

Prevalência de Influenza A, vírus sincicial respiratório e SARS-CoV-2 em pacientes com síndrome respiratória aguda grave em Passo Fundo, Rio Grande do Sul

Prevalence of Influenza A, respiratory syncytial virus and SARS-CoV-2 in patients with severe acute respiratory syndrome in Passo Fundo, Rio Grande do Sul

Beatriz de Albuquerque Bernardi¹, Patrícia Marcolin¹, Ivana Loraine Lindemann², Renata dos Santos Rabello³, Shana Ginar da Silva⁴, Gustavo Olszanski Acrani⁵, Jossimara Poletini⁶

Resumo

A síndrome respiratória aguda grave (SRAG) é caracterizada por sintomas de febre alta, tosse e dispneia, e, na maioria dos casos, relacionada a uma quantidade reduzida de agentes infecciosos. O objetivo foi avaliar a prevalência dos vírus respiratórios Influenza A (FluA), vírus sincicial respiratório (RSV) e do novo coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes com internação hospitalar por SRAG. Estudo transversal, com pacientes em internação hospitalar com SRAG entre novembro de 2021 e maio de 2022. Dados sociodemográficos e clínicos e amostras da nasofaringe foram coletados/as, as quais foram submetidas à extração de RNA e testadas quanto à positividade para Influenza A, RSV e SARS-CoV-2 por meio da técnica de PCR em tempo real pelo método SYBR Green. Foram incluídos 42 pacientes, sendo 59,5% do sexo feminino, 57,1% idosos, 54,8% com ensino fundamental. A maior parte dos pacientes reportou hábito tabagista prévio ou atual (54,8%), não etilista (73,8%) e 83,3% deles apresentavam alguma comorbidade, sendo hipertensão arterial sistêmica e diabetes *mellitus* tipo 2 as mais prevalentes. Um total de 10,5% dos pacientes testou positivo para FluA, nenhuma amostra positiva para RSV e 76,3% positivos para SARS-CoV-2. Na população estudada, SRAG com agravo hospitalar foi observado em maior proporção, em mulheres, idosos e pessoas com comorbidades, embora sem significância estatística, sendo o novo coronavírus o agente etiológico mais relacionado, o que evidencia a patogenicidade desse agente e suas consequências ainda são evidentes após quase 2 anos de período pandêmico.

Palavras-chave: Novo coronavírus; PCR em tempo real; Vírus respiratórios; Pandemia.

¹ Graduanda em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Doutorado em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Professora Associada da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Doutorado em Epidemiologia em Saúde Pública pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Doutorado em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵ Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Professor Adjunto da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *E-mail:* gustavo.acrani@uffs.edu.br

⁶ Doutorado em Patologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is characterized by symptoms of high fever, cough and dyspnea, and is in most cases related to a reduced amount of infectious agents. The objective was to assess the prevalence of respiratory viruses Influenza A (FluA), respiratory syncytial virus (RSV) and the new coronavirus (SARS-CoV-2) in patients hospitalized for SARS. Cross-sectional study, with patients hospitalized with SARS between November 2021 and May 2022. Sociodemographic and clinical data and nasopharyngeal samples were collected, which were subjected to RNA extraction and tested for positivity for Influenza A, RSV and SARS-CoV-2 using the real-time PCR technique using the SYBR Green method. 42 patients were included, 59.5% female, 57.1% elderly, 54.8% with primary education. Most patients reported previous or current smoking habits (54.8%), non-drinkers (73.8%) and 83.3% of them had some comorbidity, with systemic arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus being the most prevalent. A total of 10.5% of patients tested positive for FluA, no samples positive for RSV, and 76.3% positive for SARS-CoV-2. In the studied population, SARS with hospital injury was observed more frequently in women and the elderly, with associated comorbidities, with the new coronavirus being the most related etiological agent, which shows, although not statistically significant, that the pathogenicity of this agent and its consequences are still evident after almost 2 years of period pandemic.

Keywords: Coronavirus; Real-time PCR; Respiratory viruses; Pandemic.

Introdução

A síndrome respiratória aguda grave (SRAG) é uma das manifestações mais preocupantes dentre as infecções respiratórias em humanos, caracterizada por sintomas de febre alta, tosse e dispneia, acompanhada de aumento da frequência respiratória, hipotensão em relação à pressão arterial habitual do paciente, e, muitas vezes, falta de olfato, paladar e apetite.⁽¹⁾ Apesar de crianças e idosos serem mais frequentemente acometidos, nos últimos anos observou-se um aumento das taxas de infecção também na idade adulta, principalmente devido aos hábitos de vida, sobrecarga de trabalho e comorbidades associadas, como hipertensão arterial e diabetes.⁽²⁾ Grande parte dessas infecções é provocada por vírus, os quais circulam durante todo o ano e a maioria dos casos parece ser adquirida na comunidade. Em particular, nos últimos três anos, com o advento da pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2), declarada em março de 2020 pela Organização Mundial da Saúde (OMS),⁽³⁾ os casos de SRAG aumentaram exponencialmente. Segundo dados do InfoGripe, há uma expectativa regular de 300 a 600 casos de internação por SRAG no Brasil para a semana epidemiológica 12, que representa o início da sazonalidade desta síndrome.

No ano de 2020, por sua vez, este número foi de 2.251 casos.⁽⁴⁾

Dentre as especulações acerca da origem dessa nova espécie viral que acomete os humanos, encontrou-se similaridade genômica de 91% entre os vírus dos pangolins (coronavírus semelhantes ao SARS-CoV-2) e o novo coronavírus,⁽⁵⁾ entretanto, a origem exata e seu hospedeiro intermediário ainda não foram totalmente identificados. É válido ressaltar, também, que durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 a 2010, mais de 99% dos isolados de influenza subtípicos na Europa e nos Estados Unidos foram Influenza A (FluA) pandêmica H1N1,⁽⁶⁾ evidenciando a importância epidemiológica do FluA no contexto das síndromes gripais, assim como casos de infecções por vírus sincicial respiratório (RSV), sobretudo em idosos, crianças e recém-nascidos.

A vigilância de SRAG, assim como a notificação dos agentes mais comuns, é realizada por meio da coleta de dados de centros sentinelas, e através de notificação compulsória via Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan).⁽⁶⁾ No Brasil, os registros de SRAG, quando comparados antes e depois de dois anos do quadro pandêmico, aumentaram cerca de 20 vezes.⁽⁷⁾ Além da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, outras

doenças continuam a causar SRAG, entre elas, destacam-se as causadas pelo vírus sincicial respiratório (RSV), influenza (Flu) A e B e outros tipos de coronavírus.⁽⁸⁾

Sendo assim, a identificação precoce do SARS-CoV-2 e de outros agentes causadores de SRAG poderá ser útil à definição do plano terapêutico, favorecendo o manejo e a recuperação dos pacientes por meio da diminuição da incidência de morbimortalidade associada, além de reduzir os custos com as internações hospitalares. Desse modo, esse estudo objetiva avaliar a prevalência dos vírus respiratórios Influenza A (FluA), vírus sincicial respiratório (RSV) e do novo coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes sintomáticos internados de novembro de 2021 a maio de 2022, com quadros de SRAG, em hospital terciário no município de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, assim como descrever os aspectos sociodemográficos dos pacientes e relacioná-los à detecção molecular de SARS-CoV-2.

Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo transversal realizado em pacientes sintomáticos com SRAG internados em um hospital terciário do município de Passo Fundo, RS. A amostra foi definida por conveniência e composta por pacientes hospitalizados por SRAG, diagnosticados conforme critérios clínicos (paciente com síndrome gripal, apresentando febre de início súbito, acompanhada de tosse ou dor de garganta e pelo menos um dos seguintes sintomas: mialgia, cefaleia ou artralgia com posterior gravidade de dispnéia, desconforto respiratório ou saturação de oxigênio menor que 95%), no período de novembro de 2021 a maio de 2022.

Os pacientes participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário, através do qual foram coletadas as variáveis categóricas de sexo, faixa etária, escolaridade, município e local de residência, número de pessoas no município, tabagismo, consumo de álcool, presença de comorbidades. Em seguida, os participantes que concordaram, tiveram

amostra de nasofaringe coletada. Pacientes que não estavam aptos a responderem o questionário tiveram seus dados coletados a partir de aplicação do instrumento de coleta a seus responsáveis. Além disso, dados em prontuários também foram coletados e analisados nesse estudo. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Fronteira Sul (parecer 4.405.773).

Os pacientes internados elegíveis foram abordados em leito e questionados acerca do interesse em aceitar participar da pesquisa e, quando concordado, o questionário foi aplicado, devidamente identificado com os dados do participante e numerado. O material biológico também foi identificado e numerado de acordo com o questionário correspondente.

Foram usados *kits* estéreis para coleta de material da nasofaringe (Kolplast®, São Paulo, SP, BR) sendo introduzido um cotonete (*swab de ryon*) em cada narina e, quando encontrada a resistência do final da cavidade, realizado giro de 360° para raspagem de células. Após, ambos cotonetes foram colocados em um tubo *falcon* estéril com 3 ml de salina. Em sequência, os tubos foram armazenados sob refrigeração e transportados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul e as amostras foram mantidas à temperatura de -80 °C até a extração do RNA total.

Para purificação e extração do RNA viral do meio foi utilizado o *kit* de purificação de ácido nucleico total ReliaPrep® (Promega, Madison, WI, USA). A partir de 1 mL de amostra coletada, obteve-se o *pellet* celular após centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm e ressuspensão em 200 µL de salina estéril.

Em resumo, o protocolo primariamente incluiu adição de 20 µL da *solução de proteinase K* (PK) e 200 µL de *Cell Lysis Buffer* (CLD) a cada amostra e incubação a 56 °C por 10 minutos. Após, foram adicionados 250 µL de isopropanol e o conteúdo foi transferido para uma coluna com um tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Após descarte do filtrado, foram adicionados 500 µL de *Column Wash Solution* (CWD) às colunas e

levados à centrífuga por 3 minutos a 13.000 rpm. Esse último passo de lavagem foi repetido por três vezes. Em seguida, as colunas foram colocadas em novos tubos de 1,5 mL e o RNA foi eluído em 40 µL de Nuclease-Free Water no final do processo.

Para verificação da correta extração do material genético, a concentração e a pureza do RNA obtidas em cada amostra foram determinadas por quantificação em espectrofotômetro (MultiSkan µDrop® Plate, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) pela leitura no comprimento de onda de 260 nm e cálculo específico para RNA.

Todas as amostras foram submetidas à PCR em tempo real (qPCR) para a amplificação de regiões específicas dos genomas dos vírus utilizando-se os *primers* FLU A Foward “5’-GAC CRA TCC TGT CAC TCT TGA-3’”, FLU A Reverse “5’-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3’”, RSV Foward “5’-GGA TTC TAC CAT ATA TTG A-3’”, RSV Reverse “5’-GAA GTK AGG AAA TTG AGT-3’”, hCOVassay1 Foward “5’-GCC TCT TCT CGT TCC TCA TCA-3’”, hCOVassay1 Reverse “5’-AGC AGC ATC ACC GCC ATT-3’” e do gene endógeno GAPDH Foward “5’-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA-3’” e GAPDH Reverse “5’-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC-3’”, conforme previamente descrito.⁽⁹⁾ Como controles positivos, foram utilizados cDNA obtidos a partir do RNA extraído de células infectadas por Influenza A, RSV e SARS-CoV-2, gentilmente cedidos pelo laboratório LEVE (Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). As reações foram realizadas separadamente para cada gene, utilizando-se os reagentes disponíveis em GoTaq® 1-Step RT-qPCR System Kit (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A primeira etapa da reação consiste na transcrição do RNA a DNA complementar, seguida da etapa de amplificação dos produtos específicos, de acordo com os genes de interesse, utilizando-se o método de SYBR Green de detecção.

Para iniciar o processo de PCR em tempo real, as amostras foram diluídas a 6,25 ng de RNA total em cada 5 µL de amostra. Em seguida, a *mix* foi preparado com os *primers* necessários, agente

fluorescente (GoTaq® Green Master Mix, Promega Winsconsin, EUA) e água. Após, cada poço da placa que foi para leitura no termociclador foi preenchido com 15 µL de *mix* e 5 µL de amostra.

As etapas de ciclagem da reação foram realizadas em termociclador no aparelho Qiagen Qiaquant 96-5 plex (Qiagen, Hilden, GE) e consistem, primeiramente, na Transcrição Reversa, uma vez que os vírus trabalhados apresentam RNA no seu material genético, à temperatura de 37 °C por 15 minutos, seguida do início da PCR a 95 °C por 10 minutos. Após, foi iniciada a ciclagem de abertura, realizada na temperatura de 95 °C por 45 ciclos de 10 segundos. O anelamento dos iniciadores e extensão da polimerase foram realizados à temperatura de 58 °C e 72 °C respectivamente, ambos por 30 segundos. A etapa final da ciclagem foi a formação da curva de *melting*, a temperaturas variando de 60 °C a 95 °C por 36 ciclos de 15 segundos cada. Com o término de cada ciclagem, os dados da reação em tempo real foram transferidos do termociclador para análise no computador com o programa da mesma fabricante do aparelho.

Os dados obtidos foram duplamente digitados e validados no *software* EpiData, de distribuição livre. Após, a amostra foi caracterizada e foram determinadas as medidas de tendência central e as frequências relativas das variáveis categóricas, sendo a relação das variáveis com o SARS-CoV-2 analisada pelo teste de qui-quadrado ou exato de Fisher. Tal análise não foi realizada para FluA e RSV devido ao baixo número encontrado. As análises foram realizadas em *software* GraphPad Prism 6.0 e o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

No período do estudo, 42 pacientes aceitaram participar e foram incluídos. A caracterização da amostra e seus respectivos dados sociodemográficos estão dispostos na Tabela 1. Observa-se predomínio do sexo feminino (59,5%), idosos (57,1%), residentes no município de Passo Fundo (66,7%) e em zona urbana (81%), com predomínio de escolaridade até o ensino fundamental (54,8%).

Tabela 1 - Caracterização sociodemográfica de pacientes internados por SRAG. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022. (n=42).

Variáveis	n (%)
Sexo	
Masculino	17 (40,5)
Feminino	25 (59,5)
Faixa etária	
Adultos 18-59	18 (42,9)
Idosos \geq 60	24 (57,1)
Escolaridade	
Sem escolaridade/analfabeto	7 (16,7)
Até ensino fundamental	23 (54,8)
Até ensino médio	8 (19,0)
Além do ensino médio	4 (9,5)
Município de residência	
Passo Fundo	28 (66,7)
Outra cidade	14 (33,3)
Local de residência	
Zona urbana	34 (81,0)
Zona rural	8 (19,0)
Número de pessoas no domicílio	
1 pessoa	5 (11,9)
2 pessoas	14 (33,3)
3 pessoas	12 (28,6)
4 ou mais pessoas	11 (26,2)

Fonte: os autores.

Quando questionados sobre hábitos de vida e doenças prévias, dados dispostos na Tabela 2, mais da metade dos pacientes reportou hábito tabagista (23,8%) ou ex-tabagista (31%), e sem hábito etilista. Acerca de suas comorbidades, cabe ressaltar que 83,3% dos participantes informaram apresentar pelo menos uma enfermidade anterior

à internação e 64,2% dos pacientes apresentavam mais de uma comorbidade. Nos indivíduos com comorbidades, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) estava presente em 74,3% e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma estavam presentes em 51,4% desses pacientes, conforme pode se observar a seguir.

Tabela 2 - Hábitos de vida e características clínicas de pacientes internados por SRAG. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022. (n=42).

Variáveis	n (%)
Tabagismo	
Sim	10 (23,8)
Ex-tabagista	13 (31,0)
Não	19 (45,2)
Consumo de álcool	
Sim	11 (26,2)
Não	31 (73,8)
Comorbidades	
Apenas uma	8 (19,0)
Duas ou três	12 (28,5)
Quatro, cinco ou mais	15 (35,7)
Sem comorbidades	7 (16,7)
Principais comorbidades (n=35)	
HAS*	27 (74,3)
Diabetes	16 (45,7)
Asma	8 (22,8)
DPOC**	10 (28,6)
Intervalo entre internação hospitalar e coleta de material biológico (dias) (n=38)	
0-7	19 (50,0)
8-14	11 (29,0)
15-29	5 (13,1)
≥ 30	3 (7,9)

Legenda: *HAS: hipertensão arterial sistêmica; **DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica.

Fonte: os autores.

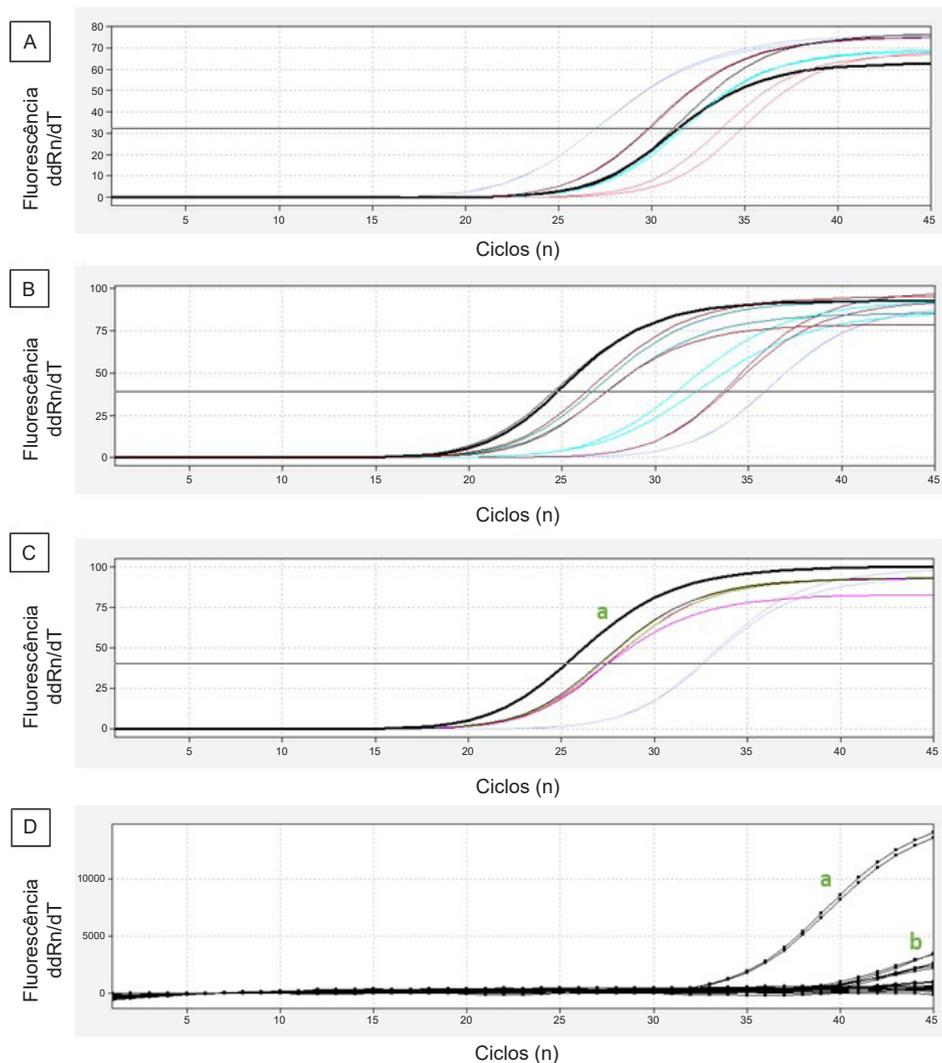
Com base nos dados em prontuários dos pacientes participantes do estudo, a data da internação hospitalar e a data de coleta de cada amostra foram comparadas e analisadas. Metade dos pacientes teve amostra de nasofaringe coletada na

primeira semana de internação e apenas 8 (20%) participantes tiveram amostras coletadas com mais de 14 dias de internação (Tabela 2). Dos 42 participantes, 2 (4,8%) evoluíram a óbito no período hospitalar.

Em relação à detecção do agente viral presente nos casos de SRAG, 38 amostras foram testadas e analisadas (4 participantes se recusaram a realizar a coleta). Observou-se que 4 amostras amplificaram e foram positivas para FluA (10,5%), nenhuma amostra foi positiva para RSV e 29 para SARS-CoV-2 (76,3%). Ainda, 3 amostras foram positivas para FluA e SARS-CoV-2 (7,9%) simultaneamente, enquanto nenhum vírus foi detectado em 10 amostras (26,3%). Todas as amostras apre-

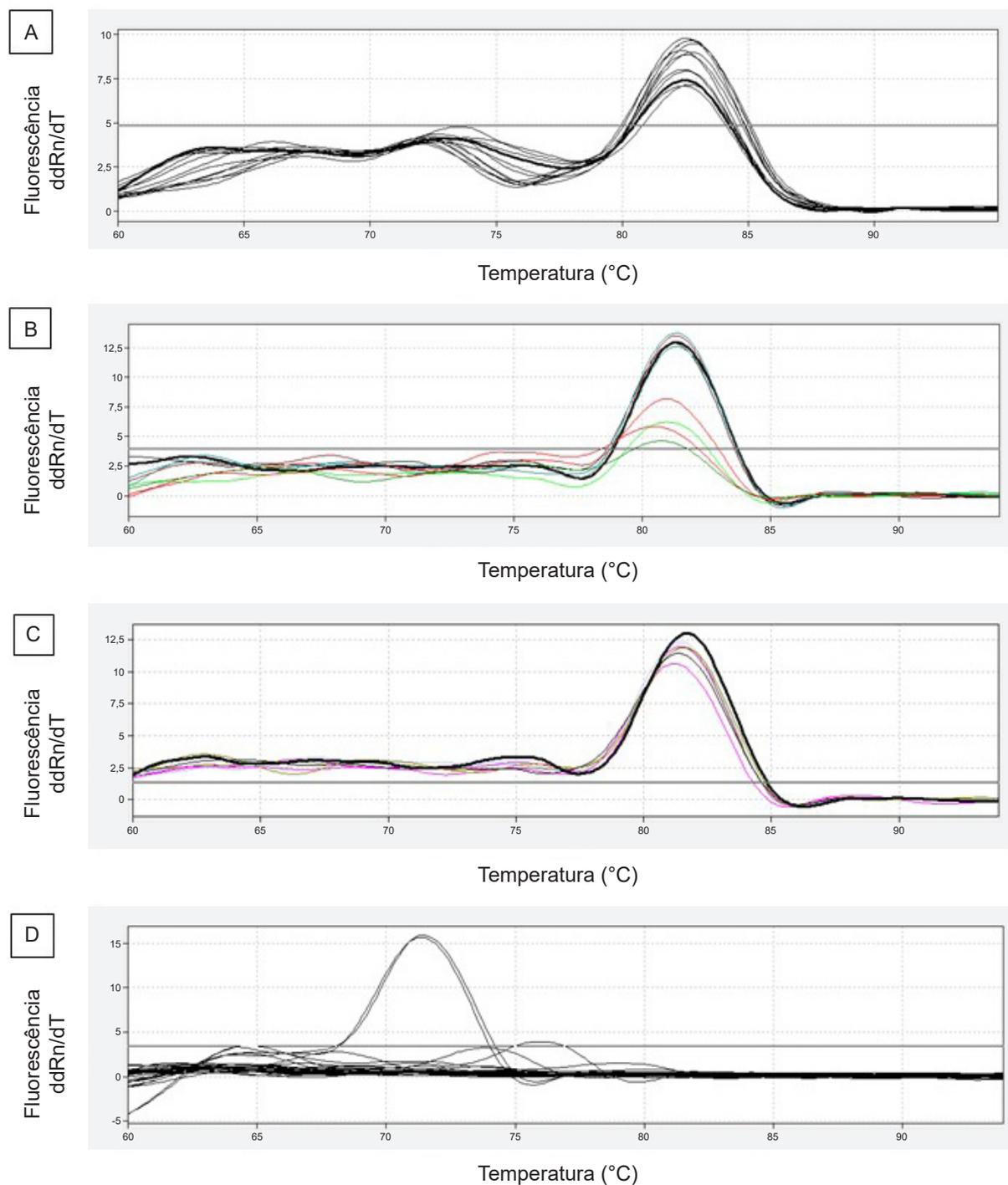
sentaram material genético satisfatório e suficiente para análise, como demonstrado pela amplificação do gene endógeno GAPDH (Figura 1 A). A amplificação dos controles positivos para SARS-CoV-2, RSV e Influenza A, assim como a representação da positividade das amostras, estão apresentadas na Figura 1 B e C, respectivamente. Além disso, as respectivas curvas de *melting* demonstrando especificidade de amplificação com cada *primer* utilizado estão apresentadas na Figura 2.

Figura 1 - Curvas de amplificação de RNA extraído de amostras clínicas de nasofaringe, e amplificadas com *primers* específicos. **A.** Curvas de amplificação do gene endógeno GAPDH. **B.** Curvas de amplificação para SARS-CoV-2. **C.** Curva de amplificação do gene para Influenza A: a: controle positivo para FluA. **D.** Curva de amplificação para vírus sincicial respiratório (RSV): a: curvas de amplificação do controle positivo (RNA de células infectadas com RSV); b: amostras dos pacientes incluídos no estudo. (As amostras de controles positivos encontram-se em destaque [negrito]; a linha horizontal representa o *threshold*; ddRn = fluorescência).



Fonte: os autores.

Figura 2 - Curvas de *melting* demonstrando especificidade de amplificação com os *primers* utilizados. **A.** Gene endógeno GAPDH. **B.** Gene de SARS-CoV-2. **C.** Gene de Influenza A. **D.** Curva de *melting* demonstrando especificidade de amplificação com os *primers* utilizados para RSV nos controles positivos. (As amostras de controles positivos encontram-se em destaque [negrito]; a linha horizontal representa o *threshold*; ddRn = fluorescência).



Fonte: os autores.

Dentre as características sociodemográficas e clínicas, não houve relação significativa entre a positividade para SARS-CoV-2 e sexo, idade,

escolaridade, tabagismo, etilismo, presença de comorbidades e intervalo entre data de internação e coleta de amostra (Tabela 3).

Tabela 3 - SARS-CoV-2 em amostras de pacientes internados e distribuição conforme características sociodemográficas e clínicas e intervalo entre internação e coleta de material biológico. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2022. (n=38).

Variáveis (n=38)	Positivo para SARS-CoV-2		Negativo para SARS-CoV-2		p
	n	%	n	%	
Sexo					1,000
Masculino	11	78,6	3	21,4	
Feminino	18	75,0	6	25,0	
Faixa etária					0,709
Adultos 18-59	13	72,2	5	27,8	
Idosos ≥ 60	16	80,0	4	20,0	
Escolaridade					1,000
Com escolaridade	24	77,4	7	22,6	
Sem escolaridade/analfabeto	5	71,4	2	28,6	
Tabagismo					0,135
Atual ou prévio	13	65,0	7	35,0	
Não	16	88,9	2	11,1	
Etilismo					1,000
Sim	8	80,0	2	20,0	
Não	21	75,0	7	25,0	
Comorbidades					0,656
Com comorbidades	22	73,3	8	26,7	
Sem comorbidades	6	85,7	1	14,3	
Intervalo internação e coleta					0,361
0-15 dias	24	80,0	6	20,0	
≥ 16 dias	5	62,5	3	37,5	

Fonte: os autores.

Discussão

O presente estudo avaliou casos de pacientes hospitalizados por SRAG em um hospital terciário

da Região Norte do estado do Rio Grande do Sul e demonstrou aspectos sociodemográficos e clínicos, assim como a frequência dos vírus respiratórios Influenza A e SARS-CoV-2.

Diversos estudos demonstraram que a maioria da população acometida pela SRAG causada por COVID-19 é do sexo masculino,⁽¹⁰⁾ o que pode estar relacionado à quantidade superior de enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) presente nas células alveolares do sexo masculino,⁽¹¹⁾ local de ação do SARS-CoV-2. Entretanto, os dados da amostra analisada divergem, uma vez que apresenta predominância de SRAG na população feminina. Os presentes resultados podem ser atribuídos à maior adesão das mulheres ao estudo, ou ainda à particularidade da população local. Nesse contexto, um estudo recente realizado na Alemanha⁽¹²⁾ apontou maiores riscos de infecção entre as mulheres do que os homens em idade ativa, sendo que para os idosos o oposto é verdadeiro. Importante destacar que 2 dos 42 pacientes estudados evoluíram a óbito e ambos os pacientes eram do sexo masculino. Desta forma, as taxas de mortalidade em todas as faixas etárias já foram relatadas como duas vezes mais altas para homens do que para mulheres.⁽¹⁰⁾ Tal fato parece estar relacionado à maior produção de citocinas nos indivíduos do sexo biológico masculino infectados pelo SARS-CoV-2,⁽¹¹⁾ ou ainda por fatores externos de comportamento e estilo de vida, como observado também com outras doenças e suas prevalências em homens.

Destaca-se ainda que os casos de SRAG são mais comuns em crianças e idosos, como reportam os números absolutos de casos de internações por SRAG no Brasil da 9ª a 12ª semanas epidemiológicas nos anos de 2010 a 2020.⁽¹³⁾ A imaturidade ou diminuição das respostas imunológicas parecem ser os aspectos mais relevantes para tal observação. Em concordância, a maioria dos pacientes estudados tinha mais que 60 anos, o que evidencia que cuidados mais intensificados devem ser direcionados a essa população.

A presença de comorbidades tem sido apontada como fator de risco para agravamento dos casos de SRAG,⁽¹⁴⁾ em particular por COVID-19. Nessa conjuntura, 83,3% da amostra analisada no presente estudo tinha algum tipo de comorbidade, sendo o comprometimento cardiovascular mais frequente. Uma revisão sistemática recente revelou

que, entre os pacientes, com COVID-19 e hipertensão arterial sistêmica apresentaram risco significativamente maior de internação em UTI, necessidade de ventilação invasiva e óbitos hospitalares.⁽¹⁵⁾ Ainda, observa-se alta prevalência de SRAG por COVID-19 em adultos e idosos com doença cardiovascular no Brasil.⁽¹⁶⁾ Outro destaque importante sobre as comorbidades dos pacientes estudados é que mais da metade da amostra apresentou doença pulmonar prévia à SRAG, incluindo asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, pertinentemente relacionadas à gravidade dos casos de SRAG associados a essas condições.

No que diz respeito à positividade dos agentes virais, as análises demonstram que 7 vezes mais casos apresentaram SARS-CoV-2 que Influenza A, possivelmente devido à vigência predominante da variante Omicron do primeiro, descrita em novembro de 2021, e cuja transmissão é maior que das variantes anteriores, mas a patogenicidade parece ser menor, como observado em roedores que expressam ACE2 humana, paralelamente a dados clínicos humanos preliminares.⁽¹⁷⁾ Nas coletas e análises realizadas, duas das quatro positivities para FluA foram coletadas na metade do mês de maio de 2022. Logo, apesar da capacidade de ambos os vírus evoluir suas doenças a quadros graves, a positividade de Influenza A é mais frequente no inverno, o que pode justificar o baixo número de casos devido ao período de realização do projeto.

Outro aspecto das infecções virais fortemente discutido na literatura é o período de infecção ativa e, conseqüentemente, a detecção do agente. Nesse estudo, o intervalo entre internação com diagnóstico de SRAG e coleta de amostra da nasofaringe foi menor que 14 dias em quase 80% das amostras. Nesse período, a positividade para SARS-CoV-2 é esperada utilizando a técnica de padrão ouro baseada na detecção de ácidos nucleicos, a qPCR, pois estudos relatam que a detecção positiva pode ocorrer em até 4 semanas após infecção.⁽¹⁸⁾ Além disso, não existe diferença na duração da positividade da PCR entre os infectados com a variante Omicron do SARS-CoV-2 *versus* variantes anteriores do SARS-CoV-2.⁽¹⁹⁾ Dessa forma,

ossos resultados fortemente representam os casos de COVID-19 independente da variante ou tempo de infecção. Vale a pena ressaltar que, dentre as 4 amostras positivas para Influenza A, três delas foram detectadas dentro do intervalo de 7 dias após início dos sintomas, e uma delas em um período de 14 dias. Embora tenha sido detectada uma amostra positiva para Influenza A em uma janela de 14 dias, é possível que esta seja uma limitação no número de amostras positivas para este vírus, uma vez que a grande parte das amostras foram coletadas com mais de 7 dias após o início dos sintomas. Por outro lado, estudo recente demonstrou alteração da epidemiologia da infecção por Influenza durante a pandemia de COVID-19 em 2021/2022, incluindo redução dramática do número de casos de Influenza e diminuição da diversidade genética deste tipo viral circulante,⁽²⁰⁾ o que justifica o baixo número de positividade no presente estudo.

Acerca das técnicas, as utilizadas rotineiramente em PCR em tempo real são a SYBR Green e a TaqMan. Devido ao seu *design* simples, à fácil configuração e ao baixo custo, a detecção por SYBR Green é preferencialmente escolhida para a detecção e amplificação de ácidos nucleicos. Já a metodologia TaqMan utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da qPCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação e é considerado o principal método para detectar e quantificar patógenos humanos com baixo número de cópias, incluindo vírus.⁽²¹⁻²²⁾ Entretanto, essa técnica apresenta limitação quanto aos reagentes e *kits* e demanda de elevados investimentos financeiros.

O sistema do corante SYBR Green possui ligação altamente específica ao DNA dupla fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação. Desse modo, o SYBR Green detectará todo DNA dupla fita, inclusive produtos de reação não específicos. Uma reação bem otimizada é, portanto, essencial para resultados precisos. Nessa perspectiva, a fim de detectar baixas cargas virais e realizar triagem em larga escala, pesquisadores da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

desenvolveram e validaram a utilização do método diagnóstico molecular com SYBR Green na qPCR e dos *primers* usados nesse estudo.⁽⁹⁾

Desse modo, um ponto forte desse estudo é a demonstração da aplicação prática da metodologia acessível e rápida de um teste diagnóstico de custo mais baixo, o qual, por meio do protocolo desenvolvido pelos pesquisadores e seguido nesse estudo, maximiza o custo-benefício da detecção viral e proporciona a análise em larga escala necessária em tempos de necessidade, como na pandemia de COVID-19.

O presente estudo ainda apresenta limitações devido ao baixo número de casos analisados, o que é refletido nas análises realizadas, as quais não apresentaram significância estatística entre os dados sociodemográficos e clínicos e positividade para SARS-CoV-2. O baixo número de casos estudados pode ser explicado, provavelmente, devido à vigência da variante Omicron, uma vez que as internações com agravos são menores,⁽²³⁾ e também pelo fato de que no período avaliado foi observado uma mudança no perfil da infecção por SARS-CoV-2, uma vez que muitos indivíduos já apresentavam a vacinação, o que pode ter diminuído o número de casos graves hospitalizados.

Conclusão

Considerando a população estudada e metodologia empregada, conclui-se que SRAG com agravo hospitalar foi observado em maior proporção em mulheres, idosos e pessoas com comorbidades, embora sem significância estatística, sendo o novo coronavírus o agente etiológico mais relacionado, o que evidencia a patogenicidade desse agente, e suas consequências ainda são evidentes após quase dois anos de período pandêmico.

Referências

- 1 Ministério da Saúde (BR). Protocolo de manejo clínico de síndrome respiratória aguda grave: SRAG: versão IV. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

- 2 Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the US, 1999-2018. *JAMA Netw Open*. 2022;5(2):e220527. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.0527.
- 3 Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, Khan M, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, Agha R. World Health Organization declares global emergency: a review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg*. 2020;76:71-6. doi: 10.1016/j.ijso.2020.02.034.
- 4 Ministério da Saúde (BR). InfoGripe [Internet]. 2020 [citado 2023 ago 22]. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/boletim_infogripe_se202012.pdf
- 5 Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr Biol*. 2020;30(7):1346-51.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022.
- 6 Greco DB, Tupinambás U, Fonseca M. Influenza A (H1N1): histórico, estado atual no Brasil e no mundo, perspectivas. *Rev Méd Minas Gerais*. 2009;19(2):132-9.
- 7 Ministério da Saúde (BR). Doença pelo Novo Coronavírus-COVID-19. *Boletim Epidemiol Espec* [Internet]. 2022 [citado 2023 ago 15]; 112:1-87. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-112-boletim-coe-coronavirus.pdf>
- 8 Magalhaes EF, Beraldo CL, Vieira ALP, Mendonça PAFS, Teixeira DV, Rocha EA, et al. Análise da prevalência de vírus respiratórios em crianças atendidas em um hospital universitário do sul de Minas Gerais. *Rev Méd Minas Gerais*. 2017;27:e-1870. doi: 10.5935/2238-3182.20160128.
- 9 Marinowic DR, Zanirati G, Rodrigues FVF, Grahl MVC, Alcará AM, Machado DC, Da Costa GC. A new SYBR Green real-time PCR to detect SARS-CoV-2. *Sci Rep*. 2021;11(1):2224. doi: 10.1038/s41598-021-81245-0.
- 10 Niquini RP, Lana RM, Pacheco AG, Cruz O, Coelho FC, Carvalho LM, Villela DAM, Gomes MFC, Bastos LS. SRAG por COVID-19 no Brasil: descrição e comparação de características demográficas e comorbidades com SRAG por influenza e com a população geral. *Cad Saúde Pública*. 2020;36(7):e00149420. doi: 10.1590/0102-311X00149420.
- 11 Safadi MAP. The intriguing features of COVID-19 in children and its impact on the pandemic. *J Pediatr (Rio J)*. 2020;96(3):265-8. doi: 10.1016/j.jpmed.2020.04.001.
- 12 Doerre A, Doblhammer G. The influence of gender on COVID-19 infections and mortality in Germany: insights from age- and gender-specific modeling of contact rates, infections, and deaths in the early phase of the pandemic. *PLoS One*. 2022;17(5):e0268119. doi: 10.1371/journal.pone.0268119.
- 13 Bastos LS, Niquini RP, Lana RM, Villela DAM, Cruz OG, Coelho FC, et al. COVID-19 e hospitalizações por SRAG no Brasil: uma comparação até a 12ª semana epidemiológica de 2020. *Cad Saúde Pública*. 2020;36(4). doi: 10.1590/0102-311X00070120.
- 14 Sardinha DM, do Socorro Pompeu de Loiola R, Ferreira ALS, de Sá CAF, Rodrigues YC, Lima KVB, Guimarães RJPS, Lima LMGC. Risk factors associated with the severity of COVID-19 in a region of the Brazilian Amazon. *Sci Rep*. 2021;11(1):20569. doi: 10.1038/s41598-021-00009-y.
- 15 Qian Z, Li Z, Peng J, Gao Q, Cai S, Xu X. Association between hypertension and prognosis of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Hypertens*. 2022;44(5):451-8. doi: 10.1080/10641963.2022.2071914.
- 16 Paiva KM, Hillesheim D, Rech CR, Delevatti RS, Brown RVS, Gonzáles AI, Haas P. Prevalence and associated factors of SARS by Covid-19 in adults and aged people with chronic cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol*. 2021;117(5):968-75. doi: 10.36660/abc.20200955.

- 17 Halfmann PJ, Iida S, Iwatsuki-Horimoto K, Maemura T, Kiso M, Scheaffer SM, Darling TL, Joshi A, Loeber S, Singh G, Foster SL, *et al.* SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature*. 2022;603(7902):687-92. doi: 10.1038/s41586-022-04441-6.
- 18 Mitchell SL, Loeffelholz MJ. Considerations regarding interpretation of positive SARS-CoV-2 molecular results with late cycle threshold values. *J Clin Microbiol*. 2022;60(9):e0050122. doi: 10.1128/jcm.00501-22.
- 19 Kojima N, Roshani A, Klausner JD. Duration of COVID-19 PCR positivity for Omicron vs earlier variants. *J Clin Virol Plus*. 2022;2(3):100085. doi: 10.1016/j.jcvp.2022.100085.
- 20 Korsun N, Trifonova I, Dobrinov V, Madzharova I, Grigorova I, Christova I. Low prevalence of influenza viruses and predominance of A (H3N2) virus with respect to SARS-CoV-2 during the 2021-2022 season in Bulgaria. *J Med Virol*. 2023;95(2):e28489. doi: 10.1002/jmv.28489.
- 21 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986.
- 22 Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25(3):2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- 23 He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: characteristics and prevention. *MedComm (2020)*. 2021;2(4):838-45. doi: 10.1002/mco2.110.

Recebido em: 30 maio 2023

Aceito em: 22 ago. 2023

