

Carga viral absoluta de SARS-CoV-2 e sua relação com o desfecho clínico em pacientes infectados

Absolute viral load of SARS-CoV-2 and its relationship with clinical outcome in infected patients

DOI:10.34117/bjdv9n3-130

Recebimento dos originais: 17/02/2023

Aceitação para publicação: 15/03/2023

Jessica Sabrina Canedo da Silva Sumensse

Graduada em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)

Endereço: Avenida Tarquinio Joslin dos Santos, 1000, Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil,

CEP: 85870-901

E-mail: jscds.sumensse.2016@aluno.unila.edu.br

Rafael dos Santos da Silva

Graduado em Biomedicina

Instituição: Hospital Municipal Padre Germano Lauck (HMPGL)

Endereço: Rua Adoniran Barbosa, 370, Parque Monjolo, Foz do Iguaçu,

Paraná – Brasil, CEP: 85864-380

E-mail: biomedico06@gmail.com

Maria Leandra Terencio

Doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Instituição: Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)

Endereço: Avenida Tarquinio Joslin dos Santos, 1000, Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil,

CEP: 85870-901

E-mail: maria.terencio@unila.edu.br

RESUMO

Considerando a premissa de que a carga viral está relacionada a uma maior letalidade, realizamos um estudo retrospectivo com 188 pacientes com COVID-19 assistidos no Hospital Municipal Padre Germano Lauck (HMPGL), em Foz do Iguaçu-Brasil no período de julho a novembro de 2021. Neste estudo foi avaliado a relação da carga viral absoluta de SARS-CoV-2 com o desfecho clínico dos pacientes. Por meio da técnica de RT-qPCR, as cargas virais absoluta de amostras nasofaríngeas foram obtidas através da construção de uma curva padrão utilizando o oligo sintético comercial 2019-nCoV_N (IDT kit) como padrão. As reações foram realizadas segundo o protocolo disponibilizado pelo CDC/EUA tendo como alvo a sequência viral N1 do gene da nucleoproteína SARS-CoV-2 e o gene P da ribonuclease humana como controle endógeno. Os resultados apontaram uma carga viral média de 4,84 Log₁₀ e uma associação significativa de alta carga viral ao maior risco de óbito. Desta forma, a carga viral de SARS-CoV-2 na admissão foi independentemente associada à mortalidade entre os pacientes hospitalizados com COVID-19. A ampliação de pesquisas desta ordem poderá confirmar a utilização da carga viral como ferramenta prognóstica no manejo clínico de pacientes graves decorrentes de infecções virais de importância clínica.

Palavras-chave: carga viral, Sars-CoV-2, qRT-PCR, quantificação absoluta.

ABSTRACT

Considering the hypothesis that viral load is related to higher lethality, we performed a retrospective study with 188 patients with COVID-19 assistance at the Padre Germano Lauck municipal hospital, in Foz do Iguaçu, Brazil, from July to November 2021. This study evaluated the relationship between the absolute viral load of SARS-CoV-2 and the clinical diagnosis of patients. Using the RT-qPCR technique, nasopharyngeal demonstration of absolute viral loads was initiated by constructing a standard curve using the commercial synthetic oligo 2019-nCoV_N (IDT kit) as a standard. The reactions were performed according to the protocol provided by the CDC/USA, targeting the N1 viral sequence of the SARS-CoV-2 nucleoprotein gene and the human ribonuclease P gene as an endogenous control. The results showed an average viral load of 4.84 Log₁₀ and a significant association between a high viral load and a higher risk of death. Thus, SARS-CoV-2 viral load on admission was independently associated with mortality among patients hospitalized with COVID-19. The extension of research of this order may confirm the use of the viral load as a prognostic tool in the clinical management of critically ill patients with clinically important viral dependence.

Keywords: viral load, SARS-CoV-2, qRT-PCR, absolute quantification.

1 INTRODUÇÃO

O vírus 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 (DE FREITAS et al 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 este, o terceiro país com maior número de casos confirmados e o segundo maior em mortes, segundo o site oficial da OMS (WHO, 2022).

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 (MAGLEBY et al. 2020).

A detecção de SARS-CoV-2 pelo ensaio de transcrição reversa-PCR (RT-qPCR) em amostras de swab nasofaríngeo é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19. Nesse contexto, um fator pouco abordado em estudos é a relação da carga viral absoluta durante a admissão dos pacientes e o desfecho clínico dos mesmos

(NASCIMENTO et al 2010). A quantificação absoluta baseia-se na comparação da carga viral das amostras com um padrão cujo número de moléculas é conhecido. A partir disso se constrói uma curva padrão para determinar a quantidade absoluta de carga viral dos pacientes.

Com base na hipótese de que a carga viral de SARS-CoV-2 durante a admissão hospitalar poderia atuar como um biomarcador de gravidade e letalidade, esse trabalho teve como objetivo investigar a possível existência de relação significativa entre a carga viral absoluta e o desfecho clínico de pacientes diagnosticados com covid-19 por qRT-PCR, assistidos no hospital municipal Padre Germano Lauck em Foz do Iguaçu, Brasil, no período de julho a novembro de 2021.

2 MÉTODOS

2.1 CENÁRIO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Neste estudo virológico quantitativo foram avaliadas 188 amostras de pacientes com COVID-19 detectados entre julho e novembro de 2021 no Laboratório de Biologia Molecular UNILA/HMPGL localizado no Hospital Municipal Padre Germano Lauck em Foz do Iguaçu, inserido na rede de estabelecimentos de saúde vinculados ao SUS. As amostras para análise chegaram ao laboratório em tubo falcon contendo 3ml de meio VTM, que foram armazenados em geladeira (8C°), até o processamento das amostras.

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.

2.2 EXTRAÇÃO DO RNA

Foram utilizados 100 µL da amostra para extração de RNA usando o Kit Extracta Fast-RNA Viral (MVXA-P096 FAST Locus) em extrator automatizado Extracta 96 (Locus), com capacidade para extração de 96 amostras simultâneas. O sistema automatizado realiza o processo de extração e purificação por meio de beads magnéticas. Ao final do processo o RNA é recuperado em uma solução de eluição com volume final de 60 µL. O RNA purificado foi armazenado a -80 C até o momento da detecção.

2.3 DETECÇÃO DE SARS-COV-2

A detecção viral foi realizada usando o Kit Biomol OneStep/COVID-19 (IBMP) de acordo com as especificações do fabricante que 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.

2.4 MÉTODO DE ANÁLISE DA CARGA VIRAL

A quantificação baseou-se em uma preparação de uma curva padrão contendo diluições conhecidas da amostra padrão 2019-nCoV_N (marca IDT) que já vem ressuspenso em tubo contendo 250 μL (200.000 cópias/ μL) 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/ μL (6 \log_{10}), em triplicata como especificado pelo fabricante. O ponto 2 foi de 20.000 cópias/ μL (5 \log_{10}), o ponto 3 de 2.000 cópias/ μL (4 \log_{10}), o ponto 4 de 200 cópias/ μL (3 \log_{10}) e o ponto 5 de 20 cópias/ μL (2 \log_{10}). Para as reações de PCR foram utilizados 5 μL 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.

2.5 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

Conforme seu desfecho clínico as amostras foram classificadas em três grupos: 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. 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%). 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).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 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. 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.

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 descrito por CHERNICHARO, 2021.

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

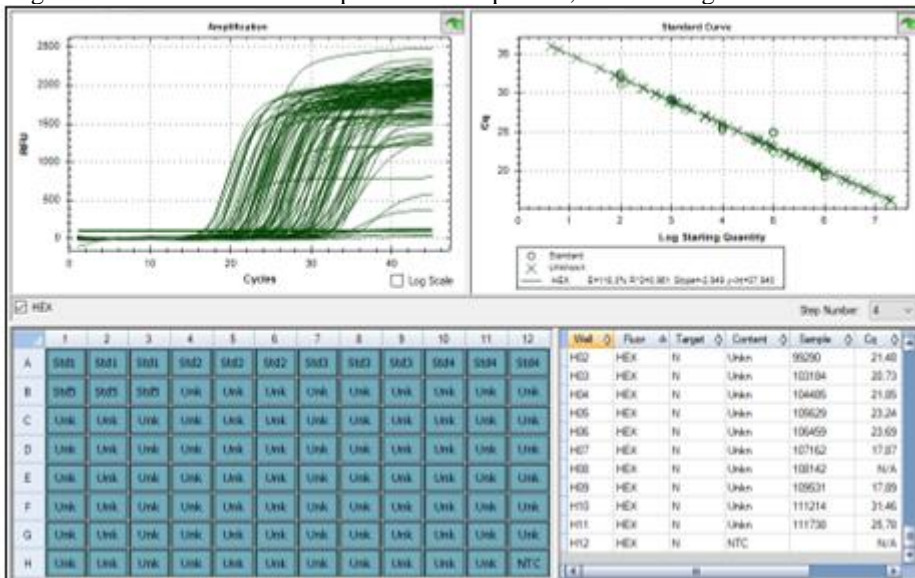


Figura 2 - Placa 2 contendo os padrões em triplicada, controle negativo e 79 amostras

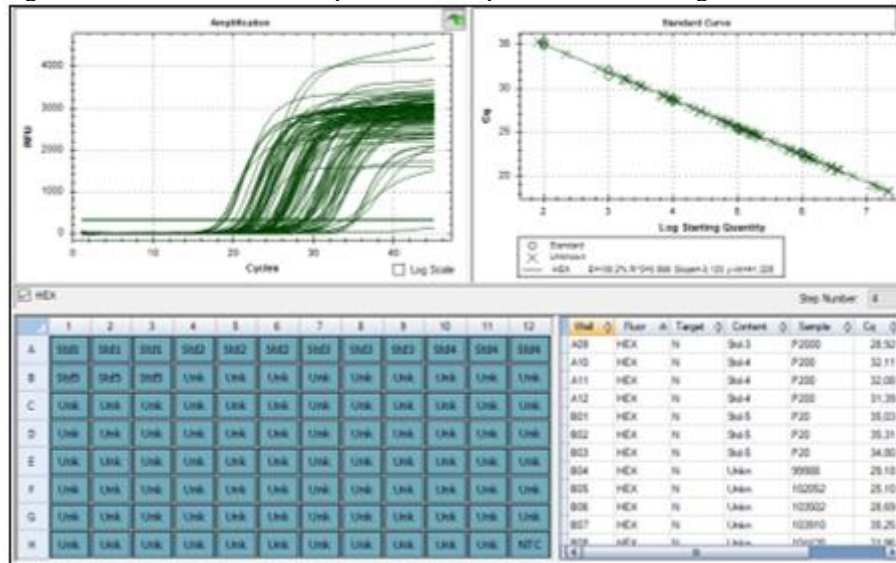
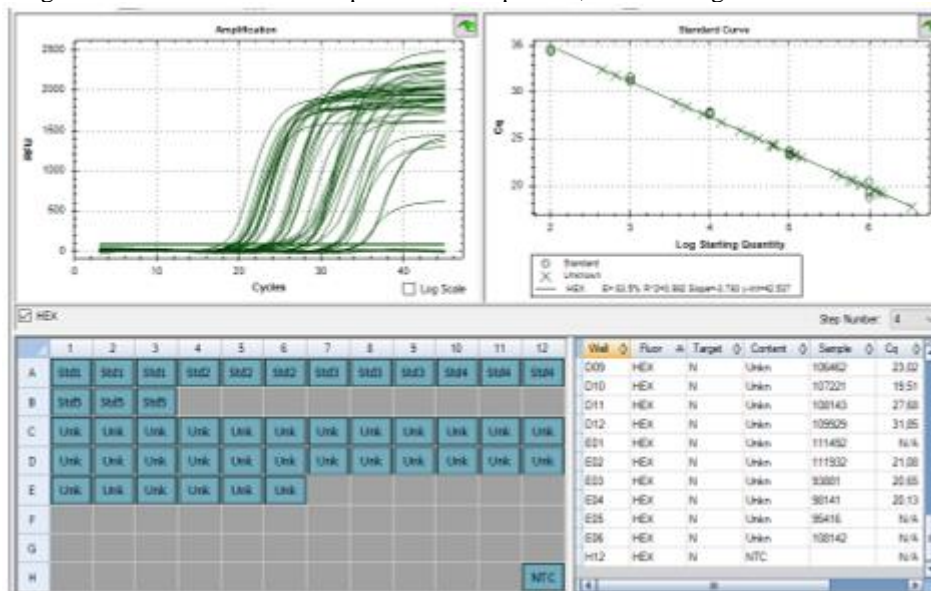


Figura 3 - Placa 3 contendo os padrões em triplicada, controle negativo e 30 amostras.



Ensaios 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 1 mostra a eficiência de amplificação de todas as placas.

Tabela 1 – 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

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 $-3,120$ e da terceira placa foi $3,793$.

Correlation Coefficient (R²) mede o ajuste dos dados à curva padrão. O valor R² reflete a linearidade da curva padrão. Idealmente, R² = 1, embora 0,999 seja geralmente o valor máximo. Neste estudo, o R² da primeira placa foi 0,962, da segunda placa foi 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.

3.2 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 (CHERNICHARO et al., 2021).

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.

Existem vários fatores que interferem na gravidade dos pacientes com COVID-19, por exemplo, a idade e as comorbidades dos pacientes. 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 ao seu 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.

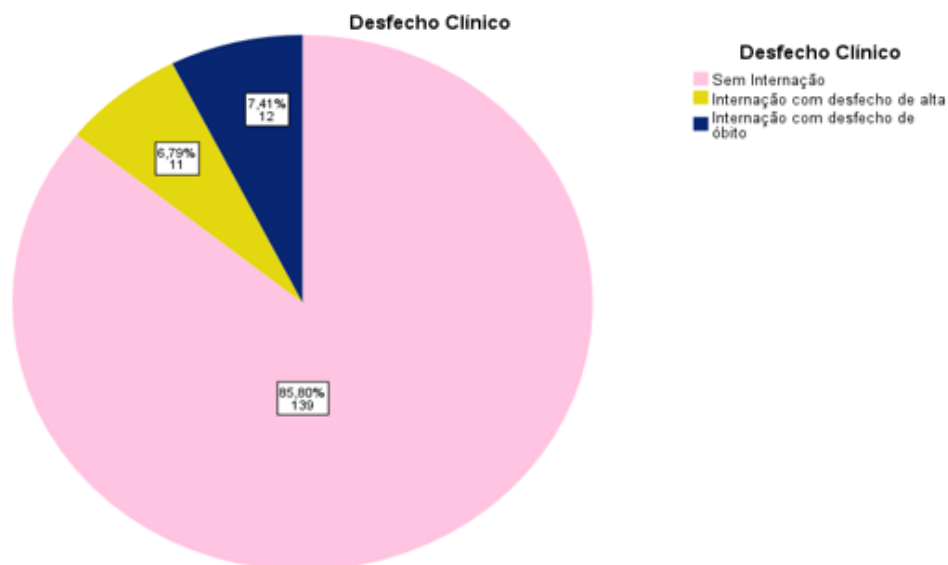
3.3 RELAÇÃO ENTRE CARGA VIRAL E DESFECHO CLÍNICO

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, e portanto, conseguiram se recuperar sem intervenção hospitalar (CASCELLA et al., 2021). 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, 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 (CASCELLA et al., 2021). 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.



3.4 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 abaixo na tabela 2.

Tabela 2 - 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

Utilizando a comparação por método de Pairwise foi possível determinar em quais grupos havia uma diferença significativa da carga viral. Na tabela 3 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.

Tabela 3 - 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.

Um resultado semelhante foi encontrado, a distribuição da carga viral SARS-CoV-2 de acordo com os valores da CT das amostras iniciais seguiu uma curva V, com pacientes levemente afetados e gravemente doentes com cargas virais mais elevadas do que os hospitalizados com melhor desfecho [8]. 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 (FAÍCO-FILHO et al., 2020).

Como mostrado pelo método de Pairwise 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.

A diferença de carga viral entre esses grupos está 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 aqueles 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 viral 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 (CEVIK et al., 2020; DE LA CALLE et al., 2021). 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.

3.5 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 4.

Tabela 4 – 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

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.

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 5 mostra os valores estatísticos da regressão logística da taxa de mortalidade.

Tabela 5 – 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

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

4 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 a qRT-PCR pode ser utilizada para avaliação da carga viral qualitativa e quantitativamente.

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.

Esses achados fornecem a base para iniciar novos estudos sobre a carga viral e sua relação com 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.

4.1 LIMITAÇÕES DE 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. Um exemplo da relação entre o tratamento recebido e a carga viral é Zheng et al. que verificou que a duração do tratamento com glicocorticóides foi positivamente correlacionada com a duração viral em pacientes com doença grave (ZHENG et al., 2020). 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 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 et al., 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.

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.

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.

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.

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.