

PERSISTÊNCIA DO SARS-CoV-2 NO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR DE PACIENTES COM COVID-19

Vitória Belucci Frachinconi (PIBIC/FA/UEM), Dennis Armando Bertolini (Orientador),
e-mail: ra123894@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas. Subárea: Virologia.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, qRT-PCR, carga viral.

Resumo:

Este estudo teve como objetivo verificar se o SARS-CoV-2 permanece presente no trato respiratório superior de pacientes com COVID-19 internados no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM), após o período de viremia. Foram obtidas amostras de swab nasofaríngeo de 50 pacientes internados no HUM, para execução do teste molecular de qRT-PCR. Com isso, foi verificada a persistência do SARS-CoV-2 no trato respiratório superior desses pacientes. O tempo médio da durabilidade do RNA viral nas amostras foi de 12,0 (IQR, 4,00) dias, tempo elevado ao instruído para realização do teste molecular (7 dias) e de isolamento (10 dias). Entretanto, não podemos comprovar o potencial infectante e a viabilidade da partícula viral, mas serve como alerta e revisão das medidas de manejo clínico, e, também, na instrução do tempo em que os pacientes com COVID-19 devem ficar em isolamento.

Introdução

Desde a notificação do surgimento do SARS-CoV-2 até o momento, mais de 588 milhões de casos foram confirmados e aproximadamente 57 milhões de óbitos em todo mundo (WHO, 2022).

O causador da COVID-19 é um vírus da família *Coronaviridae*, cujo gênero é o *Betacoronavírus*. O contágio deste vírus pode ocorrer de forma sintomática ou assintomática. Em sua forma sintomática, o COVID-19 manifesta sintomas não específicos, como tosse, coriza, febre e náusea ou vômito (BRASIL, 2021).

Com isso, sabe-se que o tempo de incubação, segundo a literatura, é o fator mais importante para contenção da transmissão viral (CIMOLAI, 2021). O presente vírus possui um período médio de incubação de 5 a 6 dias. À vista disso, no Brasil é recomendado pelo Ministério da Saúde o isolamento de 10 dias perante a ausência de sintomas e uso de antitérmicos.

No trabalho de Li *et al.* (2020) foram demonstrados que, mesmo realizando a coleta do trato respiratório durante, em média, 53,5 dias após o início dos sintomas, ainda sim havia presença do material genético viral do SARS-CoV-2. Porém, como a técnica utilizada foi a de qRT-PCR e não a de cultura viral, não há como afirmar que esses materiais genéticos apresentam capacidade de infecção.

Sendo assim, o presente estudo tem como finalidade observar a persistência do SARS-CoV-2 no trato respiratório superior de pacientes portadores do patógeno, assim como analisar as cargas virais ainda detectáveis nos indivíduos.

Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo com obtenção de amostras de conveniência, sendo todas as informações epidemiológicas e clínicas retiradas do prontuário do Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM), da Universidade Estadual de Maringá. Os participantes selecionados foram convidados para participar da pesquisa após a concordância e assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da UEM (Parecer nº 4.634.043).

Posterior a isto, foi analisado a possível associação entre tempo de sintomas e as seguintes variáveis: saturação de O₂ (%), hematócrito (%), níveis de hemoglobina (g/dL), linfócitos (células/mm³), contagem de leucócitos (células/mm³), bastonetes (mm³), neutrófilos (células/mm³), plaquetas (mm³), lactato desidrogenase (LDH) (U/L), níveis de D-dímero (ng/mL) e de proteína C reativa (PCR) (mg/dL).

As amostras foram coletadas através do swab de Rayon acondicionado em Meio de Transporte Viral e ficaram armazenadas em ultra freezer a -80°C no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC-UEM).

Por intermédio do kit MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit foi feita a extração do RNA viral de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi analisado pela metodologia de qRT-PCR, seguindo o protocolo descrito por Corman et al. (2020), onde foi utilizado o mastermix SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific), tendo como alvo os genes RdRP e E, e como controle interno o gene da RNaseP (CORMAN *et al.*, 2020). Para a reação de amplificação em tempo real foi utilizado o equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com a seguinte termociclagem: 55°C por 10 min para a transcrição reversa, seguido por 95°C por 3 min e 45 ciclos de 95°C por 15 s, 58°C por 30 s.

Sendo assim, as amostras foram separadas em níveis de carga viral. Ao final, para comparação das características clínico-epidemiológicas (variáveis qualitativas) com o tempo de sintomas dos pacientes, foi utilizado o teste Exato de Fisher. Foi utilizado o programa Jomivi 2.0, sendo que o nível e significância para rejeitar a hipótese nula foi de 5% (p-valor<0,05).

Resultados e Discussão

Neste estudo, foram obtidos dados de 50 pacientes, sendo 30 (60,0%) no setor da UTI-COVID e 20 (40,0%) da Enfermaria-COVID, compreendendo o período de outubro de 2020 a fevereiro de 2021. A mediana do tempo entre o início dos sintomas e a coleta foi de 13,0 (IQR, 5,75) dias, sendo o menor tempo possível para detectar o RNA viral de 5 dias e o maior de 29 dias.

Das amostras com carga viral detectável (35 – 70,0%), 63% apresentaram carga viral baixa (Ct≥31), 17% com carga viral intermediária (Ct 26-30) e 20% com carga

viral alta ($Ct \leq 25$). Além disso, foi possível observar que 70,2% (33/47) das amostras coletadas com pelo menos 7 dias de sintomas tiveram resultado detectável por qRT-PCR, e, inclusive, 42,0% (14/33) dessas amostras com RNA viral detectável permaneceram desta forma por no mínimo 14 dias desde o início dos sintomas. Dessa forma, a detecção do RNA viral foi maior em pacientes da UTI (79%). Conforme a tabela 1, não houve associação significativa entre a variação da carga viral detectada com a persistência do resultado detectável nos pacientes (p -valor = 0,383).

Foi observado também, que cerca de 66% dos pacientes possuíam, ao menos, uma comorbidade ou histórico de tabagismo ou alcoolismo, sendo observado a hipertensão (48%), seguida de diabetes (46%), e histórico de tabagismo (18%). Foram registrados 9 óbitos (18%) decorrente de complicações, os quais apresentavam carga viral detectável e comorbidades (p -valor = 0,020).

Ainda, o tempo de internação demonstrou uma variação conforme o tempo de permanência do RNA Viral (p -valor = 0,009), entretanto, não indicou uma diferença estatisticamente significativa em relação à variação da carga viral (p -valor = 0,895). Alguns parâmetros como leucócitos, linfócitos e neutrófilos apresentaram variação significativa na sua quantidade conforme o tempo dos sintomas, os quais demonstraram menor valor médio para amostras coletadas com tempo menor ou igual a 7 dias de sintomas (leucócitos, p -valor = 0,010; linfócitos, p -valor = $<0,001$; neutrófilos, p -valor = 0,007).

Tabela 1 Distribuição da variação da carga viral do SARS-CoV-2 em relação ao tempo de sintomas até o momento da coleta das amostras nos 35 pacientes internados no HUM com COVID-19.

Carga Viral	Tempo de sintomas até o momento da coleta da amostra			p-valor
	≤ 7 dias	8-13 dias	≥ 14 dias	
Baixa ($Ct \geq 31$)	1	10	11	0,383
Intermediária (Ct 26-30)	1	4	1	
Alta ($Ct \leq 25$)	0	5	2	

Ct: limiar do ciclo, do inglês, *Cycle Threshold*.

Verificou-se que o maior tempo de persistência do material genético viral nos pacientes foi de 29 dias, no qual 42% ficaram detectáveis por até 14 dias, ultrapassando assim o tempo de isolamento recomendado pelo Ministério da Saúde. Apesar desse resultado não negar a possibilidade de serem apenas resquícios de material genético, é válido ressaltar que todas as amostras com carga viral alta foram obtidas de pacientes com mais de uma semana de sintomas.

Sendo assim, foi verificado que os casos que apresentaram RNA viral acima de 14 dias foram maiores nas amostras que apresentaram carga viral baixa (50%). Foi possível observar, também, que a taxa de mortalidade foi elevada quando comparado a outros estudos, mas não pode ser excluída a possibilidade dessa

discrepância ter ocorrido devido à diferença de amostragem, visto que neste trabalho obteve-se apenas 50 amostras. Contudo, foi notado que diabetes (p -valor = 0,035) e tabagismo (p -valor = 0,023) apresentaram associação significativa com a evolução do paciente a óbito. Apesar de essas comorbidades estarem relacionadas com a mortalidade, não foi demonstrada relação significativa com o tempo de permanência do RNA viral (p -valor = 0,126). Outros valores como hemoglobina e hematócrito estiveram dentro da normalidade para pacientes detectáveis e não detectáveis. Apesar disso, foi verificado linfopenia em 74% dos pacientes, enquanto a leucopenia estava presente em apenas 4%. Valores como leucócitos, linfócitos e neutrófilos apresentaram menor valor médio em amostras coletadas com tempo menor ou igual a 7 dias de sintomas.

Contudo, é necessário considerar o período em que as amostras foram coletadas, pois a cepa do vírus no momento da coleta pode apresentar características diferentes da cepa do momento atual, podendo assim, apresentar diferenças nos parâmetros que podem se alterar com a infecção pelo SARS-CoV-2.

Conclusões

Perante as resultados, foi verificado a possibilidade de detecção do RNA viral do SARS-CoV-2 em tempo superior a 7 dias de sintomas, tempo recomendado para realização do teste molecular, e a 10 dias de sintomas, tempo recomendado para isolamento. Entretanto, não podemos comprovar o potencial infectante e a viabilidade da partícula viral, mas serve como alerta e revisão das medidas de manejo clínico, e, também, na instrução do tempo em que os pacientes com COVID-19 devem ficar em isolamento.

Agradecimentos

CNPq, Capes e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Referências

BRASIL. Sintomas - COVID-19 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. 2021 [cited 2022 Aug 10]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/sintomas>

CIMOLAI N. In pursuit of the right tail for the COVID-19 incubation period. *Public Health*. 2021 May; 194:149–55.

CORMAN, V. M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *In: Euro Surveill*, 2020. v. 25.

LI N., WANG X., LV T. Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: Not a rare phenomenon. *J Med Virol*. 2020 Nov 22;92(11):2286–7.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. Geneva: World Health Organization. 2020 [cited 2022 Aug 10]. Available from: <https://covid19.who.int/>