

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

NATHALIA GARDIN PESSOA

SÃO CARLOS – SP

2023

NATHALIA GARDIN PESSOA

CARGA VIRAL DE SARS-COV-2 E SOBREVIDA EM PACIENTES  
COM COVID-19 NO MUNICÍPIO DE SÃO CARLOS: ESTUDO DE  
COORTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Departamento de Medicina da Universidade Federal de  
São Carlos, para obtenção do título de bacharel em  
Medicina.

Orientação: Sigrid De Sousa dos Santos

Coorientação:

Anderson Ferreira da Cunha

Caio Cesar de Melo Freire

SÃO CARLOS – SP

2023

## **Agradecimentos**

*Agradeço a Deus que por seus caminhos tortuosos me trouxe até aqui.*

*Agradeço minha família que com todo esforço me manteve aqui durante o curso, me apoiando e fazendo com que os 500 km de distância se encurtassem sempre que precisei de apoio e carinho. Por cada abraço e colo quando pude estar perto. Sem vocês nada disso seria possível. Sempre foi por vocês.*

*Aos meus amigos, a minha família em São Carlos, que fizeram desses anos os mais intensos e inesquecíveis. Por todo o apoio e carinho, levarei vocês pra sempre no coração.*

*Agradeço aos meus amigos do apartamento 81, Raquel, Diego e Pedro por todos os anos de parceria, todos os jantares regados a muitas risadas e as revisões intermináveis para as provas. Obrigada por me mostrarem o tipo de profissional e pessoa que desejo ser.*

*Ao meu amigo Pedro Gimenes por toda a paciência e carinho durante os anos em que fomos dupla de pratica, dupla de representantes, dupla de internato e principalmente dupla de vida dividindo o apartamento e todas as crises da faculdade e da vida. Você é sem duvida uma das melhores pessoas que conheci, meu irmão de outra mãe. Obrigada por tudo.*

*Agradeço a minha amiga Maria Beatriz, a mais improvável e linda amizade que São Carlos me deu. Os nossos dez anos de diferença nunca foram perceptíveis no meio da nossa história de aventuras e acolhimento. Aprendi tanto com nossa convivência, minha vida é muito melhor com você.*

*A minha orientadora Sigrid por todo o apoio e incentivo durante todos os anos de graduação. Você é uma inspiração de profissional e mulher forte que não deixa nunca de buscar a excelência em tudo que faz. Obrigada por todo o apoio e compreensão.*

*Agradeço ao meu chefe e amigo Anderson Cunha por todo o apoio durante os anos de projeto e hoje por se tornar parte da minha vida. O seu senso de justiça e carinho me ensinaram muito sobre o que é ser verdadeiramente um coordenador.*

*Agradeço a todos os docentes, preceptores, residentes e que contribuíram para minha formação. A todos os profissionais do hospital escola que sempre nos acolheram e ensinaram, muito obrigada*

Ao **Laboratório Fleury**, na pessoa do Dr. **Edgar Gil Rizzatti**, pela capacitação da equipe de pesquisa na técnica de RT-PCR para SARS-CoV-2.

Ao **Ministério da Educação (MEC)** pelo apoio ao projeto “Plano de ação para a realização de testes diagnóstico de COVID-19 na população e nos profissionais da saúde de São Carlos e região”, que disponibilizou insumos para o presente projeto de pesquisa.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos - **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC-CNPq)** pelo apoio financeiro (bolsa NGP)

Às enfermeiras **Sandra Keiko Odashima Ueyama** e **Michelle de Aguiar Bezerra** pelo apoio logístico, realização dos exames eletrocardiográficos e consulta de enfermagem dos pacientes do projeto.

À professora **Lucimar Retto da Silva de Avó**, e aos Chefes da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSCar **Renata dos Santos Batista Reis Woloszynek** e **Roberto Augusto Silva Molina** pelo apoio logístico, preparo e armazenamento das amostras biológicas do projeto.

Às professoras **Meliza Goi Roscani** e **Fabíola Paula Galhardo Rizzatti** pela contribuição na elaboração do projeto.

Ao professor **Paulo Inacio da Costa** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus Araraquara pela disponibilização de insumos e realização dos ensaios de neutralização.

Aos médicos cardiologistas **Meliza Goi Roscani**, **André Cechinatti** e **Fabio Rodrigo Prone** pela realização dos exames ecocardiográficos.

Ao médico **Matheus Jorge Iani** e equipe de radiologia do HU-UFSCar pela realização dos exames de tomografia computadorizada de tórax

Aos colegas **Jéssica Hilário Bonomo**, **Olinda Soares Athaíde Neta** e **João Pedro Maia de Oliveira da Silva** pelo apoio na realização das reações de RT-PCR.

.

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	3
2. INTRODUÇÃO .....	5
3. OBJETIVOS .....	7
4. CASUÍSTICA E METODOS .....	8
4.1 População.....	8
4.2 Cálculo amostral .....	8
4.3 Avaliação clínica .....	9
4.4 Coleta de Amostras .....	9
4.5 RT-PCR para SARS-CoV-2 .....	10
4.5.1 Extração do RNA do SARS-CoV-2.....	10
4.5.2 Amplificação do material genético .....	11
4.5.3 Validação do Método.....	12
4.5.4 Cálculo da carga viral do SARS-CoV-2 .....	15
4.6 Ensaio de detecção de anticorpos neutralizantes .....	16
4.6.1 Etapas do ensaio.....	17
4.7 Análise estatística .....	18
5. RESULTADOS .....	19
5.1 Estatística descritiva .....	19
5.2 Fatores associados a pior prognóstico.....	25
5.2.1 Fatores associados ao óbito hospitalar e em 120 dias .....	25
5.2.2 Análise multivariada dos fatores associados ao óbito hospitalar e em 120 dias .....	30
6. DISCUSSÃO .....	31
7. CONCLUSÕES .....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
9. ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	36
10. ANEXO II. APROVAÇÃO NO CEP .....	41
11. ANEXO III - REFLEXÃO SOBRE O PROCESSO ENSINO-APRENDIZAGEM .....	47

12.	ANEXO IV. AVALIAÇÃO DA ORIENTADORA.....	48
-----	---	----

## 1. RESUMO

**Introdução:** Há evidência de que cargas virais do SARS-CoV-2 elevadas e mantidas em secreções respiratórias estejam relacionadas a maior gravidade da doença. No entanto, alguns autores observaram elevada carga de vírus em secreções respiratórias mesmo em pessoas assintomáticas. Diversos fatores podem estar implicados como maior inóculo na transmissão, menor controle de replicação, menor resposta ao tratamento. Assim, são necessários estudos sistematizados da influência da dinâmica de secreção viral em secreções respiratórias na letalidade por COVID-19 **Objetivo:** O objetivo principal deste estudo é avaliar a associação entre a evolução da carga viral do SARS-CoV-2 em secreções respiratórias e o prognóstico da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) por COVID-19, em termos de necessidade de ventilação mecânica não invasiva (VMNI), de ventilação mecânica invasiva (VMI), ou de evolução para óbito ou para desenvolvimento de sequelas, assim como os fatores associados a esses desfechos desfavoráveis. **Métodos:** Estudo descritivo longitudinal de coortes. Fator de exposição: carga viral do SARS-CoV-19 estimada pelo método  $\Delta$ Ct; desfecho: VMNI, VMI, seqüela cardíaca ou pulmonar, alta/óbito. Participaram do estudo indivíduos adultos (idade  $\geq 18$  anos), com diagnóstico de Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 diagnosticados por RT-PCR, e internados na enfermaria de clínica médica do HU-UFSCar, que assinarem o TCLE. Os pacientes foram avaliados por questionário padronizado com informações demográficas, epidemiológicas, clínicas, virológicas, laboratoriais e de imagem, de necessidade de suporte, e de tratamento, no programa RedCap. Os pacientes eram reavaliados em mais quatro ocasiões quando eram submetidos a avaliação clínica, laboratorial e novas coletas de RT-PCR em tempo real para SARS-CoV-2 em secreção de rinofaringe (48-72h, 6-8 dias, 10-15 dias, 20-25 dias). Os pacientes foram avaliados quanto a evolução com necessidade de ventilação mecânica invasiva ou não invasiva, alta ou óbito hospitalar, sequelas pulmonares e cardiovasculares e sobrevivência em 120 dias. **Resultados:** Entre outubro de 2020 e novembro de 2021, foram inclusos no estudo 23 pacientes com SRAG por SARS-CoV-2. Cerca de metade dos pacientes necessitaram suporte de O<sub>2</sub> com máscara com reservatório e 26,1% foram submetidos a ventilação mecânica invasiva. Dois pacientes evoluíram com o óbito. A carga viral do SARS-CoV-2 pelo método  $\Delta$ Ct em swab de naso/orofaringe se manteve mais elevada (acima de 10) após uma semana de internação em pacientes que evoluíram com o óbito. Outros fatores associados ao óbito foram idade maior que 60 anos e algumas características à admissão, hipotermia, bradicardia, hipotensão, alterações eletrocardiográficas (alargamento da onda p e BAV de 1 grau), contagem neutrófilos abaixo de 5000 células/mm<sup>3</sup>, D-dímero maior que 1 mg/L;

PCR menor que 10 mg/dL; e bilirrubina total menor que 0,4 mg/dL. Os dois pacientes que evoluíram com o óbito não receberam corticoide nas primeiras 72 horas de internação. Falta avaliar os fatores demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, de imagem e de tratamento associados à necessidade de ventilação mecânica não invasiva, de ventilação mecânica invasiva e a sequelas. Mais de 95% dos pacientes evoluíram com produção de anticorpos neutralizantes após a SRAG por COVID-19, com mediana de neutralização de 99,3%.

Palavras-chaves: Carga viral, SARS-CoV-2, COVID-19, SRAG, prognóstico.



## 2. INTRODUÇÃO

O coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), o agente causador do COVID-19, foi detectado pela primeira vez em Wuhan, China, no final de 2019.<sup>1</sup> A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou esta doença como uma "emergência de saúde pública de interesse internacional" em 30 de janeiro de 2020. Em 3 de setembro de 2021, houve mais de 218 milhões de casos confirmados de COVID-19 e 4.526.583 mortes foram relatadas em todo o mundo.<sup>2</sup>

Quando o SARSCoV-2 invade o trato respiratório inferior ele se liga aos pneumócitos e às células endoteliais através dos seus receptores da enzima conversora de angiotensina II.<sup>3,4</sup> A infecção induz a ativação endotelial, plaquetária e de células imunes como neutrófilos e macrófagos, que sofrem piroptose (apoptose pró-inflamatória) e liberam padrões moleculares associados a danos, ativando o estresse oxidativo e gerando liberação pró-inflamatória de citocinas e quimiocinas de células epiteliais próximas, células endoteliais e macrófagos alveolares.<sup>5</sup> Essas alterações geram um estado pró-trombótico, manifesto por trombose microvascular, tromboembolismo venoso ou trombose arterial. A causa desse estado pró-trombótico pode estar relacionada à ligação entre trombose e inflamação na qual a trombose pode amplificar a inflamação e a inflamação sistêmica pode gerar trombose.<sup>6</sup>

Desde o início da epidemia de covid-19, a OMS recomenda que o diagnóstico laboratorial seja realizado utilizando testes moleculares, que visam a detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório por RT-PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa – RT-qPCR). Até o momento, este permanece sendo o teste laboratorial de escolha para o diagnóstico da covid-19.<sup>7</sup>

Há evidências de que cargas virais do SARS-CoV-2 por RT-PCR elevadas e mantidas em secreções respiratórias possam estar relacionadas a maior gravidade da doença por coronavírus-19 (COVID-19).<sup>8,9</sup> No entanto, alguns autores observaram elevada carga de vírus em secreções respiratórias mesmo em pessoas assintomáticas.<sup>10-12</sup> Os resultados conflitantes provavelmente se devem aos pequenos tamanhos amostrais, ao frequente uso de testes qualitativos e aos diferentes esquemas de coleta preconizados.

A carga viral do SARS-CoV-2 parece também estar associada a maior gravidade das anormalidades laboratoriais. Indivíduos com cargas virais plasmáticas, nasofaríngeas ou escarro detectáveis apresentaram contagens absolutas de linfócitos mais baixas e concentrações mais elevadas de proteína C reativa e interleucina-6 em comparação com aqueles sem cargas virais detectáveis.<sup>13,14</sup>

Diversos fatores podem estar implicados como maior inoculo na transmissão, menor controle de replicação, menor resposta ao tratamento. Assim, são necessários estudos

sistematizados da influência da dinâmica de secreção viral em secreções respiratórias na letalidade por COVID-19.

Há uma série de fatores de risco conhecidos para evolução para insuficiência respiratória e óbito como a idade avançada, obesidade e a presença de diabetes, doença cardiovascular, renal e câncer. No entanto, a importância da carga viral de SARS-CoV-2 no prognóstico da infecção não é totalmente entendido.

Estudo retrospectivo multicêntrico norte-americano de pacientes internados com COVID-19 relacionou a carga viral do SARS-CoV-2 em nasofaringe pelo número de ciclos necessários para a detecção de sinal por RT-PCR (Cycle Threshold Values - Ct) com a evolução clínica. O Ct foi inversamente proporcional à necessidade de alta suplementação de oxigênio, intubação orotraqueal e à mortalidade intra-hospitalar. Esses pacientes também apresentam mais complicações cardiovasculares agudas e insuficiência renal.<sup>15,16</sup> Em estudo Chinês, pacientes com apresentações graves de COVID-19 apresentaram cargas virais mais altas do que aqueles com apresentações leves.<sup>17</sup> O mesmo foi verificado em estudo israelense, onde pacientes com altas cargas plasmáticas em nasofaringe também relacionou com maior necessidade de ventilação mecânica e evolução para óbito.<sup>18</sup> No entanto os estudos utilizaram o Ct como parâmetro de carga viral, que pode variar muito com protocolo e com erros de coleta pela presença de maior ou menor de material biológico na amostra.

O SARS-CoV-2 usa uma glicoproteína de pico homotrimérica de envelope para interagir com o receptor celular ACE2. A ligação com ACE2 desencadeia uma cascata de fusão da membrana celular que resulta na entrada viral. Isso sugere que a interrupção da interação RBD-ACE2 bloquearia a entrada da célula SARS-CoV-2. A estrutura de alta resolução do SARS-CoV-2 RBD ligada ao domínio N-terminal da peptidase da ACE2 foi recentemente determinada. O mecanismo de ligação de ACE2 é quase idêntico entre SARS-CoV-2 e SARS-CoV RBD. Estudos em animais sobre vacinas baseadas em RBD contra SARS-CoV e MERS-CoV mostraram fortes respostas de anticorpos policlonais que inibem a entrada viral. Essas descobertas sugerem que os anticorpos anti-RBD devem bloquear efetivamente a entrada do SARS-CoV-2.<sup>19</sup>

O presente estudo procura normalizar a medida de carga viral relacionando a leitura de Ct com amostra de contagem conhecida e normalizando-se por CT obtidos com a amplificação do gene de referência de material humano (RNase P).<sup>20</sup> Dessa forma procura-se obter valor mais confiável, reprodutível de carga viral. O estudo também realiza dosagens seriadas de carga viral para relacionar a evolução da carga viral ao longo da internação com desfechos clínicos desfavoráveis e com a produção de anticorpos neutralizantes.

### **3. OBJETIVOS**

- Avaliar a associação entre a evolução da carga viral do SARS-CoV-2 estimada pelo método  $\Delta Ct$  em amostras coletadas por swab de nasofaringe e orofaringe e o prognóstico de pacientes com SRAG por COVID internados no HU-UFSCar e seus fatores associados.
- Avaliar a frequência de uso de ventilação mecânica não invasiva (VMNI), de ventilação mecânica invasiva (VMI), de óbito e de sequelas em pacientes com SRAG por COVID.
- Avaliar os principais fatores demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, de imagem e de tratamento associados à necessidade de ventilação mecânica não invasiva, de ventilação mecânica invasiva, ao óbito e a sequelas em pacientes com SRAG por COVID-19.
- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes após a infecção

## 4. CASUÍSTICA E METODOS

### 4.1 População

Foram inclusos no estudo pacientes com diagnóstico de síndrome respiratória aguda (SRAG) por SARS-CoV-2 internados no Hospital Universitário da UFSCar entre os meses de outubro de 2020 e novembro de 2021. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar em 28/07/2020 (CAAE 34344520.8.0000.5504).

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- a. Idade maior ou igual a 18 anos
- b. Queixa de febre OU tosse OU dor de garganta OU coriza OU dificuldade respiratória
- c. Indicação de internação hospitalar por insuficiência respiratória, definida por FR maior ou igual a 30 rpm, saturação O<sub>2</sub> menor que 94% em ar ambiente, paO<sub>2</sub> menor que 60 mmHg em ar ambiente, paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 200 ou Grad A-a maior que 20 mmHg.
- d. Duração dos sintomas até 8 dias
- e. Diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 confirmada por teste rápido antigênico ou RT-PCR de secreção respiratória
- f. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Foram excluídos do estudo pacientes que fossem admitidos no serviço já em ventilação mecânica invasiva.

### 4.2 Cálculo amostral

Em estudo com SARS-CoV, a sobrevivência dos pacientes em quatro meses foi associada ao logaritmo base 10 da carga viral em secreções respiratórias. A taxa de sobrevivência de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS em quatro meses foi 83% (71/86) em pacientes internados com carga viral em secreções respiratórias de até 3 log ( $\leq 1000$  cp/mL) e de 66% (31/47) em pacientes com viremia maior que 3 log ( $> 1000$  cp/mL).<sup>21</sup> Fazendo o cálculo para uma coorte que avalia sobrevivência em 120 dias (Kelsey et al., 1996), teríamos que incluir pelo menos 210 pacientes, caso o comportamento viral fosse semelhante. Estimando perda de 10% das amostras, seriam necessários 221 pacientes. No entanto, para SARS-CoV-2, nem sempre isso é verdade, e aparentemente a manutenção da viremia é importante. Assim, optamos por desenho adaptativo de estudo. Dessa forma seriam inclusos 220 pacientes, com análises interinas após completar inclusão de 55, 110, 165 e 220 pacientes. A cada análise interina será novamente calculada a amostra baseando-se nos dados obtidos até o momento, podendo haver ajuste do número de pacientes para mais ou para menos. Da mesma forma eventos clínicos importantes do ponto de vista assistencial são incorporados ao seguimento do paciente,

conforme o conhecimento sobre a COVID-19 seja melhor estabelecido. Infelizmente o estudo teve que ser interrompido prematuramente devido ao fechamento da UTI COVID-19 no HU-UFSscar em dezembro de 2021. Não seria ético incluir pacientes em internação de enfermaria sem haver uma retaguarda de UTI. Desta forma optamos por suspender o protocolo.

### **4.3 Avaliação clínica**

Todos pacientes foram avaliados de forma padronizada, utilizando-se formulário online do programa Redcap com informações demográficas, epidemiológicas, clínicas, virológicas, laboratoriais e de imagem (TC/RX tórax, ECG, ecocardiograma), de necessidade de suporte, e de tratamento eventualmente utilizado (heparina, anticoagulantes orais, corticosteroides, antivirais, cloroquina, hidroxiclороquina, azitromicina, plasma fresco congelado, dentre outros). Durante o período do protocolo foi iniciada a vacinação da população contra SARS-CoV-2. O estado vacinal dos participantes passou a ser avaliado desde então.

Os pacientes eram reavaliados em mais quatro ocasiões quando eram submetidos a avaliação clínica, laboratorial e novas RT-PCR em tempo real para SARS-CoV-2 em secreção de rinofaringe (48-72h, 6-8 dias, 10-15 dias, 20-25 dias). Na última era separado e congelado soro a -20 °C para ensaio de detecção de anticorpos neutralizantes. Os pacientes foram avaliados quanto à evolução com necessidade de ventilação mecânica invasiva (VMI) ou não invasiva (VMNI), alta ou óbito hospitalar, e sobrevida em 120 dias de seguimento (retorno ambulatorial ou contato telefônico). Como desfecho secundários foram avaliadas sequelas pulmonares e cardiovasculares em 120 dias de seguimento por exames de imagem (radiografia simples de tórax ou tomografia de tórax sem contraste, eletrocardiograma e ecocardiograma).

O número de inclusões abaixo do delimitado no projeto inicial deve-se em grande parte a dificuldade de acesso precoce dos pacientes ao serviço de saúde, sendo as internações realizadas geralmente após 14 dias do início dos sintomas e inviabilizando assim a inclusão em nosso protocolo.

### **4.4 Coleta de Amostras**

A equipe responsável pelo protocolo foi responsável pela assistência direta aos pacientes pois integra a equipe de cuidados da instituição, e pela coleta das amostras. Para coleta de secreção de rinofaringe e orofaringe foram utilizados swabs de haste de plástico e ponta de Rayon que foram acondicionados em tubos com solução salina, seguindo protocolo estabelecido pelo CDC.<sup>22</sup> Para realizar a coleta o pesquisador utilizou paramentação com máscara N95, óculos de proteção ou face shield, avental descartável e luvas.

Os exames laboratoriais seguiram a rotina de coleta do serviço, que incluía hemograma completo, gasometria arterial, lactato arterial, INR, relação TTPA paciente/normal, D-dímero, PCR, DHL, Troponina I, CPK, TGO, TGP, gGT, F alcalina, BTF, Ureia e creatinina.

## **4.5 RT-PCR para SARS-CoV-2**

### **4.5.1 Extração do RNA do SARS-CoV-2**

A extração do RNA foi realizada em triplicata no Maxwell 16, seguindo o Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit Protocolo do sistema que utiliza 200 µL de amostra para cada extração.

Etapas da incubação das amostras:

1. Pipetar 200 µL de cada amostra em um tubo de microcentrifuga de 2 mL com tampa.
2. Adicionar 200 µL de tampão de lise e 20 µL de solução de proteinase K ao microtubo com amostra (Seção 6. A do manual Maxwell).
3. Fechar os tubos e agitar no vórtex por 10 segundos.
4. Incubar em temperatura ambiente (15–30 °C) por 10 minutos.
5. Incubar a 56 °C em um bloco de calor por 10 minutos. Durante essa incubação executar a Etapa 6 abaixo.
6. Trocar as luvas antes de manusear cartuchos, êmbolos LEV e tubos de eluição. Colocar os cartuchos a serem usados no rack Maxwell® 16 LEV Cartridge (Cat. # AS1251) (Figura 1). Ligar, colocar cada cartucho no rack com o lado da etiqueta voltado para longe dos tubos de eluição. Pressione para baixo no cartucho para encaixá-lo na posição. Retire cuidadosamente o selo para que todo o plástico saia da parte superior do cartucho. Certifique-se de que toda a fita de vedação e qualquer resíduo o adesivo foi removido antes de colocar os cartuchos no instrumento.
7. Coloque um êmbolo LEV no poço nº 8 de cada cartucho. O poço 8 é o poço mais próximo do tubo de eluição.
8. Coloque os tubos de eluição de 0,5 mL na frente da rack de cartucho do Maxwell® 16 LEV. Adicionar 60 µL de água livre de nucleasse no fundo de cada tubo de eluição.

**FIGURA 1: Representação do rack de cartucho Maxwell® 16 LEV**



FONTE: Promega Applications Scientists

#### **4.5.2 Amplificação do material genético**

Para a etapa de amplificação, foi utilizado o sistema 2019-nCoV RUO Kit IDT, seguindo as recomendações do protocolo do fabricante. Os termocicladores utilizados foram o QuantStudio 6™ System ou o StepOnePlus™ System, a depender da disponibilidade no laboratório. As etapas de transcriptase reversa, ativação da polimerase, desnaturação, anelamento e extensão foram ajustadas conforme indicado pelo protocolo CDC (15 minutos 50°C; 2 minutos 95 °C e 45 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C). Foram utilizadas sondas para a detecção dos genes N1 e N2 do Sars-CoV-2, e do gene da Rnase P como controle da presença de células humanas na amostra.

#### **Etapas de amplificação:**

1. Descongelar e agitar no vórtex os reagentes antes de usar.
2. Todos os reagentes devem estar no gelo ou no bloco de resfriamento.
3. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar os reagentes indicados no Quadro 1, para número necessário de amostras, mais o NTC, o controle positivo 2019-nCoV\_N, Hs\_RPP30 Controle positivo e controle negativo interno DNA Consult.

#### **QUADRO 1: Preparação mistura de reação**

Volume final	10 µL	20 µL
Master Mix High ROX IDT	5 µL	10 µL
RTAse Go	0,5 µL	1,0 µL
Mix Primer	0,75 µL	1,5 µL

4. Repetir o procedimento para os 3 alvos (N1, N2 e RP). Agitar as misturas por 10 segundos.

5. Distribuir a mistura de reação (6,25 µL para a reação com volume final de 10 µL e 12,5 µL para a reação com volume final de 20 µL) .
6. Adicionar 3,75 µL de amostra para as reações com volume final de 10 µL e 7,5 µL de amostra para as reações com volume final de 20 µL.
7. Vedar a placa com o selo ótico e centrifugar brevemente.
8. Colocar a placa no termociclador e ajustar as configurações de volume e temperatura, conforme descrito no Quadro 2.

**QUADRO 2: Ciclos de amplificação**

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	50 °C	15 minutos
1	95 °C	2 minutos
45	95 °C	5 segundos
	60 °C	30 segundos

Seguindo as recomendações do CDC, considerou-se curva de amplificação adequada quando as amostras clínicas exibiram curvas de crescimento de fluorescência na reação RNase P até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct), indicando assim a presença do gene humano RNase P. As amostras foram consideradas positivas para a presença de SARS-CoV-2 quando exibiram curvas de crescimento de fluorescência na reação N1 e N2 até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct). As amostras foram consideradas inconclusivas quando exibiram curvas de crescimento de fluorescência apenas na reação de N1 ou N2 até a linha limite dentro limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct) e negativas quando apresentavam curvas de crescimento de fluorescência apenas na reação RNASE P até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct). As leituras que não evidenciaram amplificação foram reportadas como Ct 45,0 (numero limite de ciclos) para fins de análise estatística.

**4.5.3 Validação do Método**

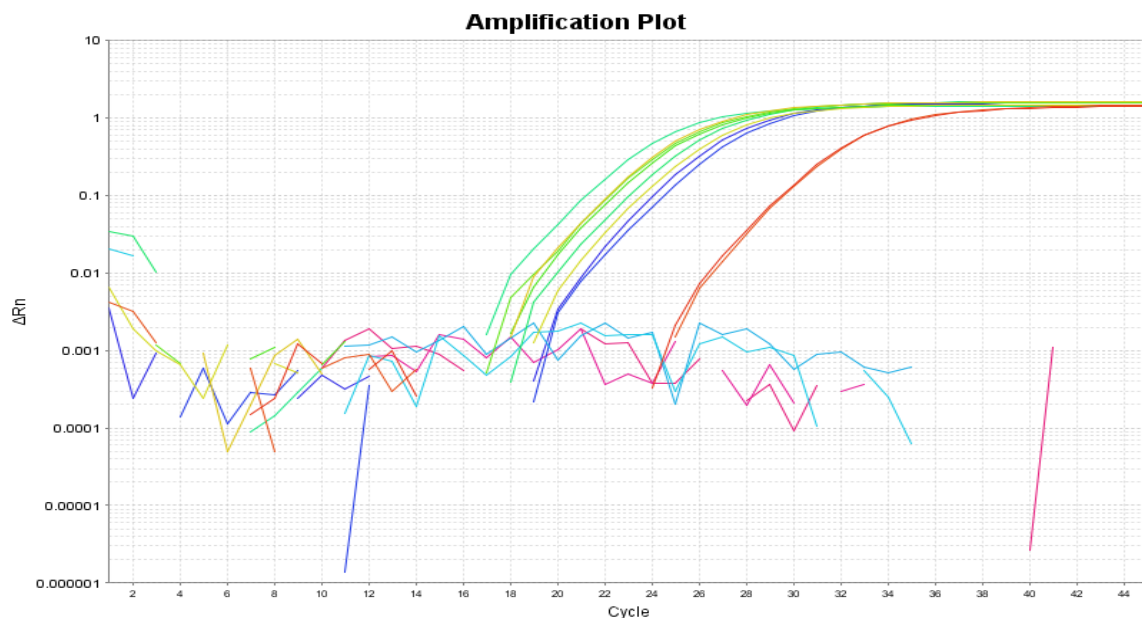
Inicialmente foi padronizado o método de RT-PCR para SARS-CoV-2 de amostras de nasofaringe e orofaringe utilizando 4 amostras positivas, previamente testadas, e controles positivos com concentração conhecida, em duplicata e controles negativos, segundo protocolo do Centers for Disease Controle and Prevention dos EUA (CDC). Utilizou-se um swab para coleta de amostra de nasofaringe e outro para coleta de amostra de orofaringe. Os swabs foram colocados em tubo contendo três mL de solução salina. O processo de extração do RNA viral, seguiu o protocolo Maxwell® RSC miRNA Tissue Kit, e amplificação utilizando o sistema 2019-nCoV RUO Kit IDT.



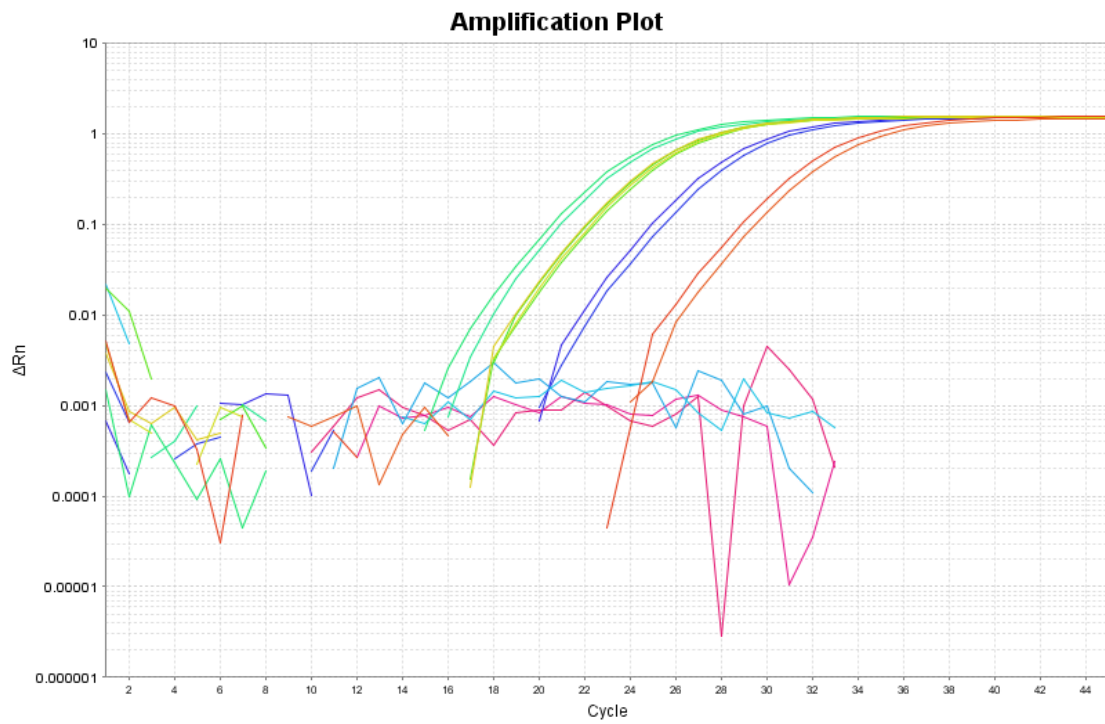
Procedeu-se a leitura do Ct, do ciclo em que a fluorescência ultrapassava o threshold (limiar de detecção). Essa leitura permitiu correlacionar o aumento da fluorescência com a quantidade inicial de DNA-alvo.

Seguindo as recomendações do CDC, considera-se curva de amplificação adequada quando as amostras clínicas exibirem curvas de crescimento de fluorescência na reação RNase P até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct), indicando assim a presença do humano Gene RNase P. As amostras são consideradas positivas para a presença de SARS-CoV-2 quando exibem curvas de crescimento de fluorescência na reação N1 e N2 até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct). As amostras foram consideradas inconclusivas quando exibiram curvas de crescimento de fluorescência apenas na reação de N1 ou N2 até a linha limite dentro limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct) e negativas quando apresentavam curvas de crescimento de fluorescência apenas na reação RNASE P até a linha limite dentro de 40 ciclos (<40,00 Ct). As Figuras 2, 3 e 4 ilustram as curvas de monitoramento de fluorescência que detectam a amplificação em tempo real.

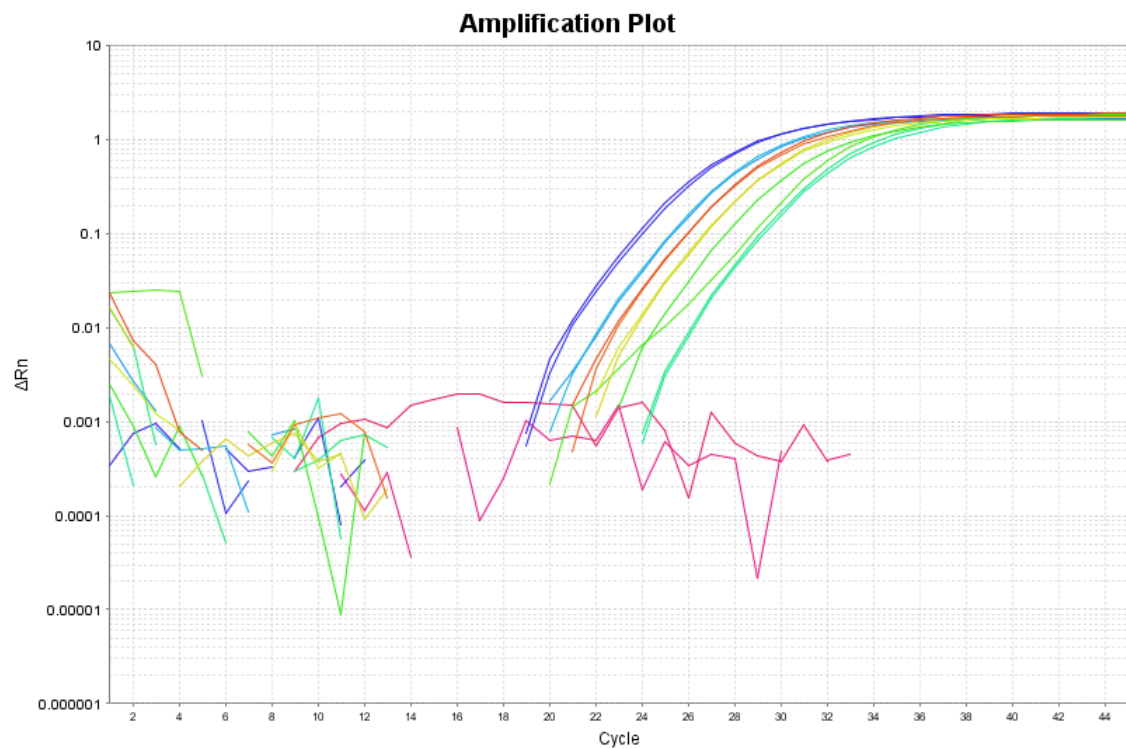
**FIGURA 2. Padronização RT-PCR para SARS-Cov-2 para detecção de N1**



**FIGURA 3. Padronização RT-PCR para SARS-Cov-2 para detecção de N2**



**FIGURA 4. Padronização RT-PCR para SARS-Cov-2 para detecção de RNASE P**



#### 4.5.4 Cálculo da carga viral do SARS-CoV-2

A carga viral foi estimada pelo método  $\Delta\Delta Ct$  <sup>20</sup> O método compara o CT das amostras com os CT um controle de concentração conhecida, normalizados por CT obtidos com a amplificação do gene de referência de material humano (RNase P).

Inicialmente calcula-se o Ct médio entre as regiões N1 e N2 do gene N de cada amostra:

$$CtN = (CtN1 + CtN2) / 2$$

Em seguida calcula-se o  $\Delta Ct_{amostra}$ , que indica a diferença o número de ciclos necessários para a detecção de curva de crescimento da região N do número de ciclos necessários para detecção de curva de crescimento da ORF da RNase P humana. Esse cálculo permite a normalização da estimativa da viremia, pela quantidade de material biológico presente na amostra. Lembrando-se que a quantidade de material genético é inversamente proporcional à quantidade de ciclos necessários, invertemos a subtração:

$$\Delta Ct_{amostra} = Ct_{RNase P} - CtN(amostra)$$

Repetimos o cálculo para estimar  $\Delta Ct_{controle\ positivo}$

$$\Delta Ct_{controle\ positivo} = Ct_{RNase P} - CtN(controle\ positivo)$$

Calcula-se então a diferença do ciclo de limiar comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) entre o  $\Delta Ct_{amostra}$  e o  $\Delta Ct_{controle\ positivo}$ , que compara a detecção entre a amostra e o controle positivo, normalizados pela quantidade de amostra biológica, pela fórmula:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \Delta Ct_{controle\ positivo}$ .

Como cada ciclo de PCR duplica o material genético na amostra, a quantidade de material genético na amostra (carga viral do SARS-CoV-2) pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$Carga\ viral_{amostra} = CargaViral_{controle} \times 2^{\Delta\Delta Ct}$$

Foi utilizado controle positivo com 3500 cópias por ensaio. Desta forma, calculou-se a carga viral da mostra pela seguinte fórmula:

$$Carga\ viral_{amostra} = 3500 \times 2^{\Delta\Delta Ct} \text{ cópias por teste}$$

Para efeito de análise estatística, também foi analisada a evolução do logaritmo decimal da carga viral do SARS-CoV-2

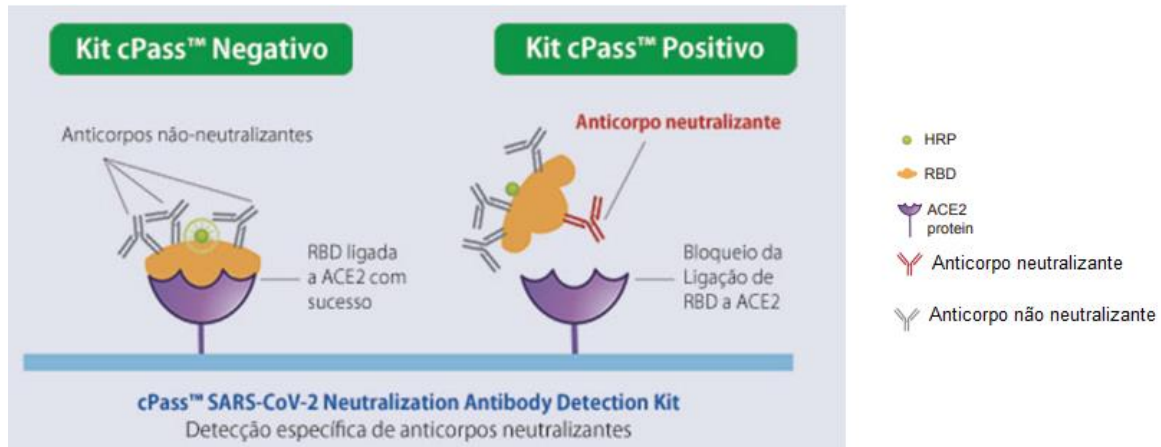
#### **4.6 Ensaio de detecção de anticorpos neutralizantes**

Anticorpos neutralizantes (NAbs) são anticorpos que neutralizam os microorganismos intracelulares ligando-se a ele de forma que impede que ele se ligue e infecte as células-alvo. A produção de anticorpos neutralizantes pode variar de acordo com as características do agente e da infecção ou mesmo da vacinação.

O primeiro tipo desenvolvido de teste de neutralização de vírus (TNV) detecta anticorpos neutralizantes (NAb) no sangue de um paciente com uso de amostras de vírus selvagem. Assim, o TNV requer o manuseio de SARS-CoV-2 vivo em um laboratório com instalações de contenção apropriadas para garantir um nível 3 de biossegurança (BSL3). Trata-se de reação tecnicamente difícil e demorada, levando de 2 a 4 dias para ser concluída. Uma solução é o uso de teste de neutralização de vírus baseado em pseudovírus (pVNT). Trata-se de tecnologia semelhante, que ainda requer o uso de vírus e células vivas, mas que pode ser realizado em laboratório de nível de biossegurança 2 (BSL2).

A solução encontrada para o estudo foi o uso do GenScript cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit. Trata-se de ensaio de neutralização que utiliza um vírus substituto, sem nem a necessidade de usar qualquer vírus ou células vivas. O teste utiliza uma proteína recombinante do domínio de ligação ao receptor (receptor binding domain, RBD) da proteína Spike (S) do SARS-CoV-2 ao invés de um vírus inteiro para testar a neutralização. O teste também substitui a célula humana pelo receptor celular ACE2 humano (hACE2). O teste é projetado então para testar a ligação entre a RBD e o receptor hACE2, imitando a interação entre o vírus e a célula hospedeira. Essa interação altamente específica pode então ser neutralizada, bloqueada por NAb altamente específicos em soros de pacientes da mesma maneira que em do TNV convencional, o chamado Teste de Neutralização por Redução em Placa. Além de mais seguro o ensaio também é mais rápido, podendo ser realizado em 1-2 horas em um laboratório BSL2 (Figura 5).

Figura 5. Ensaio de neutralização



FONTE:

[https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/cPass\\_FDA\\_EUA\\_authorized.pdf?\\_=20220125?1964154866](https://www.genscript.com/gsfiles/techfiles/cPass_FDA_EUA_authorized.pdf?_=20220125?1964154866)

#### 4.6.1 Etapas do ensaio

- Primeiro, as amostras e controles são pré-incubados com o RBD marcado com peroxidase (RBD-HRP) para permitir a interação e ligação dos anticorpos de neutralização ao RBD-HRP marcado.
- A mistura é então adicionada à placa de captura que é pré-revestida com a proteína hACE2.
- O RBD-HRP não ligado, bem como qualquer RBD-HRP ligado ao anticorpo não neutralizante, será capturado na placa.
- O anticorpo de neutralização complexado com RBD-HRP permanece no sobrenadante e é removido durante a lavagem.
- Após as etapas de lavagem, adiciona-se solução de tetrametilbenzidina (TMB), substrato cromogênico da peroxidase HRP, tornando a cor azul, caso o RBD-HRP não tenha sido eliminado na lavagem.
- Ao adicionar a solução de parada, a reação é inibida, a cor fica amarela e os poços são lidos a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação. A absorbância da amostra é inversamente proporcional ao título de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2.

#### 4.7 Análise estatística

Inicialmente foi realizada a estatística descritiva da população inclusa no estudo, utilizando-se medidas de frequência para variáveis categóricas e medidas de dispersão para variáveis numéricas.

Cada variável foi avaliada quanto a associação com óbito, necessidade de uso de altas concentrações de oxigênio, de uso de ventilação mecânica não invasiva ou invasiva. As comparações entre as variáveis numéricas e a evolução com os desfechos desfavoráveis foram feitas usando ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis para dois grupos, utilizando-se como parâmetro de escolha o teste de Bartlett. Nos casos em que o valor de p no teste de Bartlett foi menor que 0,05, considerou-se que as variâncias não eram homogêneas entre as amostras e optou-se por utilizar teste de Kruskal-Wallis para dois grupos. As variáveis categóricas foram expressas como frequências absolutas e relativas e avaliadas quanto à associação com os desfechos desfavoráveis por meio do teste exato de Fisher bicaudal. Variáveis com valores de  $P < 0,15$  seriam selecionadas para análise multivariada. Para a análise logística multivariada transformamos as variáveis numéricas em dicotômicas, utilizando-se como parâmetro a mediana dos casos e/ou a literatura. Como a amostra foi reduzida, devido ao fechamento da unidade de terapia intensiva, não foi possível realizar a análise multivariada. Dessa forma optamos por descrever cada variável e avaliar com mais atenção especificamente a carga viral do SARS-CoV-2 em nasofaringe e orofaringe como preditores de prognóstico, com auxílio de uso de análise da série temporal por método gráfico, que posteriormente será corroborado por análise de variância para medidas repetidas e/ou pela análise da área sob a curva (AUC). Porém notamos que alguns fatores clínicos podem ter interferido nos resultados. Para efeito de trabalho de conclusão de curso de graduação foi apresentada a análise de fatores de risco de óbito hospitalar e de 120 dias após internação. Os outros desfechos serão analisados posteriormente como produto final da pesquisa.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estatística descritiva

Foram convidados a participar do presente estudo 25 pacientes, dentre os quais 23 assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram inclusos no estudo. As características de entrada dos participantes estão disponíveis na Tabela 1. A média de idade foi de 53,3 anos, sendo a maioria do sexo feminino (56,5%) e de cor/raça não branca (65,2%). Praticamente todos os pacientes eram procedentes de São Carlos (95,7%). A maioria dos participantes ainda não havia recebido nenhuma dose da vacina contra SARS-CoV-2 (69,6%). Os principais fatores de risco foram obesidade (60,8%), hipertensão arterial sistêmica (52,2%), diabetes mellitus (34,8%), insuficiência cardíaca (26,1%) e tabagismo (21,7%).

TABELA 1. Características demográficas e condições clínicas de base dos pacientes inclusos no estudo, São Carlos, 2020-2021.

<b>Variável</b>		
<i>Sexo, n (%)</i>		
- Feminino	13	56,5
<i>Idade</i>		
- Média (DP)	53,3	15,8
- Acima de 60 anos, n (%)	6	26,1
<i>Cor da pele, n (%)</i>		
- Não branca	15	65,2
<i>Procedência, n (%)</i>		
- São Carlos	22	95,7%
<i>Vacinação contra SARS-CoV-2, n (%)</i>		
- Não vacinado	16	69,6
- Vacinado 1 dose	3	13,0
- Vacinado 2 doses	4	17,4
- Vacinado 3 doses	1	4,3
<i>Doenças crônicas, n (%)</i>		
- SNC	0	0
- Cardiovascular	14	60,9
HAS	12	52,2
Insuficiência cardíaca	6	26,1
Insuficiência coronariana	3	13,0
Insuficiência venosa periférica	3	13,0
- Endocrinológica	16	65,2
Obesidade	14	60,8
Diabetes mellitus não complicada	8	34,8
Doença tireoidiana	2	8,7
- Pneumopatias	2	8,7
Antecedente de tuberculose	2	8,7
- Imunodepressão (aids)	1	4,3
<i>Tabagismo</i>	5	21,7
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>100%</b>

Os principais sintomas foram tosse (100%), fadiga (91,3%), febre (87%), dispneia (87%), mialgia (78,3%), anorexia (78,3%), cefaleia (69,6%), tontura (65,2%), e anosmia/ageusia

(60,9%) (Tabela 2). Cerca de 1/3 dos pacientes tinham sintomas gastrointestinais. Ao exame físico 73,9% dos pacientes apresentavam taquipneia ( $\geq 22$  rpm) e 87% hipoxemia ( $< 94\%$ ). Um paciente foi admitido hipotenso ( $PAm < 65$  mmHg). As principais alterações à ausculta pulmonar foram estertores crepitantes (60,9%) e diminuição do murmúrio vesicular (47,8%). Um terço dos pacientes apresentavam estase jugular.

TABELA 2. Características clínicas de entrada dos pacientes incluídos no estudo, São Carlos, 2020-2021.

<b>Sintomas</b>		
<i>Tosse, n (%)</i>	23	100
<i>Fadiga, (%)</i>	21	91,3
<i>Febre</i>		
- n (%)	20	87
- Temperatura máxima, média (DP) °C	38	0,74
<i>Dispneia, n(%)</i>	20	87
<i>Mialgia, n (%)</i>	18	78,3
<i>Anorexia, n (%)</i>	18	78,3
<i>Cefaleia, n (%)</i>	16	69,6
<i>Tontura, n (%)</i>	15	65,2
<i>Anosmia ou ageusia, n (%)</i>	14	60,9
<i>Dor torácica, n (%)</i>	13	56,5
<i>Coriza, n (%)</i>	13	56,5
<i>Expectoração, n (%)</i>	11	47,8
<i>Dor de garganta, n (%)</i>	9	39,1
<i>Dor abdominal, n (%)</i>	9	39,1
<i>Diarreia, n (%)</i>	9	39,1
<i>Obstrução nasal, n (%)</i>	7	30,4
<i>Palpitações, n (%)</i>	7	30,4
<i>Otalgia, n (%)</i>	6	26,1
<i>Vômitos, n (%)</i>	5	21,7
<b>Sinais</b>		
<i>Temperatura, média (DP) °C</i>	36,6	1,23
<i>Pulso radial, mediana (intervalo interquartil) bpm</i>	88	84,5-97
<i>Frequência respiratória, mediana (intervalo interquartil) bpm</i>	28	21,5-30
<i>Saturação de O<sub>2</sub>, mediana (intervalo interquartil)</i>	91	89-92,5
<i>Pressão arterial média, mediana (intervalo interquartil) mmHg</i>	89	80,7-97,7
<i>Rebaixamento do nível de consciência, n (%)</i>	2	8,7
<i>Sistema respiratório, n (%)</i>		
- Uso de musculatura acessória	6	26,1
- Ausculta pulmonar		
Diminuição do murmúrio vesicular	11	47,8
Estertores crepitantes	14	60,9
Estertores subcrepitantes	1	4,3
Sibilos	1	4,3
Atrito pleural	1	4,3
Roncos	2	8,7
<i>Sistema cardiovascular, n (%)</i>		
- Estase jugular	8	34,8
- Edema de membros inferiores	1	4,3
<i>Trato gastrointestinal, n (%)</i>		
- Hepatomegalia	1	4,3
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>100%</b>



Em relação aos exames de imagem, dezesseis pacientes foram submetidos a realização de radiografia simples de tórax, sendo que todos apresentaram opacidades de padrão intersticial e 85,5% estavam associados a opacidades de padrão alveolar (Tabela 3). Oito pacientes foram submetidos a tomografia computadorizada de tórax, sendo que todos apresentavam opacidades em vidro fosco difusas, e 37,5% apresentavam também opacidades alveolares. A distribuição das lesões apresentou predomínio periférico em 87,7% e predomínio em lobos inferiores em 57,1% das imagens tomográficas.

TABELA 3. Características de exames de imagem de entrada dos pacientes incluídos no estudo, São Carlos, 2020-2021.

<b>Característica</b>		
<i>Radiografia simples de tórax, n (%)</i>		
- Opacidades de padrão intersticial	16	100
- Opacidades de padrão alveolar	14	85,5
Difusas	10	62,5
Focos de consolidação	5	31,3
- Cardiomegalia	11	68,8
- Congestão	5	31,3
- Derrame pleural	2	12,5
<i>Tomografia computadorizada de tórax, n (%)</i>		
- Achados radiológicos	8	
Opacidades em vidro fosco	8	100
Consolidação	3	37,5
Espessamento de septos alveolares	4	50,0
- Distribuição		
Predomínio periférico	7	87,5
Predomínio em lobos inferiores	4	50,0
Lesões em ambos hemitórax	6	75
- Comprometimento do parênquima pulmonar		
Menor que 25%	4	50,0
25-50%	3	37,5
Maior que 50%	1	12,5

Um paciente não realizou o eletrocardiograma de entrada. Alterações no traçado eletrocardiográfico foram encontradas em 77,3% dos pacientes que realizaram o exame (Tabela 4). A principal alteração encontrada foi a alteração de repolarização (40,9%), seguida das arritmias supraventriculares (flutter atrial, fibrilação atrial, extrassístoles supraventriculares).

TABELA 4. Características do traçado eletrocardiográfico de entrada dos pacientes incluídos no estudo, São Carlos, 2020-2021.

<b>Característica</b>		
<i>Eletrocardiograma</i>	22	
- Achados anormais, n (%)	17	77,3
- Ritmo, n (%)		
Sinusal	20	90,9
Extrassístoles supraventriculares	2	9,1
Extrassístoles ventriculares	1	4,5
Fibrilação atrial	1	4,5
Flutter atrial	1	4,5
- Frequência cardíaca, mediana (intervalo interquartil) bpm	81,5	64-94,5
- Sobrecarga de câmaras, n (%)		
Átrio D	2	9,1
Átrio E	2	9,1
Ventrículo D	2	9,1
- Bloqueios, n (%)		
BAV 1 grau	1	4,5
BRE	1	4,5
- bDASE, n (%)	2	9,1
- Alteração de repolarização, n (%)	9	40,9
- Área eletricamente inativa	2	9,1
- Duração onda P, mediana (intervalo interquartil) ms	80	80-100
- Intervalo PR, mediana (intervalo interquartil) ms	120	120-160
- Duração QRS, mediana (intervalo interquartil) ms	80	80-80
- Duração RR, mediana (intervalo interquartil) s	0,72	0,62-0,85
- Duração QT, mediana (intervalo interquartil) ms	340	320-370
- Duração QTc (Bazett), mediana (intervalo interquartil) ms	403,5	363,7-447,2

As alterações laboratoriais mais encontradas foram linfopenia menor que 1500 cels/mm<sup>3</sup> (91,3%); DHL > 271 U/L (76,2%); paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub><300 mmHg (73,8%); D-dímero > 0,5 mg/L (68,2%); PCR > 10 mg/dL (65,2%) (Tabela 5).

TABELA 5. Características laboratoriais de entrada dos pacientes incluídos no estudo, São Carlos, 2020-2021.

<b>Característica</b>		
<i>Gasometria arterial (n=32)</i>		
- pH, mediana (intervalo interquartil)	7,43	7,40-7,45
- pO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , média (DP) mmHg	260,7	74,0
- pO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <300 mmHG, n (%)	17	73,8
- pCO <sub>2</sub> , mediana (intervalo interquartil) mmHg	34,4	31,7-36,8
- HCO <sub>3</sub> , mediana (intervalo interquartil) mmol/L	22,1	20,9-23,0
- Lactato, mediana (intervalo interquartil) mmol/L	1,81	1,60-2,12
<i>Hemograma (n=23)</i>		
- Hb, mediana (intervalo interquartil) g/dL	13	12,2-14,0
- Leucócitos, mediana (intervalo interquartil) cels/mm <sup>3</sup>	6830	5295-8260
- Neutrófilos, mediana (intervalo interquartil) cels/mm <sup>3</sup>	5694	4175-8559
- Linfócitos, mediana (intervalo interquartil) cels/mm <sup>3</sup>	945	700-1186
- Linfócitos <1500 cels/mm <sup>3</sup> , n (%)	21	91,3
- Plaquetas, mediana (intervalo interquartil) unidades/mm <sup>3</sup>	178.000	158.000-247.500
- Plaquetas < 150.000 unidades/mm <sup>3</sup> , n (%)	4	17,4
<i>Coagulograma (n=20)</i>		
- INR, mediana (intervalo interquartil)	1,13	0,98-1,15
- TTPA Paciente / normal, mediana (intervalo interquartil)	0,97	0,85-1,07
<i>D dímero (n=22)</i>		
- D dímero, mediana (intervalo interquartil) mg/L	0,64	0,37-1,31
- D dímero >0,5 mg/L, n (%)	15	68,2
<i>Proteína C-reativa (n=23)</i>		
- PCR, mediana (intervalo interquartil) mg/dL	13,4	8,2-19,8
- PCR >10 mg/dL, n (%)	15	65,2
<i>Desidrogenase Láctica (n=21)</i>		
- DHL, mediana (intervalo interquartil) U/L	366	285-471
- DHL >271 U/L, n (%)	16	76,2
<i>Creatinofosfoquinase (n=17)</i>		
- CPK, mediana (intervalo interquartil) U/L	138	60-369
- CPK >223 U/L, n (%)	7	41,2
<i>TGO (n=21), mediana (intervalo interquartil) U/L</i>	37	33-67
<i>TGP (n=20), mediana (intervalo interquartil) U/L</i>	37,5	25-53,2
<i>Fosfatase alcalina (n=15), mediana (intervalo interquartil) U/L</i>	72	52,5-94
<i>gGT (n=15)</i>		
- gGT, mediana (intervalo interquartil) U/L	62	40-153
- gGT >64 U/L, n (%)	6	40
<i>Bilirrubina total (n=15), mediana (intervalo interquartil) mg/dL</i>	0,4	0,38-0,60
<i>Ureia (n=23)</i>		
- Ureia, mediana (intervalo interquartil) mg/dL	37	22-47,5
- Ureia >53,5 mg/dL, n (%)	4	17,4
<i>Creatinina (n=23)</i>		
- Creatinina, mediana (intervalo interquartil) mg/dL	0,9	0,7-1,1
- Creatinina >1,3 mg/dL, n (%)	4	17,4

As cargas virais do SAS-CoV-2 em naso-orofaringe dos pacientes incluídos estão listadas na Tabela 6.

TABELA 6. Carga viral do SARS-CoV-2 em secreção de naso e orofaringe de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 internados no Hospital Universitário da UFSCar, 2020-21

<b>Carga Viral do SARS-CoV-2 em swab de naso e orofaringe (cópias por teste)</b>				
Paciente	48-72hrs	6-8 dias	10-15 dias	20-25 dias
1	0,0051	0,0032	-	0,0008
3	0,0014	16,9962	11,0513	0,0217
4	1,8304	100,1931	0,2568	0,0014
5	1,4919	0,0235	0,0041	0,0012
6	50208,3330	1166,6363	-	-
7	0,0415	0,1565	0,0024	0,0012
8	0,3249	0,4064	0,0143	0,0343
9	0,0018	0,0013	0,0021	0,0014
10	0,0006	0,0125	0,0022	0,0018
12	0,0003	0,0030	0,0025	0,0023
13	0,2458	0,0016	0,0130	0,0039
14	0,0628	0,0171	0,0009	0,0026
15	3,8937	0,0154	1,5274	0,0110
16	714,7525	513,0817	9,1312	0,0086
17	291,8161	3,3943	0,2703	0,0007
18	230,8779	0,0236	6,1720	0,0094
19	285,6306	246,9247	0,0123	0,0030
20	528,5533	0,0100	0,1922	0,0058
21	4755,7972	255,4815	2479,9865	0,0016
22	287,6904	0,240049	0,0002	
23	46,3673	29,5602	17,8129	0,0582
24	16,2271	11917,5000	5,5815	33,7513
25	2073,4352	0,0008	0,0083	

Em relação à produção de anticorpos neutralizantes um mês após o início dos sintomas, a dosagem foi realizada em 21 pacientes, com títulos positivos (mais de 30% de neutralização) em 95,2% dos pacientes (apenas um paciente com título negativo). A mediana de neutralização foi de 99,3%, com intervalo interquartil de 98,4-99,6%.

Em relação aos desfechos, 91,3% precisaram manter suplementação de O<sub>2</sub> durante a internação, sendo que em 52,2% houve necessidade de máscara com reservatório, não reinalante. A ventilação mecânica não invasiva foi utilizada em 82,6% dos pacientes, sendo necessária intubação orotraqueal e ventilação mecânica invasiva em 26,1% dos pacientes. Dois pacientes evoluíram com o óbito durante a internação hospitalar (8,7%) (Tabela 7).

Uma paciente reinternou por endocardite, falecendo dentro de um ano de internação. Estamos avaliando a evolução de um ano de seguimento dos outros pacientes.

TABELA 7. Evolução dos pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 internados no Hospital Universitário da UFSCar, 2020-21.

<b>Característica</b>		
<i>Suplementação cateter O<sub>2</sub> ou máscara de venturi (n=23), n (%)</i>	21	91,3
<i>Máscara de O<sub>2</sub> com reservatório, não reinalante (n=23), n (%)</i>	12	52,2
<i>Ventilação mecânica não invasiva (n=23), n (%)</i>	19	82,6
<i>Ventilação mecânica invasiva (n=23), n (%)</i>	6	26,1
<i>Óbito hospitalar (n=23), n (%)</i>	2	8,7
<i>Óbito 120 dias (n=23), n (%)</i>	2	8,7
<i>RX de tórax de 1-12 meses (n=8)</i>		
- Anormalidades, n (%)	6	75
- Opacidades de padrão intersticial, n (%)	4	50
- Opacidades de padrão alveolar, n (%)	2	25
- Aumento de área cardíaca, n (%)	2	25
<i>Tomografia de tórax de 2-18 meses (n=12)</i>		
- Anormalidades, n (%)	9	75
- Opacidades em vidro fosco, n (%)	6	50
- Espessamento de septos alveolares, n (%)	5	41,7
- Opacidades de padrão alveolar, n (%)	1	8,3
- Distribuição		
Predomínio em lobos inferiores	5	41,7
Lesões em ambos hemitórax	5	41,7
Predomínio periférico	1	8,3
- Comprometimento do parênquima pulmonar		
Menor que 25%	9	100
<i>Eletrocardiograma em 2-18 meses (n=14)</i>		
- Achados anormais, n (%)	9	64,3
<i>Ecocardiograma em 1-18 meses (n=13)</i>		
- Achados anormais, n (%)	10	64,3
- Fração de ejeção, mediana (intervalo interquartil)	64	59-67
- Fração de ejeção menor que 50%, n (%)	3	23,1
- Hipertrofia ventricular esquerda, n (%)	7	53,8
- Disfunção diastólica de VE, n (%)	4	30,8
- Dilatação VD, n (%)	2	15,4
- Pressão sistólica de artéria pulmonar (n=6)		
Pressão sistólica de artéria pulmonar, mediana (intervalo interquartil)	29	27,2-51,7
Pressão sistólica de artéria pulmonar >40 mmHg, n (%)	2	33,3

## 5.2 Fatores associados a pior prognóstico

### 5.2.1 Fatores associados ao óbito hospitalar e em 120 dias

A Tabela 8 mostra a avaliação das variáveis possivelmente associadas à evolução com o óbito hospitalar e em 120 dias, pois não houve novo óbito após 120 dias da alta hospitalar. Foram selecionadas para a análise multivariada idade, temperatura axilar, pulso radial, pressão arterial média, alterações eletrocardiográficas (frequência cardíaca, duração da onda p, BAV 1 grau), contagem neutrófilos, D-dímero, proteína C reativa, bilirrubina.

TABELA 8 (parte 1) . Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de imagem de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 e associação com óbito hospitalar, 2020-2021 (parte 1)

Característica		Total (n)	Alta (n=21)	Óbito (n=2)	p	
Idade, anos	Media (DP)	23	50.6 (13,6)	81.1 (10,1)	<b>0,006*</b>	
Sexo	Feminino	13	12	1	1,000**	
	Masculino	10	9	1		
Cor/raça	Não Branca	15	14	1	1,000**	
	Branca	8	7	1		
Vacina	Duas ou mais doses	4	3	1	0,324**	
	Não vacinado ou uma dose	19	18	1		
Comorbidade	Cardiovascular	14	12	2	0,502**	
	Sem doença cardiovascular	9	9	0		
	Endocrinológica	15	13	2	0,526**	
	Sem doença endocrinológica	8	8	0		
	Pneumopatia prévia	2	2	0	1,000**	
	Sem pneumopatia	21	19	2		
	Tabagismo	5	4	1	0,395**	
	Sem tabagismo	18	17	1		
	Infecção por HIV	1	1	0	1,000**	
	Sem infecção por HIV	22	20	2		
	Sintomas	Febre	20	18	2	1,000**
		Sem febre	3	3	0	
Cefaleia		16	15	1	0,526**	
Sem cefaleia		7	6	1		
Tontura		20	18	2	1,000**	
Sem tontura		3	3	0		
Anosmia ou ageusia		14	13	1	1,000**	
Sem anosmia ou ageusia		9	8	1		
Coriza		13	11	2	0,486**	
Sem coriza		10	0	0		
Obstrução nasal		7	7	0	1,000**	
Sem obstrução nasal		16	14	2		
Dor de garganta		9	8	1	1,000**	
Sem dor de garganta		14	13	1		
Otalgia		6	6	0	1,000**	
Sem otalgia		17	15	2		
Anorexia		18	16	2	1,000**	
Sem anorexia		5	5	0		
Tosse		23	21	2	1,000**	
Sem tosse		0	0	0		
Expectoração		11	10	1	1,000**	
Sem expectoração		12	11	1		
Dispneia		20	19	1	0,249**	
Sem dispneia		3	2	1		
Dor torácica		13	12	1	1,000**	
Sem dor torácica		10	9	1		
Astenia		21	19	2	1,000**	
Sem astenia		2	2	0		
Mialgia		18	16	2	1,000**	
Sem mialgia		5	5	0		
Palpitações		7	7	0	1,000**	
Sem palpitações		16	14	2		
Vômitos		5	5	0	1,000**	
Sem vômitos		18	16	2		
Diarreia		9	8	1	1,000**	
Sem diarreia		14	13	1		
Dor abdominal		9	9	0	0,502**	
Sem dor abdominal		14	12	2		

n = número de participantes; DP= desvio padrão; \*ANOVA; \*\*Teste Exato de Fisher

TABELA 8 (parte 2). Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de imagem de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 e associação com óbito hospitalar, 2020-2021

Característica		Total (n)	Alta (n=21)	Óbito (n=2)	p	
Temperatura axilar, °C	Média (DP)	23	36,7 (1,19)	35,1 (0,42)	<b>0,071*</b>	
Pulso radial, bpm	Medida (DP)	23	91,5 (10,1)	59,5 (17,7)	<b>0,001*</b>	
Frequência respiratória, rpm	Média (DP)	23	26,9 (6,5)	23,0 (4,2)	0,424*	
Saturação de oxigênio, %	Média (DP)	23	89,5 (5,1)	92,5 (0,7)	0,429*	
Pressão arterial média, mmHg	Média (DP)	23	91,6 (13,4)	67,7 (10,8)	<b>0,024*</b>	
Sinais clínicos	Uso de musculatura acessória	6	6	0	1,000**	
	Sem uso de musculatura acessória	17	15	2		
	Delirium	2	2	0	1,000**	
	Sem delirium	21	19	2		
	Ausculta pulmonar anormal	19	17	2	1,000**	
	Ausculta pulmonar normal	4	4	0		
	Estertores crepitantes	14	13	1	1,000**	
	Sem estertores crepitantes	9	8	1		
	Estertores subcrepitantes	1	1	0	1,000**	
	Sem estertores subcrepitantes	22	20	2		
	Roncos	2	2	0	1,000**	
	Sem roncos	21	19	2		
	Sibilos	1	1	0	1,000**	
	Sem sibilos	22	20	2		
	Diminuição de murmúrio vesicular	11	9	2	0,217**	
	Murmúrio vesicular normal	12	12	0		
	Atrito pleural	1	1	0	1,000**	
	Sem atrito pleural	22	20	2		
	Anormalidades exame cardiovascular	10	9	1	1,000**	
	Exame cardiovascular normal	13	12	1		
	Estase jugular	8	7	1	1,000**	
	Sem estase jugular	15	14	1		
	Abafamento de bulhas	1	1	0	1,000**	
	Sem abafamento de bulhas	22	20	2		
	Edema de membros	1	1	0	1,000**	
	Sem edema de membros	22	20	2		
	Hepatomegalia	1	1	0	1,000**	
	Sem hepatomegalia	22	20	2		
	Radiografia simples de tórax	Alterada	16	16	0	1,000**
		Sem alteração	0	0	0	
	Tomografia de tórax	Alterada	8	6	2	1,000**
		Sem alteração	0	0	0	
Padrão à TC	Opacidades em vidro fosco	8	6	2	1,000**	
	Sem opacidades em vidro fosco	0	0	0		
	Opacidades alveolares	3	3	0	0,464**	
	Sem opacidades alveolares	5	3	2		
	Espessamento septos alveolares	4	3	1	1,000**	
	Sem espessamento septos alveolares	4	3	1		
Distribuição opacidades à TC	Predomínio Periférico	7	5	2	1,000**	
	Sem predomínio periférico	1	1	0		
	Predomínio campos inferiores	4	3	1	1,000**	
	Sem predomínio campos inferiores	4	3	1		
	Bilaterais	6	5	1	0,464**	
	Unilaterais	2	1	1		
Comprometimento à TC	Até 25%	4	2	2	0,429**	
	Mais que 25%	4	4	0		

n = número de participantes; DP= desvio padrão; \*ANOVA; \*\*Teste Exato de Fisher; TC-Tomografia computadorizada

TABELA 8 (parte 3). Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de imagem de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 e associação com óbito hospitalar, 2020-2021

Característica		Total (n)	Alta (n=21)	Óbito (n=2)	p
Eletrocardiograma	Alterado	17	16	1	0,411**
	Normal	5	4	1	
Ritmo ECG	Não sinusal	2	2	0	1,000**
	Sinusal	20	18	2	
Extrassístoles ECG	Sim	3	3	0	1,000**
	Não	19	17	2	
Frequência cardíaca ECG, bpm	Média (DP)	22	83,0 (15,1)	61,0 (24,0)	<b>0,073*</b>
Duração onda P ECG, ms	Média (DP)	19	88,2 (10,2)	110 (14,1)	<b>0,012*</b>
Duração intervalo PR, ms	Mediana (intervalo interquartil)	19	120 (120-160)	235 (120-350)	0,510***
Duração onda QRS, ms	Mediana (intervalo interquartil)	20	80 (80-80)	80 (8-80)	0,543***
Duração intervalo RR, ECG, s	Mediana (intervalo interquartil)	20	0,69 (0,60-0,84)	1,01 (0,72-1,30)	0,229***
Duração intervalo QT, ECG, s	Média (DP)	20	347,8 (46,6)	380 (84,8)	0,394*
Sobrecarga atrial, ECG	Sim	3	3	0	1,000**
	Não	17	15	2	
BAV 1 grau	Sim	1	0	1	<b>0,091**</b>
	Não	21	20	1	
BRE	Sim	1	1	0	1,000**
	Não	21	19	2	
bDASE	Sim	2	2	0	1,000**
	Não	20	18	2	
Alteração repolarização ventricular	Sim	11	10	1	1,000**
	Não	11	10	1	
Área eletricamente inativa	Sim	2	2	0	1,000**
Parâmetros laboratoriais	pH, média (DP)	23	7,41 (0,07)	7,37 (0,03)	0,552*
	pO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> , média (DP) mmHg	23	255 (74,7)	321 (28,9)	0,236*
	pCO <sub>2</sub> , média (DP), mmHg	23	35,4 (6,0)	35,9 (0,4)	0,904*
	HCO <sub>3</sub> , média (DP), mmol/L	23	22,7 (3,7)	20,7 (1,8)	0,464*
	Lactato, média (DP), mmol/L	21	1,97 (0,77)	1,78 (0,05)	0,736*
	Hb, média (DP), g/dL	23	13,3 (1,5)	12,9 (0,8)	0,687*
	Leucócitos, média (DP), cels/mm <sup>3</sup>	23	7508 (3359)	5455 (290)	0,407*
	Neutrófilos, média (DP), cels/mm <sup>3</sup>	23	6682 (2807)	3488 (995)	<b>0,130*</b>
	Linfócitos, média (DP), cels/mm <sup>3</sup>	23	1025 (646)	1142 (95)	0,805*
	Plaquetas, média (DP), unidades/mm <sup>3</sup>	23	205.000 (59.033)	148.000 (9.899)	0,196*
	INR, média (DP)	20	1,09 (0,11)	1,13 (0,27)	0,723*
	TTPA Paciente / normal, média (DP)	19	1,01 (0,34)	1,05 (0,05)	0,894*
	D dímero, média (DP), mg/L	22	1,14 (1,79)	3,08 (0,17)	<b>0,148**</b>
	PCR, média (DP), mg/dL	23	15,0 (8,2)	4,5 (4,6)	<b>0,093*</b>
	DHL, média (DP), U/L	21	388 (130,8)	287 (11,7)	0,308*
	CPK, mediana (intervalo interquartil), U/L	17	138 (57-369)	1283 (91-2475)	0,456***
	TGO, média (DP), U/L	21	49,5 (30,7)	54,5 (26,2)	0,827*
	TGP, média (DP), U/L	20	48,8 (41,8)	28 (2,8)	0,501*
	Fosfatase alcalina, média (DP), U/L	15	79,2 (32,7)	71,0 (31,1)	0,747*
	gGT, média (DP), U/L	15	113 (93,1)	34,5 (19,1)	0,267*
Bilirrubina total, média (DP), mg/dL	16	0,51 (0,20)	0,30 (0,14)	<b>0,147*</b>	
Ureia, média (DP), mg/dL	23	40,1 (39,2)	82,5 (24,7)	0,152*	
Creatinina, média (DP), mg/dL	23	1,20 (1,53)	1,60 (0,71)	0,722*	

n = número de participantes; DP= desvio padrão; \*ANOVA; \*\*Teste Exato de Fisher; \*\*\*Teste de Kruskal-Wallis para dois grupos; ECG-Eletrocardiograma



A Tabela 9 mostra as medicações de uso contínuo e as prescritas durante a internação e sua avaliação quanto à associação com o óbito. O uso prévio de betabloqueadores adrenérgicos e de inibidor da enzima conversora de angiotensina e o não uso de corticoides sistêmicos na admissão hospitalar tiveram possível associação com o óbito. Embora o uso de heparina terapêutica tenha sido utilizado nos dois pacientes que evoluíram para óbito, em ambos o uso foi iniciado após a deterioração clínica.

TABELA 9. Medicações utilizadas nas 48 horas antes da admissão e durante a internação por pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave por SARS-CoV-2 e associação com óbito, HU-UFSCar, 2020-2021

Medicação		Total (n)	Alta (n=21)	Óbito (n=2)	p
AAS	Sim	4	2	2	0,170*
	Não	19	19	0	
Azitromicina	Sim	7	7	0	1,000*
	Não	16	14	2	
Betabloqueador	Sim	4	2	2	<b>0,024*</b>
	Não	19	19	0	
Colchicina	Sim	22	20	2	1,000*
	Não	1	1	0	
Corticoide inalatório	Sim	1	1	0	1,000*
	Não	22	20	2	
Corticoide sistêmico	Sim	21	21	0	<b>0,040*</b>
	Não	2	0	2	
Heparina profilática	Sim	23	21	2	1,000*
	Não	0	0	0	
Heparina terapêutica	Sim	5	3	2	<b>0,040*</b>
	Não	18	18	0	
IBP	Sim	3	3	0	1,000*
	Não	18	16	2	
IECA	Sim	1	0	1	<b>0,091*</b>
	Não	20	1	0	
SABA	Sim	8	8	0	0,526*
	Não	15	13	2	

n = número de participantes; \*Teste Exato de Fisher; IBP=inibidor de bomba de prótons; IECA=inibidor de enzima conversora de angiotensina; SABA=agonistas  $\beta$ 2 adrenérgicos de curta ação

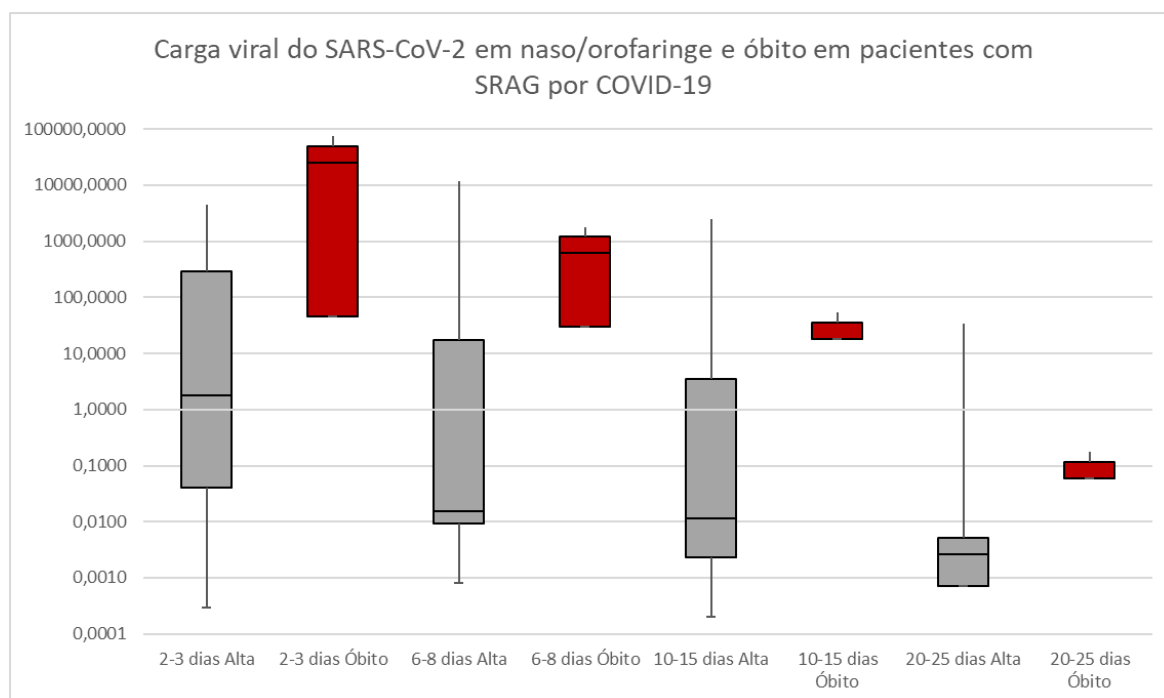
A carga viral do SARS-CoV-2 em swab de nasofaringe e rinofaringe em todas as quatro coletas de seguimento foram também selecionadas para análise multivariada, todas apresentando certa associação com evolução com o óbito  $P < 0,15$  (Tabela 10). A Figura 6 demonstra graficamente a diferença significativa da evolução da carga viral do SARS-COV-2 entre os pacientes que receberam alta e os que faleceram durante a internação. A série temporal ainda será analisada estatisticamente quanto a essa diferença, sendo objeto do produto final da pesquisa.

Figura 6. Box-plot da evolução temporal da carga viral do SARS-CoV-2 em naso/orofaringe de pacientes com SRAG por COVID-19 de acordo com a evolução para alta/óbito.

TABELA 10. Carga viral do SARS-CoV-2 em swab de nasofaringe e orofaringe em pacientes internados por Síndrome Respiratória Aguda Grave por coronavírus-19, e associação com óbito hospitalar, 2020-2021

Tempo da internação	Tempo da internação	Total (n)	Alta (n=21)	Óbito (n=2)	p
Carga viral (SARS-CoV-2),	24-72 horas	23	1,83 (0,04-287,69)	25.127,35 (46,37-50.208,33)	<b>0,156***</b>
Mediana (IIQ) cópias	6-8 dias	23	0,02 (0,01-17,00)	598,10 (29,56-1.166,64)	<b>0,102***</b>
	10-15 dias	21	0,01 (0,00-3,55)	17,81(17,81-17,81)	<b>0,137***</b>
	20-25 dias	20	0,00 (0,00-0,01)	0,06 (0,06-0,06)	<b>0,140***</b>
Log carga viral (SARS-CoV-2),	24-72 horas	23	0,26 (-1,38 – 2,46)	3,18 (1,66 – 4,70)	<b>0,156***</b>
Mediana (IIQ) cópias	6-8 dias	23	-1,63 (-2,00 – 1,23)	2,27 (1,47 – 3,07)	<b>0,102***</b>
	10-15 dias	21	-1,87 (-2,61 – 0,46)	1,25 (1,25 – 1,25)	<b>0,137***</b>
	20-25 dias	20	-2,59 (-2,85 – -2,03)	-1,24 (-1,24 – -1,24)	<b>0,140***</b>

n = número de participantes; DP= desvio padrão; IIQ= intervalo interquartil; \*ANOVA; \*\*Teste Exato de Fisher; \*\*\*Teste de Kruskal-Wallis para dois grupos



### 5.2.2 Análise multivariada dos fatores associados ao óbito hospitalar e em 120 dias

Foram inicialmente selecionados para a análise multivariada de associação com o óbito as seguintes variáveis: idade, temperatura axilar, pulso radial, pressão arterial média, alterações eletrocardiográficas (frequência cardíaca, duração da onda p, BAV 1 grau), contagem neutrófilos, D-dímero, proteína C reativa, bilirrubina, uso de betabloqueadores adrenérgicos, uso de corticoides sistêmicos, uso de inibidor da enzima conversora de

angiotensina e carga viral do sars-cov-2 em secreção de nasofaringe/orofaringe. Seriam necessários pelo menos 10 casos para cada parâmetro estudado para realizar a análise multivariada dos fatores de risco de óbito, e a amostra total de pacientes incluídos foi de 23 pacientes, uma vez que o protocolo teve que ser interrompido. Optamos por não realizar a análise multivariada e aguardar a finalização dos outros desfechos para determinar o método de análise.

Considerando os parâmetros pulso radial e frequência cardíaca redundantes, acreditamos que o pulso radial seja mais adequado por ter p mais estatisticamente significativo (0,001 versus 0,073) e ser de aferição mais rápida e fácil em situação de urgência.

## 6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, os pacientes que evoluíram com o óbito eram mais idosos, tinham tendência a hipotermia, bradicardia e hipotensão arterial. Embora a COVID-19 se expresse particularmente por sintomas respiratórios devido à expressão de receptores da enzima conversora de angiotensina II (ACE2) nas células alveolares, mais de 7,5% das células miocárdicas também expressam esse receptor.<sup>23,24</sup> Pacientes que faleceram por síndrome respiratória aguda grave por SARS-CoV-2 apresentam hipertrofia miocárdica com degeneração parcial, necrose, edema intersticial e infiltrado inflamatório misto (linfócitos T CD4, macrófagos e neutrófilos). A microscopia eletrônica evidencia edema e degeneração de fibras miocárdicas.<sup>25</sup>

Um dos pacientes que evoluíram com o óbito no estudo apresentava alterações eletrocardiográficas (bradicardia, alargamento da onda P e BAV de primeiro grau). O significado das anormalidades detectadas não pôde ser determinado, pois não dispúnhamos de exame anterior para comparação, podendo ser preexistentes. Anormalidades miocárdicas da COVID-19 podem ser devidas a tempestade de citocinas, lesão hipóxica, anormalidades eletrolíticas, ruptura de placa, espasmo coronário e microtrombos, bem como lesão endotelial ou miocárdica direta.<sup>26</sup> Os pacientes que faleceram também apresentaram níveis mais elevados de D dímero e CPK. Em discordância com outros estudos acerca do tema, os pacientes de nossa amostra que foram a óbito apresentaram níveis menores de PCR em comparação aos pacientes com desfechos favoráveis.<sup>26,27</sup>

Outros fatores possivelmente associados ao óbito foram o uso prévio de betabloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina, que também podem denotar doença

cardíaca prévia, e o não uso de corticoide nas primeiras 72 horas de internação, compatível com o encontrado no estudo Recovery.<sup>28</sup>

A carga viral do SARS-CoV-2 apresentou valores predominantemente mais elevados na admissão, se mantendo significativamente mais elevada após uma, duas e três semanas da internação nos pacientes que evoluíram com o óbito, corroborando evidências de que a carga viral está associada ao desfecho desfavorável.<sup>15,29-31</sup>

## 7. CONCLUSÕES

- A carga viral do SARS-CoV-2 estimada pelo método  $\Delta Ct$  em amostras coletadas por swab de nasofaringe e orofaringe se mantém mais elevada (acima de 10) após uma semana de internação em pacientes que evoluem com o óbito.
- Outros fatores associados a pior prognóstico são idade maior que 60 anos, hipotermia, bradicardia, hipotensão, alterações eletrocardiográficas (alargamento da onda p e BAV de 1 grau), contagem neutrófilos abaixo de 5000 células/mm<sup>3</sup>, D-dímero maior que 1 mg/L; PCR menor que 10 mg/dL; e bilirrubina total menor que 0,4 mg/dL.
- Os dois pacientes que evoluíram com o óbito não receberam corticoide nas primeiras 72 horas de internação, e faziam uso de betabloqueadores adrenérgicos.
- Falta avaliar os principais fatores demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, de imagem e de tratamento associados à necessidade de ventilação mecânica não invasiva, de ventilação mecânica invasiva e a sequelas.
- Mais de 95% dos pacientes evoluíram com produção de anticorpos neutralizantes após a SRAG por COVID-19, com mediana de neutralização de 99,3%.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. Mar 2020;579(7798):265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
2. WHO. Rolling Updates on Coronavirus Disease (COVID-19). WHO. Accessed 07/01/2023, 2023. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 03 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
4. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Garout MA, et al. Diverse Immunological Factors Influencing Pathogenesis in Patients with COVID-19: A Review on Viral Dissemination, Immunotherapeutic Options to Counter Cytokine Storm and Inflammatory Responses. *Pathogens*. May 07 2021;10(5)doi:10.3390/pathogens10050565
5. Price LC, McCabe C, Garfield B, Wort SJ. Thrombosis and COVID-19 pneumonia: the clot thickens! *Eur Respir J*. Jul 2020;56(1)doi:10.1183/13993003.01608-2020
6. Iffah R, Gavins FNE. Thromboinflammation in coronavirus disease 2019: The clot thickens. *Br J Pharmacol*. May 2022;179(10):2100-2107. doi:10.1111/bph.15594
7. Gitman MR, Shaban MV, Paniz-Mondolfi AE, Sordillo EM. Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 Pneumonia. *Diagnostics (Basel)*. Jul 15 2021;11(7)doi:10.3390/diagnostics11071270
8. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 03 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3
9. Gold JAW, Wong KK, Szablewski CM, et al. Characteristics and Clinical Outcomes of Adult Patients Hospitalized with COVID-19 - Georgia, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. May 08 2020;69(18):545-550. doi:10.15585/mmwr.mm6918e1
10. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 03 2020;382(12):1177-1179. doi:10.1056/NEJMc2001737
11. Onder G, Rezza G, Brusaferro S. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. *JAMA*. Mar 2020;doi:10.1001/jama.2020.4683
12. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, et al. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. *Diagnostics (Basel)*. Jun 15 2021;11(6)doi:10.3390/diagnostics11061091
13. Buder F, Bauswein M, Magnus CL, et al. Contribution of High Viral Loads, Detection of Viral Antigen and Seroconversion to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infectivity. *J Infect Dis*. Jan 18 2022;225(2):190-198. doi:10.1093/infdis/jiab415
14. Buder F, Bauswein M, Magnus CL, et al. Correction to: Contribution of High Viral Loads, Detection of Viral Antigen and Seroconversion to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infectivity. *J Infect Dis*. Jul 23 2022;doi:10.1093/infdis/jiac123
15. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, 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*. Dec 06 2021;73(11):e4197-e4205. doi:10.1093/cid/ciaa851
16. de la Calle C, Lalueza A, Mancheño-Losa M, et al. Impact of viral load at admission on the development of respiratory failure in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jun 2021;40(6):1209-1216. doi:10.1007/s10096-020-04150-w
17. Zheng S, Fan J, Yu F, 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*. Apr 21 2020;369:m1443. doi:10.1136/bmj.m1443

18. Shlomai A, Ben-Zvi H, Glusman Bendersky A, Shafran N, Goldberg E, Sklan EH. Nasopharyngeal viral load predicts hypoxemia and disease outcome in admitted COVID-19 patients. *Crit Care*. Sep 01 2020;24(1):539. doi:10.1186/s13054-020-03244-3
19. Ju B, Zhang Q, Ge J, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*. Aug 2020;584(7819):115-119. doi:10.1038/s41586-020-2380-z
20. Bustos P, Tambley C, Acevedo A, et al. Quantitative detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal samples from infected patients with mild disease. *J Med Virol*. 04 2021;93(4):2439-2445. doi:10.1002/jmv.26761
21. Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. Mar 2020;doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2
22. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (CDC) 80 (2020).
23. Esler M, Esler D. Can angiotensin receptor-blocking drugs perhaps be harmful in the COVID-19 pandemic? *J Hypertens*. May 2020;38(5):781-782. doi:10.1097/HJH.0000000000002450
24. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. Apr 2020;14(2):185-192. doi:10.1007/s11684-020-0754-0
25. Yao XH, Li TY, He ZC, et al. [A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. May 08 2020;49(5):411-417. doi:10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193
26. Ranucci M, Ballotta A, Di Dedda U, et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J Thromb Haemost*. Jul 2020;18(7):1747-1751. doi:10.1111/jth.14854
27. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. Jun 16 2020;75(23):2950-2973. doi:10.1016/j.jacc.2020.04.031
28. Horby P, Lim WS, Emberson JR, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. Feb 25 2021;384(8):693-704. doi:10.1056/NEJMoa2021436
29. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. Jul 09 2020;383(2):120-128. doi:10.1056/NEJMoa2015432
30. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. May 02 2020;395(10234):1417-1418. doi:10.1016/S0140-6736(20)30937-5
31. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med*. Sep 2020;8(9):e70. doi:10.1016/S2213-2600(20)30354-4

## **9. ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **PROJETO DE PESQUISA:**

#### **COVID-19 NO MUNICÍPIO DE SÃO CARLOS: ESTUDO DE COORTES**

#### **PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO DGE-UFSCAR:**

- PROF. DR. CAIO CESAR DE MELO FREIRE (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO, CCBS, UFSCAR)

#### **PESQUISADORA PRINCIPAL NO HU-UFSCAR:**

- PROFA. DRA. SIGRID DE SOUSA SANTOS (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

#### **PESQUISADORES ENVOLVIDOS:**

- PROF. DR. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO, CCBS, UFSCAR)

- DRA. BARBARA REZENDE MARTINS (HU-UFSCAR)

- DRA. CLÁUDIA CRISTINA PUPO (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- CRISLAINE APARECIDA ANTONIO MESTRE (VIGEP-SÃO CARLOS)

- PROF. DR. FÁBIO FERNANDES NEVES (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- PROF. DR. HENRIQUE POTT JUNIOR (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- KATIA REGINA SPILLER (VIGEP-SÃO CARLOS)

- PROF. DR. PAULO DE OLIVEIRA VASCONCELOS FILHO (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- PROFA. DRA. FABÍOLA PAULA GALHARDO RIZZATTI (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- PROFA. DRA. LUCIMAR RETTO DA SILVA DE AVÓ (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- DRA. MARIA PAULA BARBIERI D ELIA (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- PROFA. DRA. SANDRA REGINA COSTA MARUYAMA (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO, CCBS, UFSCAR)

- PROFA. DRA. SILVANA GAMA FLORÊNCIO CHACHÁ (DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CCBS, UFSCAR)

- NATHALIA GARDIN PESSOA (GRADUAÇÃO EM MEDICINA - UFSCAR)

- DENISE SCATOLINI (SEÇÃO DE APOIO À VIGILÂNCIA EM SAÚDE E INFORMAÇÃO, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SÃO CARLOS, SP.

- PROF. DR. LUIZ TADEU MORAES FIGUEIREDO (CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

- DR.A CAROLINA TONIOLO ZENATTI (IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO CARLOS)

#### **INSTITUIÇÕES COLABORADORAS:**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA - CCBS - UFSCAR

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO - CCBS - UFSCAR



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SÃO CARLOS, SP

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO CARLOS

EM DEZEMBRO DE 2019, UM NOVO VÍRUS FOI DESCOBERTO EM WUHAN, CHINA. ESTE VÍRUS, CHAMADO CORONAVÍRUS OU SARS-COV-2, PODE CAUSAR SINTOMAS PARECIDOS COM UMA GRIPE E PODE TAMBÉM CAUSAR PNEUMONIA. NA MAIOR PARTE DAS PESSOAS OS SINTOMAS SÃO LEVES, MAS EM ALGUNS INDIVÍDUOS PODE CAUSAR DOENÇA GRAVE E MESMO MORTE. ESTE VÍRUS DISSEMINOU-SE RAPIDAMENTE PARA MAIS DE 45 PAÍSES, INCLUSIVE O BRASIL, CAUSANDO ALARME. NO ENTANTO, POUCO SE SABE A RESPEITO DESTE NOVO VÍRUS, PARA O QUAL AINDA NÃO FOI DESENVOLVIDA VACINA E NEM SE ENCONTROU TRATAMENTO ESPECÍFICO. PARA ENTENDER MELHOR A TRANSMISSÃO, A GRAVIDADE DA DOENÇA E OS RISCOS PARA A POPULAÇÃO EM GERAL SERÁ PRECISO ESTUDAR A INTERAÇÃO ENTRE O VÍRUS E O ORGANISMO HUMANO. ASSIM, CIENTISTAS DE TODO O MUNDO ESTÃO TENTANDO ENTENDER COMO O VÍRUS SE COMPORTA DENTRO DO CORPO HUMANO.

**ESTA PESQUISA PRETENDE ESTUDAR COMO O CORONAVÍRUS (SARS-COV-2) SE DISTRIBUI NA CIDADE DE SÃO CARLOS, COMO TEM SIDO TRANSMITIDO, COMO A DOENÇA COVID-19 AFETA O ORGANISMO HUMANO. TAMBÉM PROCURA ENTENDER QUAIS AS RAZÕES FAZEM A DOENÇA SER MAIS GRAVE EM ALGUMAS PESSOAS.**

DESTA FORMA DIVERSOS PESQUISADORES FORMARAM GRUPOS NA UFSCAR, CADA GRUPO COM O OBJETIVO DE AVALIAR COM MAIS DETALHE UM DIFERENTE ASPECTO DA COVID-19 EM SÃO CARLOS:

1. SERÁ QUE A QUANTIDADE DE VÍRUS ELIMINADA NAS SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS DETERMINA MAIOR GRAVIDADE DA DOENÇA? HÁ RELAÇÃO ENTRE MINHA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E COMO A DOENÇA SE DESENVOLVE EM MIM? FICAREI RESISTENTE À COVID DEPOIS DE TER A DOENÇA?
2. QUAIS AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES QUE A COVID-19 FAZ NOS ÓRGÃOS COMO PULMÃO E CORAÇÃO?
3. COMO SE DISTRIBUI A DOENÇA POR CORONAVÍRUS-19 NO MUNICÍPIO DE SÃO CARLOS E REGIÃO?
4. COMO O VÍRUS AFETARÁ O ORGANISMO DAS PESSOAS NA REGIÃO DE SÃO CARLOS? COMO SERÁ AS CARACTERÍSTICAS DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA EM NOSSO MUNICÍPIO?

O SENHOR(A) ESTÁ SENDO CONVIDADO(A) A PARTICIPAR DESTA PESQUISA PORQUE TEVE O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA COVID-19, TEM PELO MENOS 18 ANOS DE IDADE E TEVE INDICAÇÃO DE INTERNAÇÃO HOSPITALAR.

CASO O(A) SENHOR(A) CONCORDE EM PARTICIPAR OS SEUS DADOS MÉDICOS, INCLUINDO OS AS COISAS QUE ACONTECEREM COM A SUA SAÚDE DURANTE SUA INTERNAÇÃO E RESULTADOS DE EXAMES DE SANGUE E DE EXAMES DE IMAGEM (ELETROCARDIOGRAMA, TOMOGRAFIAS E RAIOS-X) REALIZADOS AO LONGO DE SUA INTERNAÇÃO SERÃO ARMAZENADOS PARA ANÁLISE. DEPOIS DA ALTA HOSPITALAR VOCÊ TERÁ SEGUIMENTO EM AMBULATÓRIO APÓS 30 DIAS, 45 DIAS E COM 120 DIAS DO INÍCIO DOS SINTOMAS.

ALÉM DOS EXAMES PROGRAMADOS PARA QUALQUER PACIENTE INTERNADO POR COVID-19, SERÃO REALIZADOS MAIS OS SEGUINTE PROCEDIMENTOS:

1 – COLETA DE MATERIAL DE NASOFARINGE E OROFARINGE (FUNDO DO NARIZ E DA GARGANTA) TIPO DE COTONETE (SWAB) COM 2-3 DIAS DE INTERNAÇÃO, COM 6-7 DIAS DE INTERNAÇÃO, COM 10-14 DIAS DE INTERNAÇÃO E COM 20 A 24 DIAS DE INTERNAÇÃO, PARA VER SE A QUANTIDADE DE VÍRUS NAS FASES INICIAIS DA DOENÇA AFETA A GRAVIDADE DA DOENÇA. COLETA DE 5ML DE SANGUE COM 30 DIAS DE SEGUIMENTO PARA SABER SE VOCÊ FICOU “IMUNE” À DOENÇA (PROJETO I)

2 – REALIZAÇÃO DE ELETROCARDIOGRAMA E TOMOGRAFIA DE TÓRAX SEM CONTRASTE APÓS 10-14 DIAS DE DOENÇA, ASSIM COMO SERÃO REPETIDOS ESSES EXAMES COM 120 DIAS DE DOENÇA, JUNTAMENTE COM EXAME QUE AVALIA O FUNCIONAMENTO DO SEU CORAÇÃO (ECOCARDIOGRAMA), PARA VERIFICAR SE HÁ ALGUMA COMPLICAÇÃO AGUDA OU SE FICOU ALGUM DEFEITO DE FUNCIONAMENTO NO SEU CORAÇÃO OU NOS SEUS PULMÕES APÓS A DOENÇA (PROJETO III).

3 – OS DADOS DA LOCALIZAÇÃO DE SUA MORADIA SERÃO AVALIADOS NO MAPA PARA VERIFICAR QUAIS OS FATORES FIZERAM VOCÊ PEGAR A DOENÇA, SE AS PESSOAS QUE PEGARAM A DOENÇA EM SÃO CARLOS TIVERAM EXPOSIÇÃO A LUGARES EM COMUM NA CIDADE (PROJETO IV).

4 – POR FIM, OS DADOS DE COMO FOI SEU TRATAMENTO E SE HOUVE OU NÃO COMPLICAÇÕES SERÃO TAMBÉM ESTUDADOS, PARA ENTENDER MELHOR A DOENÇA (PROJETO IV).

NOSSO PRINCIPAL OBJETIVO É AVALIAR SUA SAÚDE DE UMA FORMA MAIS COMPLETA POSSÍVEL, E AO MESMO TEMPO GARANTIR QUE NÃO HAJA EXCESSO DE DOCUMENTOS, AVALIAÇÕES E EXAMES, ENGLOBANDO TODOS OS PROJETOS EM UM ÚNICO ESTUDO, E APROVEITANDO TODOS OS EXAMES JÁ REALIZADOS NA ROTINA HOSPITALAR DE TRATAMENTO, PARA SEU CONFORTO.

A SUA IDENTIDADE SERÁ MANTIDA SOB SIGILO. SEUS DADOS SERÃO TRATADOS DE FORMA ANÔNIMA E CONFIDENCIAL, OU SEJA, EM NENHUM MOMENTO SERÁ DIVULGADO SEU NOME EM QUALQUER FASE DO ESTUDO. QUANDO FOR NECESSÁRIO EXEMPLIFICAR DETERMINADA SITUAÇÃO, SUA PRIVACIDADE SERÁ ASSEGURADA. OS DADOS COLETADOS PODERÃO TER SEUS RESULTADOS DIVULGADOS EM EVENTOS, REVISTAS E/OU TRABALHOS CIENTÍFICOS, MAS SEMPRE MANTENDO SUA IDENTIDADE SOB SIGILO.

A PARTICIPAÇÃO NESTA PESQUISA PODE INCORRER EM UM RISCO SUBJETIVO, POIS TANTO AS COLETAS DE MATERIAL DE NASOFARINGE E OROFARINGE E A COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO EM VOLUME ADICIONAL PARA OS TESTES A SEREM FEITOS NA PESQUISA, QUANTO O PRÓPRIO FATO DE ESTAR SENDO INCLUÍDO EM UMA PESQUISA NO MOMENTO EM QUE O SENHOR(A) ESTÁ SE SENTINDO DOENTE, PODEM REMETER A ALGUM DESCONFORTO E FAZER COM QUE VOCÊ TENHA SENTIMENTOS DESAGRADÁVEIS.

O ELETROCARDIOGRAMA PRECISA SER REALIZADO EM REPOUSO, COM O SENHOR DEITADO, SEM SE MEXER, O QUE TAMBÉM PODE SER DESCONFORTÁVEL.

NA COLETA DE SECREÇÃO NASAL, PODE HAVER DESCONFORTO, CAUSANDO LACRIMEJAMENTO E PROVOCANDO ESPIRROS, EMBORA SEJA UM PROCESSO RÁPIDO (MENOS QUE 1MINUTO) E INDOLOR.

O ECOCARDIOGRAMA USA UMA GELATINA POUCO FRIA NO TÓRAX E UM APARELHO QUE PERMITE VER O FUNCIONAMENTO DO SEU CORAÇÃO. NÃO HÁ DOR, NEM INVASÃO DA PELE. NO MÁXIMO O DESCONFORTO DE TER QUE TIRAR A CAMISA E FICAR COM O TÓRAX NÚ.

CASO ALGUMAS DESSAS POSSIBILIDADES OCORRAM, O SENHOR (A) PODERÁ OPTAR PELA SUSPENSÃO IMEDIATA DA SUA PARTICIPAÇÃO.

O(A) SENHOR (A) NÃO TERÁ NENHUM CUSTO OU COMPENSAÇÃO FINANCEIRA AO PARTICIPAR DO ESTUDO. TODOS OS SEUS GASTOS, GERADOS PELA SUA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA, SERÃO RESSARCIDOS DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO CNS Nº466/2012. ESTÁ PREVISTO O DIREITO À JUSTIÇA, À ASSISTÊNCIA E À INDENIZAÇÃO A QUALQUER EVENTUAL DANO DECORRENTE DA PESQUISA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO CNS Nº 466/2012, ITEM IV.3, LETRA H. ESTE TRABALHO PODERÁ CONTRIBUIR NA AMPLIAÇÃO DO CONHECIMENTO SOBRE A DOENÇA PELO CORONAVÍRUS (COVID-19).

OUTRAS PESSOAS PODERÃO SE BENEFICIAR DOS RESULTADOS DESTES TRABALHOS, POIS O CONHECIMENTO ACERCA DA INTERAÇÃO DO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 E O ORGANISMO HUMANO, BEM COMO A DISTRIBUIÇÃO DESTES VÍRUS NA NOSSA REGIÃO, PODEM AJUDAR NA IMPLEMENTAÇÃO DE MEDIDAS DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO.

A PARTICIPAÇÃO NESTE TRABALHO É VOLUNTÁRIA. O(A) SENHOR(A) PODERÁ, A QUALQUER MOMENTO DESISTIR DE PARTICIPAR E RETIRAR O SEU CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR DA PESQUISA, SEM QUE ISTO LHE TRAGA QUALQUER CONSEQÜÊNCIA AO SEU CUIDADO OU À SUA RELAÇÃO COM OS PESQUISADORES ENVOLVIDOS OU COM AS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES DESTA PESQUISA. PODE SE RECUSAR A REALIZAR QUALQUER PARTE DA PESQUISA, SE ASSIM LHE CONVIER. NÃO ESTÁ PREVISTA NENHUMA COMPENSAÇÃO FINANCEIRA PELA PARTICIPAÇÃO NESTA PESQUISA.

O (A) SENHOR (A) RECEBERÁ UMA VIA DESTES TERMOS, RUBRICADA EM TODAS AS PÁGINAS PELO PESQUISADOR, ONDE CONSTA O TELEFONE E O ENDEREÇO DO PESQUISADOR PRINCIPAL. O (A) SENHOR (A) PODERÁ TIRAR SUAS DÚVIDAS SOBRE O PROJETO E SUA PARTICIPAÇÃO AGORA OU A QUALQUER MOMENTO. TAMBÉM PODE ENTRAR EM CONTATO CASO TENHA QUALQUER PROBLEMA DE SAÚDE, A QUALQUER MOMENTO.

DECLARO QUE ENTENDI OS OBJETIVOS, RISCOS E BENEFÍCIOS DE MINHA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA E CONCORDO EM PARTICIPAR. O PESQUISADOR ME INFORMOU QUE O PROJETO FOI APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA UFSCAR QUE FUNCIONA NA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, LOCALIZADA NA RODOVIA WASHINGTON LUIZ, KM. 235 - CAIXA POSTAL 676 - CEP 13.565-905 - SÃO CARLOS - SP – BRASIL. FONE (16) 3351-8028. ENDEREÇO ELETRÔNICO: CEPHUMANOS@UFSCAR.BR

O CEP TEM POR FINALIDADE CUMPRIR E FAZER CUMPRIR AS DETERMINAÇÕES DA RESOLUÇÃO 466/12, DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE NO QUE DIZ RESPEITO AOS ASPECTOS ÉTICOS DAS PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS, SOB A ÓTICA DO INDIVÍDUO E DAS COLETIVIDADES, TENDO COMO REFERENCIAIS BÁSICOS DA BIOÉTICA: AUTONOMIA, NÃO MALEFICÊNCIA, BENEFICÊNCIA E JUSTIÇA,

ENTRE OUTROS, E VISA ASSEGURAR OS DIREITOS E DEVERES QUE DIZEM RESPEITO À COMUNIDADE CIENTÍFICA, AOS SUJEITOS DA PESQUISA E AO ESTADO.

SÃO CARLOS, / /

ASSINATURA.....

NOME DO PARTICIPANTE: .....

SEXO: M  F  DATA DE NASCIMENTO: ...../...../.....

RG: ..... ÓRGÃO EXP: .....

ENDEREÇO:..... NO ..... COMPL: .....

BAIRRO:..... CIDADE: ..... EST: .....

CEP: ..... TELEFONE: .....

EMAIL: .....

---

DR.<sup>A</sup> SIGRID DE SOUSA DOS SANTOS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA - UFSCAR  
RODOVIA WASHINGTON LUIS, KM 235 - Cx. POSTAL 676  
CEP 13565-905 - SÃO CARLOS/SP TELEFONE: (16) 99702-5700

## 10. ANEXO II. APROVAÇÃO NO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COVID-19 NO MUNICÍPIO DE SÃO CARLOS: ESTUDO DE COORTES

**Pesquisador:** Sigrid De Sousa dos Santos

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 34344520.8.0000.5504

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.177.581

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de coorte longitudinal prospectivo de pacientes internados por COVID-19 no HU-UFSCar, englobando análise virológica (carga viral nasofaringe e reto, cepa viral), imunológica (produção de anticorpos neutralizantes), de marcadores laboratoriais de lesão cardíaca e de trombofilia, clínica, tomográfica, eletrocardiográfica, e de predisposição genética. Também procurará observar o padrão de distribuição espacial de pacientes internados com COVID-19. Serão avaliados pacientes internados no HU-UFSCar, que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, entre os meses de junho de 2020 e junho de 2024 (período máximo), que atendam aos seguintes requisitos: Idade  $\geq$  18 anos; Febre aferida ou não medida; Tosse ou dor de garganta ou coriza ou dificuldade respiratória; Duração de sintomas de até 14 dias; Sinais de insuficiência respiratória que indiquem internação (qualquer um) (FR  $>$  30 rpm, Saturação  $<$  90% em ar ambiente, PaO<sub>2</sub>  $<$  60 mmHg em AA, Grad A-a  $>$  20 mmHg), RT-PCR reagente para SARS-CoV-2 em secreção respiratória. Para a análise espacial entrarão no estudo todos os pacientes internados por COVID-19 em São Carlos. O projeto tem como desfecho primário - Quantificação da carga viral em nasofaringe e tempo para negatificação da carga viral em nasofaringe; Óbito; Ventilação mecânica invasiva; Tempo para negatificação Carga viral mucosa retal; Complicações cardiovasculares, de coagulação e pulmonares.

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235

**Bairro:** JARDIM GUANABARA

**CEP:** 13.565-905

**UF:** SP

**Município:** SAO CARLOS

**Telefone:** (16)3351-9885

**E-mail:** cephumanos@ufscar.br



**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

- Avaliar a associação entre a evolução da carga viral do SARS-CoV-2 estimada pelo método Ct em amostras coletadas por swab de narinas, orofaringe e rinofaringe e o prognóstico de pacientes com SRAG por COVID internados no HU-UFSCar e seus fatores associados;
- Avaliar a presença de material genético do SARS-CoV-2 em swab retal de pacientes com COVID-19 internados na Enfermaria de Clínica Médica do HU- UFSCar para tratamento desta infecção;
- Avaliar a frequência de uso de ventilação mecânica não invasiva (VMNI), de ventilação mecânica invasiva (VMI), de óbito e de sequelas em pacientes com SRAG por COVID.
- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes contra COVID-19 e sua correlação com os desfechos desfavoráveis: necessidade de VMNI, necessidade de VMI, óbito e sequelas;
- Avaliar os principais fatores demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, de imagem e de tratamento associados à necessidade de ventilação mecânica não invasiva, de ventilação mecânica invasiva, ao óbito e as sequelas em pacientes com SRAG por COVID;
- Avaliar se anomalias no eletrocardiograma e elevações de troponina na admissão de pacientes hospitalizados pelo COVID-19 são preditoras de desfechos desfavoráveis na internação e após 4 meses dos pacientes sobreviventes;
- Avaliar se pacientes hospitalizados por COVID-19 e com achados tomográficos de padrões "clássico" ou "provável" ou "indeterminado" para COVID-19 na tomografia inicial são preditores de desfechos desfavoráveis na internação e após 4 meses dos pacientes sobreviventes;
- Avaliar o padrão de distribuição espacial de casos de síndrome respiratória aguda grave por COVID-19 diagnosticados no município de São Carlos, ao longo do período epidêmico, por até três anos;
- Identificar marcadores genéticos associados a progressão da Covid-19.

**Objetivo Secundário:**

- Avaliar o tempo para detecção em swab retal do material genético do SARS-CoV-2 a partir dos sintomas iniciais da infecção;
- Avaliar o tempo para detecção em swab nasofaríngeo do material genético do SARS-CoV-2 a partir dos sintomas iniciais da infecção;
- Avaliar fatores associados ao tempo para detecção em swab retal do material genético do SARS-CoV-2 a partir dos sintomas iniciais da infecção;
- Avaliar fatores associados ao tempo para detecção em swab nasofaríngeo do material genético do SARS-CoV-2 a partir dos sintomas iniciais da infecção.
- Investigar as principais complicações cardiovasculares, de coagulação e pulmonares desenvolvidas em pacientes hospitalizados por COVID-19 e os fatores associados a esse desfecho;
- Avaliar se há associação

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9685

E-mail: cephumanos@ufscar.br

do uso de medicações já tomadas por esses pacientes com a ocorrência de complicações cardiovasculares (trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, obstrução arterial), pulmonares agudas e sequelares (pneumonia, SARA e fibrose pulmonar)• Avaliar quais os principais fatores associados a distribuição espacial de casos de síndrome respiratória aguda grave por COVID-19 diagnosticados no município de São Carlos. • Acompanhar os pacientes durante a vigência do projeto para analisar marcadores associados a outras doenças infecciosas. • Avaliar a estrutura genética populacional do pacientes admitidos no estudo de coorte. • Harmonizar diversos subprojetos, de modo a não submeter o participante a excesso de documentos, avaliações e exames, englobando todos os subprojetos em um único estudo longitudinal, com harmonia entre as partes.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**A participação nesta pesquisa pode incorrer em um risco subjetivo, pois tanto as coletas de material de nasofaringe e orofaringe, a coleta de cotonete retal e a coleta de sangue periférico em volume adicional para os testes a serem feitos na pesquisa, quanto o próprio fato de estar sendo incluído em uma pesquisa no momento em que o participante se sente doente, podem remeter a algum desconforto físico e fazer com que ele tenha sentimentos desagradáveis. O eletrocardiograma precisa ser realizado em repouso, com o participante deitado, sem se mexer, o que também pode ser desconfortável. Na coleta de secreção nasal, pode haver desconforto, causando lacrimejamento e provocando espirros, embora seja um processo rápido (menos que 1 minuto) e indolor. Desconforto também pode ocorrer durante a coleta de material pelo ânus, embora seja um processo indolor que não cause ferimentos.o ecocardiograma usa uma gelatina pouco fria no tórax e um aparelho que permite ver o funcionamento cardíaco. Não há dor, nem invasão da pele. No máximo o desconforto do paciente ter

**Benefícios:**O protocolo não tem custo nem compensação financeira. O benefício indireto é a contribuição na ampliação do conhecimento sobre a doença pelo coronavírus (covid-19).

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto é de grande relevância social e científica e poderá trazer contribuições valiosas no entendimento da infecção causada pelo COVID-19.

-Os pesquisadores destacam que a equipe de pesquisadores está apta a lidar com pacientes internados em enfermarias de Clínica Médica para tratamento de doenças infecciosas.

<b>Endereço:</b> WASHINGTON LUIZ KM 235	
<b>Bairro:</b> JARDIM GUANABARA	<b>CEP:</b> 13.565-905
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO CARLOS
<b>Telefone:</b> (16)3351-9885	<b>E-mail:</b> cephumanos@ufscar.br



UFSCAR - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SÃO CARLOS



Continuação do Parecer: 4.177.581

-O cronograma apresentado tem previsão de Admissão de participantes no estudo a partir de 15/07/2020 entretanto este projeto só poderá dar início a coleta de dados após aprovação deste CEP.

-Foi descrito no subprojeto III que a todo paciente incluso no subprojeto I, será ofertada a possibilidade de realizar conjuntamente o subprojeto II, para evitar sobrecarga de exames sobre um mesmo paciente, e permitir o compartilhamento de informações entre os projetos.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram incluídos os seguintes documentos de apresentação obrigatória: Folha de rosto devidamente assinada; projeto com informações básicas da plataforma, Projeto Completo; carta de anuência da secretaria municipal da Saúde; e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido. No novo TCLE apresentado os pesquisadores explicitam:

1-"NOSSO PRINCIPAL OBJETIVO É AVALIAR SUA SAÚDE DE UMA FORMA MAIS COMPLETA POSSÍVEL, E AO MESMO TEMPO GARANTIR QUE NÃO HAJA EXCESSO DE DOCUMENTOS, AVALIAÇÕES E EXAMES, ENGLOBALANDO TODOS OS PROJETOS EM UM ÚNICO ESTUDO, E APROVEITANDO TODOS OS EXAMES JÁ REALIZADOS NA ROTINA HOSPITALAR DE TRATAMENTO, PARA SEU CONFORTO"

2-"O(A) SENHOR (A) NÃO TERÁ NENHUM CUSTO OU COMPENSAÇÃO FINANCEIRA AO PARTICIPAR DO ESTUDO. TODOS OS SEUS GASTOS, GERADOS PELA SUA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA, SERÃO RESSARCIDOS DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO CNS Nº466/2012."

3-"ESTÁ PREVISTO O DIREITO À JUSTIÇA, À ASSISTÊNCIA E À INDENIZAÇÃO A QUALQUER EVENTUAL DANO DECORRENTE DA PESQUISA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO CNS Nº 466/2012, ITEM IV.3, LETRA H".

#### Recomendações:

Este CEP faz as seguintes recomendações:

1- Solicita-se constar em ambas as vias do TCLE nome, endereço, contato telefônico e horário de funcionamento do CEP responsável pelo estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d). Para melhor informar o participante da pesquisa, solicita-se incluir no TCLE uma breve descrição do que é o CEP e qual sua função no estudo.

2- O documento apresentado solicita o número do RG do participante. Considerando que o TCLE tem a função de informar e respeitar a autonomia do participante de pesquisa. Solicita-se a retirada desse campo.

3- solicita-se a impressão do TCLE em frente e verso e, quando não for possível, as páginas

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9885

E-mail: cephumanos@ufscar.br





Continuação do Parecer: 4.177.581

devem ser enumeradas da seguinte forma: 1/4; 2/4; 3/4; 4/4, nesse caso deve ter um espaço para as rubricas do pesquisador e participante da pesquisa em cada página;

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Este CEP considera que o projeto está adequado:

- 1-Foi explicitado no TCLE sobre o direito ao ressarcimento de despesas decorrentes da participação e forma de cobertura das despesas. (Resolução CNS nº 466/2012, Item IV.3, letra g).
- 2-Foi explicitado ao participante da pesquisa o direito a justiça e/ou indenização a danos decorrentes da participação na pesquisa (Resolução CNS nº 466/2012, Item IV.3, letra h).
- 3-foi esclarecido no TCLE a informação que a todo paciente incluso no projeto será evitada pela equipe envolvida no projeto, a sobrecarga de exames sobre um mesmo paciente, e permitir o compartilhamento de informações entre os projetos e a rotina de exames do hospital.
- 4-As cartas de autorização da instituições participantes (Hospital Universitário e Irmandade de Santa Casa de São Carlos) foram anexadas.
- 5-Atender as recomendações deste CEP descritas no item "Recomendações".

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O parecer do relator foi apreciado por uma câmara técnica, conforme recomendações da Conep para análise e tramitação de projetos relacionados à Covid-19.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1573614.pdf	23/07/2020 00:38:18		Aceito
Outros	PARECER_FINAL_HUUFSCar1.pdf	23/07/2020 00:36:34	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito
Outros	Carta_de_autorizacao_Santa_Casa.pdf	23/07/2020 00:29:00	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Longitudinal_1.pdf	23/07/2020 00:24:17	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Long_1.pdf	23/07/2020 00:20:39	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9885

E-mail: cephumanos@ufscar.br



UFSCAR - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SÃO CARLOS



Continuação do Parecer: 4.177.581

Outros	Resposta_CEP1.pdf	23/07/2020 00:18:33	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito
Declaração de concordância	Carta_VIGEP_SC.pdf	30/06/2020 15:54:53	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaRosto_covid_long.pdf	30/06/2020 15:12:55	Sigrig De Sousa dos Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO CARLOS, 28 de Julho de 2020

---

Assinado por:  
ADRIANA SANCHES GARCIA DE ARAUJO  
(Coordenador(a))

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9685

E-mail: oephumanos@ufscar.br

## **11. ANEXO III - REFLEXÃO SOBRE O PROCESSO ENSINO-APRENDIZAGEM**

A escolha da medicina como um novo desafio para minha vida profissional e pessoal foi durante todo o decorrer dos anos um processo de evolução e superação inigualável. Aprendi que ser médico e ter um raciocínio clínico vai além dos conhecimentos técnicos. É necessário ir além da doença, olhar o paciente em todas as suas nuances e entender assim todo o processo que o levou até ali.

Durante os seis anos de medicina UFSCar me envolvi com as atividades acadêmicas e também com a parte política e administrativa do curso. Representei minha turma no conselho de curso e durante a pandemia, quando as atividades foram suspensas por muitos meses, pude fazer parte do grupo de alunos que se mobilizou para que pudéssemos retornar as unidades de saúde e retomar nossos atendimentos. Por dois anos tive o prazer de coordenar as atividades da Liga de Infectologia da UFSCar ao lado da minha mentora e orientadora Sigrid, participando da organização de aulas, simpósios e campanhas que foram de extrema importância na minha formação profissional e aquisição de habilidades interpessoais de liderança e trabalho em equipe.

Ao longo do curso tive contato com profissionais que me inspiraram e me acolheram e com certeza fizeram toda a diferença nessa trajetória. Nas atividades de pequenos grupos tive a oportunidade de aprender e crescer com meus colegas de classe e conhecer os amigos que certamente levarei por toda a vida.

A pandemia em 2020 nos deixou cercados de insegurança e um conflito de sentimentos. Entre o medo do contágio e a vontade de atuar no cuidado dos pacientes veio a oportunidade única de participar do projeto “Plano de ação para a realização de testes diagnósticos de COVID-19 na população e nos profissionais da saúde de São Carlos e região”. Nos quase dois anos de projeto tive a honra de trabalhar com profissionais dedicados que me ajudaram em cada detalhe durante a execução dos testes e no desenvolvimento da iniciação científica que resultou neste trabalho de conclusão de curso.

Encerro mais essa etapa da minha vida profissional com a certeza de que o curso de medicina é só a “ponta do iceberg” e que a busca por conhecimento deve ser contínua. Mantenho vivo o desejo que me motivou a iniciar essa trajetória, de cuidar da saúde das pessoas da melhor forma possível oferecendo sempre o meu melhor.

Nathalia Gardin Pessoa

## 12. ANEXO IV. AVALIAÇÃO DA ORIENTADORA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

### AVALIAÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso, produzido pela estudante NATHALIA GARDIN PESSOA sob minha orientação e coorientação dos docentes de Anderson Ferreira da Cunha e Caio Cesar de Melo Freire, foi avaliada por mim e aprovada em 18 de janeiro de 2023:

---

Profa. Dra. Sigrid De Sousa dos Santos

Orientadora pedagógica

Universidade Federal de São Carlos

São Carlos, SP, 17/01/2023