

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA DA LUZ

DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM
DIAGNÓSTICO DE COVID-19

CURITIBA

2023

LETICIA DA LUZ

DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM
DIAGNÓSTICO DE COVID-19

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Meri Bordignon Nogueira

CURITIBA

2023

TERMO DE APROVAÇÃO

LETICIA DA LUZ

DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Meri Bordignon Nogueira
Orientadora – Setor de Ciências da Saúde
da Universidade Federal - UFPR

Prof^ª. Dr^ª. Sonia Mara Raboni
Avaliadora – Setor de Ciências da Saúde
da Universidade Federal - UFPR

Curitiba, janeiro de 2023

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Eunice, por todo incentivo e apoio durante todos os anos da graduação, mesmo de longe, seu amparo foi crucial para eu conseguir alcançar meus objetivos. Muito obrigada por acreditar em mim e apoiar os meus sonhos, muitas vezes em detrimento dos seus, sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao meu amor Willian, por toda palavra encorajadora, carinho e atenção nos momentos que eu mais precisei, obrigada pela enorme compreensão durante todas as vezes que eu tive que me ausentar para me dedicar à faculdade.

Aos meus amigos por todo apoio durante estes longos anos.

À equipe do laboratório de Virologia do CHC-UFPR por toda contribuição e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço especialmente à Barbará, Francielli, Indianara e Jairo, sem vocês eu não teria conseguido.

A todos os meus professores, especialmente à Prof^a. Dr^a. Meri Bordignon Nogueira pela sua orientação, competência, apoio e ensinamentos para que eu pudesse realizar este trabalho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram e estiveram comigo nessa trajetória.

RESUMO

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, reconhecida como pandemia pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020, causa infecção assintomática ou sintomas leves na maioria dos casos. Entretanto, algumas pessoas portadoras de fatores de risco como idade avançada, doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade apresentam maiores taxas de complicações. Além destes grupos, a forma grave da doença também tem atingido gestantes, onde tem-se notificado o aumento da mortalidade materna, prematuridade e óbito fetal. O impacto da elevada transmissibilidade do SARS-CoV-2 e suas variantes, a ampla variabilidade na apresentação clínica da COVID-19 e a possibilidade de transmissão vertical necessitam ser melhor estudadas em gestantes. Desta forma, este estudo visa contribuir com novos dados de evidência de transmissão vertical do SARS-CoV-2, por meio de detecção do RNA viral em amostra de líquido amniótico de gestantes positivas atendidas no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Para atingir o objetivo proposto, amostras de líquido amniótico passaram por diferentes métodos de extração e de processamento, a fim de otimizar as análises. Foram coletadas, no período de 2020 e 2021, 22 amostras de líquido amniótico de gestantes atendidas no serviço de Obstetrícia do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) com diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por teste molecular em algum momento da gestação. Do total de amostras, 17 estavam elegíveis e foram incluídas no estudo. Ao final das etapas de processamento e extração, obteve-se um total de 66 alíquotas que passaram pelo teste de RT-PCR. Das amostras estudadas, o RNA viral do SARS-CoV-2 foi detectado em duas amostras distintas: uma no sobrenadante e outra no precipitado. Neste estudo, foi possível demonstrar a importância das condições pré-analíticas envolvidas no diagnóstico da transmissão vertical, além da necessidade de se estabelecer protocolos padronizados, para um diagnóstico acurado e preciso, que otimizem essas etapas do processo envolvidas no diagnóstico de transmissão vertical do SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; transmissão vertical; líquido amniótico; gestação.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, recognized as a pandemic by the World Health Organization in March 2020, causes asymptomatic infection or mild symptoms in most cases. However, some people with risk factors such as advanced age, cardiovascular disease, diabetes and obesity have higher rates of complications. In addition to these groups, the severe form of the disease has also affected pregnant women, where an increase in maternal mortality, prematurity and fetal death has been reported. The impact of the high transmissibility of SARS-CoV-2 and its variants, the wide variability in the clinical presentation of COVID-19 and the possibility of vertical transmission need to be better studied in pregnant women. Therefore, this study aims to contribute with new evidence of vertical transmission of SARS-CoV-2, through the detection of viral RNA in a sample of amniotic fluid from positive pregnant women treated at the Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. To achieve the proposed objective, amniotic fluid samples underwent different extraction and processing methods in order to optimize the analysis. In the period 2020 and 2021, 22 samples of amniotic fluid were collected from pregnant women attended at the Obstetrics service of the Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) with a positive diagnosis for SARS-CoV-2 by molecular test in sometime during pregnancy. Of the total samples, 17 were eligible and were included in the study. At the end of the processing and extraction steps, a total of 66 aliquots were obtained that passed the RT-PCR test. Of the studied samples, SARS-CoV-2 viral RNA was detected in two different samples: one in the supernatant and the other in the precipitate. In this study, it was possible to demonstrate the importance of the pre-analytical conditions involved in the diagnosis of vertical transmission, in addition to the need to establish standardized protocols, for an accurate and precise diagnosis, which optimize these stages of the process involved in the diagnosis of vertical transmission of SARS -CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; vertical transmission; amniotic fluid; pregnancy.

LISTA DE SIGLAS

ACE-2	- Enzima conversora de angiotensina 2 (<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>)
CDC	- Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CHC-UFPR	- Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CMV	- Citomegalovírus
Ct	- Ciclo do <i>threshold</i>
FA	- Vírus da febre aftosa
HSV	- Vírus herpes simplex (<i>Herpes Simplex Virus</i>)
MERS	- Síndrome respiratória do Oriente Médio (<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>)
NAAT	- Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PSC	- Vírus da peste suína clássica
RR	- Risco relativo
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RT-qPCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (<i>Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>)
SARS	- Síndrome respiratória aguda grave (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>)
SDRA	- Síndrome do desconforto respiratório agudo
SINs	- Sinciciotrofblastos
SRAG	- Síndrome respiratória aguda grave
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TDR	- Testes de diagnóstico rápido
TMPRSS2	- Enzima serina protease transmembranar 2 (<i>Transmembrane Serine Protease 2</i>)
UTI	- Unidade de terapia intensiva
VZV	- Vírus varicela-zoster (<i>Varicella-zoster virus</i>)
ZIKV	- Vírus zika (<i>Zika virus</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	OBJETIVO GERAL	9
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
1.3	JUSTIFICATIVA	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 NA GESTAÇÃO.....	10
2.2	TRANSMISSÃO VERTICAL.....	11
2.2.1	Evidências de transmissão vertical do SARS-CoV-2.....	14
2.2.2	Categorização de transmissão vertical do SARS-CoV-2 segundo a Organização Mundial da Saúde	16
2.2.2.1	Transmissão intrauterina.....	18
2.2.2.2	Transmissão intraparto.....	19
2.2.2.3	Transmissão pós-natal.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	AMOSTRAS.....	20
3.1.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	20
3.1.2	Processamento do líquido amniótico.....	21
3.1.3	Extração de ácidos nucleicos	21
3.1.4	Teste RT-PCR para SARS-CoV-2.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXO 1 -TRANSMISSÃO INTRAUTERINA DE SARS-CoV-2:NASCIDO VIVO ...	43
	ANEXO 2 - TRANSMISSÃO INTRAUTERINA DE SARS-CoV-2: MORTE FETAL .	44
	ANEXO 3 -TRANSMISSÃO INTRAPARTO DE SARS-CoV-2	45
	ANEXO 4 - TRANSMISSÃO PRECOCE PÓS-NATAL DE SARS-CoV-2 (IDADE >48 HORAS - 28 DIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Em 29 de dezembro de 2019, os quatro primeiros casos de pneumonia de etiologia desconhecida, todos ligados ao Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan em Wuhan (sul da China) foram identificados por hospitais locais (LI *et al.*, 2020). Amostras de pacientes que apresentaram esta pneumonia foram coletadas e um novo *Betacoronavírus* previamente desconhecido foi descoberto por meio de isolamento e sequenciamento genético, o novo coronavírus recém isolado foi denominado inicialmente 2019-nCoV (ZHU *et al.*, 2020).

Entre dezembro de 2019 e março de 2020 houve um aumento exponencial de novos casos de pneumonia causada pelo novo coronavírus, mas somente em 11 de março de 2020, quando a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) já havia se espalhado pelo mundo inteiro, a OMS definiu o surto como uma pandemia. (LI *et al.*, 2020; OMS, 2020a).

Apenas uma pequena parcela dos pacientes infectados, geralmente idosos, gestantes e pacientes com comorbidades, evolui para forma mais grave da doença, necessitando de hospitalização e/ou internação em unidade de terapia intensiva (UTI) (TROUGAKOS *et al.*, 2021; NARANG *et al.*, 2020). Discussões sobre a infecção pelo SARS-CoV-2 e suas consequências na gestante permanecem controversas. No entanto, é bem conhecido que as adaptações maternas fisiológicas à gravidez predispõem as mulheres grávidas a um curso mais grave de pneumonia, com subsequente maior morbimortalidade materna e fetal (WASTNEDGE *et al.*, 2020).

Diversos estudos vêm demonstrando que gestantes são mais suscetíveis às complicações das doenças causadas pelos vírus pertencentes ao gênero Coronavírus, como a síndrome respiratória aguda grave (SARS), a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), bem como a COVID-19, (doença do coronavírus 2019), quando comparadas a população geral (MASCIO *et al.*, 2020). E à medida que esses estudos avançam e as infecções em gestantes por SARS-CoV-2 aumentam, há uma preocupação sobre a transmissão intrauterina (WASTNEDGE *et al.*, 2020). O impacto da elevada transmissibilidade do SARS-CoV-2 e suas variantes, o risco de transmissão vertical, a ampla variabilidade na apresentação clínica da COVID-19 necessitam ser melhor estudadas em gestantes, devido ao risco de mortalidade materna, prematuridade e óbito fetal (VILLAR *et al.*, 2021). Desta forma, este estudo aponta para uma importante realidade clínica e laboratorial a ser

investigada, que trata do diagnóstico da transmissão vertical do SARS-CoV-2 da COVID-19, para contribuir com o estabelecimento de protocolos que possibilitem um diagnóstico acurado e preciso.

1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se há evidência de transmissão vertical do SARS-CoV-2 pela detecção do RNA viral em amostra de líquido amniótico de gestantes positivas atendidas no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar o processamento de amostras de líquido amniótico, sobrenadante e precipitado.
- Avaliar se houve diferença na detecção do RNA viral, após diferentes protocolos de processamento.

1.3 JUSTIFICATIVA

Há poucos dados sobre os aspectos da infecção viral em mulheres gestantes, bem como o risco de transmissão vertical e os comprometimentos fetais e neonatais. Contudo, publicações têm mostrado que mulheres gestantes e puérperas são mais suscetíveis a complicações. Apesar da grande dificuldade para confirmar a transmissão vertical do SARS-CoV-2 e associar o comprometimento fetal e neonatal, inúmeras pesquisas conseguiram evidenciar a transmissão intrauterina por meio da detecção do SARS-CoV-2 em diferentes amostras.

A comprovação da transmissão vertical se dá pela detecção do RNA viral na placenta, sangue de cordão ou líquido amniótico. Os métodos de detecção do RNA viral não foram desenvolvidos para essas amostras, necessitando de padronização e validação adequada. Controlar as condições adequadas de coleta, armazenamento e processamento dessas amostras é um grande desafio, devido à falta de estudos que orientem esses processos para que seja possível afirmar e quantificar o risco real e as condições da transmissão vertical do SARS-CoV-2. Além disso, o entendimento da dinâmica da doença na gestante e no bebê, depende da coleta adequada de todas as

amostras que possam contribuir para esta avaliação. Mesmo quando se comprova a transmissão vertical, é difícil observar a presença do RNA viral nas diferentes amostras, visto que a carga viral pode ser baixa e o RNA viral pode não estar presente em todas as amostras em quantidade suficiente para ser detectado por métodos moleculares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método diagnóstico rápido, sensível e específico para detectar patógenos associados a infecções e doenças genéticas, mas está sujeito a interferências, como qualquer teste laboratorial, especialmente na fase pré-analítica. Este trabalho visa padronizar os protocolos de processamento de amostra de líquido amniótico, extração do RNA do SARS-CoV-2 e contribuir com novos dados de evidência de transmissão vertical desse vírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 NA GESTAÇÃO

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou o surto de síndrome respiratória aguda grave por coronavírus 2, uma pandemia, devido ao seu número crescente de casos em todo o mundo (OMS, 2020a).

A COVID-19, (doença por coronavírus 2019), causou mais de 665 milhões de infecções e 6,7 milhões de mortes em todo mundo (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (JHU). Center for Systems Science and Engineering (CSSE), 2023).

Enquanto a maioria dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 não precisam de hospitalização, uma minoria como idosos, gestantes e portadores de comorbidades apresenta sintomas mais graves que requerem hospitalização e podem apresentar complicações graves com risco de vida, incluindo síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), que pode desencadear um colapso sistêmico de múltiplos órgãos, levando à morte (TROUGAKOS *et al.*, 2021; NARANG *et al.*, 2020).

Mulheres grávidas apresentam alterações fisiológicas significativas nos sistemas imunológico e respiratório, na função cardiovascular e na coagulação, estas alterações podem ter um impacto importante na progressão da COVID-19 (WASTNEDGE *et al.*, 2020).

Uma análise epidemiológica conduzida pelo CDC entre janeiro e outubro de 2020, constatou que mulheres grávidas infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentaram um aumento na taxa de admissão em unidades de terapia intensiva, necessidade de

oxigenação suplementar e mortalidade. Em outra análise também conduzida pelo CDC entre março e agosto de 2020 com 598 gestantes, foi verificado que a incidência de partos prematuros em gestantes hospitalizadas devido a COVID-19, era de 12,6%, uma taxa maior que a observada na população geral dos EUA em 2010, que foi de 10%. Além disso, também foi observado que a incidência de partos prematuros em gestantes sintomáticas era três vezes maior do que gestantes assintomáticas (ZAMBRANO *et al.*, 2020; DELAHOY *et al.*, 2020).

Já um estudo de coorte multinacional comparando 706 pacientes grávidas com diagnóstico de COVID-19 com 1.424 mulheres grávidas sem diagnóstico de COVID-19, demonstrou que aquelas com COVID-19 apresentaram um risco 5,04 vezes maior de admissão em UTI, um risco relativo (RR) de 22,3 vezes de mortalidade materna, pré-eclâmpsia: 1,76; parto prematuro: 1,59; morbidade neonatal grave: 2,66 e mortalidade perinatal grave que inclui óbito intrauterino ou neonatal: 2,14 (VILLAR *et al.*, 2021).

Outro estudo de coorte realizado nos EUA, incluiu 869.079 mulheres grávidas que receberam atendimento em um dos 499 centros, destas pacientes, 18.715 tiveram COVID-19 (2,2%). O estudo também demonstrou que pacientes com COVID-19 foram significativamente mais propensas a ter parto prematuro na proporção de 16,4% versus 11,5%. Elas tiveram taxas significativamente mais altas de admissão na UTI, 5,2% vs; 0,9% e intubação respiratória 1,5% vs, 0,1%, bem como um aumento de 10 vezes no risco de mortalidade hospitalar com 0,1% das pacientes grávidas com COVID-19 indo a óbito durante a admissão (CHINN *et al.*, 2021).

Maiores estudos são necessários para entender a vulnerabilidade de gestantes à infecção por SARS-CoV-2. Conforme estes estudos prosseguem, há uma preocupação sobre a possibilidade de transmissão intrauterina, uma vez que a transmissão vertical é documentada, mas os mecanismos ainda não são completamente compreendidos (WASTNEDGE *et al.*, 2020).

2.2 TRANSMISSÃO VERTICAL

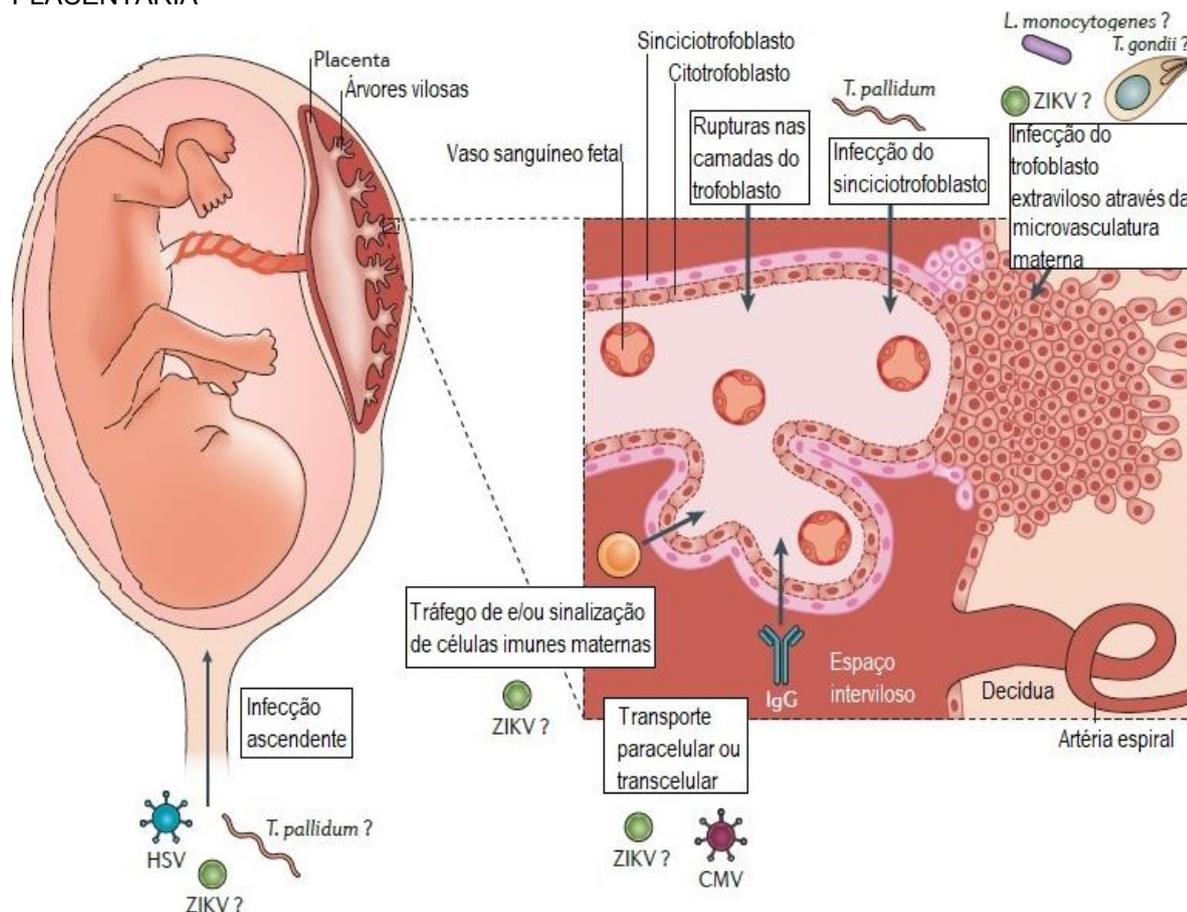
Para atingir o feto humano, certos patógenos devem superar a barreira placentária, que se desenvolve poucos dias após a concepção e é indispensável para a manutenção da gravidez. A placenta forma uma barreira física e imunológica entre a mãe e o feto, servindo para proteger o feto em desenvolvimento da infecção e

rejeição materna, facilitando a troca de nutrientes e eliminação de resíduos (COYNE; LAZEAR, 2016; MOORE; SUTHAR, 2021).

Nos estágios iniciais da gravidez, a placenta humana é responsável por estabelecer o sistema circulatório que proverá o sangue materno diretamente no espaço interviloso (FIGURA 1). Esse espaço é composto de líquido que envolve as superfícies das vilosidades da placenta humana, as vilosidades, por sua vez, são formadas por sinciciotrofoblastos (SINs). Devido ao seu contato direto com o sangue materno, os SINs são cruciais para proteger o feto de patógenos. A camada de SINs forma uma barreira protetora mesmo nos estágios iniciais da gravidez. Uma vez que o sistema circulatório uteroplacentário esteja totalmente estabelecido, o que ocorre ao final do primeiro trimestre, a placenta é a única barreira que impede o acesso de microrganismos do sangue materno ao compartimento fetal (COYNE; LAZEAR, 2016).

Certos patógenos são conhecidos por superar a barreira placentária, às vezes com efeitos devastadores no desenvolvimento gestacional. Embora o mecanismo exato de transmissão transplacentária de muitos microrganismos seja desconhecido, sabemos que a transmissão vertical de patógenos da mãe para o feto pode ocorrer por diferentes vias (FIGURA 1), incluindo: infecção de células endoteliais na microvasculatura materna e disseminação para trofoblastos extravilosos invasivos, que são as células que ancoram as árvores vilosas à parede uterina; tráfego de células imunes maternas infectadas através da barreira placentária; transporte paracelular ou transcelular do sangue materno através das árvores vilosas e para os capilares fetais; danos à árvore vilosa e quebras na camada SIN; e/ou infecção ascendente transvaginal (COYNE; LAZEAR, 2016).

FIGURA 1 - ROTAS USADAS POR PATÓGENOS PARA ULTRAPASSAR A BARREIRA PLACENTÁRIA



FONTE: Adaptado de COYNE; LAZEAR, (2016).

Patógenos como o citomegalovírus (CMV), vírus herpes simplex (HSV), vírus varicela-zoster (VZV) e vírus zika (ZIKV) ao atravessarem a barreira placentária podem causar síndromes congênitas, com taxas variáveis de transmissão e gravidade, que dependem, em parte, do estágio da gravidez em que a infecção ocorre. É importante destacar que muitas dessas infecções podem ter efeitos menores na mãe e há pouca correlação entre a sintomatologia materna e a gravidade dos efeitos fetais. Infecções na gravidez são sempre preocupantes, mas é importante destacar que, primeiro, a presença de microrganismos na superfície placentária não indica necessariamente infecção placentária, uma vez que a transmissão vertical depende da violação da barreira placentária. Segundo, a infecção das células placentárias por patógenos não significa necessariamente que haja transmissão para o feto. Terceiro, mesmo quando ocorre infecção fetal, as respostas são variáveis, assim, a infecção fetal nem sempre significa dano ao feto (WASTNEDGE *et al.*, 2020).

2.2.1 Evidências de transmissão vertical do SARS-CoV-2

Um caso relatado no Hospital de Lausanne, Suíça demonstrou a expressão de SARS-CoV-2 em amostra colhida da placenta após uma perda fetal espontânea na 19ª semana de gestação. A gestante com 28 anos, obesa, primigesta, que apresentou sintomas característicos da infecção por SARS-CoV-2, confirmado por *swab* nasofaríngeo. Ela foi medicada e recebeu alta hospitalar e dois dias depois, apresentou febre e fortes contrações uterinas que evoluíram para trabalho de parto, com o nascimento de um feto natimorto. *Swabs* das axilas, boca, mecônio e sangue fetal obtidos poucos minutos após o nascimento testaram negativo para SARS-CoV-2 e infecção bacteriana. A autópsia fetal não mostrou malformações e as biópsias fetais de pulmão, fígado e timo foram negativas para SARS-CoV-2. A superfície fetal da placenta foi colhida, além de dois *swabs* e biópsias, que foram negativos para infecção bacteriana ou fúngica, mas estavam positivos para SARS-CoV-2. O estudo, embora com um único caso, indica a necessidade de uma investigação mais aprofundada para confirmar se o SARS-CoV-2 cruza a barreira placentária (BAUD *et al.*, 2020).

Um outro estudo de caso também revelou tecido placentário e amostra de líquido amniótico positivos para SARS-CoV-2. A gestante, com 23 anos, primigesta, com 35 semanas, quando admitida apresentava sintomas da infecção por SARS-CoV-2, tendo o vírus sido detectado no sangue e em *swabs* nasofaríngeos e vaginais. A gravidez evoluiu sem intercorrências e todos os exames de ultrassonografia e exames de rotina foram normais até o diagnóstico da COVID-19. Três dias após a admissão, foi constatado padrão anormal em exame de cardiotocografia, os achados eram sugestivos de frequência cardíaca fetal de categoria III, que está fortemente associado a desfechos neonatais adversos. Foi realizado parto cesárea e o recém-nascido precisou ser transferido para unidade de terapia intensiva neonatal (UTI). Foram coletados durante a cesariana: líquido amniótico, sangue e lavado broncoalveolar não broncoscópico do recém-nascido, além de *swabs* nasofaríngeos e retais do recém-nascido foram coletados pela primeira vez na primeira uma hora de vida e depois repetidos aos 3 e 18 dias de idade, sendo que todas as amostras foram positivas para SARS-CoV-2. O exame da placenta também foi positivo para SARS-CoV-2, sendo a carga viral maior nesse tecido do que nas demais amostras, sugerindo a presença viral nas células placentárias. Os exames histológicos realizados na placenta também demonstraram alterações significativas e é importante destacar que as curvas de RT-

PCR dos *swabs* nasofaríngeos neonatais aos 3 e 18 dias de vida foram maiores do que no primeiro dia, indicando infecção real e não uma contaminação, demonstrando transmissão pela placenta (VIVANTI *et al.*, 2020).

Outros estudos também relataram a possibilidade de transmissão transplacentária do SARS-CoV-2: uma gestante de 42 anos sintomática admitida no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) testou positivo para SARS-CoV-2; seis dias depois foi observado ausência de movimentos fetais, foi realizado uma cesariana, o feto nasceu morto, amostras de placenta e sangue do cordão umbilical foram coletadas e testaram positivo para o SARS-CoV-2 por RT-PCR (STONOGA *et al.*, 2021). Outro relato de caso descreve uma mulher iraniana de 22 anos, grávida de 32 semanas, também com diagnóstico positivo para COVID-19, que precisou passar por uma cesárea após piora nos sintomas da doença, e deu à luz um recém-nascido pesando 2,4 kg sem intercorrências. Sangue de cordão umbilical e líquido amniótico foram coletados, bem como *swabs* nasais, destas amostras, o teste do líquido amniótico foi positivo para o SARS-CoV-2. Foi realizado um segundo teste de *swab* nasal que foi positivo 24 horas depois. Infelizmente a condição de saúde da mãe piorou drasticamente, evoluindo para óbito (ZAMANIYAN *et al.*, 2020). Outro estudo que relata uma possível transmissão transplacentária em gestante de 40 anos, internada em um hospital de Toronto, Canadá. A paciente com diagnóstico positivo para COVID-19 foi submetida a uma cesariana, dando à luz um recém-nascido com 2,930 kg. Foram coletadas amostras da placenta e *swabs* nasofaríngeos, estes, obtidos no segundo e sétimo dia após o nascimento, todos os três *swabs* foram positivos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR, além do exame histopatológico da placenta também ter apresentado alterações significativas (KIRSTMAN *et al.*, 2020).

Já outros dois estudos, realizados em Wuhan, China, descrevem resultados positivos em testes para anticorpos IgM e IgG em amostras de *swabs* nasofaríngeos de recém nascidos de mães com diagnóstico positivo para COVID-19. O primeiro relato trata-se de uma recém-nascida que apresentou níveis elevados de IgM, indicando que a infecção possa ter ocorrido ainda no útero, uma vez que IgM não ultrapassa a placenta, sendo um bom marcador para o diagnóstico de infecções congênitas. O segundo estudo foi realizado com seis crianças, sendo que cinco apresentaram níveis elevados de anticorpos da classe IgG, das quais, duas também

apresentaram níveis elevados de IgM, indicando a possibilidade de infecção congênita (DONG *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020).

2.2.2 Categorização de transmissão vertical do SARS-CoV-2 segundo a Organização Mundial da Saúde

Devido ao número crescente de mulheres grávidas com diagnóstico de COVID-19, uma possível vulnerabilidade de gestantes à infecção por SARS-CoV-2, conforme relatado anteriormente, somado a possibilidade de transmissão vertical do SARS-CoV-2, a OMS publicou em 2021 um resumo científico que propõe um sistema de classificação da transmissão vertical do SARS-CoV-2. Os momentos de transmissão foram classificados em transmissão intrauterina, transmissão intraparto e transmissão pós-natal, subcategorizando a transmissão intrauterina em nascidos-vivos ou em natimortos. Para todos estes momentos é necessária evidência de infecção materna por SARS-CoV-2 em qualquer período da gestação. As gestantes podem ser classificadas como caso suspeito, provável ou confirmado de infecção por SARS-CoV-2, estes critérios também são estabelecidos pela OMS (OMS, 2021).

O QUADRO 1 traz as definições de caso suspeito, provável ou confirmado, o conteúdo foi baseado no documento publicado pela OMS: Vigilância de Saúde Pública para COVID-19. Orientação provisória (OMS, 2020b). O resumo dos testes que podem ser utilizados para detecção e confirmação de infecção aguda por SARS-CoV-2 em indivíduos com suspeita clínica de COVID-19 também foi retirado de outro guia provisório da OMS (OMS, 2020c).

QUADRO 1 - DEFINIÇÃO DE CASO SUSPEITO, PROVÁVEL OU CONFIRMADO SEGUNDO A OMS

Caso suspeito de COVID-19		Caso provável de COVID-19	Caso confirmado de COVID-19
Critérios Clínicos	Epidemiológicos		
<p>1. Febre, tosse, fraqueza e/ou fadiga geral, cefaleia, mialgia, dor de garganta, coriza, dispneia, etc.</p> <p>2. Paciente com Síndrome respiratória aguda grave (SRAG) com história de febre ou febre medida ≥ 38 °C e tosse com início nos últimos 10 dias e que necessita de hospitalização.</p>	<p>1. Residir ou trabalhar em uma área com alto risco de transmissão do vírus: por exemplo, ambientes residenciais fechados e ambientes humanitários, etc.</p> <p>2. Residir ou viajar para uma área com transmissão comunitária a qualquer momento nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas.</p> <p>3. Trabalhar em ambiente de saúde, incluindo unidades de saúde e domicílios, a qualquer momento nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas.</p>	<p>1. Paciente que preenche os critérios clínicos e tem contato com um caso provável ou confirmado, ou epidemiologicamente vinculado a um grupo de casos em que tenha havido pelo menos um caso confirmado identificado.</p> <p>OU</p> <p>2. Um caso suspeito (descrito acima) com exame de imagem de tórax mostrando achados sugestivos de COVID-19.</p> <p>OU</p> <p>3. Pessoa com início recente de anosmia (perda do olfato) ou ageusia (perda do paladar) na ausência de qualquer outra causa identificada.</p> <p>OU</p> <p>4. Morte, não explicada de outra forma, em adultos com dificuldade respiratória anterior à morte E que era contato de um caso provável ou confirmado ou epidemiologicamente ligado a um cluster em que tenha havido pelo menos um caso confirmado identificado.</p>	<p>1. Uma pessoa com confirmação laboratorial de infecção por SARS-CoV-2, independentemente dos sinais e sintomas clínicos.</p> <p>Abaixo estão descritos os diferentes testes que podem ser utilizados para detecção de infecção aguda por SARS-CoV-2:</p> <p>Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAAT): Têm como alvo o genoma do SARS-CoV-2, sempre que possível, as suspeitas de infecções ativas por SARS-CoV-2 devem ser testadas com NAAT, como RT-PCR.</p> <p>Testes de diagnóstico rápido com base na detecção de antígenos (TDR): São os testes responsáveis por detectarem a presença de proteínas virais (antígenos) de SARS-CoV-2 em diferentes amostras.</p> <p>Testes sorológicos disponíveis para detecção de anticorpos: São testes que medem anticorpos como IgG, IgM e/ou IgA produzidos pelo corpo humano em resposta à infecção por SARS-CoV-2.</p>

FONTE: Adaptado de OMS (2020b e 2020c).

NOTA: Para o caso suspeito de COVID-19, a pessoa deve preencher os critérios clínicos e epidemiológicos, exceto quando o indivíduo for diagnosticado com Síndrome respiratória aguda grave.

LEGENDA:RT-PCR= reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa.

Verificada a evidência de infecção materna, conforme as definições estabelecidas anteriormente, é preciso ainda confirmar a exposição fetal ao vírus para cada momento de transmissão, (“in útero”, intraparto ou no período pós-natal precoce). A OMS também preconiza os testes necessários para cada tempo de transmissão. Com base nos testes realizados e no tipo da amostra coletada, os momentos de transmissão são classificados em 4 categorias, mutuamente exclusivas: transmissão vertical confirmada, transmissão vertical possível (evidência sugestiva, mas não confirmatória para infecção), improvável (pouco suporte para o diagnóstico, mas infecção não pode ser completamente descartada) e indeterminado (quando não foram realizados os testes necessários para definir a classificação (OMS, 2021).

2.2.2.1 Transmissão intrauterina

A transmissão intrauterina pode ocorrer pela via hematogênica ou, mais raramente, pela via ascendente. A maioria dos patógenos são transmitidos “in útero” por meio de uma infecção sistêmica na gestante, esta condição permite que os patógenos tenham acesso à placenta. Uma vez que o patógeno atinja a placenta, ele deve atravessar a barreira placentária para ter acesso aos vasos fetais, atingir o feto e causar infecção. Alguns estudos demonstraram a expressão do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) associado à membrana celular e a enzima serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) necessários para a entrada do SARS-CoV-2, também em células placentárias, embora haja dados conflitantes relacionados a extensão da co-expressão e expressão diferencial por idade gestacional. Além disso, SARS-CoV-2 também está associado a danos vasculares, incluindo hipercoagulopatia em mulheres grávidas e lesão isquêmica na placenta, nestas condições, o vírus pode atingir o feto sem necessariamente infectar células placentárias. O ANEXO 1 e o ANEXO 2 trazem informações detalhadas do fluxo necessário para classificar a transmissão intrauterina em nascidos vivos e para casos de morte fetal, respectivamente (OMS, 2021).

A transmissão intrauterina para nascidos vivos requer: evidência de infecção materna por SARS-CoV-2 a qualquer momento durante a gravidez, evidências de exposição fetal no útero e persistência de SARS-CoV-2 ou resposta imune no neonato. É importante que as amostras sejam coletadas e testadas nas primeiras 24 horas de vida para confirmação de exposição fetal e que as análises de persistência

viral ocorram entre as 24-48 horas de vida. Maiores detalhes estão descritos no ANEXO 1 (OMS, 2021).

A transmissão intrauterina do SARS-CoV-2 em casos de morte fetal requer: evidência de infecção materna por SARS-CoV-2 a qualquer momento durante a gravidez e detecção de SARS-CoV-2 em tecido fetal, líquido amniótico ou amostras placentárias, maiores detalhes estão descritos no ANEXO 2 (OMS, 2021).

2.2.2.2 Transmissão intraparto

Em relação à transmissão intraparto, a contaminação fecal do canal/vulva vaginal durante o trabalho de parto e parto poderia potencialmente permitir a contaminação viral por SARS-CoV-2 da oro/nasofaringe neonatal durante o parto vaginal. Também pode haver contaminação viral no ambiente durante o trabalho de parto e parto ou imediatamente após o parto, por gotículas e aerossóis gerados pela mulher infectada durante o trabalho de parto ativo, bem como a contaminação fecal materna do ambiente próximo, particularmente durante o parto vaginal, que pode levar à infecção viral pelo neonato imediatamente após o nascimento. Estes achados podem dificultar a distinção da infecção viral infantil durante a passagem pelo canal do parto da infecção viral horizontal do SARS-CoV-2 no período pós-natal imediato. O ANEXO 3 traz informações detalhadas do fluxo necessário para confirmação de transmissão intraparto do SARS-CoV-2, que requer: evidência de infecção materna por SARS-CoV-2 perto do momento do nascimento, evidência de falta de SARS-CoV-2 fetal “in útero” e exposição intraparto ao SARS-CoV-2 com persistência viral ou resposta imune no bebê. É importante que as amostras sejam coletadas e testadas nas primeiras 24 horas de vida para confirmação da falta de exposição fetal e que as análises de exposição intraparto com persistência viral ocorram entre as 24-48 horas de vida (OMS, 2021).

2.2.2.3 Transmissão pós-natal

A transmissão pós-natal de SARS-CoV-2 parece ser responsável pela maioria das infecções relatadas em neonatos, provavelmente representando exposição à mãe infectada, outros cuidadores ou fômites. Embora o SARS-CoV-2 tenha sido detectado por ensaios baseados na detecção do genoma viral por (RT-PCR) no leite materno,

esse achado parece ser incomum e até o momento nenhum vírus competente para replicação foi detectado. No período pós-natal, os bebês podem ser expostos ao SARS-CoV-2 da mãe infectada, de outros cuidadores e/ou do ambiente do neonato, dificultando a determinação da fonte de infecção pós-natal, caso ocorra. A transmissão precoce pós-natal de SARS-CoV-2 (idade > 48 horas - 28 dias) requer: evidência de infecção materna perto do momento do nascimento, evidência para mostrar falta de exposição “in útero” e ausência de exposição intraparto e exposição pós-natal precoce ao SARS-CoV-2 e persistência viral ou resposta imune no bebê. As amostras devem ser coletadas e testadas nas primeiras 48 horas de vida para confirmação de ausência de exposição intrauterina ou no momento do parto e o teste de persistência viral também deve ser realizado nas primeiras 48 horas de vida. Maiores detalhes estão disponíveis no ANEXO 4 (OMS, 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de líquido amniótico de gestantes com diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por teste molecular (RT-qPCR) em algum momento durante a gestação. Assim, conforme estabelece as definições da OMS (QUADRO 1), trata-se de casos confirmados de COVID-19. Estas amostras foram coletadas no período de 2020 e 2021, com assinatura de TCLE relacionadas ao projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do CHC-UFPR, sob o número CAAE:35129820.6.0000.0096

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo amostras de líquido amniótico de gestantes que tiveram resultado de RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2 durante qualquer período da gestação. Foram excluídas do estudo amostras sem o resultado de RT-qPCR disponível e com volume insuficiente para realizar as análises.

3.1.2 Processamento do líquido amniótico

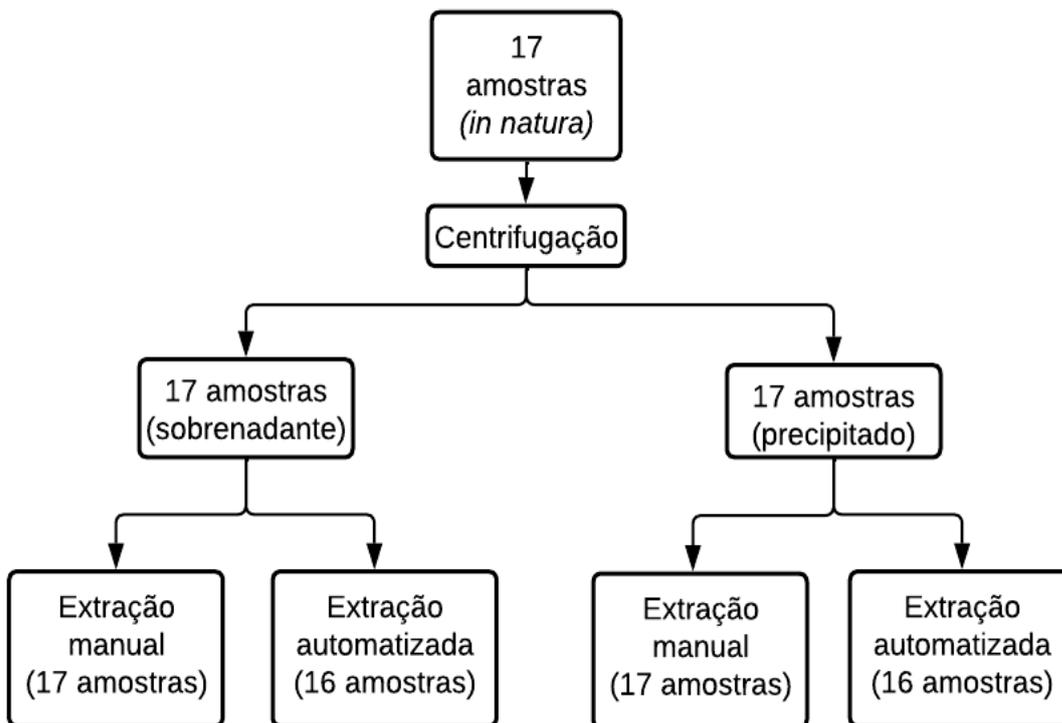
O protocolo de processamento das amostras foi adaptado do estudo de Calvet *et al.* (2016). Conforme relatado: 1mL de cada amostra do líquido amniótico foi centrifugada a 15.000 rpm, durante 90 minutos a 4° C, posteriormente o sobrenadante foi transferido para microtubo livre de nucleases. O precipitado foi ressuspendido com 500 uL de água ultrapura e, então, transferido também para microtubo livre de nucleases. Ao final do processamento obteve-se um total de 34 alíquotas, sendo 17 do sobrenadante e 17 do precipitado. As amostras foram estocadas a -70°C até à extração dos ácidos nucleicos.

3.1.3 Extração de ácidos nucleicos

O isolamento do ácido nucleico é considerado um dos passos mais importantes em qualquer técnica molecular. A extração de DNA e/ou RNA de tecidos biológicos requer ruptura das estruturas teciduais e celulares, desnaturação de complexos de nucleoproteínas, inativação de nucleases e por fim purificação de ácidos nucleicos. Uma extração bem-sucedida de ácido nucleico deve seguir protocolos padronizados, seguindo especificidades para cada amostra. Essas etapas podem ser modificadas com base no ácido nucleico de interesse e fonte de amostra biológica. (MULLEGAMA *et al.*, 2019)

Para este estudo, sobrenadante e precipitado de cada amostra foram submetidos ao isolamento do RNA viral por dois métodos: manual e automatizado. No método manual foi utilizado o Kit comercial PureLink™ Viral RNA/DNA Mini kit (Invitrogen). Já no método automatizado o Kit utilizado foi o Extracta 32 Kit Fast-DNA e RNA Viral (Loccus) em extrator automatizado Extracta 32 do mesmo fabricante, em ambas as técnicas foram seguidas as orientações do manual do fabricante. Ao final da extração foram obtidas 66 alíquotas dos produtos eluídos das extrações, que, posteriormente, foram estocadas a -70°C, até o momento da realização do teste de RT-PCR.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS



FONTE: A autora (2022)

Devido ao volume insuficiente da amostra de líquido amniótico numeração interna 1911/20, foi possível realizar somente a extração manual para esta alíquota.

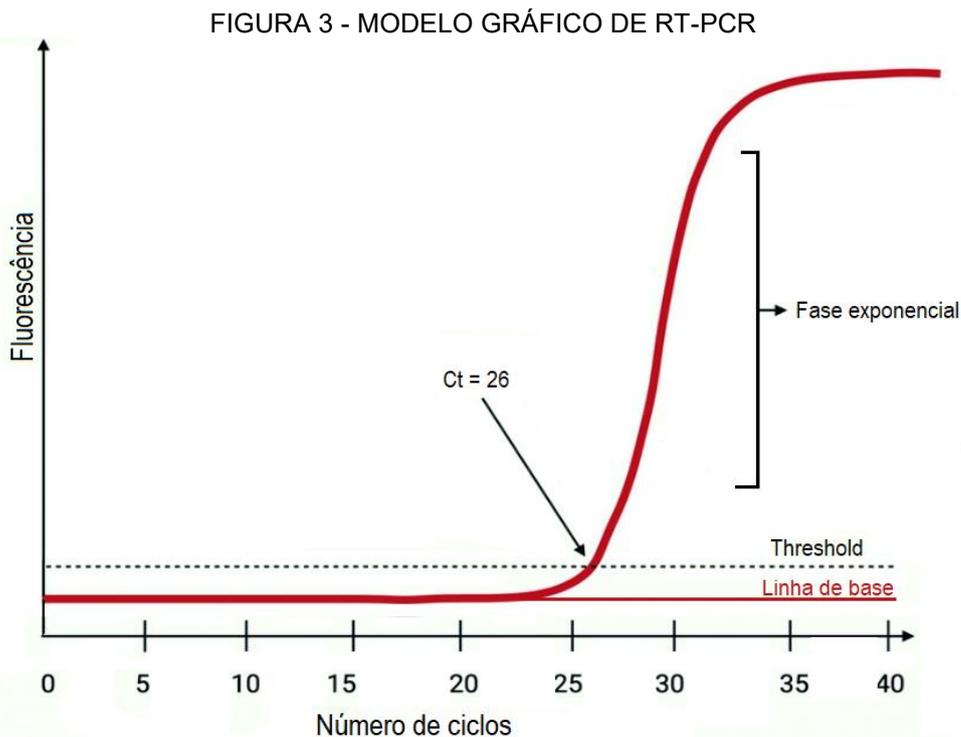
3.1.4 Teste RT-PCR para SARS-CoV-2

Devido à sua especificidade e sensibilidade, juntamente com seu potencial de alto rendimento e a introdução contínua de novas químicas, instrumentação mais confiável e protocolos aprimorados, a RT-PCR tornou-se a tecnologia de referência para a detecção e/ou quantificação de RNA. A reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa, (RT-qPCR), usa moléculas fluorescentes para monitorar a síntese de produtos de amplificação durante cada ciclo da PCR, ela combina as etapas de transcrição reversa (para vírus RNA), amplificação e detecção de ácido nucleico em um ensaio homogêneo e elimina a necessidade de eletroforese em gel de agarose para detectar produtos amplificados (BUSTIN *et al.*, 2005).

Primeiramente, como parte fundamental do processo, ocorre a transcrição reversa do RNA por ação enzimática para obtenção do DNA, que permite que ele seja

amplificado e copiado, posteriormente em cada um dos ciclos, (geralmente são realizados até 40 ciclos) existem 3 etapas: Desnaturação, o material genético é incubado em alta temperatura para que haja a abertura da fita dupla de DNA, seguida pelo anelamento, onde são adicionados fragmentos genéticos denominados *primers*, que geralmente são compostos por 18-24 nucleotídeos complementares a sequências específicas de DNA, caso os primers complementem as sequências específicas, ligações de hidrogênio serão formadas entre as bases pareadas. Alguns dos fragmentos participarão de futuras ampliações, enquanto outros, previamente marcados e capazes de emitir um sinal fluorescente na presença de seu alvo, serão os que detectarão a presença do vírus ou de seus fragmentos. E por último ocorre a extensão ou alongamento, pela ação da polimerase, enzima capaz de transcrever ou replicar ácidos nucleicos em temperaturas de 70-72 °C (CUMPLIDO *et al.*, 2021).

Os ciclos são repetidos consecutivamente, copiando as partes específicas do DNA viral até que o sistema detecte a presença do alvo molecular de interesse. Para isto, primeiramente, é necessário determinar a linha de base (sinal de fundo ou ruído) e a partir deste ponto, calcula-se o limiar entendido como o nível do sinal fluorescente que representa o início da fase exponencial de amplificação gênica, (*threshold*). E o Ct (ciclo do *threshold*) corresponde ao número de ciclos necessários para o início da amplificação, ou seja, o momento em que a fluorescência emitida cruza a linha *threshold*. Para avaliar a presença do vírus na amostra, determina-se o número de ciclos Ct necessários para que o teste seja positivo, ou seja, indica o momento preciso da amplificação em que o teste é capaz de identificar a presença do alvo molecular investigado. Assim, o Ct é um valor semiquantitativo inversamente proporcional à quantidade de RNA na amostra, de forma que um baixo número de Ct está relacionado a uma maior carga viral e vice-versa (CUMPLIDO *et al.*, 2021).



FONTE: Adaptado de JAYAKODY *et al.* (2021)

Para detecção de SARS-CoV-2, as amostras previamente extraídas foram submetidas à RT-qPCR, utilizando Kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene. Este dispositivo de diagnóstico é um ensaio de PCR em tempo real multiplex que permite amplificação e detecção simultânea de ácidos nucleicos alvos: gene RdRP (gene da polimerase de RNA dependente de RNA) e gene N (gene da proteína do nucleocapsídeo) específicos para SARS-CoV-2, além do gene E (gene da proteína do envelope) particular de todos os Sarbecovírus, incluindo SARS-CoV-2. Além disso, um gene humano exógeno é usado como Controle Interno (CI) para monitoração de todo o processo desde a coleta de amostras, a extração de ácido nucleico e, também, para verificar qualquer possível inibição de PCR (SEEGENE, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O QUADRO 2 traz informações sobre os dados clínicos, as características demográficas das gestantes e informações gerais das amostras de líquido amniótico em que foi possível realizar a coleta. Das 17 gestantes incluídas no estudo, uma teve diagnóstico de COVID-19 no primeiro trimestre da gestação, três se infectaram no segundo trimestre e 11 gestantes no terceiro trimestre, estes dados podem ser visualizados na FIGURA 4.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONTINUA)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
1	1911/20	45	26	Tosse seca, dispneia, febre, anosmia, ageusia, náusea, vômito e diarreia.	Pré-eclâmpsia e diabetes mellitus gestacional.	Mãe: Evolui para insuficiência respiratória hipoxêmica com intubação orotraqueal, após 13 dias ocorreu o desmame da oxigenioterapia. No 14º dia recebeu alta. Feto: Realização de cesariana; Idade gestacional: 28 semanas, óbito fetal.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 3 dias antes do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.
2	2552/20	38	28	Febre referida, mal-estar e tosse que evoluiu com dispneia.	Hipotireoidismo pré-gestacional.	Mãe: Internada na Unidade de terapia intensiva com hipotensão e taquipneia, três dias depois foi transferida para enfermaria, recebendo alta 6 dias depois. Feto: Realização de cesariana devido a sofrimento fetal agudo; Idade gestacional: 28 semanas; Apgar: 6/9; peso: 1,100Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 4 dias antes do parto; Exame realizado pelo: LACEN-PR.
3	7675/20	26	32	Febre e dor de garganta.	Toxoplasmose aguda e hipotireoidismo.	Mãe: - Feto: Realização de cesariana. Idade gestacional: 38 semanas; Apgar: 9/10; peso: 2,935Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 42 dias antes do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONTINUAÇÃO)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
4	9177/20	27	37	Tosse e dispneia.	Diabetes mellitus gestacional.	Mãe: Recebeu alta após 2 dias da data da admissão hospitalar. Feto: Realização de cesariana eletiva após a alta hospitalar. Idade gestacional:39 semanas; Apgar: 8/9; peso: 3,150Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 12 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.
5	9718/20	22	34	Anosmia, ageusia, cefaleia e coriza.	Asma, transtorno de ansiedade generalizada e obesidade.	Mãe: - Feto: Realização de cesariana. Idade gestacional:38 semanas; Apgar: 8/8; peso 3,065Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 33 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.
6	546/21	23	36	Cefaleia, febre, tosse, dispneia, ageusia e anosmia.	-	Mãe: Frequência respiratória e saturação de oxigênio fora dos parâmetros recomendados, transferida para Unidade de terapia intensiva, recebeu alta após 19 dias. Feto: Realização de cesariana devido a piora materna. Idade gestacional:36 semanas; Apgar: 8/10; peso: 2,945Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado no dia do parto; Exame realizado pelo: IBMP.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONTINUAÇÃO)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
7	755/21	34	34	Prostração, coriza, tosse, diarreia, anosmia e vômito.	-	Mãe: - Feto: Realização de cesariana devido à cesariana prévia. Idade gestacional: 39 semanas; Apgar: 9/9; peso: 3,685Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 26 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.
8	758/21	29	34	Febre, tosse, anosmia e diarreia.	Diabetes mellitus gestacional, obesidade, hipotireoidismo, ex-usuária de substância psicoativa e histórico de sífilis devidamente tratada.	Mãe: - Feto: Realização de cesariana devido ao risco materno. Idade gestacional: 34 semanas; Apgar: 9/9; peso: 2,770Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado no dia do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONTINUAÇÃO)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
9	2448/21	32	38	Febre sem melhora, mialgia, anosmia e mal estar geral.	-	Mãe: - Feto: Realização de cesariana. Idade gestacional: 38 semanas; Apgar: 8/9; peso: 3,400Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado no dia do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.
10	3748/21	30	30	Tosse e cansaço leve.	Diabetes mellitus gestacional, pré-eclâmpsia, obesidade e infecção do trato urinário de repetição	Mãe: Não internou por COVID-19. Feto: Realização de cesariana devido ao mau controle da diabetes mellitus gestacional e macrossomia fetal. Idade gestacional: 38 semanas; Apgar: 7/9; peso: 3,590Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 46 dias antes do parto; Exame realizado pelo: LACEN-PR.
11	4225/21	39	8	Inapetência, cefaleia, fraqueza, anosmia e ageusia.	-	Mãe: Não houve internamento por COVID-19. Feto: Realização de cesariana eletiva após meses da alta hospitalar. Idade gestacional: 39 semanas; Apgar: 9/9; peso: 4,105Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 231 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONTINUAÇÃO)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
12	4856/21	-	-	-	-	-	Resultado: Detectável; Laudo liberado 53 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.
13	5087/21	28	25	Mialgia, sintomas gripais, febre e dispneia.	Diabetes mellitus tipo 2.	Mãe: Não houve internamento por COVID-19. Feto: Realização de cesariana eletiva após meses da alta hospitalar devido a falha de indução por Diabetes tipo 2. Idade gestacional: 36 semanas; Apgar: 9/10; peso: 3,875Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 76 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.
14	5353/21	37	34	Dispneia.	Transtorno de ansiedade generalizada.	Mãe: Infecção por bactérias multirresistentes, intubação orotraqueal 3 dias após o internamento, evolui para choque séptico, parada cardiorrespiratória e insuficiência renal aguda. Óbito materno 6 dias após o internamento. Feto: Realização de cesariana por oligodrâmio. Idade gestacional: 34 semanas; Apgar: 8/9; peso: 2,080Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado no dia do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

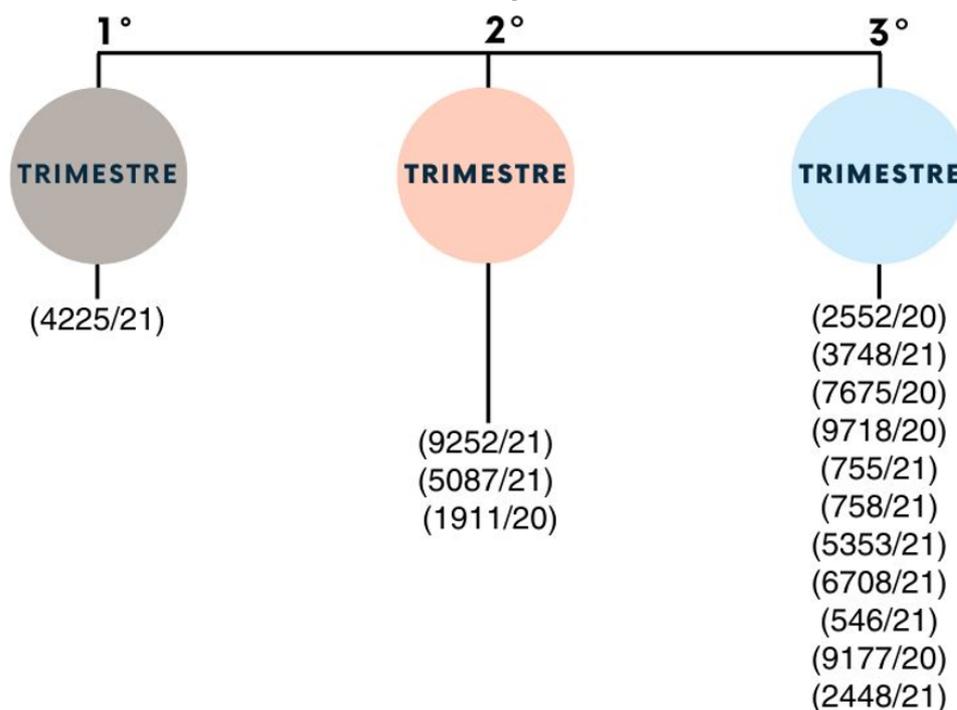
QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, SINAIS E SINTOMAS, CONDIÇÕES MÉDICAS SUBJACENTES E EVOLUÇÃO CLÍNICA (CONCLUSÃO)

Paciente	Numeração interna atribuída à amostra de líquido amniótico	Idade materna (anos)	Idade gestacional no momento do diagnóstico (semanas)	Sinais e sintomas no momento do diagnóstico	Condições médicas subjacentes	Evolução clínica materno-fetal	Informações sobre o resultado de RT-PCR para SARS-CoV-2 em <i>swab</i> de nasofaringe realizada na mãe
15	6708/21	22	35	Mialgia, cefaleia, febre, tosse e dispneia.	Diabetes mellitus gestacional, obesidade e hipotireoidismo.	Mãe: Interna por taquipneia. Feto: Realização de cesariana por perfil biofísico alterado. Idade gestacional: 36 semanas; Apgar: 8/9; peso: 2,755Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 4 dias antes do parto; Exame realizado pelo: LACEN-PR.
16	6945/21	-	-	-	-	-	Resultado: Detectável; Laudo liberado 6 dias antes do parto; Exame realizado pelo: CHC-UFPR.
17	9252/21	26	21	-	Diabetes mellitus gestacional, obesidade e hipotireoidismo.	Mãe: - Feto: Realização de cesariana por diabetes mellitus gestacional e cesariana prévia. Idade gestacional: 39 semanas; Apgar: 8/9; peso: 3,640Kg.	Resultado: Detectável; Laudo liberado 74 dias antes do parto; Exame realizado pelo: IBMP.

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: CHC-UFPR: Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná; IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná; LACEN-PR: Laboratório Central do Estado do Paraná.

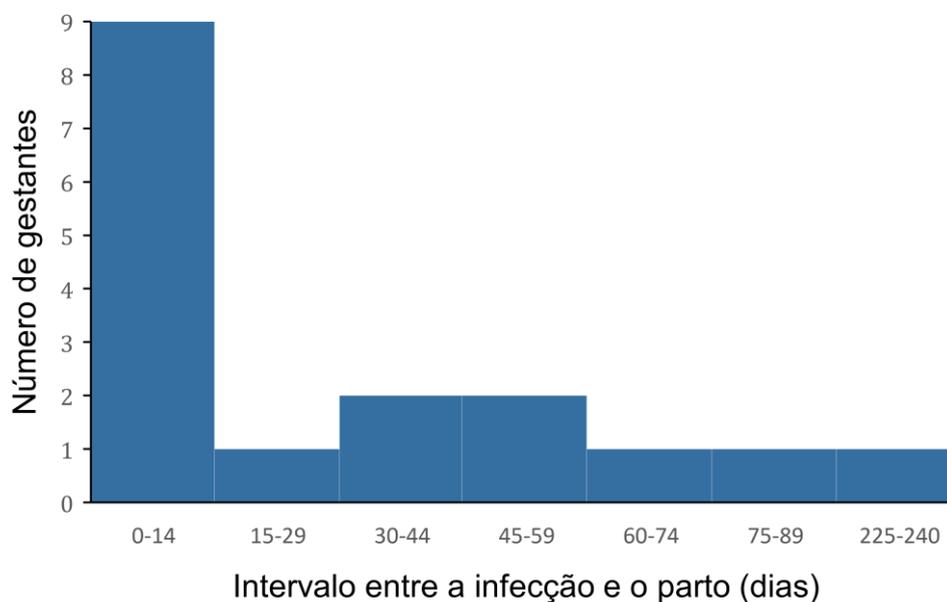
FIGURA 4 – MOMENTO DA INFECÇÃO MATERNA POR COVID-19



FONTE: A autora (2023)

Em relação ao intervalo entre a infecção e o parto, nove gestantes tiveram diagnóstico de COVID-19 com uma diferença menor do que 15 dias, e a média geral foi de 36 dias entre o diagnóstico e o momento do parto. Estes dados podem ser visualizados na FIGURA 5.

FIGURA 5 – HISTOGRAMA DO INTERVALO ENTRE A INFECÇÃO E O PARTO



FONTE: A autora (2023)

A RT-qPCR foi realizada conforme descrito no item 3.1.4. Entre as amostras de líquido amniótico de gestantes com COVID-19 confirmado, o gene N do SARS-CoV-2 foi detectado no líquido amniótico de duas pacientes (TABELA 1). Conforme preconiza a OMS em áreas com transmissão generalizada de SARS-CoV-2, um único gene independente pode ser adotado como um único alvo discriminatório (OMS, 2020c).

Uma amostra (2552/20) apresentou positividade para a alíquota do precipitado que passou pelo processo de extração manual, enquanto a outra (6708/21) apresentou positividade para o sobrenadante que passou pelo processo de extração automatizada.

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE RT-PCR PARA SARS-CoV-2 EM LÍQUIDO AMNIÓTICO (CONTINUA)

Amostra		Extração automatizada		Extração Manual	
		Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
1	1911/20	INS	INS	ND	ND
2	2552/20	ND	ND	Detectado E=ND N= 37,9 RdRP = ND	ND
3	7675/20	ND	ND	ND	ND
4	9177/20	ND	ND	ND	ND
5	9718/20	ND	ND	ND	ND
6	546/21	ND	ND	ND	ND
7	755/21	ND	ND	ND	ND
8	758/21	ND	ND	ND	ND
9	2448/21	ND	ND	ND	ND
10	3748/21	ND	ND	ND	ND
11	4225/21	ND	ND	ND	ND
12	4856/21	ND	ND	ND	ND
13	5087/21	ND	ND	ND	ND
14	5353/21	ND	ND	ND	ND

FONTE: A autora (2022)

LEGENDA: INS= Insuficiente (amostra insuficiente); ND= Não Detectado; E= gene E (gene da proteína do envelope); N= gene N (gene da proteína do nucleocapsídeo); RdRP= gene RdRP (gene da polimerase de RNA dependente de RNA)

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE RT-PCR PARA SARS-CoV-2 EM LÍQUIDO AMNIÓTICO (CONCLUSÃO)

Amostra		Extração automatizada		Extração Manual	
		Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
15	6708/21	ND	Detectado E=ND N= 37,3 RdRP = ND	ND	ND
16	6945/21	ND	ND	ND	ND
17	9252/21	ND	ND	ND	ND

FONTE: A autora (2022)

LEGENDA: INS= Insuficiente (amostra insuficiente); ND= Não Detectado; E= gene E (gene da proteína do envelope); N= gene N (gene da proteína do nucleocapsídeo); RdRP= gene RdRP (gene da polimerase de RNA dependente de RNA)

Os dois recém-nascidos que tiveram RNA viral de SARS-CoV-2 detectado em amostras de líquido amniótico nasceram prematuros, ou seja, antes de completar 37 semanas de gestação. Outras cinco gestantes também tiveram idade gestacional inferior a 37 semanas, porém, RNA viral não foi detectado nas amostras coletadas. Destas, duas apresentaram idade gestacional ≤ 28 semanas (prematividade extrema), incluindo a gestante (2552/20), ambas apresentaram um intervalo de tempo entre o diagnóstico de COVID-19 e o parto menor do que cinco dias. A gestante com amostra de líquido amniótico positivo para SARS-CoV-2 apresentou um melhor prognóstico fetal (Apgar: 6/9, peso: 1,100Kg). Infelizmente, o outro evoluiu para óbito e a amostra coletada não apresentou positividade. A evolução clínica materno fetal da paciente 6708/21 (idade gestacional: 36 semanas, Apgar: 8/9, peso: 2,755Kg) é semelhante aos demais parâmetros encontrados nas demais gestantes que tiveram parto prematuro e exceto para paciente 5087/21, o intervalo entre a infecção materna e o parto destas pacientes foi menor do que cinco dias.

O diagnóstico de infecções congênitas a partir da detecção do material genético de microrganismos no líquido amniótico vem sendo bastante estudado nos últimos anos, entretanto ainda não existe único protocolo específico para o processamento e extração de amostras de líquido amniótico que aumente a sensibilidade da RT-qPCR. A qualidade e a quantidade de ácidos nucleicos extraídos são bastante afetadas pela coleta da amostra, por seu manuseio, transporte, armazenamento, processamento e pela escolha do método de extração de ácidos nucleicos, assim o resultado da RT-qPCR depende diretamente destes fatores (MELO *et al.*, 2010; RÅDSTRÖM *et al.*, 2004). Uma vez que a quantidade de microrganismos, ácidos nucleicos e inibidores

de RT-qPCR são muito variáveis entre os vários tipos de amostras, os protocolos de processamento e extração de ácidos nucleicos devem ser específicos para cada uma delas (WILSON, 1997).

Além da dificuldade em garantir protocolos que otimizem a técnica, outros problemas pré-analíticos podem prejudicar a acurácia e precisão do teste. Conforme destaca Sidsted, Rådström e Hedman (2020) é vital que a amostra seja representativa, além disso, a amostragem deve ter como objetivo minimizar a absorção de inibidores de PCR das matrizes de amostra enquanto maximiza a absorção alvo. No QUADRO 2 é possível confirmar que todas as amostras incluídas no estudo foram coletadas a partir de parto cesárea, o qual foi indicado exclusivamente devido às condições clínicas da gestante e/ou do feto, desta forma, a coleta das amostras seguiu o protocolo proposto pela OMS para determinação de transmissão vertical por meio da análise do líquido amniótico, em que era necessário que a coleta fosse realizada de modo estéril em cesariana antes da ruptura das membranas (OMS, 2021).

Em relação ao processamento e extração das amostras, eles servem para gerar extratos homogêneos de RNA a partir de amostras heterogêneas usando, por exemplo, princípios bioquímicos ou físicos. O RNA é liberado das células por extração e, se necessário, os extratos são posteriormente purificados. A desvantagem da purificação extensiva é que ela leva a uma perda substancial de RNA, geralmente com taxas de recuperação de 10 a 80%. O oposto da purificação extensiva são os métodos de PCR direto, onde a etapa de preparação da amostra é minimizada ou totalmente excluída. Aqui, a vantagem é que a perda de RNA é evitada, mas uma desvantagem é que altas quantidades de inibidores de PCR podem estar presentes (SIDSTED; RÅDSTRÖM; HEDMAN, 2020). Desta forma, após o processamento e extração das amostras não sabemos se a recuperação do material genético atingiu um valor significativo para realização da RT-PCR, podendo gerar resultados falsos-negativos.

Quatro amostras apresentaram grande quantidade de sangue, que é conhecido um inibidor dos testes moleculares. Os potenciais inibidores de PCR identificados no sangue são a imunoglobulina G, lactoferrina e hemoglobina. Os inibidores geralmente atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação: (1) interferem na lise celular necessária para a extração do material genético; (2) na degradação ou captura do ácido nucleico e (3) inibem a atividade da polimerase para amplificação do alvo DNA (WILSON, 1997; SIDSTED; RÅDSTRÖM; HEDMAN, 2020). Não sabemos até que ponto o sangue presente nas amostras pode ter interferido nos

resultados, entretanto o processamento e extração parecem ter otimizado as análises, uma vez que a amostra 2552/20 apresentou resultado positivo.

As amostras positivas apresentaram um valor de Ct elevado (>37). Conforme abordado no tópico anterior, valores de Ct elevados indicam uma menor concentração do ácido nucleico alvo (CUMPLIDO *et al.*, 2021). É importante destacar que todas as amostras foram processadas meses depois de serem coletadas, o que pode ter interferido nas análises. A qualidade do RNA é variável e bastante instável quando armazenado durante um longo período de tempo, uma vez que amostras de RNA são extremamente vulneráveis à degradação, o uso de amostras de RNA degradado pode levar a redução da sensibilidade (FLEIGE; PFAFFL, 2006; PADHI *et al.*, 2018). Isto pode explicar o valor de Ct elevado das alíquotas. Além disso, ambas amostras eram de gestantes que estavam na fase ativa da doença, poucos dias entre a coleta da amostra e o parto. Outras gestantes também apresentaram este curto período de tempo entre o diagnóstico e o parto. Como as amostras destas pacientes, embora adequadamente armazenadas, permaneceram por um longo período de tempo, após a coleta, antes de serem processadas e analisadas, podem ter prejudicado a detecção do RNA viral, já que não há relatos de como armazenar esses materiais.

Uma alternativa para contornar possíveis problemas de armazenamento a longo prazo de amostras de RNA viral seria utilizar o TRIzol como método de conservação. O TRIzol é um reagente usado para extração de RNA (além de DNA ou proteínas) de uma variedade de amostras. Previne a degradação do RNA, preservando sua qualidade e integridade durante o processo de purificação e adicionalmente permite a obtenção de grandes quantidades. Ele não é usado apenas para extração, mas também serve como meio de armazenamento, levando em consideração que o RNA do SARS-CoV-2 não requer tampões especializados para estabilização do material genético. O uso do TRIzol para extração do RNA do SARS-CoV-2 é promissor, pode diminuir os custos de testes, inativar o vírus e obter RNA estável. Isso é particularmente importante para cenários de recursos limitados, onde testes massivos são necessários apesar da escassez econômica (ORTIZ *et al.*, 2021).

Um estudo realizado por Hofmann *et al.* (2000) comparou os efeitos do armazenamento a longo prazo de amostras contendo o vírus da peste suína clássica (PSC) ou vírus da febre aftosa (FA) armazenadas em TRIzol e fixadas em Formaldeído, ambos são vírus que tem o RNA como material genético. As amostras foram armazenadas em TRIzol por até 4 semanas a -20°C, 4°C, temperatura ambiente

ou 37°C antes da extração do material genético, o RNA viral foi detectado em todas as amostras, independentemente das condições de armazenamento. Em contraste com o armazenamento feito em TRIzol, a fixação de amostras clínicas em formaldeído com posterior extração de RNA resultou em um impacto negativo drástico na detecção do RNA viral, resultando em uma queda de ≥ 3 log da sensibilidade do RT-PCR. Infelizmente a maioria dos estudos atuais que envolvem o uso de TRIzol na RT-PCR dão enfoque apenas para o seu uso no processo extração, nesta etapa o TRIzol também gera melhores resultados, aumentando a sensibilidade da RT-PCR (ORTIZ *et al.*, 2021), desta forma, há necessidade de desenvolver testes que visam verificar se alíquotas mantidas em TRIzol, apresentaram maior estabilidade e conseqüentemente maior carga viral. Se for possível demonstrar que o uso de TRIzol contribui para manter a estabilidade do RNA, este método pode ser introduzido na rotina diagnóstica para melhorar a preservação dessas amostras, reduzindo a degradação natural do RNA.

Um estudo desenvolvido por Avidor *et al.* (2004) destaca as dificuldades inerentes em relação ao uso de PCR em amostra de líquido amniótico. Avidor e colaboradores construíram um modelo de plasmídeo para testar o efeito inibitório do sobrenadante de líquido amniótico sobre a sensibilidade de PCR. O plasmídeo continha DNA de citomegalovírus (CMV) e para comparar a detecção do material genético, o modelo foi testado por PCR em água e em sobrenadante de líquido amniótico não infectado. O modelo do plasmídeo testado no sobrenadante foi 2.000 vezes menos sensível quando comparado com o modelo testado em água, esta diferença significativa na sensibilidade sugere a presença de fatores inibitórios no líquido amniótico que interferem na amplificação do DNA. O estudo também testou outros modelos para verificar as propriedades inibitórias do líquido amniótico e concluíram que após o processo de extração de DNA a maioria das amostras inibitórias apresentou resultados positivos, indicando que houve sucesso na remoção dos inibidores pela purificação do DNA.

O processamento também é um fator que deve ser discutido e pode ser decisivo quando não dispomos de métodos de purificação, no mesmo estudo Avidor *et al.* (2004) indicou que uma forma de contornar os possíveis inibidores presentes no líquido amniótico é concentrar as amostras. Sete alíquotas de líquido amniótico positivas para CMV foram centrifugadas e separadas em fração celular e sobrenadante, posteriormente a concentração viral no sobrenadante e precipitado

celular foi determinada por PCR quantitativo. A quantidade de vírus em cada uma dessas frações foi calculada multiplicando-se a concentração viral medida no sobrenadante ou no precipitado celular pelo volume da fração correspondente. A concentração de DNA viral aumentou de 4 a 67 vezes na fração celular quando comparada com a fração do sobrenadante. Quando o sobrenadante foi purificado a carga viral e conseqüentemente a sensibilidade foi semelhante à encontrada no precipitado celular. Estes resultados sugerem que a baixa sensibilidade do ensaio no sobrenadante não tratado foi provavelmente devido à inibição da amplificação do DNA, ao invés de uma baixa concentração de DNA viral. Este estudo indica a importância de estabelecer protocolos que visam a otimização do processamento e principalmente a purificação/extração de amostras de líquido amniótico, garantindo a recuperação ideal do material genético e a eliminação de possíveis inibidores da PCR para que os resultados gerados sejam mais sensíveis e específicos.

O presente estudo indica a possibilidade de transmissão transplacentária de SARS-CoV-2 e de acordo com o sistema de classificação proposto pela OMS, uma infecção congênita neonatal é considerada confirmada se o vírus for detectado no líquido amniótico nas primeiras 24 horas de vida somado a um teste de persistência viral (OMS, 2021). Infelizmente os nossos resultados não se enquadram nestas definições, não podendo ser qualificados como transmissão confirmada, uma vez que não foram realizados testes de persistência viral. Além disto o tempo de armazenamento das amostras talvez tenha sido o principal limitador deste estudo, não sabemos até que ponto ele pode ter influenciado nas análises. Devido ao baixo número de amostras positivas não foi possível estabelecer qual fração após a etapa de processamento ou qual método de extração foi superior a outro para realização do RT-qPCR. Entretanto, é de conhecimento geral que métodos de extração manual despendem mais tempo, exigem mais etapas de processamento (aumentando a probabilidade erros), tornando-os inadequados para laboratórios de diagnóstico de grande porte. Desta forma, a partir dos estudos encontrados na literatura e os resultados do presente trabalho, indicamos a importância da realização de novas pesquisas que visem o estabelecimento de protocolos que otimizem as etapas de processamentos e extração das amostras de líquido amniótico e que incluam novos dados sobre a possibilidade de transmissão vertical de SARS-CoV-2.

5 CONCLUSÃO

Considerando as evidências disponíveis até o momento, é difícil tirar conclusões absolutas sobre o risco de infecção congênita por SARS-CoV-2, a maioria dos estudos é limitado a um único caso e a falta de padronização nos testes realizados impossibilita maiores conclusões. A fim de estabelecer definições internacionais para transmissão intrauterina, intraparto e pós-natal, a OMS, publicou em 2021, um resumo científico que propõe um sistema de classificação da transmissão vertical do SARS-CoV-2, estas definições são fundamentais para que haja um esforço em conjunto no levantamento de dados sobre a transmissão vertical da COVID-19.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e nas definições estabelecidas pela OMS, não é possível concluir se houve evidência de transmissão vertical do SARS-CoV-2 nas amostras analisadas. Apenas duas amostras de líquido amniótico foram positivas para SARS-CoV-2, no entanto, testes de persistência viral não foram realizados. O número reduzido de amostras positivas, sendo que ambas passaram por processos de extração distintos, também impossibilita verificar se o processamento e a técnica da extração otimizam ou não as análises. Por outro lado, os dados discutidos neste estudo podem auxiliar na realização de novas pesquisas que visam melhorar os protocolos de processamento e extração de amostras de líquido amniótico para detecção de SARS-CoV-2. Desta forma, são necessárias mais evidências sobre a transmissão vertical da COVID-19 e novos estudos sobre os protocolos necessários para realização das análises de RT-qPCR em líquido amniótico.

REFERÊNCIAS

AVIDOR, B. *et al.* Insight into the intrinsic sensitivity of the PCR assay used to detect CMV infection in amniotic fluid specimens. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, n. 4, p. 260-269, Apr. 2004. DOI.10.1016/S1386-6532(03)00166-5. Acesso em: 15 jan. 2022.

BAUD, D. *et al.* Second-Trimester Miscarriage in a Pregnant Woman With SARS-CoV-2 Infection. **JAMA**, v. 323, n. 21, p. 2198, Apr. 2020. DOI.10.1001/jama.2020.7233. Acesso em: 12 out. 2022.

BUSTIN, S. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 34, n. 3, p. 597, Jun. 2005. DOI.10.1677/jme.1.01755. Acesso em: 9 mai. 2022.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n.6, p. 655, Jun. 2016. DOI.10.1016/S1473-3099(16)00095-5. Acesso em: 9 mai. 2022.

CHINN, J. *et al.* Characteristics and Outcomes of Women With COVID-19 Giving Birth at US Academic Centers During the COVID-19 Pandemic. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 8, p 2-3, Aug. 2021. DOI. 10.1001/jamanetworkopen.2021.20456. Acesso em: 19 out. 2022.

COYNE, C.; LAZEAR, H. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p. 707-708, Aug. 2016. DOI.10.1038/nrmicro.2016.125. Acesso em: 12 out. 2022

CUMPLIDO, A. S. *et al.* Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19. **Semergen**, v. 47, n. 5, p 338-339, Jul-Aug. 2021. DOI.10.1016/j.semerg.2021.05.003. Acesso em: 19 dez. 2022.

DELAHOY, M. J. *et al.* Characteristics and Maternal and Birth Outcomes of Hospitalized Pregnant Women with Laboratory-Confirmed COVID-19 - COVID-NET, 13 States, March 1-August 22, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 69, n. 38, p. 1352, Sep. 2020. DOI.10.15585/mmwr.mm6938e1. Acesso em: 19 ago. 2022.

DONG, L. *et al.* Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. **JAMA**, v. 323, n. 18, p.1846-1847, Mar. 2020. DOI.10.1001/jama.2020.4621. Acesso em: 16 out. 2022.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 14, n. 2-3, p. 128, Apr-Jun. 2006. DOI.10.1016/j.mam.2005.12.003. Acesso em: 19 dez. 2022.

HOFMANN, M. A. *et al.* Rescue of infectious classical swine fever and foot-and-mouth disease virus by RNA transfection and virus detection by RT-PCR after extended storage of samples in Trizol®. **Journal of Virological Methods**, v. 87, n. 1-2, p.29-38, Jun. 2000. DOI.10.1016/s0166-0934(00)00154-3. Acesso em: 15 jan. 2023.

JAYAKODY, H. *et al.* Molecular diagnostics in the era of COVID-19. **Analytical Methods**, v. 13, n. 34, p. 3747, Sep. 2021. DOI.10.1039/d1ay00947h. Acesso em: 19 dez. 2022.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (JHU). Center for Systems Science and Engineering (CSSE). **COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU)**. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 11 de jan. 2023.

KIRSTMAN, M. *et al.* Probable congenital SARS-CoV-2 infection in a neonate born to a woman with active SARS-CoV-2 infection. **CMAJ**, v. 192, n. 124, p. 647-648, Jun. 2020. DOI.10.1503/cmaj.200821. Acesso em: 16 out. 2022.

LI, Q. *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199-1200, Mar. 2020. DOI. 10.1056/NEJMoa2001316. Acesso em: 11 nov. 2022.

MASCIO, D. D. *et al.* Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM**, v. 2, n. 2, p. 2, May. 2020. DOI.10.1016/j.ajogmf.2020.100107. Acesso em: 11 nov. 2022.

MELO, M. R. *et al.* Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p.375-381, Out. 2010. DOI.10.1590/S1676-24442010000500006. Acesso em: 11 jan. 2023.

MOORE, K. M.; SUTHAR, M. S. Comprehensive analysis of COVID-19 during pregnancy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 181, Jan. 2021. DOI.10.1016/j.bbrc.2020.12.064. Acesso em: 12 out. 2022.

MULLEGAMA, S.V. *et al.* Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *In*: YONG, W. (Ed). **Biobanking. Methods in Molecular Biology**. v. 1897. New York, NY: Humana Press, 2019. p. 359. DOI.10.1007/978-1-4939-8935-5_30. Acesso em: 9 mai. 2022.

NARANG, K. *et al.* SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 During Pregnancy: A Multidisciplinary Review. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 95, n.8, p. 1750, May. 2020. DOI.10.1016/j.mayocp.2020.05.011. Acesso em: 12 ago. 2022.

ORTIZ, H. M. *et al.* Development of an alternative saliva test for diagnosis of SARS-CoV-2 using TRIzol: Adapting to countries with lower incomes looking for a large-scale detection program. **PLOS ONE**, v. 18, n. 16, p. 8, Aug. 2021. DOI.10.1371/journal.pone.0255807. Acesso em: 15 jan. 2023.

PADHI, B. K. *et al.* A PCR-based quantitative assay for the evaluation of mRNA integrity in rat samples. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 15, p.18, May. 2018. DOI.10.1016/j.bdq.2018.02.001. Acesso em: 19 dez. 2022.

RÅDSTRÖM, P. *et al.* Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 133-146, Feb. 2004. DOI.10.1385/MB:26:2:133. Acesso em: 11 jan. 2023.

SEEGENE. **Manual Kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay**. Contagem, 2020. Manual para uso profissional. Disponível em: https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y_V1-15_PT-Manual.pdf. Acesso em: 5 de out. 2022.

SIDSTED, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 9, p. 2011-2013, Jan. 2021. DOI.10.1007/s00216-020-02490-2. Acesso em: 15 jan. 2023.

STONOGA, E. S. *et al.* Intrauterine Transmission of SARS-CoV-2. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 638-640, Feb. 2021. DOI. 10.3201/eid2702.203824. Acesso em: 13 out. 2022.

TROUGAKOS, I.P. *et al.* Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n.9, p. 1, Jan. 2021. DOI.10.1186/s12929-020-00703-5. Acesso em: 12 ago. 2022.

VILLAR, J *et al.* Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women With and Without COVID-19 Infection The INTERCOVID Multinational Cohort Study. **JAMA Pediatrics**, v. 175, n. 8, p. 819-821, Aug. 2021. DOI.10.1001/jamapediatrics.2021.1050. Acesso em: 19 out. 2022.

VIVANTI, A. J. *et al.* Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 3572, p. 2-6, Jul. 2020. DOI.10.1038/s41467-020-17436-6. Acesso em: 12 out. 2022.

WASTNEDGE, E. A. N. *et al.* Pregnancy and COVID-19. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 1, p. 303-304, 309, Nov. 2020. DOI.10.1152/physrev.00024.2020. Acesso em: 5 out. 2022.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v. 63, n. 10, p. 3741, Oct. 1997. DOI.10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997. Acesso em: 19 dez. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. Mar. 2020a Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 5 de out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Public health surveillance for COVID-19: interim guidance**. Aug. 2020b. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/333752>. Acesso em: 26 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance**. Sep. 2020c. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254>. Acesso em: 26 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2: scientific brief**. Feb. 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/339422>. Acesso em: 26 out. 2022.

ZAMANIYAN, M. Preterm delivery, maternal death, and vertical transmission in a pregnant woman with COVID-19 infection. **Prenatal Diagnosis**, v. 40, n.13, p. 1759-1760, Apr. 2020. DOI.10.1002/pd.5713. Acesso em: 16 out. 2022.

ZAMBRANO, L. D. *et al.* Update: Characteristics of Symptomatic Women of Reproductive Age with Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection by Pregnancy Status — United States, January 22–October 3, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 69, n. 44, p. 1641-1646, Nov. 2020. DOI.10.15585/mmwr.mm6944e3. Acesso em: 5 out. 2022.

ZENG, H. *et al.* Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. **JAMA**, v. 323, n. 18, p.1848-1849, Mar. 2020. DOI.10.1001/jama.2020.4861. Acesso em: 16 out. 2022.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-731, Mar. 2020. DOI.10.1056/NEJMoa2001017. Acesso em: 11 nov. 2022.

ANEXO 1 -TRANSMISSÃO INTRAUTERINA DE SARS-CoV-2:NASCIDO VIVO

Transmissão Confirmada		Transmissão Possível	
Evidência de exposição fetal no útero	Persistência viral/resposta imune	Evidência de exposição fetal no útero	Persistência viral/resposta imune
Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia (IgM ou IgA).	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24-48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia (IgM ou IgA).	Uma ou mais das seguintes amostras às 24-48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR de não amostra estéril. Sorologia positiva (IgM ou IgA) entre de 24 horas a <7 dias.
Transmissão Improvável		Transmissão Indeterminada	
Evidência de exposição fetal no útero	Persistência viral/resposta imune	Evidência de exposição fetal no útero	Persistência viral/resposta imune
Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia (IgM ou IgA).	Todos os testes realizados em amostras às 24-48 horas de vida são negativos para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia negativa (IgM ou IgA) entre 24 horas a <7 dias de vida.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24 horas de vida positivas para SARS-CoV-2: RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia (IgM ou IgA).	Não foram realizados um ou mais dos seguintes testes em amostras às 24-48 horas de vida RT-PCR de amostra estéril. RT-PCR de amostra não estéril. Sorologia (IgM ou IgA) entre 24 horas a <7 dias de vida.
Todos os testes de exposição fetal intrauterina (acima) realizados são negativos para SARS-CoV-2.	Um ou mais testes realizados (acima) são positivos para SARS-CoV-2.	Não foram realizados testes de persistência viral/resposta imune (acima) .	Um ou mais testes descritos (acima) são positivos para SARS-CoV-2.

FONTE: Adaptado de OMS (2021).

NOTA: Amostra estéril: líquido amniótico, sangue neonatal, amostras do trato respiratório inferior obtidas por lavado broncoalveolar por meio de broncoscopia ou inserção de tubo endotraqueal, aspirado brônquico ou traqueal, ou LCR; Amostra não estéril: amostras do trato respiratório superior (por exemplo, *swab* ou aspirado nasal ou orofaríngeo), ou outras amostras não estéreis (por exemplo, fezes), incluem também os testes RT-PCR/ISH(hibridização *in situ*) de Placenta, IHC (imunohistoquímica)/Microscopia de Placenta e RT-PCR de *swab* placentário.

LEGENDA: :RT-PCR= reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; LCR= líquido cefalorraquidiano.

ANEXO 2 - TRANSMISSÃO INTRAUTERINA DE SARS-CoV-2: MORTE FETAL

Detecção de SARS-CoV-2	
Transmissão Confirmada	RT-PCR ou ISH de tecido fetal positivo para SARS-CoV-2.
Transmissão Possível	Tecido fetal não testado para SARS-CoV-2 E um ou mais dos seguintes positivos para SARS-CoV-2: IHC ou microscopia de tecido fetal ou RT-PCR de <i>swab</i> fetal. Líquido amniótico. Tecido placentário (RT-PCR, ISH, IHC ou microscopia) ou RT-PCR de <i>swab</i> placentário.
	Tecido fetal negativo para SARS-CoV-2 em teste de RT-PCR ou ISH. E líquido amniótico positivo para SARS-CoV-2.
Transmissão Improvável	Tecido fetal negativo para SARS-CoV-2 em teste de RT-PCR ou ISH. E um ou mais dos seguintes positivos para SARS-CoV-2: IHC ou microscopia de tecido fetal ou RT-PCR de <i>swab</i> fetal. Tecido placentário (RT-PCR, ISH, IHC ou microscopia) ou RT-PCR de <i>swab</i> placentário.

FONTE: Adaptado de OMS (2021).

NOTA: Tecido fetal de local estéril, como órgãos fetais (por exemplo, pulmão, fígado, cérebro); recomenda-se testar várias amostras.

LEGENDA: RT-PCR= reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; ISH= hibridização *in situ*; IHC= imunohistoquímica.

ANEXO 3 -TRANSMISSÃO INTRAPARTO DE SARS-CoV-2

Transmissão Confirmada		Transmissão Possível	
Ausência de exposição fetal intrauterina	Exposição intraparto com persistência viral/ resposta imune	Ausência de exposição fetal intrauterina	Exposição intraparto com persistência viral/ resposta imune
Um ou mais testes realizados nas primeiras 24 horas de vida foram negativos . Todos os testes realizados devem ser negativos . RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril. Sorologia negativa (IgM ou IgA).	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24-48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril corroborado por PCR positivo em uma 2º amostra não estéril entre 48 horas e 7 dias de vida. Sorologia positiva (IgM ou IgA) entre 7-14 dias de vida, corroborada por teste sorológico positivo em uma 2º amostra obtida 10 dias após o primeiro teste positivo.	Não foram realizados testes de exposição fetal intrauterina.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 24-48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril corroborado por PCR positivo em uma 2º amostra não estéril entre 48 horas e 7 dias de vida. Sorologia positiva (IgM ou IgA) entre 7-14 dias de vida, corroborada por teste sorológico positivo em uma 2º amostra obtida 10 dias após o primeiro teste positivo.
Transmissão Improvável			
Ausência de exposição fetal intrauterina	Exposição intraparto com persistência viral/ resposta imune		
Não foram realizados testes de exposição fetal intrauterina.	Uma ou mais das seguintes amostras às 24-48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra estéril com RT-PCR negativo em uma 2º amostra entre 48 horas e 7 dias de vida. RT-PCR em amostra não estéril com RT-PCR negativo em uma 2º amostra não estéril entre 48 horas e 7 dias de vida. Sorologia positiva (IgM ou IgA) entre 7-14 dias de vida com teste sorológico negativo em uma 2º amostra obtida 10 dias após o primeiro teste positivo.		

FONTE: Adaptado de OMS (2021).

NOTA: Amostra estéril: líquido amniótico, sangue neonatal, amostras do trato respiratório inferior obtidas por lavado broncoalveolar por meio de broncoscopia ou inserção de tubo endotraqueal, aspirado brônquico ou traqueal, ou LCR: Amostra não estéril: amostras do trato respiratório superior (por exemplo, *swab* ou aspirado nasal ou orofaríngeo), ou outras amostras não estéreis (por exemplo, fezes), incluem também os testes RT-PCR/ISH (hibridização *in situ*) de Placenta e IHC(imunohistoquímica)/Microscopia de Placenta e RT-PCR de *swab* placentário.

LEGENDA: RT-PCR= reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; LCR= líquido cefalorraquidiano.

ANEXO 4 - TRANSMISSÃO PRECOCE PÓS-NATAL DE SARS-CoV-2 (IDADE >48 HORAS - 28 DIAS)

	Ausência de exposição intrauterina/intraparto	Exposição no pós-natal imediato com persistência viral/resposta imune
Transmissão Confirmada	Foi realizado pelo menos um teste nas primeiras 48 horas de vida com resultado negativo para SARS-CoV-2. Todos os testes realizados devem ser negativos . RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril. Sorologia negativa (IgM ou IgA) nos primeiros 14 dias de vida.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril corroborado por PCR positivo em uma 2ª amostra não estéril obtida 10 dias após o primeiro teste positivo realizado nas primeiras 48 horas de vida. Sorologia positiva (IgM ou IgA) após 14 dias de vida, corroborada por um 2º teste sorológico positivo obtido 10 dias após o primeiro teste positivo realizado após 14 dias de vida.
Transmissão Possível	Não foram realizados testes de exposição “in útero” fetal/intraparto.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra estéril. RT-PCR em amostra não estéril corroborado por PCR positivo em uma 2ª amostra não estéril obtida 10 dias após o primeiro teste positivo. Sorologia positiva (IgM ou IgA) após 14 dias de vida, corroborada por um 2º teste sorológico positivo obtido 10 dias após o primeiro teste positivo.
Transmissão Improvável	Não foram realizados testes de exposição “in útero” fetal/intraparto.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra não estéril com RT-PCR negativo em uma segunda amostra não estéril obtida 10 dias após o primeiro teste positivo. Sorologia positiva (IgM ou IgA) após 14 dias de vida com teste sorológico negativo em uma 2ª amostra obtida 10 dias após o primeiro teste positivo.
Transmissão Indeterminada	Não foram realizados testes de exposição “in útero” fetal/intraparto.	Uma ou mais das seguintes amostras nas primeiras 48 horas de vida positiva para SARS-CoV-2: RT-PCR em amostra não estéril sem um 2º teste confirmatório. Sorologia positiva (IgM ou IgA) após 14 dias de vida sem um 2º teste confirmatório.

FONTE: Adaptado de OMS (2021)

NOTA: Amostra estéril: líquido amniótico, sangue neonatal, amostras do trato respiratório inferior obtidas por lavado broncoalveolar por meio de broncoscopia ou inserção de tubo endotraqueal, aspirado brônquico ou traqueal, ou LCR; Amostra não estéril: amostras do trato respiratório superior (por exemplo, *swab* ou aspirado nasal ou orofaríngeo), ou outras amostras não estéreis (por exemplo, fezes), incluem também os testes RT-PCR/ISH (hibridização *in situ*) de Placenta e IHC (imunohistoquímica)/Microscopia de Placenta e RT-PCR de *swab* placentário.

LEGENDA: RT-PCR= reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; LCR= líquido cefalorraquidiano.