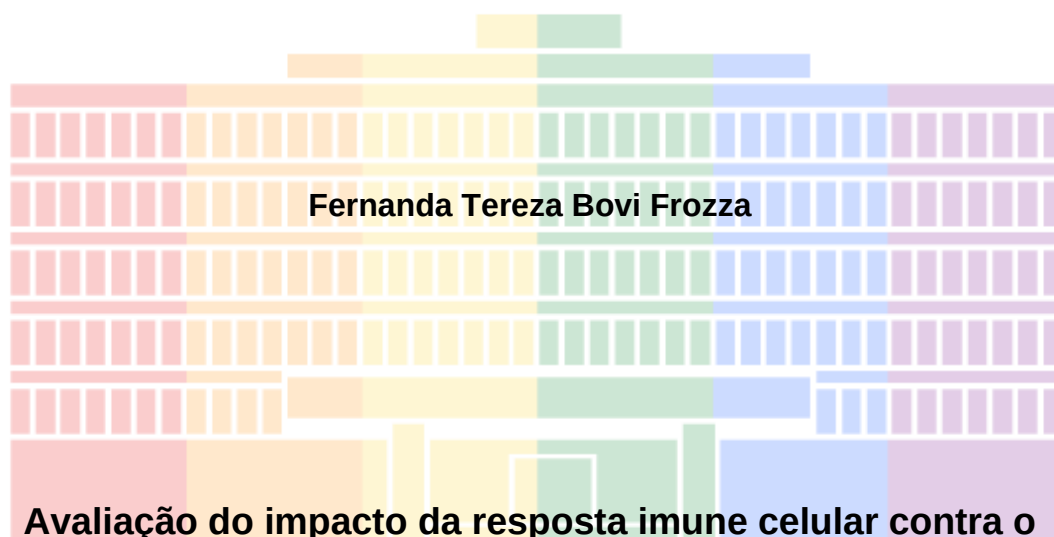


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
– UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre, RS

2023

Fernanda Tereza Bovi Frozza

**Avaliação do impacto da resposta imune celular contra o
citomegalovírus na infecção por SARS-CoV-2**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Bonorino

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Fazolo

Porto Alegre, RS

2023

Catálogo na Publicação

Tereza Bovi Frozza, Fernanda

Avaliação do impacto da resposta imune celular contra o citomegalovírus na infecção por SARS-CoV-2 / Fernanda Tereza Bovi Frozza. -- 2023.

69 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2023.

Orientador(a): Cristina Bonorino ; coorientador(a): Tiago Fazolo.

1. Citomegalovírus. 2. SARS-CoV-2. 3. Imunidade Celular. 4. Citocinas. 5. Imunidade Humoral. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Diana e Paulo, pelo apoio e amor incondicionais. Aos meus irmãos, Bruna e Pedro, pelos incentivos constantes durante todo o meu período na academia. À minha melhor amiga e namorada, Júlia, pelo companheirismo, amor e paciência. A todos os meus amigos, que estiveram comigo desde o princípio. E, não menos importante, ao grupo de pesquisa do laboratório de Imunoterapia da UFCSPA, pela oportunidade de integrar um time tão competente e gentil.

RESUMO

Introdução. O citomegalovírus humano (CMV), pertencente à família *herpesvirus*, possui alta prevalência e exige vigilância imunológica constante para mantimento de seu estado de latência. Suas interações crônicas com o sistema imune são associadas a efeitos deletérios, incluindo exaustão celular T e imunossenescência. No contexto da pandemia de COVID-19, nós perguntamos se a atividade celular e humoral CMV-específica poderia estar associada às respostas imunes contra o SARS-CoV-2. **Métodos.** PBMCs de adultos com COVID-19 leve (n=15) e grave (n=14) foram estimulados *in vitro* com peptídeos CMV ou SARS-CoV-2 para avaliar a produção de IFN γ , TNF α e IL-17 em células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$. Anticorpos IgG e IgM anti-CMV e IgG e IgA anti-SARS-CoV-2 foram analisados por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Concentrações séricas de citocinas Th1, Th2 e Th17 foram analisadas com um kit comercial de *Cytometric Bead Array (CBA)*. Análise estatística pelos testes de *Fisher*, *Mann Whitney* e *Spearman*, com $p < 0,05$. **Resultados.** Todos os pacientes exibiram soropositividade para IgG e ausência de IgM anti-CMV. Anticorpos anti-CMV não apresentaram associação com severidade de COVID-19. Seis pacientes exibiram frequências elevadas de células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ CMV-específicas através da produção de IFN γ , IL-17 e TNF α , sendo designados como CMV *high responders (hiT CMV)*. Em comparação com os demais pacientes, indivíduos *hiT CMV* exibiram frequências elevadas de células T CD4 $^{+}$ IL-17 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} , IL-17 $^{+}$ ou TNF α^{+} SARS-CoV-2-específicas ($p < 0,001$), além de uma proporção predominante de IL-6 e IL-17 circulantes. **Conclusão.** A frequência elevada de células T CMV-específicas mostrou-se associada a um perfil imune com polarização Th17 contra o SARS-CoV-2, além de uma atividade CD8 $^{+}$ SARS-CoV-2-específica aumentada. Análises prospectivas poderiam indicar se o aumento da atividade T CMV-específica durante a fase aguda de COVID-19 poderia estar relacionada com complicações secundárias pós-covid resultantes de uma imunidade mal ajustada.

Palavras-chave: Citomegalovírus. SARS-CoV-2. Imunovirologia. Imunologia celular. Citocinas.

ABSTRACT

Introduction. Human cytomegalovirus (CMV) is a widespread persistent herpes virus requiring lifelong immune surveillance to maintain latency. Such long-term interactions with the immune system may be associated with deleterious effects including immune exhaustion and senescence. Regarding the COVID-19 pandemic, we asked whether CMV-specific cellular and humoral activity could be associated with immune responses toward SARS-CoV-2 and/or disease severity.

Methods. PBMCs from adults with mild (n=15) and severe (n=14) COVID-19 were stimulated *in vitro* with CMV or SARS-CoV-2 peptides to evaluate the production of IFN γ , TNF α , and IL-17 in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells. Anti-CMV IgG/IgM and anti-SARS-CoV-2 IgA/IgG antibodies were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum Th1, Th2, and Th17 cytokines' concentrations were analyzed with a commercial CBA (*Cytometric Bead Array*). Statistical analysis was performed using *Fisher's* exact test, the nonparametric *Mann-Whitney* and *Spearman* tests, with a <0.05 p-value. **Results.** All adults with mild and severe COVID-19 were seropositive for anti-CMV IgG, but negative for IgM antibodies. Anti-CMV IgG titers did not correlate with disease severity. Six patients presented elevated frequencies of CMV-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells producing IFN γ , IL-17, and TNF α , designated as CMV high responders (hiT CMV). In comparison to CMV low responders, hiT CMV individuals exhibited higher frequencies of SARS-CoV-2-specific CD4 $^{+}$ IL-17 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ IFN γ $^{+}$, IL-17 $^{+}$, or TNF α $^{+}$ T cells ($p<0.001$), besides a Th17-predominant proportion of serum cytokines. **Conclusion.** These results indicate that high frequencies of CMV-specific T cells may be associated with a SARS-CoV-2-reactive profile skewed towards Th17-dominated immunity, with an elevated SARS-CoV-2-specific CD8 $^{+}$ activity. Thus, CMV-amplified IL-17-dominated responses to SARS-CoV-2 could be further investigated as a mechanistic player for long-lasting damage as a result of maladjusted immunity from COVID-19 acute phase.

Keywords: Cytomegalovirus. SARS-CoV-2. Immunovirology. Cellular immunology. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ac: Anticorpo;
- Ag: Antígeno;
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa;
- CMV: Citomegalovírus;
- CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*;
- DNA: *Deoxyribonucleic Acid*;
- ECA2: *Enzima conversora da angiotensina II*;
- EDTA: *Ethylenediamine Tetra acetic Acid*;
- HIV: *Human Immunodeficiency Virus*;
- HMO: Hospital Moinhos de Vento;
- IFN: Interferon;
- Ig: Imunoglobulina;
- IL: Interleucina;
- LB: Linfócito B;
- LT: Linfócito T;
- Md: mediana;
- MHC: *major histocompatibility complex*;
- NK: *Natural Killer*;
- PBMCs: Células mononucleares de sangue periférico;
- PBS: *Phosphate buffered saline*;
- PD-1: *programmed death 1*;
- RNA: *Ribonucleic Acid*;
- RSV: *Respiratory Syncytial Virus*;
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*;
- SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*;
- SFB: Soro Fetal Bovino;
- TALE: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido;
- TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Th: *T helper*;
- TNF: *Tumor Necrosis Factor*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 CITOMEGALOVÍRUS E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	8
1.2 RESPOSTA IMUNE AO CITOMEGALOVÍRUS	11
1.3 O SARS-CoV-2	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
3 PERGUNTA DE PESQUISA	25
3.1 JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
6. CONCLUSÃO	45
ANEXO A — Parecer consubstanciado do CEP (HNV)	46
ANEXO B — Parecer consubstanciado do CEP (UFCSPA)	55
ANEXO C — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 CITOMEGALOVÍRUS E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O citomegalovírus humano (CMV), vírus da família *Herpesviridae*, representa uma das infecções mais comuns no ocidente, com prevalência que varia de 50% a 95% [1]. O CMV é um vírus de DNA linear de fita-dupla de ~230 kb, envolvido pelo nucleocapsídeo, seguido de um tegumento com fosfoproteínas e um envelope lipídico [2], como ilustrado na Figura 1. A infecção pelo CMV pode ocorrer como primária, por reinfecção ou reativação, com transmissão através da transfusão sanguínea, transplante de órgãos, amamentação, contato direto com saliva ou urina, contato sexual, dentre outras maneiras [3].

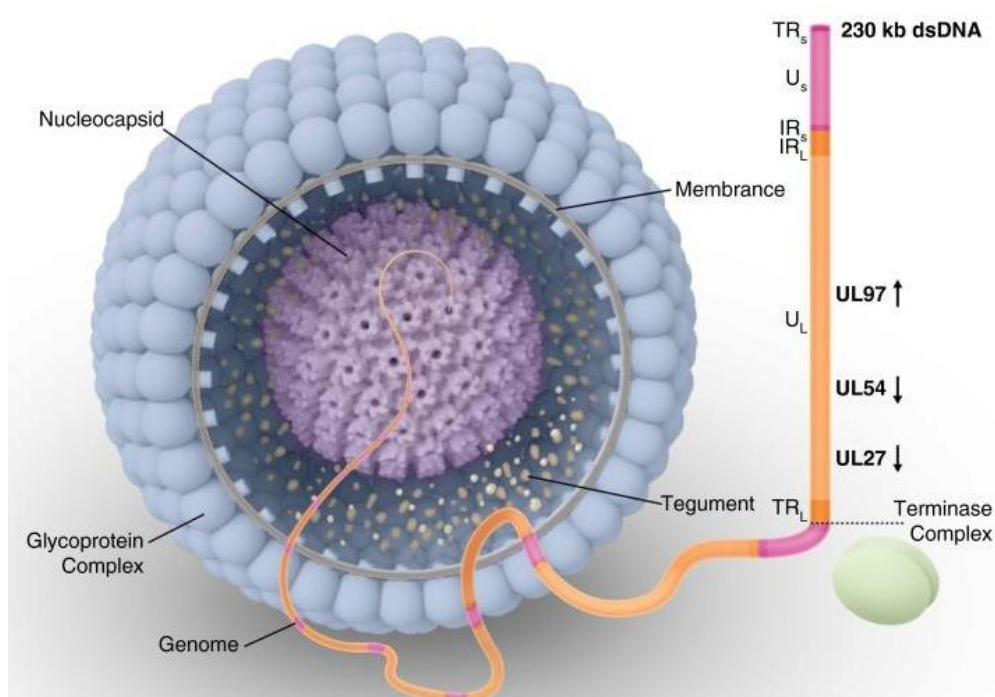


Figura 1. Componentes estruturais do citomegalovírus. Figura extraída de El Chaer et al., Blood. 2016 Dec 8; 128(23): 2624–2636 [2].

A infecção primária por CMV normalmente ocorre durante a infância tardia e pode ser assintomática ou moderada — com sintomas de febre, dor de garganta e fadiga, além de ser autolimitada em imunocompetentes. Após resolução da infecção aguda, o CMV se estabelece em uma fase latente em células progenitoras hematopoiéticas da linhagem mieloide [4], caracterizada

pela manutenção do genoma viral e ausência de expressão de genes de fase lítica, com possibilidade de reativação sob certas condições [5, 6].

A latência do CMV é condicionada por mecanismos virais de inibição de apresentação de antígenos nos MHCs (*major histocompatibility complex*) de classe I e II, bloqueio de respostas por interferon e produção de IL-10 viral, levando a um silenciamento da célula hospedeira, além da produção de mediadores imunossupressores (Figura 2) [7].

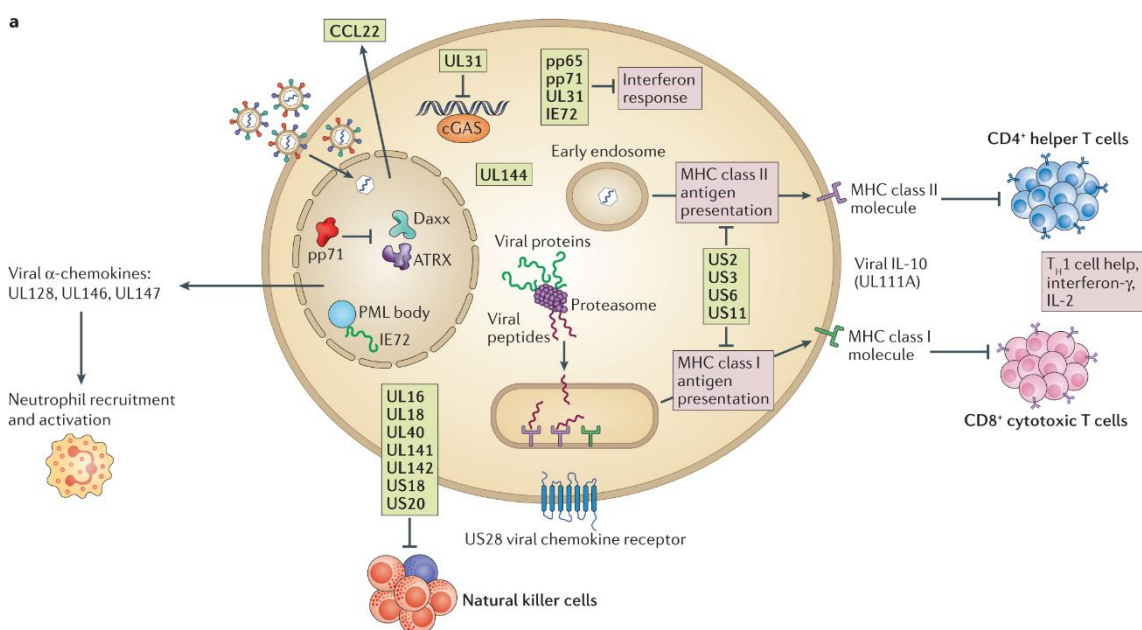


Figura 2. Mecanismos de mantimento da latência viral na célula hospedeira pelo citomegalovírus. Imagem extraída de Griffiths et al., *Nat Rev Microbiol* 19, 759–773 (2021) [7].

O sistema imunológico limita a infecção por CMV através da imunidade adaptativa [8, 9], mediada majoritariamente por linfócitos T (LT) e B (LB) [10]. Enquanto os componentes celulares da imunidade inata atuam na ativação de mecanismos e barreiras pré-existentes e com funções protetivas não direcionadas [11], a imunidade adaptativa age a partir da exposição prévia a antígenos não-próprios, e é caracterizada por respostas específicas e de memória imunológica, fator que garante imunização contra infecções futuras de mesma etiologia [10].

Linfócitos T (LTs), mediadores principais da imunidade específica, passam pelos processos de maturação e seleção, e se diferenciam em duas principais categorias de acordo com a expressão de marcadores de superfície

específicos, LTs CD4+ e CD8+ [12]. Linfócitos T CD4+ compreendem diferentes subpopulações *T helper* (Th) com uma série de funções distintas. O padrão Th1 desencadeia a imunidade celular e é regido por interferons do tipo 1, interleucina-12 (IL-12) e pelo fator de transcrição T-bet, cuja ativação excessiva ocasiona em dano tecidual. Efeitos deletérios associados à inflamação também ocorrem com sustentação de células CD4+ de perfil Th17, detentoras da maior fonte de IL-17 e IL-22 e atuantes como agentes pró-inflamatórios contra bactérias extracelulares e outros patógenos. A diferenciação de células CD4+ Th17 é ativada pelo fator de transcrição ROR γ t e depende principalmente de TGF β e IL-6 como mediadores pró-inflamatórios [13].

Já os linfócitos T CD8+, classe distinta de LTs, são capazes de produzir e secretar diversas classes de citocinas e grânulos citotóxicos (como as perforinas e granzimas), que induzem à morte celular programada de agentes infecciosos e células danosas [12], mecanismo este fundamental para mantimento da homeostase do organismo. O combate a infecções virais está diretamente relacionado a linfócitos citotóxicos (CTLs), cuja diferenciação é estimulada por interferons do tipo 2, IL-6 e IL-1 β [14].

Como descrito acima, a vasta gama de funções protetivas do sistema imunológico implica no combate e neutralização de diversos agentes nocivos ao organismo. Todavia, as funções imunes tendem a decrescer ao longo do tempo, acarretando uma maior suscetibilidade a infecções, eficácia reduzida de vacinas, dentre outros efeitos deletérios [15, 16].

O processo de disfunção imunológica é mediado por diversos aspectos relacionados ou não ao envelhecimento. Em decorrência da idade, a maturação e atividade de células T *naïve* são comprometidas pela involução do timo e, como consequência, a geração de resposta contra novos antígenos circulantes é dificultada [17]. Outro fator pertinente no que diz respeito à perda da função do sistema imune com o decorrer da idade é o acúmulo de células T antígeno-específicas, condicionadas a um processo contínuo de diferenciação com possíveis desfechos de exaustão e senescência replicativa [15, 17].

A exaustão de células T é definida por função efetora reduzida, estado transcricional alterado e expressão de receptores inibitórios, tal qual o *programmed death 1* (PD-1), presente em LTs, LBs, dentre outras células imunes [18]. Quando ativado, o PD-1 desencadeia em processos apoptóticos, inibição

do ciclo celular e da produção de citocinas [19]. O fenótipo característico de células exaustas também pode ser caracterizado por níveis baixos de moléculas de superfície coestimulatórias envolvidas na função celular, como o CD28. A senescência, diferente da exaustão, pode ser ocasionada por danos diretos ao DNA, ou ainda pela perda de telômeros, que decrescem devido à alta taxa de replicação e induzem a paralisação do ciclo celular [20]. O perfil da senescência celular também é associado a um fenótipo pró-inflamatório com produção, sobretudo, de TNF- α , fator contribuinte da inflamação crônica [21].

A imunossenescência, outro termo pertinente à atividade de células T, é ocasionada tanto pela idade como por estímulos antigênicos e reflete características sistêmicas associadas à redução do repertório de células naíve e da diversidade de TCRs, em contraste com a elevação do número de células T terminalmente diferenciadas, inflamação e menor responsividade a novos antígenos [22]. Assim, partindo do pressuposto de que eventos de imunossenescência e exaustão imunológicas decorrem de processos estimulatórios constantes, a cronicidade e latência de infecções virais tornam-se fatores importantes na potencialização do envelhecimento celular, como já observado e estabelecido nas infecções por citomegalovírus [15, 16, 23, 24].

1.2 RESPOSTA IMUNE AO CITOMEGALOVÍRUS

Quando infecta o hospedeiro, o CMV é reconhecido e provoca ativação de mecanismos iniciais de resposta imune inata, que incluem atividade de células *Natural Killers* (NKs), produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores envolvidos no recrutamento de células do sistema adaptativo. A partir do silenciamento transcricional dos genes virais, o CMV infecta e se estabelece em células de origem mieloide e assume um estado quiescente, fator imprescindível para o mantimento da latência viral. Cenários pró-inflamatórios e de imunossupressão tornam o hospedeiro suscetível à reativação do CMV, desencadeada pelo aumento da replicação viral e expressão de genes que silenciam a atividade imune antiviral. Ante esse processo de reativação, a imunidade celular adaptativa atua como principal defesa do organismo para o restabelecimento da latência viral [25].

Citocinas do tipo 1 (de cunho pró-inflamatório) compõem o perfil de resposta imune adaptativa frente ao CMV, com evidências apontando seu papel protetivo contra o vírus [26, 27]. Contudo, a desregulação de citocinas pró-inflamatórias CMV-específicas, como IL-6, IFN γ e TNF α , são capazes de gerar dano tecidual e acarretam quadros clínicos mais graves, com relatos de retinite [28] e “tempestade de citocinas” em modelos murinos de hepatite por CMV [29], perda de audição CMV-induzida em crianças [30, 31], esofagite [32] e inflamação gastrointestinal [33].

Além dessa persistência de resposta imune mesmo durante sua latência, a atividade celular T CMV-específica também é considerada uma assinatura singular do vírus. Em contraste com outros vírus persistentes, o citomegalovírus é capaz de gerar um vasto *pool* de células T CD8+ altamente diferenciadas que são formadas durante a infecção primária e são mantidas como populações relativamente estáveis ao longo do período de latência [34, 35]. Estas células T CD8+ citotóxicas podem ser caracterizadas pela expressão de CD57 e pela perda dos receptores coestimulatórios CD27 e CD28 [23].

Pensando nas características únicas de resposta imune contra o citomegalovírus, efeitos relatados de exaustão e senescência celular de LTs CMV-específicos se mostram diretamente associados a respostas imunes disfuncionais e atenuadas em outras infecções virais. A proliferação exaustiva e inflamento de células CD8+ CMV-específicas em pacientes com HIV são uma fonte potencial de inflamação crônica e senescência linfocítica que podem afetar a função e atividade do sistema imunológico [24, 36].

Enquanto as consequências deletérias da forma latente do CMV são observadas com maior frequência em idosos [37-39], alguns estudos sugerem vantagens imunológicas relacionadas à infecção por citomegalovírus em adultos, como o aumento da polifuncionalidade de células CD8+, expandidas ao fenótipo CD8+CD57+ em indivíduos CMV positivos [40-43]. A hipótese seria a de que, frente a infecções virais em adultos imunocompetentes, a resposta imunológica pode ser potencializada pela presença de células CMV-específicas. Segundo Furman *et al.* [44], a positividade para CMV está associada a respostas aumentadas de anticorpos frente à vacinação do vírus da influenza, com sensibilidade de LTs CD8+ aumentada e níveis de IFN γ circulantes elevados comparados a indivíduos CMV negativos.

Especialmente para as infecções virais, a atividade da resposta imune T específica é imprescindível para o controle e resolução de infecções virais, e a exaustão funcional de linfócitos citotóxicos está diretamente relacionada com progressão de doenças [45]. Neste contexto, a pandemia da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, já passa de 761 milhões de casos confirmados no mundo e 6 milhões de mortes até 21 de março de 2023 [46]. Declarada como um estado emergencial de saúde pública, trouxe consigo a necessidade de compreensão e mensuração de fatores de risco que contribuem para pior prognóstico da doença, havendo *gaps* ainda não pesquisados sobre a influência de infecções virais latentes como contribuintes de um fenótipo específico de resposta imune ao COVID-19, incluindo o CMV [47-49].

1.3 O SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de RNA de fita única pertencente ao gênero *Betacoronavirus* e à família *Coronaviridae*. Possui ~29kb e é envolvido pelo nucleocapsídeo, envelope viral e por uma proteína de membrana. Na superfície, o SARS-CoV-2 expressa a proteína *Spike*, cuja ligação com a ECA-2 (enzima conversora da angiotensina II) na célula hospedeira inicia o processo de infecção ativa [50], conforme a Figura 3.

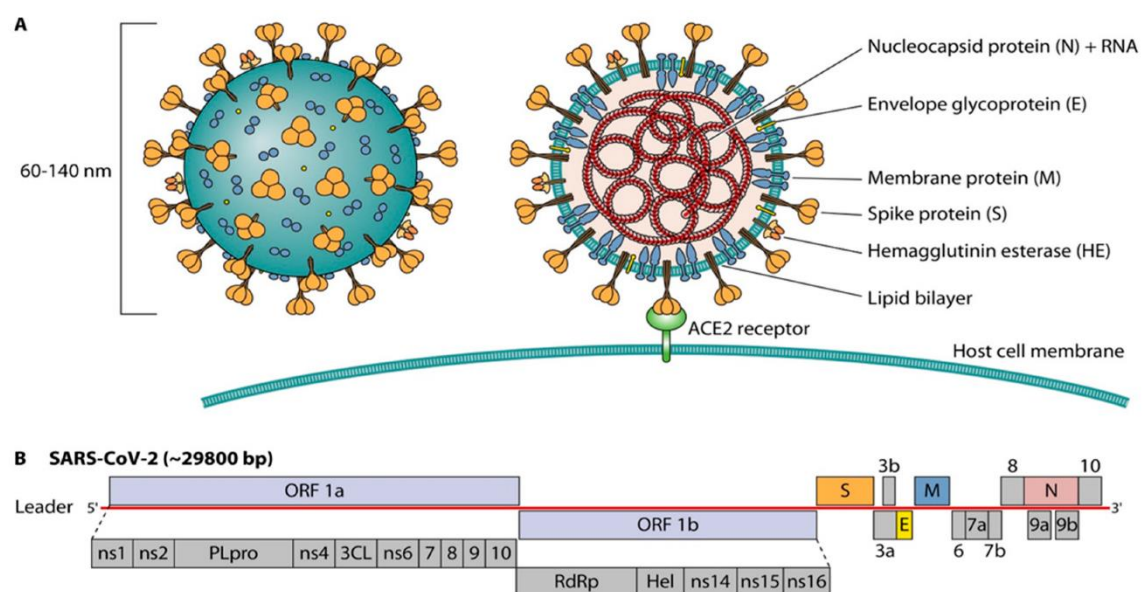


Figura 3. Componentes estruturais do SARS-CoV-2. Imagem extraída de Safiabadi et al., Clin Microbiol Rev. 2021 May 12;34(3):e00228-20 [50].

O SARS-CoV-2 é caracterizado por sua alta taxa de transmissão, e a severidade e complicações da doença possuem variabilidade nos seres humanos. Eventos que vão de febre, dor de cabeça e tosse seca à pneumonia severa, síndrome aguda respiratória, fibrose pulmonar, eventos cardiovasculares, injúria aguda renal, hospitalização e mortalidade têm sido reportados e resultam de diferentes interações hospedeiro-patógeno [51].

Os desfechos da infecção são definidos por uma série de fatores associados ou não ao hospedeiro. Indivíduos mais idosos são mais propensos a desenvolver a forma severa de COVID-19, enquanto a população jovem normalmente experiencia a forma leve da doença. Além disso, uma série de comorbidades, como obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares etc., já foram caracterizadas como fatores de risco para piores prognósticos da infecção por SARS-CoV-2 [52].

No processo de resolução da doença, diversos estudos têm detalhado os nuances do perfil de resposta imunológica contra o SARS-CoV-2. A invasão viral desencadeia uma resposta imune local, com recrutamento de macrófagos e monócitos que liberam citocinas e atraem células T e B para resolução da infecção. Contudo, em alguns casos ocorrem respostas imunes disfuncionais que levam a graus mais graves da doença [53].

Nesses casos, uma resposta imune exacerbada é gerada a partir do aumento de neutrófilos, IL-6 e proteína C reativa (PCR), além da ativação do padrão Th1 e Th17 de resposta, resultando em eventos excessivamente inflamatórios [54]. Certos padrões contribuem para esse aumento da resposta disfuncional ao SARS-CoV-2, com interações diretas ou não com a infecção viral, que incluem imunossenescência, instabilidade genômica, disfunção mitocondrial, alterações epigenéticas e erosão telomérica [51].

Na admissão, pacientes com SARS-CoV-2 podem apresentar linfocitopenia, trombocitopenia e leucopenia, sinônimos da baixa contagem de linfócitos, plaquetas e leucócitos, respectivamente [55]. De acordo com Zheng *et al.* [45], a contagem de células T CD8+ também é significativamente reduzida em pacientes de COVID-19 em graus moderados e graves comparados a grupos controle saudáveis.

O perfil de resposta à infecção e chances de convalescência são estritamente associados à idade, considerada um importante preditor de risco a

indivíduos infectados por SARS-CoV-2. Como já citado, desfechos negativos da doença são relacionados a respostas imunológicas aumentadas e/ou disfuncionais, que podem estar exacerbadas devido a disfunções imunes próprias, como o desenvolvimento de inflamação crônica em idosos [56], além da senescência imunológica, característica acentuada conforme o decorrer dos anos e potencializada pelo descontrole da resposta imune contra infecções persistentes como o CMV [49].

Simonnet *et al.* [57], Gatto *et al.* [58] e Weber *et al.* [59] investigaram a incidência de infecções persistentes em pacientes de COVID-19 grave e encontraram um índice elevado de reativação por citomegalovírus nesses indivíduos, além de uma correlação positiva entre o soro status CMV+ e a severidade da doença [59]. A incidência disseminada de coinfeções pelo SARS-CoV-2 e CMV [60, 61] têm evidenciado a importância de investigar os mecanismos pelos quais a infecção primária ou reativação do CMV ocorre, e sob que circunstâncias essa resposta celular específica pode interferir na resolução da infecção por SARS-CoV-2 em decorrência de seus efeitos já relatados.

Os mecanismos de patogênese do SARS-CoV-2 são hoje intensamente estudados visando desenvolver terapias que evitem desfechos clínicos graves ou mesmo fatais. Para tal, é necessário identificar assinaturas imunológicas indicativas de pior prognóstico, como chances reduzidas de convalescência. A investigação de fatores de risco da doença, como as comorbidades já correlacionadas a desfechos clínicos indesejáveis (doenças cardiovasculares, hipertensão e idade avançada) [49], é uma das abordagens utilizadas para isso.

A hipótese deste trabalho é de que existe uma interação entre as respostas anti-CMV e anti-SARS-CoV-2, e de que isso pode ser evidenciado por correlações entre ambas as atividades vírus-específicas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Li X; Huang Y; Xu Z; Zhang R; Liu X; Li Y; Mao P. Cytomegalovirus infection and outcome in immunocompetent patients in the intensive care unit: A systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1186/s12879-018-3195-5.
- [2] El Chaer F, Shah DP, Chemaly RF. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. **Blood**. 2016 Dec;128(23):2624-2636. DOI: 10.1182/blood-2016-06-688432. PMID: 27760756; PMCID: PMC5146744.
- [3] European Centre For Disease Prevention And Control. Immune responses and immunity to SARS-CoV-2; COVID-19 latest evidence, 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/immune-responses>.
- [4] Wu S; Miller WE. The Human Cytomegalovirus Lytic Cycle Is Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Peripheral Blood Monocytes and in the THP-1 Monocytic Cell Line. **Virology**, [S. l.], v. 483, p. 83–95, 2015. DOI: doi:10.1016/j.virol.2015.04.004.
- [5] Al-omari A; Aljamaan F; Alhazzani W; Salih S; Arabi Y. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. **Annals of Intensive Care**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2016. DOI: 10.1186/s13613-016-0207-8.
- [6] Reeves M; Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [S. l.], v. 325, p. 297–313, 2008. DOI: 10.1007/978-3-540-77349-8_17.
- [7] Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. **Nat Rev Microbiol** 19, 759–773 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00582-z>
- [8] Janeway CA; Medzhitov R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**.

2002;20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861602.

[9] Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde, Andrade LE, et al. Sistema imunitário - parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T E B. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 2010;50(5):552–80.

[10] Ranganathan S. Adaptive Immune System. **Encycl Syst Biol**. 2013;10–1.

[11] Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Correa NE, Montoya-Ortíz G. AUTOIMMUNITY From Bench to Bedside. **Autoimmunity**: From Bench to Bedside. 2013. 767-768-794-800-801-803–804 p.

[12] Moticka EJ. T-Lymphocyte-Mediated Effector Mechanisms. **ScienceDirect Topics**: A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology. 2016;235–42.

[13] McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**. 2008 Apr;28(4):445-53. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.001. PMID: 18400187.

[14] Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**. 2015;16(4):343–53.

[15] Schurich A, Henson SM. The many unknowns concerning the bioenergetics of exhaustion and senescence during chronic viral infection. **Front Immunol**. 2014;5(SEP):1–6.

[16] Akbar AN, Henson SM, Lanna A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. **Trends Immunol** [Internet]. 2016;37(12):866–76. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.09.002>

[17] Libri V, Azevedo RI, Jackson SE, Di Mitri D, Lachmann R, Fuhrmann S, et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived,

multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ T cells: The potential involvement of interleukin-7 in this process. **Immunology**. 2011;132(3):326–39.

[18] Thibault ML, Mamessier E, Gertner-Dardenne J, Pastor S, Just-Landi S, Xerri L, Chetaille B, Olive D. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. **Int Immunol**. 2013 Feb;25(2):129-37. doi: 10.1093/intimm/dxs098. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23087177.

[19] Sharpe, A., Pauken, K. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nat Rev Immunol** 18, 153–167 (2018). <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>

[20] Huang, W., Hickson, L.J., Eirin, A. et al. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. **Nat Rev Nephrol** 18, 611–627 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>

[21] Callender LA, Carroll EC, Beal RWJ, Chambers ES, Nourshargh S, Akbar AN, Henson SM. Human CD8⁺ EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. **Aging Cell**. 2018 Feb;17(1):e12675. doi: 10.1111/accel.12675. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29024417; PMCID: PMC5770853.

[22] J Heath J, D Grant M. The Immune Response Against Human Cytomegalovirus Links Cellular to Systemic Senescence. **Cells**. 2020 Mar 20;9(3):766. doi: 10.3390/cells9030766. PMID: 32245117; PMCID: PMC7140628.

[23] van de Berg PJEJ, Griffiths SJ, Yong S-L, Macaulay R, Bemelman FJ, Jackson S, et al. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere Length of the Circulating T Cell Pool. **J Immunol**. 2010;184(7):3417–23.

[24] Heath JJ, Fudge NJ, Gallant ME, Grant MD. Proximity of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells to replicative senescence in human immunodeficiency virus-infected individuals. **Front Immunol**. 2018;9(FEB).

- [25] La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. **Future Virol.** 2012;7(3):279–93.
- [26] Chen SF, Tu WW, Sharp MA, Tongson EC, He XS, Greenberg HB, et al. Antiviral CD8 T cells in the control of primary human cytomegalovirus infection in early childhood. **J Infect Dis.** 2004;189(9):1619–27.
- [27] Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, Bemelman F, Van Lier RAW, Ten Berge IJM. Primary immune responses to human CMV: A critical role for IFN- γ -producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. **Blood.** 2003;101(7):2686–92.
- [28] Carter J, Alston CI, Oh J, Duncan LA, Esquibel Nemeny JG, Byfield SN, et al. Mechanisms of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. **Future Virol.** 2019;14(8):545–60.
- [29] Trgovcich J, Štimac D, Polić B, Krmpotić A, Pernjak-Pugel E, Tomac J, et al. Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. **Arch Virol.** 2000;145(12):2601–18.
- [30] Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. **Rev Med Virol.** 2007;17(5):355–63.
- [31] Samileh N, Ahmad S, Mohammad F, Framarz M, Azardokht T, Jomeht E. Role of cytomegalovirus in sensorineural hearing loss of children: A case-control study Tehran, Iran. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol.** 2008;72(2):203–8.
- [32] Murakami D, Harada H, Yamato M, Amano Y. Cytomegalovirus-associated esophagitis on early esophageal cancer in immunocompetent host: a case report. **Gut Pathog** [Internet]. 2021;13(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00418-4>

- [33] Marques S, Carmo J, Pinto D, Bispo M, Ramos S, Chagas C. Cytomegalovirus Disease of the Upper Gastrointestinal Tract: A 10-Year Retrospective Study. **GE Port J Gastroenterol**. 2017;24(6):262–8.
- [34] Hertoghs KML, Moerland PD, Stijn A Van, Remmerswaal EBM, Yong SL, Berg PJEJ Van De, et al. Molecular profiling of cytomegalovirus- induced human CD8+ T cell differentiation. **J Clin Invest** [Internet]. 2010;120(11):4077–90.
- [35] Van De Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young S La, Van Donselaar-Van Der Pant KA, et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. **J Infect Dis**. 2010;202(5):690–9.
- [36] Barret, L, Fudge, S, Heath, J., Grant M. Cytomegalovirus Immunity and Exhaustive CD8+ T cell Proliferation in Treated Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clinical Infectious Diseases**, 62, 11, 1 June 2016, Pages 1467–1468.
- [37] Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE. Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly latinos over 9 years of follow-up. **Am J Epidemiol**. 2010;172(4):363–71.
- [38] Wang GC, Kao WHL, Murakami P, Xue QL, Chiou RB, Detrick B, et al. Cytomegalovirus infection and the risk of mortality and frailty in older women: A prospective observational cohort study. **Am J Epidemiol**. 2010;171(10):1144–52.
- [39] Vescovini R, Biasini C, Telera AR, Basaglia M, Stella A, Magalini F, et al. Intense Antiextracellular Adaptive Immune Response to Human Cytomegalovirus in Very Old Subjects with Impaired Health and Cognitive and Functional Status. **J Immunol**. 2010;184(6):3242–9.
- [40] Pera A, Campos C, Corona A, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Larbi A, et al. CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals. **PLoS One**. 2014;9(2):1–7.

- [41] Pera A, Vasudev A, Tan C, Kared H, Solana R, Larbi A. CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4 + T cell subset coexpressing CD57 and CD154 . **J Leukoc Biol.** 2017;101(2):555–66.
- [42] Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8+ T cell responses. **J Exp Med.** 2007;204(6):1405–16.
- [43] Rocha CLH weber; Iagares; C. Subclinical Cytomegalovirus Infection Is Associated with Altered Host Immunity, Gut Microbiota, and Vaccine Responses. **J Virol.** 2018;92(13):1–18.
- [44] Furman D, Jojic V, Sharma S, Shen-Orr S, Angel CJL, Onengut-Gumuscu S, et al. Cytomegalovirus infection improves immune responses to influenza. **Sci Transl Med.** 2015;7(281):1–22.
- [45] Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cell Mol Immunol** [Internet]. 2020;17(5):533–5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- [46] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. **WHO.** 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>
- [47] Dardes D. et al. A Case of Coinfection with SARS-COV-2 and Cytomegalovirus in the Era of COVID-19. **European Journal of Case Reports in Internal Medicine.** [s.l: s.n.]. DOI: Doi: 10.12890/2020_001652 -.
- [48] Le Balc'h, P; Pinceaux, K; Pronier, C; Seguin, P; Tadié, J; Reizine, F. Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. **Critical Care**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 1–3, 2020. DOI: 10.1186/s13054-020-03252-3.

[49] Moss P. The ancient and the new": Is there an interaction between cytomegalovirus and SARS-CoV-2 infection? **Immunity and Ageing**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1186/s12979-020-00185-x.

[50] Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan SM, Jahanshahi-Anbuhi S. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. **Clin Microbiol Rev**. 2021 May 12;34(3):e00228-20. doi: 10.1128/CMR.00228-20. PMID: 33980687; PMCID: PMC8142517.

[51] Salimi S, Hamlyn JM. COVID-19 and Crosstalk With the Hallmarks of Aging. **Journals Gerontol Ser A**. 2020;XX(Xx):1–8.

[52] Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. **Nat Med** [Internet]. 2021;27(1):28–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-01202-8>

[53] Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**. 2020;20(6):363–74.

[54] Gabriella M, Annalisa C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. **Int Immunopharmacol**. 2020;84.

[55] Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J Med**. 2020;382(18):1708–20.

[56] Mallapaty S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. **Nature**. 2020 Apr;580(7802):176-177. doi: 10.1038/d41586-020-00973-x. PMID: 32246117.

[57] Simonnet A, Engelmann I, Moreau A, Garcia B, Six S, Kalioubie A El. High incidence of Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6

reactivations in critically ill patients with COVID-19. **Infect Dis Now**. 2021;296–299 6/34.

[58] Gatto I, Biagioni E, Coloretti I, Farinelli C, Avoni C, Caciagli V, Busani S, Sarti M, et al. Cytomegalovirus blood reactivation in COVID-19 critically ill patients: risk factors and impact on mortality. **Intensive Care Med**. 2022 Jun;48(6):706-713. doi: 10.1007/s00134-022-06716-y. Epub 2022 May 18. PMID: 35583676; PMCID: PMC9116062.

[59] Weber S, Kehl V, Erber J, Wagner KI, Jetzlsperger AM, Burrell T, et al. CMV seropositivity is a potential novel risk factor for severe COVID-19 in non-geriatric patients. **PLoS One**. 2022 May 25;17(5):e0268530. doi: 10.1371/journal.pone.0268530. PMID: 35613127; PMCID: PMC9132318.

[60] Im JH, Lee J-S, Kwon HY, Chung M-H, Baek J. Epstein–Barr Virus and Cytomegalovirus Reactivation in Patients with COVID-19. **Res Sq**. 2020;

[61] Siddiqui SS, Chatterjee S, Yadav A, Rai N, Agrawal A, Gurjar M, et al. Cytomegalovirus Coinfection in Critically Ill Patients with Novel Coronavirus-2019 Disease: Pathogens or Spectators? **Indian J Crit Care Med** 2022;26(3):376–380

[62] Reddehase MJ, Lemmermann NAW. Mouse Model of Cytomegalovirus Disease and Immunotherapy in the Immunocompromised Host: Predictions for Medical Translation that Survived the "Test of Time". **Viruses**. 2018 Dec 6;10(12):693. doi: 10.3390/v10120693. PMID: 30563202; PMCID: PMC6315540.

[63] Zheng J, Wong LR, Li K, Verma AK, Ortiz ME, Wohlford-Lenane C, Leidinger MR, Knudson CM, Meyerholz DK, McCray PB Jr, Perlman S. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. **Nature**. 2021 Jan;589(7843):603-607. doi: 10.1038/s41586-020-2943-z. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33166988; PMCID: PMC7855185.

[64] Perlman S, McCray P. B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J. **The Jackson Laboratory.** Acessado em 2023. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/034860>

3 PERGUNTA DE PESQUISA

- Existe relação entre a resposta imune ao CMV e a resposta imune ao SARS-CoV-2 em indivíduos infectados por ambos os vírus?

3.1 JUSTIFICATIVA

Os estudos que associam piores prognósticos de COVID-19 a coinfeções virais ressaltam a necessidade de investigar se há um impacto de infecções persistentes na resposta imune celular e humoral contra o SARS-CoV-2. Os resultados dessas investigações podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias para tratamento e resolução da COVID-19 com menor prejuízo à saúde dos indivíduos acometidos.

4. OBJETIVOS

- Investigar associações entre as respostas imunes CMV-específica e SARS-CoV-2-específica.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o título de anticorpos anti-CMV em indivíduos com graus leve e grave de COVID-19;
- Investigar frequência e fenótipo de células T CD4+ e CD8+ CMV- ou SARS-CoV-2-específicas;
- Analisar as citocinas séricas representativas de perfis Th1, Th2 ou Th17 dos pacientes;
- Investigar possíveis correlações entre os parâmetros analisados.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Este trabalho gerou a publicação de um artigo original intitulado “*A high CMV-specific T cell response associates with SARS-CoV-2-specific IL-17 T cell production*” (DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00758-1>), publicada na revista *Medical Microbiology and Immunology*, cujo fator de impacto é 4.148 (2021) e possui qualis A3.



A high CMV-specific T cell response associates with SARS-CoV-2-specific IL-17 T cell production

Fernanda Tereza Bovi Frozza¹ · Tiago Fazolo¹ · Priscila Oliveira de Souza¹ · Karina Lima¹ · Julia Crispim da Fontoura¹ · Théo Souza Borba¹ · Márcia Polese-Bonato² · Luciane Beatriz Kern² · Renato T. Stein^{2,3} · Graham Pawelec^{4,5} · Cristina Bonorino^{1,6}

Received: 8 August 2022 / Accepted: 24 November 2022 / Published online: 13 December 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

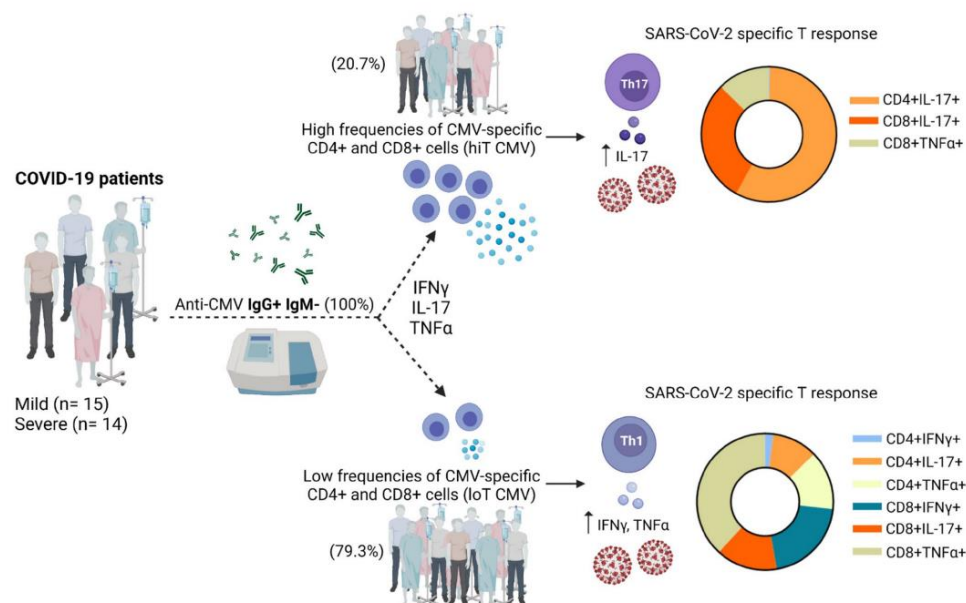
Human cytomegalovirus (CMV) is a widespread persistent herpes virus requiring lifelong immune surveillance to maintain latency. Such long-term interactions with the immune system may be associated with deleterious effects including immune exhaustion and senescence. Regarding the COVID-19 pandemic, we asked whether CMV-specific cellular and humoral activity could influence immune responses toward SARS-CoV-2 and/or disease severity. All adults with mild ($n = 15$) and severe ($n = 14$) COVID-19 were seropositive for anti-CMV IgG, but negative for IgM antibodies. Antibody titers did not correlate with COVID-19 severity. Six patients presented elevated frequencies of CMV-specific CD4+ and CD8+ T cells producing IFN γ , IL-17, and TNF α , designated as CMV high responders (hiT CMV). In comparison to low CMV responders, hiT CMV individuals exhibited higher frequencies of SARS-CoV-2-specific CD4+ IL-17+ and CD8+ IFN γ +, IL-17+ or TNF α + T cells. These results indicate that high frequencies of CMV-specific T cells may be associated with a SARS-CoV-2-reactive profile skewed toward Th17-dominated immunity.

Edited by Matthias J. Reddehase.

✉ Fernanda Tereza Bovi Frozza
 fernandabfrozza@gmail.com

- ¹ Basic Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Immunotherapy Laboratory–UFCSA, R. Sarmiento Leite, 245-Centro Histórico, Porto Alegre 90050-170, Brazil
- ² Social Responsibility–PROADI-SUS, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brazil
- ³ Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brazil
- ⁴ Department of Immunology, University of Tübingen, Tübingen, Germany
- ⁵ Health Sciences North Research Institute, Sudbury, ON, Canada
- ⁶ Department of Surgery, University of California at San Diego - UCSD, La Jolla, CA, USA

Graphical abstract



Keywords Cytomegalovirus · SARS-CoV-2 · Cellular immunity · Lymphocytes · Cytokines · Th17

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) belongs to the *Herpesviridae* family causing persistent latent infection in immunocompetent individuals. After primary infection, the host may experience several episodes of reinfection or reactivation, as the virus persists in a latent phase in hematopoietic progenitors and cells within the myeloid lineage [1]. Cytomegalovirus represents one of the most common infections globally, with a prevalence ranging from 50 to 95% depending on age and socioeconomic status [2]. Studies from Southern Brazil [3–5] show an 88–98% IgG prevalence in adults below 55 years old, and 100% in older individuals, with anti-CMV IgM present in 2.4% of the adult population, most of them under 35 years old and probably representing new infections [5].

The chronic interaction of CMV with the immune system, necessary for maintaining latency and preventing pathology, may eventually be associated with deleterious effects reflecting immune exhaustion and senescence, especially in the elderly [6–8], while in CMV-positive young people

and adults, the presence of highly differentiated and sensitized T cells is potentially an immunological advantage for responses against other pathogens [9–12]. We asked whether the severity of SARS-CoV-2 disease, which has pathological mechanisms associated with severe acute respiratory syndrome that include dysfunctional and exacerbated immune responses [13], was associated with the immune response to CMV infection. We found that, although anti-CMV IgG titers did not correlate with COVID-19 severity, high frequencies of CMV-specific CD4+ and CD8+ T cells were associated with elevated levels of SARS-CoV-2-specific IL-17-producing CD4+ and CD8+ T cells. This suggests that CMV may skew the anti-SARS-CoV-2 activity toward an immune phenotype polarized to a Th17 type of response which could influence inflammation and the course of disease.

Methods

Patients

This is a case–control study focused on the analysis of CMV humoral and cellular immune responses in mild and severe COVID-19 patients. A convenience sample of COVID-19 patients was obtained from Moinhos de Vento and Restinga Extremo Sul hospitals, located in Porto Alegre, Brazil. Adults with confirmed SARS-CoV-2 positivity that arrived at either hospital were invited to participate in the study. Participants included were recruited from June to December 2020, all > 18 years of age who presented with cough and/or axillary temperature above 37.8 °C and/or sore throat, and who were hospitalized, in emergency rooms or outside health units. Nasopharyngeal and oropharyngeal swabs were collected to confirm the COVID-19 diagnosis. Clinical and demographic data were collected at inclusion. Disease severity was obtained according to the World Health Organization classification following a standardized protocol [14]: severe COVID-19 patients were classified based on oxygen saturation < 90% in room air, with signs of severe respiratory distress and pneumonia. Mild disease was defined by the absence of any of the criteria above for severe COVID-19. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB 30,749,720.4.1001.5330) at Hospital Moinhos de Vento and Ethics Committee from Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (CEP-UFCSPA) (CAAE 30,749,720.4.3001.5345). Informed consent was obtained from all participants or legal guardians.

SARS-CoV-2 RT-qPCR

A qualitative RT-PCR assay to SARS-CoV-2 was performed for all participants as detailed in our previous work [15]: bilateral nasopharyngeal and oropharyngeal swabs were collected and transported in medium with saline solution and RNAlater®, RNA Stabilization Solution (Catalog number AM7021, Invitrogen™). For RNA extraction, MagMax™ Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems) was used in the KingFisher Duo Prime System (ThermoFisher, USA) automated platform. The RT-PCR assay was performed in a 10 µL total reaction, using Path™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (catalog number A15299, AppliedBiosystems), and TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1 (catalog number A47532, AppliedBiosystems). As control, 5 µL (200 copies/µL) of the TaqMan™ 2019-nCoV Control Kit v1 (catalog number A47533, AppliedBiosystems) was used. QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, USA) was applied to perform the PCR.

ELISA

IgG and IgM antibodies for CMV and IgG and IgA for SARS-CoV-2 S-RBD (Spike-Receptor Binding Domain) and N (Nucleocapsid) peptides were analyzed. Heat-Inactivated (56 °C for 60 min) plasma samples from the study participants were used in the assay.

Anti-CMV antibodies were tested using commercial kits provided by BioClin (Brazil). Qualitative IgM determination was performed by enzyme immunoassay (Biolisa CMV IgM, K123—BioClin). Positive results were defined by absorbance greater than the cut-off calibrator. For IgG, we performed a quantitative determination (Biolisa CMV IgG, K122—BioClin). To quantify the sample absorbances as IU/mL (International Units per mL), five reference standard solutions containing IgG anti-CMV antibodies in different concentrations were used in the assay, and a concentration curve was obtained from each absorbance and known IgG (in IU/mL). Samples' absorbances were converted to IU/mL based on the assay concentration curve. Negative and positive controls from the kits were used in the assays to confirm test accuracy.

For anti-S-RBD and anti-N IgG and IgA, we followed our previous study protocol [15]. Briefly, ELISA plates (Kasvi, Brazil) were coated overnight with 1 µg/mL of SARS-CoV-2 Spike Protein (S-RBD; Catalog nr. RP-87678, Invitrogen) or N peptide (Fiocruz, Brazil). Next, blocking buffer was added for 1 h at room temperature. Samples were serially diluted in 0.05% PBS-Tween 20 (milk 1%) starting at 1:25 and incubated for 2 h at 37 °C. Secondary antibodies diluted in 0.05% PBS-Tween were then added and plates were incubated for 1 h at room temperature. Anti-human peroxidase produced in rabbits (Catalog nr. IC-1H01—Rhea Biotec, Brazil) was used for IgG, and anti-human peroxidase produced in goat (Catalog nr. A18781—Invitrogen, USA) was used for IgA, both at a 1:10,000 dilution. The assay was developed with TMB Elisa Substrate—High Sensitivity (Abcam, United Kingdom) for 30 min, and 1 M chloric acid was added to stop the reaction. An ELISA reader (Biochrom EZ 400) was used to measure anti-CMV and anti-SARS-CoV-2 antibodies with a 450 nm O.D. To calculate the area under the curve (AUC), a baseline of 0.07 was applied [16].

PBMC Isolation

Blood samples were collected in EDTA tubes and stored at room temperature. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation, using Ficoll™ PLUS (GE Healthcare®). Cells were resuspended in Fetal Bovine Serum (FBS) with 5% DMSO and stored in liquid nitrogen until analysis.

Table 1 Patient's baseline and COVID-19 related data

	Mild	Severe	<i>p</i> -value
<i>N</i>	15	14	
Age, mean $\pm$ SD	38.8 $\pm$ 12.6	53.6 $\pm$ 17.9	0.02 (*)
Female, <i>n</i> (%)	9 (60)	8 (57.1)	> 0.99
<i>Racial/ Ethnic group</i>			
Caucasian, <i>n</i> (%)	12 (80)	9 (64.3)	0.43
Black, <i>n</i> (%)	2 (13.3)	1 (7.1)	> 0.99
Other/ Not Reported, <i>n</i> (%)	1 (6.7)	4 (28.6)	0.17
<i>Symptoms</i>			
Days of symptoms until blood collection, median (IQR)	17 (15–22)	10.5 (7–14.7)	0.05 (*)
Fever, <i>n</i> (%)	11 (73.3)	11 (78.6)	> 0.99
Dyspnea, <i>n</i> (%)	7 (46.7)	9 (64.3)	0.46
Comorbidities, <i>n</i> (%)	2 (13.3)	9 (64.3)	0.008 (**)
Asthma, <i>n</i> (%)	1 (6.7)	2 (14.3)	0.6
Hypertension, <i>n</i> (%)	1 (6.7)	5 (35.7)	0.08
Congenital heart disease, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (7.1)	0.5
COPD, <i>n</i> (%)	0 (0)	3 (21.4)	0.1
DM 1, 2, <i>n</i> (%)	1 (6.7)	3 (21.4)	0.33
Prior Stroke, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (7.1)	0.48
Heart Failure, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (7.1)	0.48
Obesity, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (7.1)	0.48

Demographic and COVID-19-related data from the study sample. Age was analyzed by unpaired *T*-test with Welch's correction and anti-CMV IgG and days of symptoms were analyzed by unpaired Mann–Whitney test. Fisher's exact test was used to compare proportions of racial groups, comorbidities, and symptoms between groups, with *p* values < 0.05 (*), < 0.01 (**), and < 0.001 (***). Abbreviations: COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; DM 1, 2: Type 1, 2 Diabetes Mellitus; NR Not Reported

T cell in vitro simulation

After thawing, PBMCs were counted and viability was evaluated, with subsequent plating in 96-well plates at 3×10^5 PBMCs per well in 100 μ L of RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich—R8758) supplemented with fetal bovine serum (10%) and antibiotics (100 IU penicillin/mL, 100 μ g streptomycin/mL and 2 mM L-glutamine (Lonza, Belgium)). Cells were stimulated with a CMV mega pool (2 μ g/mL, composed of 42 peptides from cytomegalovirus, including pp50, pp65, IE1, IE2, and envelope glycoprotein B—Mabtech, Sweden) or 1 μ g/mL of peptide PepTivator SARS-CoV-2 Prot S (130–126–700—Miltenyi Biotec, Germany), PepTivator SARS-CoV-2 Prot N (130–126–698—Miltenyi Biotec, Germany) or PepTivator SARS-CoV-2 Prot M (130–126–702—Miltenyi Biotec, Germany). PMA (50 ng/mL, Sigma, USA) plus ionomycin (1 μ g/mL, Cayman chemical company, USA) and DMSO were used as positive and negative controls, respectively. Plates were incubated at 37 °C/5%

CO₂ for 18 h. Three hours before harvesting the cells, 1 μ g/ml of Golgi Plug (BD Biosciences, USA) was added to each well. Cells were labeled and analyzed by flow cytometry to establish their phenotypes as follows.

CD4 + and CD8 + immunophenotyping

Cells were labeled with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 for viability, and then with surface marker antibodies: anti-CD3-PE-Cy7 (clone SK7), anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T4), and anti-CD8-APC-H7 (clone SK1). For intracellular cytokine labeling, cells were first stained with surface markers, and then fixed, and permeabilized with Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences-Pharmingen, USA). They were then stained with anti-IFN γ -FITC (clone 4S.B3), anti-TNF α -APC (clone MAb11), and anti-IL-17-PE (clone SCPL1362) antibodies. For surface antibody staining, incubation was for 30 min at room temperature in the dark. For intracellular antibodies, the interval was 40 min at 2–8 °C. Samples were analyzed using BD Biosciences—FACSCanto II and FlowJo 10.7.1 software. CMV- and SARS-CoV-2-specific CD4 + and CD8 + cells are represented as frequencies of viable PBMCs.

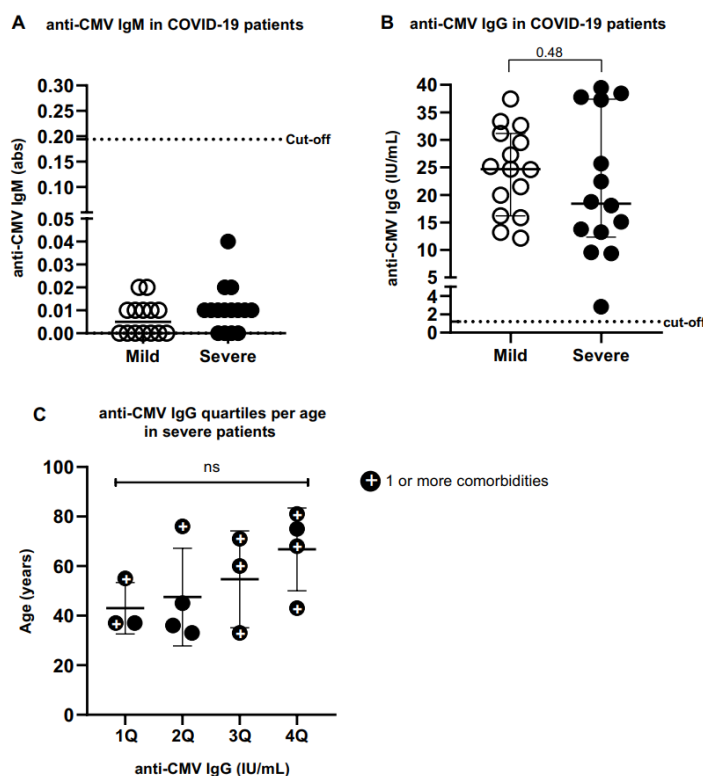
Serum cytokine measurements

IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A concentrations in inactivated serum were analyzed with a commercial BD CBA Human Th1/Th2/Th17 cytokines kit (cat 560,484, BD Inc., USA), as described in our previous work [15]. Briefly, a mixture of capture beads coated with capture antibodies specific for each cytokine and a phycoerythrin (PE) detection reagent were used according to the manufacturer's instruction. Then, samples were measured on the BD FACS Canto II flow cytometer and analyzed by FCAP Array software 3.0. Individual cytokine concentrations were indicated by their fluorescent intensities and represented in pg/mL.

Statistical analysis

The Shapiro Wilk test was used to determine normal distribution of results. For age, mean $\pm$ standard deviation was considered, and an unpaired *T*-test with Welch's correction was applied. Fisher's exact test was used to calculate proportions between groups. For anti-CMV IgG, days of symptoms until blood collection and CD4 + and CD8 + specific T cell frequencies, median $\pm$ interquartile range was considered. A nonparametric two-tailed Mann Whitney test was used for comparison between two groups and the Kruskal–Wallis test for comparisons between more than two groups. Spearman *r* was used for correlations between variables (*corrplot* package in R). Statistical analysis was conducted in *GraphPad Prism* 9.0 and *R* 4.1.

Fig. 1 Qualitative anti-CMV IgM (A) and quantitative anti-CMV IgG (B) assays in mild ($n = 15$) and severe ($n = 14$) COVID-19 patients. Samples of serum were diluted according to the kit instructions. Cut-offs of 0.194 (absorbance) for IgM and 1.2 (IU/mL) for IgG were calculated based on the calibrator of the commercial kits used for the analysis. (C) Comparison of anti-CMV IgG quartiles by age in severe COVID-19 patients ($n = 14$). Statistical analysis using nonparametric Mann–Whitney test for A–B and Kruskal–Wallis test for C, with p values < 0.05 (*), < 0.01 (**) and < 0.001 (***)



Results

As shown in Table 1, severe COVID-19 patients were significantly older than mild patients (53.6 ± 17.9 vs 38.8 ± 12.6 , $p < 0.05$), in addition to having a higher proportion of comorbidities (9 (64.3%) vs 2 (13.3%), $p < 0.001$) such as hypertension, congenital heart disease, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Diabetes Mellitus 1 or 2, prior stroke, heart failure, and obesity. These results align with previous studies that attribute comorbidities as a risk factor for the severity of COVID-19 [17, 18].

To investigate cytomegalovirus prevalence in mild and severe COVID-19 patients, we evaluated anti-CMV IgG and IgM positivity to determine the presence of primary infection (IgM+), latency (IgG+), or reactivation cases (IgM+, IgG+) in our sample. While none of the patients with confirmed COVID-19 was CMV IgM-seropositive (Fig. 1A), all were IgG-seropositive. No significant difference in IgG titers was found according to the severity of the disease (Fig. 1B).

The wide range of anti-CMV IgG titers in severe COVID-19 patients (18.4 IU/mL (2.8–39.5)) might be attributable to age variation in this group (53.6 ± 17.9 years). Based on studies that showed associations between anti-CMV IgG titers and age [19], we separated severe patients by anti-CMV IgG quartiles and found that individuals with higher IgG titers indeed tended to be older (Fig. 1C). We also assessed the proportion of comorbidities in each anti-CMV IgG quartile and observed that six of the nine severe patients with comorbidities (66.7%) were concentrated in the third and fourth quartiles, whereas four of the five individuals with no comorbidities (80%) belonged to the first and second IgG quartiles. In contrast, neither age nor the presence of comorbidities correlated with anti-CMV IgG titers in patients with mild COVID-19.

We then asked if CMV-specific T responses were different in COVID-19 patients according to disease severity. We assessed the frequencies of CD4+ and CD8+ CMV peptide-specific T cells by the production of IFN γ , IL-17,

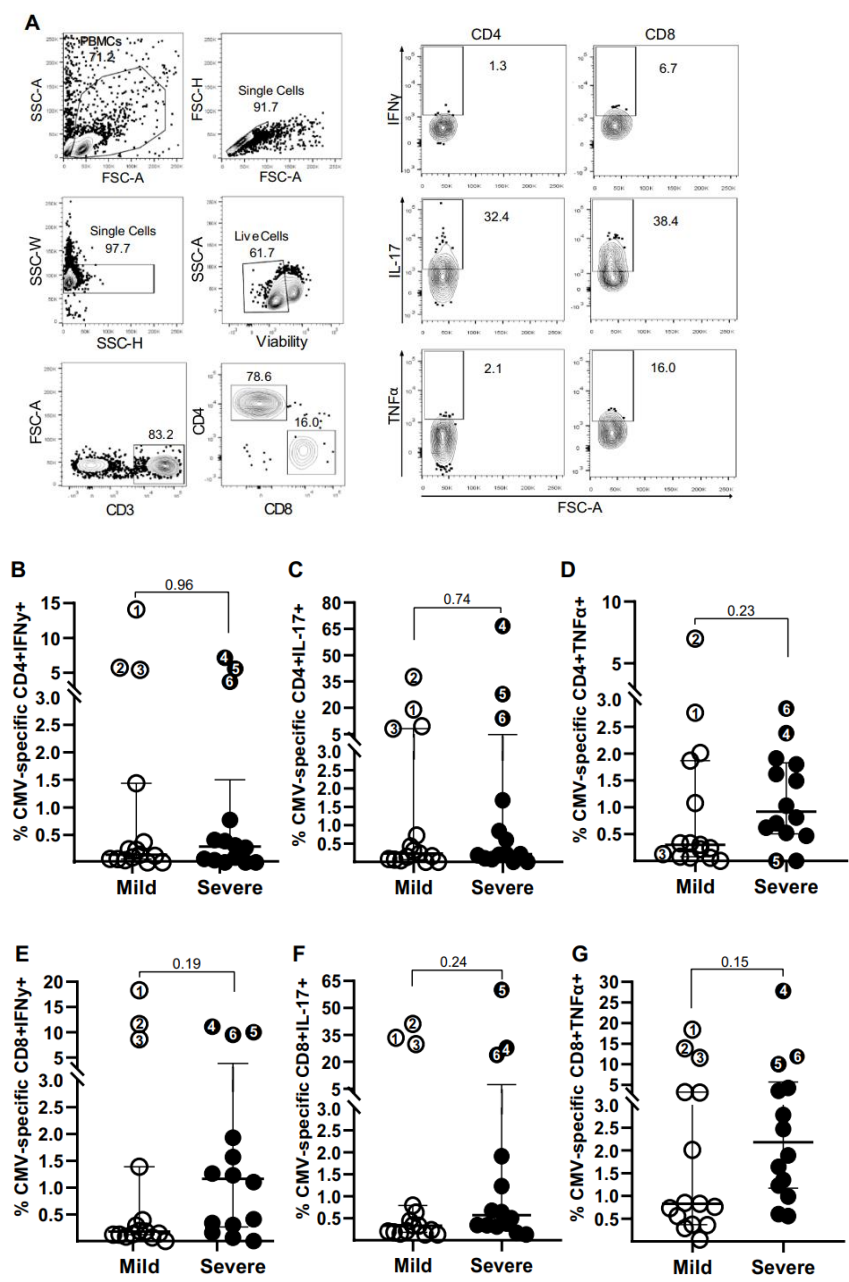


Fig. 2 **A** Gate strategy for T cell responses after stimulation with CMV peptides. The same gates were applied for SARS-CoV-2 peptides and controls. Each panel depicts how peptide-specific CD4+ and CD8+ T cells were selected: viable PBMCs were isolated through size and complexity (FSC-A, SSC-A) together with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510. Anti-CD3 stained cells were then selected to isolate only lymphocytes that were positive for anti-CD4 or anti-CD8 with the respective cytokines (IFN γ , IL-17 or TNF α). **B–G** Frequencies of CMV-specific CD4+ and CD8+ T cells in mild ($n=15$) and severe ($n=14$) COVID-19 patients. T responses represented in frequencies of parent: **B** CD4+IFN γ +, (**C**) CD4+IL-17+, **D** CD4+TNF α +, **E** CD8+IFN γ +, **F** CD8+IL-17+, and **G** CD8+TNF α +, after stimulation with CMV peptides. Bars represent median with interquartile range, and dots represent each patient. Six individuals from mild (1, 2, 3) and severe (4, 5, 6) groups exhibited frequency of cells above the third quartile for at least 5 of the 6 subpopulations analyzed. Statistical analysis by Mann–Whitney test, with p values <0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***)

and TNF α by flow cytometry (gating strategy presented in Fig. 2A). Despite the lack of difference in terms of severity of disease, a group of CMV responders [patients' number 1 to 6 (Fig. 2B–G)], exhibited frequencies of CMV-specific cells above the third quartile for at least five of the six subpopulations analyzed (CD4+IFN γ + > 1.1%; CD4+IL-17+ > 4.9%; CD4+TNF α + > 1.83%; CD8+IFN γ + > 1.75%; CD8+IL-17+ > 1.57%; CD8+TNF α + > 3.9%). Figure 3 shows that, overall, CMV-specific T responses had significant correlations with each other, in contrast to the absence of association with anti-CMV IgG titers.

By separating this group of CMV high T responders (designated “hiT CMV”) from those with lower levels of response (“loT CMV”), we investigated SARS-CoV-2-specific CD4+ and CD8+ cells in both groups following stimulation of PBMCs with Spike (S), Membrane protein (M) or Nucleocapsid (N) peptides. We matched baseline characteristics between hiT and loT CMV groups for further analysis. Mean age of the hiT CMV group ($n=6$) was 46 ± 9.4 years, similar to 48 ± 19.2 years of the loT CMV group ($n=10$). Three patients (50%) in the hiT group and 5 (50%) in the loT CMV group presented with one or more comorbidities. The number of symptomatic days prior to blood collection was 13 (10.5–20.2) for the hiT patients and 10.5 (3.5–16.2) for the loT group.

hiT CMV individuals showed an increase in the frequencies of SARS-CoV-2-specific CD4+IL-17+, CD8+IL-17+, CD8+TNF α +, and CD8+IFN γ + cells (Fig. 4B–G), whereas loT CMV showed elevated CD4+TNF α + frequencies for all three peptides analyzed (Supplementary Table 1). A comparison of the proportions of SARS-CoV-2-specific cytokine production between hiT and loT CMV individuals revealed that S- and N-specific CD4+ and CD8+ profiles were skewed to a Th17 type response in the hiT CMV group, with predominant IL-17-producing cells and an absence of CD4+TNF α + cells

(Fig. 4H). PBMCs stimulated with M peptide showed a less skewed response profile in the hiT CMV group. Thus, unlike the polarized Th17 profile stimulated by S and N peptides in hiT CMV responders, an overall more diversified phenotype of response was observed in the loT CMV individuals.

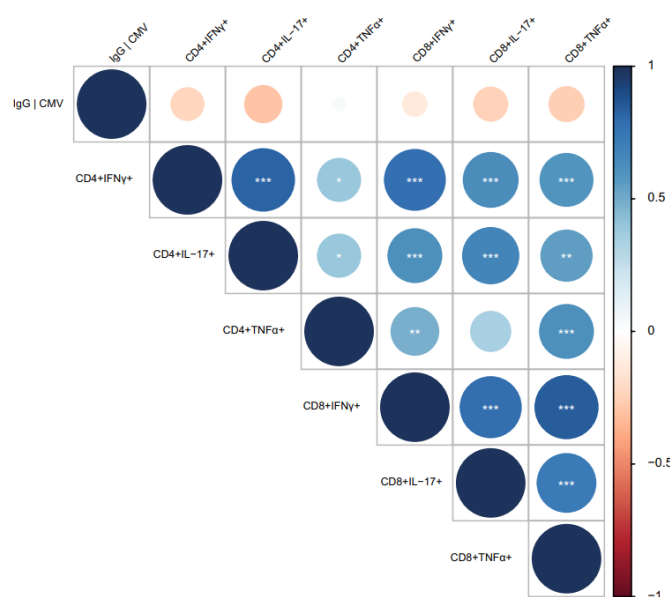
We then investigated possible associations between responses against the two viruses in CMV high and low T responders. Figure 5A–B shows that anti-CMV IgG correlated positively with anti-RBD IgG and anti-N IgA antibodies in hiT CMV, but not loT CMV individuals. In the hiT CMV group, anti-RBD IgG levels, but not IgA, correlated positively with all other anti-SARS-CoV-2 antibodies assayed. Anti-S-RBD and anti-N IgG were positively correlated with anti-N IgA in the loT CMV group.

Next, we asked if the frequency of CMV-specific T cells producing IFN γ , IL-17, or TNF α correlated with SARS-CoV-2-specific responses. Figure 5C shows that, in the hiT CMV group, both CD8+ and CD4+IFN γ + responses to CMV positively correlated with anti-SARS-CoV-2 IFN γ + responses, while only CMV-specific CD4+IL-17+ consistently correlated positively with IL-17+ anti-SARS-CoV-2 responses; anti-CMV CD8+IL-17+, instead, negatively correlated with IL-17+ anti-SARS-CoV-2 responses. Correlations of CMV-specific CD4+TNF α + cells were also mostly positive between them and anti-SARS-CoV-2 TNF α +, except for CD8+TNF α + cells and anti-M TNF α + cells (both CD4+ and CD8+, Fig. 5E). For the loT CMV group, these patterns were not observed (Fig. 5D).

Finally, considering the elevated frequency of IL-17 responses in the hiT CMV individuals, we analyzed Th1 (IFN γ , TNF α), Th2 (IL-4, IL-10) and Th17 (IL-6, IL-17) cytokines in the patients' serum to investigate if there were systemic implications related to the Th17 skewed profile observed. As shown in Fig. 6A–F, we found no differences in the concentration of these cytokines between hiT and loT CMV groups. However, their profile, or proportion, was unique for each group: hiT CMV individuals exhibited more IL-17 and IL-6 than any other cytokine, whereas the loT CMV group presented an IL-6 and IL-10 enriched state (Fig. 6G). This distinct IL-17 predominance corroborates our findings regarding the peptide-specific T cell responses with a Th17 polarized profile in the hiT CMV group.

The balance of Th1/Th2/Th17 serum cytokines was analyzed through a matrix correlation in each group. Figure 6H–I shows that the loT CMV group exhibited strong positive correlations between Th1, Th2 and Th17 cytokines, suggesting a balance between pro and anti-inflammatory responses during COVID-19. On the other hand, hiT CMV individuals did not show the same equilibrated profile, with negative correlations between Th2 (IL-4) with Th1 (IFN γ and TNF α) cytokines.

Fig. 3 Correlation matrix between anti-CMV IgG titer and CMV-specific CD4 + and CD8 + T cell frequencies in COVID-19 patients ($n=29$). Anti-CMV IgG titers presented in IU/mL and T responses in frequencies of parent. Circle size and color intensity indicate the strength of correlation by Spearman r (bigger and darker circles denote stronger associations), and colors depict positive (blue) or negative (red) correlations, with $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**) and < 0.001 (***)



Altogether, these data indicate that the predominant CD4 + IL-17 + frequencies toward CMV and SARS-CoV-2 may have systemic implications, including a higher proportion of serum IL-17A compared to other cytokines, and an imbalance of Th1, Th2 and Th17 immune profiles during infection.

Discussion

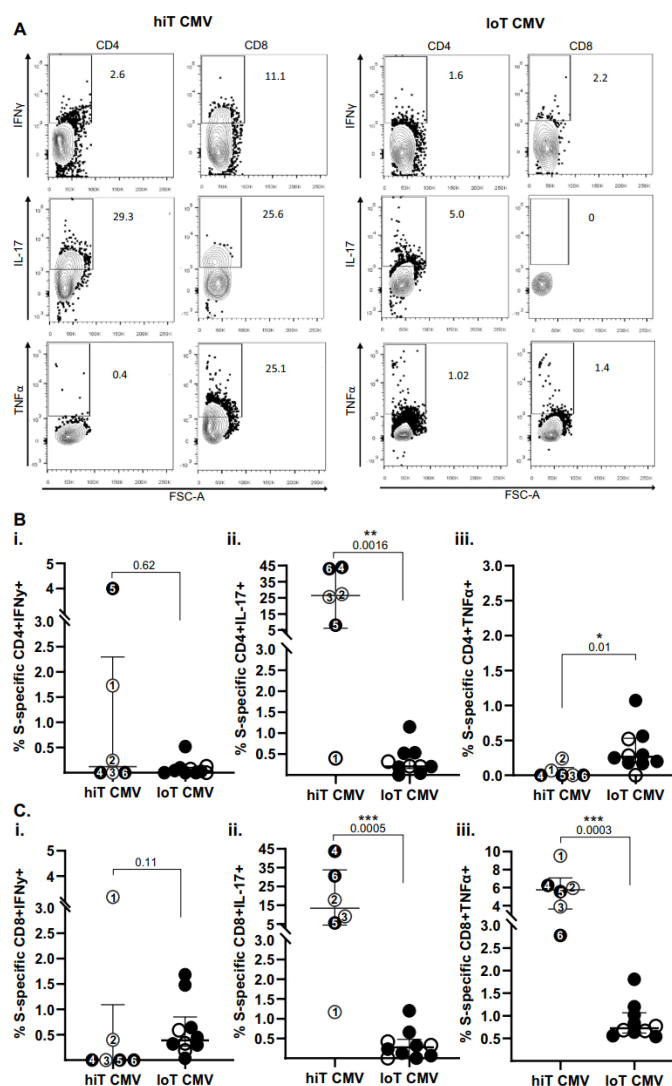
Since the SARS-CoV-2 outbreak, countless efforts have been made to investigate and understand risk factors related to a worse COVID-19 prognosis. The phenomena of cytomegalovirus reactivation in COVID-19 patients, in addition to longer ICU stay and lower chances of convalescence [20–26], highlight how important it is to study the impact of CMV infection and latency in the immune defense against SARS-CoV-2.

Given the mean age of our sample ranging from 20 to 81 years (45.9 ± 16.8 years), the absolute positivity rate for IgG showed the expected CMV prevalence in Southern Brazil [3–5]. We found that, despite the high prevalence of anti-CMV IgG, which indicates previous infection and latency (IgG + and IgM -), antibody titers did not correlate with severity of COVID-19 or humoral responses to SARS-CoV-2. Additionally, age and comorbidities did not significantly correlate with anti-CMV IgG titers in severe

COVID-19 patients. This was perhaps unexpected given published studies showing associations between high titers of IgG to cytomegalovirus with disease progression and mortality in COPD [27, 28], hypertension [29], and cardiovascular diseases [30], which have all been identified as risk factors for COVID-19 severity [31].

We also found that CMV-specific T cell responses were not associated with COVID-19 clinical course. Strikingly, in the individuals with higher CMV-specific T responses, CD4 + and CD8 + immune profiles following Spike and Nucleocapsid stimulation in vitro were polarized toward a Th17-type of response, in contrast to more heterogeneous proportions of Th1 and Th17 cytokines in loT CMV individuals. Immune responses orchestrated by IL-17 are commonly associated with defense against extracellular fungi and bacteria through the recruitment of neutrophils and mononuclear phagocyte activation [32, 33]. Th17-dominated immunity is not the most effective type of response against viruses, which is associated with type 1 immunity and IFN γ production [34]. This agrees with recent studies that show IL-17 as a dysfunctional type of response against SARS-CoV-2, responsible for so-called “immune misfiring” [35], and associated with a worse prognosis of the disease, including mortality [36, 37]. Nevertheless, we could not confirm a relationship between the Th17 phenotype displayed by hiT CMV individuals and disease severity. It is possible that the “immune misfiring” is not as obvious as

Fig. 4 **A** Gating representation showing SARS-CoV-2-specific CD4⁺ and CD8⁺ frequencies in hiT and loT CMV individuals. **B–G** SARS-CoV-2-specific responses after stimulation with Spike **B–C**, Membrane **D–E** or Nucleocapsid **F–G** peptides, respectively, in hiT CMV ($n=6$) and loT CMV ($n=10$) COVID-19 patients. **T** responses represented in frequencies of parent. Bars represent the median and interquartile range, and dots represent each individual, with white and black circles representing mild and severe COVID-19 patients, respectively. **H** Stacked histogram of SARS-CoV-2-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in hiT and loT CMV groups after stimulation with Spike, Membrane or Nucleocapsid peptide pools. Each fraction refers to the median frequency of IFN γ , IL-17 or TNF α -producing T cells upon stimulation. Statistical analysis using the nonparametric *Mann–Whitney* test, with p values <0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***)

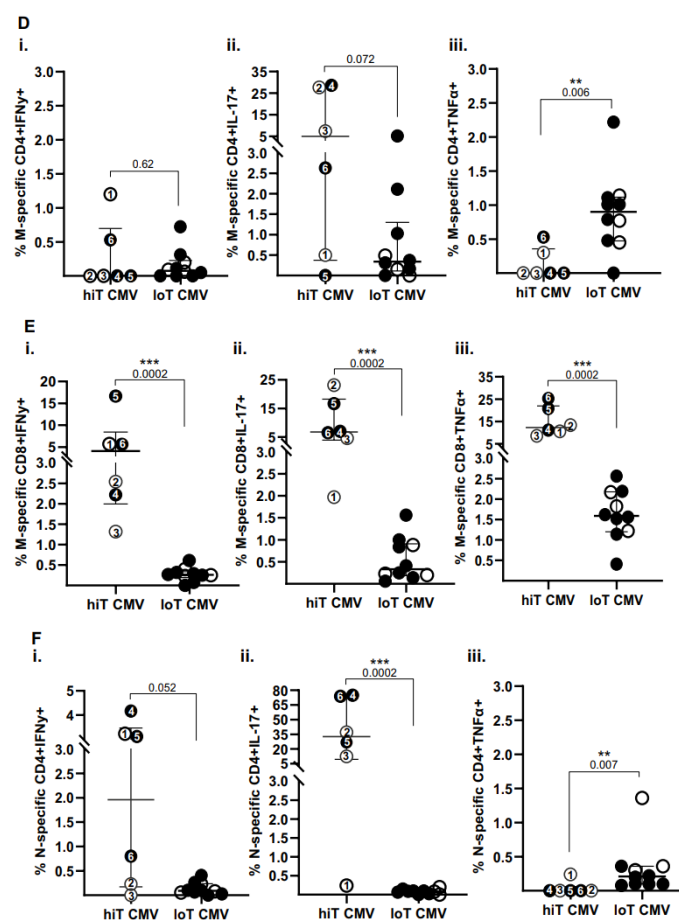


death or hospitalization—in the sense that infection seems to leave long-lasting symptoms, often neurological—and thus worth following up. In this context, the Th17 immune profile uncovered in this study, in association with CMV infection,

might be implicated in the disease's recovery process and incidence of inflammatory injury.

The mechanism responsible for the Th17 unbalanced response during COVID-19 is unclear. Hasan et al. [38] suggested that in some individuals, SARS-CoV-2 infection

Fig. 4 (continued)

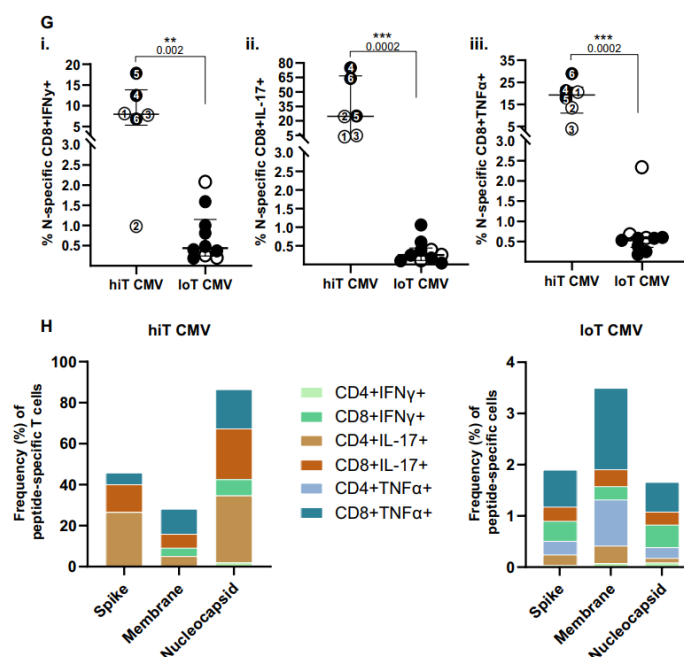


initiates a predominant IL-17-enriched chemokine transcriptional response while producing a low to moderate antiviral response by impairing interferon regulatory factors. The elevated frequency of SARS-CoV-2-specific CD4+IL-17+ cells, in addition to an absence of CD4+TNF α + response in the hiT CMV group, also points to a polarized T helper cell profile with predominant Th17-mediated activity. In line with this, Mason and colleagues [50] investigated the CMV secretome during latency and found an elevated production of chemokine ligand (CCL)8, responsible for the recruitment of CD4+T cells, and, more importantly, a downregulation of CMV-specific IFN γ + and TNF α +CD4+T cells, proposing it as a virus strategy to

inhibit antiviral effector functions of recruited T cells and to skew it to a more favorable condition, as observed in our study in the hiT CMV individuals.

Also, because the development of Th17 cells during viral infections correlates with high levels of IL-6 and transforming growth factor- β (TGF β) [39, 40], the inflammatory environment created by SARS-CoV-2 infection, marked by IL-1 β , IL-17A, IL-18, and IL-6 upregulation [41], might be a potential factor involved in the unbalanced immune profile uncovered in the present study. The excess of SARS-CoV-2-specific CD8+IFN γ , TNF α , and IL-17-producing cells also highlight the exacerbated inflammatory state evidenced in CMV high responders. In fact, a recent study by Naendrup

Fig. 4 (continued)



and colleagues [42] found that most COVID-19 patients with cytomegalovirus or EBV reactivations were under systemic corticosteroid treatment due to a hyper inflammation state.

How anti-CMV T response could contribute or be related to this process could not be confirmed in this study. Besides, most existing research in this area focuses only on CMV seropositivity and its impact on T cell senescence and disease severity [43, 44]. Jo et al. [44] found that putatively senescent SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cell populations were higher in CMV-seropositive young individuals than in seronegative ones, whereas Shrock et al. [43] observed that CMV seropositivity correlated with the hospitalization rate among COVID-19 patients. Our results suggest that CMV-specific T responses can also be investigated as a marker of immune polarization during SARS-CoV-2 infection.

Could pre-existing CMV-specific T cells be enhancing pro-inflammatory immunity mounted against SARS-CoV-2? Furman et al. [45] found that, upon influenza vaccination, CMV-seropositive young adults presented an upregulated immune function marked by elevated levels of IFN γ and increased CD8+ T cell sensitivity compared to CMV-seronegative individuals. Also, Barton et al. [46] showed in mice that CMV infection can protect animals against lethal infection with certain other pathogens by a mechanism involving

prolonged production of cytokines and systemic activation of macrophages, thereby upregulating the basal activation state of innate immunity against subsequent infections. Moreover, some studies suggest that viral latency caused by Epstein-Barr (EBV) and CMV are responsible for a pro-inflammatory polarization that reduces Th2 upregulation and therefore decreases the incidence of allergies [47]. Thus, CMV latency may modulate immune responses to other antigens through a polarized cytokine environment. Another possibility is that CMV-specific T cells could be just contributing to an already dysfunctional immune response against SARS-CoV-2. Limaye and Boeckh [48] imply that, in the context of other respiratory infections, cytomegalovirus can prolong a pre-existing inflammatory environment through the upregulation of cytokines and inflammatory mediators. Finally, CMV-specific T cells could be cross-reacting with SARS-CoV-2 epitopes and leading to the augmentation of pro-inflammatory responses during infection. A preprint of research from Weber et al. [49] detected T cell cross-reactivity to cytomegalovirus and SARS-CoV-2 epitopes, partially explaining why individuals with a high frequency of CMV-specific T cells also had an elevation of CD4+IL-17+ and CD8+IFN γ , IL-17+ and TNF α + responses specific to SARS-CoV-2 peptides.

Fig. 5 Correlation matrices between CMV- and SARS-CoV-2-specific responses. **A–B** anti-CMV IgG and anti-SARS-CoV-2 (RBD or N-specific) IgG and IgA correlation matrix in (A) hiT CMV ($n=6$) and (B) loT CMV ($n=10$) groups. **C–D** Correlation between CMV- and SARS-CoV-2-specific T responses in (C) hiT CMV ($n=6$), and (D) loT CMV ($n=10$) groups. CD4⁺ and CD8⁺ cells represented in frequencies of viable PBMCs. Circle size and color intensity indicate the strength of correlation by Spearman r (bigger and darker circles denote stronger associations), and colors exhibit positive (blue) or negative (red) correlations, with $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**) and < 0.001 (***)

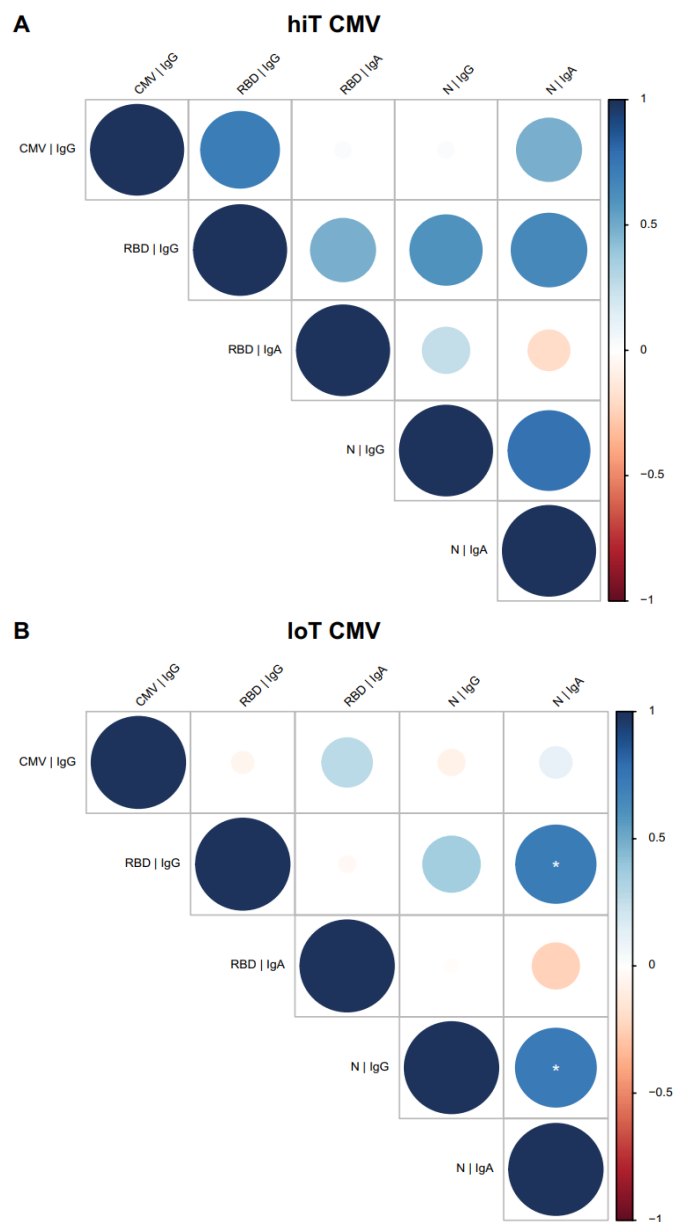
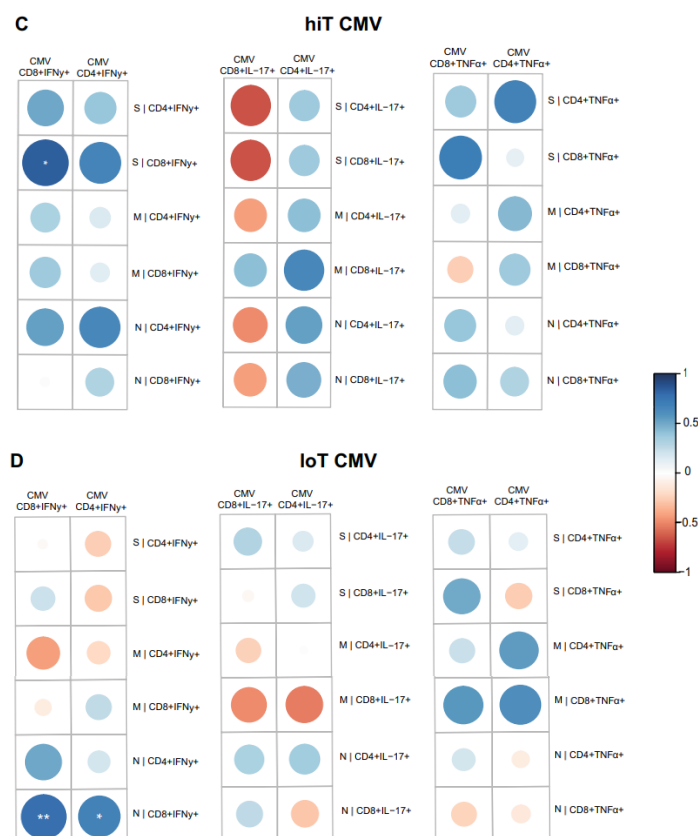


Fig. 5 (continued)



More evidence is needed to understand the mechanistic link between cytomegalovirus and SARS-CoV-2-specific T cell responses. To the best of our knowledge, this is the first study that focuses on anti-CMV humoral and cellular immune activity and its associations with SARS-CoV-2 T cell-specific immune profiles. Because we had no CMV-negative patients, it is not possible to attribute causality to the results obtained. Nonetheless, CMV-specific T cell responses in COVID-19 patients could be implicated in an immune polarization process during SARS-CoV-2 infection.

Limitations

The sample size was relatively small and restricted to a Brazilian cohort in this study, and it is not possible to confirm that high T responses to cytomegalovirus are the cause of SARS-CoV-2 immune dysregulation because all patients were CMV IgG-seropositive. Because all data stem from COVID-19 patients, it cannot be excluded that SARS-CoV-2 caused the different profiles of T cell responses to CMV. Also, additional data with respect to CMV- and SARS-CoV-2-specific Th2 cytokines in hiT CMV and loT CMV responders would give an important and comprehensive insight into the effect of CMV in T cell response to SARS-CoV-2. Due to the lack of differences between groups and an overall low frequency observed, we also did not mention in

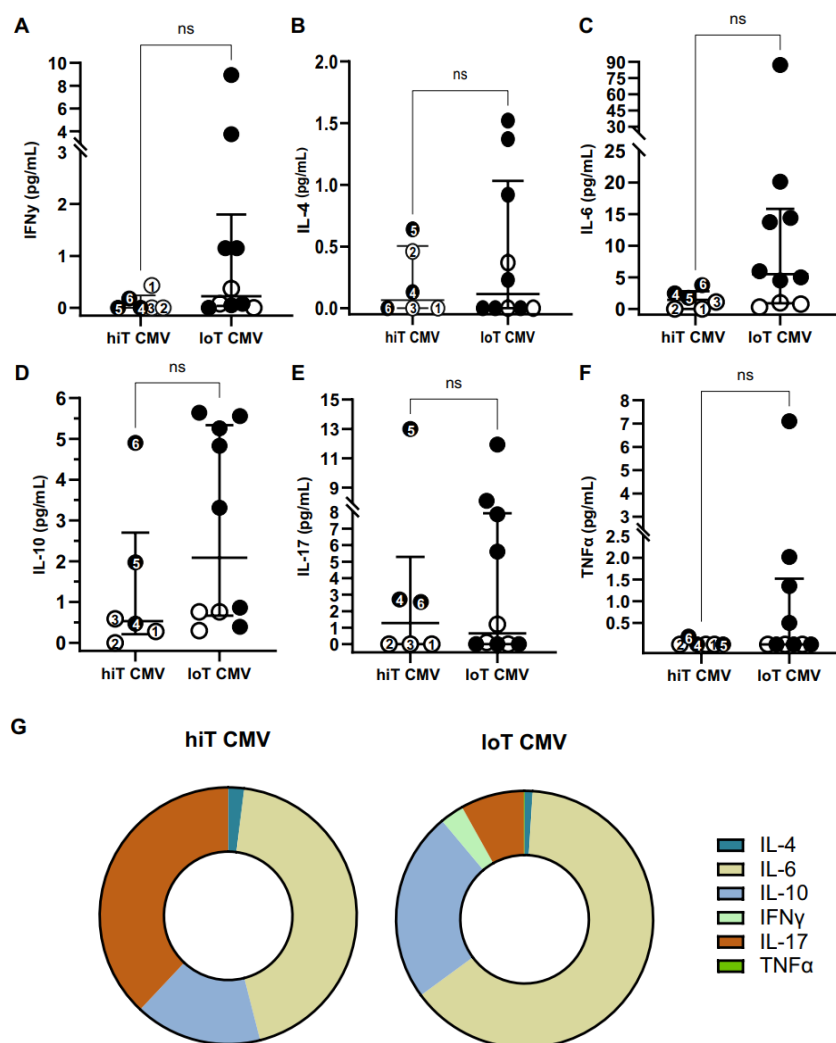


Fig. 6 Serum Th1, Th2, and Th17 cytokines in hiT ($n=6$) and loT CMV ($n=10$) groups: **A** IFN γ , **B** IL-4, **C** IL-6, **D** IL-10, **E** IL-17A and **F** TNF α . Values represented in pg/mL. Bars represent the median and interquartile range, and dots represent each individual, with white and black circles representing mild and severe COVID-19 patients, respectively. **G** Proportion of serum cytokines in hiT and loT CMV groups. Values refer to the median concentration (pg/mL) of each cytokine in hiT and loT CMV groups and are normalized to 100%

of all cytokines. Statistical analysis using the nonparametric Mann–Whitney test, with p values <0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***). **H–I** Matrix correlation of serum cytokines in (H) hiT and (I) loT CMV groups. Circle size and color intensity indicate the strength of correlation by Spearman r (bigger and darker circles denote stronger associations), and colors depict positive (blue) or negative (red) correlations, with p values <0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***)

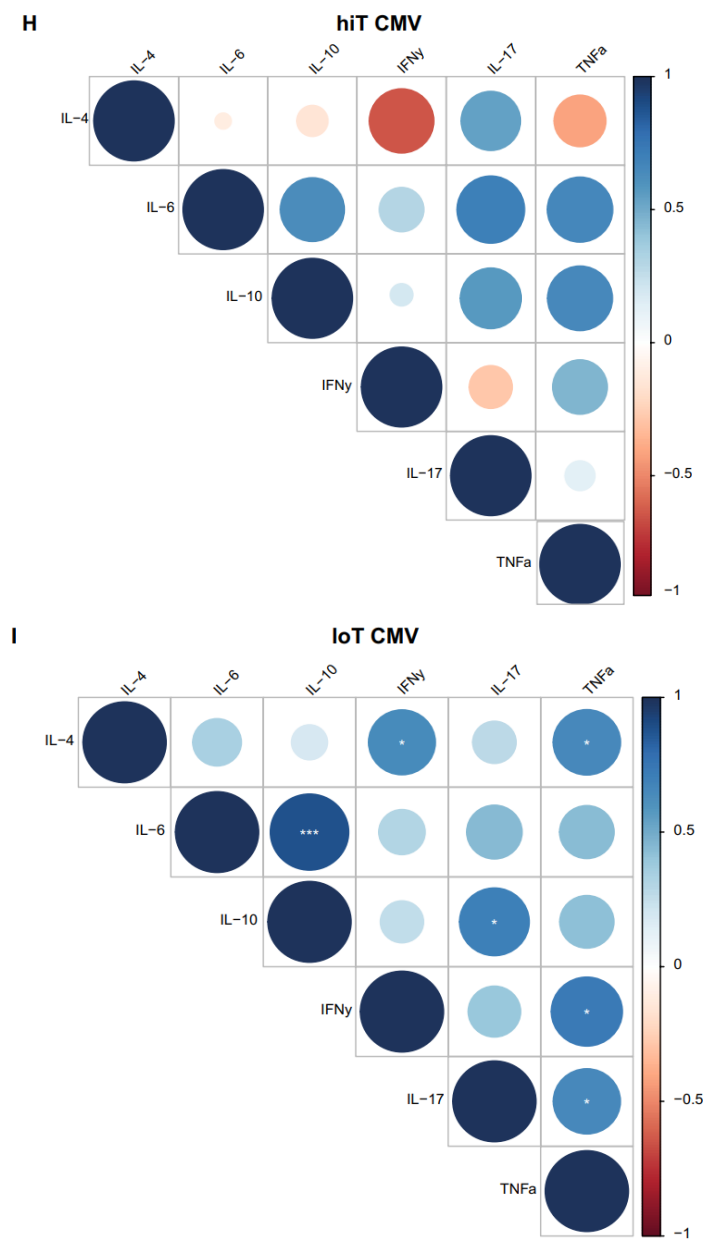


Fig. 6 (continued)

this study the presence of polyfunctional cells toward CMV and SARS-CoV-2 peptides.

Conclusions

COVID-19 patients with a high frequency of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ cells exhibit a profile skewed toward CD4⁺ Th17 responses on stimulation with SARS-CoV-2 peptides, as well as broader specific CD8⁺ T cell activity reflected by IFN γ , IL-17, and TNF α production. Thus, CMV-amplified IL-17-dominated responses to SARS-CoV-2 could be further investigated as a mechanistic player for long-lasting damage as a result of maladjusted immunity from COVID-19 acute phase.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00758-1>.

Acknowledgements We wish to thank Dr. Alessandra Peres, Dr. Gilson Dorneles, and all the colleagues from the immunotherapy laboratory for the technical support. We also thank all the patients that agreed to participate in this study.

Funding This study was supported by PROADI, Moinhos de Vento Hospital, and the Ministry of Health. Fellowships for Fernanda Tereza Bovi Frozza, Priscila Oliveira de Souza, and Tiago Fazolo are from CAPES; fellowships for Karina Lima, Julia C. Fontoura, and Cristina Bonorino are from CNPq.

Data availability The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest None.

References

- Wu S-E, Miller WE (2015) The human cytomegalovirus lytic cycle is induced by 1,25-dihydroxy vitamin D₃ in peripheral blood monocytes and in the THP-1 monocytic cell line. *Virology* 483:83–95
- Li X, Huang Y, Xu Z, Zhang R, Liu X, Li Y et al (2018) Cytomegalovirus infection and outcome in immunocompetent patients in the intensive care unit: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 18(1):1–10
- Lobato-Silva DF (2016) Citomegalovírus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 7:213–9
- Moura JU, Moraes GB, Capiotti MP, Silva RM, Leal DBR (2007) Prevalência Sorológica de Anti-CMV Em Gestantes da Região Oeste de Santa Maria, RS. *Disc Scientia Ciências da Saúde*, Santa Maria, Brazil. 8(1):33–9
- Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C (2010) Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil | Soroprevalência de anticorpos contra citomegalovírus em doadores de sangue do Sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(4):359–361
- Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE (2010) Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly latinos over 9 years of follow-up. *Am J Epidemiol* 172(4):363–371
- Wang GC, Kao WHL, Murakami P et al (2010) Cytomegalovirus infection and the risk of mortality and frailty in older women: A prospective observational cohort study. *Am J Epidemiol* 171(10):1144–1152
- Vescovini R, Biasini C, Telera AR et al (2010) Intense antiextracellular adaptive immune response to human cytomegalovirus in very old subjects with impaired health and cognitive and functional status. *J Immunol* 184(6):3242–3249
- Pera A, Campos C, Corona A et al (2014) CMV latent infection improves CD8⁺ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57⁺ cells in young individuals. *PLoS ONE* 9(2):1–7
- Pera A, Vasudev A, Tan C, Kared H, Solana R, Larbi A (2017) CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4⁺ T cell subset coexpressing CD57 and CD154. *J Leukoc Biol* 101(2):555–566
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J et al (2007) Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med* 204(6):1405–1416
- Rocha CS, Hirao LA, Weber MG et al (2018) Subclinical cytomegalovirus infection is associated with altered host immunity, gut microbiota, and vaccine responses. *J Virol* 92(13):1–18
- Salimi S, Hamlyn JM (2020) COVID-19 and Crosstalk With the Hallmarks of Aging. *J Gerontol Ser A*. 20:1–8
- World Health Organization (2021) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>
- Fazolo T, Lima K, Fontoura JC et al (2021) Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses. *Nat Commun* 12(1):1–13
- Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Krammer F (2020) SARS-CoV-2 seroconversion in humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol* 57:1–15
- Thakur B, Dubey P, Benitez J et al (2021) A systematic review and meta-analysis of geographic differences in comorbidities and associated severity and mortality among individuals with COVID-19. *Sci Rep*. 11(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88130-w>
- Honardoost M, Janani L, Aghili R, Emami Z, Khamseh ME (2021) The association between presence of comorbidities and COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. *Cerebrovasc Dis* 50(2):132–140
- Parry HM, Zuo J, Frumento G et al (2016) Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing*. <https://doi.org/10.1186/s12979-015-0056-6>
- D'Ardes D, Boccatonda A, Schiavone C et al (2020) A Case of Coinfection with SARS-COV-2 and cytomegalovirus in the Era of COVID-19. *EJCRIM* 7:1
- Le Balc'h P, Pinceaux K, Pronier C, Seguin P, Tadié JM, Reizine F (2020) Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit Care* 24(1):1–3
- Jiwa N, Lorick K, Mutneja R (2020) Cytomegalovirus colitis post IL-6 inhibitor use in Covid-19 infection. *Chest* 158(4):A772. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.08.719>
- Leemans S, Maillart E, Van Noten H et al (2020) Cytomegalovirus hemorrhagic colitis complicating COVID-19 in an immunocompetent critically ill patient: A case report. *Clin Case Reports*. 9:1–5
- Marchi G, Vianello A, Crisafulli E et al (2020) Cytomegalovirus-induced gastrointestinal bleeding and pancreatitis complicating severe COVID-19 pneumonia: a paradigmatic case. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 12(1):12–15

25. Pitoyo CW, Wijaya IPEK, Wulani V, Wiraputri AK, Romulo MA (2020) Misleading diagnosis of radiological imaging of COVID-19 pneumonia during pandemic era: risk on the existence of CMV infection. *Acta Med Indones* 52(4):375–382
26. Moniz P, Brito S, Póvoa P (2021) SARS-CoV-2 and cytomegalovirus co-infections—a case series of critically ill patients. *J Clin Med* 10(13):2–6
27. Nenna R, Zhai J, Packard SE et al (2020) High cytomegalovirus serology and subsequent COPD-related mortality: a longitudinal study. *ERJ Open Res*. 6(2):00062–02020. <https://doi.org/10.1183/23120541.00062-2020>
28. Tan DAB, Amran FS, Teo TH, Price P, Moodley YP (2016) Levels of CMV-reactive antibodies correlate with the induction of CD28null T cells and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Immunol* 13(4):551–3. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.4>
29. Li Z, Tang Y, Tang N et al (2017) High anti-human cytomegalovirus antibody levels are associated with the progression of essential hypertension and target organ damage in Han Chinese population. *PLoS ONE* 12(8):1–18
30. Wang H, Peng G, Bai J et al (2017) Cytomegalovirus infection and relative risk of cardiovascular disease (ischemic heart disease, stroke, and cardiovascular death): A meta-analysis of prospective studies up to 2016. *J Am Heart Assoc* 6(7):1–10
31. Espinosa OA, Zanetti AS, Antunes EF, Longhi FG, Matos TA, Battaglini PF (2020) Prevalence of comorbidities in patients and mortality cases affected by SARS-CoV2: a systematic review and meta-analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 62(43):1–13
32. Veldhoen M (2017) Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol* 18(6):612–621
33. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S (2015) The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* 135(3):626–35. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.001>
34. Sadler AJ, Williams BRG (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8(7):559–568
35. Lucas C et al (2020) Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 584:463–469
36. Hussman JP (2021) Severe clinical worsening in COVID-19 and potential mechanisms of immune-enhanced disease. *Front Med* 8(June):1–13
37. Jahaj E, Vassiliou AG, Keskinidou C et al (2021) Evaluating the role of the interleukin-23/17 axis in critically ill COVID-19 patients. *J Pers Med*. 11(9):891
38. Hasan MZ, Islam S, Matsumoto K, Kawai T (2021) SARS-CoV-2 infection initiates interleukin-17-enriched transcriptional response in different cells from multiple organs. *Sci Rep* 11(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96110-3>
39. Hou W, Kang HS, Kim BS (2009) Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med* 206(2):313–328
40. Knosp CA, Johnston JA (2011) Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signaling proteins. *Immunology* 135:101–111
41. Vabret N, Britton GJ, Gruber C et al (2020) Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity* 52(6):910–941
42. Naendrup JH, Borrega JG, Eichenauer DA, Shimabukuro-Vornhagen A, Kochanek M, Böll B (2021) Reactivation of EBV and CMV in severe COVID-19—epiphenomena or trigger of hyperinflammation in need of treatment? a large case series of critically ill patients. *J Intensive Care Med*. 37:1–7
43. Shrock E, Fujimura E, Kula T et al (2020) Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science* 370(6520):1–23
44. Jo N, Zhang R, Ueno H et al (2021) Aging and CMV infection affect pre-existing SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells in unexposed individuals. *Front Aging* 2:1–16
45. Furman D, Jovic V, Sharma S et al (2015) Cytomegalovirus infection improves immune responses to influenza. *Sci Transl Med* 7(281):1–22
46. Barton ES, White DW, Cathelyn JS et al (2007) Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 447(7142):326–329
47. Nilsson C, Linde A, Montgomery SM et al (2005) Does early EBV infection protect against IgE sensitization? *J Allergy Clin Immunol* 116(2):438–444
48. Limaye AP, Boeckh M (2010) CMV in critically ill patients: Pathogen or bystander? *Rev Med Virol* 20(6):372–379
49. Weber S, Kehl V, Erber J, Busch DH (2021) CMV seropositivity is a potential novel risk factor for severe COVID-19 in non-geriatric patients. *medRxiv* 323:1–19
50. Mason GM, Poole E, Sissons JG, Wills MR, Sinclair JH (2012) Human cytomegalovirus latency alters the cellular secretome, inducing cluster of differentiation (CD)4+ T-cell migration and suppression of effector function. *PNAS* 109(36):14538–14543

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

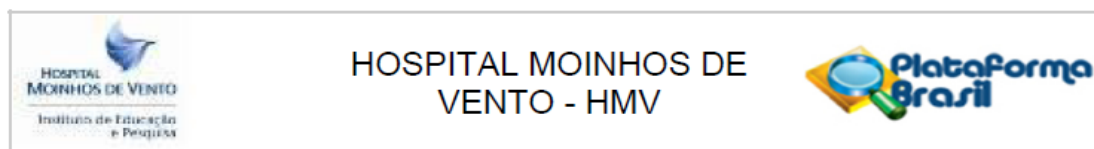
6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que frequências elevadas de células T CMV-específicas associam-se a uma resposta anti-SARS-CoV-2 polarizada para uma imunidade Th17 e marcada pelo aumento da atividade CD8+ específica para o SARS-CoV-2 (refletida pela produção de IFN γ , IL-17, e TNF α). Além disso, a análise do perfil de citocinas séricas exibiu predomínio de IL-17 e IL-6 no grupo de pacientes com frequências elevadas de células T anti-CMV, em contraste com um perfil composto por citocinas Th1, Th2 e Th17 nos demais indivíduos.

Seriam necessários mais estudos de cunho mecanístico que determinassem se uma resposta está efetivamente influenciando a outra, especialmente se a infecção por CMV pode ser um gatilho para polarizar a resposta anti-SARS-CoV-2. Embora não tenhamos encontrado uma associação dessa resposta Th17 com a severidade da doença, análises prospectivas poderiam indicar se o aumento da atividade T CMV-específica durante a fase aguda de COVID-19 poderia estar relacionada com complicações secundárias pós-covid resultantes de uma imunidade mal ajustada.

Em modelos animais, uma forma de estudar se existe uma interação entre as atividades imunes vírus-específicas seria através da infecção por mCMV em camundongos balb/c ou C57BL/6 *knock-in* para ECA-2 [62-64], com posterior infecção por SARS-CoV-2. O acompanhamento e a análise da dinâmica das respostas T CMV- e SARS-CoV-2-específicas durante e após a infecção por COVID-19 em animais CMV positivos ou negativos poderia nos fornecer um agente causativo na desregulação da imunidade antiviral, além do possível surgimento de sequelas pós-covid decorrentes da produção de IL-17.

ANEXO A — Parecer consubstanciado do CEP (HMV)

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

Pesquisador: Renato Tetelbom Stein

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30749720.4.1001.5330

Instituição Proponente: Hospital Moinhos de Vento - HMV

Patrocinador Principal: Hospital Moinhos de Vento - HMV

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.091.989

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda referente a pesquisa: Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil.

Pesquisador Responsável: Renato Tetelbom Stein.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência da infecção por SARS-CoV-2 em todas as faixas etárias, descrevendo e analisando suas características clínicas, fatores de risco, prevalência e papel das coinfeções por outros vírus respiratórios e/ou tuberculose, acurácia de métodos diagnósticos e características da resposta imune em pacientes que buscam atendimento em sala de emergência ou que são hospitalizados com suspeita de SARS-CoV-2 em dois hospitais do sul do Brasil.

Objetivos Secundários:

1. Avaliar a prevalência de infecções por SARS-CoV-2 entre os participantes ambulatoriais ou hospitalizados com quadro clínico suspeito de COVID19 em atendimento nos dois hospitais do estudo, durante o período da pandemia de 2020;
2. Identificar a frequência de coinfeções (vírus influenza A e B e VSR) com o SARS-CoV-2 nos

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

- participantes hospitalizados e ambulatoriais, avaliando seu impacto como fator de risco para gravidade;
3. Identificar a frequência de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em participantes ambulatoriais do estudo com suspeita clínica de SARS-CoV-2 (em subamostra de participantes no HRES) através de coleta de escarro, avaliando seu impacto como fator de risco para gravidade;
 4. Descrever a evolução clínica dos participantes com diagnóstico confirmado de acordo com a faixa etária e comorbidades, após 4 semanas da inclusão no estudo (participantes ambulatoriais) ou da alta hospitalar (participantes internados);
 5. Descrever a evolução clínica dos participantes encaminhados para isolamento domiciliar ou após alta hospitalar através de ligação telefônica;
 6. Avaliar a acurácia do teste rápido sorológico comparado à técnica padrão-ouro de biologia molecular RT-PCR;
 7. Comparar a técnica padrão-ouro de biologia molecular RT-PCR para identificação do SARS-CoV-2 em diferentes materiais: nasal/orofaríngeo (padrão, realizado em toda a coorte), escarro espontâneo, saliva, e aspirado traqueal (estas três últimas em subamostras);
 8. Entender as relações entre uso de bloqueadores do sistema RAS (iECA ou ARA II) com gravidade e prognóstico da COVID-19, ajustando para comorbidades dosagem e uso, recente ou prévio;
 9. Descrever etiologia, características e gravidade das doenças cardíacas pré-existentes (hipertensiva, isquêmica, insuficiência cardíaca, valvulopatias) com gravidade e prognóstico da COVID-19, ajustando para outras comorbidades;
 10. Descrever a evolução temporal da troponina (ultra-sensível) e BNP (ou NT-pro-BNP) nos participantes hospitalizados com COVID-19 (doença leve a moderada ou grave) e sua relação com gravidade e prognóstico da COVID-19;
 11. Comparar o perfil da resposta imunológica (análise de células imunes no sangue por citometria de fluxo e de anticorpos neutralizantes) e evolução clínica entre crianças e adultos com teste positivo para SARS-CoV-2 e controles saudáveis, avaliando fatores protetores e de gravidade;
 12. Caracterizar o uso de receptores antigênicos específicos – células T e B – para compreender o espectro da resposta protetora gerada;
 13. Quantificação da carga viral SARS-CoV-2 por RT-PCR quantitativa em diferentes tipos de amostras biológicas (saliva, nasofaringe e oral), avaliando fatores de gravidade;
 14. Analisar a resposta inata e adaptativa em diferentes graus de doença, buscando marcadores preditivos;

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

15. Nos participantes incluídos após a internação ocorrida nos primeiros 2 meses de pandemia no HMV, serão avaliados os objetivos 4, 8, 9 e 10.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos atribuídos à participação no estudo incluem aqueles inerentes às coletas de material biológico, devido a punção venosa, aspiração de secreção e desconforto ao responder alguma questão da entrevista. Nesse caso o entrevistado pode optar por não responder. A coleta de sangue tem riscos inerentes à punção da veia como desconforto, dor, sangramento local, ou hematoma no local da picada. A coleta de teste rápido tem o risco de dor, sangramento e hematoma no local da punção com lanceta em extremidade. A coleta de secreção respiratória tem riscos inerentes ao uso do swab para a coleta como desconforto, dor no local, sangramento nasal discreto, vômito ou tosse devido à coleta. O procedimento será feito por profissional devidamente capacitado e com capacidade de avaliar o estado do paciente e suspender a coleta, caso necessário.

Benefícios:

Estarão sendo ofertados ao paciente testes diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade para quadro respiratório (SARS-CoV-2, Influenza, VSR e, no HRES, para tuberculose), com resultados na hora (tuberculose e VSR) ou em aproximadamente 24h (SARS-CoV-2), sendo que estes não são disponibilizados desta forma rotineiramente no SUS e na saúde suplementar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesta emenda, constam alterações realizadas no Projeto "Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune da COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil".

Os pesquisadores, com o objetivo de aprimorar o desempenho do projeto de pesquisa, solicitam a aprovação das seguintes modificações:

1. A palavra "paciente" foi substituída por "participante", ao longo do resumo, dos objetivos secundários e das principais hipóteses do projeto;
2. A palavra "COVID-19" foi substituída por "SARS-CoV-2", ao longo da justificativa e no item

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.560-030

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

5.8. do projeto;

3. No item 4.2.11. dos objetivos secundários foi adicionado na amostra “controles saudáveis”;
4. No item 4.2.13. dos objetivos secundários foi adicionada uma coleta de “saliva”;
5. No item 5.5 principais hipóteses foi ajustado os números de “5 dias” para “7 dias” e “sexto dia” para “oitavo dia”.
6. Inclusão do parágrafo a baixo no item 6.2 Descrição da pesquisa, local e período de realização:
 “A análise laboratorial das amostras biológicas coletadas ocorrerá da seguinte forma:
 - Hospital Restinga e Extremo Sul: análise de PCR para VSR, Influenza e Mycobacterium tuberculosis no equipamento Gene Xpert. Estas análises serão apenas para as amostras coletadas neste centro.
 - Hospital Moinhos de Ventos: análise de PCR para VSR, Influenza no equipamento Gene Xpert das amostras coletadas no Hospital Moinhos de Vento; análise de PCR qualitativo para SARS-CoV-2 das amostras biológicas coletadas no Hospital Moinhos de Vento e no Hospital Restinga Extremo Sul.
 - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre: análise de PCR quantitativo para SARS-CoV-2; análise de resposta imunológica para o SARS-CoV-2. Estas análises serão apenas para as amostras de participantes que concordarem com a inclusão na subamostra de participantes descrita no item 6.9 deste projeto.”
7. Inclusão do parágrafo a baixo no item 6.3 Aplicação dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e Assentimento Livre e Esclarecido:
 “Para o caso de pacientes menores de 18 anos e sem a presença de um responsável legal ou maior de 18 anos e incapaz de responder por si próprio e para pacientes adultos que estejam internados em UTI será oferecido a participação no estudo e feito registro das informações dos responsáveis legais (nome e telefone), e posteriormente, entrar em contato com estes para a aplicação do TCLE. A central telefônica do estudo possui pessoal treinado atendendo aos preceitos éticos para oferecimento de participação no estudo e aplicação do TCLE via telefônica, apenas após o consentimento do responsável legal que o paciente passará a ser um participante de pesquisa e

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

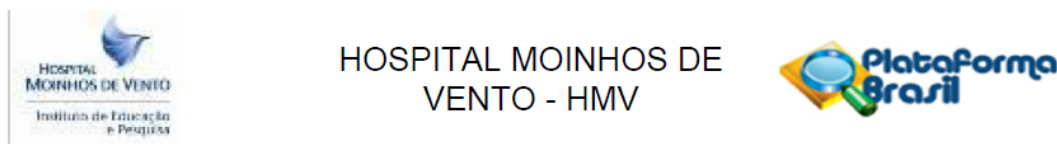
CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



Continuação do Parecer: 4.091.989

será incluído no estudo.

8. No item 6.7 Seguimento, o parágrafo “Para os participantes hospitalizados em ambos os hospitais será realizada a avaliação de prontuário médico na alta hospitalar. Para o seguimento destes participantes, após a alta hospitalar, será realizado contato telefônico de seguimento 28 (vinte e oito) dias após a alta hospitalar.” Foi ajustado para “Para os participantes hospitalizados em ambos os hospitais será realizada a avaliação de prontuário médico na alta hospitalar. Avaliação de escala ordinal durante a internação nos dias 7, 14 e 28 da inclusão. Para o seguimento destes participantes, após a alta hospitalar, será realizado contato telefônico de seguimento 7, 14 e 28 dias a partir da inclusão sempre que não estiver em internação hospitalar e 28 (vinte e oito) dias após a alta hospitalar.”

9. No Item 6.8 Coleta dos exames: o parágrafo a) foi ajustado para que a coleta do teste rápido (TR) passará a ser coletada apenas para os participantes que estiverem com 7 ou mais dias de sintomas, sendo realizado a leitura do TR com 15 minutos, e adicionado o parágrafo “Para participantes com menos de 7 dias de sintomas será feito o agendamento para realização do teste rápido imunocromatográfico entre o D14 e o D21 do início dos sintomas. Para os participantes que estiverem em internação hospitalar e tiverem o teste rápido não reagente na inclusão, o exame será repetido no D7 da inclusão.”

10. No Item 6.8 Coleta dos exames: o parágrafo b) “Amostras de secreção respiratória serão obtidas através da coleta de swab nasal (duas narinas) e cavidade orofaríngea e serão colocadas em meio de transporte adequado (VTM ou solução salina). Essas amostras serão utilizadas para realização do GeneXpert Flu/RSV (Cepheid, USA) e o RT-PCR para SARS-Cov-2. Todos os pacientes com mais de 10 anos com tosse produtiva e/ou escarro, do Hospital Restinga e Extremo Sul (e não os pacientes do HMV), terão solicitada a coleta de amostra de escarro espontâneo para realização de RT-PCR de SARS-CoV-2 e Gene Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA), para identificação de infecção ativa por M.tuberculosis. A coleta de escarro será realizada em ambiente externo do hospital, para biossegurança da equipe, evitando riscos de contaminação do ambiente (em acordo com prática já normatizada pela equipe assistencial local).” Foi substituído pelo “Amostras de secreção respiratória serão obtidas através da coleta de swab nasal (duas narinas) e cavidade orofaríngea e serão colocadas em meio de transporte adequado (VTM ou solução salina). Essas amostras serão utilizadas para realização do RT-PCR para SARS-Cov-2. Amostras de secreção

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

respiratória serão obtidas através da coleta de swab nasal (duas narinas) de transporte adequado próprio (Cepheid, USA). Essa amostra será utilizada para realização do GeneXpert Flu/RSV (Cepheid, USA). Todos os participantes com mais de 10 anos com tosse produtiva e/ou escarro, do Hospital Restinga e Extremo Sul (e não os participantes do HMV), terão solicitada a coleta de amostra de escarro espontâneo para realização de RT-PCR de SARS-CoV-2 e Gene Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, USA), para identificação de infecção ativa por M. tuberculosis. A coleta de escarro será realizada em ambiente externo do hospital, para biossegurança da equipe, evitando riscos de contaminação do ambiente (em acordo com prática já normatizada pela equipe assistencial local)."

11. No Item 6.8 Coleta dos exames: o parágrafo c) Foi adicionado o volume mínimo de 6,5 mL.

12. Os Itens 6.9 Coleta de Dados Clínico-Cardiológicos, 6.10.4 RT-PCR Quantitativo, 6.10.5 Citometria de fluxo, 6.11 Biorrepositório, 6.14.1.3 Amostra para subanálise imunológica foram reestruturados com pequenas alterações.

13. Figura 1, apresenta o novo fluxograma.

- Os questionários foram reestruturados visando uma maior praticidade e confiabilidade na coleta das informações necessárias.

Alterações de documentos:

1. Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e Assentimento Livre e Esclarecido foram substituídos pelos novos, sendo a 3 versão.

Inclusões de documentos na Plataforma Brasil:

- 2_termo_de_responsabilidade_HMV_2
- 3_termo_de_responsabilidade_HMV_3
- 4_termo_de_responsabilidade_HRES
- termo_responsabilidade_Johns_Hopkins

As alterações propostas são pertinentes e não há impedimento ético para aprovação da presente

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

emenda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados. Os TCLEs e o TALE estão adequados, bem explicativos e em linguagem de fácil compreensão.

Recomendações:

Vide conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências. Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Moinhos de Vento, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 466/2012 do CNS e complementares, e pela Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1565190_E2.pdf	05/06/2020 18:04:35		Aceito
Outros	Carta_retificacao_05junho2020.pdf	05/06/2020 18:03:09	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	Carta_retificacao_05junho2020.docx	05/06/2020 18:02:41	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	apendice_questionarios.pdf	05/06/2020 17:54:55	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_COVIDa_05junho2020.pdf	05/06/2020 17:53:20	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_UFCSPA.pdf	05/06/2020 17:21:29	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Declaração de	termo_responsabilidade_Johns_Hopki	05/06/2020	Ingrid Rodrigues	Aceito

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

Pesquisadores	ns.pdf	17:00:59	Fernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4_termo_de_responsabilidade_HRES.pdf	05/06/2020 17:00:35	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_termo_de_responsabilidade_HMV_3.pdf	05/06/2020 16:58:16	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	2_termo_de_responsabilidade_HMV_2.pdf	05/06/2020 16:58:01	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor_de_idade.pdf	05/06/2020 16:15:59	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	05/06/2020 16:08:50	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_termo_de_assentimento_livre_e_esclarecido.pdf	05/06/2020 16:07:02	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	08/05/2020 16:52:30	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	carta_conep.pdf	14/04/2020 22:15:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	termo_responsabilidade.pdf	14/04/2020 19:27:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	parecer_da_comissao_cientifica_id109.pdf	14/04/2020 19:09:42	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_de_utilizacao_de_prontuarios_e_base_de_dados.pdf	14/04/2020 18:52:43	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	autorizacao_submissao_CEP.pdf	14/04/2020 18:51:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_HRES.pdf	14/04/2020 17:58:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_MEDICINA_INTERNA.pdf	14/04/2020 17:57:33	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_PNEUMOLOGIA.pdf	14/04/2020 17:52:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_PEDIATRIA.pdf	14/04/2020 17:52:18	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_EMERGENCIA.pdf	14/04/2020 17:51:46	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_CTI_ADULTO.pdf	14/04/2020 17:51:13	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_CONTROLE_DE_INFEC CAO.pdf	14/04/2020 17:47:00	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	14/04/2020	Ingrid Rodrigues	Aceito

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.lep@hmv.org.br



HOSPITAL MOINHOS DE VENTO - HMV



Continuação do Parecer: 4.091.989

Orçamento	orcamento.pdf	16:57:55	Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_covid_19.pdf	14/04/2020 16:43:41	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 17 de Junho de 2020

Assinado por:

Guilherme Alcides Flôres Soares Rollin
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tiradentes, 198 - Subsolo

Bairro: Floresta

CEP: 90.560-030

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3314-3537

E-mail: cep.iep@hmv.org.br

ANEXO B — Parecer consubstanciado do CEP (UFCSPA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

Pesquisador: Renato Tetelbom Stein

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30749720.4.3001.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital Moinhos de Vento - HMV

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.223.879

Apresentação do Projeto:

Em dezembro de 2019 foi identificado na China um novo agente etiológico causador de doença respiratória aguda grave, a partir de então denominado Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARSCoV2). Em fevereiro de 2020, o Ministério da Saúde declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional em decorrência do número crescente de casos de infecção humana por este agente no mundo. Apesar das publicações recentes desde então relacionadas ao SARS-CoV-2 e a doença respiratória causada por este agente, denominada COVID-19, há várias perguntas fundamentais a serem respondidas, que podem potencialmente alterar condutas a nível de saúde pública ou de manejo clínico. Entre estas estão elencadas: 1) a aferição da prevalência da COVID-19 na população atendida em emergência e não hospitalizada; 2) o papel das coinfeções com outros vírus respiratórios (principalmente os vírus da influenza e o vírus sincicial respiratório) e com tuberculose ativa; 3) os fatores associados ao risco de desenvolvimento de casos graves hospitalares; 4) a verificação da acurácia dos testes diagnósticos (incluindo o teste rápido sorológico); e 5) a resposta imunológica protetora contra o vírus. Objetivos: avaliar a prevalência da COVID-19 em uma coorte de pacientes atendidos em setores de emergência e internação hospitalar (hospital público e privado), identificando características e evolução clínica dessa população; prevalência e papel prognóstico das coinfeções (com outros vírus respiratórios que causam doença significativa nessa população e com o *Mycobacterium tuberculosis*); fatores de

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

risco e marcadores clínicos para doença grave; comparação de métodos diagnósticos rápidos com o padrão ouro; resposta imunológica da infecção (fatores protetores e imunidade) pelo SARS-CoV-2; marcadores de falência cardíaca precoces em pacientes que hospitalizam; mecanismos de resposta imune que diferenciam desfechos clínicos entre adultos e crianças. Métodos: nesta coorte, serão incluídos 1.747 participantes de todas as idades, entre abril e dezembro de 2020, com suspeita clínica de SARS-CoV-2, que procuram atendimento em sala de emergência. Serão incluídos os participantes avaliados em dois hospitais de Porto Alegre (1 da rede privada e 1 hospital que atende ao Sistema Único de Saúde - SUS). Os indivíduos na sua inclusão responderão a um questionário, coletarão swabs de secreção nasal e orofaríngea (para RT-PCR de SARS-CoV-2, Influenza e VSR), e sangue (teste rápido sorológico e análise da resposta imune). Em todos os participantes com mais de 10 anos incluídos no hospital público do estudo, que apresentarem tosse produtiva e/ou escarro espontâneo, será realizado coleta de escarro para pesquisa de M. tuberculosis por Gene Xpert MTB/RIF Ultra, neste escarro também será realizado RT-PCR de SARS -CoV-2. Os participantes com doença leve que forem liberados para seu domicílio serão acompanhados por ligações telefônicas até 28 dias após inclusão no estudo. Aqueles participantes que necessitarem de hospitalização por quadro grave de COVID-19 serão acompanhados durante toda a internação e com ligações telefônicas até 28 dias após a alta hospitalar ou óbito. Será também realizada uma avaliação retrospectiva nos prontuários médicos das variáveis clínica e demográficas associadas à maior gravidade nos participantes internados nos primeiros dois meses da pandemia em Porto Alegre. Além disso, será realizada coleta de swab oral e nasal e sangue periférico em uma subamostra de 165 sujeitos, para avaliação da PCR quantitativo e resposta imunológica sistêmica frente a infecção pelo SARS-CoV-2. Durante o estudo será avaliada a acurácia do teste rápido sorológico (IgM e IgG contra SARS-CoV-2), para publicação dos resultados o mais breve possível. Nos participantes hospitalizados, a evolução clínica e exames realizados durante internação serão coletados no prontuário eletrônico pelos pesquisadores. No dia 7 após a inclusão no estudo, os participantes hospitalizados com infecção confirmada por SARS-CoV-2 coletarão novamente secreção respiratória por swab (RT-PCR de SARS-CoV-2), sangue (análise da resposta imune) e teste rápido apenas para aqueles participantes com este exame não reagente ou não realizado na inclusão. Para os participantes hospitalizados com testes negativos para SARS-CoV-2, serão repetidos o teste rápido e coleta de sangue para avaliação da resposta imune. Por fim, serão avaliadas também as seguintes variáveis no estudo: necessidade ou não de internação; necessidade e tempo de oxigenioterapia; necessidade e tempo de ventilação mecânica; necessidade de reconsulta em emergência ou readmissão hospitalar; mortalidade hospitalar;

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

injúrias cardíacas associada à alteração de troponina, disfunção miocárdica, arritmia ou complicação tromboembólica; e características radiológicas de tórax.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a prevalência da infecção por SARS-CoV-2 em todas as faixas etárias, descrevendo e analisando suas características clínicas, fatores de risco, prevalência e papel das coinfeções por outros vírus respiratórios e/ou tuberculose, acurácia de métodos diagnósticos e características da resposta imune em pacientes que buscam atendimento em sala de emergência ou que são hospitalizados com suspeita de SARS-CoV-2 em dois hospitais do sul do Brasil.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a prevalência de infecções por SARS-CoV-2 entre os participantes ambulatoriais ou hospitalizados com quadro clínico suspeito de COVID19 em atendimento nos dois hospitais do estudo, durante o período da pandemia de 2020;
2. Identificar a frequência de coinfeções (vírus influenza A e B e VSR) com o SARS-CoV-2 nos participantes hospitalizados e ambulatoriais, avaliando seu impacto como fator de risco para gravidade;
3. Identificar a frequência de infecção por Mycobacterium tuberculosis em participantes ambulatoriais do estudo com suspeita clínica de SARS-CoV-2 (em subamostra de participantes no HRES) através de coleta de escarro, avaliando seu impacto como fator de risco para gravidade;
4. Descrever a evolução clínica dos participantes com diagnóstico confirmado de acordo com a faixa etária e comorbidades, após 4 semanas da inclusão no estudo (participantes ambulatoriais) ou da alta hospitalar (participantes internados);
5. Descrever a evolução clínica dos participantes encaminhados para isolamento domiciliar ou após alta hospitalar através de ligação telefônica;
6. Avaliar a acurácia do teste rápido sorológico comparado à técnica padrão-ouro de biologia molecular RTPCR;
7. Comparar a técnica padrão-ouro de biologia molecular RT-PCR para identificação do SARS-CoV-2 em diferentes materiais: nasal/orofaríngeo (padrão, realizado em toda a coorte), escarro espontâneo, saliva, e aspirado traqueal (estas três últimas em subamostras);
8. Entender as relações entre uso de bloqueadores do sistema RAS (iECA ou ARA II) com gravidade e prognóstico da COVID-19, ajustando para comorbidades dosagem e uso, recente ou prévio;

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos atribuídos à participação no estudo incluem aqueles inerentes às coletas de material biológico, devido a punção venosa, aspiração de secreção e desconforto ao responder alguma questão da entrevista. Nesse caso o entrevistado pode optar por não responder. A coleta de sangue tem riscos inerentes à punção da veia como desconforto, dor, sangramento local, ou hematoma no local da picada. A coleta de teste rápido tem o risco de dor, sangramento e hematoma no local da punção com lanceta em extremidade. A coleta de secreção respiratória tem riscos inerentes ao uso do swab para a coleta como desconforto, dor no local, sangramento nasal discreto, vômito ou tosse devido à coleta. O procedimento será feito por profissional devidamente capacitado e com capacidade de avaliar o estado do paciente e suspender a coleta, caso necessário.

Benefícios: Estarão sendo ofertados ao paciente testes diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade para quadro respiratório (SARS-COV-2, Influenza, VSR e, no HRES, para tuberculose), com resultados na hora (tuberculose e VSR) ou em aproximadamente 24h (SARS-CoV-2), sendo que estes não são disponibilizados desta forma rotineiramente no SUS e na saúde suplementar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados.

Recomendações:

O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento do Projeto. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa respeita as normas vigentes 466/12, pela avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Projeto com término previsto para 31/12/2020

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

CEP: 90.050-170

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1578654.pdf	13/08/2020 14:14:15		Aceito
Outros	carta_resposta_ufcspa_13ago2020.pdf	13/08/2020 12:09:23	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_ORIENTACOES_GERAIS_PARA_TRABALHO.pdf	13/08/2020 11:46:27	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_Protocolo_813_BIOSSEGURANCA_em_projetos_COVID_19_UF_CSPA_IMUNO.pdf	13/08/2020 11:24:50	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_POP_RECEBIMENTO_DE_AMOSTRAS_BIOLOGIAS_CONTAMINADAS_COM_SARS.pdf	13/08/2020 11:20:11	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_POP_PIPETAGEM_E_CENTRIFUGACAO.pdf	13/08/2020 11:19:14	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_POP_INATIVACAO_DE_AMOSTRAS_BIOLOGIAS_CONTAMINADAS_COM_SARS.pdf	13/08/2020 11:18:17	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_KarinaLima_DECLARACAO_DE_SAUDE_PARA_TRABALHO_COM_AMOSTRAS_CONTAMINADAS_COM_SARS.pdf	13/08/2020 11:15:48	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_JuliaFontoura_DECLARACAO_DE_SAUDE_PARA_TRABALHO_COM_AMOSTRAS_CONTAMINADAS_COM_SARS.pdf	13/08/2020 11:14:16	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_GS_Bio_II_Advance_Plus_4.pdf	13/08/2020 11:09:26	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	FUNDACAO_CristinaBonorino_DECLARACAO_DE_SAUDE_PARA_TRABALHO_COM_AMOSTRAS_CONTAMINADAS_COM_SARS.pdf	13/08/2020 10:57:27	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	carta_resposta_ufcspa.pdf	16/07/2020 11:48:40	Renato Tetelbom Stein	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_dos_laboratorios_da_ufcspa.pdf	16/07/2020 11:44:54	Renato Tetelbom Stein	Aceito
Outros	termo_compromisso_entrega_relatorio_final_ufcspa.pdf	16/07/2020 11:42:35	Renato Tetelbom Stein	Aceito
Outros	Carta_retificacao_05junho2020.pdf	05/06/2020	Ingrid Rodrigues	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

CEP: 90.050-170

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

Outros	Carta_retificacao_05junho2020.pdf	18:03:09	Fernandes	Aceito
Outros	Carta_retificacao_05junho2020.docx	05/06/2020 18:02:41	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	apendice_questionarios.pdf	05/06/2020 17:54:55	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_COVIDa_05junho2020.pdf	05/06/2020 17:53:20	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_UFCSPA.pdf	05/06/2020 17:21:29	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor_de_idade.pdf	05/06/2020 16:15:59	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	05/06/2020 16:08:50	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_termo_de_assentimento_livre_e_ esclarecido.pdf	05/06/2020 16:07:02	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	carta_conep.pdf	14/04/2020 22:15:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	termo_responsabilidade.pdf	14/04/2020 19:27:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	parecer_da_comissao_cientifica_id109.p df	14/04/2020 19:09:42	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_de_utilizacao_ de_prontuarios_e_base_de_dados.pdf	14/04/2020 18:52:43	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	autorizacao_submissao_CEP.pdf	14/04/2020 18:51:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_HRES.pdf	14/04/2020 17:58:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_MEDICINA_INTERNA.p df	14/04/2020 17:57:33	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_PNEUMOLOGIA.pdf	14/04/2020 17:52:38	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_PEDIATRIA.pdf	14/04/2020 17:52:18	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_EMERGENCIA.pdf	14/04/2020 17:51:46	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_CTI_ADULTO.pdf	14/04/2020 17:51:13	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito
Outros	anuencia_hmv_CONTROLE_DE_INFEC CAO.pdf	14/04/2020 17:47:00	Ingrid Rodrigues Fernandes	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.223.879

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 19 de Agosto de 2020

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO C — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Instituto de Educação
e Pesquisa



ID do participante de pesquisa: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - DIRIGIDO AO RESPONSÁVEL LEGAL DE MENORES DE 18 ANOS DE IDADE OU PARTICIPANTE MAIOR DE 18 ANOS E INCAPAZ DE RESPONDER POR SI PRÓPRIO

O(a) paciente pelo qual você é responsável, está sendo convidado a participar da pesquisa "Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil" cujo objetivo é identificar pacientes com infecção com o novo coronavírus e outras infecções respiratórias. Este estudo está sendo realizado no Hospital Moinhos de Vento e no Hospital Restinga Extremo Sul, e visa auxiliar no conhecimento sobre a pandemia do novo coronavírus e nas estratégias de enfrentamento da doença. Está prevista a participação de 1747 pacientes.

Se você concordar com a participação do(a) paciente, esta participação consistirá em passar por uma entrevista inicial, coletas de sangue, coletas de secreção do nariz e da garganta, coleta de saliva (alguns participantes), e coleta de escarro (alguns participantes) e entrevistas por telefone no 7º, 14º e 28º dias após a entrada na pesquisa, e 28 dias após a alta (caso o participante tenha ficado internado), caso o(a) paciente necessite internação hospitalar. Se o(a) paciente estiver internado desde o 1º dia da pesquisa, será necessário que a equipe de pesquisadores colete informações em seu prontuário. Assim o tempo de participação nesta pesquisa será de aproximadamente 30 dias, se o(a) paciente não precisar de hospitalização, ou 30 dias após a alta hospitalar, se hospitalização.

Cada procedimento pelo qual o(a) paciente poderá passar está detalhado a seguir:

- Entrevista inicial: no 1º dia de participação na pesquisa, o(a) paciente responderá a um questionário sobre condições socioeconômicas e de saúde. Esse questionário levará cerca de 10 minutos. Você poderá responder o questionário caso o(a) paciente não possa responder por si.
- Coletas de sangue: no 1º dia de participação da pesquisa, será realizada uma punção (picada) na veia, preferencialmente do braço, para a retirada de 8,5 ml (equivalente a duas colheres de sopa) de sangue, suficiente para encher dois tubos de coleta. Este sangue ficará armazenado e será utilizado para estudar a resposta inflamatória e a imunidade contra o vírus. Também será realizada uma picada na

Página 1 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.

ID do participante de pesquisa: _____

ponta do dedo da mão, para a retirada de uma gota de sangue que será destinada para saber se já está com imunidade contra o novo coronavírus, conhecido como teste rápido, este teste será agendado para os participantes que estiverem com menos de 7 dias de doença. Se o(a) paciente estiver internado, essas coletas de sangue serão repetidas no 7º dia desde a primeira coleta ou na alta hospitalar (o teste rápido não será repetido se no primeiro teste rápido realizado for positivo), o que acontecer primeiro. Esse procedimento levará 15 minutos, o resultado do teste da ponta de dedo leva 15 minutos para o resultado ficar pronto.

- Coletas de secreção do nariz e garganta: no 1º dia de participação na pesquisa, será introduzido um swab (um tipo de cotonete) nas duas narinas e outro na garganta. Esse procedimento será realizado duas vezes, mas a 2ª vez apenas nas narinas. Na primeira, o material coletado será usado para saber se o(a) paciente está infectado pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2). Na segunda vez, o material coletado será utilizado para saber se o(a) paciente está infectado por outros três tipos de vírus (Influenza A e Influenza B e Vírus Sincicial Respiratório) que também causam problemas respiratórios e sintomas parecidos com os causados pelo novo coronavírus. Esse procedimento levará 3 minutos. Se o(a) paciente estiver internado, será repetida uma coleta de secreção do nariz e garganta no 7º dia após a primeira coleta ou na alta hospitalar (o que vier primeiro) para avaliar a novamente a infecção pelo novo coronavírus.
- Alguns participantes serão convidados para fazer outras coletas neste primeiro dia de entrada no estudo: coletas de swab orofaríngeo e nasal, coleta de escarro, coleta de saliva e sangue para análises mais específicas do novo coronavírus:
 1. Secreção respiratória: será coletado material com um *swab* nasofaríngeo e outro *swab* oral, um tipo de cotonete que será passado no nariz e na garganta, isto pode causar desconforto momentâneo no local da coleta e um pouco de tosse ou espirros. Esta amostra será usada para a análise por metodologia de biologia molecular (PCR) para o novo coronavírus (SARS-CoV-2), esse teste irá contar a quantidade de vírus presente na secreção.
 2. Coleta de escarro: se o menor de idade tiver secreção nos pulmões, será solicitado que provoque tosse e escarre em um frasco. O motivo desta coleta,

Página 2 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.

ID do participante de pesquisa: _____

além de pesquisar a bactéria da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), é comparar se o método de coleta com cotonetes (*swab*) é equivalente à secreção coletada por escarro para detectar a presença do coronavírus.

3. Coleta de sangue: será realizada uma punção (picada) na veia, preferencialmente do braço, para a retirada de 12 ml (equivalente a três colheres de sopa) de sangue, suficiente para encher um tubo de coleta. Este sangue será avaliado para identificar a resposta de imunidade contra o novo coronavírus.
4. Secreção de aspirado traqueal: caso o menor de idade precisar respirar com auxílio de ventiladores mecânicos (aparelhos que ajudam o paciente a respirar em situações de falta de ar importante), no 7º dia de participação no estudo, será coletada secreção da garganta, junto com procedimentos de higiene que são realizados rotineiramente quando o ventilador é utilizado. Este teste vai avaliar a presença ou persistência do novo coronavírus.
5. Coleta de saliva: será solicitado que o participante colete saliva em um pote. O motivo desta coleta é comparar se o método de coleta com cotonetes (*swab*) é equivalente à saliva para detectar a presença do coronavírus

Em alguns participantes com a infecção pelo SARS-CoV-2 confirmada, será feito um contato para novas coletas. Para esta subamostra será agendado um horário e local para tal coleta.

Entrevistas por telefone: no 7º, 14º e 28º dia após a entrada na pesquisa, o(a) responsável pelo participante responderá a entrevistas por telefone sobre sua condição de saúde. As entrevistas serão gravadas e terão 10 minutos de duração cada. Caso o(a) participante fique internado para tratamento essa ligação será realizada no 28º dia após a alta do hospital, na qual serão questionados aspectos relacionados à sua saúde e sua qualidade de vida no período após a alta. As informações obtidas no seguimento telefônico serão utilizadas para obtenção dos indicadores hospitalares, sempre preservando a identidade dos participantes.

Coleta de dados do prontuário: se o(a) paciente estiver internado, serão coletadas

Página 3 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.

ID do participante de pesquisa: _____

informações do seu prontuário sobre sua condição de saúde, exames e tratamentos realizados, até a sua alta do hospital. Após o período de tratamento no hospital os pesquisadores farão o acompanhamento do(a) paciente pelas entrevistas telefônicas descritas acima.

Os riscos de participar nesta pesquisa estão relacionados aos seus procedimentos. Durante ou após a coleta de sangue por picada na veia, pode haver desconforto, dor, sangramento local, ou hematoma (mancha roxa) no local da picada que pode persistir por no máximo 15 dias até que a mancha desapareça completamente. Durante a coleta de secreção do nariz e da garganta o(a) paciente pode sentir desconforto momentâneo nos locais onde for introduzido o cotonete (swab). Caso seja necessário respiração com auxílio de um ventilador, a secreção coletada no 7º dia após sua entrada no estudo será coletada no momento que a equipe que estiver realizando procedimento de rotina para auxiliar na higiene do pulmão do participante, se isso for necessário, esta coleta não prejudicará seu estado de saúde. Em relação a entrevista por telefone, pode haver desconforto ao responder alguma questão, nesse caso, o(a) paciente ou você poderá optar por não responder. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais treinados e habilitados. Para realização de qualquer procedimento o(a) paciente, você e os pesquisadores que terão contato direto com o(a) paciente e você, utilização todos do equipamentos de proteção individual necessários conforme protocolos de atendimento e de realização dos testes.

Os benefícios diretos da participação na pesquisa são os resultados dos testes para coronavírus e para os demais vírus respiratórios (Influenza A e B e Vírus Respiratório Sincicial). Além disso, há o benefício indireto de contribuir para entendermos melhor sobre o novo coronavírus e as infecções pulmonares mais comuns na cidade de Porto Alegre nesta época do ano. A participação na pesquisa é voluntária. Caso decida não participar, ou ainda, desista de participar ao longo da pesquisa, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento ou tratamento que o(a) paciente, você ou seus familiares recebem ou possam a vir a receber neste Hospital.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento ao menor ou ao seu cuidador pela participação na pesquisa e também não haverá nenhum custo cobrado pelos procedimentos e exames realizados pelo estudo. Exames feitos e solicitados pelo seu médico não serão pagos pela pesquisa. Se ocorrer alguma intercorrência ou dano resultante da participação

Página 4 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.



Instituto de Educação
e Pesquisa



ID do participante de pesquisa: _____

na pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. O patrocinador desta pesquisa é o Hospital Moinhos de Vento por meio do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Institucional do Sistema Único de Saúde (PROADI-SUS).

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento (CEP)** para garantir que seus direitos e bem-estar sejam protegidos. Os dados coletados durante a pesquisa serão tratados de forma confidencial e serão utilizados unicamente com fins científicos e apresentados ao Ministério da Saúde. Fica garantido de que em momento algum o nome dos participantes será divulgado. Todas as informações coletadas irão respeitar o sigilo de confidencialidade de dados. Considerando que haverá a formação de biorrepositório na pesquisa, fica garantido o atendimento e o respeito ao disposto na legislação (Resolução CNS 441/2011 e Portaria MS Nº 2.201 de 2011).

O pesquisador responsável por este estudo é o Dr. Renato Tetelbom Stein. Em caso de dúvidas relacionadas aos exames realizados na pesquisa você poderá entrar em contato com a equipe do projeto de segunda a sexta das 08h às 18h através do telefone (51) 3314-3174 ou por Whatsapp no número (51) 99674-2310. Caso você tenha dúvidas adicionais sobre este estudo, poderá entrar em contato a qualquer momento com **os pesquisadores através do** telefone: (51) 998554457 **(apenas ligações)** ou com o **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento** - sob coordenação do Dr. Guilherme Alcides Flores Rollin pelo Telefone: (51) 33143537, localizado na Rua Tiradentes, 198 Subsolo – Porto Alegre/RS, Horário de atendimento: das 8h às 11h30 e das 13h30 às 18h.

Os resultados dos testes serão fornecidos por meio de login e senha de acesso no portal Sisepidemia para que o(a) participante ou você tenham acesso direto aos seus resultados. Todas as informações para acesso serão fornecidas pela equipe da pesquisa.

Este termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores. Ao assinar você confirma a participação na pesquisa, significando que entendeu as informações fornecidas, os procedimentos do estudo e que teve a oportunidade de fazer perguntas e tirar suas dúvidas sobre o que foi lido e explicado.

- 1) Você concorda com a coleta de secreção sangue da ponta do dedo para avaliar a produção

Página 5 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.

ID do participante de pesquisa: _____

de anticorpos contra o novo coronavírus (SARS-CoV-2)?

() NÃO () SIM

- 2) Você concorda com a coleta de secreção do nariz e garganta para exames específicos de infecções respiratórias incluindo o novo coronavírus?

() NÃO () SIM

- 3) Você concorda com a coleta de secreção do nariz e garganta para ser guardada no laboratório (biorrepositório) para analisar a forma como o organismo defende-se contra os vírus e bactérias, não sendo necessário, para tal, novo consentimento?

() NÃO () SIM

- 4) Você concorda com a coleta de escarro obtido espontaneamente para pesquisa do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e para a bactéria da tuberculose?

() NÃO () SIM () NÃO SE APLICA

- 5) Você concorda com a coleta de sangue (8,5 mL) para ser guardada no laboratório (biorrepositório) para futuras análises relacionadas à forma como o organismo se defende de vírus e bactérias, não sendo necessário, para tal, novo consentimento?

() NÃO () SIM

- 6) Você concorda e autoriza que os pesquisadores façam contato posteriormente para entrevista por telefone, e-mail ou WhatsApp para saber como o participante ficou depois de realizar estes exames?

() NÃO () SIM

- 7) Você concorda e autoriza que os pesquisadores façam contato posteriormente para informar resultado de exames por telefone, e-mail ou WhatsApp

() NÃO () SIM, mas apenas contato comigo

() SIM, podem ser contatados qualquer um dos contatos fornecidos na inclusão.

- 8) Você concorda que a equipe de pesquisa entre em contato para agendar nova a coleta de swab orofaríngeo e nasal para exames específicos do novo coronavírus e para ser guardada no laboratório (biorrepositório) para estudos análise molecular de patógenos de infecção respiratória, não sendo necessário, para tal, novo consentimento?

() NÃO () SIM

Página 6 de 7

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.



Instituto de Educação
e Pesquisa



ID do participante de pesquisa: _____

- 9) Você concorda que a equipe de pesquisa entre em contato para agendar nova a coleta de sangue (12mL) para análise de imunidade para o novo coronavírus e também para ser guardada no laboratório (biorrepositório) para estudos futuros, não sendo necessário, para tal, novo consentimento?

() NÃO () SIM () NÃO SE APLICA

- 10) Caso você necessite respirar com a ajuda de um ventilador, você autoriza a coleta de secreção respiratória do tubo endotraqueal?

() NÃO () SIM

PARTICIPANTE DA PESQUISA

Nome completo: _____

REPRESENTANTE LEGAL DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Nome completo: _____

Assinatura: _____

PESQUISADOR QUE APLICOU O TERMO

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Cidade: _____ Data: _____

Rubrica do participante/representante legal: _____

Rubrica do pesquisador que aplicou o termo: _____

Nome do estudo Avaliação de características clínicas, fatores de risco, método diagnóstico e resposta imune de COVID-19: um estudo de vida real em dois hospitais no sul do Brasil

TCLE para responsável V.4 de 17 de julho de 2020.