



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**CARGA VIRAL ABSOLUTA DE SARS-CoV-2 E SUA RELAÇÃO COM SINTOMAS
E DESFECHO CLÍNICO EM PACIENTES INFECTADOS**

**JESSICA SABRINA CANEDO DA SILVA
SUMENSSE**

Foz do Iguaçu
2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**CARGA VIRAL ABSOLUTA DE SARS-CoV-2 E SUA RELAÇÃO COM SINTOMAS
E DESFECHO CLÍNICO EM PACIENTES INFECTADOS**

**JESSICA SABRINA CANEDO DA SILVA
SUMENSSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Doutora Maria Leandra Terencio

Foz do Iguaçu
2022

JESSICA SABRINA CANEDO DA SILVA SUMENSSE

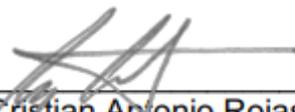
**CARGA VIRAL ABSOLUTA DE SARS-CoV-2 E SUA RELAÇÃO COM SINTOMAS E DESFECHO CLÍNICO EM
PACIENTES INFECTADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA


Orientador: Prof. Dra. Maria Leandra Terencio

UNILA


Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

UNILA


Prof. Dr. Felipe Bejamini

UFFS

Foz do Iguaçu, 29 de Abril de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Jessica Sabrina Canedo da Silva Sumensse

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(x) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....)

Título do trabalho acadêmico: Carga viral absoluta de SARS-CoV-2 e sua relação com sintomas e desfecho clínico em pacientes infectados

Nome do orientador(a): Doutora Maria Leandra Terencio

Data da Defesa: 01/04/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

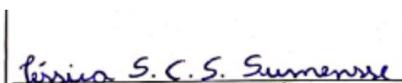
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 29 de Abril de 2022.



Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a minha professora orientadora Dra. Maria Leandra Terencio, pela constante orientação e ensinamentos neste trabalho, assim como, nesses vários meses de estágio que tive a oportunidade de realizar no laboratório de biologia molecular.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Municipal Padre Germano Lauck pela disponibilização das amostras e dos dados dos pacientes que permitiram a realização deste trabalho. Agradeço a todos os colegas do laboratório por seu apoio na separação das amostras e sua dedicação diante desta pandemia.

Aos professores da banca por aceitarem o convite de participar desde momento importante da minha graduação e também pelas valiosas orientações recebidas.

Aos colegas de curso por todo o apoio durante os anos de graduação. Aos meus amigos de sempre, principalmente para a Ana Carolina Mayumi Ota, Angelo Gabriel Vidal dos Santos e Daniele da Luz Silva um especial agradecimento por toda a partilha, apoio e diversão.

Aos meus pais, pelo exemplo, pela formação, pela paciência, pelo amor e apoio incansável. Os meus irmãos por toda a amizade e companheirismo e os outros elementos da minha família pela amizade e interesse nos meus percursos acadêmicos.

RESUMO

Um misterioso surto de pneumonia atípica surgiu no final de 2019 em Wuhan, na China. Em poucas semanas, um novo coronavírus chamado de SARS-CoV-2 foi anunciado pela Organização Mundial da Saúde. Neste trabalho foi realizado um estudo retrospectivo de carga viral absoluta em amostras clínicas de 188 pacientes com COVID-19 confirmada laboratorialmente por qRT-PCR de julho a novembro de 2021, no Hospital Municipal Padre Germano Lauck de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. O estudo teve como objetivo geral avaliar se a carga viral absoluta de SARS-CoV-2, identificada pela técnica de transcrição reversa, seguida pela reação da polimerase em cadeia (qRT-PCR) em amostras nasofaríngeas, tem relação com os sintomas e o desfecho clínico de pacientes infectados, conforme a gravidade da doença. Os resultados apontaram que o valor médio da carga viral foi 4,84 Log₁₀ e que a carga viral alta está significativamente associada ao maior risco de óbito quando considerado os casos de internamento. Entretanto, a relação da carga viral não foi significativa quanto à gravidade dos sintomas. Considerando estes resultados, a carga viral de SARS-CoV-2, medida através do valor absoluto na admissão, pode ser uma ferramenta valiosa para prever a taxa de mortalidade em pacientes graves internados com COVID-19 e a ampliação dos estudos desta ordem poderá confirmar a sua utilização como ferramenta prognóstica no manejo clínico de pacientes graves, infectados pelo SARS-CoV-2, com risco de óbito.

Palavras-chave: Carga Viral; SARS-CoV-2; qRT-PCR; Quantificação Absoluta.

ABSTRACT

A mysterious outbreak of atypical pneumonia emerged in late 2019 in Wuhan, China. Within weeks, a new coronavirus called SARS-CoV-2 was announced by the World Health Organization. In this work, a retrospective study of absolute viral load in clinical specimens of 188 patients with COVID-19 laboratory-confirmed by qRT-PCR from July to November 2021 was performed at Hospital Municipal Padre Germano Lauck in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. The overall objective of this study was to assess whether the absolute viral load of SARS-CoV-2, identified by reverse transcription technique followed by polymerase chain reaction (qRT-PCR) in nasopharyngeal samples, is related to symptoms and clinical outcome of infected patients, according to disease severity. The results showed that the mean viral load value was 4.84 Log₁₀, and that a high viral load is significantly associated with a higher risk of death when considering inpatient cases. However, the relationship between viral load and symptom severity was not significant. Considering these results, the viral load of SARS-CoV-2, measured through the absolute value at admission, may be a valuable tool to predict the mortality rate in critically ill patients hospitalized with COVID-19, and further studies of this order may confirm its use as a prognostic tool in the clinical management of critically ill, SARS-CoV-2 infected patients at risk of death.

Key words: Viral Load; SARS-CoV-2; qRT-PCR; Absolute Quantification.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	6
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 REVISÃO TEÓRICA	7
3.1 CORONAVÍRUS DISEASE-2019	7
3.2 DIAGNÓSTICO	10
3.3 CARGA VIRAL	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 CENÁRIO DA PESQUISA E ASPECTOS ÉTICOS	14
4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	15
4.3 FICHA DE INVESTIGAÇÃO HOSPITALAR	15
4.4 RECEBIMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	15
4.5 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	15
4.6 qRT-PCR	16
4.7 CURVA PADRÃO	16
4.8 ANÁLISE DE DADOS	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
5.1 CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO E EFICIÊNCIA DA PCR	18
5.2 QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA	21
5.3 RELAÇÃO ENTRE CARGA VIRAL E DESFECHO CLÍNICO	23
5.3.1 TESTE DE KRUSTAL-WALLIS	24
5.3.2 REGRESSÃO LOGÍSTICA	26
5.4 RELAÇÃO ENTRE CARGA VIRAL E SINTOMAS	28
5.4.1 TESTE U DE MANN-WHITNEY	30
5.4.2 REGRESSÃO LOGÍSTICA	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO	34
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Segundo de Freitas et al. (2020), em dezembro do ano de 2019, em Wuhan, na China, três pacientes foram admitidos no serviço de Pronto Atendimento com um tipo de pneumonia de “causa desconhecida”. Com o evoluir do quadro clínico, dois deles, que eram adultos jovens, sobreviveram, enquanto o terceiro paciente, idoso, acabou falecendo por insuficiência respiratória aguda. Alguns dias depois foram feitos exames que demonstraram o surgimento de um novo coronavírus, atualmente chamado de SARS-CoV-2.

“SARS-CoV-2 foi rapidamente disseminado em todo o mundo em um curto espaço de tempo, obrigando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar como uma pandemia global em 11 de março de 2020.” (CASCELLA et al., 2021). Desde então deu-se início a uma das maiores crises de saúde global desde a pandemia de influenza de 1918, a Coronavírus Disease - 2019 (COVID-19). Até março de 2022 foram mais de 445 milhões de casos confirmados no mundo e mais de 29 milhões no Brasil, o número de mortes ultrapassou 5,9 milhões e 650 mil no Brasil, sendo que o Brasil é o terceiro país com maior número de casos confirmados e o segundo maior em mortes, segundo o site oficial da OMS, (WHO, 2022).

Os principais sintomas encontrados nos pacientes são: “febre (70%-90%), tosse seca (60%-86%), falta de ar (53%-80%), fadiga (38%), mialgia (15%-44%), náusea/vômito ou diarreia (15%-39%), dor de cabeça e fraqueza (25%).” (WIERSINGA et al., 2020). A maioria dos casos começa a apresentar melhora após uma semana de doença. Todavia, alguns casos evoluem de forma grave, apresentando pneumonia bilateral e, eventualmente, insuficiência respiratória. Os sintomas variam de organismo para organismo geralmente sendo mais fortes em idosos e pessoas com comorbidades como diabetes e hipertensão, podendo levar até ao óbito. Em pessoas jovens e sem comorbidades geralmente os sintomas são mais brandos ou muitas vezes são assintomáticos. De acordo com Magleby et al. (2020), embora a maioria dos pacientes que desenvolvem COVID-19 tenham apresentações leves, 18%-33% dos pacientes que estão internados necessitam de ventilação mecânica e até 20% dos pacientes hospitalizados morrem.

Apesar da vacinação em andamento, os números de casos diários, como apontado pelos dados disponibilizados pela OMS, ainda são preocupantes, por isso se faz importante entender todos os mecanismos de ação do vírus. Nesse contexto,

um fator pouco abordado em estudos é a relação da carga viral absoluta dos pacientes com casos confirmados de COVID-19 seus sintomas e desfecho clínico.

Um método quantitativo eficaz para a análise da carga viral de SARS-CoV-2 é a qRT-PCR. “A reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RTPCR), possui como molde inicial a molécula de RNA, e gera cDNA, a partir de desoxirribonucleotídeos trifosfatados. A reação inicial de transcrição reversa ocorre, em geral, a 420 °C, por 30 a 60 minutos. Após a obtenção do cDNA uma alíquota desta amostra de cDNA é utilizada para a reação de amplificação por PCR.” (NASCIMENTO et al., 2010).

Utilizando uma curva padrão de valor conhecido de carga viral é possível utilizar essa técnica para determinar a quantidade absoluta de carga viral dos pacientes. Desta forma, esse trabalho tem como objetivo investigar a possível existência de relação entre a carga viral absoluta, os sintomas e o desfecho clínico de pacientes diagnosticados com covid-19 por qRT-PCR, contribuindo para um melhor entendimento da história natural da doença e sua progressão.

2 OBJETIVO

Avaliar a relação entre a carga viral absoluta de 188 pacientes diagnosticados com COVID-19 do Hospital Municipal Padre Germano Lauck de Foz do Iguaçu, seu desfecho clínico e seus sintomas.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar a extração de RNA viral das amostras de pacientes ambulatoriais e hospitalizados;
- Fazer a detecção molecular por qRT-PCR do vírus SARS-CoV-2 nas amostras;
- Obter curva de referência para quantificação absoluta da carga viral das amostras;
- Analisar a existência de associação entre a carga viral absoluta com os sintomas e desfecho clínico dos pacientes analisados;
- Verificar se a carga viral pode ser considerada um fator prognóstico para as taxas de internamento e mortalidade.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 Coronavírus Disease-2019

A Coronavírus Disease-2019 ou COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 “um novo beta CoV pertencente ao mesmo subgênero que o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio Coronavírus (MERS-CoV), que foram anteriormente implicados em epidemias de SARS-CoV e MERS-CoV.” (CHAN et al., 2020). O SARS-CoV-2 é um coronavírus de RNA envelopado de fita simples, composto por um conjunto de proteínas estruturais, tais como as proteínas spike (S), envelope (E) e membrana (M), muito utilizadas como alvo de detecção molecular da doença e desenvolvimento de vacinas.

Os primeiros representantes do gênero coronavírus foram descobertos em animais e tinham pouca repercussão para os humanos. Entretanto, três representantes desse gênero acarretaram sérios problemas de saúde pública durante este século. “A primeira grande pandemia relacionada aos coronavírus ocorreu no ano de 2002. [...] O vírus causador dessa infecção recebeu o nome de SARS-CoV. A infecção disseminou-se em mais de 30 países, provocando mais de 100.000 casos e cerca de 3.411 óbitos, configurando uma taxa de letalidade global de, aproximadamente, 3,4%.” (DE FREITAS et al., 2020). A segunda dessas epidemias causadas pelos coronavírus ocorreu 10 anos depois, “Era a síndrome respiratória do Oriente Médio, também relacionada ao coronavírus ou, simplesmente, chamada MERS-CoV. [...] Desde o primeiro caso de infecção humana causada pelo MERS-CoV, mais de 2.538 casos foram confirmados laboratorialmente e 871 faleceram por complicações respiratórias ou renais.” (DE FREITAS et al., 2020).

Ainda assim, esses dois casos nem se comparam a magnitude da terceira pandemia causada por esse gênero. De acordo com Chan et al. (2020) “A data mais antiga do início dos sintomas foi 1 de dezembro de 2019. A sintomatologia desses pacientes incluiu febre, mal-estar, tosse seca e dispneia”. A evolução clínica desses pacientes também é relatada, “Entre 41 pacientes internados em um hospital designado em Wuhan, 13 (32%) necessitaram de cuidados intensivos e 6 (15%)

morreram. Todos os 41 pacientes apresentaram pneumonia com achados anormais em tomografia computadorizada do tórax.” (CHAN et al., 2020).

Para entender a gravidade dessa doença Cascella et al., (2021) salienta que “a doença viral altamente contagiosa causada pela síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), teve um efeito catastrófico na demografia mundial, resultando em mais de 3,8 milhões de mortes em todo o mundo, emergindo como a crise de saúde global mais consequente desde a era da pandemia de influenza de 1918.” Outro fator determinante para o nível de emergência dessa pandemia é o nível de infectividade da COVID-19 que é bem maior que das outras doenças relacionadas ao Coronavírus, “Após os primeiros casos desta doença viral predominantemente respiratória terem sido relatados pela primeira vez [...] o SARS-CoV-2 foi rapidamente disseminado em todo o mundo em um curto espaço de tempo, obrigando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar como uma pandemia global em 11 de março de 2020.” (CASCELLA et al., 2021).

Os sintomas da COVID-19 são parecidos com o de uma infecção viral comum, com os mais comuns sendo febre, tosse, dispneia, mialgia, fadiga e congestão nasal. Entretanto, em alguns casos, principalmente em pacientes com comorbidades, a COVID-19 pode ter complicações sérias podendo levar até a morte. “Alguns indivíduos apresentam uma síndrome de desconforto respiratório grave, necessitando de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e suporte respiratório precoce com morbidade e mortalidade significativas.” (DE LA CALLE et al., 2021).

Entre as complicações que acometem os pacientes que precisam ser hospitalizados pela Covid-19 as mais comuns estão na tabela 1, assim como as porcentagens das complicações em relação aos pacientes internados.

Algumas características importantes para entender a doença é o tempo de aparecimento dos sintomas em relação à exposição ao vírus e o modo de transmissão do vírus. O tempo médio de aparecimento dos sintomas é de “5 dias, e 97,5% das pessoas que desenvolvem sintomas o fazem dentro de 11,5 dias.” (WIERSINGA et al., 2020). O modo de transmissão primário é “através da exposição a gotículas respiratórias que transportam o vírus infeccioso a partir do contato próximo ou transmissão de gotículas de indivíduos pré-sintomáticos, assintomáticos ou sintomáticos que abrigam o vírus.” (CASCELLA et al., 2021).

Tabela 1 - Complicações mais comuns aos pacientes com covid-19.

Complicações	Pacientes Internados (%)
Pneumonia	75%
Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	15%
Lesão Hepática Aguda	19%
Lesão Cardíaca	7%-17%
Insuficiência Cardíaca Aguda; Disritmias e Miocardite; Coagulopatia Pró Trombótica	10%-25%
Lesão Renal Aguda	9%
Manifestações Neurológicas	8%
Doença Cerebrovascular Aguda	3%
Choque	6%

Fonte: WIERSINGA et al., 2020. Nota: Dados trabalhados pelo autor

A taxa de letalidade para a COVID-19 não é muito diferente das taxas de letalidade de SARS-CoV ou MERS-CoV, porém, como a infectividade é muito maior, a diferença no número de mortes é grande. “A estimativa atual da OMS para a taxa global de letalidade de casos para o COVID-19 é de 2,2%. No entanto, a taxa de letalidade do caso é afetada por fatores que incluem idade, condições pré-existentes subjacentes e gravidade da doença e varia significativamente entre os países.” (CASCELLA et al., 2021).

Casella et al. (2021) destaca a importância de continuarmos estudando todos os fatores que ainda não entendemos sobre o SARS-CoV-2, já que mesmo com a vacinação em andamento ainda temos vários novos casos da doença diariamente. “limitar a contínua disseminação desse vírus e suas variantes tornaram-se um problema de crescente preocupação, uma vez que o SARS-CoV-2 continua a causar estragos em todo o mundo, com muitos países suportando uma segunda ou terceira onda de surtos dessa doença viral atribuída principalmente devido ao surgimento de variantes mutantes do vírus.”

3.2 Diagnóstico

Com a rápida disseminação do vírus pelo mundo foi preciso encontrar uma forma fácil, rápida e sensível de diagnóstico. Atualmente “o teste padrão-ouro (...), para diagnóstico da COVID-19, é feito por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) que detecta o RNA SARS-CoV-2, material genético do vírus.” (DE FREITAS et al., 2020).

A PCR comum consiste em uma técnica de desnaturação da dupla fita do DNA, pelo rompimento das pontes de hidrogênio, seguido pelo reconhecimento dos primers com a sequência específica do DNA (chamado de anelamento ou hibridização), depois a polimerização da nova fita de DNA pela inclusão dos nucleotídeos na extremidade 3' dos primers iniciadores, fazendo assim a extensão das cadeias no sentido 5'-3'. Um derivado da técnica comum de PCR é a PCR em tempo real e a principal diferença é que essa técnica “permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA alvo, possibilitando a análise comparativa da expressão de tal gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação.” (NASCIMENTO et al., 2010).

Para a detecção do SARS-CoV-2 a técnica utilizada é a PCR em tempo real em combinação com a transcriptase reversa. “Por ser uma técnica de elevada sensibilidade e acurácia, a PCR em tempo real tem sido uma ferramenta aplicada em diversas áreas biomédicas, destacando-se na pesquisa básica e no diagnóstico clínico laboratorial.” (NASCIMENTO et al., 2010). A maior diferença nessa técnica é que o RNA é utilizado e não o DNA como normalmente em outros PCRs, para isso é necessário extrair primeiramente o RNA da amostra e então ocorre a “conversão deste RNA em cDNA pela técnica de transcrição reversa e, finalmente, amplificação do cDNA por PCR (ação da DNA polimerase).” (NASCIMENTO et al., 2010). Assim como nos outros PCRs essa sequência de cDNA será replicada com o uso de primers iniciadores (oligonucleotídeos) específicos.

Para o SARS-CoV a detecção se baseia em alguns genes que podem variar dependendo do kit e do fabricante, em geral, “o teste é direcionado para identificação dos genes virais N, E, S e RdRP.” (DE FREITAS et al., 2020).

Apesar de ter diversas vantagens para o diagnóstico, o maior problema encontrado durante a pandemia são os falsos negativos, já que, mesmo a

sensibilidade da PCR em tempo real sendo alta, existem diversos fatores que influenciam. “A sensibilidade dos testes de PCR depende de múltiplos fatores que incluem a adequação da amostra, coleta técnica de amostras, tempo de exposição e fonte da amostra.” (WIERSINGA et al., 2020).

A outra opção mais comum que pode ser utilizada para o diagnóstico da COVID-19 é o exame sorológico (exame de anticorpos). “Um teste de anticorpos pode avaliar a presença de anticorpos que ocorrem como resultado de infecção. Os testes de anticorpos desempenham um papel importante na vigilância ampla do COVID-19, e muitos kits de teste de anticorpos fabricados comercialmente estão disponíveis para avaliar a presença de anticorpos contra SARS-CoV-2.” (CASCELLA et al., 2021).

As respostas imunitárias durante a infecção e até mesmo depois são utilizadas neste exame, portanto seu maior diferencial é poder identificar pacientes que tiveram a doença depois do fim da infecção. “Um teste sorológico deve ser capaz de identificar pacientes com infecção atual (IgM) ou anterior (IgG)”. (DE FREITAS et al., 2020). A maior desvantagem deste teste em relação ao qRT-PCR é a especificidade e sensibilidade que é menor.

Outra opção de diagnóstico são os testes rápidos que faz uso de uma lâmina de nitrocelulose (uma espécie de papel) que reage com a amostra e apresenta uma indicação visual em caso positivo. “Estão disponíveis no mercado dois tipos de testes rápidos: de antígeno (que detectam proteínas na fase de atividade da infecção) e o de anticorpos (que identificam uma resposta imunológica do corpo em relação ao vírus). A vantagem desses testes seria a obtenção de resultados rápidos para a decisão da conduta.” (DE SOUSA, 2020). No entanto, a maioria dos testes rápidos possuem sensibilidade e especificidade reduzidas.

Apesar de suas desvantagens, levando em conta as outras opções de diagnóstico para a COVID-19 a qRT-PCR é a melhor opção, por isso o padrão ouro.

3.3 Carga Viral

Uma vantagem da qRT-PCR é que ela é uma técnica quantitativa, portanto, além de fazer o diagnóstico da presença do vírus ela pode quantificá-lo. “A tecnologia baseada no qRT-PCR permite o cálculo da carga viral, que está associada ao risco de transmissão e à gravidade da doença em outras doenças virais. A carga

viral no COVID-19 pode se correlacionar com infectividade, fenótipo da doença, morbidade e mortalidade.” (PUJADAS et al., 2020).

Na literatura encontram-se vários estudos sobre a carga viral de doenças infecciosas, e sua possível relação direta e/ou indireta com muitos fatores. Conhecer a carga viral de pacientes com doenças infecciosas é extremamente significativo já que “a carga viral reflete a interação dinâmica entre a replicação viral e o desembaraço por mecanismos de defesa corporal.” (HUNG et al., 2004). Por ser diretamente relacionada à replicação viral podem ser utilizadas para “monitorar infecções graves do trato respiratório viral, incluindo progressão clínica, resposta ao tratamento, cura e recaída.” (ZHENG, et al., 2020).

“Embora vários estudos tenham avaliado a síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), a dinâmica da carga viral e a duração do derramamento viral relatado em estudos até agora foram heterogêneos.” (CEVIK et al., 2020). Na revisão bibliográfica Cevik et al. (2020), por exemplo, é apontado como a carga viral pode estar relacionada diretamente com o nível de transmissão da COVID-19. “Cinética de carga viral e duração do derramamento viral são determinantes importantes para a transmissão da doença. Eles determinam a duração da infecciosidade, que é um parâmetro crítico para informar medidas de controle eficazes e modelagem de doenças.” Entre os achados deste trabalho pode-se destacar que o pico de carga viral SARS-CoV-2 foi na primeira semana após o início dos sintomas. Considerando que esse já foi demonstrado como o período onde a infecciosidade do coronavírus é maior em estudos semelhantes, os autores chegam à conclusão de que pode existir relação entre a elevada carga viral e a maior taxa de infecciosidade da doença.

De La Calle et al. (2021) estudou a relação entre a carga viral e a insuficiência respiratória em pacientes do Hospital Universitário "12 de Octubre", no sul de Madri, Espanha. Os autores justificam a importância desse estudo pelo fato de que “vários trabalhos relataram que pacientes com pneumonia grave que necessitam de ventilação mecânica têm cargas virais muito altas por longos períodos. Apesar disso, até o momento, poucos estudos relacionaram a carga viral inicial ao desfecho de pacientes COVID-19”. Entre os resultados que eles chegaram se destaca que “os pacientes com alta carga viral de SARS-CoV-2 na admissão, medidos por um valor ct do qRT-PCR abaixo de 25, tiveram mais do que o dobro de chances de desenvolver

insuficiência respiratória hospitalar em comparação com pacientes com cargas virais mais baixas.” (DE LA CALLE et al., 2021).

Os autores chegam a conclusão de que a qRT-PCR utilizando o valor de CT para determinar a carga viral do SARS-CoV-2 em amostras nasofaríngeas é um marcador prognóstico confiável para o desenvolvimento da insuficiência respiratória nos pacientes. “É fácil de obter e é uma ferramenta amplamente disponível que poderia ajudar a selecionar aqueles pacientes que se beneficiariam de um acompanhamento mais próximo e um suporte respiratório adequado e pontual.” (DE LA CALLE et al., 2021).

Outro estudo que fez uma relação parecida com De La Calle foi Magleby et al. (2020). Os autores investigaram a relação da carga viral com intubação e a taxa de mortalidade nos pacientes hospitalizados. “As cargas virais SARS-CoV-2, determinadas pelos valores de CT gerados com ensaios de diagnóstico padrão de cuidado, estão associadas independentemente à intubação e ao óbito entre pacientes hospitalizados com COVID-19”. Para os autores, esses achados demonstram o papel crítico da carga viral na patogênese do SARS-CoV-2 e que os valores do CT devem fazer parte do diagnóstico relatado aos médicos para auxiliar na identificação dos pacientes com maiores chances de complicações adversas relacionadas a COVID-19.

Em Pujadas et al. (2021) foi demonstrado por qRT-PCR uma grande relação entre baixos valores de CT de amostras (alta carga viral) e o desfecho dos pacientes, mostrando que pacientes que chegaram ao óbito tinham cargas virais mais altas que a média, o que confirma os resultados dos artigos citados acima de que a carga viral de SARS-CoV-2 está relacionada com a gravidade da doença.

Zheng et al. (2020) analisou 3000 amostras de pacientes diagnosticados com COVID-19 para comparar a carga viral das amostras com a gravidade da doença dos pacientes, um trabalho semelhante aos anteriores. “Encontramos diferenças na carga viral em pacientes com diferentes gravidades da doença, aqueles com doença grave mostrando uma carga viral significativamente maior do que aqueles com doença leve, o que sugere que a carga viral pode ser usada para avaliar o prognóstico. (ZHENG, et al., 2020).

Uma pesquisa relacionou a carga viral com a idade dos pacientes e sua infectividade, os resultados mostram que “a carga viral se correlaciona com a infectividade em um nível fundamental porque a razão entre RNA viral detectado e vírus infeccioso, como mensurável pelo isolamento do vírus na cultura celular, sofre

pouca variação antes do início de uma resposta imune adaptativa em doenças virais agudas.” (JONES et al., 2020). A carga viral e a infecciosidade tem uma relação bem estabelecida a tal ponto de que “os limites de sensibilidade do qRT-PCR, que detectam RNA, são frequentemente expressos na forma de uma concentração baseada em doses infecciosas da cultura tecidual.” (JONES et al., 2020).

Em Shi et al., 2020 eles estudaram a associação da carga viral com IgM anti-SARS-CoV-2, proteína C-reativa (CRP) e soro amilóide A (SAA). “A combinação do IgM e CRP/SAA com algumas informações clínicas convencionais, incluindo tempo após o início e o tipo de gravidade, podem dar sugestões sobre a carga viral e o julgamento de condições dos pacientes COVID-19.” (SHI et al., 2020). Demonstrando como a carga viral se relaciona com os biomarcadores e as respostas imunológicas dos pacientes.

A SARS-CoV-1 e a MERS-CoV, por serem doenças que têm mais tempo de estudo, apresentam mais relatos de pesquisas envolvendo a carga viral. Por exemplo, em Hung et al. (2004) foi relacionado a carga viral e as manifestações de SARS-CoV. “Neste estudo, examinamos e analisamos a carga viral em amostras clínicas retiradas de diferentes sítios anatômicos do dia 10 ao 15 após o início dos sintomas para entender o papel do SARS-CoV na patogênese das manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais nos pacientes com SARS”. (HUNG et al., 2004). Eles conseguiram relacionar a carga viral encontrada em diferentes fontes com diversos prognósticos da doença. “A alta carga viral em NPA, com ou sem alta carga viral no soro, é um indicador prognóstico útil de insuficiência respiratória ou morte. A presença de RNA viral em múltiplos locais do corpo também indica mau prognóstico.” (HUNG et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cenário da pesquisa e aspectos éticos

O local de execução do projeto foi o Laboratório de Biologia Molecular UNILA/HMPGL (Hospital Municipal Padre Germano Lauck) em Foz do Iguaçu, PR. O HMPGL está inserido na rede de estabelecimentos de saúde vinculados ao SUS, sob a gestão da Fundação Municipal de Saúde de Foz do Iguaçu.

O presente estudo configura-se como um dos objetivos propostos no Projeto **“Perfil da população do oeste paranaense acometido de Síndrome Respiratória Aguda Grave entre 2020 e 2022 ”** aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)/ Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Plataforma Brasil, CAAE número 36189220.3.0000.8527.

4.2 População de estudo

Neste estudo virológico quantitativo foram avaliadas 188 amostras de pacientes aleatórios, positivos para a COVID-19 com doença detectada entre julho e novembro de 2021.

4.3 Ficha de investigação hospitalar

Foram coletadas, via prontuário eletrônico hospitalar (Tasy), as seguintes informações: idade, sintomatologia (prontuário padrão NOTIFICA COVID) e desfecho clínico.

4.4 Recebimento e armazenamento das amostras

As amostras para análise chegaram ao laboratório em tubo falcon 15mL contendo 3ml de meio VTM, devidamente identificados e cadastrados pela triagem do Hospital Municipal Padre Germano Lauck. Após o recebimento, foram armazenados em geladeira (8C°), exclusiva para o recebimento de amostras.

Em cabines de segurança biológica as amostras foram aliquotadas em microtubos de polipropileno de 1,5mL, devidamente identificados, os quais foram utilizados posteriormente no processo automatizado de extração de ácidos nucleicos. Após o processo de aliquotagem, os tubos de falcon com o restante das amostras, foram descartados em lixo hospitalar infectante.

4.5 Extração do RNA viral

O RNA das amostras foi purificado usando o Kit EXTRACTA FAST-RNA Viral (MVXA-P096 FAST) da Loccus, seguindo as especificações do fabricante. Esse

kit de extração é utilizado em conjunto com um extrator automatizado EXTRACTA 96 da Loccus, com capacidade para extrair 96 amostras simultâneas. O kit para extração e purificação pode purificar DNA e RNA de amostras virais por meio da utilização de beads magnéticas em 30 minutos. O envase do kit é feito em placas de 96 poços fundos e conta com todos os reagentes necessários para a purificação do material genético viral. O extrator e purificador de DNA e RNA Extracta 96 é um sistema automatizado que realiza o procedimento de extração/purificação utilizando as beads magnéticas em algumas etapas de extração lise, ligação, lavagem e eluição. Foram utilizados 100 μ L de amostra por poço de extração, e no final do processo de extração automatizada, o RNA é recuperado em uma solução de eluição com volume final de 60 μ L.

4.6 qRT-PCR

A detecção viral foi realizada usando o KIT BIOMOL OneStep/COVID-19 do INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ – IBMP, para 94 amostras e 2 controles (positivo e negativo), de acordo com as especificações do fabricante. O Kit permite a identificação do vírus SARS-CoV-2 através de dois alvos: região conservada ORF 1ab e região da proteína do nucleocapsídeo N. As reações são monitoradas pela detecção de um controle interno que possui como alvo um gene endógeno humano permitindo confirmar o desempenho dos processos de extração e de detecção do RNA viral. A amplificação dos genes alvos do patógeno com a amplificação do Controle Interno indica presença de RNA viral na amostra.

4.7 Curva padrão

A quantificação baseou-se em uma preparação de uma curva padrão de carga viral contendo diluições conhecidas de um controle positivo, denominado padrão, com variações de 10⁶ a 10² cópias/ μ L. Neste trabalho, o padrão utilizado foi o controle positivo 2019-nCoV_N (marca IDT) que já vem ressuspenso em tubo contendo 250 μ L (200.000 cópias/ μ L) em IDTE pH 8,0.

Para a diluição seriada em cinco pontos foi utilizado água livre de DNAses e RNAses com fator de diluição 1:10. Padronizou-se o primeiro ponto da curva padrão com o controle estoque, sem diluição, com 200.000 cópias/ μ L (6 log₁₀), em triplicata

como especificado pelo fabricante. O ponto 2 foi de 20.000 cópias/ μ L (5 log₁₀), o ponto 3 de 2.000 cópias/ μ L (4 log₁₀), o ponto 4 de 200 cópias/ μ L (3 log₁₀) e o ponto 5 de 20 cópias/ μ L (2 log₁₀). Para as reações de PCR foram utilizados 5 μ L de padrão por reação.

Vale ressaltar que o controle utilizado como padrão tem como alvo o gene N1, portanto, as análises foram baseadas nos valores de amplificação do gene N. A tabela 2 mostra o primer utilizado.

Tabela 2 - Sequência do primer utilizado.

nCoV_N1-F 2019	Primer forward 2019-nCoV_N	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT
----------------	-------------------------------	-------------------------------

Fonte: Site oficial da CDC.

Neste estudo, baseado no número de ciclos de replicação da genética viral (Ct), as amostras com Ct < 25 foram classificadas como carga viral alta, Ct entre 25-30 como carga viral moderada e Ct >30 como carga viral baixa.

4.8 Análise de dados

Para as análises, as 188 amostras foram classificadas em três grupos, conforme seu desfecho clínico: Sem Internação, Internação com desfecho de alta e Internação com desfecho de óbito. Calcularam-se estatísticas descritivas, como médias e proporções (percentuais) de cada variável. A relação entre a carga viral e o desfecho clínico foi analisada utilizando o teste Kruskal-Wallis e o método de Pairwise. Os sintomas foram comparados com os valores de carga viral utilizando o teste de Mann-Whitney U para variáveis contínuas.

Foram feitos modelos de regressão logística bivariada para estimar se a carga viral poderia ser preditora das taxas de mortalidade e de internamento entre os pacientes com COVID-19. Foi investigada a associação das taxas de mortalidade, internamento e a carga viral, com cálculos dos odds ratio (OR) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%). Foi feito um modelo que considerou a carga viral juntamente com os sintomas como variável preditora da taxa de mortalidade.

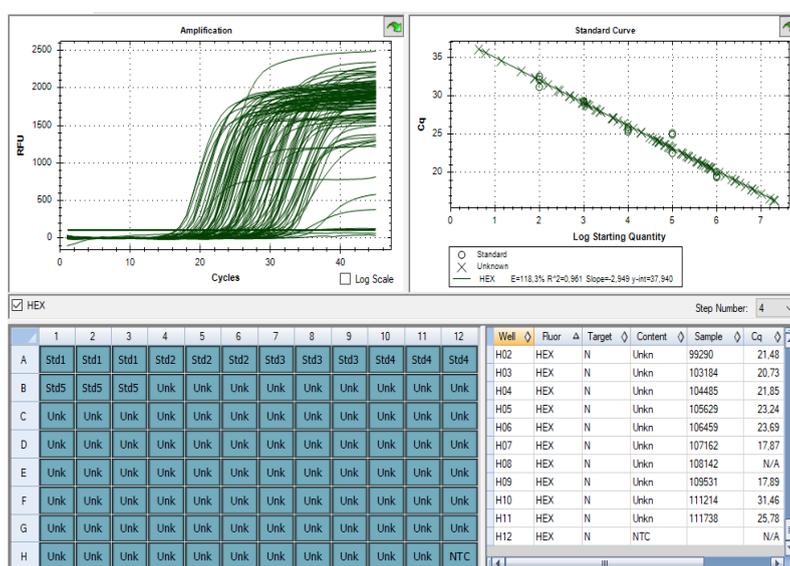
Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As análises estatísticas foram realizadas com o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 28.0 (Armonk, NY: IBM Corp e SAS/STAT 10.1; SAS Institute Inc., Cary, NC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Curvas de amplificação e Eficiência da PCR

Para a realização da quantificação viral absoluta das 188 amostras, foram realizadas três placas de detecção (figuras 1, 2 e 3). Vale ressaltar que a amplificação e detecção da curva padrão são realizadas paralelamente a amplificação das amostras que se quer quantificar (figura 4). Em todas elas, as diluições seriadas da amostra padrão foram postas em triplicatas e os ciclos de amplificação foram: 15 minutos a 50°C, 3 minutos a 95°C e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 40 segundos a 55°C para anelamento e extensão.

Figura 1 - Placa 1 contendo os padrões em triplicada, controle negativo e 79 amostras.

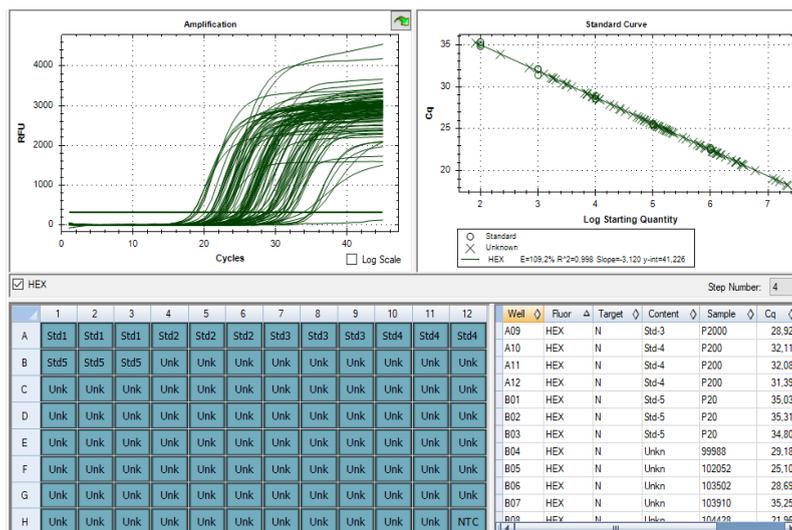


Fonte: O Autor

O NTC (No Template Control) de todas as três placas não apresentou curva de crescimento de fluorescência que cruzasse a linha do Threshold, como o NTC consiste em um poço que contém apenas o mix de detecção sem presença de qualquer RNA, não houve contaminação das placas. “Se qualquer uma das reações

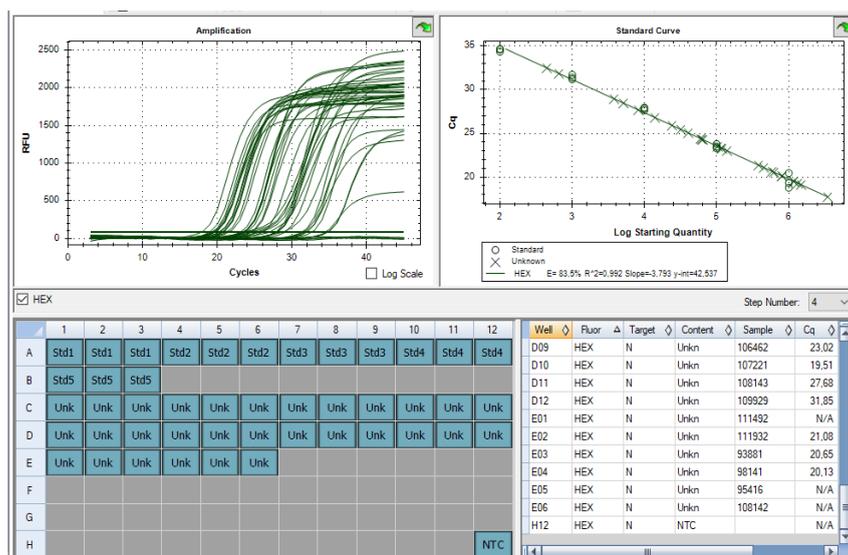
NTC exibir uma curva de crescimento que ultrapasse o limite do ciclo, pode ter ocorrido contaminação. Nessa situação, a corrida deve ser invalidada e o ensaio repetido, seguindo rigorosamente os cuidados citados no protocolo.” (CHERNICHARO et al., 2021).

Figura 2 - Placa 2 contendo os padrões em triplicada, controle negativo e 79 amostras.



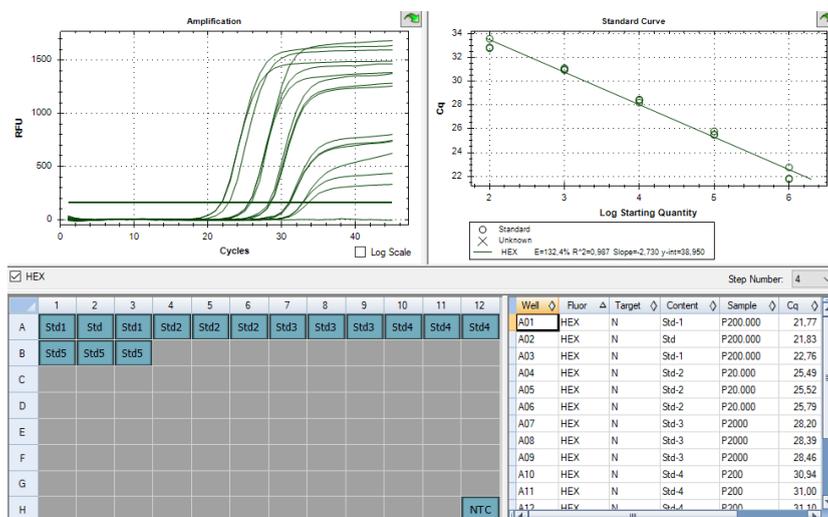
Fonte: O Autor

Figura 3 - Placa 3 contendo os padrões em triplicada, controle negativo e 30 amostras.



Fonte: O Autor

Figura 4 - Placa teste para preparação da curva padrão.



Fonte: O Autor

“Ensaio precisos geralmente são correlacionados com uma PCR de alta eficiência. Desta forma, a eficiência da PCR deve ser estabelecida por curvas de calibração, as quais fornecem uma indicação simples, rápida e reprodutível da eficiência média da PCR, da sensibilidade analítica e da robustez do ensaio” (BUSTIN et al., 2009). Ou seja, a partir da curva padrão, podem ser derivadas informações sobre o desempenho da reação através dos seguintes parâmetros: *Efficiency %*, *Slope*, *Y-intercept*, e *Correlation Coefficient (R²)*. A tabela 3 mostra a eficiência de amplificação de todas as placas.

Tabela 3 - Relação da eficiência nas 3 placas.

Placa	Fluor	Efficiency %	Slope	Y-Intercept	R ²
1	HEX	118,18	-2,951	37,854	0,962
2	HEX	109,2	-3,12	41,226	0,998
3	HEX	83,49	-3,793	42,537	0,992

Fonte: O Autor

Entende-se por eficiência da PCR, a taxa na qual um amplicon é gerado. Se um amplicon dobra em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, ela apresentou 100% de eficiência. Neste estudo, a eficiência de amplificação da PCR da primeira placa foi de 118,18%, da segunda placa foi de 109,20% e da terceira placa foi 83,49%.

Slope e Y-intercept da curva padrão estimam a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real e é representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucleico. Para obter resultados precisos e reprodutíveis, as reações devem ter uma eficiência tão próxima de 100% quanto possível, equivalente a uma inclinação de $-3,32$. Neste estudo, o *slope* da primeira placa foi $-2,951$, da segunda placa foi de $-3,120$ e da terceira placa foi $3,793$.

Correlation Coefficient (R^2) mede o ajuste dos dados à curva padrão. O valor R^2 reflete a linearidade da curva padrão. Idealmente, $R^2 = 1$, embora $0,999$ seja geralmente o valor máximo. Neste estudo, o R^2 da primeira placa foi $0,962$, da segunda placa foi de $0,998$ e da terceira placa foi $0,992$.

As diferenças de eficiência encontradas nas placas tem muitas explicações possíveis, “tais como: o cuidado nas pipetagens, a qualidade e integridade das amostras (molde de RNA e cDNA), desenho dos primers, condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos primers), qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Condições específicas para cada experimento devem ser padronizadas.” (NASCIMENTO et al., 2010). Sendo assim, os valores de eficiência alcançados foram considerados suficientes para validar o estudo proposto.

5.2 Quantificação Absoluta

Os 188 pacientes apresentaram infecção diagnosticada de SARS-CoV-2 por qRT-PCR anteriormente, porém, durante a realização dos testes, duas amostras não apresentaram curva de crescimento de fluorescência que cruzasse a linha do Threshold, portanto, foram excluídas das análises. “Resultados Falso Negativos podem ocorrer devido à baixa quantidade de vírus presentes na amostra, devido a problemas na coleta, transporte ou manuseio. O limite de detecção do teste deve ser estabelecido por cada laboratório levando em consideração todas as variáveis envolvidas.” (CHERNICHARO et al., 2021). No presente projeto, o limite de detecção (determinado com a curva padrão elaborada a partir da diluição do controle positivo) foi de 20 cópias por μL .

A faixa etária dos 186 pacientes foi de 1 a 91 anos, com média de idade de 39,81 anos (dp 20,9). O Ct médio foi 24,72 (dp 4,3), o Ct mais baixo foi 16,28 e o

mais alto foi 35,96. O valor médio de cópias virais foi de 4,84 log₁₀, (dp 1,4 log₁₀) o menor número de cópias foi de 0,64 log₁₀ e o maior foi de 7,34 log₁₀ (tabela 4).

Tabela 4 - Dados gerais de cada grupo.

	Sem Internação	Internação com Desfecho de Alta	Internação com Desfecho de Óbito	Não Informado	Total
Frequência	139	11	12	24	186
%	75	6	7	12	100
Média da Carga Viral Absoluta (Log₁₀)	4,88	3,62	5,56	4,81	4,78
Média do CT	24,66	27,81	21,45	25,12	24,48
Média de Idade	35,29	52,73	73,42	43,43	39,81

Fonte: O Autor

Existem vários fatores que interferem na gravidade dos pacientes com COVID-19, por exemplo, a idade e as comorbidades dos pacientes. “De fato, pacientes idosos e frágeis podem apresentar uma expressão mais elevada de receptores ACE2 que servem como entrada celular para SARS-CoV-2 e também podem ter uma imunidade prejudicada, tudo isso contribuindo para cargas virais mais altas na admissão e uma doença mais grave.” (DE LA CALLE et al., 2021).

“Embora apenas aproximadamente 25% dos pacientes infectados tenham comorbidades, 60% a 90% dos pacientes infectados internados têm comorbidades. As comorbidades mais comuns em pacientes hospitalizados incluem hipertensão (presente em 48%-57% dos pacientes), diabetes (17%-34%), doença cardiovascular (21%-28%), doença pulmonar crônica (4%-10%), doença renal crônica (3%-13%), malignidade (6%-8%) e doença hepática crônica (<5%).” (WIERSINGA et al., 2020). Como este estudo levou em consideração apenas aspectos virológicos, uma análise da relação entre a idade, as comorbidades e a carga viral dos pacientes poderia apresentar resultados diferentes.

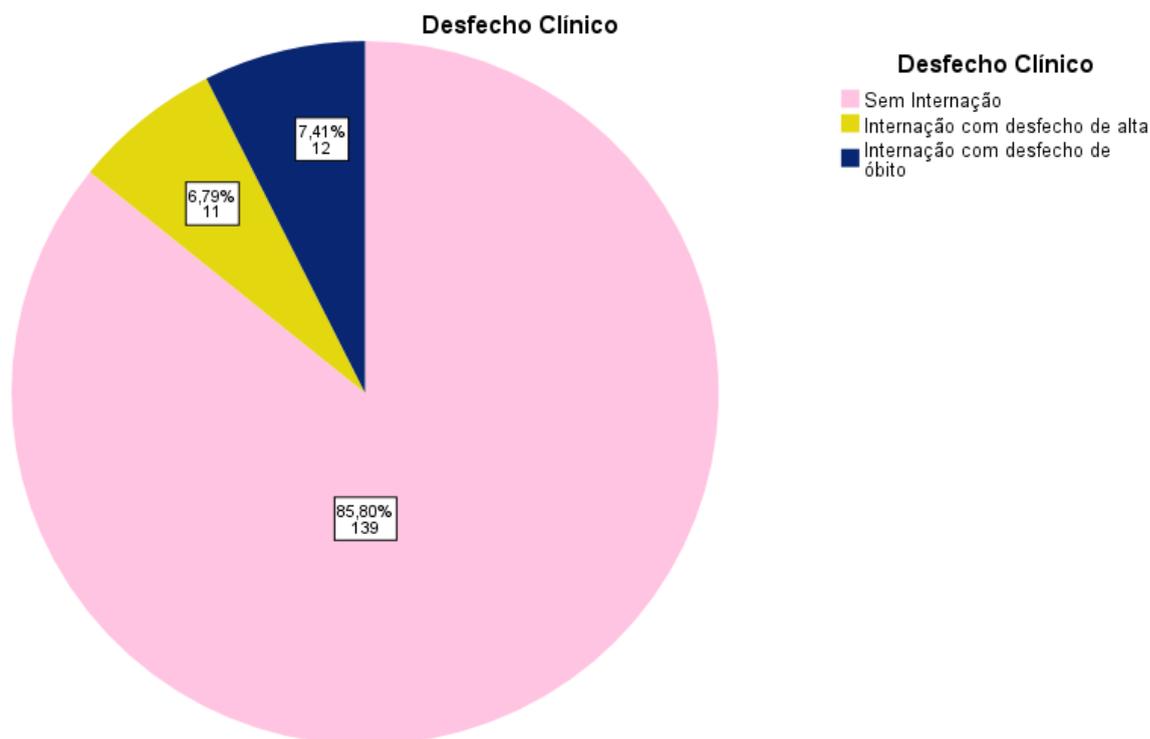
Durante o levantamento dos dados, 24 pacientes não foram analisados em relação a sintomas e desfecho clínico, por falta de dados no prontuário eletrônico, sendo assim, as análises utilizam um número total de 162 pacientes. A idade, as comorbidades, data de coleta em relação ao início dos sintomas, tratamento feito antes da coleta das amostras e vacinação do paciente, apesar de serem variáveis importantes na dinâmica da carga viral, não foram incluídas nas análises estatísticas. Por ser um estudo retrospectivo, muitos pacientes não continham essas informações

cadastradas no seu prontuário eletrônico, mostrando que há uma grande defasagem na coleta dos dados dos pacientes durante a pandemia, dificultando um estudo mais abrangente dos fatores relacionados à carga viral.

5.3 Relação entre carga viral e desfecho clínico

Os pacientes foram classificados com base em seu desfecho clínico da seguinte forma: sem internação, internação com desfecho de alta e internação com desfecho de óbito. Os pacientes sem internação são aqueles com teste positivo para SARS-CoV-2 sem qualquer sintoma clínico consistente com COVID-19 (assintomáticos) ou que apresentaram “doença leve: indivíduos que apresentam qualquer sintoma de COVID-19, como febre, tosse, dor de garganta, mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, náusea, vômito, diarreia, anosmia ou disgeusia, mas sem falta de ar ou imagem anormal do tórax” (CASCELLA et al., 2021), e portanto, conseguiram se recuperar sem intervenção hospitalar. A internação com desfecho de alta considerou todos os pacientes que precisaram de acompanhamento hospitalar, tanto aqueles pacientes que tiveram “doença moderada: indivíduos que têm sintomas clínicos ou evidências radiológicas de doença do trato respiratório inferior e que têm saturação de oxigênio (SpO₂) ≥ 94% no ar do quarto” (CASCELLA et al., 2021), quanto aqueles que tiveram doença grave em que a oxigenoterapia convencional não foi suficiente para atender à demanda de oxigênio, desde de que esses pacientes em algum momento tenham recebido alta, portanto, tendo se recuperado completamente dos sintomas. Os pacientes que foram internados com doença grave que não resistiram aos sintomas sendo levados a óbito, foram considerados internamento com desfecho óbito.

Os valores da carga viral foram analisados de acordo com o desfecho clínico da doença: sem internação (85,8%; 139/162; média de carga viral, 4,88 Log₁₀); internação com desfecho de alta (6,8%; 11/162; média de carga viral, 3,62 Log₁₀); e internação com desfecho de óbito (7,4%; 12/162; média de carga viral, 5,56 Log₁₀), como mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Frequência dos grupos de desfecho clínico.

Fonte: O Autor

5.3.1 Teste de Kruskal-Wallis

Um teste de Kruskal-Wallis foi feito para determinar se havia relação entre os valores de carga viral com o desfecho clínico, o teste demonstrou que há um valor estatisticamente significativo de relação entre as duas variáveis ($H(3)=8,651$; $p=0,013$), como mostrado na tabela 5. Utilizando a comparação por método de Pairwise foi possível determinar em quais grupos havia uma diferença significativa da carga viral. Na tabela 4 os dois pares com valores de $p<0,05$ foram aqueles que demonstraram diferença significativa em suas cargas virais, esses grupos são: internação com desfecho de alta e sem internação e internação com desfecho de alta e internação com desfecho de óbito.

Como mostrado pelo método de Pairwise (tabela 6) a maior discrepância nos valores de carga viral foi no grupo de internação com desfecho de alta, pois este grupo teve discrepância tanto com o grupo sem internação, quanto com o grupo de internação com desfecho de óbito. O resultado encontrado é semelhante ao relatado em Faico-Filho (2020), onde a carga viral foi relacionada ao desfecho clínico. “Notavelmente, a distribuição da carga viral SARS-CoV-2 de acordo com os valores

da CT das amostras iniciais seguiu uma curva V neste estudo, com pacientes levemente afetados e gravemente doentes com cargas virais mais elevadas do que os hospitalizados com melhor desfecho.” (FAÍCO-FILHO, 2020). Ou seja, aqueles pacientes que foram internados, mas tiveram um bom desfecho clínico (alta), tiveram uma carga viral significativamente menor que em casos de doença leve e óbito.

Tabela 5 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis.

Estatísticas de teste	
	Número de Cópias em 5 uL
H de Kruskal-Wallis	8,651
df	2
Significância Sig.	,013

Fonte: O Autor

Tabela 6 - Comparações entre os grupos de desfecho clínico pelo método de Pairwise.

Comparações por Método Pairwise de Desfecho Clínico

Sample 1-Sample 2	Estatística de teste	Erro Padrão	Estatística de Teste Padrão	Sig.
Internação com desfecho de alta-Sem Internação	32,177	14,693	2,190	,029
Internação com desfecho de alta-Internação com desfecho de óbito	-57,447	19,581	-2,934	,003
Sem Internação-Internação com desfecho de óbito	-25,270	14,114	-1,790	,073

Cada linha testa a hipótese nula em que as distribuições Amostra 1 e Amostra 2 são iguais.

As significâncias assintóticas (teste de dois lados) são exibidas. O nível de significância é ,050.

Fonte: O Autor

A diferença de carga viral entre esses grupos pode estar relacionada ao tempo de coleta depois do início dos sintomas e ao derramamento viral. Os valores de alta carga viral em pacientes sem internação (doença leve) se deve ao fato de que a maioria dos casos foi testado em um estágio muito precoce da doença, geralmente até o quinto dia de sintomas, quando a replicação viral é muito alta. Já nos casos graves, a maioria dos pacientes se apresenta ao pronto-socorro durante um período posterior da doença, em torno do nono dia, devido ao aparecimento dos sintomas

mais graves. Consequentemente os pacientes com internamento foram testados em uma fase mais tardia do ciclo viral, por isso, os casos mais leves podem apresentar uma carga viral mais alta do que os pacientes internados com bom desfecho clínico.

Em Cevik et al. (2020) é mencionado que alguns estudos relataram cargas virais semelhantes no início da infecção entre pacientes com casos leves e casos graves, entretanto, “a diferença encontrada na maioria dos estudos demonstrou uma liberação viral mais rápida em indivíduos assintomáticos, como também visto no MERS-CoV, sugerindo um período infeccioso mais curto, mas com potencial de transmissibilidade semelhante no início da infecção.”

Dados da literatura indicam que o derramamento viral, tanto nos casos mais leves (sem internação), quanto nos casos com bom desfecho clínico, tem um derramamento mais rápido, diferentemente dos casos mais graves com desfecho ao óbito onde é detectado uma alta carga viral mesmo que tenham sido coletados em um momento mais tardio da infecção, porque, nesses casos ocorre um derramamento viral muito mais lento o que mantém a carga viral alta por muito tempo, como mencionado em Cevik et al. (2020). Sendo assim, por terem sido coletados mais tardiamente que os pacientes sem internação, seria esperado que todos os pacientes internados tivessem carga viral mais baixa, entretanto, como os pacientes que tiveram o desfecho de óbito tem um derramamento viral lento, eles mantêm uma carga viral elevada em estágios tardios da doença.

5.3.2 Regressão Logística

Um modelo de regressão logística binária foi realizado para analisar se a carga viral é preditora da taxa de internamento dos pacientes. O modelo com a carga viral como variável preditiva da taxa de internamento não foi estatisticamente significativo ($X^2(1)=0,628$; $p = 0,428$; R^2 Nagelkerke=0,007). A carga viral não foi um preditor significativo (OR=0,88; IC 95%=0,649-1,199). Os valores estatísticos são mostrados na tabela 7. Como discutido anteriormente os valores de carga viral nos casos leves são mais altos do que nos casos de internação com desfecho de alta e são semelhantes aos de internação com desfecho de óbito, já que o período de coleta das amostras, em geral, não é o mesmo, portanto, para ter uma análise mais eficiente da relação da carga viral entre os pacientes sem internação e os que foram

internados independentemente do desfecho, seria necessário padronizar a data da coleta das amostras em relação ao início dos sintomas.

Tabela 7 - Estatísticas do modelo de regressão logística da taxa de internamento.

Regressão Logística									
		Qui-quadrado	df	Sig.					
Etapa		,628	1	,428					

Resumo do modelo			
Etapa	Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke
1	131,736	,004	,007

Variáveis na equação									
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	OR	95% C.I. para EXP(B)		
							Inferior	Superior	
Número de Cópias em 5 uL	-,125	,157	,637	1	,425	,882	,649	1,199	

Fonte: O Autor

Foi realizado um modelo de regressão logística binária com o objetivo de analisar se os pacientes que dão entrada no hospital para internamento podem ter a carga viral utilizada como prognóstico para a taxa de mortalidade. O modelo resultante, contendo a carga viral como variável preditiva, levando em conta apenas os casos de internamento foi estatisticamente significativo ($X^2(1)=6,742$; $p=0,009$; R^2 Nagelkerke=0,339). A carga viral foi um preditor significativo, onde os pacientes com carga viral elevada tem quase 2 vezes mais chances de chegarem ao óbito do que aqueles com carga viral baixa (OR=1,935; IC 95%=1,099-3,406). A tabela 8 mostra os valores estatísticos da regressão logística da taxa de mortalidade.

Em Magleby et al. (2020) foi feito um estudo para analisar se os valores de carga viral eram um bom prognóstico para taxas de mortalidade e de intubação, com a diferença de que foi usado o valor do CT e não da carga viral absoluta, ainda assim, os resultados são semelhantes. “Neste estudo, demonstramos que os pacientes que deram entrada no hospital com altas cargas virais SARS-CoV-2, avaliados pelos valores de CT, tiveram maior probabilidade de serem intubados ou morrerem durante a internação.” (MAGLEBY et al., 2020).

Tabela 8 - Estatísticas do modelo de regressão logística da taxa de mortalidade.

Regressão Logística								
	Qui-quadrado	df	Sig.					
	6,742	1	,009					

Resumo do modelo		
Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke
25,099 ^a	,254	,339

Variáveis na equação								
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	OR	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Carga Viral	,660	,288	5,237	1	,022	1,935	1,099	3,406

Fonte: O Autor

Eles também utilizaram apenas pacientes que deram entrada no hospital, ou seja, sem casos de doença leve ou assintomáticos, pois interferem bastante na significância estatística dos testes. Se excluirmos da análise esses pacientes a carga viral pode ser um bom prognóstico do desfecho clínico, como conclui Magleby et al. “Relatar a carga viral de SARS-CoV-2 com base nos valores de CT a partir de amostras de swab de NP de admissão poderia, portanto, ajudar a identificar pacientes que estão em maior risco de desfechos adversos e que, portanto, podem se beneficiar de um monitoramento mais intensivo.”

5.4 Relação entre carga viral e sintomas

Os sintomas foram definidos como: febre; coriza (congestão nasal); tosse seca; espirros; cefaléia; dispnéia (qualquer tipo de dificuldade respiratória); diarreia; náuseas (vômitos); dor no corpo (dor nas costas, dor no peito, dor abdominal, dor no estômago e outras); astenia (fraqueza, tontura, mal estar, e sonolência); anosmia e ageusia (dificuldades de alimentação); mialgia e artralgia; dor de garganta; dessaturação de oxigênio (menor que 96%); insuficiência renal; insuficiência respiratória (IRA - Insuficiência Respiratória Aguda e SARA - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda); problemas pulmonares (fibrose pulmonar e tromboembolismo pulmonar); e problemas cardíacos (fibrilação atrial de alta resposta ventricular,

insuficiência cardíaca congestiva, entre outros). A tabela 8 mostra a frequência de cada um dos sintomas. Na tabela 9 é mostrado um resumo da frequência de cada sintoma.

Tabela 9 - Relação entre a frequência dos sintomas e o desfecho clínico.

Sintomas/Desfecho clínico		Desfecho Clínico			Total
		Sem Internação	Internação com desfecho de alta	Internação com desfecho de óbito	
Sintomas	Paciente Assintomático	16	0	0	16
	Febre	51	7	9	67
	Coriza	48	3	3	54
	Tosse Seca	73	9	10	92
	Espirros	4	0	0	4
	Cefaléia	61	3	3	67
	Dispnéia	24	10	11	45
	Diarréia	21	3	1	25
	Náuseas	13	6	2	21
	Dor no Corpo	23	4	4	31
	Astenia	29	9	8	46
	Anosmia e Ageusia	41	6	6	53
	Mialgia e Atralgia	37	5	5	47
	Dor de Garganta	22	2	2	26
	Dessaturação de O ₂	6	9	12	27
	Insuficiência Renal	0	4	10	14
	Insuficiência Respiratória	0	4	10	14
	Problemas Pulmonares	0	1	2	3
	Problemas Cardíacos	0	1	6	7

Fonte: O Autor

“O espectro clínico do COVID-19 varia de formas assintomáticas ou levemente sintomáticas a doenças clínicas caracterizadas por insuficiência respiratória aguda que requer ventilação mecânica, choque séptico e falência múltipla de órgãos.” (CASCELLA et al., 2021). Portanto, para facilitar a observação dos dados foi feita uma relação entre os sintomas e o desfecho dos pacientes.

Os sintomas leves aparecem com uma frequência muito maior nos pacientes sem internação, os únicos sintomas que aparecem somente nos casos de internamento foram: insuficiência renal, insuficiência respiratória, problemas pulmonares e problemas cardíacos. Esses sintomas foram considerados como

sintomas graves, já que ocorreram apenas nos casos de internamento. 16 pacientes foram assintomáticos.

5.4.1 Teste U de Mann-Whitney

O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para testar a relação desses sintomas com a carga viral. Primeiro foi utilizado para definir a relação entre os pacientes assintomáticos e a carga viral. Os 16 pacientes assintomáticos tiveram média de carga viral de $4,15 \log_{10}$, a média dos 146 pacientes sintomáticos foi de $4,92 \log_{10}$. A média de carga viral dos pacientes sintomáticos foi maior que dos pacientes assintomáticos, porém, utilizando o teste U de Mann-Whitney a diferença não foi estatisticamente significativa ($U=954,5$; $p = 0,231$), como mostrado na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do teste U de Mann-Whitney para pacientes assintomáticos.

Estatísticas de teste	
	Número de Cópias em 5 uL
U de Mann-Whitney	954,500
Significância Sig. (2 extremidades)	,231

Fonte: O Autor

Depois foi feito um teste para medir as diferenças de carga viral entre os sintomas considerados leves e graves. A média de carga viral entre os pacientes com sintomas considerados leves foi de $4,96 \log_{10}$, a média dos pacientes com sintomas considerados graves foi de $4,63 \log_{10}$. A média de carga viral dos pacientes que tinham sintomas leves foi maior que dos pacientes com sintomas de graves, porém, utilizando o teste U de Mann-Whitney a diferença não foi estatisticamente significativa ($U=938$; $p = 0,774$), como mostrado na tabela 11.

Tabela 11 - Resultados do teste U de Mann-Whitney para sintomas leves e sintomas graves.

Estatísticas de teste	
	Carga Viral
U de Mann-Whitney	938,000
Wilcoxon W	1058,000
Z	-,287
Significância Sig. (2 extremidades)	,774

Fonte: O Autor

Assim como citado anteriormente, Cevik et al. (2020) explica que não há uma diferença significativa de carga viral entre os casos leves e graves no início dos sintomas apenas no tempo de derramamento viral. Portanto, como as amostras com sintomas leves ainda estão no seu pico de replicação e não começaram seu derramamento viral, a análise estatística não consegue encontrar um valor significativo entre os grupos de pacientes assintomáticos.

5.4.2 Regressão Logística

Um modelo de regressão logística foi realizado utilizando como variáveis preditoras da taxa de mortalidade a carga viral e os sintomas para comparar se o modelo com as duas variáveis é melhor que o modelo considerando apenas a carga viral. Assim como o modelo anterior, este analisou apenas os pacientes que deram entrada no hospital para internamento.

O modelo contendo a carga viral e os sintomas como variáveis preditivas considerando apenas os casos de internamento foi estatisticamente significativo ($\chi^2(2)=20,558$; $p<0,001$; R^2 Nagelkerke=0,788). Na tabela 12, onde está o título regressão logística, temos 2 linhas a segunda linha são os valores de significância do modelo em geral, a primeira linha mostra os valores de significância do bloco com sintomas comparado com o bloco que relacionava apenas a carga viral, ou seja, como o valor da comparação entre o bloco com os sintomas teve um $p<0,001$ em relação ao bloco que continha apenas a carga viral como preditora, o modelo que tem a carga viral e os sintomas como variáveis preditoras do desfecho clínico é estatisticamente mais significativo. A carga viral combinada com os sintomas foi um preditor significativo, os pacientes com carga viral elevada e sintomas graves têm 5

vezes mais chances de chegarem ao óbito do que aqueles com carga viral baixa e sintomas leves (OR=5,250; IC 95%=0,934-29,508). A tabela 12 mostra os valores estatísticos da regressão logística da taxa de mortalidade.

Tabela 12 - Estatísticas do modelo de regressão logística da taxa de mortalidade com duas variáveis preditoras.

Regressão Logística								
		Qui-quadrado	df	Sig.				
Bloco		13,815	1	<,001				
Modelo		20,558	2	<,001				

Resumo do modelo			
Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke	
11,284	,591	,788	

Variáveis na equação								
B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)		
						Inferior	Superior	
1,658	,881	3,543	1	,060	5,250	,934	29,508	

Fonte: O Autor

Em Magleby et al. (2020) eles consideraram outros fatores que interferem nas taxas de mortalidade e não apenas a carga viral como a idade e as comorbidades. “Essa associação persistiu mesmo quando ajustados para idade, comorbidades, apresentando sintomas, achados de radiografia torácica e grau de apresentação de hipóxia.” (MAGLEBY et al., 2020). Assim como neste trabalho, os modelos que têm mais de uma variável preditiva mantém sua significância estatística, em alguns casos como na relação entre a carga viral e os sintomas pode aumentar a eficiência do modelo.

“A estimativa atual da OMS da taxa global de letalidade por casos para COVID-19 é de 2,2%. No entanto, a taxa de letalidade do caso é afetada por fatores como idade, condições pré-existentes subjacentes e gravidade da doença.” (CASCELLA et al., 2021). Portanto, um modelo eficiente de previsão que englobe esses outros fatores que interferem nas taxas de mortalidade dos pacientes pode ser um preditor ainda melhor da carga viral. “A identificação de marcadores precoces,

idealmente obtidos na admissão, capazes de prever insuficiência respiratória, é essencial para enfrentar o SARS-CoV-2 em uma situação pandêmica, onde as instalações de suporte respiratório podem estar à beira de serem sobrecarregadas.” (DE LA CALLE et al., 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qRT-PCR é uma técnica amplamente utilizada na investigação biológica devido à capacidade de amplificação e detecção simultâneas de quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos. No diagnóstico clínico e molecular qRT-PCR pode ser utilizada para avaliação da carga viral qualitativa e quantitativamente.

Neste estudo, tanto os valores de Ct quanto da carga viral foram considerados altos de acordo com os critérios de carga viral elevada (Ct <25), carga viral intermediária (Ct: 25-30) e carga viral baixa (Ct > 30).

Em comparação aos pacientes que precisaram de internamento e tiveram alta, os pacientes que ficaram internados e vieram a óbito apresentaram maior carga viral nas amostras nasofaríngeas. Esses achados sugerem que a carga viral pode ser utilizada como prognóstico da taxa de mortalidade para os pacientes na admissão hospitalar. A combinação da carga viral com algumas informações clínicas convencionais, como idade, comorbidades e sintomas, pode ser um modelo para as condições dos pacientes COVID-19.

Para os sintomas não foram encontrados dados estatisticamente significantes da relação com a carga viral, porém, considerando que quando analisados apenas a relação dos sintomas nos casos de internamento como feito na regressão logística, mais dados com os pacientes que precisam de internamento são necessários para uma melhor análise dessa relação.

Esses achados fornecem a base para iniciar novos estudos sobre a carga viral e sua relação com os sintomas e o desfecho clínico, assim como, o uso da carga viral como prognóstico para os casos de óbitos dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Levando-se em conta que esses indicadores têm ampla gama de aplicações clínicas, a confirmação dessas análises ajudará muito a prevenir e controlar a pandemia da SARS-CoV-2.

7 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO

Este estudo apresentou várias limitações. Em primeiro lugar, trata-se de um estudo de amostras de um único centro e incluiu apenas pacientes do mesmo período da pandemia; portanto, as taxas de mortalidade e internamento podem variar na situação atual da pandemia. Em segundo lugar, as amostras nasofaríngeas têm a qualidade determinada pela capacidade de coleta da amostra e podem não refletir adequadamente a carga viral do tecido pulmonar. Em terceiro lugar, o número de amostras de internamento foi consideravelmente menor que o de pacientes que não precisaram de internação, essa diferença pode ter interferido nos resultados. “Embora as diferenças entre as réplicas biológicas possam ser grandes, números suficientes podem permitir que diferenças experimentais menores sejam discernidas. (...). Muitos fatores contribuem para a variação experimental e influenciam o número de réplicas biológicas necessárias para alcançar um determinado poder estatístico.” (BUSTIN et al., 2009). Sendo assim, um modelo estatístico com um número maior de pacientes internados poderia ter resultados mais adequados.

Quase todos os pacientes incluídos no estudo receberam uma série de tratamentos, o que pode ter modificado a dinâmica de carga viral. “Atualmente, uma variedade de opções terapêuticas estão disponíveis que incluem drogas antivirais (...), anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 (...), anti-inflamatórios (...), imunomoduladores (...) estão disponíveis sob autorização de uso de emergência emitida pela FDA (EUA) ou sendo avaliados na gestão do COVID-19.” (CASCELLA et al., 2021). Um exemplo da relação entre o tratamento recebido e a carga viral é Zheng et al. (2020) que verificou que a duração do tratamento com glicocorticóides foi positivamente correlacionada com a duração viral em pacientes com doença grave. Uma relação parecida que deve ser considerada é que durante o período de separação das amostras a vacinação para a COVID-19 estava em andamento, sendo assim, alguns pacientes avaliados no estudo tinham tomado a primeira dose da vacina, ou até mesmo as duas doses. A vacina pode interferir na quantidade de carga viral já que o sistema imune combate o vírus com maior eficiência. “A vacinação desencadeia o sistema imunológico levando à produção de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2. De acordo com o Painel coronavírus da OMS (COVID-19), mais de 2,4 bilhões de doses de vacinas foram administradas até 22 de junho de 2021,

com aproximadamente 22% da população mundial recebendo pelo menos uma dose da vacina.” (CASCELLA et al., 2021).

O período de testagem das amostras depois do início dos sintomas não foi padronizado. “A duração dos sintomas antes do teste pode ser uma variável importante.” (FAÍCO-FILHO, 2020). Além disso, foi avaliada apenas a carga viral de uma única amostra de swab nasofaríngeo por paciente e não foi possível avaliar a dinâmica da carga viral ao longo do tempo ou a carga infecciosa no momento do início da infecção.

Como já abordado anteriormente, o estudo focou apenas em aspectos virológicos e não foi incluído os efeitos de comorbidades, idade, data de internação e coleta das amostras. Outra limitação é que o estudo foi retrospectivo e contou com dados que foram documentados no prontuário eletrônico, portanto, poderiam ter características ou desfechos mal classificados do paciente.

REFERÊNCIAS

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

CASCELLA, Marco et al. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **StatPearls**, 2021.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. In: Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. Disponível em: [Real-time RT-PCR Primers and Probes for COVID-19 | CDC](#). Acesso em: 04 abril. 2022.

CEVIK, Muge et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. **The lancet microbe**, 2020.

CHAN, J. F. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging microbes**, 2020.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos et al. Nota Técnica-Metodologia para concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares. **Agência Nacional de Águas (ANA)**, p. 1-14, 2021.

DE FREITAS, Netto, Felício et al. SARS-COV-2 e a COVID-19. 2020

DE LA CALLE, Cristina et al. Impact of viral load at admission on the development of respiratory failure in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 6, p. 1209-1216, 2021.

DE SOUSA, Fabiana Cristina Belchior et al. Protocolos utilizados para diagnóstico de COVID-19. **Revista da FAESF**, v. 4, 2020.

FAÍCO-FILHO, Klinger Soares; PASSARELLI, Victor Cabelho; BELLEI, Nancy. Is higher viral load in SARS-CoV-2 associated with death?. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 103, n. 5, p. 2019, 2020.

HUNG, I. F. N. et al. Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 1550, 2004.

JONES, Terry C. et al. An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age. **MedRxiv**, 2020.

MAGLEBY, Reed et al. Impact of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. **Clin Infect Dis**, p. 851, 2020.

NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área

médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.

PUJADAS, Elisabet et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. **The Lancet. Respiratory medicine**, v. 8, n. 9, p. e70, 2020.

SHI, Fengjuan et al. Association of viral load with serum biomarkers among COVID-19 cases. **Virology**, v. 546, p. 122-126, 2020.

WHO, World Health Organization. In: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: [WHO Coronavirus \(COVID-19\) Dashboard | WHO Coronavirus \(COVID-19\) Dashboard With Vaccination Data](#). Acesso em: 07 mar. 2022.

WIERSINGA, W. Joost et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. **Jama**, v. 324, n. 8, p. 782-793, 2020.

ZHENG, Shufa et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. **bmj**, v. 369, 2020.