

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**



Larissa Rocha da Silva

**Avaliação da dinâmica da epidemia
de COVID-19 pela inferência de
carga viral de SARS-CoV-2 na cidade
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2024**

Catálogo na Publicação

Rocha da Silva, Larissa

Avaliação da dinâmica da epidemia de COVID-19 pela inferência de carga viral de SARS-CoV-2 na cidade de Porto Alegre / Larissa Rocha da Silva. -- 2024.

48 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2024.

Orientador(a): Alessandro Comarú Pasqualotto.

1. Carga viral. 2. Análise de ondas. 3. Wavelet. 4. qRT-PCR. 5. SARS-CoV-2. I. Título.

Larissa Rocha da Silva

Avaliação da dinâmica da epidemia de COVID-19 pela inferência de carga viral de SARS-CoV-2 na cidade de Porto Alegre

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

**Porto Alegre
2024**

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, por sempre me sustentar e ser o bondoso Pai que sempre sabe o que seus filhos precisam; por sempre ser presente e por me dar muito mais do que mereço. Aliás, sem Ele, eu jamais estaria aqui.

À Daniela e Vladimir, meus pais amados, por todo apoio, incentivo, alegrias e momentos únicos, que nunca hesitaram em me dar suporte e sempre incentivaram minha carreira acadêmica e profissional, obrigada! Sem vocês, nada disso seria realidade.

Ao Pedro, Arthur e Pâmela, por serem minhas alegrias e sempre me instigarem a querer ser uma pessoa melhor.

A Leila e Acrízio, por serem avós presentes que sempre me levaram como troféu, que sempre tiveram orgulho da mulher que me tornei.

À Luciana, madrinha querida que sempre apoiou e incentivou minha carreira e meus sonhos.

Ao meu querido companheiro de vida, Evertom, que me acompanha e incentiva para a realização desta conquista.

Aos amigos que acompanharam essa dissertação e sempre estenderam um ombro amigo nos momentos difíceis, vocês são essenciais para mim.

Aos queridos colegas de mestrado, Pedro, Estefany, Nicole e Pamela, que são pessoas incríveis e sabem como agir quando os momentos de tensão e medo vêm. Com auxílio e uma opinião sempre construtiva.

Ao Programa de Patologia que abriu as portas para essa dissertação e é um incentivador de formação acadêmica.

Ao meu professor Alessandro, que me deu oportunidades de crescimento e direções acadêmicas e profissionais.

“Porque Eu bem sei os pensamentos que penso de vós, diz o SENHOR;
pensamentos de paz e não de mal, para vos dar o fim que esperais.”

Jeremias 29:11 – Bíblia Sagrada

Resumo da Dissertação

Introdução: A infecção por SARS-CoV-2 já causou mais de 6,6 milhões de mortes em todo o mundo e seu modelo de transmissão foi estabelecido. No entanto, são necessários mais estudos sobre a relação entre as ondas epidemiológicas da COVID-19 e a carga viral do SARS-CoV-2. Neste sentido, este trabalho avaliou o impacto da carga viral do SARS-CoV-2 nas ondas de positividade da COVID-19.

Objetivo do estudo: Avaliar a dinâmica da epidemia por meio do *cycle threshold* (Ct), de amostras admitidas para testagem SARS-CoV-2 por RT-qPCR no Hospital Santa Casa de Porto Alegre, associando-o às medidas preventivas vigentes à época da pandemia.

Materiais e métodos: Amostras de indivíduos com suspeita de COVID-19 foram analisadas por meio de RT-qPCR no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Santa Casa de Porto Alegre. Os dados epidemiológicos foram extraídos de *websites* da Prefeitura Municipal de Porto Alegre, bem como do Estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas análises *wavelet* com filtro de 3 dias.

Resultados: Foram avaliadas 11.302 amostras positivas para COVID-19 de pacientes residentes em Porto Alegre. A maioria dos participantes da pesquisa eram do sexo feminino. Com média de idade de 44,6 anos. A mediana da carga viral relativa (CVR) foi de 9,98. Notou-se que houve uma estreita relação entre a presença de casos positivos e o aumento da carga viral. O espectro de potência local revelou que as correlações positivas foram amplificadas com valores de carga viral relativa acima de 600, enquanto apresentaram baixa correlação com valores inferiores de CVR. Essas correlações foram potencializadas dentro de

uma janela de até 3 dias, exercendo influência durante períodos prolongados, mesmo diante de eventos extremos associados aos picos pandêmicos. Essa influência perdurou, em média, por aproximadamente 16 a 32 dias. O período de ocorrência com mais energia foi de 8 dias, dominando estes espectros. Um resultado geral da análise *wavelet* é que entre os dados de CVR houve influência média de 32 dias de ciclos de ocorrência. Foi realizada análise de CVR filtrado de alta frequência, mostrando que a série temporal apresenta um padrão alternado de valores altos e baixos de CVR resultante da alta variância de CVR em 3 dias.

Conclusão: A carga viral relativa de SARS-CoV-2 não conseguiu prever as ondas de positividade de COVID-19 devido à mutação genética do vírus, o que resultou em novas variantes. Houve períodos de alta CVR, em que a transmissão ocorreu em até 32 dias, e períodos de baixo CVR, em que a transmissão ocorreu em até 16 dias.

Palavras-chave: carga viral; análise de ondas; *wavelet*; RT-qPCR; infecciosidade; SARS-CoV-2; COVID-19.

Abstract

Introduction: SARS-CoV-2 infection has already caused more than 6.6 million deaths worldwide and its transmission model has been questioned and resolved. However, more studies are necessary to better understand if SARS-COV- viral loads are associated to peaks in the COVID-19 positivity waves. Therefore, this study evaluated the impact of SARS-CoV-2 viral load on COVID-19 positivity waves.

Aim of study: Evaluate the dynamics of the epidemic through the threshold cycle, Ct, of samples submitted to SARS-CoV-2 RT-qPCR, associating it with current protective measures, current flags in Porto Alegre and epidemiological data.

Materials and methods: Samples from COVID-19 suspected cases were analyzed using RT-qPCR at the Molecular Biology Laboratory of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Epidemiological data were obtained from health authorities websites. Wavelet analyses with a 3-days filter were used.

Results: 11,302 COVID-19 positive samples were evaluated from patients living in Porto Alegre; most patients were female, and the average age was 44.6 years. The median relative viral load (RVL) was 9.98. There was a close relationship between the presence of positive cases and the increase in viral load. The local power spectrum revealed that positive correlations were amplified with relative viral load values above 600, while they showed low correlation with lower RVL values. These correlations were enhanced within a window of up to 3 days, exerting influence over prolonged periods, even in the face of extreme events associated with pandemic peaks. On average, this influence lasted for approximately 16 to 32 days. The most energetic period of occurrence was 8

days, dominating the energy spectra. A general result of the wavelet analysis is that among the RVL data there was an average influence of 32 days of occurrence cycles. High frequency filtered RVL analysis was performed, showing that the time series presents an alternating pattern of high and low RVL values resulting from the high RVL variance over 3 days.

Conclusion: Relative viral load failed to predict waves of COVID-19 positivity, due to genetic mutation of the virus, resulting in new variants. There were periods of high RVL in which transmission occurred within 32 days and periods of low RVL in which transmission occurred within 16 days.

Keywords: viral load; wave analysis; *wavelet*; RT-qPCR; infectiousness; SARS-CoV-2; COVID-19.

Lista de abreviaturas

CEVS: Centro Estadual de Vigilância em Saúde

COVID-19: doença do Coronavírus

Ct: cycle threshold

CVR: carga viral relativa

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECA2: enzima conversora de angiotensina 2

ESPII: Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional

OMS/WHO: Organização Mundial da Saúde

PCR: reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RT: transcrição reversa

SARS-CoV-2: coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa de 2019

SES: Secretaria Estadual de Saúde

VOC: variante de preocupação

SUMÁRIO

1.REFERENCIAL TEÓRICO.....	111
1.1. Diagnóstico do SARS-CoV-2 por RT-qPCR.....	14
1.2 Epidemiologia	15
1.3 Técnica de <i>wavelets</i>	17
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	23
5. CONCLUSÕES.....	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
8. ANEXOS	43
8.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA.....	43

1. REFERENCIAL TEÓRICO

A síndrome respiratória aguda severa de 2019 (COVID-19) é causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, da família Coronaviridae, gênero Beta-coronavírus. O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples positivo, altamente patogênico,¹ e cujo nome se deve à sua imagem microscópica, que se assemelha a uma coroa. O primeiro caso foi oficialmente notificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 31 de dezembro de 2019.

Antes da pandemia de COVID-19, houve duas outras epidemias desta família de vírus: a epidemia causada pelo SARS-CoV em 2003, trazendo casos relatados de pneumonia na China, onde 774 pessoas vieram a óbito e, no mínimo, 8 mil pessoas foram infectadas; e a síndrome respiratória do Oriente Médio de 2012, causada pelo MERS-CoV, transmitido entre animais e pessoas, em que 35% dos casos reportados para OMS vieram a óbito¹.

A hipótese mais disseminada é a de que a transmissão de COVID-19 foi originada em morcegos, que poderiam ter infectado seres humanos através de outros animais intermediários, como cobras, pangolins e outros mamíferos. A infecção de humano para humano se dá por contato direto ou por gotículas e aerossóis, que se transmite de um indivíduo para o outro. Essa transmissão pode ocorrer em 7 dias após o início dos sintomas e pacientes assintomáticos podem apresentar um maior período de transmissão que pacientes sintomáticos².

Dessa forma, a transmissão de assintomáticos ocorreu, mas não houve a mesma quantidade de testagem para esses indivíduos, o que pode ter causado

maior disseminação da doença. Contudo, dados sugerem que quanto maior a manifestação de sintomas, pode haver maior carga viral, por consequência pode haver um tempo de transmissão maior ^{3 4}. Além disso, dados indicaram a possibilidade de transmissão também pode ocorrer por contato de objetos inanimados infectados ³. O potencial de transmissibilidade diversifica de indivíduo para indivíduo ⁵. Sendo assim, a testagem da população é um controle epidemiológico da doença, o que pode auxiliar na gestão de políticas públicas de saúde, no manejo de indivíduos e possibilita estratégias para limitar o contágio ⁶.

Segundo a OMS, os sintomas da COVID-19 começam em até 6 dias após a infecção e podem durar até 14 dias. Entre as manifestações mais frequentes o paciente pode ter febre, calafrios e odinofagia. As manifestações menos comuns são dores musculares, fadiga, coriza, cefaleia, dor ocular, vertigem, tosse, dor torácica, anosmia e ageusia. Assim, a COVID-19 é considerada grave na presença de taquipneia, baixa saturação de oxigênio, envolvimento pulmonar extenso em exames de imagem ou capacidade pulmonar de oxigenação baixa ⁴. Pode haver pacientes assintomáticos também e este é um fator no qual a genética do indivíduo pode influenciar.

O tropismo do SARS-CoV-2, que é a especificidade do vírus infectar um determinado tipo de tecido ou célula, são as células endoteliais, presente nos tratos respiratórios inferior e superior, tecido renal, cardíaco e outros. Esse tropismo propicia que o vírus entre na célula devido à proteína S (“spike” do inglês) que tem o domínio de ligação ao receptor e através do receptor celular da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2). Mutações genéticas no ECA2, e outras moléculas envolvidas na entrada do vírus no organismo, por fatores

epigenéticos ou outras doenças cardiovasculares e comorbidades, são as razões principais que vão determinar a susceptibilidade do indivíduo para a doença, sendo as causas também da variabilidade da resposta imune pessoal. Apesar do sistema de infectividade do vírus ser o mesmo para a maior parte dos indivíduos, foi confirmado que variantes genéticas do sistema imune serão essenciais na susceptibilidade, manifestação e gravidade da doença ⁵.

O SARS-CoV-2, como qualquer outro vírus de RNA, passou por uma série de mutações genômicas para adaptar-se ao hospedeiro, classificando-se por variantes de preocupação (VOC) e interesse, ou variante de monitoramento. As variantes de preocupação enfrentaram mudanças em sua transmissibilidade e virulência, às quais trouxeram maior preocupação referente à prevenção e possíveis métodos de tratamento. As VOCs identificadas foram a Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (p.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529).

As VOC confirmadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, foram todas exceto a Beta. Estas foram confirmadas através de sequenciamento genético de amostras de indivíduos contaminados ⁶.

A COVID-19 se espalhou rapidamente causando casos fatais. Mais de 6 milhões de mortes e 774 milhões de casos confirmados foram registrados mundialmente, segundo a OMS¹. No Brasil foram registradas mais de 38 milhões de casos. No Rio Grande do Sul, mais de 3 milhões de casos reportados, e em Porto Alegre 341 mil casos e mais de 6 mil mortes.

Em março de 2020, o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado no Rio Grande do Sul pela Secretaria de Saúde (SES), através do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (Cevs), trazendo à tona a realidade de uma epidemia no

estado ⁷. O diagnóstico deste paciente foi feito através do padrão ouro para COVID-19, o RT-qPCR, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real, padronizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos.

1.1. Diagnóstico do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR, transcrição reversa com reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, permite a amplificação de regiões do genoma de RNA, fazendo milhares de cópias destas sequências. O processo se dá pela extração da amostra, purificando os ácidos nucleicos para que haja amplificação das sequências desejadas, com o uso de *primers* e *probes*, através de termocicladores que demonstrarão esta fluorescência em um gráfico.

Para o diagnóstico do SARS-CoV-2, regiões do gene nucleocapsídeo (N) do vírus foram escolhidas para que os oligonucleotídeos do teste possam ser complementados. Para esse teste, o controle foi de RNase P (RP), que é um gene humano para confirmação do teste negativo, pois onde há um resultado negativo de COVID-19 e positivo de RP significa que a amostra realmente foi coletada.

De acordo com o CDC, o valor de referência de Ct para uma amostra positivo para COVID-19, é menor que 40.00 ciclos, em todos os genes testados, sendo eles N1, N2 e RNase P ⁸. O RNA foi extraído de amostras clínicas usando kits Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification (Promega, Wisconsin, EUA), e o qPCR foi realizado usando os seguintes termocicladores: Step One Plus, Step One e 7500 Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). *Primers* e

sondas foram utilizados de acordo com o protocolo do Centers for CDC para detecção de COVID-19.

A inferência de alta carga viral é geralmente correlacionada com o Ct, sendo inversos. Quanto menor seria a carga viral, maior é o Ct, porém a inversa pode não ser diretamente proporcional por conta da possível presença de fatores inibidores dentro das amostras, mas autores consideram o valor de Ct um adequado substituto para carga viral⁹. A carga viral relativa pode ser calculada baseada no método $2(-\Delta CT)^{10}$.

Estudos *in vitro* demonstram que a taxa de infectividade pelo COVID-19 é significativamente menor quando o Ct é maior que 24 ciclos e que para cada unidade aumentada no Ct, a razão de probabilidade para infectividade diminui 32%¹¹.

Num estudo epidemiológico de coorte, a carga viral foi identificada como o principal fator de transmissão, tendo o caso primário de infecção correlacionado com a transmissão posterior, e que os sintomática da doença está fortemente associada à carga viral desse contato de transmissão¹². Logo, transmissibilidade máxima se daria próximo ao início dos sintomas, e com o decorrer do tempo e da diminuição da doença, a probabilidade da infectividade diminui¹³.

Muito conhecimento já foi adquirido sobre as janelas de infecção e questões genéticas dos pacientes por se tratar de uma pandemia e muitos esforços para controle da doença e da transmissibilidade foram realizados. Entretanto as variantes do vírus e o fator de imunidade adquirida pela população tornam mais complexo o entendimento generalizado da dinâmica viral para a população¹⁴.

1.2 Epidemiologia

Após os primeiros casos de COVID-19, a OMS preconizou medidas de prevenção da disseminação por meio de distanciamento social, utilização de máscaras e higiene de mãos. Em 2020, o Estado do Rio Grande do Sul implementou decretos restritivos para conter a disseminação do vírus, utilizou medidas relacionadas a bandeiras com medidas protetivas para a população gaúcha, onde estas bandeiras tinham o objetivo de mostrar, através de cores, o risco das regiões do Estado, onde mediu dois grupos principais de métricas: propagação e capacidade de manutenção de cada região do estado. Começou em 30 de abril de 2020 e durou até abril de 2021, sendo a bandeira amarela, risco baixo; bandeira laranja, risco médio; bandeira vermelha, risco alto e bandeira preta, risco altíssimo ¹⁵.

Após esse modelo, o Estado contou com um sistema de monitoramento, chamado Sistema 3As, que traz uma maneira mais simples de monitoramento e protocolos como medidas protetivas. O sistema conta com três medidas: Aviso, Alerta e Ação; onde o Aviso é para a região que teve um aumento da tendência de casos, o Alerta é quando essa tendência de casos é grave, e a Ação é para a região responder sobre esse quadro de tendência e apresentar sua proposta de ações ¹⁶.

No entanto, mesmo com os esforços realizados, as medidas de distanciamento social não foram cumpridas pela população em sua totalidade, houve aglomerações e falta da utilização correta de máscaras e higiene. A falta de conscientização a respeito das consequências do não cumprimento das medidas distanciamento e de prevenção da disseminação viral provocou e ainda provoca a continuação da disseminação do vírus e aparecimento de novos casos. Além disso, houve falta e atrasos de recursos profiláticos, como a vacina.

A OMS decretou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) referente à COVID-19 em 5 de maio de 2023, após 1459 dias de decreto do nível mais alto de alerta da OMS, conforme Regulamento Sanitário Internacional, iniciado em 30 de janeiro de 2020, e caracterizado como pandemia em 11 de março de 2020¹.

Com o arrefecimento da pandemia, seria natural a ocorrência de um afrouxamento das medidas de proteção, momento em que a população voltaria a se aglomerar. Assim, haveria um aumento de circulação do vírus da COVID-19 e poderia apresentar maiores cargas virais nos pacientes, aumento da taxa de transmissibilidade.

1.3 Técnica de *wavelets*

A *wavelet*, originada da palavra francesa “ondalette”, significa pequena onda. A partir dela se originou a análise de *wavelets*, que utiliza a decomposição destas ondas para aproximar, estimar ou comprimir com domínios de frequência e tempo finito. Este é um método de sinalização e processamento de dados¹⁷.

Nas últimas décadas, as técnicas *wavelets* tornaram-se uma importante área de pesquisa em análise numérica e uma ferramenta importante no processamento moderno de sinais¹⁷. O fato básico que faz das *wavelets* uma ferramenta poderosa é que elas estão localizadas no tempo ou no espaço (ou ambos), ao contrário do que acontece com algumas funções estatísticas. Este comportamento o torna adequado para a análise de sinais não estacionários, conjuntos de dados lineares ou não lineares, além de amostras não homocedásticas. A ideia por trás da análise de *wavelets* é aproximar uma função através de uma combinação linear de *wavelets*. Para uma aproximação

comparável, funções com diferentes graus de suavidade (contendo picos e descontinuidades, por exemplo) exigirão menos *wavelets* nas suas representações dos conjuntos de dados. Ou seja, esta técnica analisa a frequência de um evento através de escalas de frequência e tempo¹⁸.

Este trabalho combina o entendimento sobre o SARS-CoV-2, seu diagnóstico por RT-qPCR, epidemiologia da cidade de Porto Alegre e a aplicação da técnica *wavelets*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. *World Health Organization*. 2022;(August):1-33. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>
2. Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26(8):1200-1204. doi:10.1038/s41591-020-0965-6
3. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*. 2021;13(2). doi:10.3390/v13020202
4. Adil MT, Rahman R, Whitelaw D, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgrad Med J*. 2021;97(1144):110-116. doi:10.1136/postgradmedj-2020-138386
5. Fricke-Galindo I, Falfán-Valencia R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.622176
6. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Boletim genômico 2021. Published online 2021.
7. Rio Grande do Sul S da S. Confirmado o primeiro caso de coronavírus no Rio Grande do Sul. *10/03/2020 às 13h30min*. 2020:1-5.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR diagnostic panel for emergency use only. *Cdc Eua*. 2020;3:0. <https://www.fda.gov/media/134922/download>

9. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* 2020;9(3):573-586. doi:10.1007/s40121-020-00324-3
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
11. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis.* Published online 2020:1-18. doi:10.1093/cid/ciaa638
12. Marks M, Millat-Martinez P, Ouchi D, et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(5):629-636. doi:10.1016/S1473-3099(20)30985-3
13. Marc A, Keroui M, Blanquart F, et al. Quantifying the relationship between sars-cov-2 viral load and infectiousness. *Elife.* 2021;10. doi:10.7554/eLife.69302
14. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):147-161. doi:10.1038/s41579-022-00822-w
15. Rio Grande do Sul S da S. Bandeiras e protocolos: entenda o modelo de distanciamento controlado. 30/04/2020 às 16h25min. 2020:20-23.
16. Rio Grande do Sul S da S. *SISTEMA 3As DE MONITORAMENTO.*; 2021:42.
17. Morettin P. *Ondas e Ondaletas.*; 2014.

18. Morettin PA. Wavelets in Statistics. *Resenhas IME-USP*. 1997;3(2):211-272.

doi:<https://doi.org/10.11606/resimeusp.v3i2.74872>

3. OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar a dinâmica da pandemia em Porto Alegre através dos Ct das amostras admitidas para testagem de SARS-CoV-2 por RT-qPCR no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, associando com as medidas protetivas presentes, bandeiras vigentes e dados epidemiológicos.

ESPECÍFICOS:

- a) Inferir a carga viral de SARS-CoV-2 em amostras positivas no PCR qualitativo de COVID-19;
- b) Associar a carga viral de SARS-CoV-2 com as medidas protetivas vigentes (bandeiras) no momento da análise;
- c) Associar a carga viral de SARS-CoV-2 com as ondas da epidemia em Porto Alegre.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

**“Why we can’t predict COVID-19 waves with viral load of
SARS-CoV-2”**

Larissa Rocha da Silva, Eduardo de Paula Kirinus, Alessandro Comarú
Pasqualotto

Enviado para publicação na Revista “Clinical Biomedical Research”

Notificações

**[CBR] Decisão editorial**

2024-01-19 10:07 AM

Larissa Rocha da Silva, Eduardo de Paula Kirinus, Alessandro Comarú Pasqualotto:

Nós chegamos a uma decisão referente a sua submissão para o periódico Clinical and Biomedical Research, "Why we can't predict COVID-19 waves with viral load of SARS-CoV-2".

O manuscrito teve uma recomendação positiva para publicação, porém, ainda há **revisões ou esclarecimentos necessários** a partir da avaliação de nossos pareceristas.

Os arquivos que devem ser incluídos no sistema são: carta resposta aos itens questionados, e artigo completo com as alterações marcadas em amarelo para facilitar a sua identificação.

Por favor, veja abaixo os comentários dos avaliadores.

Cordialmente,

Daniel Umpierre
Editor-chefe
Clinical and Biomedical Research

Avaliador B:
Recomendação: Aceitar

Avaliador D:

The paper is suitable for the journal, but requires minor revision.

The figures should better commented and a brief introduction on wavelets could be given. Since relative viral load was not appropriate to predict the waves of covid infection, why is the paper relevant to this subject? What other variable, if any, could be used?

COVID-19 epidemiological waves cannot be predicted with SARS-CoV-2 viral load

ABSTRACT

Background: SARS-CoV-2 infection has caused more than 6.6 million deaths worldwide, and its transmission model has been questioned. The viral load of the virus was probably the main driver of the transmission of COVID-19. Therefore, this study assessed the impact of the viral load of SARS-CoV-2 on the epidemiological wave of COVID-19. **Methods:** Samples for COVID-19 were analyzed using RT-qPCR at the Molecular Biology Laboratory of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Epidemiological data were drawn from prefectural and state websites. Wavelet analyses with a 3-days filter were used.

Results: A total of 11.302 positive COVID-19 samples from patients residing in Porto Alegre were evaluated; most patients were female, and the mean age was 44.6 years-old. The median relative viral load (RVL) median was 9.98 copies/mL.

Conclusions: The relative viral load could not predict the waves of COVID-19, due to the virus mutation. There were periods of high RVL where transmission occurred within 32 days and periods of low RVL where transmission occurred up to 16 days.

Key words: viral load; wave analysis; wavelet; RT-qPCR; infectiousness; SARS-CoV-2; COVID-19.

BACKGROUND

SARS-CoV-2 is a positive-sense, single-stranded RNA virus that caused several outbreaks of respiratory syndrome in China in 2019, which was followed by a global epidemic¹⁹. As determined by the World Health Organization (WHO) as a pandemic, COVID-19 has spread rapidly, causing numerous fatal cases. More than 6.6 million deaths and 656 million confirmed cases have been recorded worldwide ¹.

The diagnosis of COVID-19 is usually established by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR), most commonly using an assay standardized by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in the United States ⁸. Analysis of RT-qPCR results relies on cycle threshold (Ct) readings, that is, the cycle at which fluorescence accumulates exponentially to cross the threshold, which separates background noise from genomic amplification ²⁰. In this regard, there is an inverse relationship between Ct and viral load, such that samples with a higher viral load produce lower Cts, and vice versa.

The SARS-CoV-2 viral load was probably the main driver of COVID-19 transmission ²¹. In vitro studies have demonstrated that the rate of infectivity by COVID-19 is significantly lower when Ct is higher than 24 cycles, and that for each unit increase in Ct, the odds ratio for infectivity decreases by 32% ¹¹. Understanding the epidemiological waves of COVID-19 is a more complex process, in which viral transmission is related to evolutionary changes in the virus as well as changes in host immunity and its behaviors ²². To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the impact of the SARS-CoV-2 viral load on the epidemiological waves of COVID-19.

METHODS

STUDY DESIGN

Retrospective transversal study.

CLINICAL SAMPLES

Patients included in the study tested positive for SARS-CoV-2 using RT-qPCR at Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, a large tertiary hospital (1,200-beds) and a reference health care institution in Porto Alegre, Southern Brazil. Only patients residing in Porto Alegre were eligible for the study. This study was conducted between March 2020 and March 2022. Clinical samples included nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples, bronchoalveolar lavage, and tracheal aspirates. Inpatients and outpatients, adult and pediatric patients were included in the study. Only positive samples from residents of Porto Alegre were considered for this project.

EPIDEMIOLOGIC DATA

In March 2020, the first case of COVID-19 was confirmed in the state of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). Since then, local authorities have implemented a system of flags to provide recommendations on the mobility of people in the state. The flag system was used as a controlled distancing model, involving rules that were adopted according to the region's flag and economic sector, providing four stages of control: yellow, orange, red, and black. It measured two major metric groups: propagation and serviceability from each region of the state. It started on April 30, 2020, and lasted until April 2021. After this, 3As monitoring was used, with the same methodology as flags, but giving

each region their own ability to use it or not, with recommendations for Warning, Alert, and Action.

For the purpose of this study, we recorded epidemiologic data, protective measures (flag system), genomic reports of circulating variants, and social distancing in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul (southern Brazil). WHO's website was also consulted for different moments of the epidemic. According to the sequencing state genomic bulletin, the entry of variant of concern (VOC) Gamma occurred in March 2021, VOC Delta in August 2021, and VOC Omicron in late December 2021 ⁶. We have previously reported on VOC Alpha and 614G in the state.

Relative viral load (RVL) was associated with the number of COVID-19 hospitalizations, vaccine doses administered in the community, and deaths during the study period.

RT-qPCR for SARS-CoV-2

RNA was extracted from clinical samples using Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification kits (Promega, Wisconsin, USA), and RT-qPCR was performed using the following thermocyclers: Step One Plus, Step One, and 7500 Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers and probes were used according to the Centers for CDC protocol for COVID-19 detection ⁸. Even though the CDC COVID-19 RT-qPCR test is a qualitative assay, the SARS-CoV-2 viral load was inferred by considering the CT value of the COVID-19 N1 gene and internal control RNase P, using the following delta calculation: relative viral load (RVL) = $2(-\Delta CT)^{10}$, in which $\Delta CT = CT_{N1} - CT_{RNA}$.

STATISTICS

Descriptive statistics were used to analyze the data. Qualitative data were analyzed with Chi-square or Fisher's exact test, according to the data distribution. Quantitative data were analyzed using Student's t-test or the Mann-Whitney test, as appropriate. Comparison of viral load according to Variable categories was performed using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests with Dunn's test for multiple comparisons. Results with a p-value of <0.05 were considered statistically significant. Data analysis was performed using SPSS software (version 25.0; International Business Machines Corporation, New York, United States).

WAVELET ANALYSIS

The Wavelet analyses were carried out according to Torrence and Compo²³ and Morettin¹⁷ to analyze the collected data in the energy and Frequency spectra²⁴. In this study, only one-dimensional wavelets were applied to identify the time scales of the most relevant processes acting in the data filtered with high- and low-pass Lanczos-cosine filters²⁴, with a time window of three days (mimicking the incubation period of COVID-19).

The temporality of COVID-19 cases associated with the relative viral load (RVL) was analyzed using the wavelet method with a time series of RVL filtered with a high and low-pass filter. In the wavelet method, a global wavelet power spectrum was used to demonstrate the occurrence of events with high energy over the global spectra over time, thus enhancing moments with a high dominance of the studied variable (RVL).

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by the ethical committee of Santa Casa Hospital and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (49313421.8.0000.5335).

RESULTS

During the study period, 126,945 samples were tested for COVID-19 using qPCR in Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Of these, 11,302 samples were positive from Porto Alegre residents and were therefore included in the study. Most of these patients were female (55.4%), and the mean age was 44.6 years-old ($\pm$ standard deviation, sd, 20.8 years-old).

Most samples were combined from oral and nasopharyngeal swabs (99.3%), mostly (96%), representing the first sample tested for qPCR. Along the 666 days analysed, the highest positivity rates occurred in August 2020 (9.3%), March 2021 (9.9%) and January 2022 (11.6%).

Median RVL for samples tested in the study was 9.98 copies/mL (lower range value was <0.001 and upper range value was 4.10^8). The 25th percentile was 0.86, and the 75th percentile was 184.73, as measured using the Livak method¹⁰.

Table 1 shows the association between RVL and demographic data in the study. Regarding age, a significant difference in RVL occurred: RLV was higher in the 0-17 years-old group ($p<0.001$), with a median RVL of 20.8, in comparison to other age groups. The RVL did not vary significantly according to sex. A total of 433 patients were tested more than once, and these had a higher median RVL on the first positive test than on the second ($p>0.001$). Regarding the flag

systems, the black flag showed the highest RLV (median of 27.8), the second highest was warning (RLV median of 27.4), and the third was orange (RLV median of 15.5), while the others were lower than unmonitored (RLV median 10). There was no association between median RLV and the number of COVID-19 hospitalizations, vaccine doses, or deaths ($p>0.05$).

Applying wavelet analysis to the RVL time series, with a low-pass filtered RVL treated with a 3 days window (Figure 1, upper panel), it can be noted that there was a close relationship between the presence of positive cases and the increase in viral load. In addition, the local power spectrum (Figure 1, bottom left panel) showed that positive correlations (i.e., the red contours) were enhanced with RVL values above 600, as well as low correlation with less RVL, enhancing the correlation of RVL within a window of up to 3 days, which are able to exert influence towards high period, reaching 128 days of influence in Nov/20, 64 days in Feb/22. However, despite extreme events related to pandemic peaks, on average, this influence was maintained for approximately 16-32 days. Interestingly, the figure also shows that despite a period of low incidence of occurrence (Apr/21 to Jan/22) the viral charge maintained high values with a decreasing tendency. During this period, there was a peak in the local energy spectra for 64 days in Jul/21.

The most energetic period of occurrence was 8 days, dominating the energy spectra, which was corroborated by Fourier analysis (Figure 1, bottom right panel). A general result from the wavelet analysis is that among the RVL data, there was an average influence of 32 days of occurrence cycles. This result showed that the first COVID-19 variant was able to gradually increase the viral load in patients during 2020, reaching its peak on Nov/20, with 128 days of

influence period; after the first wave of vaccines (after Apr/21), the cases reduced as well as the viral charge that oscillated.

High-frequency filtered RVL analysis was performed, showing that the time series (Figure 2 upper panel) has an alternating pattern towards high and low values of RVL resulting from the high variance of RVL within 3 days. The local power spectrum of the wavelet analysis (Figure 2, bottom left panel) confirmed with 95% confidence for cycles occurring from 1 to 3 days that positive samples can exert influence on temporal scales of occurrence shorter than 16 days, meaning that a positive case could be spreading COVID for up to 16 days, thus enforcing the idea of high transmissibility of COVID variants (Figure 2, bottom right panel).

In addition, after the first vaccination period for alpha variation (from Jan/2021), the period of influence of the viral charge decreased, regarding the cycles of 1 to 3 days, reaching no correlation or influence less than 4 days, indicating a significant reduction in RVL and the period of influence that a positive patient can spread COVID. At the beginning of the omicron variation (Feb/22), it is possible to confirm an increase in the viral load, as COVID-19 is immune to the previous vaccine.

DISCUSSION

So far, the viral load of SARS-CoV-2 has been related to shedding dynamics of the virus, transmission, immunity, and virus mutations ^{21,25}, but there have been no studies relating the viral load to the emergence of new epidemic waves.

Our findings, based on wavelet analysis with RVL and considering the chronological order of events, revealed an increasing number of COVID-19 cases (the first epidemiological wave) between Jul/20 and Jan/21. After that, the second wave occurred between Mar/21 and Apr/21, following Carnival in Brazil, and the third wave between Jan/22 and Mar/22, following important holidays such as New Year's Eve and Carnival. The introduction of novel VOCs and the failure to promote social distancing, including clandestine parties during the epidemic, showed an increase in cases.

It is important to note that in Brazil, 614G and Alpha were the predominant VOCs in the first wave, and the Gama variant already reached its peak of infection during the second wave. Even though the Delta variant entered the state in August 2021, it had a higher RVL, but not so many cases of positive people. The Omicron variant reached its state in December 2021 and is the predominant variant of the third wave ⁶.

Regarding the sample type, we found a higher RVL in combined swabs of tracheal and nasopharyngeal aspirates than in other types, in accordance with published literature ²¹.

On a low-frequency graph of RVL, for three days of cases, we note a higher viral load, and the positive cases can still be infectious for up to 32 days; however, there are periods when there is a reduction in this pattern without a high

viral load, which we can call a vaccine effect. On a high frequency graph of RVL, 1-3 days of cases, we noted a lower viral load, and the positive cases could be infectious for up to 16 days. Despite the vaccine's effect, it still maintained the existence of new infections in short periods, even with a low viral load.

Although the evolution of variants shows that they are more transmissible, this does not mean that their virulence is greater, such as Omicron, which is less clinically serious than its previous variants ²². Transmission models have shown that agematched contacts are associated with an increased risk of infection ²⁶, which contributes to the agglomeration rate and typical holidays in Porto Alegre.

The high-frequency result is much more reliable if the sample is controlled, as if all residents of a given neighborhood were evaluated to understand the transmission, as we have transmission data for up to 16 days, but we do not know if this spread occurs in the same location, that is, the infected patient influences the sample globally, but not necessarily locally.

Our study has several limitations. Missing data on prefecture and state websites due to technical problems in the collection. As it is a quantitative qPCR assay, we could not assess which strains were predominant in the hospital for each positive sample. If the sample is controlled for, the high-frequency graph would be even more reliable.

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrated that the study of RVL does not allow for the prediction of novel epidemiological waves of COVID-19 in the context of evolving variants. SARS-CoV-2 does not cause a regular illness that maintains the same pattern of infection because many variables can interfere with the SARS-CoV-2 transmission cycle. However, we can notice a pattern of outbreaks, where it occurs again from 500 to 1000 days, not caused by RVL but from its virus cycle, not necessarily deadly or so clinically serious, due to human behavior, host immunity enhancement, evolution of the virus, and vaccination.

Unlike other viruses, SARS-CoV-2 stands out for not following the same pattern of dissemination by viral load, because even at times when we had a high viral load, we had low dissemination, demonstrating that the strains of the virus determine its dissemination.

There are epidemiological periods in which the viral load increases, and it has a prolonged effect on viral transmission for up to 32 days and other periods that have an effect on viral transmission for up to 16 days.

REFERENCES

1. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. *World Health Organization*. 2022;(August):1-33. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>
2. Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26(8):1200-1204. doi:10.1038/s41591-020-0965-6
3. Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*. 2021;13(2). doi:10.3390/v13020202
4. Adil MT, Rahman R, Whitelaw D, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgrad Med J*. 2021;97(1144):110-116. doi:10.1136/postgradmedj-2020-138386
5. Fricke-Galindo I, Falfán-Valencia R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Front Immunol*. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.622176
6. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Boletim genômico 2021. Published online 2021.
7. Rio Grande do Sul S da S. Confirmado o primeiro caso de coronavírus no Rio Grande do Sul. *10/03/2020 às 13h30min*. 2020:1-5.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR diagnostic panel for emergency use only. *Cdc Eua*. 2020;3:0. <https://www.fda.gov/media/134922/download>

9. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* 2020;9(3):573-586. doi:10.1007/s40121-020-00324-3
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
11. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis.* Published online 2020:1-18. doi:10.1093/cid/ciaa638
12. Marks M, Millat-Martinez P, Ouchi D, et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(5):629-636. doi:10.1016/S1473-3099(20)30985-3
13. Marc A, Keroui M, Blanquart F, et al. Quantifying the relationship between sars-cov-2 viral load and infectiousness. *Elife.* 2021;10. doi:10.7554/eLife.69302
14. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):147-161. doi:10.1038/s41579-022-00822-w
15. Rio Grande do Sul S da S. Bandeiras e protocolos: entenda o modelo de distanciamento controlado. 30/04/2020 às 16h25min. 2020:20-23.
16. Rio Grande do Sul S da S. *SISTEMA 3As DE MONITORAMENTO.*; 2021:42.
17. Morettin P. *Ondas e Ondaletas.*; 2014.
18. Morettin PA. Wavelets in Statistics. *Resenhas IME-USP.* 1997;3(2):211-272. doi:https://doi.org/10.11606/resimeusp.v3i2.74872

19. Oliveira BA, de Oliveira LC, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: A mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2020;62(May):1-8. doi:10.1590/S1678-9946202062044
20. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-219. doi:10.1586/14737159.5.2.209
21. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. doi:10.1038/s41579-022-00822-w
22. Koelle K, Martin MA, Antia R, Lopman B, Dean NE. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. 2022;1121(March):1116-1121.
23. Torrence C, Compo G. A Practical Guide to Wavelet Analysis Christopher. *The Governors and The New Federalism*. Published online 2019:49-57. doi:10.4324/9780429311369-6
24. Liu Y, Liang XS, Weisberg RH. Rectification of the bias in the wavelet power spectrum. *J Atmos Ocean Technol*. 2007;24(12):2093-2102. doi:10.1175/2007JTECHO511.1
25. Jonsson H, Magnusson OT, Melsted P, et al. Molecular benchmarks of a SARS-CoV-2 epidemic. Published online 2021:6-13. doi:10.1038/s41467-021-23883-6
26. Laxminarayan R, Wahl B, Dudala SR, et al. Epidemiology and transmission dynamics of COVID-19 in two Indian states. 2020;697(November):691-697.

TABLES

Table 1. Demographic variables of patients with COVID-19 and their association with SARS-CoV-2 relative viral load.

Total (n=11.302)							
		n	%	Median	P25	P75	p-value
Age (years)	0-17	766	6.8	20.8	1.00	170.7	<0.001
	18-39	4300	38.0	13.6	1.00	236.8	
	40-59	3431	30.4	10.5	0.80	180.8	
	>=60	2805	24.8	4.4	0.30	115.1	
Sex	Male	5018	44.4	10.7	0.9	199.1	0.129
	Female	6284	55.6	9.3	0.8	172.6	
Flags system	Yellow	0	0	0	0	0	<0.001
	Orange	1592	14.1	15.5	0.8	300.8	
	Red	5028	44.5	4.1	0.7	160.3	
	Black	1793	15.9	27.8	1.00	394.3	
	Warning	889	7.9	27.4	1.00	329.9	
	Unmonitored	2000	17.7	10.0	0.6	67.8	

P25: Percentile 25; P75: Percentile 75.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, demonstramos que o estudo da CVR não permite a previsão de novas ondas epidemiológicas de COVID-19 no contexto de variantes em evolução. O SARS-CoV-2 não causa uma doença regular que mantenha o mesmo padrão de infecção porque muitas variáveis podem interferir no ciclo de transmissão do SARS-CoV-2. No entanto, podemos notar um padrão de surtos, onde ocorre novamente de 500 a 1000 dias, não causado pela CVR, mas pelo seu ciclo viral, não necessariamente mortal ou clinicamente grave, devido ao comportamento humano, aumento da imunidade do hospedeiro, evolução do vírus e vacinação.

Diferentemente de outros vírus, o SARS-CoV-2 se destaca por não seguir o mesmo padrão de disseminação por carga viral, pois mesmo nos momentos em que houve carga viral elevada, houve baixa disseminação, demonstrando que são as características das cepas do vírus que determinam seu padrão de disseminação.

Existem períodos epidemiológicos em que a carga viral aumenta e tem efeito prolongado na transmissão viral por até 32 dias e outros períodos que têm efeito na transmissão viral por até 16 dias.

Sabe-se que a carga viral varia fortemente dentro da população, como as questões genéticas, vacinação, variantes do vírus, susceptibilidade individual, tornando a questão da dinâmica da carga viral e transmissão únicas para cada indivíduo, então a carga viral não pode ser avaliada como um único fator de transmissibilidade.

A ideia principal de tentar relacionar a carga viral com a transmissibilidade baseia-se no princípio viral de transmissibilidade e contágio, que podemos verificar em outros vírus que infectam humanos. Assim que a análise foi concluída, confirmou-se que não havia associação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo tem várias limitações. Dados faltantes nos sites das prefeituras e estados devido a problemas técnicos na coleta. Por se tratar de um ensaio qPCR quantitativo, não foi possível avaliar quais cepas eram predominantes no hospital para cada amostra positiva. Se a amostra for controlada, o gráfico de alta frequência seria ainda mais confiável.

Uma análise mais completa necessitaria de uma amostra controlada e do sequenciamento para confirmação do tipo de vírus, para avaliação do fluxo de ondas.

8. ANEXOS

8.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA	
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA EPIDEMIA DE COVID-19 PELA INFERÊNCIA DA CARGA VIRAL DE SARS-COV-2 NA CIDADE DE PORTO ALEGRE

Pesquisador: ALESSANDRO COMARÚ PASQUALOTTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49313421.8.0000.5335

Instituição Proponente: Imandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.957.953

Apresentação do Projeto:

O SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave por coronavírus 2, é um vírus senso positivo, RNA de fita simples, da família Coronaviridae, do gênero Beta-coronavírus, que causou, em dezembro de 2019, na China, uma sequência de surtos de síndromes respiratórias em humanos ocasionando, logo depois, uma epidemia mundial (OLIVEIRA et al., 2020). Determinada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doença pandêmica, a COVID-19, se espalhou rapidamente causando inúmeros casos fatais. Mais de 3,9 milhões de mortes e 181 milhões de casos confirmados foram registrados mundialmente, segundo a OMS (<https://covid19.who.int/>). Em março de 2020, o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado no Rio Grande do Sul pela Secretaria de Saúde (SES), através do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (Cevs), trazendo à tona a realidade de uma epidemia no estado (RIO GRANDE DO SUL, 2020a). O diagnóstico deste paciente foi feito através do padrão ouro para COVID-19, o qRT-PCR, transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real, padronizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos. A técnica de qRT-PCR consiste na amplificação de genes, fazendo milhares de cópias destas sequências. O processo

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer		
Bairro: 6º andar - Centro	CEP: 90.020-090	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE	
Telefone: (51) 3214-8571	Fax: (51) 3214-8571	E-mail: cep@santacasa.fche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 4.957.953

se dá pela extração da amostra, purificando os ácidos nucleicos para que haja amplificação das sequências desejadas, com o uso de primers e probes, através de termocicladores que captarão a fluorescência da amostra e demonstrarão isso em um gráfico. Para a análise deste gráfico, é necessário o ajuste do threshold, limiar de fluorescência, na região de crescimento exponencial do produto da PCR. A inferência de carga viral dessa amostra acontece pela interpretação do Ct, ciclo threshold, que vai indicar o primeiro ciclo que a amostra vai passar pelo threshold (ARYA et al., 2005). De acordo com o CDC, o valor de referência de Ct para uma amostra positiva para COVID-19, é menor que 40.00 ciclos, em todos genes testados, sendo eles N1, N2 e RNase P (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020). A inferência de alta carga viral é geralmente correlacionada com o Ct, sendo inversos. Quanto menor seria a carga viral, maior é o Ct, porém a inversa pode não ser diretamente proporcional por conta da possível presença de fatores inibidores dentro das amostras, mas autores consideram o valor de Ct um adequado substituto para carga viral (RAO et al., 2020). A carga viral relativa pode ser calculada baseada no método $2(-CT)$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Estudos in vitro demonstram que a taxa de infectividade pelo COVID-19 é significativamente menor quando o Ct é maior que 24 ciclos e que para cada unidade aumentada no Ct, a razão de probabilidade para infectividade diminui 32% (BULLARD et al., 2020). A OMS preconiza medidas de distanciamento social, como evitar aglomerações, não se manter em ambientes fechados ou que tenha contato próximo de alguém, utilização correta de máscaras e higiene de mãos. O Estado do Rio Grande do Sul adotou, em 2020, decretos restritivos para conter a disseminação do vírus, através de bandeiras com medidas protetivas para a população gaúcha (RIO GRANDE DO SUL, 2020b). Atualmente, o Estado conta com um sistema de monitoramento, chamado Sistema 3As (RIO GRANDE DO SUL, 2021). Muitas medidas de distanciamento social não foram cumpridas pela população, havendo aglomerações e falta da utilização correta de máscaras e higiene. A falta de conscientização das consequências provocou e ainda provoca a continuação dos casos, além da falta e/ou atraso de recursos profiláticos, como

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51) 3214-8571 Fax: (51) 3214-8571 E-mail: oep@santacasa.iche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 4.957.953

a vacina, fazendo assim o ser humano o principal motor da epidemia Metodologia Proposta:

AMOSTRA Serão avaliadas amostras de swab naso e orofaringe, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal e/ou líquido coletados em tubos

específicos para cada amostra, de pacientes pediátricos e adultos com suspeita de COVID-19 diagnóstico e que entraram, desde março de 2020 até

30 de junho de 2021, totalizando 85436 amostras, na rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto da Santa Casa de Misericórdia de Porto

Alegre. Destas serão avaliadas somente as amostras positivas de pacientes de Porto Alegre. ANÁLISE ESTATÍSTICA Para a análise estatística dos

dados será utilizada planilha no programa Excel versão 2019 (Office, Microsoft, USA) e posteriormente exportada para o software SPSS (Statistical

Package for the Social Sciences) versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para a associação entre os valores de carga viral e dados

epidemiológicos será realizado o teste estatístico de Correlação de Pearson para as variáveis simétricas ou o teste estatístico de Spearman para as

variáveis assimétricas. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS A coleta de dados epidemiológicos e de distanciamento social, medidas protetivas

(bandeiras) será feita através dos sites específicos da prefeitura de Porto Alegre para dados sobre a COVID-19, e também dos sites do Estado do

Rio Grande do Sul e OMS, para diferentes momentos da epidemia. Avaliação do bairro do paciente residente em Porto Alegre, sexo, idade, tipo de

amostra e recidiva da doença. MÉTODOS LABORATORIAIS Foi realizado a transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo

real, utilizando os termocicladores modelo Step One Plus, Step One e 7500 Real-Time (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA), após a extração

de RNA de cada paciente, foram utilizados primers de acordo com a padronização do CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND

PREVENTION, 2020), específicos para análise dos genes de COVID-19. A análise de carga viral será calculada pelo método 2^{-CT} (LIVAK;

SCHMITTGEN, 2001), onde os valores de CT obtidos através do qRT-PCR de N1 e RNase P (genes alvo e referência, respectivamente) serão

utilizados para o cálculo do delta ($CT = CT_{N1} - CT_{RNA}$) e os controles positivos para calcular o

Endereço: R. Profª Arnes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.lche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 4.957.953

delta delta ($CT = CT_{amostra} - CT_{controle}$).

Critério de Inclusão:

Amostras com resultados positivos de pacientes que residem em Porto Alegre.

Critério de Exclusão:

Amostras com resultados negativos de pacientes que residem fora de Porto Alegre

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a dinâmica da epidemia através dos Ct das amostras admitidas para testagem de SARS-CoV-2 por qRT-PCR no Laboratório de Biologia

Molecular do Instituto Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, associando com as medidas protetivas presentes, bandeiras vigentes, em Porto

Alegre e dados epidemiológicos.

Objetivo Secundário:

• Inferir a carga viral de SARS-CoV-2 em amostras positivas no PCR qualitativo de COVID-19; • Associar a carga viral de SARS-CoV-2 com

as medidas protetivas vigentes (bandeiras) no momento da análise; • Associar a carga viral de SARS-CoV-2 com número de novos infectados em Porto Alegre ao longo da epidemia; • Associar a carga viral de SARS-CoV-2 com o percentual de vacinados na

população de Porto Alegre; • Avaliar a carga viral de SARS-CoV-2 com o painel de mobilidade e distanciamento social durante os diferentes

regimes de bandeiras em Porto Alegre.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo para os pacientes, por se tratar de análise de banco de dados.

Benefícios:

Tendo em vista os impactos que a COVID-19 têm provocado, tanto em âmbito social quanto econômico, fazem-se necessários estudos para avaliar

a dinâmica da epidemia de SARS-Cov-2 dentro de Porto Alegre, permitindo desta forma uma relação de inferência de carga viral e frequência da

doença na cidade, visando a avaliação da epidemiologia da COVID-19.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo que analisará amostras já coletadas com dados epidemiológicos de COVID-

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer

Bairro: 6º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA**



Continuação do Parecer: 4.957.953

19.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
apresentados e adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa encontra-se de acordo com a Norma vigente Resolução 466/12 para pesquisa em seres humanos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1786224.pdf	10/07/2021 08:54:59		Aceito
Folha de Rosto	Projeto_pesquisa_PBrasil_Larissa.pdf	10/07/2021 08:53:56	Larissa Rocha da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao_confidencialidade_de_sujeito.pdf	06/07/2021 19:44:40	Larissa Rocha da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao_utilizacao_de_dados.pdf	06/07/2021 19:44:13	Larissa Rocha da Silva	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_mestrado_Larissa.docx	06/07/2021	Larissa Rocha da Silva	Aceito

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
 Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.tche.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA**



Continuação do Parecer: 4.957.953

/ Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Larissa.docx	19:42:37	Silva	Aceito
----------------------------	-------------------------------	----------	-------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Setembro de 2021

**Assinado por:
JOÃO CARLOS GOLDANI
(Coordenador(a))**

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 8º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.fche.br