



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

THAIS DE OLIVEIRA COSTA

**VIGILÂNCIA GENÔMICA DE SARS-CoV-2 NA CIDADE DE FORTALEZA:
FORTALECIMENTO DO MONITORAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E
CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES**

FORTALEZA

2023

THAIS DE OLIVEIRA COSTA

VIGILÂNCIA GENÔMICA DE SARS-CoV-2 NA CIDADE DE FORTALEZA:
CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES E FORTALECIMENTO DO MONITORAMENTO
EPIDEMIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Miyajima.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C876v Costa, Thaís.
Vigilância Genômica de SARS-CoV-2 na Cidade de Fortaleza : Caracterização de Variantes e Fortalecimento do Monitoramento Epidemiológico / Thaís Costa. – 2023.
109 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Fabio Miyajima.
1. COVID-19. 2. Sequenciamento de Nova Geração. 3. Sequenciamento do Genoma Completo. 4. Técnicas de Genotipagem. 5. Teste para Antígeno do SARS-COV-2. I. Título.
- CDD 615.1
-

THAIS DE OLIVEIRA COSTA

VIGILÂNCIA GENÔMICA DE SARS-CoV-2 NA CIDADE DE FORTALEZA:
CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES E FORTALECIMENTO DO MONITORAMENTO
EPIDEMIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Miyajima (Presidente)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Ceará)

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Allysson Allan de Farias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Amazônia)

A Deus.

Aos meus pais, Mônica e João.

A todas as vítimas, diretas e indiretas, da COVID-19.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, João e Mônica, e minha irmã, Thamiris, por todo auxílio. Por terem me apoiado a seguir meus sonhos e por terem me dado todas as condições necessárias para isso.

A Luís Castanheira, pelo apoio fundamental na minha trajetória pessoal e profissional.

A Fundação Oswaldo Cruz e a Universidade Federal do Ceará, pela estrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Fabio Miyajima, por ter me concedido a oportunidade de executar esse trabalho e pela orientação no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Danielle Macêdo Gaspar, Dr. Felipe Gomes Naveca, Dr. Moreno Magalhães de Souza Rodrigues e Dr. Fernando Motta, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

À Cibele Amaro e aos demais membros da minha família, pelo apoio e acompanhamento a minha trajetória acadêmica.

À Lorena Santos, Ana Kelly e Luiza Ribeiro, por sempre estarem presentes na minha vida.

À Adelaide Cabral, por toda sensibilidade, cuidado e apoio na minha trajetória.

Aos colegas do Hemoce, Andressa Almeida, Fernanda Soares, Anamaria Falcão, Maisa Pessoa, Beatriz Chaves, Luisa Vasconcelos, Aurilene Cajado, Nivian Albuquerque, Matheus de Souza e Davi Alves, pela companhia e auxílio nos meus dias de trabalho no diagnóstico na COVID-19.

Aos colegas do ACME Lab Ticiane Cavalcante, Joaquim Júnior, Jamille Bezerra, Thaís Ferreira, Leonardo Araújo, Pedro Miguel, Débora Maria, Bruna Maria, Cleber Furtado, Clara Norões, Mayra França, Luzia Zeferino, Lucas Delerino, Allysson Allan, Alyson Santos, Joyce Carvalho, Luisa Lopes, Ellen Gonçalves, Letícia Espinosa, Sarah Barreto, Nicole Neves, Fabio Marconso, Suzana Porto, Eder Lopes, Fernando Braga, Alice Sabatino, Claudia Stutz e Veridiana Pessoa - expresso minha profunda gratidão. Suas contribuições foram fundamentais não apenas na execução e elaboração deste trabalho, mas também no meu crescimento pessoal e profissional. Sem a presença e apoio de cada um de vocês, a realização deste trabalho não teria sido possível. Ele é fruto do nosso esforço. Obrigada por fazerem parte deste percurso!

“Vida é código e combinação / Vida é mutação e evolução
/ Vida é inovação e repetição / Vida é molécula e sistema”
(Cubo da Vida – Museu do Amanhã).

RESUMO

A emergência da pandemia de COVID-19 foi um catalizador para avanços sem precedentes em aplicações de técnicas de sequenciamento do genoma completo (WGS) voltados para a vigilância genômica (VG) de SARS-CoV-2 (SC2), com o objetivo de aprimorar medidas de prevenção e intervenção frente a evolução viral, bem como o contínuo progresso científico no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas. Apesar do elevado número de genomas de SC2 em repositórios públicos, existe um viés em favor de centros tecnológicos mais avançados e uma necessidade de se homogeneizar a cobertura e a representatividade amostral para VG. Para tanto, este trabalho objetivou a caracterização e o monitoramento de novas variantes de SC2 em um centro urbano representativo (Fortaleza) durante um período crítico da pandemia (Dez/2020 a Dez/2022), durante o qual foi conduzido o desenvolvimento simultâneo de soluções inovadoras para aplicação no monitoramento de variantes de preocupação (VOCs) de SC2. Amostras de swab nasofaríngeo coletadas em meio de transporte viral (MTV) foram encaminhadas após confirmação diagnóstica da COVID-19 por RT-qPCR, triadas e sequenciadas por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) em plataforma Illumina, como parte das atividades desenvolvidas em colaboração com a Rede Genômica da Fiocruz. Adicionalmente, abordagens metodológicas complementares ao WGS foram desenvolvidas, consistindo em: *i*) implementação de ensaios de genotipagem; *ii*) operacionalização de fluxo de trabalho e viabilidade técnica do reaproveitamento de material remanescente de testes rápidos de antígeno (TR). O mapeamento de assinaturas moleculares específicas de variantes/linhagens sob investigação a partir de genomas de SC2 do Brasil e de Fortaleza depositados em bases públicas permitiu a definição de regiões-alvo para a realização de rastreamento de VOCs: *i*) NSP6: S106del, G107del, F108del; *ii*) 28262: AACCA; *iii*) S: K417T; *iv*) S: L452R; *v*) S: H69del, V70del e *vi*) NSP1: K141del, S142del, F143del. Estes alvos serviram como base para a customização/aquisição de 8 ensaios com elevada sensibilidade, especificidade e concordância com o WGS (n=3.420). A aplicação em larga-escala viabilizou um incremento amostral substancial e a obtenção de resultados a partir de material biológico de qualidade heterogênea. Similarmente, a implantação de um fluxo alternativo com validação analítica de material de teste rápido de antígeno (TR) resultou em um ganho de 3.4x de cobertura amostral para vigilância genômica de SC2 durante um período de baixa testagem molecular. A recuperação de material genético viral, aferida por RT-qPCR, foi possível em 93% das alíquotas de TR testadas (997/1.072), das quais 93,5% geraram sequências com definição de linhagem filogenética por WGS (n=347/371). Não houve diferenças significativas entre resultados obtidos por genotipagem e NGS quanto ao volume de TR utilizado para a extração (200µL vs. 50 µL), tempo de conservação (1 dia vs. 7 dias) ou tampão de conservação utilizado (Guanidina 4M+EDTA 0,2M vs. Guanidina 4M+Citrato 0,2M). Dados obtidos por WGS possibilitaram a identificação dos casos iniciais da VOC Gama (P.1-like), VOC Delta (B.1.617.2-like) e de diferentes sublinhagens da VOC Ômicron (BA.1; BA.2; BA.4; BA.5; BE.9; BQ.1 e XXB), em que a expansão de linhagens emergentes, isoladamente ou em conjunto, estavam associadas a sucessivas ondas de casos de COVID-19. A integração dos resultados de WGS obtidos de material viral extraído de MTV (n=4.253) com a complementação com os resultados gerados pela genotipagem dirigida e pela análise de amostras de TR, permitiu maximizar-se a quantidade de casos analisados (n = 9.860), atingindo-se em diversas ocasiões o limiar mínimo de cobertura recomendado para VG com os quais foi possível subsidiar análises mais fidedignas do cenário epidemiológico. Este trabalho destaca a relevância técnico-científica de estratégias inovadoras complementares ao WGS no fortalecimento da VG, constituindo em um modelo exemplar de aplicação no monitoramento de outros patógenos de importância em saúde pública.

Palavras-chave: COVID-19; Sequenciamento de Nova Geração; Técnicas de Genotipagem; Teste para Antígeno do SARS-COV-2.

ABSTRACT

GENOMIC SURVEILLANCE OF SARS-CoV-2 IN THE CITY OF FORTALEZA: VARIANT CHARACTERIZATION AND STRENGTHENING OF EPIDEMIOLOGICAL MONITORING

The emergence of the COVID-19 pandemic has been a catalyst for unprecedented advances in the application of whole-genome sequencing (WGS) techniques focused on genomic surveillance (GS) of SARS-CoV-2 (SC2). The aim is to enhance preventive measures and interventions in the face of viral evolution, as well as to contribute to ongoing scientific progress in the development of new drugs and vaccines. Despite the high number of SC2 genomes in public repositories, there is a bias favoring more advanced technological centers, and a need to standardize coverage and sample representativeness for GS. Therefore, this work aimed to characterize and monitor new SC2 variants in a representative urban center (Fortaleza) during a critical period of the pandemic (Dec/2020 to Dec/2022). During this time, innovative solutions were concurrently developed for monitoring Variants of Concern (VOCs) of SC2. Nasopharyngeal swab samples collected in viral transport medium (VTM) were sent after COVID-19 diagnosis confirmation by RT-qPCR, screened, and sequenced by Next-Generation Sequencing (NGS) on the Illumina platform, as part of collaborative efforts with the Fiocruz Genomic Network. Additionally, complementary methodological approaches to WGS were developed, including: i) implementation of genotyping assays; ii) operationalization of workflow and technical feasibility of reusing residual material from rapid antigen tests (RAT). Mapping specific molecular signatures of variants/lineages under investigation from SC2 genomes in Brazil and Fortaleza deposited in public databases allowed the definition of target regions for VOC screening: i) NSP6: S106del, G107del, F108del; ii) 28262:AACA; iii) S: K417T; iv) S: L452R; v) S: H69del, V70del; and vi) NSP1: K141del, S142del, F143del. These targets served as a basis for customizing/acquiring 8 assays with high sensitivity, specificity, and concordance with WGS (n=3,420). Large-scale application enabled a substantial increase in sample size and obtaining results from heterogeneous biological material. Similarly, implementing an alternative workflow with analytical validation of rapid antigen test (RAT) material resulted in a 3.4x increase in sample coverage for SC2 genomic surveillance during a period of low molecular testing. Viral genetic material recovery, assessed by RT-qPCR, was possible in 93% of the tested RAT aliquots (997/1,072), of which 93.5% generated sequences with phylogenetic lineage definition by WGS (n=347/371). There were no significant differences between results obtained by genotyping and NGS regarding the volume of RAT used for extraction (200µL vs. 50 µL), conservation time (1 day vs. 7 days), or conservation buffer used (Guanidine 4M+EDTA 0.2M vs. Guanidine 4M+Citrate 0.2M). WGS data identified the initial cases of the Gamma VOC (P.1-like), Delta VOC (B.1.617.2-like), and different sublineages of the Omicron VOC (BA.1; BA.2; BA.4; BA.5; BE.9; BQ.1 and XXB). The expansion of emerging lineages, individually or in combination, was associated with successive waves of COVID-19 cases. Integrating WGS results from viral material extracted from VTM (n=4,253) with complementary results from targeted genotyping and analysis of RAT samples allowed maximizing the number of cases analyzed (n=9,860), often reaching the minimum coverage threshold recommended for GS, providing more reliable analyses of the epidemiological scenario. This work highlights the technical-scientific relevance of innovative strategies complementary to WGS in strengthening GS, serving as an exemplary model for monitoring other public health-important pathogens.

Keywords: COVID-19; Next-generation Sequencing; Genotyping Techniques; SARS-CoV-2 Antigen Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Relação de <i>Orthocoronavirinae</i> (alfa, beta, gama e deltacoronavirus) com os respectivos hospedeiros)	27
Figura 02	Proteínas estruturais do SARS-CoV-2 e sua organização genômica.....	29
Figura 03	Ilustração das relações filogenéticas hierárquicas dos clados de SARS-CoV-2...	33
Figura 04	Comparação da frequência de mutações na proteína S de SARS-CoV-2 presentes nas (A) principais VOCs e nas (B) principais sublinhagens de VOC Ômicron.....	36
Figura 05	Janela de detecção direta ou indireta de SARS-CoV-2 por diferentes métodos diagnósticos.....	43
Figura 06	Exemplo de curva de amplificação por RT qPCR evidenciando o valor CT.....	45
Figura 07	Esquema representativo de um teste rápido de antígeno por imunocromatografia de fluxo lateral para diagnóstico de SARS-CoV-2.....	47
Figura 08	Comparativo do número de casos de SRAG por COVID-19 do Brasil notificados no OpenDataSUS por RT-qPCR em tempo real e por TR.....	48
Figura 09	Número de sequências de SARS-CoV-2 depositadas no repositório GISAID por país.....	51
Figura 10	Desenho experimental do estudo.....	55
Figura 11	Árvore filogenética das linhagens de SARS-CoV-2 circulantes na cidade de Fortaleza/CE no período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, estimados por sequenciamento do genoma completo e com sequências disponíveis no GISAID.....	68
Figura 12	Período de aplicação e interpretação de resultado de ensaios moleculares utilizados para monitoramento de variantes de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de (A) dezembro de 2020 a dezembro de 2021 e (B) dezembro de 2021 a dezembro de 2022.....	69
Figura 13	Distribuição de valores CT obtido por RT-qPCR para diagnóstico de COVID-19 em uma parcela de amostras com resultados conclusivos para vigilância genômica de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2022 (n = 5.693/9.896) segmentado por método de análise.....	72
Figura 14	Distribuição geográfica do quantitativo de amostras recebidas entre a S.E. 47 e 52 de 2022 divididas por (A) teste rápido de antígeno e (B) swab nasofaríngeo para RT-qPCR.....	73

Figura 15	Frequência da recuperação do material genético de SARS-CoV-2 avaliada por RT-qPCR em amostras de TR após extração em diferentes condições de processamento e conservação.....	74
Figura 16	Distribuição dos valores CT em cada condição de tratamento.....	75
Figura 17	Distribuição dos valores CT em cada condição de tratamento em amostras de TR sequenciadas em Illumina NextSeq2000.....	77
Figura 18	Quantitativo de amostras de SARS-CoV-2 analisadas de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, por: A) Sequenciamento de Nova Geração; B) genotipagem molecular de amostras de swab e teste rápido de antígeno.....	78
Figura 19	Número de casos de COVID-19 em Fortaleza notificados no IntegraSUS em relação a data de detecção por WGS de novas variantes de SARS-CoV-2 na cidade.	80
Figura 20	Frequência de circulação de variantes de SARS-CoV-2 em Fortaleza no período de período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, estimados por: (A) WGS de amostras de swab nasofaríngeo após testagem molecular; (B) WGS ou genotipagem de amostras de swab nasofaríngeo após testagem molecular ou de TR de antígeno.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Principais pandemias e epidemias presentes na história da humanidade.....	20
Quadro 02	Principais proteínas de SARS-CoV-2 e suas funções.....	28
Quadro 03	Variantes de Preocupação (VOCs) já reconhecidas pela OMS.....	32
Quadro 04	Estudos publicados que avaliam a utilização de ensaios de genotipagem molecular.....	53
Quadro 05	Esquema metodológico dos ensaios de inferência utilizados no estudo.....	60
Quadro 06	Frequência de mutações-alvo presentes em sequências de SARS-CoV-2 provenientes do repositório GISAID e coletadas em amostras do Brasil durante o período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022 (n = 174.625)	66
Quadro 07	Validação analítica dos ensaios moleculares utilizados para monitoramento de variantes de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2022 em relação ao padrão-ouro (NGS).....	71
Quadro 08	Quantitativo de amostras de TR com linhagem definida por meio de NGS, segmentado por condição de tratamento e valor CT.....	76
Quadro 09	Cobertura da vigilância genômica de Fortaleza por período e por estratégia utilizada.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACME	Laboratório Analítico de Competências Moleculares e Epidemiológicas
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2, do inglês <i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>
AIDS	do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cDNA	DNA complementar
CIEVS	Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde do Ceará
CIT	Citrato de sódio
COVID-19	do inglês, <i>Coronavirus Disease 2019</i>
CT	Ciclo limiar de detecção, do inglês, <i>Cycle Threshold</i>
CDC	do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Gua 4M + Cit 0,2M	4M de Guanidina Isocianato + 0,2M de Citrato de Sódio
Gua 4M + EDTA 0,2M	4M de Guanidina Isocianato + 0,2M de EDTA
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
GAL	Gerenciador de ambiente laboratorial
GISAID	Do inglês, <i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>
MTV	Meio de Transporte Viral
NGS	Sequenciamento de nova geração, do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

ORF	Janelas abertas de leitura, do inglês <i>open read frames</i>
PASC	Sequelas pós-agudas
RBD	Domínio de ligação ao receptor, do inglês, <i>Receptor-Binding Domain</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase
SC2	SARS-CoV-2
SG	Síndrome gripal
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
SMS	Secretaria municipal de saúde
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TR	Teste rápido de antígeno
UNADIG	Unidade de Apoio ao Diagnóstico da COVID-19
VOC	Variante de preocupação de SARS-CoV-2, do inglês <i>SARS-CoV-2 variant of concern</i>
VOI	Variante de interesse de SARS-CoV-2, do inglês <i>SARS-CoV-2 variant of interest</i>
VUM	Variante sob monitoramento de SARS-CoV-2, do inglês <i>SARS-CoV-2 variant under monitoring</i>
WGS	Sequenciamento do genoma completo, do inglês <i>Whole Genome Sequencing</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Doenças infecciosas transmissíveis	18
<i>2.1.1 Surtos, endemias, epidemias e pandemias</i>	<i>19</i>
<i>2.1.2 Principais registros de pandemias e epidemias através dos séculos</i>	<i>20</i>
2.2 Impacto da pandemia de COVID-19 no Brasil	23
2.3 SARS-CoV-2 e a doença do novo coronavírus humano 2019 (COVID-19)	24
<i>2.3.1 Patogênese, progressão e manifestações clínicas</i>	<i>24</i>
<i>2.3.2 Características genéticas e estruturais do SARS-CoV-2</i>	<i>26</i>
2.4 Processo evolutivo do SARS-CoV-2 e o surgimento de novas variantes	30
<i>2.4.1 VOCs iniciais (anteriormente circulantes)</i>	<i>33</i>
<i>2.4.2 VOC Ômicron</i>	<i>35</i>
2.5 Vacinas contra a COVID-19 no Brasil	38
2.6 Terapias farmacológicas no tratamento contra a COVID-19	40
2.7 Evolução dos algoritmos para diagnóstico laboratorial da COVID-19	41
<i>2.7.1 Diagnóstico por imunoenaios</i>	<i>42</i>
<i>2.7.2 Diagnóstico por técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos</i>	<i>43</i>
<i>2.7.3 Diagnóstico por testes rápidos de antígeno</i>	<i>46</i>
2.8 Vigilância Genômica baseada em Sequenciamento do genoma completo (WGS)	49
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Aspectos éticos	55
4.2 Desenho experimental	55
4.3 Mapeamento de frequência de mutações-alvo	56
4.4 Triagem amostral de SARS-CoV-2 para vigilância genômica	56
<i>4.4.1 Obtenção de amostras de aproveitamento detectáveis para SARS-CoV-2 após testagem por RT-qPCR</i>	<i>56</i>
<i>4.4.2 Obtenção de amostras de aproveitamento reagentes para SARS-CoV-2 após testagem imunocromatográfica (teste rápido de antígeno)</i>	<i>57</i>
4.5 Reaproveitamento de amostras de TR para vigilância genômica	57
<i>4.5.1 Extração, controle de qualidade e amplificação do material genético</i>	<i>57</i>

<i>4.5.2 Avaliação da estabilidade do RNA viral</i>	57
4.6 Obtenção de dados de carga viral relativa (valores de CT) a partir de exames realizados por laboratórios de assistência diagnóstica da COVID-19	57
4.7 Ensaios de inferência molecular por genotipagem	58
<i>4.7.1 Ensaios de genotipagem para VOC Gama e VOC Delta</i>	58
<i>4.7.2 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.1 e BA.2)</i>	59
<i>4.7.3 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4 e BA.5)</i>	59
<i>4.7.4 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (BE.9 e BQ.1)</i>	59
4.8 Sequenciamento de Nova Geração	63
4.9 Análises por Bioinformática	63
4.10 Análises estatísticas	63
5 RESULTADOS	65
5.1 Ensaios de inferência como uma ferramenta para o fortalecimento da vigilância laboratorial e genômica de SARS-CoV-2	65
<i>5.1.1 Mapeamento de mutações-alvo</i>	65
<i>5.1.2 Validação analítica dos ensaios</i>	70
<i>5.1.3 Distribuição do valor CT das amostras analisadas pelos dois métodos de vigilância.</i> ..	71
5.2 Viabilidade metodológica no aproveitamento de amostras de teste rápido para o fortalecimento da vigilância laboratorial e genômica de SARS-CoV-2	72
<i>5.2.1 Obtenção de amostras clínicas positivas de SARS-CoV-2 por teste rápido</i>	72
<i>5.2.2 Isolamento do material genético viral de SARS-CoV-2</i>	73
5.3 Vigilância genômica de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza-CE	77
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO	97
8. REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A economia globalizada atual tem impactado diretamente na emergência, transmissão e propagação de novos patógenos infecciosos de importância sanitária global, sobretudo, vírus respiratórios. Dentro desse panorama, a pandemia de COVID-19, ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2, destaca-se não apenas pelos seus impactos políticos, econômicos e sociais, como também pelo elevado número de fatalidades, configurando-se como uma tragédia humana sem precedentes em nossa recente história.

A contínua evolução do vírus levou ao surgimento de variantes mais competentes, denominadas variantes de preocupação de SARS-CoV-2 (VOCs), que se propagaram por meio de seleção natural, desencadeando o recrudescimento da pandemia e o surgimento de múltiplas ondas em diferentes partes do mundo. Pela primeira vez na história, o surgimento e a disseminação de variantes virais foram monitorados quase em tempo real, como forma de guiar os órgãos de saúde pública regionais e mundiais na tomada de decisões de combate à pandemia, antecipar a dinâmica de surtos e monitorar a eficácia de vacinas e fármacos.

A principal técnica utilizada para vigilância genômica é a decodificação de genoma viral pelo Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) a partir de amostras remanescentes do diagnóstico de COVID-19 por RT-qPCR. Apesar do elevado quantitativo de sequências geradas, a maioria dos países sequenciou menos de 0,5% dos casos de COVID-19, devido a fatores como i) alto custo do NGS, ii) baixo número de instituições com instalações adequadas e expertise analítica necessárias iii) requerimentos de amostras de RNA viral de alta qualidade e iv) aumento do número de diagnóstico por teste rápido de antígeno (TR) em detrimento da RT-qPCR (Brito *et al.*, 2022).

Dessa forma, técnicas complementares ao WGS de amostras após diagnóstico por RT-qPCR, mais simples, custo efetivas e abrangentes, são necessárias para fortalecer a vigilância genômica, sobretudo, em locais com baixa disponibilidade de recursos e promover análises mais representativas. Dessa forma, este trabalho propõe desenvolver e validar estratégias complementares à vigilância genômica convencional baseada em WGS, por meio da utilização de ensaios de genotipagem baseados em RT-qPCR e sequenciamento a partir de amostras remanescentes de TR, utilizando a cidade de Fortaleza como modelo de aplicação e gerando informações sobre a evolução da pandemia no município em um período de dois anos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças infecciosas transmissíveis

Doenças infecciosas representam uma categoria ampla de enfermidades que têm desafiado a medicina e a saúde pública ao longo dos séculos, sendo causadas por microrganismos - como bactérias, vírus, parasitas e fungos – que não conseguem ser eliminados pelo sistema imune do hospedeiro (Cui; Zhou; Zhou, 2020). Quando estas doenças se propagam entre indivíduos, elas são classificadas como transmissíveis, tendo como principais formas de transmissão o contato com fluidos corporais, produtos sanguíneos, superfícies contaminadas, vetores biológicos ou aerossóis presentes no ar (Prabhu, 2023). Os significativos avanços científicos nos métodos de diagnóstico, manejo clínico e prevenção contribuíram para a grande redução das altas taxas de morbidade e mortalidade historicamente associadas a essas doenças (Baker *et al.*, 2022). No entanto, apesar desses progressos, ainda constituem uma séria ameaça à saúde global e uma das principais causas de morbimortalidade (Brooks *et al.*, 2022; Nii-Trebi, 2017).

A emergência das doenças infectocontagiosas é resultante dos numerosos ciclos de interações que vem ocorrendo ao longo da história entre patógenos e hospedeiros vertebrados (Baker *et al.*, 2022). O surgimento de civilizações agrárias, acompanhado da domesticação de animais e da conseqüente formação de aglomerados densamente povoados, certamente favoreceu a emergência, transmissão e a proliferação de doenças infecciosas devido à potencialização de transmissões zoonóticas, algumas delas constituindo eventos autóctones com transmissão comunitária sustentada (LePan, 2020; Piret; Boivin, 2021). Essas interações foram exacerbadas devido à constituição de povoados com crescente urbanização e concentração de pessoas em cidades, massificação da rede de transportes em contínua mobilidade e depredação de novos ecossistemas (LePan, 2020). Atualmente, a economia globalizada com turismo e comércio massificados, as mudanças climáticas, e o alto nível de conurbação e densidade populacional global, tem impactado diretamente na emergência, transmissão e propagação de novos patógenos infecciosos de importância sanitária global, tornando imprescindível o aprimoramento de estratégias de monitoramento desses agravos (Brooks *et al.*, 2022; Smith *et al.*, 2019).

2.1.1 Surto, endemias, epidemias e pandemias

A epidemiologia estuda a ocorrência de doenças e identifica os fatores que contribuem para a disseminação de patógenos, gerando conhecimentos necessários para orientar políticas de saúde pública, sendo, portanto, uma ciência fundamental para a compreensão do estado de saúde das populações humanas (Ahlbom, 2021). Nesse contexto, a taxa de incidência e a taxa de prevalência são dois importantes indicadores epidemiológicos. Enquanto a taxa de incidência consiste no número de casos novos de uma condição clínica em uma determinada população e período específico, a taxa de prevalência é definida como um histórico da proporção de casos em uma população já registrados de uma determinada condição clínica (OPAS, 2018). Tais indicadores podem ser utilizados para avaliar uma situação de endemia e prevenir a emergência de surtos, epidemias e pandemias.

Por definição, uma doença endêmica é caracterizada pela incidência constante de um agente infeccioso em uma região geográfica específica, seja de forma sazonal ou não, com uma manutenção de níveis previsíveis ao longo do tempo, sem apresentar variações abruptas em sua ocorrência (Byrne; Hays, 2021). Alternativamente, surtos consistem em aumentos na incidência de uma determinada patologia em uma localização geográfica definida, e, quando essa propagação se estende para áreas geográficas mais amplas, é classificada como epidemia, ou, se tiver uma disseminação global, como pandemia (Piret; Boivin, 2021). Enquanto em uma epidemia, uma doença pode ser propagada rapidamente entre uma população, em um estado de pandemia, esta pode ser rapidamente disseminada entre países (Kaur *et al.*, 2020). No entanto, é fundamental destacar que o reconhecimento oficial de um estado de pandemia só pode ser declarado por autoridades de saúde pública, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), após uma análise técnica criteriosa.

A grande maioria das pandemias tem origem zoonótica, devido a capacidade natural que vírus e bactérias possuem de se adaptarem à constante interação patógeno-hospedeiro, de forma que a baixa imunidade populacional ao novo patógeno resulta em uma elevada transmissibilidade da doença (Byrne; Hays, 2021). A dinâmica de propagação do patógeno pode ser significativamente influenciada por outros fatores biológicos, como o modo de transmissão e a virulência do organismo causador, além de aspectos não biológicos, como o cenário político-econômico e condições sócio-sanitárias dos locais afetados (Dasgupta; Crunkhorn, 2020). O impacto causado por uma pandemia, por sua vez, é tipicamente mensurado pelas taxas de

transmissibilidade, crescimento do número de casos em um curto período de tempo, número de pacientes hospitalizados e mortalidade (Akin; Gözel, 2020).

2.1.2 Principais registros de pandemias e epidemias através dos séculos

Em termos quantitativos, a emergência de uma pandemia resulta em um número excessivo de casos e óbitos, bem como impactos na qualidade dos serviços de saúde e nas condições sociais e econômicas das nações afetadas. Muitas epidemias e pandemias foram registradas durante a história, tendo como agentes causadores patógenos taxonomicamente distintos, incluindo vírus e bactérias (Quadro 1). Estima-se que tais eventos tenham contabilizado uma quantidade de óbitos comparável ao ocasionado por múltiplas grandes guerras (Archer-Diaby, 2020).

Quadro 01- Principais pandemias e epidemias presentes na história da humanidade

Doença	Agente Etiológico	Tipo de Infecção	Ano	Classificação OMS	Distribuição Geográfica	Estimativa de Óbitos
Praga de Atenas	Desconhecido	Viral	430 a.C.	Epidemia	Atenas	100 mil
Praga Antonina (Varíola*)	Desconhecido	Viral	165-180	Pandemia	Europa e África do Norte	5 milhões
Praga de Cipriano (Varíola*)	Desconhecido	Viral	250 – 271	Epidemia	Roma	190 mil
Praga de Justiniano	<i>Yersinia pestis</i>	Bacteriana	541-544	Pandemia	Europa, Ásia, África	50 milhões
Varíola	<i>Orthopoxvirus</i>	Viral	Sécs. XI-XX	Endemia	Todos os continentes	300 milhões
Varíola japonesa	Desconhecido	Viral	735 – 737	Epidemia	Japão	1 milhão
Peste Negra	<i>Y. pestis</i>	Bacteriana	1346-1353	Pandemia	Europa, Asia, África do Norte	200 milhões
Varíola	<i>Orthopoxvirus</i>	Viral	1492- Séc. XIX	Epidemia	Impérios Asteca, Maia e Inca	56 milhões
Cocoliztli	Desconhecido	Bacteriana	1543 - 1548	Epidemia	Império Asteca	15 milhões
Praga Italiana	<i>Y. pestis</i>	Bacteriana	1629 - 1631	Epidemia	Verona, Bolonha, Milão, Veneza e Florença	1 milhão
Grande Peste de Londres	<i>Y. pestis</i>	Bacteriana	1665 - 1666	Epidemia	Londres	100 mil
Grande Peste de Marselha	Desconhecido	Bacteriana	1723 - 1728	Epidemia	Marseilles and Provence	100 mil
Peste Russa	<i>Y. pestis</i>	Bacteriana	1770 - 1772	Epidemia	Império Russo	100 mil
Varíola Norte-Americana	Desconhecido	Viral	1775 - 1782	Epidemia	EUA, Nova Espanha (atual México) e Canadá	130 mil

Febre amarela	<i>Flavivirus</i>	Viral	1793 - 1889	Epidemia	EUA, Haiti, Grã-Colômbia (atual Panamá)	150 mil
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Bacteriana	1817 [#]	Pandemia	Todos os continentes	1 milhão
3ª Pandemia de Peste	<i>Y. pestis</i>	Bacteriana	1855 - 1912	Pandemia	Todos os continentes	12 milhões
Gripe Russa	Desconhecido	Viral	1889 - 1890	Pandemia	Europa e Ásia	1 milhão
Gripe Espanhola	Influenza A (H1N1)	Viral	1918 - 1919	Pandemia	Todos os continentes	50 milhões
Gripe Asiática	Desconhecido	Viral	1957 - 1958	Pandemia	Todos os continentes	1 milhão
Gripe de Hong Kong	Desconhecido	Viral	1968 - 1970	Pandemia	Todos os continentes	1 milhão
Meningite meningocócica	<i>Neisseria meningitidis</i>	Bacteriana	1970-	Epidemia	Todos os continentes	N/A
AIDS	Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	Viral	1981 [#]	Epidemia Global	Todos os continentes	25 milhões
Gripe Suína	Influenza A (H1N1pdm)	Viral	2009 - 2010	Pandemia	Ásia, Europa e Américas	200 mil
COVID-19	SARS-CoV-2	Viral	2020[#]	Pandemia	Todos os continentes	7 milhões

Legenda: * - Provável; # - Dias atuais; a.C. – antes de Cristo; Sécs – séculos.

Fonte: Adaptado de (Dasgupta; Crunkhorn, 2020).

O exemplo mais emblemático de agentes infecciosos associados a sucessivos ciclos de pandemia foi o ocasionado pela *Yersinia pestis*, uma bactéria gram-negativa que afligiu grandemente a humanidade através dos séculos, chegando a dizimar cerca de 1/3 da população europeia durante a peste negra (Ditchburn; Hodgkins, 2019). Apesar do elevado potencial pandêmico deste agente, a grande maioria das pandemias e epidemias de alto impacto registradas na história, foram resultados da emergência, por via zoonótica, de vírus respiratórios, devido a fatores como i) ocorrência em diversas espécies; ii) altas taxas de infectividade e iii) rotas de transmissão mais efetivas, ocorrendo, principalmente, pela inalação de perdigotos ou aerossóis contaminados (*airborne transmission*) (Bhadoria; Gupta; Agarwal, 2021).

O termo “vírus respiratórios” consiste em uma classificação abrangente para vírus com a capacidade de infectar o trato respiratório humano, resultando, principalmente, em sintomas respiratórios (Leung, 2021). Dentre as pandemias causadas por estes vírus na nossa história recente, a Gripe Espanhola, que se disseminou na Europa em 1918, certamente destaca-se como a mais difundida e letal (Sharma *et al.*, 2021). Como consequência direta da organização de densos agrupamentos militares na Primeira Guerra Mundial, associados à criadouros de porcos e aves para a alimentação de tropas, o vírus da Influenza H1N1 foi capaz

de utilizar humanos como seu hospedeiro e difundir-se pelo mundo juntamente com o alto fluxo de deslocamento de pessoas no pós-guerra (Oxford *et al.*, 2005). Devido às elevadas taxas de mortalidade e morbidade na população geral, principalmente entre jovens adultos, esta doença vitimou mais de 50 milhões de pessoas em apenas 18 meses (Tambolkar *et al.*, 2022). Desde então, houve registros de outras pandemias de menor escala causadas por Influenza, a última em 2009, popularmente conhecida como “gripe suína” associada à emergência de uma nova cepa de H1N1, tecnicamente denominada H1N1pdm09, e que tem sido a mais predominante desde então (Harrington; Kackos; Webby, 2021).

No que concerne às demais epidemias virais do século XXI, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*), também conhecida como SARS-CoV, surgiu na China em 2002, após um vírus da família *Coronaviridae* cruzar a barreira animal e começar a infectar humanos com uma alta transmissibilidade, vitimizando 774 pessoas em 37 países (Souza *et al.*, 2021). Uma década depois, em 2012, um vírus da mesma família foi responsável pelo surto de Síndrome Respiratória do Oriente Médio, também conhecida como MERS-CoV, de alta letalidade e que ocasionou 858 óbitos em 27 países (Koh, 2020). Apesar da gravidade, em ambos os casos as epidemias não atingiram proporções globais, apresentando caráter autolimitante, em que se foi evitada a disseminação em massa.

Todavia, em dezembro de 2019, na província de Wuhan, na China, houve um terceiro evento independente associado à emergência de um novo coronavírus humano (Coronavírus humano 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave, ou simplesmente SARS-CoV-2), cuja doença foi denominada de COVID-19 (do inglês, *Coronavirus disease*). Diferentemente do SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 rapidamente disseminou-se, ocasionando inúmeros registros de casos e óbitos, fazendo com que a OMS declarasse estado de emergência sanitária de pandemia em 11 de março de 2020 (OMS, 2020). Nos meses que se sucederam, houve um vertiginoso crescimento no número de casos, hospitalizações e óbitos diretamente associados à COVID-19, ocasionando impactos políticos, econômicos e sociais sem precedentes em nossa história recente, sobretudo nos sistemas de saúde (Kaye *et al.*, 2021). Desde então, mais de 772 milhões de casos e 6,9 milhões de óbitos foram confirmados pelo mundo, tendo o Brasil registrado o segundo maior número de casos (WHO, 2023). Sem ainda contabilizar as elevadas taxas de subnotificação e subtestagem, a COVID-19 é,

indubitavelmente, considerada a maior pandemia desde a segunda metade do século XX até os dias atuais.

2.2 Impacto da pandemia de COVID-19 no Brasil

No Brasil, o primeiro caso confirmado de COVID-19 foi registrado em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo. Um homem de 61 anos, que retornou de viagem de Lombardia, Itália, onde havia um surto da doença, deu entrada no Hospital Israelita Albert Einstein com sintomas respiratórios e com confirmação diagnóstica por RT-qPCR no Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2020). Até dezembro de 2023, o país registrou mais de 38 milhões de casos, dos quais 708.638 evoluíram à óbitos, de forma que o Brasil foi o 3º país com o maior número absoluto de óbitos de COVID-19 (BRASIL, 2023).

Após os primeiros casos detectados em território nacional, o governo brasileiro instituiu medidas de intervenção não farmacológicas (INFs) que objetivavam a diminuição da disseminação do SARS-CoV-2 (Ministério da Saúde, 2022a). Dentre estas medidas, destacam-se o uso obrigatório de máscaras em locais públicos, etiqueta ao tossir/espirrar, assepsia das mãos e o estabelecimento de confinamentos (*lockdowns*) em diversas localidades, que consistiam no fechamento de escolas, universidades e serviços não-essenciais, cancelamento de eventos de grande porte, e circulação limitada a atividades essenciais (Tang *et al.*, 2020). No entanto, a falta de confiança da eficácia destas recomendações e a minimização da gravidade da pandemia por uma parcela significativa da população brasileira fez com que adesão à essas medidas fossem heterogêneas no país (Morais, 2023).

A contínua evolução do SARS-CoV-2 durante o curso da pandemia subsidiou a implementação de diversos órgãos de vigilância genômica no país (Queiroz, 2022). Dentre estes, a Rede de Vigilância Genômica da Fiocruz destaca-se por ser uma organização do Ministério da Saúde presente em 10 estados do Brasil e que atua ativamente na vigilância genômica do SARS-CoV-2. Com mais de 80.000 genomas compartilhados no *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) até novembro de 2023, a rede é a responsável pelo maior número de genomas virais sequenciados no Brasil, fornecendo dados robustos para compreensão do cenário epidemiológico complexo do país (Rede Genômica Fiocruz, 2023). Esse cenário epidemiológico foi marcado pela co-circulação de diferentes linhagens, com múltiplos eventos de introdução e com o surgimento de variantes locais, o que contribuiu para que o país vivenciasse três importantes ondas pandêmicas e diversos surtos de casos de COVID-

19 (GISAID, 2023).

A primeira onda pandêmica do Brasil ocorreu no início de 2020, após múltiplas introduções do SARS-CoV-2 no país e transmissão no estado de São Paulo (JESUS *et al.*, 2020). Como consequência, houve uma transmissão sustentada da doença e um colapso nos sistemas de saúde, contribuindo para altas taxas de morbidade e mortalidade na população, além de um elevado número de casos subnotificados (Silva *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2020). A segunda onda pandêmica no Brasil ocorreu no início de 2021, marcada pela emergência de uma nova variante denominada Gama (P.1) no estado de Amazonas e por sua rápida disseminação pelo país (Alcantara *et al.*, 2022). Nesse período, a COVID-19 foi responsável por impactos ainda mais severos na saúde pública, ocasionando um elevado número de casos e óbitos diários (até 4,25 mil óbitos/dia), potencializados pela falta de leitos de UTI, escassez de insumos básicos para intubação de pacientes graves e falta de cilindros de oxigênio, atingindo, principalmente, a cidade de Manaus (G1, 2021b, 2021a).

A terceira onda pandêmica ocorreu no final de 2021 e início de 2022, e foi caracterizada pela introdução e rápida disseminação da variante Ômicron (BA.1). A contínua evolução dessa variante e o surgimento de sublinhagens resultou no recrudescimento do número de casos de COVID-19 no país, associado à expansão de subvariantes da Ômicron (BA.4 e BA.5), que ocasionou uma nova onda de casos que atingiu o ápice em junho/julho de 2022 e em setembro de 2022, associada a subvariante BA.5 da Ômicron (BQ.1 e BE.9) (Naveca *et al.*, dados não publicados).

2.3 SARS-CoV-2 e a doença do novo coronavírus humano 2019 (COVID-19)

2.3.1 Patogênese, progressão e manifestações clínicas

Apesar dos inúmeros estudos na literatura, a patogênese da COVID-19 não está completamente elucidada, de forma que os conhecimentos referentes aos demais vírus respiratórios, sobretudo SARS-CoV e MERS-CoV, foram essenciais para a compreensão do SARS-CoV-2 (Acosta *et al.*, 2022). De forma similar aos demais vírus respiratórios, o vírus da COVID-19 é transmitido por meio de perdigotos, aerossóis e superfícies contaminadas, de forma que a prevenção da contaminação é realizada por intervenções não farmacológicas, como a utilização adequada de máscaras faciais, distanciamento social, etiqueta respiratória e assepsia das mãos (Zhao *et al.*, 2022). A infecção da célula hospedeira, por sua vez, ocorre por meio da

interação entre a proteína da espícula viral do SC2 (S, do inglês *spike*) e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*), uma importante enzima que atua na regulação da pressão arterial e está presente, majoritariamente em células epiteliais alveolares pulmonares e células endoteliais (Wu, Can rong *et al.*, 2022). Após a ligação com a ACE2, a subunidade S2 da proteína S é clivada pela Serina Protease Transmembrana (TMPRSS2) humana, de forma a permitir a fusão entre a bicamada lipídica viral e a célula do hospedeiro (Lamers; Haagmans, 2022).

Após um período de incubação (entre 2 a 14 dias, com mediana de 5 dias), a replicação viral é iniciada desencadeando uma resposta imunológica (Acosta *et al.*, 2022). A maioria dos indivíduos com casos moderados podem ter a sua resposta imunológica dividida em duas fases, em que a primeira fase consiste na ativação de componentes antivirais da imunidade inata, como células dendríticas e macrófagos (Borczuk; Yantiss, 2022). Estes componentes produzem resposta de interferona (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e diversas citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12, que ativam a resposta imunológica adaptativa para inibir replicação viral, que ocorre, principalmente, no trato respiratório superior (Nazerian *et al.*, 2022). Nesses primeiros dias, o quadro clínico do paciente pode variar entre assintomático e levemente sintomático, em que os sintomas clínicos mais frequentes incluem febre, mal-estar, mialgia, alterações gastrointestinais e sintomas no trato respiratório superior (Russell; Lone; Baillie, 2023) que ativam a resposta imunológica adaptativa para inibir replicação viral.

A segunda fase, quando ocorre, geralmente se desenvolve a cerca de uma semana após o início da infecção e consiste em uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro (frequentemente referida como a fase da tempestade de citocinas) (Borczuk; Yantiss, 2022). Nesta etapa, a desregulação do sistema imunológico pode levar a danos nos tecidos mediados por monócitos e macrófagos, especialmente nos pulmões, mesmo na ausência de replicação viral contínua (Russell; Lone; Baillie, 2023). Os sintomas clínicos presentes nessa fase estão associados ao desenvolvimento da forma grave da doença, incluindo falta de ar, tosse e insuficiência respiratória hipoxêmica. Indivíduos que progridem para essa fase da doença, necessitam de cuidados prolongados em unidade de terapia intensiva (UTI), podendo desenvolver complicações clínicas como miopatia, neuropatia e infecções secundárias (como pneumonia associada à ventilação) (Acosta *et al.*, 2022).

A gravidade da COVID-19 está relacionada não apenas à resposta imunológica do hospedeiro, mas também à virulência da variante de SARS-CoV-2 e à presença de

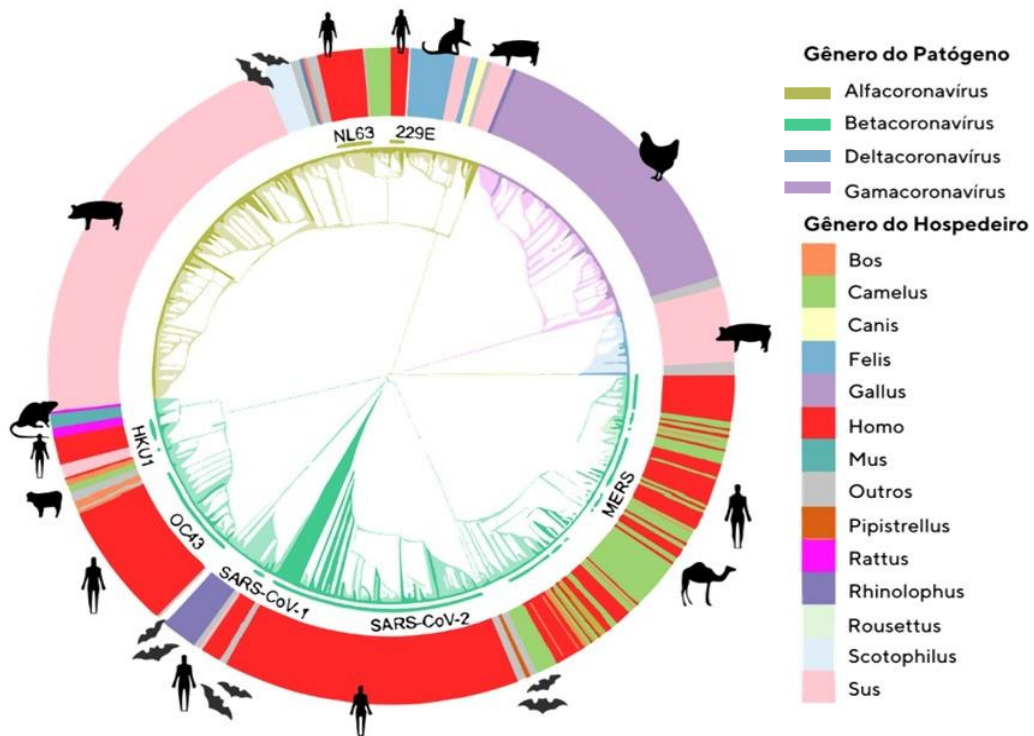
comorbidades que atuam como fatores de risco associadas ao desenvolvimento de formas graves da doença (Acosta *et al.*, 2022). Estima-se que cerca de 22% da população mundial possui pelo menos uma das comorbidades ligadas a complicações clínicas pela COVID-19, como doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas, doenças hepáticas crônicas, doenças renais crônicas, diabetes, câncer e AIDS (Clark *et al.*, 2020).

Enquanto a maioria dos indivíduos se recuperam em algumas semanas, outros podem apresentar sequelas pós-agudas (PASC) por tempo indeterminado. Tal fato é decorrente da liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias causando um quadro conhecido como síndrome pós-COVID-19 ou COVID longa (Acosta *et al.*, 2022). Uma ampla variedade de sintomas associados à condição foi descrita na literatura como dispneia, distúrbios cognitivos e neuropsiquiátricos, eventos trombo-hemorrágicos e cardiovasculares que ocorrem em mais de 70% de indivíduos independente de idade e sexo, estimando-se um total de 203 sintomas envolvendo dez órgãos diferentes do corpo humano (Goërtz *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2022).

2.3.2 Características genéticas e estruturais do SARS-CoV-2

A família *Coronaviridae* é composta por uma diversidade de coronavírus (CoV) de RNA que todos possuem fita única positiva (+ssRNA), dos quais quatro, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, são comumente associados ao desenvolvimento de infecções no trato respiratório superior em humanos (Lamers; Haagmans, 2022) (Figura 01). Os membros desta família podem ser divididos em quatro gêneros de grande abundância na natureza: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, com os representantes mais patogênicos e capazes de provocar infecções no trato respiratório inferior, MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2, pertencentes ao gênero *Betacoronavirus*.

Figura 01- Relação de *Orthocoronavirinae* (Alfa, Beta, Gama e Deltacoronavirus) com os respectivos hospedeiros



Fonte: Balloux *et al.*, 2022

O genoma do vírus SARS-CoV-2 possui comprimento de cerca de 30 kilobases (kb), contendo 14 janelas abertas de leitura (*open read frames*, ORF) que codificam 29 proteínas estruturais, não estruturais e acessórias (Yang; Rao, 2021) (Quadro 02). Existem quatro proteínas estruturais principais que quando traduzidas são responsáveis pela formação da partícula viral, a proteína S, a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína de membrana (M) e a proteína do envelope (E) (Figura 02).

Quadro 02- Principais proteínas de SARS-CoV-2 e suas funções

Proteína	Tamanho da proteína (a.a.) *	Localização no genoma	Função
nsp1	180	ORF1a (266–805)	Acelerar a degradação do RNAm, bloquear as respostas imunes inatas
nsp2	638	ORF1a (806–2,719)	Sofrer pressão seletiva positiva
nsp3	1,945	ORF1a (2,720–8,554)	Ligar-se às proteínas do hospedeiro, mediar a replicação viral
nsp4	500	ORF1a (8,555–10,054)	Mediar a interação com as membranas celulares
nsp5	306	ORF1a (10,055–10,972)	Processamento da poliproteína coronaviral

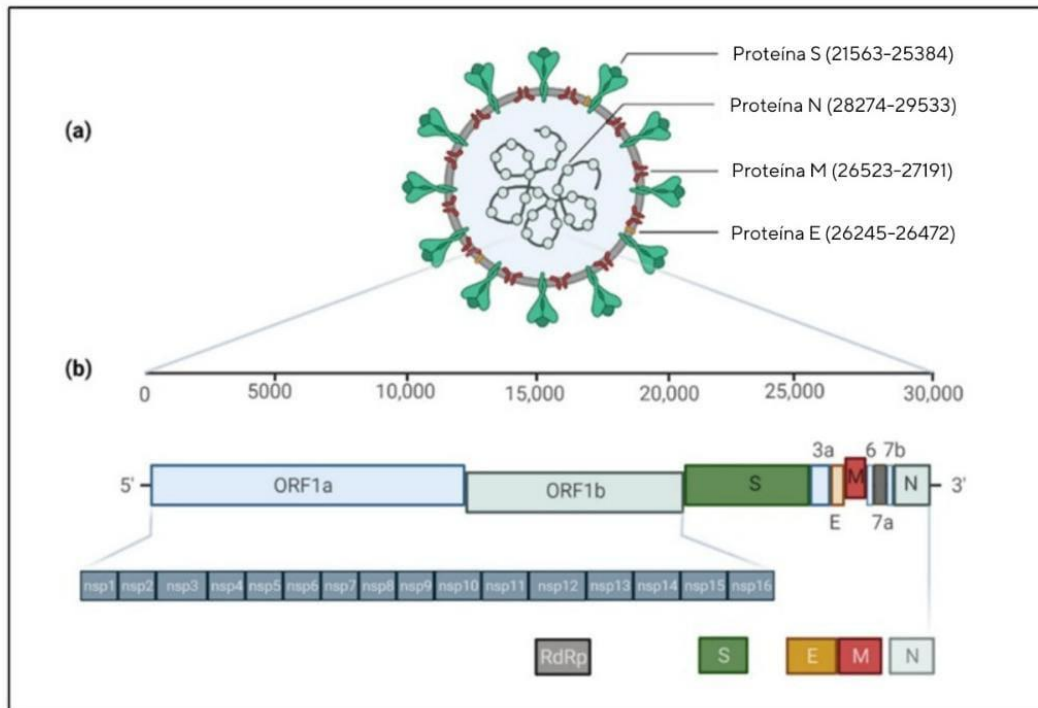
nsp6	290	ORF1a (10,973–11,842)	Defesas antivirais do hospedeiro, restringe a expansão do autofagossomo
nsp7	83	ORF1a (11,843–12,091)	Forma complexo com nsp8, estabiliza nsp8
nsp8	198	ORF1a (12,092–12,685)	Catalisa a síntese de primers de RNA
nsp9	113	ORF1a (12,686–13,024)	Proteína de ligação ao ácido nucleico
nsp10	139	ORF1a (13,025–13,441)	Interage com nsp14 e nsp16, regula a função da replicase viral
nsp11	13	ORF1a (13,442–13,480)	Função desconhecida
nsp12	932	ORF1b (13,442–13,468, 13,468–16,236)	Catalisa a síntese de RNA viral
nsp13	601	ORF1b (16,237–18,039)	Interage com nsp8 e nsp12, regula a atividade da helicase
nsp14	527	ORF1b (18,040–19,620)	Diminui a incidência de nucleotídeos incompatíveis.
nsp15	346	ORF1b (19,621–20,658)	Degrada o RNA viral
nsp16	298	ORF1b (20,659–21,552)	Evasão da imunidade inata
Proteína E	75	ORF4 (26,245–26,472)	Interage com a proteína M para formar a membrana viral
Proteína M	222	ORF5 (26,523–27,191)	Determina forma viral, é o organizador central da montagem do coronavírus
Proteína S	1,282	ORF2 (21,563–25,384)	Liga-se ao receptor da célula hospedeira, medeia a ligação e a fusão viral e da membrana do hospedeiro
Proteína N	419	ORF9a (28,274–29,533)	Liga-se ao RNA genômico viral, formando o nucleocapsídeo
Orf3a	275	ORF3a (25,393–26,220)	Induz apoptose, patogenicidade e liberação de vírus, medeia a ativação do inflamassoma
Orf3b	22	ORF3b (25,814–25,882)	Relaciona-se com a ativação de AP-1 através das vias ERK e JNK
Orf6	61	ORF6 (27,202–27,387)	Inibe a tradução celular
Orf7a	121	ORF7a (27,394–27,759)	Relaciona-se com a interação vírus-hospedeiro
Orf7b	43	ORF7b (27,756–27,887)	-
Orf8b	121	ORF8b (27,894–28,259)	Media as atividades de imunossupressão e evasão
Orf9b	97	ORF9b (28,284–28,942)	Media as respostas imunes
Orf9c	70	ORF9c (28,733–28,577)	Modifica a atividade mitocondrial das células hospedeiras

a.a.: aminoácidos

* baseado na sequência de referência (NC_045512.2)

Fonte: Adaptado de Bai, Zhong, Gao, 2022

Figura 02- Proteínas estruturais do SARS-CoV-2 e sua organização genômica



Fonte: (Alhamid *et al.*, 2022)

Localizada na membrana viral, a proteína S é um homotrímero glicosilado de duas subunidades, S1 e S2, que atua na interação entre o vírus e os receptores de superfície da célula hospedeira, mediando a entrada do patógeno (Bai *et al.*, 2021; Yang; Rao, 2021). A subunidade S1 possui o domínio de ligação ao receptor (RBD), que é responsável por reconhecer e interagir com o receptor humano ACE2 (Wu, Can rong *et al.*, 2022). Como consequência, essa molécula apresenta elevada imunogenicidade, servindo como alvo terapêutico para os anticorpos neutralizantes (Salvatori *et al.*, 2020).

Devido a seu papel essencial na transmissão no SARS-CoV-2 e no desenvolvimento da resposta imune, a proteína S destaca-se como um importante alvo para o desenvolvimento de ensaios sorológicos, novas terapias e vacinas (Almehti *et al.*, 2021; Yang; Rao, 2021). Ademais, mutações nesta região devem ser cuidadosamente monitoradas, devido ao potencial impacto na transmissibilidade e imunogenicidade do vírus. Estima-se que a maior interação entre o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 e a ACE2 humana foi o que potencializou a transmissão em massa desse coronavírus em relação ao SARS-CoV (Giron; Laaksonen; Barroso da Silva, 2021).

A proteína estrutural do nucleocapsídeo, por sua vez, possui dois domínios estruturais conservados, o monômero NTD (N-NTD) e o dímero CTD (N-CTD) (Yang; Rao, 2021). Sua principal função consiste na proteção do genoma viral por meio do empacotamento em um complexo de ribonucleoproteína, mantendo o RNA na conformação necessária para os processos de replicação e transcrição (Bai *et al.*, 2021). Por ser uma região altamente conservada, também é um importante alvo para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos (Sukumaran *et al.*, 2022).

A proteína da membrana é o componente de maior abundância na estrutura dos CoV, sendo caracterizada por três domínios transmembranares capazes de manter a homeostase intracelular (Shamsi *et al.*, 2021). É responsável pela definição do tamanho e formato do vírion ao interagir com as outras proteínas e fornecer uma matriz para a ligação do nucleocapsídeo (Bai; Zhong; Gao, 2022). Dentre as proteínas estruturais, a proteína do envelope é a menor. Por fim, existem nove proteínas acessórias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c e 10), moléculas pouco conservadas e que estão relacionadas com a patogenicidade viral e com o escape do sistema imune, mas cujas funções específicas não estão totalmente elucidadas (Bai; Zhong; Gao, 2022).

2.4 Processo evolutivo do SARS-CoV-2 e o surgimento de novas variantes

Durante o curso da pandemia, o genoma do SARS-CoV-2 sofreu modificações naturais decorrentes de recombinações e erros de transcrição, inerentes ao processo replicativo dos vírus, resultando no surgimento de mutações, inserções e deleções, que se acumularam ao longo do tempo (Salehi-Vaziri *et al.*, 2022). Embora a maioria dessas alterações tenha ocorrido de forma silenciosa, outras levaram ao surgimento de variantes com propriedades fenotípicas distintas e que se propagaram por meio de seleção natural, desencadeando o recrudescimento da pandemia e o surgimento de múltiplas ondas em diferentes partes do mundo (González-Vázquez; Arenas, 2023).

Uma variante pode ser entendida como um vírus que se modificou durante o processo de replicação e cuja população descendente conseguiu se fixar na natureza, podendo ou não apresentar vantagens seletivas em relação ao seu ancestral. Uma linhagem, por sua vez, é um conjunto de variantes que se originaram de um vírus ancestral comum e, portanto, apresentam um grau elevado de homologia (semelhança entre seus genomas).

Pela primeira vez na história, o surgimento e a disseminação de variantes virais foram monitorados quase em tempo real, como forma de guiar os órgãos de saúde pública regionais e

mundiais na tomada de decisões de combate à pandemia e de gerar conhecimentos sobre a evolução do vírus (Munnink *et al.*, 2021). Consequentemente, o compartilhamento de descobertas e sequências genômicas também ocorreu de forma próxima ao tempo real, graças ao desenvolvimento de diversas ferramentas de bioinformática e a criação de sistemas de padronização de nomenclaturas (Li, 2022). Dentre estes, o sistema Pango é o mais utilizado e baseia-se na classificação de variantes com um código alfanumérico, gerado a partir das linhagens iniciais (denominadas A e B) com a adição de níveis e subníveis numéricos para identificar variantes distintas (Ex. B.1.1).

Visando simplificar a nomenclatura das variantes a OMS elaborou um sistema de nomenclatura que utiliza letras gregas para nomear diferentes variantes e as classifica de acordo com seus impactos na saúde pública e relevância clínica, utilizando os termos "variante em monitoramento" (VUM do inglês, *variant under monitoring*), "variante de interesse" (VOI do inglês, *variant of interest*) e "variante de preocupação" (VOC do inglês, *variants of concern*) (OPAS, 2021). Essas classificações são transitórias e de acordo com o contexto epidemiológico. Uma variante de SARS-CoV-2 é classificada como VUM quando requer um acompanhamento mais rigoroso para avaliar o impacto epidemiológico de suas alterações genéticas existentes, com seu *status* sendo reavaliado à medida que novos conhecimentos científicos são gerados (Parra-Lucareo *et al.*, 2022). Alternativamente, uma variante pode ser classificada como VOI caso apresente vantagens seletivas como aumento da transmissibilidade, da virulência e do escape imune (WHO *et al.*, 2022).

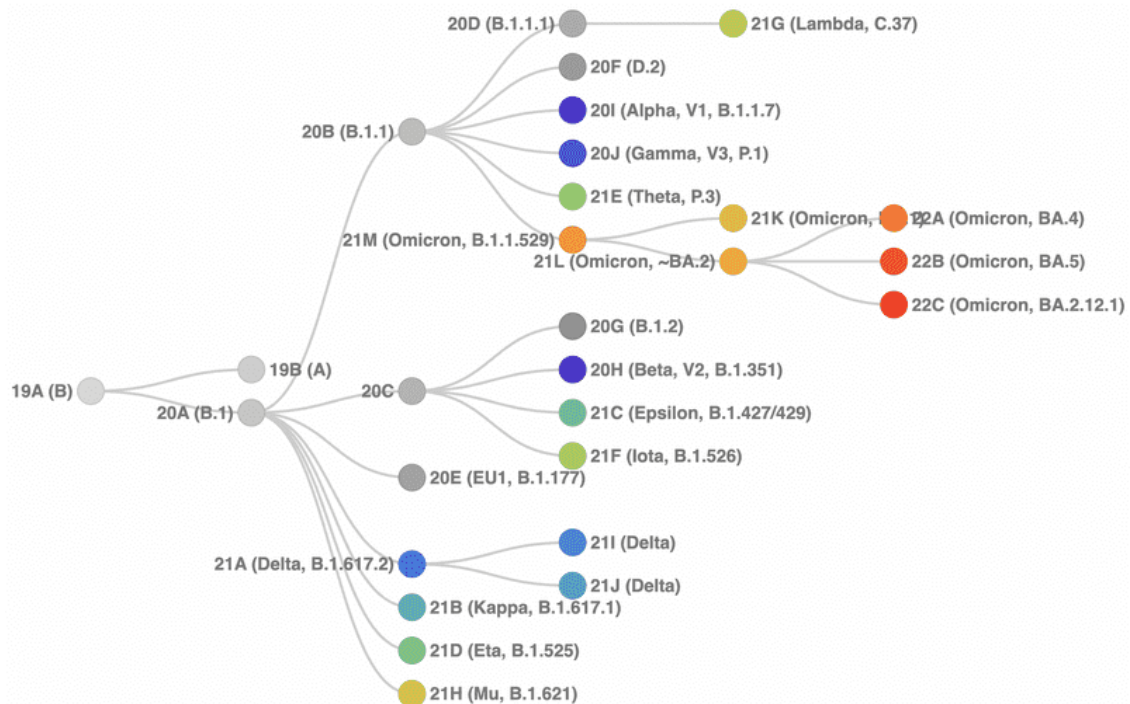
Uma variante de SARS-CoV-2 é classificada como VOC quando, além de atender todos os critérios definidos para VOIs, cumpre pelo menos um dos seguintes requisitos: (i) demonstra um aumento na gravidade da doença, (ii) tem impactos negativos significativos na saúde pública de vários países e, (iii) mostra evidências de escape imunológico pós-vacinação, de forma que o surgimento de VOCs afete significativamente o cenário da pandemia (WHO *et al.*, 2022). Ao todo, cinco variantes que emergiram de distintas linhagens filogenéticas foram classificadas como VOC's pela OMS, sendo elas: VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron (Quadro 03). Embora tenham evoluído independentemente (Figura 03), a maioria dessas variantes surgiu em meados de 2020, exibindo um conjunto de mutações convergentes, principalmente na proteína S, associadas a uma vantagem seletiva (Chen; Tsung-Ning Huang; Huang, 2022).

Quadro 03- Variantes de Preocupação (VOC's) já reconhecidas pela OMS

Designação OMS	Linhagem Pango	Sublinhagem Pango	Principais mutações de Interesse	Primeiros casos	Data de designação (OMS)
Alfa	B.1.1.7	B.1.1.7.*	NSP6. Δ106-108del S:Δ69-70 S:N501Y	Reino Unido, Set-2020	VOC: 18-Dez-2020 VOC anteriormente circulante: 09-Mar-2022
Beta	B.1.351	B.1.351.*	NSP6:Δ106-108del S:K417N S:E484K S:N501Y	África do Sul, Mai-2020	VOC: 18-Dez-2020 VOC anteriormente circulante: 09-Mar-2022
Gama	P.1	P.1.*	NSP6. Δ106-108del S:K417T S:E484K S:N501Y	Brasil, Nov-2020	VOC: 11-Jan-2020 VOC anteriormente circulante: 09-Mar-2022
Delta	B.1.617.2	AY.*	S:L452R S:T478K	Índia, Out-2020	VOI: 04-Abr-2021 VOC: 11-Mai-2021 VOC anteriormente circulante: 07-Jun-2022
Ômicron*	B.1.1.529	BA.1	Múltiplas	Múltiplos países Africanos Nov-2021	VUM: 24-Nov-2021 VOC: 26-Nov-2021 VOC anteriormente circulante: 14-Mar-2023
	B.1.1.529	BA.2	Múltiplas	Reino Unido, Dez-2021	
	B.1.1.529	BA.4 / BA.5	S:L452R S:F486V ORF7b:L11F N:P151S G12160A	Estados Unidos, Abr-2022	
	B.1.1.529	BQ.1	Orf1b:Y264H S:N460K	Estados Unidos, Ago-2022	
	B.1.1.529	BE.9	Orf7a:del244	Brasil, Ago-2022	
	B.1.1.529	Recombinantes (XBB*)	Breakpoint em S, S:G252V	Índia, Europa Set-2022	

Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> - Acesso em 05/03/2023

Figura 03- Ilustração das relações filogenéticas hierárquicas dos clados de SARS-CoV-2



Fonte: Nextstrain, 2022. Disponível em: [SARS-CoV-2 clade naming strategy for 2022 \(nextstrain.org\)](https://nextstrain.org/SARS-CoV-2/clade-naming-strategy). Acesso em: 19 nov. 2023

2.4.1 VOCs iniciais (anteriormente circulantes)

Em dezembro de 2020, um rápido aumento do número de casos de COVID-19 na região sudeste da Inglaterra e, posteriormente, em diversas localidades do Reino Unido, foi associado a detecção de um elevado número de alterações genéticas nas sequências genômicas obtidas pelos órgãos de vigilância genômica locais (Hill *et al.*, 2022). Esta nova linhagem, denominada como B.1.1.7 pelo sistema Pango e como VOC Alfa pela OMS, tornou-se a principal variante em circulação no Reino Unido nos meses seguintes. A variante VOC Alfa é caracterizada pela presença de 17 alterações em seu genoma em relação à variante selvagem, das quais 14 são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, variações de apenas uma base na sequência do genoma), localizados, principalmente, na proteína S que resultaram em mutações *missense*, e outras três são deleções na subunidade S1 (Choi; Smith, 2021; Tatsi; Filippatos; Michos, 2021).

Tais mutações foram associadas à evasão do sistema imune, à diminuição da eficácia de tratamentos realizados com anticorpos monoclonais, à menor atividade neutralizante de anticorpos, ao aumento da transmissibilidade e ao aumento em 61% da mortalidade em relação à variante selvagem (Choi; Smith, 2021; Davies *et al.*, 2021a, 2021b). Adicionalmente, a presença de uma deleção de seis nucleotídeos que resultou na remoção completa de dois

aminoácidos (H69del e V70del) na posição 69-70 (Δ 69-70) na proteína S foi associada à falha diagnóstica de kits de RT-qPCR, acarretando falha na detecção do gene S (SGTF, do inglês *S gene target failure*) ou amplificação tardia do gene S (SGTL, do inglês *S gene target late amplification*) (BORGES *et al.*, 2021).

Em dezembro de 2020, os pesquisadores da África do Sul relataram a descoberta de uma nova linhagem do SARS-CoV-2 logo após a primeira onda de COVID-19 no país. Classificada como VOC Beta (linhagem B.1.351), essa variante apresentou dezoito mutações distintas, com nove delas localizadas na proteína S, das quais três ocorrem na RBD (Choi; Smith, 2021). Estudos demonstram que a combinação destas mutações na RBD está associada a um aumento significativo na afinidade de ligação da espícula com o receptor humano ACE2, facilitando a infecção (Khan *et al.*, 2021). Dessa forma, estima-se que a variante Beta seja 1,5 vezes mais transmissível do que as variantes que circulavam anteriormente na África do Sul (Pearson *et al.*, 2021). Além disso, foi observada uma associação entre a infecção com VOC Beta e um aumento nas chances de hospitalização, porém, sem aumentar o número de óbitos (Funk *et al.*, 2021).

Em janeiro de 2021, uma nova variante do SARS-CoV-2, descendente da linhagem B.1.1.28 mas com um conjunto adicional de mutações, foi detectada em um grupo de viajantes que retornaram do Amazonas para o Japão (FUJINO *et al.*, 2021). Estima-se que essa variante tenha surgido em novembro de 2020 no mesmo estado, apresentando 21 alterações no genoma viral, sendo 10 mutações *missense* na proteína S, das quais três se localizavam na RBD (Faria *et al.*, 2021). Essa variante foi denominada P.1 e classificada como VOC Gama em janeiro de 2021 (OMS, 2021).

Enquanto a presença da mutação E484K impactava em uma redução acentuada da atividade de anticorpos neutralizantes provenientes de infecções prévias ou imunizações, a presença de duas mutações-chave convergentes (K417T e N501Y) associadas ao aumento da afinidade de ligação com a proteína ACE2 humana, impactavam em uma maior transmissibilidade e maior carga viral (Akkız, 2022; Salehi-Vaziri *et al.*, 2022). O elevado potencial de transmissão da VOC Gama ocasionou um aumento exponencial no número de casos no estado e, posteriormente, no país, dando início a 2ª onda epidêmica no Brasil, com aumento significativo no número de casos graves e óbitos (Banho *et al.*, 2022; Buss *et al.*, 2021).

Em março de 2021, apenas dois meses após a detecção da VOC Gama, uma nova variante de SARS-CoV-2 foi identificada na Índia e associada ao aumento do número de casos, de hospitalizações e de óbitos por COVID-19 no país, apesar da elevada soropositividade da população, marcando o início da 2ª onda no país (Tian *et al.*, 2022; Velumani *et al.*, 2021). Caracterizada pela presença de nove mutações *missense* na proteína S, das quais cinco são definidoras de linhagem (T19R, L452R, T478K, P681R, D950N), essa variante se disseminou globalmente e substituiu outras VOCs que estavam em circulação (GISAID, 2023). A propagação da VOC Delta foi atribuída à presença de mutações que impactaram seu comportamento biológico (sobretudo L452R, T478K, P681R), em relação ao aumento do escape imune, da afinidade de ligação entre RBD e ACE2, da taxa de infecção e da replicação viral (Baj *et al.*, 2021; Di Giacomo *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2022).

2.4.2 VOC Ômicron

Em 11 de novembro de 2021, uma nova variante classificada como linhagem B.1.1.529 de SARS-CoV-2 foi detectada na África do Sul, em um viajante proveniente do país africano Botsuana, seguido de um aumento brusco no número de casos de COVID-19 na região (Parra-Lucare *et al.*, 2022). Em 24 de novembro de 2021, essa variante foi classificada como VUM e, apenas dois dias depois, como VOC Ômicron, sendo a única variante que permanece em circulação até os dias atuais (OMS, 2023). Esta variante destaca-se pela quantidade de alterações existentes em seu genoma viral, possuindo uma quantidade de mutações muito maior que as variantes anteriores, inclusive diversas mutações nunca observadas. Somente na proteína S, a VOC Ômicron B1.1.529 apresenta 28 mutações, três deleções (como a $\Delta 69-70$) e uma inserção, das quais aproximadamente 15 destas alterações estão localizadas na RBD (Tian *et al.*, 2022). A comparação da incidência de mutações em relação a outras VOCs está esquematizada na Figura 04A.

Figura 04- Comparação da frequência de mutações na proteína S de SARS-CoV-2 presentes nas (A) principais VOCs e nas (B) principais sublinhagens de VOC Ômicron.



Fonte: <https://gisaid.org/lineage-comparison/>. Acesso em 10/07/2023.

Essa alta incidência de mutações na RBD aumentou significativamente a transmissibilidade e infectividade desta variante, o que resultou em sua rápida expansão e prevalência global (Callaway; Ledford, 2021). No entanto, diversos estudos associam que infecções ocasionadas pela VOC Ômicron são mais leves em relação as variantes prévias, com menos desenvolvimento no trato respiratório devido a menor competência de replicação viral nos pulmões (Thye; Jodi, 2022). Além disso, a cobertura vacinal da população no período de circulação dessa variante também pode ter contribuído para a redução de casos graves.

Diversas sublinhagens da Ômicron emergiram de sua linhagem original, sendo elas BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 e suas derivadas, cujas mutações estão detalhadas na Figura 04B A primeira destas sublinhagens, denominada BA.1, rapidamente se disseminou pelo mundo, ocasionando surtos em diversos países e predominou na África do Sul até janeiro de 2022. Essa sublinhagem foi gradativamente substituída pelo aumento da sublinhagem BA.2, caracterizada pela ausência da $\Delta 69-70$ e, conseqüentemente, sem falha de detecção por RT-qPCR devido ao SGTF (TIAN et al., 2022). A linhagem BA.3, por sua vez, foi detectada em níveis baixos, não se tornou uma linhagem predominante e foi a única classificada como VOI (Zhou; Zhi; Teng, 2023).

Entre dezembro de 2021 e janeiro de 2022, na África do Sul, emergiram as sublinhagens BA.4 e BA.5, caracterizadas por apresentarem seis mutações na proteína S que as diferenciam da linhagem BA.2, aumentando sua capacidade infecciosa e potencial de escape imune (Tallei et al., 2023). Essas mutações incluem a deleção $\Delta 69-70$ - presente na VOC Ômicron BA.1 e na VOC Alfa - bem como a mutação L452R - também presente na VOC Delta, além de algumas mutações/deleções que diferenciem as linhagens entre si fora da proteína S (Islam; Shahriar; Bhuiyan, 2022).

Em setembro de 2022, houve a emergência de uma descendente da linhagem BA.5, denominada BQ.1, caracterizada por possuir mutações adicionais na proteína S (K444T e N460K) que resultaram no aumento da transmissibilidade e da capacidade para escape imune em relação às variantes anteriores (Mustafa; Makhawi, 2022). Em novembro de 2022, foi identificada uma nova descendente da sublinhagem BA.5 na região norte do Brasil, que recebeu a designação de BE.9 (BA.5.3.1.9), apresentando uma deleção de 244 bases no gene ORF7a, não detectada na montagem da sequência obtida pelos principais montadores, como DRAGEN

COVID e ViralFlow 0.0.6 (Rede Genômica Fiocruz, 2023). Adicionalmente, esta linhagem apresenta importantes mutações, associadas à resistência à anticorpos (Goswami *et al.*, 2023).

A linhagem XBB, por sua vez, originou-se da recombinação de duas descendentes da linhagem BA.2 (BJ.1 e BM.1.1.1) (Tamura *et al.*, 2023) e apresenta um aumento de transmissibilidade e capacidade para escape imune em relação às variantes anteriores, com baixos riscos associados a gravidade clínica da COVID-19 (Ao *et al.*, 2023). A contínua evolução da VOC Ômicron fez com que o cenário mundial atual esteja marcado pela prevalência de importantes sublinhagens da variante Ômicron.

O impacto significativo causado pelo SARS-CoV-2 mobilizou a comunidade científica e o setor produtivo de forma colaborativa e sem precedentes, de forma a dar celeridade na concepção, desenvolvimento e implementação de estratégias de intervenção farmacológicas. Como resultado, uma ampla variedade de vacinas foi desenvolvida e empregada ao longo da pandemia para prevenção da disseminação da COVID-19.

2.5 Vacinas contra a COVID-19 no Brasil

A imunização populacional por meio da vacinação representa a principal estratégia farmacológica no combate a COVID-19 (OMS, 2022). Consideradas uma das ferramentas mais importantes para a saúde pública, as vacinas podem ser definidas como imunizantes constituídos por agentes patogênicos ou seus derivados, capazes de estimular a produção de anticorpos neutralizantes específicos, de forma que quando o organismo é exposto ao patógeno-alvo, a memória imunológica é ativada e a resposta imune ocorre com mais rapidez, prevenindo ou atenuando o surgimento da patologia (Machado *et al.*, 2022; Schuchat, 2011).

Um esforço colaborativo mundial, desencadeado por uma crise de saúde pública sem precedentes, integrado com a utilização de tecnologias de ponta permitiu o rápido desenvolvimento de diferentes vacinas contra a COVID-19. Em 31 de dezembro de 2020, a OMS autorizou o uso emergencial da vacina produzida pelo laboratório Pfizer para a COVID-19 (Comirnaty BNT162b2), que é baseada na tecnologia de RNA mensageiro (RNAm) e atua contra a proteína S do SARS-CoV-2 (WHO, 2020). Desde então, outras vacinas também tiveram seu uso aprovado pela OMS, como: i) vacinas de RNA mensageiro (Spikevax mRNA-1273 da Moderna); ii) vacinas de vírus inativado (Covilo da Sinopharm, CoronaVac da Sinovac e Covaxin da Bharat Biotech); iii) vacinas baseadas em vetor de adenovírus (Vaxzevria da AstraZeneca, Covishield ChAdOx1 e Ad26.COV2. S da Johnson & Johnson-Janssen) e iv)

vacinas de proteína com adjuvante (Nuvaxovid da Novavax e Covovax NVX-CoV2373) (Barouch, 2022). Mais recentemente, em janeiro de 2022, a Pfizer-BioNTech produziu uma vacina bivalente contendo RNAm direcionado a cepa ancestral do SARS-CoV-2 e direcionados contra a nova variante de SARS-CoV-2 associada à nova onda de COVID-19 da época, VOC Ômicron BA.1 (Offit, 2023).

Estes imunobiológicos desenvolvidos apresentaram uma alta capacidade de prevenção para o desenvolvimento de quadros graves e óbitos, impactando diretamente no curso da pandemia (Banho *et al.*, 2022). Até dezembro de 2021, aproximadamente 55,9% da população global havia recebido ao menos uma dose de vacina contra a COVID-19, resultando na prevenção estimada de cerca de 14,4 milhões de mortes (Watson *et al.*, 2022). Apesar dos benefícios, parte da população mundial não aderiu as campanhas de imunização devido ao temor de possíveis efeitos colaterais. Embora alguns casos de efeitos colaterais, como a miocardite e a pericardite (com taxas de 52 a 137 casos por milhão de vacinados), tenham sido registrados e atribuídos às vacinas, é importante ressaltar que tanto a trombose quanto a miocardite ocorrem com muito mais frequência após a infecção por COVID-19 que após a vacinação contra a COVID-19 (Barouch, 2022)

No Brasil, a campanha de imunização contra a COVID-19 teve início em fevereiro de 2021 de forma escalonada, priorizando a vacinação profissionais de saúde na linha de frente do combate à pandemia, indivíduos em situação de risco devido à presença de comorbidades e faixas etárias em ordem decrescente (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2023). Em dezembro de 2022, deu-se início no país a vacinação de crianças entre seis meses e cinco anos (BRASIL, 2022b). De forma geral, o processo de imunização no país ocorreu de forma lenta, o que contribuiu, dentre outros fatores, para o prolongamento da pandemia e para a emergência de uma nova variante do SARS-CoV-2 na região norte do país, a VOC Gama, ainda no início de 2021 (Banho *et al.*, 2022).

A vacinação desempenhou um papel fundamental no controle da pandemia e na redução de casos graves e óbitos e, caso fossem distribuídas de forma mais rápida para diversas partes do mundo e se a adesão à vacinação tivesse sido fortalecida globalmente, mais vidas poderiam ter sido salvas (Watson *et al.*, 2022). Além destes imunobiológicos, também houve uma diversidade de opções de tratamento farmacológicas para indivíduos já infectados pelo vírus, de forma que a busca por terapias eficazes contra a COVID-19 também é parte crucial da resposta global à pandemia.

2.6 Terapias farmacológicas no tratamento contra a COVID-19

Diferentemente do início da pandemia, quando as decisões sobre tratamento farmacológico de pacientes com COVID-19 se fundamentavam em projeções a partir de dados gerados *in vitro* e relatos de casos, atualmente existem diversas terapias respaldadas por evidências científicas de alta qualidade (Murakami *et al.*, 2023). Várias terapias amplamente utilizadas no início da pandemia não são mais recomendadas devido à falta de eficácia comprovada em estudos clínicos mais robustos ou pela incidência de efeitos colaterais que comprometiam a segurança do tratamento (Chinta *et al.*, 2023). Apesar da evolução das pesquisas voltadas para o desenvolvimento de medicamentos capazes de tratar a COVID-19, estas ainda se fazem necessárias, sobretudo, para o tratamento de casos clínicos mais severos (Yuan *et al.*, 2023). Diversas instituições de saúde e pesquisadores em uma colaboração global estão continuamente buscando a identificação de terapias eficazes para o tratamento da doença (Ceramella *et al.*, 2022).

Existem diferentes recomendações para o manejo terapêutico de pacientes acometidos pela COVID-19, baseadas nos sintomas da doença e na gravidade do quadro clínico. De acordo com a OMS, indivíduos com quadros leves devem tratar-se em casa com a utilização de medicamentos isentos de prescrição (MIPs) para alívio dos sintomas, como analgésicos e antipiréticos, assim como em casos de gripes comuns (Eccles *et al.*, 2023). Em casos clínicos mais graves, as orientações terapêuticas podem envolver intervenções clínicas mais robustas, como a administração de medicamentos específicos e outras terapias direcionadas.

O reposicionamento de fármacos aprovados para uso ou nas últimas fases do estudo clínico para no tratamento de outras doenças humanas foi uma importante estratégia utilizada para acelerar as buscas por terapias eficazes contra o SARS-CoV-2 (Munnink *et al.*, 2021). Nesse contexto, os medicamentos antimaláricos cloroquina e hidroxicloroquina foram amplamente utilizados no Brasil no início da pandemia para o tratamento da COVID-19, devido ao potencial antiviral contra SARS-CoV-2 demonstrado *in vitro* (Chinta *et al.*, 2023). Tendo seu uso emergencial autorizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o mesmo órgão contraindicou o uso dos fármacos em meados de 2020, após estudos clínicos *in vivo* não encontrarem efeitos significativos na recuperação de pacientes acometidos pela COVID-19 e associarem o uso deste medicamentos a efeitos adversos de importância clínica (Iacopetta *et al.*, 2022).

A azitromicina, antimicrobiano de amplo espectro, também foi amplamente utilizada

para tratar pacientes com COVID-19 moderada ou severa, principalmente em conjunto com a hidroxicloroquina. Posteriormente, o uso combinado destes fármacos foi questionado por diversos estudos clínicos, após relação com o aumento das taxas de mortalidade (Sivapalan *et al.*, 2022). Corticoides, como a metilprednisolona e a dexametasona, também foram utilizados devido a suas propriedades anti-inflamatórias potentes, capazes de mitigar os efeitos da resposta hiperinflamatória que ocorre em casos graves de COVID-19 (Nhean *et al.*, 2023). Apesar dos benefícios de utilização para o tratamento de indivíduos com fenótipos hiperinflamatório, seu uso não é recomendado para indivíduos com condições clínicas específicas, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (Iacopetta *et al.*, 2022).

Em meados de 2021, o remdesivir (*Gilead Sciences*), um inibidor da RNA polimerase dependente de RNA viral, foi o primeiro antiviral aprovado no Brasil para o tratamento de pacientes hospitalizados por COVID-19 (BRASIL, 2021; Petrakis *et al.*, 2023). Este antiviral de amplo-espectro, inicialmente utilizado para o tratamento de Ebola, atua inibindo a replicação de SARS-CoV-2 e foi considerado o melhor candidato para o tratamento de COVID-19 (Sukeishi *et al.*, 2022). O Paxlovid (*Pfizer*), por sua vez, é o antiviral aprovado mais recentemente pelo FDA e pela ANVISA para o tratamento da COVID-19, servindo, também, como um promissor agente de profilaxia pós-exposição ao SARS-CoV-2 (BRASIL, 2022a; FDA, 2023; Heskin *et al.*, 2022). À medida que os antivirais são cada vez mais utilizados em ambientes clínicos, há preocupação com o surgimento de vírus com sensibilidade reduzida ou resistência, de forma que a vigilância genômica do SARS-CoV-2 é de extrema importância para detectar precocemente o surgimento de mutações associadas a resistência de antivirais (Kiso *et al.*, 2023).

2.7 Evolução dos algoritmos para diagnóstico laboratorial da COVID-19

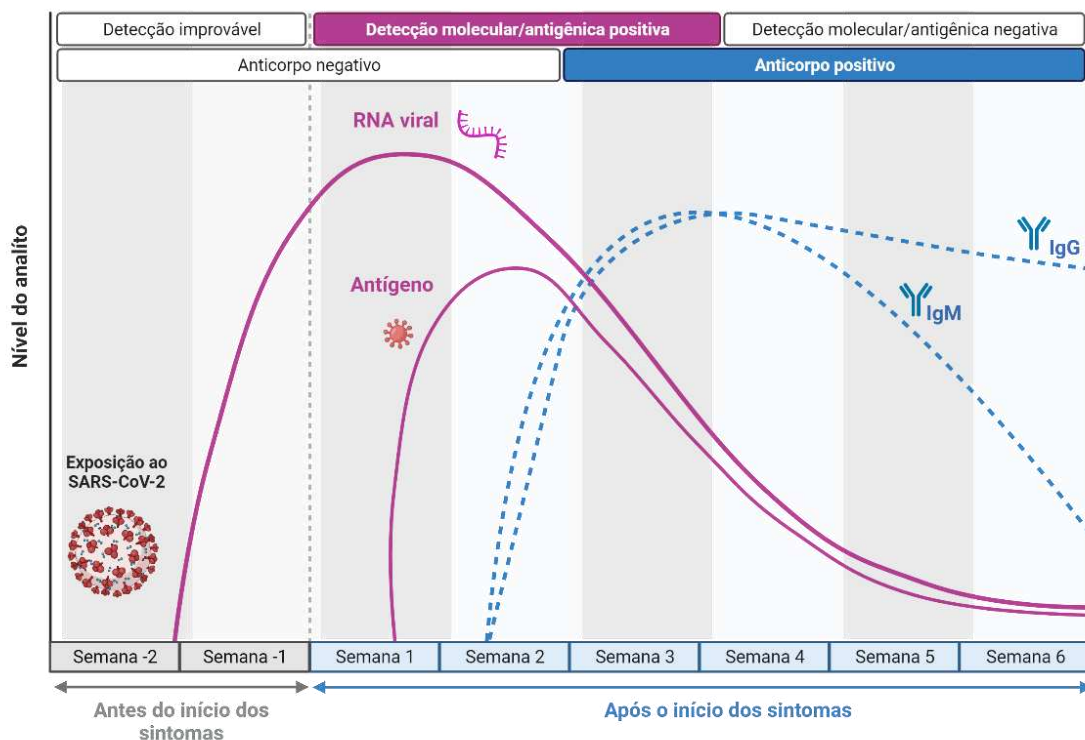
Um método diagnóstico rápido e sensível da COVID-19 é essencial para o estabelecimento de estratégias de isolamento de casos, tratamento da doença e monitoramento epidemiológico de surtos (Filchakova *et al.*, 2022). Em decorrência dessa necessidade, esses testes foram empregados em uma escala sem precedentes como uma ferramenta de saúde pública de combate a pandemia, de forma que a progressão da pandemia foi acompanhada por um desenvolvimento e evolução contínua dos testes para diagnóstico de SARS-CoV-2 (Peeling *et al.*, 2022). Em termos metodológicos, existem três tipos de abordagens principais utilizadas para o diagnóstico laboratorial da COVID-19: i) Testes sorológicos por imunoenaios; ii) testes rápidos antigênicos e iii) técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucléicos.

2.7.1 Diagnóstico por imunoensaios

O diagnóstico por imunoensaios, popularmente denominados de teste sorológico ou teste rápido de anticorpos, baseiam-se no diagnóstico indireto da COVID-19 por meio da detecção de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 circulantes no sangue venoso do indivíduo, denominadas imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) (Zheng *et al.*, 2019). Para isso, a maioria dos ensaios comerciais disponíveis detectam anticorpos anti-S e anti-N de SARS-CoV-2, por meio ensaios imunofluorescentes, quimioluminescentes, ELISA (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) ou imunocromatográficos acoplados a dispositivos portáteis de fluxo lateral (Fernandes *et al.*, 2022).

Enquanto a IgM é a primeira imunoglobulina a ser produzida, com detecção a partir da segunda semana de início dos sintomas e pico na terceira semana seguido de diminuição gradual, a IgG possui seus níveis estabilizados apenas a partir da quarta semana do início da infecção, podendo perdurar por até quatro meses (Figura 05) (Alhamid *et al.*, 2022; Haim-Boukobza *et al.*, 2020). Assim, apesar do amplo uso no início da pandemia no Brasil, a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 como ferramenta diagnóstica da COVID-19 provou ser inefetiva, visto que a janela de detecção não coincide com a fase aguda da doença, diferentemente dos testes moleculares e de antígeno (Figura 05) (Wu, Xianyong *et al.*, 2022). Dessa forma, essa abordagem ficou restrita para uso em investigações de sorovigilância, avaliando o nível de exposição da população durante a pandemia e, mais recentemente, em inquéritos para avaliar a taxa de soroconversão vacinal da população (Narasimhan *et al.*, 2021).

Figura 05- Janela de detecção direta ou indireta de SARS-CoV-2 por diferentes métodos diagnósticos.



Fonte: Adaptado de Falzone et al., 2021

2.7.2 Diagnóstico por técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos

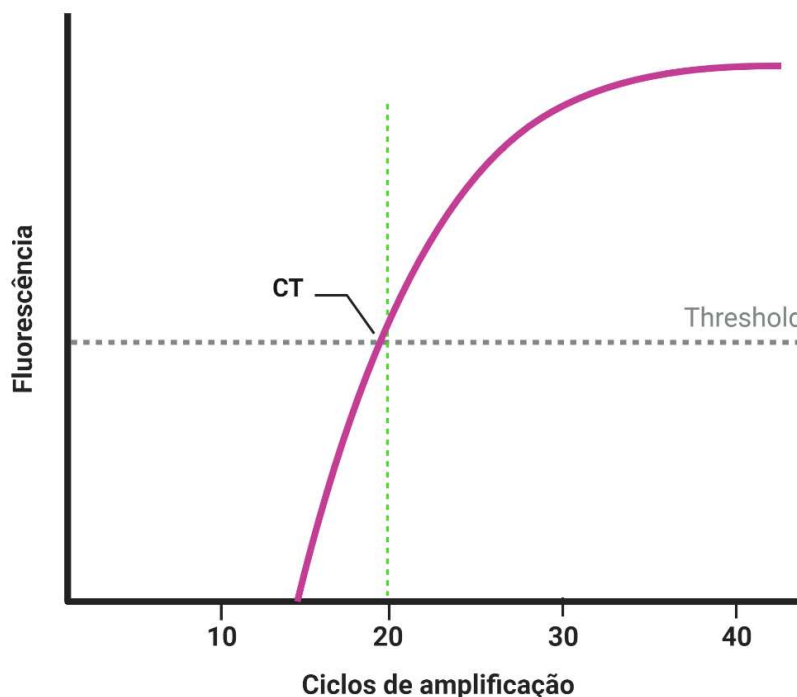
Logo após a decodificação inicial do genoma viral na China, desencadeou-se uma série de iniciativas voltadas para o desenvolvimento de técnicas de amplificação do ácido nucleico (NAAT) de regiões específicas do genoma viral para detecção do SARS-CoV-2 durante a fase aguda da infecção (Ellis *et al.*, 2021). Esses esforços deram origem a diversas abordagens diagnósticas, como a amplificação isotérmica mediada por *loop* (rt-LAMP), utilizado em plataformas como o IDNow da Abbott; o método *All-in-one*, implementado na plataforma GeneXpert da CEPHEID; e a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) (García-Bernalt Diego; Fernández-Soto; Muro, 2022; Smithgall *et al.*, 2020).

Enquanto as demais técnicas de NAAT se caracterizam pela testagem direta, com baixo tempo de retorno e o elevado custo, o método de RT-qPCR, destaca-se por ser específico, sensível e rápido, para o diagnóstico de patógenos bacterianos ou virais, destacando-se como o padrão-ouro para o diagnóstico de SARS-CoV-2 na fase aguda da doença (OMS, 2021b; Tran;

May, 2022). Esta estratégia diagnóstica necessita de profissionais capacitados e instalação física adequada, assim como etapas prévias de processamento e purificação do material genético viral, utilizando, prioritariamente, amostras de swab naso-orofaríngeo armazenadas em uma solução ideal para conservação da integridade do vírus, o Meio de Transporte Viral (MTV), podendo, também, utilizar outras fontes de amostras, como lavado broncoalveolar (LBA), saliva e líquido cefalorraquidiano (LCR) (Chong *et al.*, 2023; Torretta *et al.*, 2021).

De modo geral, este método consiste na conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), por meio da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, oligonucleotídeos específicos complementares a região-alvo, denominados *primers*, são utilizados para amplificar fragmentos do genoma em milhares de cópias, em uma reação catalisada pela enzima DNA Polimerase (Kevadiya *et al.*, 2021). Essa amplificação é acompanhada da hidrólise de sondas, oligonucleotídeos marcados com fluoróforos e seus silenciadores (*quenchers*), que, ao sofrerem esta quebra hidrolítica, emitem uma fluorescência que aumenta de intensidade em cada ciclo de amplificação (máximo de 40 ciclos), gerando uma curva logarítmica associada a um valor de ciclo limiar de detecção, ou *cycle threshold* (CT) (Figura 06). O valor CT corresponde ao número do ciclo em que a fluorescência emitida pela formação de produtos de PCR é superior a basal, ultrapassando o limiar para que a amplificação seja considerada válida (Public Health England, 2020). Portanto, um baixo valor CT está associado a uma maior quantidade de material genético da região-alvo presente na amostra, de forma que esse parâmetro pode ser um indicativo inversamente proporcional à carga viral do paciente (Rao *et al.*, 2020). Estima-se que um aumento em 3,3 unidades no valor CT representa uma diminuição de 10 vezes na quantidade de material genético viral, de forma que esse parâmetro é amplamente utilizado como controle de qualidade para seleção de amostras para sequenciamento genômico (Tom; Mina, 2020).

Figura 06 - Exemplo de curva de amplificação por RT-qPCR evidenciando o valor CT.



Fonte: Elaborado pela autora

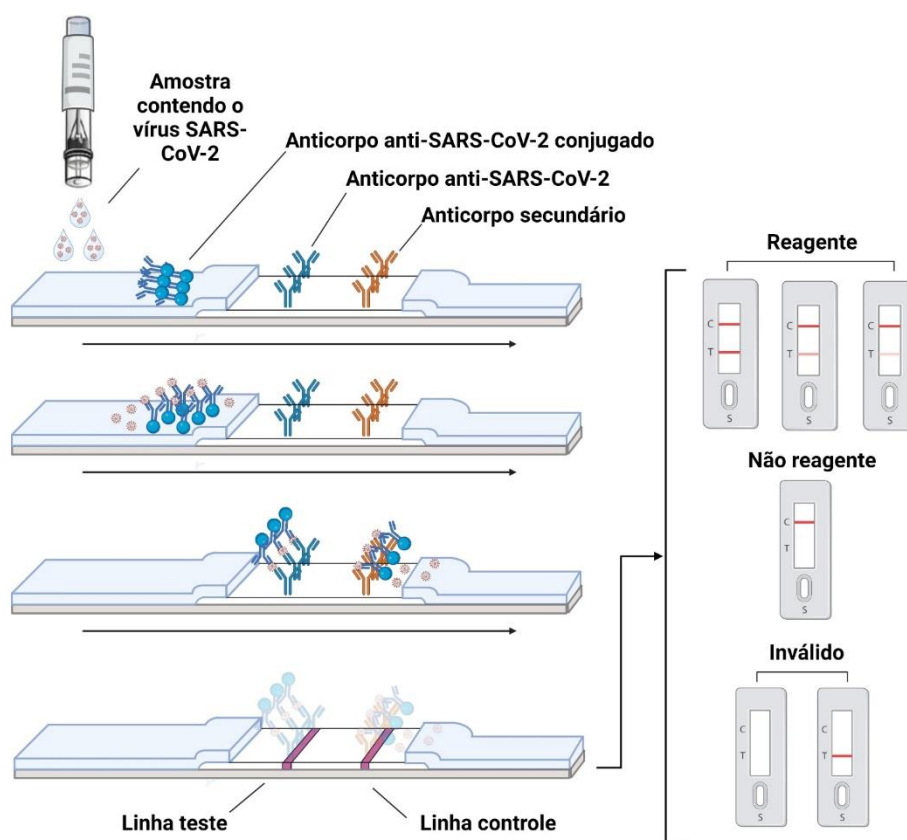
Alguns estudos associam a carga viral estimada do paciente com a severidade da doença (Huang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020), danos em tecidos e órgãos (Rabaan *et al.*, 2021), risco de intubação (Magleby *et al.*, 2020) e mortalidade (Faíco-Filho; Passarelli; Bellei, 2020; Magleby *et al.*, 2020). A estimativa dessa carga viral, por meio do valor CT, emerge como um parâmetro em potencial para a predição da disseminação da COVID-19 e outras doenças (Rabaan *et al.*, 2021). De forma complementar, outro estudo associa um baixo valor CT com o aumento da transmissibilidade da doença à nível individual e aumento da positividade à nível populacional, de forma que o monitoramento desse parâmetro pode servir como uma estratégia para a prevenção e predição de surtos de SARS-CoV-2 (Walker *et al.*, 2021).

Embora a técnica de RT-qPCR seja considerada padrão-ouro para o diagnóstico do SARS-CoV-2 e tenha sido amplamente utilizada para diagnóstico da COVID-19 durante os primeiros anos da pandemia, o elevado número de indivíduos infectados e a necessidade de testagem rápida e descentralizada, impulsionou o desenvolvimento de tecnologias de testes rápidos de antígenos para suprir a demanda global por diagnósticos e diminuir a sobrecarga nos centros de testagem molecular (COLAVITA *et al.*, 2021).

2.7.3 Diagnóstico por testes rápidos de antígeno

Os testes rápidos de antígenos (TRs), por sua vez, consistem em alternativas metodológicas mais simples e acessíveis para a testagem diagnóstica, utilizados para detecção de diversas doenças infecciosas, como Dengue, Zika, malária, AIDS, hepatites, Influenza, Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e, mais recentemente, COVID-19 (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2021). Sua abordagem mais comum consiste na utilização de dispositivos de fluxo lateral para a identificação direta de partículas virais (antígenos) por imunocromatografia a partir de amostras de swab nasal (S. Pavia; M. Plummer, 2021). A detecção ocorre por meio da ligação de anticorpos conjugados com antígenos específicos presentes na amostra, formando um complexo anticorpo-antígeno que se desloca através de um fluxo capilar até uma área de teste (Figura 07) (Boehringer; O'farrell, 2022). Os resultados são interpretados visualmente pela presença ou ausência de linhas que indicam a presença do conjugado capturado e possuem uma sensibilidade entre 92-96% para amostras com alta carga viral (estimada por valor CT < 30) e entre 12-38% para amostras com baixa carga viral (Jääskeläinen *et al.*, 2021).

Figura 07- Esquema representativo do funcionamento de um teste rápido de antígeno por imunocromatografia de fluxo lateral para diagnóstico de SARS-CoV-2.



Fonte: Elaborado pela autora.

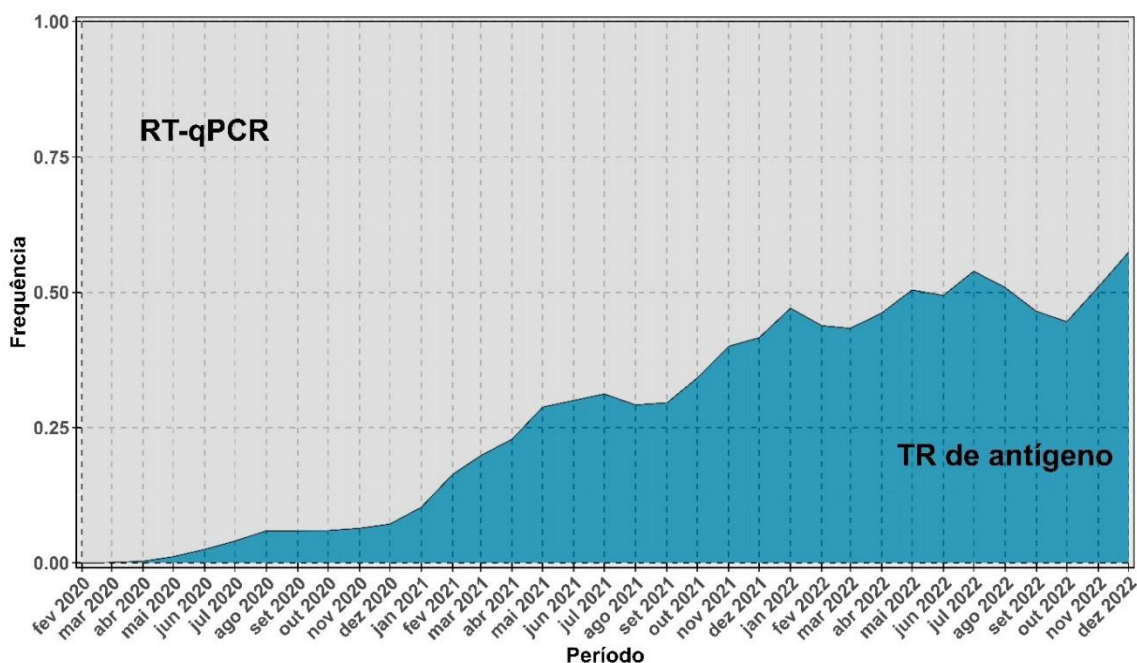
Devido a simplicidade do método em relação ao método molecular de RT-qPCR, o diagnóstico por TRs dispensa uma infraestrutura laboratorial e treinamento complexo para sua execução, permitindo que essa abordagem seja utilizada na rede de atenção primária e em outras locais importantes, como rodoviárias e aeroportos (S. Pavia; M. Plummer, 2021). Dessa forma, a implementação deste tipo de testes visava, além da diminuição da sobrecarga dos laboratórios de testagem molecular, a descentralização da testagem em favor de áreas mais remotas e de menor acesso de infraestrutura laboratorial, propiciando maior celeridade na tomada de decisões por meio do diagnóstico no local (Boehringer; O'farrell, 2022; Colavita *et al.*, 2021). Além de sua praticidade, a posterior popularização do método ocorreu também em função da sua celeridade para obtenção de resultados (15 a 20 minutos) e seu baixo custo (Tran; May, 2022).

As orientações para a utilização dos TRs na assistência diagnóstica da COVID-19 passaram por atualizações durante o curso da pandemia. Em 2020, a OMS recomendou a

utilização dos TRs apenas para pacientes sintomáticos (entre 5 e 7 dias do início dos sintomas) impossibilitados de obterem um diagnóstico por RT-qPCR em tempo hábil, com necessidade de confirmação por PCR (OMS, 2020). Em 2021, com a emergência e expansão das VOCs de SARS-CoV-2, os TRs foram utilizados para testagem em massa em eventos e no monitoramento de viajantes - objetivando o rastreamento ativo de indivíduos infectados, o isolamento de casos e a testagem de contactantes – e em caso de resultado reagente, foi recomendado a coleta de uma segunda amostra clínica para confirmação molecular por RT-qPCR e, se possível, encaminhamento para investigação genômica (Ministério da Saúde, 2022b).

Em 2022, a OMS autorizou a utilização de TRs para a realização de auto-testes com valor diagnóstico, de forma a incrementar a acessibilidade a exames diagnósticos, não mais requerendo a necessidade de confirmação de resultados por método molecular (OMS, 2022). Com isso, houve uma expansão da utilização dos TRs na rotina diagnóstica pra COVID-19 no Brasil a partir de meados de 2022 (Figura 08). Em 2023 no Brasil, houve um aumento expressivo das taxas de subnotificação de casos da COVID-19, superando os anos anteriores, o que foi associado ao aumento do uso dos TR (Palamim *et al.*, 2023). Essas elevadas taxas de subnotificação de casos prejudicaram não apenas a vigilância laboratorial da de COVID-19, como também a vigilância genômica do vírus.

Figura 08- Comparativo do número de casos de SRAG por COVID-19 do Brasil notificados no OpenDataSUS por RT-qPCR em tempo real e por TR



Fonte: Elaborado pela autora. Dados do OpenDataSUS. Disponível em: <https://opendatasus.saude.gov.br/dataset/srag-2021-a-2023>. Acesso em: 26/09/2023

2.8 Vigilância Genômica baseada em Sequenciamento do genoma completo (WGS)

Com a emergência da pandemia de COVID-19, houve uma aplicação sem precedentes de ferramentas de biologia molecular em um esforço mundial e colaborativo para a vigilância genômica de SARS-CoV-2 como uma estratégia de combate à pandemia. Já tendo sido utilizada com sucesso como estratégia de combate a vírus como Ebola e Influenza, o monitoramento da população viral permite antecipar e investigar a dinâmica dos surtos; rastrear a disseminação espacial e temporal do vírus, bem como suas rotas de transmissão e desenvolvimento e monitoramento de ensaios de diagnóstico, medicamentos e vacinas; sendo fortemente recomendada pela OMS como uma importante estratégia de saúde pública (Munnink et al., 2021; OMS, 2021). Programas globais de vigilância de patógenos são de grande importância para detectar rapidamente o surgimento de ameaças infecciosas, não apenas para a COVID-19 (Piret; Boivin, 2021).

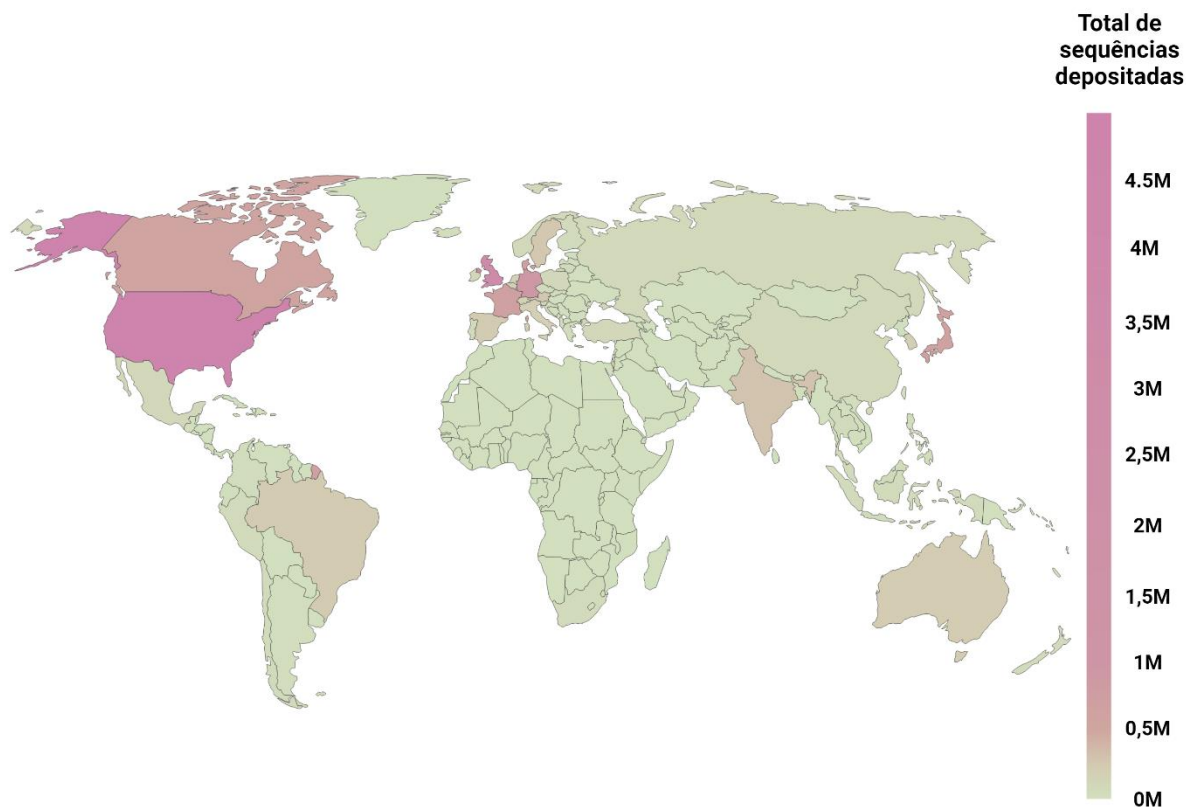
A principal técnica utilizada para vigilância genômica é a decodificação do genoma viral pelo sequenciamento do genoma total (WGS, do inglês *whole-genome sequencing*), que se trata do padrão-ouro para a classificação filogenética de cepas e para o monitoramento da evolução de um microrganismo (Hilt; Ferrieri, 2022). A técnica se baseia na determinação da sequência de nucleotídeos (C, G, A, T ou U) que compõem o genoma de determinado organismo (Brito *et al.*, 2022). Atualmente, o método de mais utilizado é o de sequenciamento por síntese (SBS), realizado pela plataforma Illumina (Hilt; Ferrieri, 2022). Esta tecnologia é do tipo sequenciamento de nova geração (NGS) e permite o sequenciamento simultâneo de milhões de fragmentos de DNA, possuindo uma capacidade de processamento superior a outros métodos, como sequenciamento por Sanger, e uma taxa de erro inferior a outros métodos, como sequenciamento via Nanopore (He, 2022). O fluxo de sequenciamento com a plataforma Illumina segue quatro etapas: i) preparo da biblioteca; ii) formação de clusters; iii) sequenciamento e iv) análise de dados (Illumina, 2015).

O preparo da biblioteca costuma ocorrer pelo método de *amplicon* utilizando o protocolo CovidSeq (Illumina), em que o RNA, após ser convertido a cDNA, é amplificado por reações de PCR de múltiplos alvos, cobrindo todo o genoma viral (Chiara *et al.*, 2021). Posteriormente, os *amplicons* gerados a partir do cDNA são fragmentados e ligados a sequências de oligonucleotídeos denominadas de adaptadores, que permitem o acoplamento a *flow cell*, superfície onde ocorrerá o sequenciamento, e a ligação da enzima DNA Polimerase (He, 2022). A formação de clusters se dá pela amplificação em ponte dos fragmentos ligados à

superfície da *flow cell*, e o sequenciamento ocorre pela detecção da adição de cada nucleotídeo. Por fim, a sequência obtida é comparada com uma sequência referência que permite a identificação de SNPs, mutações, inserções, deleções e análises filogenéticas (Illumina, 2015). As sequências obtidas podem ser depositadas em repositórios internacionais, de forma a promover e divulgar o conhecimento acerca do genoma de SARS-CoV-2.

Até outubro de 2023, mais de 16 milhões de genomas de SARS-CoV-2 foram sequenciados e depositados no repositório internacional GISAID, resultado de um investimento sem precedentes de diversos centros de pesquisa ao redor do mundo (GISAID, 2022). Apesar deste elevado quantitativo de sequências geradas, maior que para qualquer outro patógeno, apenas 13 dos 189 países conseguiram atingir os níveis de cobertura recomendados para uma vigilância genômica eficaz de SARS-CoV-2 (sequenciamento de no mínimo 5% dos casos), enquanto a maioria dos países restantes sequenciou menos de 0,5% dos casos (Brito *et al.*, 2022; Vavrek *et al.*, 2021). No geral, apenas aproximadamente 2,1% de todos os casos de COVID-19 no mundo foram submetidos a sequenciamento, representando 16.323.095 genomas depositados no GISAID em relação aos 772.138.818 casos notificados. No contexto específico do Brasil, apenas cerca de 0,6% do total de casos de COVID-19 foi sequenciado, correspondendo a 243.432 genomas depositados no GISAID em relação aos 37.519.960 casos notificados (GISAID, 2023; OMS, 2023). Isso evidencia que existe uma elevada discrepância nos níveis de sequenciamento por país (Figura 09). Isso ocorre pois, apesar do NGS ser uma técnica bastante utilizada, ainda é um método caro e que requer expertise analítica, resultando em um número restrito de locais com instituições especializadas e recursos suficientes para efetivamente fazer uso da vigilância genômica (Babiker *et al.*, 2021; Munnink *et al.*, 2021; Neopane *et al.*, 2021). Adicionalmente, a efetividade da técnica está associada ao uso de amostras de RNA viral de alta qualidade (avaliada por valor $CT \leq 28$) obtido por RT-qPCR, de forma que nem todas as amostras são passíveis de serem analisadas por NGS (Fontana-Maurell *et al.*, 2023).

Figura 09- Número de sequências de SARS-CoV-2 depositadas no repositório GISAID por país.



Fonte: Rede Genômica Fiocruz Ceará. Dados do GISAID. Disponível em: <https://gisaid.org/> Acesso em: 13/12/2023

Dessa forma, técnicas complementares ao NGS, mais simples e custo-efetivas, são necessárias para fortalecer a vigilância genômica, sobretudo, em locais com baixa disponibilidade de recursos, como as técnicas de genotipagem baseadas em RT-qPCR (Umunakwe *et al.*, 2022). Esse sistema de vigilância foi implementado com sucesso para o monitoramento de arboviroses e outras ameaças epidêmicas antes da emergência de COVID-19, e, mais recentemente, recomendada pela Organização Mundial de Saúde e pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para monitorar VOCs de SARS-CoV-2 e para a rápida triagem de amostras de interesse para o sequenciamento (OMS, 2021). Essa técnica é capaz de detectar assinaturas específicas de mutações associadas a VOCs utilizando ensaios de RT-qPCR comerciais ou customizados para regiões específicas do genoma (Caza *et al.*, 2021; Spiess *et al.*, 2023). Diversos estudos já validaram a utilização desta técnica, porém, em um período limitado e com um baixo número amostral, sem avaliarem o impacto da implementação dessa técnica na representatividade da vigilância genômica (Quadro 04).

Quadro 04- Estudos publicados que avaliam a utilização de ensaios de genotipagem molecular

Alvo	VOC	Método	n amostral	Período	Local	Procedência das amostras	Concordância com NGS	Referência
NSP6: S106107108del	VOC Gama e VOC Alfa	RT-qPCR Singleplex presença/ausência com sondas Taqman	1.232	Novembro/2020 a janeiro/2021	Amazonas, Brasil	Diagnóstico COVID-19	100% (n=266)	(Naveca <i>et al.</i> , 2021)
ORF1a.3675-3677del e S.delH69V70 (SGTF)	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron	RT-qPCR Multiplex	2,853	N/I	Brasil	Diagnóstico COVID-19	99% (n=1.568)	(Fontana-Maurell <i>et al.</i> , 2023)
S.K417T, S.D614G, S.E484K, S.E484Q, S.K417N, S.L452R S.N501Y, S.P681R, S.delH69V70 (SGTF), S.delL242.244L, orf8.Q27ST. S.A701V S.T478K	VOC Delta e VOC Alfa	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	150	Março a julho/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	100% (n=9)	(Neopane <i>et al.</i> , 2021)
K417, E484K, N501Y, L452R	VOC Gama e VOC Delta	RT-qPCR Singleplex presença/ausência com sondas Taqman	253	Janeiro a março/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	94.1%	(Babiker <i>et al.</i> , 2021)
S.delH69V70 (SGTF)	VOC Alfa	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	27.096	Dezembro a janeiro/2020	Portugal	Diagnóstico COVID-19	Não sequenciado	(Borges <i>et al.</i> , 2021)
S.delH69V70 (SGTF) ORF1a.Del3675-3677	VOC Alfa, VOC Beta e VOC Gama	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	9.792	Abril a junho/2021	Qatar	Biorepositório	88.8-100% (n= 236)	(Hasan <i>et al.</i> , 2021)
HV69/70del, Y144del, e A570D	VOC Alfa	RT-qPCR Singleplex presença/ausência com sondas Taqman	16 ETE's e 3 edifícios	Junho e agosto de 2021	EUA	Águas residuais	Não sequenciado	(Lee <i>et al.</i> , 2021)
S.L452R, S.N501Y e S.E484K	VOC Alfa	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	4.049	Dezembro/2020 a março/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	100% (n=229)	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
NSP6: S106107108del	VOC Alfa, VOC Beta	RT-qPCR Multiplex	376	Fevereiro/20	EUA, Brazil,	Diagnóstico COVID-19	31.4-97%	(Vogels <i>et</i>

	e VOC Gama	presença/ausência com sondas Taqman		21	África do Sul		(n=218)	<i>al.</i> , 2021)
T95I, D215G, K417T, N439K, L452R, E484K, P681R, Q27X, A222V, E484Q e N501Y	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	354	Agosto a dezembro/2020	EUA	Diagnóstico COVID-19	N/I	(Pinkhover <i>et al.</i> , 2022)
S.delH69V70 (SGTF), N501Y, E484K e K417N	VOC Alfa, VOC Beta e VOC Gama	RT-qPCR presença/ausência com sondas Taqman e análises por curva de melting	989	Fevereiro a maio/2021	Países Baixos	Diagnóstico COVID-19	96,5% (n=58)	(Ong <i>et al.</i> , 2021).
S.K417N, S.d69-70, S.L452R, S.K417T, S.E484Q, S.T478K, S.E484K e S.N501Y	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama e VOC Delta	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas beacon	26	N/I	N/I	Diagnóstico COVID-19	100% (n=26)	(Dikdan <i>et al.</i> , 2022).
H69V70del, Y144del, D80A e D138Y	VOC Alfa, VOC Beta e VOC Gama	Nested PCR	31	Novembro/2020 a janeiro/2021.	Itália	Células Vero	58.3-93% (n=55)	(Rosa <i>et al.</i> , 2021)
N501Y e dH69/V70	VOC Alfa, VOC Beta e VOC Gama	VirSNiP SARS-CoV-2 Spike del+501 e ID SARS-CoV-2/UK/SA Variante Triplex	35.208	Janeiro a fevereiro/2021	França	N/I	Não sequenciado	(Haim-Boukobza <i>et al.</i> , 2021).
S.delH69V70 (SGTF), Y453F, N439K e N501Y	VOC Alfa	RT-qPCR Multiplexed presença/ausência com sondas Taqman	9.266	Agosto a dezembro/2020	França	Diagnóstico COVID-19	27-58% (n=72)	(Bal <i>et al.</i> , 2020)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar e monitorar o surgimento de linhagens e sublinhagens filogenéticas de SARS-CoV-2 circulantes em Fortaleza, Ceará, Brasil, com o desenvolvimento simultâneo de soluções de resposta rápida de aplicabilidade ao sistema de saúde.

3.2 Objetivos Específicos

I) Desenvolver e validar ensaios de genotipagem para inferência molecular de VOCs que sejam rápidos, sensíveis e efetivos para utilização na rotina de triagem pré-sequenciamento e na vigilância laboratorial de SARS-CoV-2;

II) Incrementar e fortalecer a representatividade da vigilância genômica com a validação de uma estratégia de reaproveitamento de amostras de testes rápidos para o monitoramento molecular da COVID-19;

III) Determinar as linhagens e sublinhagens filogenéticas de SARS-CoV-2 em circulação no município de Fortaleza no período de dezembro/2020 a dezembro/2022, como modelo de avaliação da evolução viral e dinâmica da substituição de linhagens.

4 MATERIAL E MÉTODOS

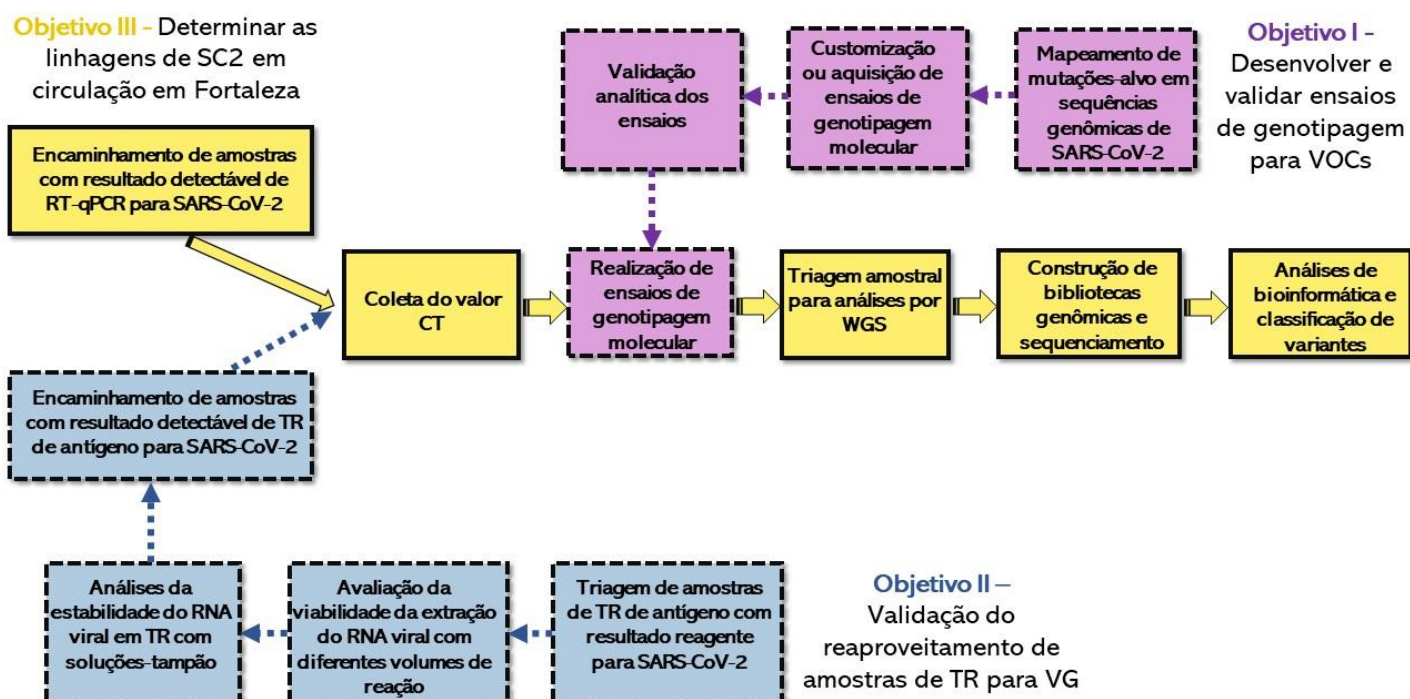
4.1 Aspectos éticos

Todas as atividades foram realizadas como parte de um esforço colaborativo para o monitoramento genômico de SARS-CoV-2, realizado pela Rede de Vigilância Genômica da Fiocruz, uma autarquia do Ministério da Saúde. O estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética (ref. CAEE 50525221.7.3005.8152) e dispensou a necessidade de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 Desenho experimental

Neste estudo prospectivo de base populacional com amostras obtidas por conveniência, objetivou-se determinar a frequência de circulação de variantes de SARS-CoV-2 no município de Fortaleza, Ceará, durante dois anos de pandemia (dezembro de 2020 a dezembro de 2022), período com alto número de casos de COVID-19 e fatalidades, assim como desenvolver, validar e aplicar estratégias para o fortalecimento da vigilância genômica. O desenho experimental está exemplificado na Figura 10.

Figura 10- Desenho experimental do estudo



4.3 Mapeamento de frequência de mutações-alvo

4.3.1 Mapeamento de mutações-alvo em sequências de Sars-CoV-2 coletadas no Brasil

Genomas completos de SARS-CoV-2 do município de Fortaleza com data de coleta completa entre o período de 01/12/2020 à 31/12/2022 foram obtidos da plataforma internacional GISAID EpiCoV. As sequências foram analisadas na plataforma Nextclade CLI v. 2.14.0, com o uso do *software* Pangolin versão 4.2. Genomas com *qc.overallStatus* igual a “Good” prosseguiram para as etapas posteriores (n = 174.625). O mapeamento da frequência de mutações sinapomórficas foi realizado em Python.

4.3.2 Construção de árvore filogenética de sequências de Sars-CoV-2 coletadas em Fortaleza

Os genomas de SARS-CoV-2 foram filtrados para amostras coletadas em Fortaleza (n = 4.351). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software MAFFT v7.453, empregando o comando "mafft --auto --add sequencias.fasta referencia.fasta > alinhamento.fasta", alinhando-as à referência de Wuhan (MN908947). A construção da árvore filogenética foi executada com o IQ-TREE multicore v2.2.3 COVID-edition para Linux. Utilizou-se o modelo GTR (General Time Reversible) com uma taxa de variação Gamma, realizando bootstrap com 1000 replicatas através do comando "iqtree -s alinhamento.fasta -m GTR+G -bb 1000". A visualização foi personalizada utilizando a ferramenta online Itol v6.

4.4 Triagem amostral de SARS-CoV-2 para vigilância genômica

4.4.1 Obtenção de amostras de aproveitamento detectáveis para SARS-CoV-2 após testagem por RT-qPCR

Amostras de swab nasofaríngeo e orofaríngeo coletadas entre dezembro de 2020 até dezembro de 2022 foram cedidas após randomização pela Unidade de Apoio ao Diagnóstico da COVID-19, da Fiocruz Ceará (UNADIG-CE) e pelo Laboratório de Assistência Diagnóstica da COVID-19 do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (LBM-Covid HEMOCE) após diagnóstico detectável para SARS-CoV-2. As amostras encaminhadas foram coletadas como parte de um atendimento clínico (para fins diagnósticos ou de requerimento pré-operatório) ou como rastreamento e busca ativa de VOC's (coletadas por meio de critérios pré-estabelecidos em Nota Técnica elaborada pela Secretaria de Saúde do estado do Ceará e o Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde do Ceará (CIEVS/CE).

4.4.2 Obtenção de amostras de aproveitamento reagentes para SARS-CoV-2 após testagem imunocromatográfica (teste rápido de antígeno)

Com o intuito de suplementar a captação de amostras para vigilância genômica no período de diminuição da adesão à testagem diagnóstica da COVID-19 por RT-qPCR, buscou-se o estabelecimento e a validação de um fluxo de encaminhamento de amostras remanescentes de testes rápidos. Para tanto, amostras com resultado reagente para SARS-CoV-2, coletadas em novembro e dezembro de 2022, foram encaminhadas pela Secretaria Municipal de Saúde de Fortaleza para processamento no LBM-Covid HEMOCE.

4.5 Reaproveitamento de amostras de TR para vigilância genômica

4.5.1 Extração, controle de qualidade e amplificação do material genético

A extração do material genético foi realizada por método automatizado com partículas magnéticas com o kit *MagMAX Viral e Pathogen Nucleic Acid Isolation Kits (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um volume padrão (200 µL) de tampão residual de amostra. A confirmação da extração do material genético viral foi realizada com a utilização de dois ensaios comerciais, o kit 4Plex SC2/VOC e o Kit Molecular SARS-CoV-2 EDX, ambos do fabricante Biomanguinhos. Amostras com resultado detectável para SARS-CoV-2 foram triadas para vigilância genômica, por ensaio de inferência molecular ou NGS.

4.5.2 Avaliação da estabilidade do RNA viral

Para a avaliação da estabilidade do RNA viral no tampão de TR, amostras remanescentes dos TRs foram fracionadas e submetidas à extração utilizando um volume racionalizado (50 µL) no 1º e 7º dia pós-recebimento, armazenadas em refrigeração (4 °C), com armazenamento na proporção 1:1 de solução conservante de 4M de Guanidina Isocianato + 0,2M de EDTA (Gua 4M + EDTA 0,2M) ou 4M de Guanidina Isocianato + 0,2M de Citrato de Sódio (Gua 4M + Cit 0,2M). Para o grupo controle, foi utilizado água livre de nucleases. A análise da possível degradação do RNA viral foi estimada por RT-qPCR utilizando os kits comerciais supracitados (tópico 4.5.1).

4.6 Obtenção de dados de carga viral relativa (valores de CT) a partir de exames realizados por laboratórios de assistência diagnóstica da COVID-19

Os resultados de RT-qPCR obtidos como parte de rotina diagnóstica de SARS-CoV-2 foram coletados no LBM-Covid-HEMOCE e na UNADIG-CE, após diagnóstico utilizando um

dos seguintes ensaios comerciais de *RT-qPCR*: *Allplex 2019-nCoV Assay* (Seegene), SARS-CoV-2 (E/RP) (Biomanguinhos), *Detect SARS-CoV-2 RT-qPCR* (Labtest), *Real-Time Fluorescent RT-qPCR kit for detecting 2019-nCoV* (BGI) ou *TaqPath 1-step Multiplex Master Mix* (ThermoFisher). Os valores CT das amostras com resultado detectável foram coletados utilizando um *software* de análise e interpretação de resultados de RT-qPCR (FIOCRUZ, patente em andamento), após laudo de acordo com instruções do fabricante. Menores valores CTs foram utilizados como um indicativo de uma maior carga viral.

4.7 Ensaios de inferência molecular por genotipagem

Para monitorar e rastrear as variantes circulantes de SARS-CoV-2, amostras positivas de SARS-CoV-2 por RT-qPCR foram analisadas por ensaios de qPCR comerciais ou customizados para rastreamento de mutações-chave que diferenciam as VOCs. Os ensaios foram validados analiticamente utilizando NGS como padrão-ouro para confirmação de linhagens. Todos os ensaios foram realizados por PCR em tempo real em Quantstudio 5 ou 7 Pro (Thermo Fisher Scientific) ou Linegene 9600 (Bioer). Os resultados foram interpretados de acordo com o cenário epidemiológico do estado no momento da coleta da amostra e com o auxílio do mesmo *software* de análise e interpretação de dados PCR em tempo real citado anteriormente (Tópico 4.6). As condições de ciclagem empregadas, bem como os parâmetros utilizados para laudo do resultado estão resumidas na Quadro 05.

4.7.1 Ensaios de genotipagem para VOC Gama e VOC Delta

A fim de distinguir a VOC Gama de outras variantes, dois ensaios *singleplex* foram customizados: um para detectar a deleção ORF1b (NSP6: S106del, G107del, F108del) presente nas VOCs Alfa, Beta e Gama; e outro desenvolvido para detectar uma inserção de 4 pares de bases (AACA) na região terminal não codificante associada à VOC Gama. Os primers e sondas utilizados foram desenhados no programa Primer3 e PrimerExpress (Quadro 05), exceto a sonda de ensaio NSP6 que foi sintetizada utilizando a sequência de Naveca e colaboradores (2021). Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela IDT DNA e ambos os ensaios foram realizados usando *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, número do catálogo A6120X). Os resultados inconclusivos ou possíveis casos de co-infecções foram analisados usando os ensaios K417T. e L452R, presentes no painel de mutação TaqMan SARS-CoV-2 (*Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific*).

4.7.2 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.1 e BA.2)

Com a emergência da VOC OMICRON (sublinhagem BA-1 like), o ensaio TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*), também conhecido como SGTF, foi empregado para rastrear a mutação *S-dropout* associada a essa variante (Quadro 05). Por tratar-se de um kit comercial para uso em pesquisa e validado para uso em diagnóstico, este foi aplicado na rotina do LBM-Covid-HEMOCE como um método dual para diagnóstico-inferência molecular. De forma complementar, o kit 4Plex SC2/VOC (Biomanguinhos) foi utilizado para amostras com resultados inconclusivos ou provenientes da UNADIG-CE.

4.7.3 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4 e BA.5)

Para diferenciação de BA.4, foi customizado e sintetizado um ensaio específico com utilização de dupla sonda (IDTDNA) a partir de uma deleção de 9 pares de bases da NSP1 (códon 686, Orf1a), utilizando o kit comercial SARS-Cov-2 EDx (Biomanguinhos) (Quadro 05). O mix da reação e as condições de ciclagem da RT-qPCR seguiram as recomendações do fabricante.

4.7.4 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (BE.9 e BQ.1)

Para confirmação da presença de uma deleção de 244 pares de base em ORF7a na sublinhagem BE.9, um ensaio de PCR em tempo real baseado em curva de dissociação (do inglês, *melting curve*) foi customizado utilizando *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, catálogo número A6001) com os primers do painel ARTIC SARS-CoV-2 V4.1 (SARS-CoV-2_92_LEFT e SARS-CoV-2_92_RIGHT) (Quadro 05).

Quadro 05- Esquema metodológicos dos ensaios de inferência utilizados no estudo

Nome do Ensaio	Mutações alvo	Aplicação (Variante principal monitorada)	Tipo de ensaio	Kit de PCR utilizado	Interpretação do ensaio	Sequência Oligonucleotídeos customizados (5' - 3')	Ciclagem utilizada
NSP6del9	NSP6: S106del, G107del, F108del	VOC Gama	Sonda única	GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, Custom A6120X (Promega)	Amplificação (CT < 38): VOC Gama Não-amplificação (CT > 40 ou indeterminado): Variante selvagem (coleta até junho* de 2021) / VOC Delta (coleta entre junho* de 2021 a dezembro 2022) / Falha* Amplificação tardia (38 < CT > 40): Inconclusivo * *Necessário confirmação do resultado por ensaio adicional	>NSP6_FM_Fw- CTGCTAGTTGGGTGATGCGTA >NSP6_FM_Rv CACAGTTCTTGCCATAAGGA >NSP6_FNP_FAM TGGTTGATACTAGTTTGAAGCTAAAA	45 °C por 15 min; 95 °C por 2 min; 45 ciclos de 95 °C 15s e 60 °C 30s.
Ins4	28262:AACA					>124ins4_FM_Fw TGCGTTGTTTCGTTCTATGAAGAC >124ins4_FM_Rv GGTGCATTTTCGCTGATTTTG >124ins4_FMP_VIC: CAGACATTTTAGTTTGTGTTGTTTCGT	
K417T	S.K417T	VOC Delta	Dupla-sonda	TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher)	Amplificação/Formação de clusters para o alelo de referência (K) - Variante selvagem (coleta até junho de 2021) / VOC Delta (coleta entre junho de 2021 a dezembro 2022) Amplificação/Formação de clusters para o alelo mutante (T) - VOC Gama	Sequência não disponível (Ensaio comercial)	60 °C 30 s (Pre-read); 50°C 10 min; 95 °C 2 min; 45 ciclos de 95 °C 3 s e 60°C 30 s; 60°C 30 s (Post-read)
L452R	S.L452R						

					2021) / VOC Gama (coleta entre janeiro de 2021 a junho de 2022)		
					Amplificação/Formação de clusters para o alelo mutante (R) - VOC Delta		
SGTF	S: H69del, V70del (del69-70)	VOC Ômicron (BA.1)	<i>Multiplex</i>	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-qPCR Kit (ThermoFisher)	Amplificação do Gene S, N, OFR1ab (CT < 38) e RP (CT < 32) - VOC Delta (coleta entre junho de 2021 a dezembro 2022); VOC Ômicron BA.2 (coleta entre fevereiro 2022 a abril 2022). Não-amplificação do Gene S (CT = indeterminado) e amplificação do Gene N, OFR1ab (CT < 38) e RP CT < 32) - VOC Ômicron (BA.1)	Sequência não disponível (Ensaio comercial)	53 °C 10 min; 95 °C 02 min; 40 ciclos de 95°C 03s e 60°C 30s.
BioM 4Plex VOC	S: H69del, V70del (del69-70)	VOC Ômicron	<i>Multiplex</i>	4Plex SC2/VOC (Bio-Manguinhos)	Amplificação de todos os alvos virais (CT < 40) - VOC Delta Amplificação somente do Gene N e RP (CT < 40) - VOC Ômicron (sublinhagem BA.1) Amplificação do Gene N e Del69-70 (CT < 40) - VOC Ômicron (BA.2)	Sequência não disponível (Ensaio comercial)	50 °C 15 min; 95 °C 15 min; 40 ciclos de 95°C 20s e 61°C 30s.

NSP1del9	NSP1: K141del, S142del, F143del	VOC Ômicron (BA.4)	Dupla- sonda	Mastermix do Kit Molecular SARS-CoV-2 EDX	Amplificação wt_686_BA_P1 (<i>CT</i> < 38): VOC Ômicron BA.2, BA.5, BQ.1 ou BA.9 (coleta a partir de fevereiro de 2022) Amplificação del9_686_BA4_P2 (<i>CT</i> < 38): VOC Ômicron BA.4	> ORF1a_del9_686_BA4_F ACGGTAATAAAGGAGCTGGTGG > ORF1a_del9_686_BA4_R GGATCAGTGCCAAGCTCGTC > ORF1a_wt_686_BA_P1 SUN/CGGCGCCGA/ZEN/TCTAAAGTCA > ORF1a_del9_686_BA4_P2 FAM/CGGCGCCGA/ZEN/TCTAGACTT	60 °C 30 s (<i>Pre-read</i>); 50°C 15 min; 95 °C 2 min; 45 ciclos de 95 °C 20 s, 58°C 30 s; 60°C 30 s (<i>Post-read</i>)
ORF7a del244	ORF7a: 244del	VOC Ômicron (BE.9)	Curva de dissociação	GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, no. A6001)	> Av4_SARS-CoV-2_92_LEFT CACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGTAC > Av4_SARS-CoV-2_92_RIGHT GTTCAAGTGAGAACCAAAAGATAATAAGC	45 °C 15 min; 95 °C 5 min; 45 ciclos de 95 °C 15 s, 65 °C 30s, 72 °C 50 s; 95 °C 15s; 60 °C 1 min; 95 °C 1s.	

4.8 Sequenciamento de Nova Geração

Amostras de RNA de SARS-CoV-2 foram sequenciadas no Laboratório Analítico de Competências Moleculares e Epidemiológicas (ACME), da Rede de Vigilância Genômica da Fiocruz Ceará. Foram utilizadas amostras após triagem e controle de qualidade. O preparo de bibliotecas foi realizado utilizando o protocolo COVIDSeq™, (Illumina Inc, USA), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, o cDNA fita simples foi sintetizado e o genoma viral total foi amplificado em duas reações separadas, utilizando um *pool* de primers do protocolo Illumina® ARTICV3™ ou, para amostras coletadas após novembro de 2021, *pool* de primers do protocolo Illumina® ARTICV4™. Em seguida, o cDNA amplificado foi tagmentado e ligado a adaptadores após etapas de purificação. As bibliotecas foram então agrupadas e analisadas utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen Inc.) para a quantificação de ácidos nucleicos e TapeStation (Agilent) para a determinação do tamanho do fragmento. Posteriormente, as bibliotecas foram normalizadas, desnaturadas e diluídas antes do carregamento na plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq ou NextSeq. O sequenciamento por amplicons foi realizado no modo *pair-end* com fragmentos no comprimento de 2 x 150 bp.

4.9 Análises por Bioinformática

As sequências FASTQ foram alinhadas com o genoma de referência de SARS-CoV-2 (NC_045512.2) e analisadas utilizando a Pipeline ViralFlow, desenvolvida pelo Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE (IAM) (DEZORDI et al, 2022), disponível em https://github.com/dezordi/IAM_SARSCOV2. Os dados gerados foram comparados com a pipeline da Illumina DRAGEN™ COVID Lineage app. Mutações específicas foram confirmadas com o Nextclade web v1.1.0 ou v1.13.2 após análises manuais. Foram descartadas as sequências com profundidade < 100 vezes, “*qc.overallStatus = bad*”, com cobertura de profundidade 5x (Cov 5x < 90%, alto número de mutações privadas ou *frameshift* em regiões importantes do genoma).

4.10 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram integrados em uma base de dados construída na plataforma *Research Electronic Data Capture* (REDCap), utilizada para coleta e gerenciamento de dados clínicos. A validação analítica dos ensaios de genotipagem foi avaliada por meio do cálculo de VPP, VPN, especificidade, sensibilidade e acurácia, com os intervalos de confiança

sendo calculados utilizando o método de Pontos de Wilson. A quantidade de amostras de TR de antígeno recuperadas após a extração do material genético, assim como a quantidade de amostras de TR com linhagem definida por NGS, foi analisada utilizando o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário. A distribuição dos valores CT do SARS-CoV-2 em amostras de TR foi avaliada por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc* pelo método de Dunnet e correção de Bonferroni. Todas as análises estatísticas, e os gráficos gerados, foram conduzidas em *software* R, com exceção dos cálculos de validação analítica dos ensaios de genotipagem, realizados na plataforma OpenEPI (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios de inferência como uma ferramenta para o fortalecimento da vigilância laboratorial e genômica de SARS-CoV-2

5.1.1 Mapeamento de mutações-alvo

Com base nas sequências disponíveis no GISAID, referentes ao período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022 no Brasil, as linhagens selvagens de SARS-CoV-2 (B.1, B.1.1, B.1.1.1 e B.1.177), circularam até fevereiro de 2021 e foram suplantadas por um aumento da circulação de variantes de preocupação (Quadro 06). Enquanto a VOC Alfa e a VOC Beta ficaram com baixos níveis de circulação durante todo o período do estudo e algumas sublinhagens da VOC Ômicron (XBB, XBB.1.5, CH.1.1) alcançaram circulação máxima apenas no último mês, a VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron (sublinhagens BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, BQ.1 e BE.9) foram as variantes de maior prevalência no país durante o período do estudo.

Em relação à frequência de mutações definidoras de linhagem nessas variantes, observa-se que a deleção de 9 nucleotídeos na proteína NSP6 (S106del, G107del, F108del) foi detectada em quase todas as linhagens de VOC Alfa (96,7%), VOC Beta (100%), VOC Gama (98,6%), VOI Lambda (95,6%) e em todas as sublinhagens da VOC Ômicron (95,2 – 100%), com exceção de BA.1. Alternativamente, a inserção de 4 pares de base AACA na posição 28262 e a mutação K417T mostraram-se exclusivas nas sequências de VOC Gama (93% e 95,2% respectivamente). A mutação L452R, por sua vez, foi detectada em todas as sublinhagens da VOC Delta (99,8 – 100%) e em algumas sublinhagens da VOC Ômicron, BE.4, BE.5, BE.9, BQ.1 e CH.1.1, (98,9 – 100%), que circularam no país em períodos distintos. A deleção de 6 nucleotídeos na proteína S del69-70 foi detectada em VOC Alfa (96,9%) e VOC Ômicron (sublinhagens BA.1, BA.4, BA.5, BQ.1 e BE.9) (97,3 – 99,7%), também circulantes em períodos distintos. Por fim, a presença de uma deleção de 9 nucleotídeos no gene da NSP6 confirmou tratar-se de uma mutação exclusiva da sublinhagem BA.4, estando presente em 98,3% das sequências analisadas. A mutação ORF7a:244del não foi analisada devido à falta de detecção nos programas de montagem utilizados no período.

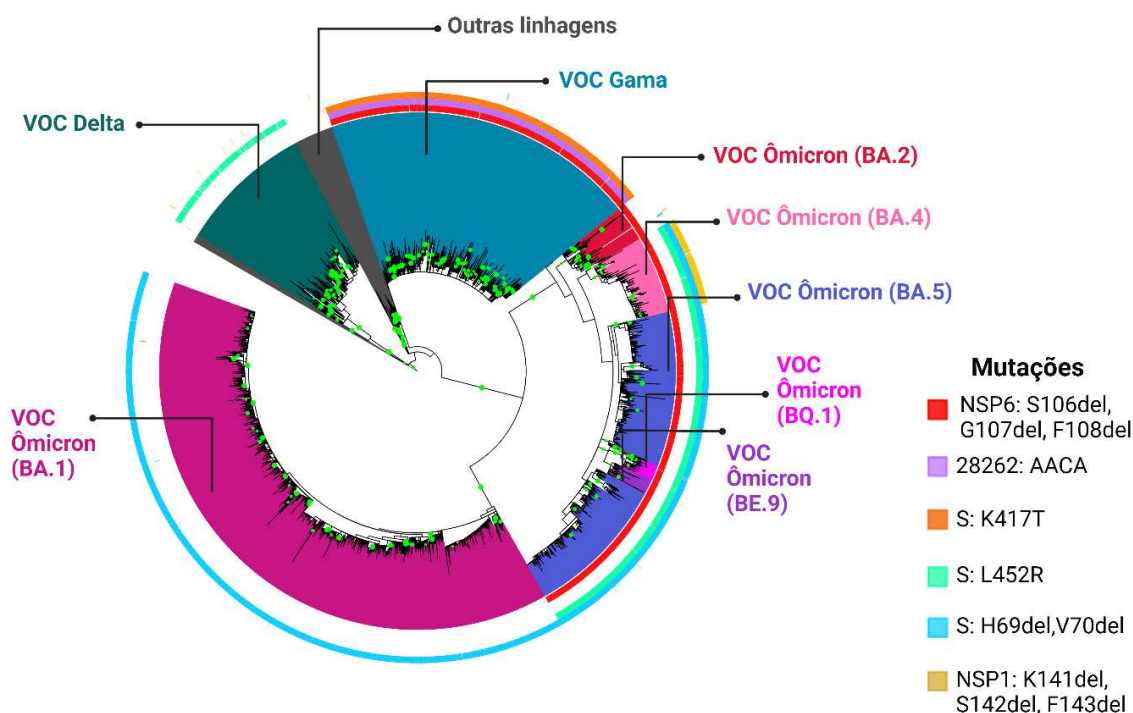
Quadro 06- Frequência de mutações-alvo presentes em seqüências de SARS-CoV-2 provenientes do repositório GISAID e coletadas em amostras do Brasil durante o período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022 (n = 174.625).

Designação OMS	Linhagem Pangolin	Período de maior circulação	Total de seqüências	Frequência de maior circulação	NSP6: S106del, G107del, F108del	28262: AACA	S: K417T	S: L452R	S: H69del, V70del	NSP1: K141del, S142del, F143del
<i>Principais linhagens circulantes no período</i>					<i>Frequência (%)</i>					
VOC Alfa	B.1.1.7	Mar/ 2021	1.163	0,042	96,68	0,00	0,00	0,00	96,89	0,00
VOC Beta	B.1.351	Mar/ 2021	12	0,001	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VOC Gama	P.1	Mai/ 2021	51.104	0,963	98,59	93,03	95,25	0,01	0,16	0,23
VOC Delta	AY.99.2	Nov/ 2021	41.468	0,984	0,00	0,13	0,00	99,82	0,14	0,33
	AY.47	Nov/ 2021	258	0,009	0,00	0,39	0,00	100,00	0,00	0,39
	B.1.617.2	Abr/ 2021	14	0,000	7,14	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00
VOC Ômicron	BA.1	Jan/ 2022	40.804	0,979	98,94	0,00	0,15	0,01	99,33	0,34
	BA.2	Abr/ 2022	11.212	0,781	97,86	0,00	0,05	0,23	1,02	0,78
	BA.4	Set/ 2022	4.508	0,194	98,77	0,00	0,00	99,91	98,87	98,34
	BA.5	Ago/ 2022	17.708	0,842	96,87	0,00	0,00	99,90	97,32	1,57
	BE.9	Out/ 2022	1.630	0,357	99,94	0,00	0,00	99,87	99,75	0,92
	BQ.1	Dez/ 2022	4.260	0,682	98,26	0,00	0,00	99,85	97,87	0,61

Designação OMS	Linagem Pangolin	Período de maior circulação	Total de seqüências	Frequência de maior circulação	NSP6: S106del, G107del, F108del	28262: AACA	S: K417T	S: L452R	S: H69del, V70del	NSP1: K141del, S142del, F143del
<i>Outras linhagens circulantes no período</i>					<i>Frequência (%)</i>					
-	B.1	Jan/2021	39	0,004	53,84	20,51	0,00	0,00	0,00	15,74
-	B.1.1	Dez/2020	4.793	0,888	1,06	0,04	0,06	6,09	0,13	0,23
-	B.1.1.1	Fev/2021	2	0,001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
-	B.1.177	Jan/2021	6	0,002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VOI Lambda	C37	Fev/2021	23	0,001	95,65	0,00	0,00	0,00	4,35	0,00
VOI Mu	B.1.621	Jul/2021	21	0,001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
VOC Ômicron	BA.2.12.1	Mai/2022	471	0,026	95,27	0,00	0,00	0,45	0,00	1,27
	BA.2.75	Out/2022	99	0,014	97,96	0,00	0,00	1,03	1,35	0,00
	XBB	Dez/2022	107	0,028	98,11	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87
	XBB.1.5	Dez/2022	1	0,003	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CH.1.1	Dez/2022	1	0,003	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00
	Recombinante		Mai/2022	222	0,015	99,09	0,00	0,00	3,70	3,60

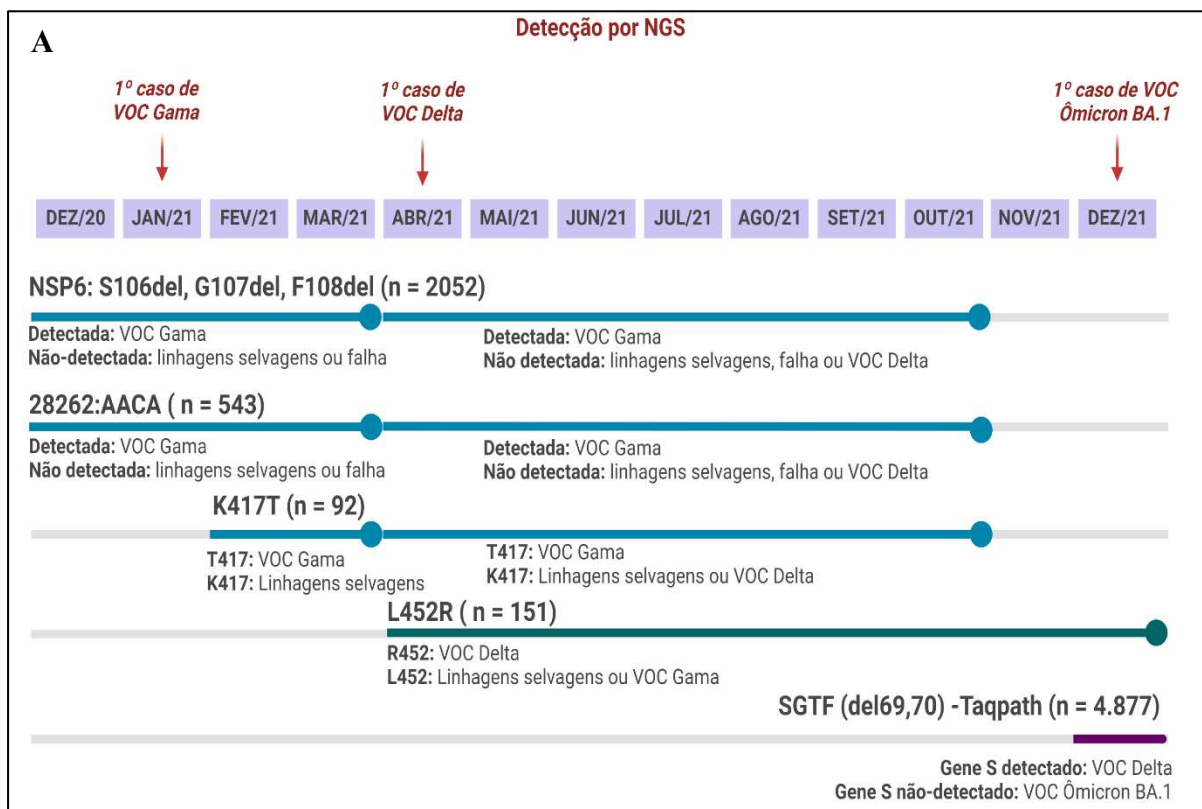
As sequências genômicas provenientes de amostras coletadas em Fortaleza (n = 4.352) foram utilizadas na construção de uma árvore filogenética que mapeasse a frequência das mutações definidoras de linhagem estudadas (Figura 11). A deleção de 9 nucleotídeos na proteína NSP6 (S106del, G107del, F108del) foi identificada em 99,0% das sequências de VOC Gama e em todas as sublinhagens de VOC Ômicron (97,6 – 100%), com exceção da sublinhagem BA.1. A inserção 28262: AACA e a mutação K417T foram detectadas em quase a totalidade das sequências de VOC Gama analisadas, estando presentes em apenas 0,3% das sequências de VOC Delta e 1,7% das sequências de VOI Zeta, respectivamente. A mutação L452R, por sua vez, foi identificada em 94,3% da VOC Delta e nas sublinhagens BA.4, BA.5, BE.9 e BQ.1 da VOC Ômicron (97,6 – 99,5%). A deleção S.del69-70 foi detectada nas sublinhagens BA.1, BA.4, BA.5, BE.9 e BQ.1 de VOC Ômicron (95.2 – 100%), com detecção em apenas 4,2% das sequências de BA.2. A deleção NSP6: K141del, S142del, F143del foi identificada em 96,8% das sequências de BA.4, com uma detecção inferior a 2% em outras variantes. Apenas um caso de VOC Alfa foi identificado na região por WGS durante o período de análise, também com a deleção em NSP6 (S106del, G107del, F108del) e a deleção S:Del69,70.

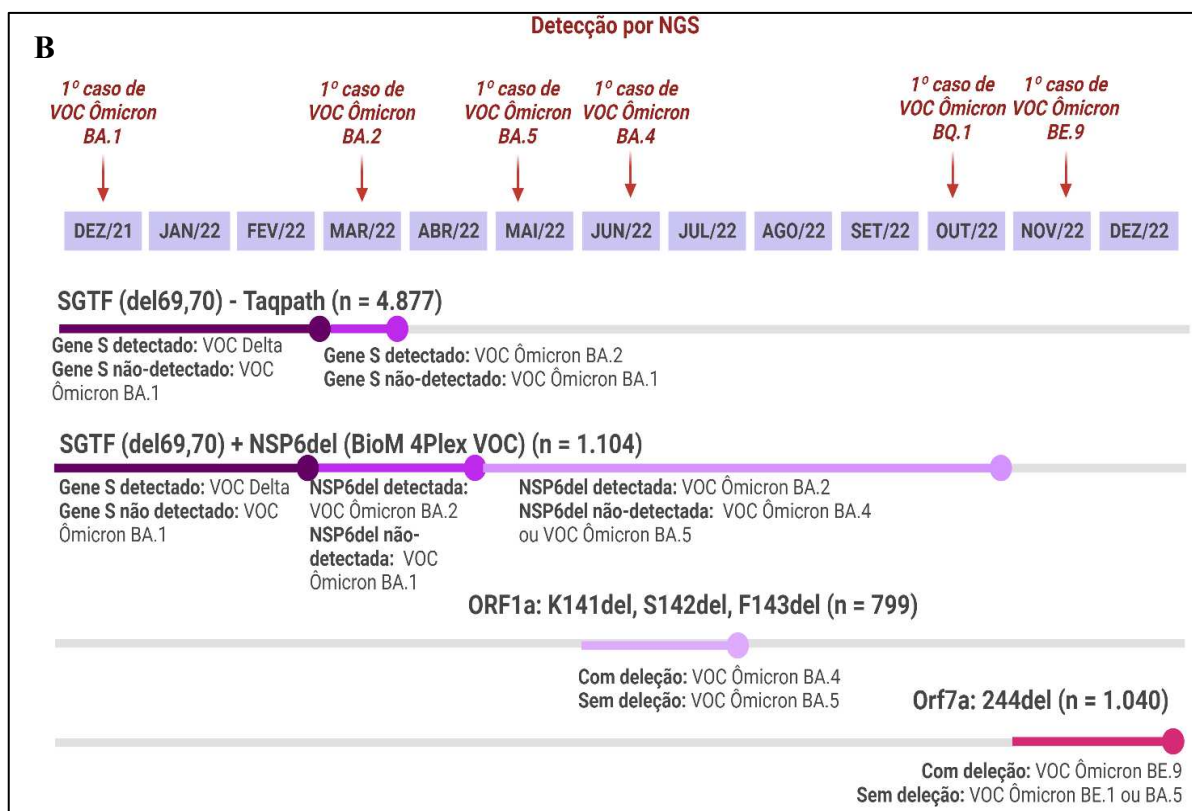
Figura 11- Árvore filogenética das linhagens de SARS-CoV-2 circulantes na cidade de Fortaleza no período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, estimados por sequenciamento do genoma completo e com sequências disponíveis no GISAID.



Com base na incidência distinta dessas assinaturas entre as linhagens e considerando os diferentes níveis e período de circulação das principais variantes no país, foi possível desenvolver estratégias baseadas na detecção destas mutações-alvo por RT-qPCR, por meio de ensaios comerciais ou customizados, para monitorar as principais VOCs com disseminação no período do estudo. Estas estratégias foram aplicadas em períodos específicos e com interpretação de resultados combinada com análises do panorama epidemiológico local por tecnologia de NGS, conforme delineado nas Figuras 12A e 11B.

Figura 12- Período de aplicação e interpretação de resultado de ensaios moleculares utilizados para monitoramento de variantes de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de (A) dezembro de 2020 a dezembro de 2021 e (B) dezembro de 2021 a dezembro de 2022.





5.1.2 Validação analítica dos ensaios

Após a definição das mutações-alvo, foi realizada uma análise temporal da aplicação dos ensaios de genotipagem em dois laboratórios de diagnóstico do SUS, utilizando o NGS como o método padrão-ouro para definição de linhagens filogenéticas. Os valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor preditivo Negativo estão expostos na Quadro 07. A comparação das 3.578 amostras de SARS-CoV-2 analisadas durante as sucessivas ondas pandêmicas com os dados de sequenciamento genômico revelou 3.507 amostras com resultados concordantes e 71 com resultados discordantes, com a maioria dessas discordâncias associadas ao ensaio SYBR ORF7a (36 amostras). Embora a análise de todas as sequências genômicas com resultados discordantes tenha confirmado o padrão de mutações característicos de suas linhagens, uma das amostras que havia sido classificada como “linhagem selvagem” pelo ensaio NSP6del9 e foi identificada como VOC Gama por NGS, não possuía a deleção NSP6: S106del, G107del, F108del.

Quadro 07- Validação analítica dos ensaios moleculares utilizados para monitoramento de variantes de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2022 em relação ao padrão-ouro (NGS).

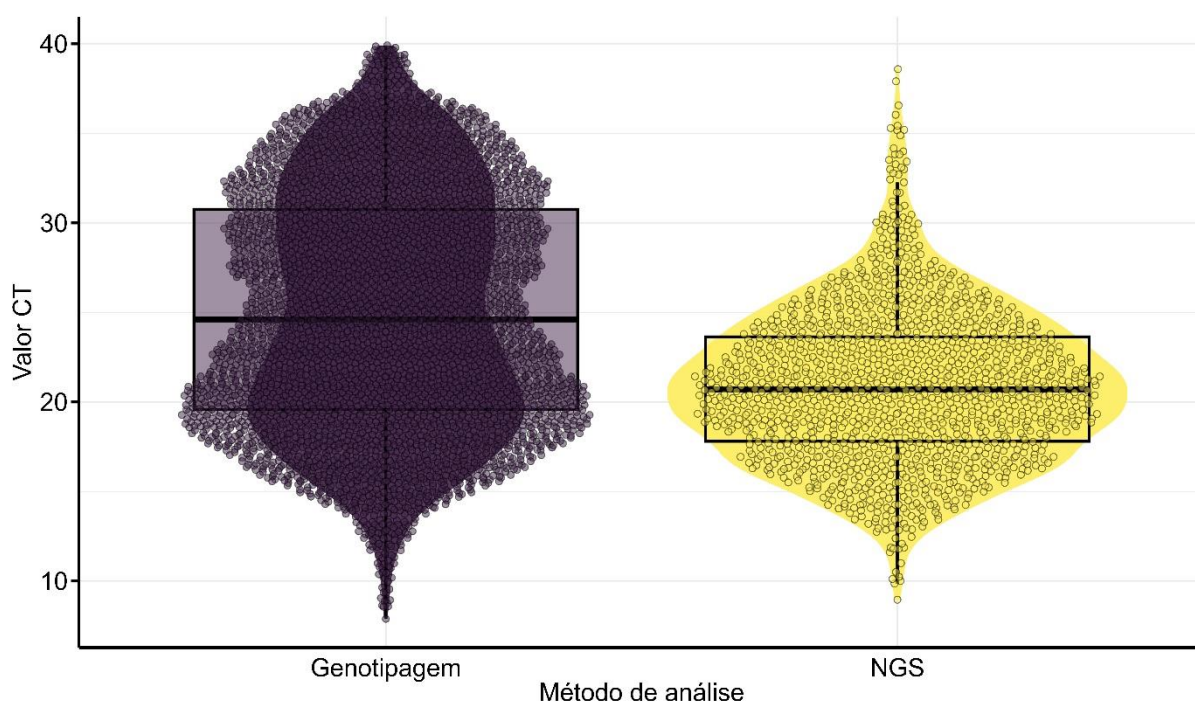
Alvo molecular	Nome ensaio	Sensibilidade	Especificidade	Precisão	VPP	VPN	Concordância com NGS (%)
NSP6: S106del, G107del, F108del	NSP6del9	99,5 (98,3-99,9)	100,0 (85,7-100,0)	100,0 (85,7-100,0)	100,0 (99,1-100,0)	92,0 (75,1-97,8)	99,60 (n = 451)
28262:AACA	Ins4	96,8 (93,1-98,5)	97,3 (93,3-99,0)	96,4 (93,5-98,0)	97,8 (94,5-99,1)	96,0 (91,6-98,1)	97,30 (n = 334)
S: K417T	K417T	100,0 (64,6-100,0)	100,0 (80,6-100,0)	100,0 (85,7-100,0)	100,0 (64,6-100,0)	100,0 (80,6-100,0)	100,0 (n = 25)
S: L452R	L452R	100,0 (96,6-100,0)	100,0 (82,4-100,0)	100,0 (97,04-100,0)	100,0 (96,6-100,0)	100,0 (82,4-100,0)	100,0 (n = 126)
S: H69del, V70del	SGTF	98,67 (92,8-99,8)	98,47 (97,4-99,1)	98,48 (97,5-99,1)	84,09 (75,0-90,3)	99,89 (99,4-99,9)	98,50 (n = 988)
S: H69del, V70del + NSP6: S106del, G107del, F108del	BioM 4Plex VOC	100,0 (99,3-100,0)	100,0 (99,3-100,0)	100,0 (99,7-100,0)	99,5 (99,3-100,0)	100,0 (99,3-100,0)	100,0 (n = 520)
NSP1: K141del, S142del, F143del	NSP1del9	98,69 (95,4-99,6)	98,42 (96,7-99,2)	98,49 (97,1-99,2)	95,57 (91,1-97,8)	99,54 (98,4-99,9)	98,50 (n = 595)
ORF7a: 244del	ORF7a del244	99,56 (97,5-99,9)	88,89 (84,9-91,9)	93,35 (90,9-95,1)	86,54 (81,8-90,2)	99,64 (98,0-99,9)	93,40 (n = 541)

5.1.3 Distribuição do valor CT das amostras analisadas pelos dois métodos de vigilância

A distribuição do valor CT obtido no diagnóstico de COVID-19 por RT-qPCR de amostras de swab nasofaringe com resultados conclusivos gerados por pelo menos um dos métodos de investigação utilizados está representado na Figura 13. A mediana dos valores de CT para amostras analisadas por genotipagem foi de $23,1 \pm 6,4$, enquanto para amostras analisadas por NGS foi de $20,7 \pm 4,3$. Em relação as amostras com carga viral baixa ou

moderada (estimada por valor CT ≥ 27), estas representam 33,2% (1.883/5.673) das análises realizadas pelo método de genotipagem e 7,2% (97/1.339) das análises realizadas por NGS.

Figura 13- Distribuição de valores CT obtido por RT-qPCR para diagnóstico de COVID-19 em uma parcela de amostras com resultados conclusivos para vigilância genômica de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza no período de dezembro de 2021 a dezembro de 2022 (n = 5.693/9.896) segmentado por método de análise.



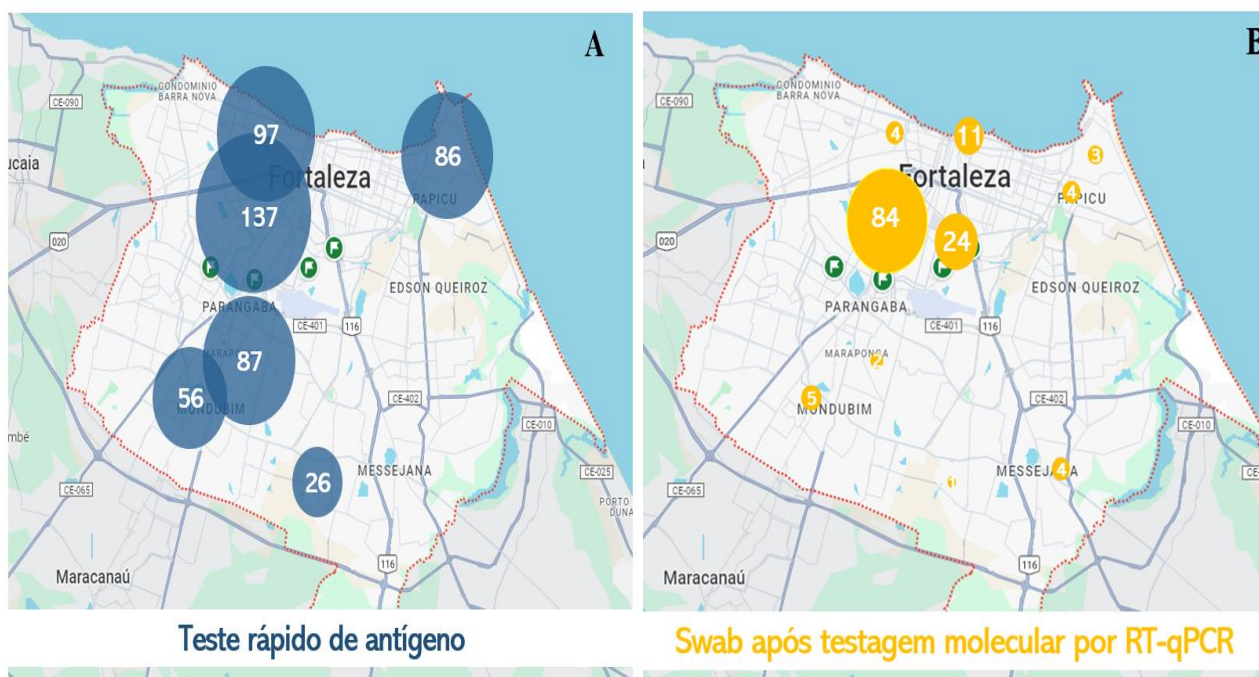
5.2 Viabilidade metodológica no aproveitamento de amostras de teste rápido para o fortalecimento da vigilância laboratorial e genômica de SARS-CoV-2

5.2.1 Obtenção de amostras clínicas positivas de SARS-CoV-2 por teste rápido

Visando o aumento da representatividade da vigilância genômica em Fortaleza em um período de surto de casos de COVID-19 associado a um baixo número de diagnósticos realizados por RT-qPCR, entre a S.E. 47 de 2022 (início em 22/11/2022) até a S.E. 52 de 2022 (final em 30/12/2022), houve o estabelecimento de parcerias com as Unidades de Atenção Primária à Saúde (UAPS) integrantes da Rede Sentinela de Fortaleza, o que permitiu a captação de amostras remanescentes de testes rápidos com resultado reagente para SARS-CoV-2 coletadas no município. No total, 489 amostras de TR foram encaminhadas no período de estudo, o que representa um aumento de 3.4x na captação de amostras de swab de nasofaringes

após testagem molecular encaminhadas por laboratórios parceiros (n = 142). A distribuição geográfica de cada unidade de saúde responsável pelo envio das amostras está representada na Figura 14. Das 489 amostras recebidas, 347 atenderam aos critérios de elegibilidade para inclusão no estudo, enquanto o restante não foi incluído devido a problemas de conservação inadequada durante o envio, informações faltantes ou problemas no processamento da amostra.

Figura 14- Distribuição geográfica do quantitativo de amostras recebidas entre a S.E. 47 e 52 de 2022 divididas por (A) teste rápido de antígeno e (B) swab nasofaríngeo para RT-qPCR

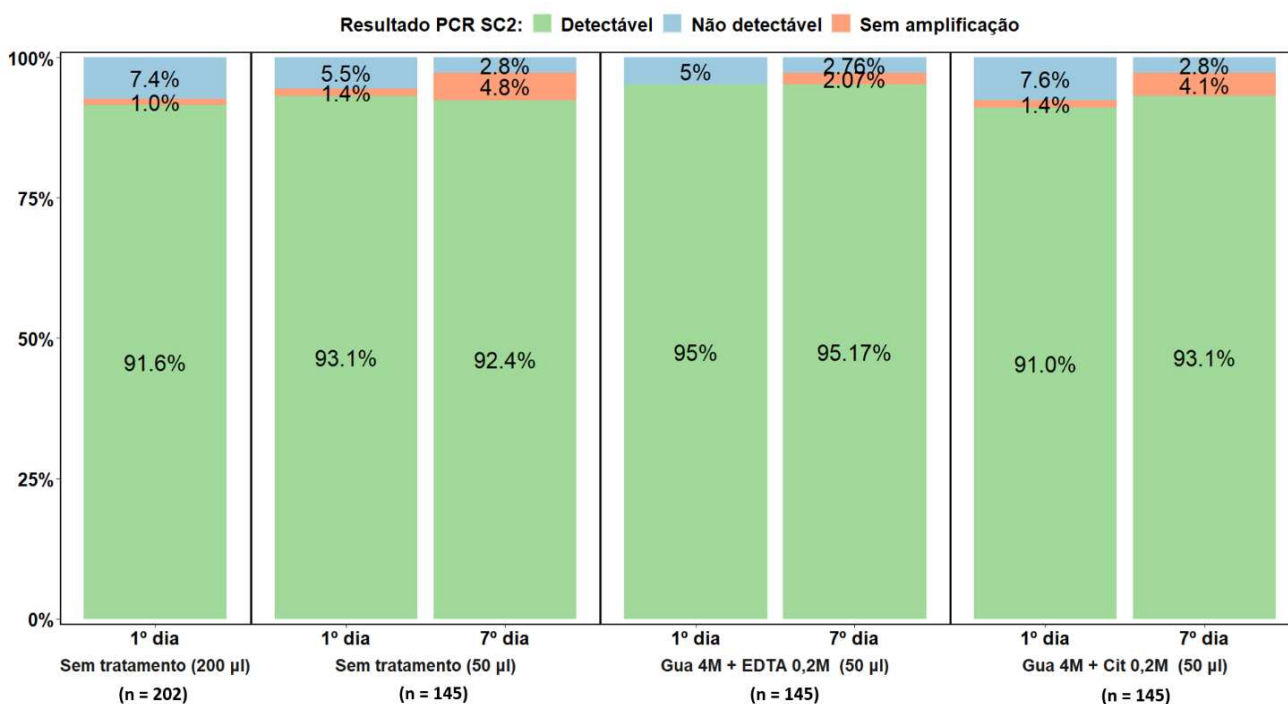


5.2.2 Isolamento do material genético viral de SARS-CoV-2

Com o intuito de avaliar a viabilidade da obtenção do material genético do SARS-CoV-2 em amostras de TR, assim como investigar a influência de variáveis como volume de extração, tempo de conservação e a necessidade da suplementação de soluções de conservação, as amostras foram subdivididas em grupos que foram submetidos a um processo de extração do material genético, seguido de avaliação por RT-qPCR. Enquanto o grupo controle (n = 202) foi submetido à extração utilizando um volume padrão de 200 µl e um tempo de conservação padrão, 1 dia após a data de recebimento, o segundo conjunto de amostras (n = 145) foi subdividido em alíquotas de 50 µl, formando seis grupos pareados que foram submetidos a diferentes condições de conservação.

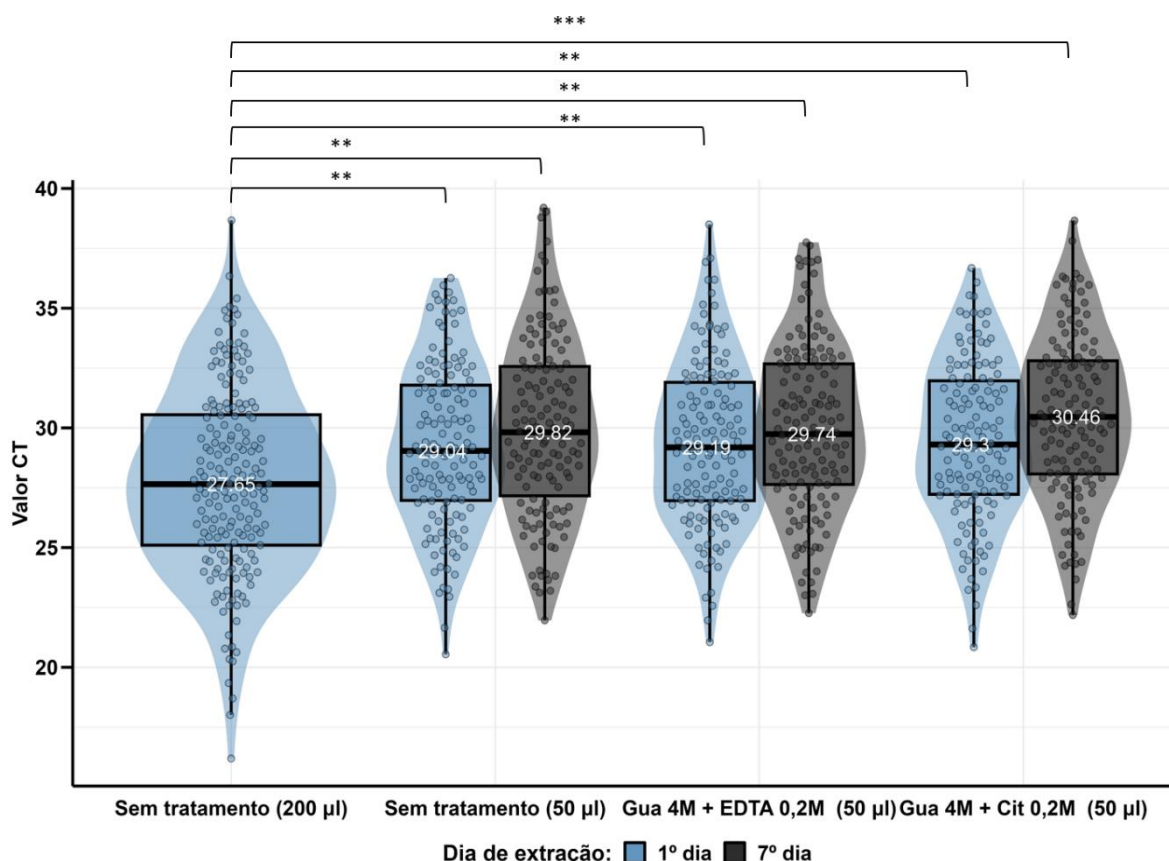
Foi possível recuperar o material genético viral de SARS-CoV-2 em 93,0% das alíquotas de amostras de TR extraídas e analisadas por RT-qPCR (997/1072). Adicionalmente, 4,9% das alíquotas (53/1072) apresentaram resultado não detectável para o SARS-CoV-2, com amplificação do controle interno humano, e 1,0% das alíquotas (11/1072) não apresentaram amplificação para nenhum dos alvos, humanos ou virais, avaliados. Os resultados específicos para cada condição de processamento estão expostos na Figura 15. Apesar de a extração com um volume de 50 µl em amostras contendo solução de conservação com Guanidina 4M e EDTA 0,2M ter apresentado uma taxa de recuperação mais elevada (95%) em ambos os períodos de conservação, não houve diferenças estatísticas significantes da proporção de amostras de TR com resultado detectável para SARS-CoV-2 em relação ao volume de extração (*p-value* = 0,124), solução-tampão utilizada (*p-value* = 0,204) ou tempo de conservação (*p-value* = 1,00).

Figura 15- Frequência da recuperação do material genético de SARS-CoV-2 avaliada por RT-qPCR em amostras de TR após extração em diferentes condições de processamento e conservação



A distribuição dos valores CTs e a mediana de cada grupo está representada na Figura 16. Enquanto o grupo controle apresentou uma distribuição de valores CTs com mediana de 27,6, os demais grupos apresentaram medianas variando entre 29,0 a 30,5. Não houve diferença estatística entre os grupos extraídos com 50 µl e conservados em solução tampão, no entanto, houve diferença estatística entre esses grupos e o controle.

Figura 16- Distribuição dos valores CT em cada condição de tratamento



5.2.3 Sequenciamento de SARS-CoV-2 a partir de amostras de TR e análises por bioinformática

Das 371 alíquotas de TR sequenciadas, 347 atenderam aos critérios mínimos de qualidade para a definição da linhagem viral (cobertura horizontal $5x \geq 90$; profundidade ≥ 100 ; e qualidade do alinhamento “bom” ou “mediocre”), representando uma taxa de sucesso da técnica em 93,5% das amostras analisadas. Os resultados por grupo estão representados na Quadro 08. Não houve diferenças estatísticas significativas do quantitativo de amostras com linhagem definida em relação ao tampão de conservação ($p\text{-value} = 0,14$), volume de extração ($p\text{-value} = 0,64$), tempo de conservação ($p\text{-value} = 1,00$) ou Valor CT até 30 ($p\text{-value} = 0,17$). O quantitativo de amostras com valor CT > 30 analisadas por WGS não foi o suficiente para a

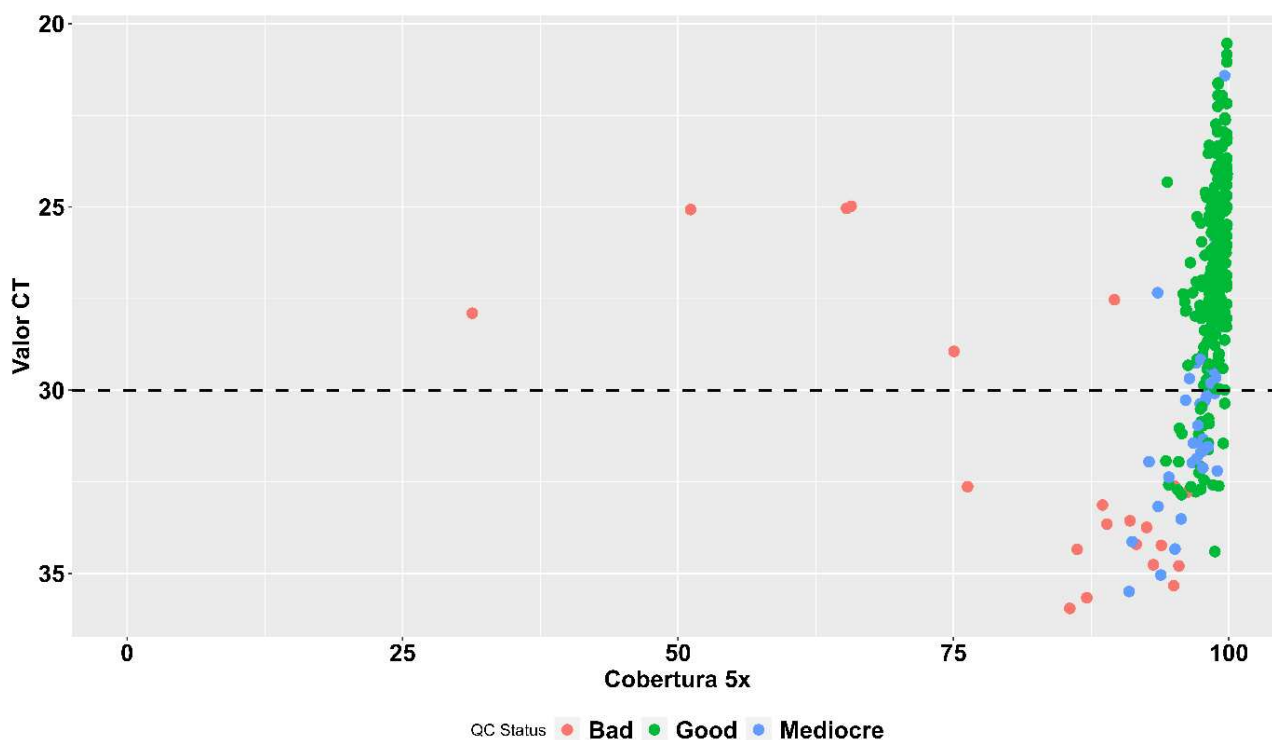
condução das análises estatísticas necessárias para interpretação dos resultados (dados não mostrados).

Quadro 08- Quantitativo de amostras de TR com linhagem definida por meio de NGS, segmentado por condição de tratamento e valor CT

Valor CT	Tratamento	Volume de extração (µL)	1º dia pós-recebimento	7º dia pós-recebimento
			Linhagens definidas por NGS (%)	
CT ≤ 25	Sem tratamento	200	95,0 (n=20)	N/A
	Sem tratamento	50	100 (n = 14)	85,7 (n=7)
	Gua 4M + EDTA 0,2M	50	100,0 (n = 13)	100,0 (n = 8)
	Gua 4M + Cit 0,2M	50	100,0 (n = 13)	100,0 (n = 8)
25 < CT ≤ 30	Sem tratamento	200	85,7 (n = 42)	N/A
	Sem tratamento	50	92,9 (n = 42)	91,3 (n=23)
	Gua 4M + EDTA 0,2M	50	97,3 (n = 37)	95,5 (n = 22)
	Gua 4M + Cit 0,2M	50	94,3 (n = 35)	95,2 (n = 21)

Os parâmetros de qualidade em relação ao valor CT das sequências geradas em plataforma Illumina NextSeq estão representados na Figura 17. Dentre as amostras sequenciadas, 80,4% (n = 242/301) apresentaram *status* de controle de qualidade “*Good*”, 12,6% (n = 38/301) apresentaram *status* “*Mediocre*” e 7,0% (n = 21/301) apresentaram o *status* “*Bad*”. Em relação a cobertura, 96,0% (n = 289/301) das amostras apresentaram cobertura horizontal 5x > 90, com apenas 4,0% (n = 12/301) das amostras apresentando cobertura horizontal ≤ 90. Com o aumento do valor CT e, conseqüentemente, diminuição da carga viral estimada, houve uma diminuição desses parâmetros, mas muitas amostras ainda apresentaram resultados satisfatórios.

Figura 17- Distribuição dos valores CT em cada condição de tratamento em amostras de TR sequenciadas em Illumina NextSeq2000

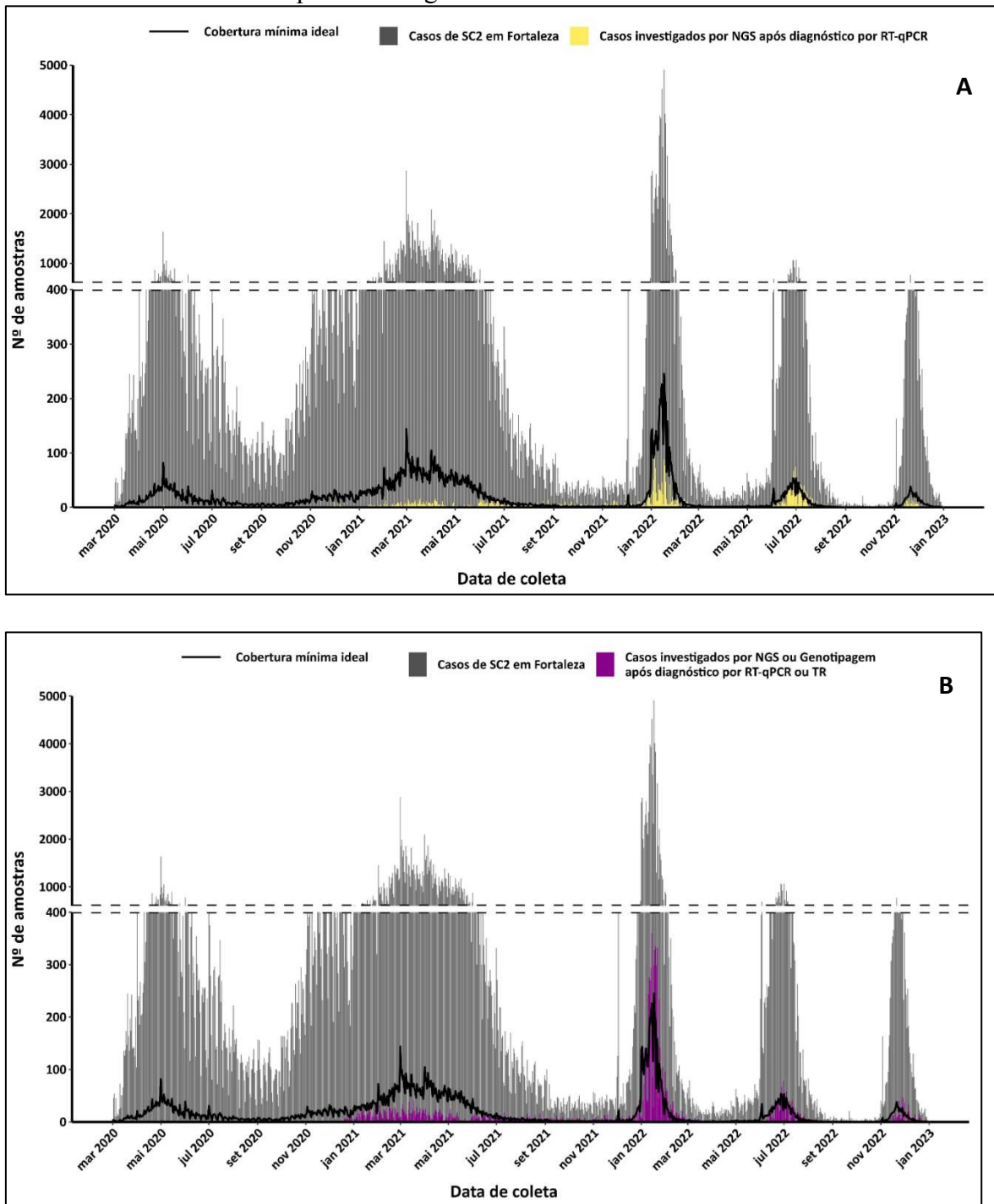


5.3 Vigilância genômica de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza-CE

5.3.1 Incremento na amostragem de casos para Vigilância Genômica

Até dezembro de 2022, a plataforma IntegraSUS registrou um total de 387.291 casos de COVID-19 em Fortaleza. Destes, 81,0% ($n = 313.889/387.291$) ocorreram durante o intervalo compreendido entre dezembro de 2020 e dezembro de 2022, período em que esta pesquisa foi conduzida. De acordo com dados disponíveis no GISAID, apenas 29 casos de COVID-19 notificados em Fortaleza até novembro de 2020 foram sequenciados, enquanto 4.253 foram sequenciados durante o período deste estudo, dos quais 89,8% ($n = 3.819/4.253$) foram realizadas como parte deste trabalho. A quantidade de amostras analisadas por sequenciamento completo do genoma (WGS) de swabs nasofaríngeos, após diagnóstico molecular, em relação ao número total de casos e à cobertura mínima ideal de 5% dos casos (conforme modelo proposto por Vavrek e colaboradores em 2021, é ilustrada na Figura 18A. O incremento amostral realizado pelas estratégias de genotipagem molecular e utilização de testes rápidos de antígeno é demonstrado na Figura 18B.

Figura 18- Quantitativo de amostras de SARS-CoV-2 analisadas de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, por: A) Sequenciamento de Nova Geração; B) genotipagem molecular de amostras de swab e teste rápido de antígeno.



O total de casos de COVID-19 avaliados por técnicas de WGS pelos órgãos de vigilância genômica de Fortaleza em amostras de swab nasofaríngeo após diagnóstico molecular, correspondem a 0,98% do total. A complementação dos resultados com as investigações realizadas pelo método de genotipagem molecular e pela utilização de amostras

de teste rápido de antígenos possibilitou a análise de 2,86% do total de casos. A cobertura por método de investigação variou de acordo com o período de análise (Quadro 09)

Quadro 09- Cobertura da vigilância genômica de Fortaleza por período e por estratégia utilizada.

Período	Meses	Total de casos em Fortaleza	WGS de amostras em MTV	WGS ou genotipagem em amostras de MTV ou TR
1ª onda*	Jan/20 a Nov/20	85.388	0,03% (n = 29)	0,03% (n = 29)
2ª onda	Dez/20 a Jul/21	168.837	0,6% (n = 982)	1,5% (n = 2.562)
-	Ago/21 a Nov/21	5.519	8,6% (n=474)	10,4% (n=574)
3ª onda	Dez/21 a Mar/22	87.556	1,5% (n = 1.312)	6,3% (n = 5.554)
-	Abr/22 a Jun/22	17.132	3,5% (n = 604)	3,9% (n = 664)
Surto de casos (provável 4ª onda)	Jul/22 a Ago/22	10.958	5,5% (n = 605)	5,6% (n = 620)
-	Set/22 a Out/22	259	3,5% (n = 9)	3,5% (n = 9)
Surto de casos** (provável 5ª onda)	Nov a Dez/22	11.642	1,8% (n=208)	10,3% (n=1.205)

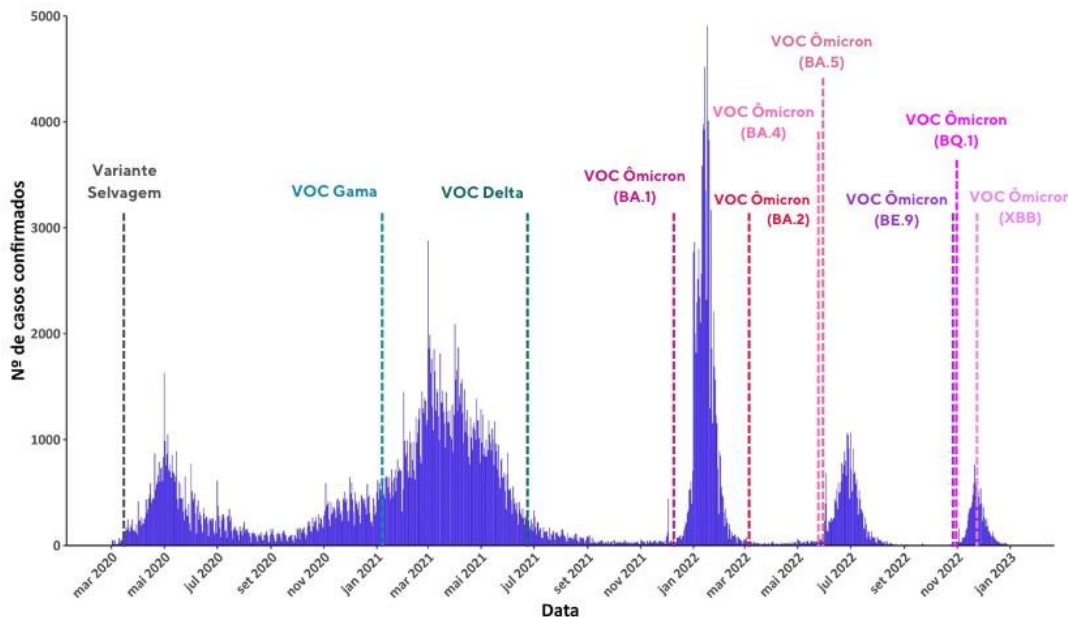
*Período anterior à realização do estudo

** Período com utilização simultânea de ensaios de genotipagem molecular e amostras de TR

5.3.2 Cenário epidemiológico de Fortaleza

Dados obtidos por WGS possibilitaram a identificação dos casos iniciais da VOC Gama em Fortaleza em janeiro de 2021, da VOC Delta em julho de 2021 e da VOC Ômicron (sublinhagem BA.1) em dezembro de 2021. Em 2022, o cenário epidemiológico foi marcado pela circulação de diferentes sublinhagens da VOC Ômicron, com os casos iniciais da sublinhagem BA.2 detectados em março, da BA.4 e BA.5 em maio, BE.9 e BQ.1 em outubro e XBB em novembro (Figura 19).

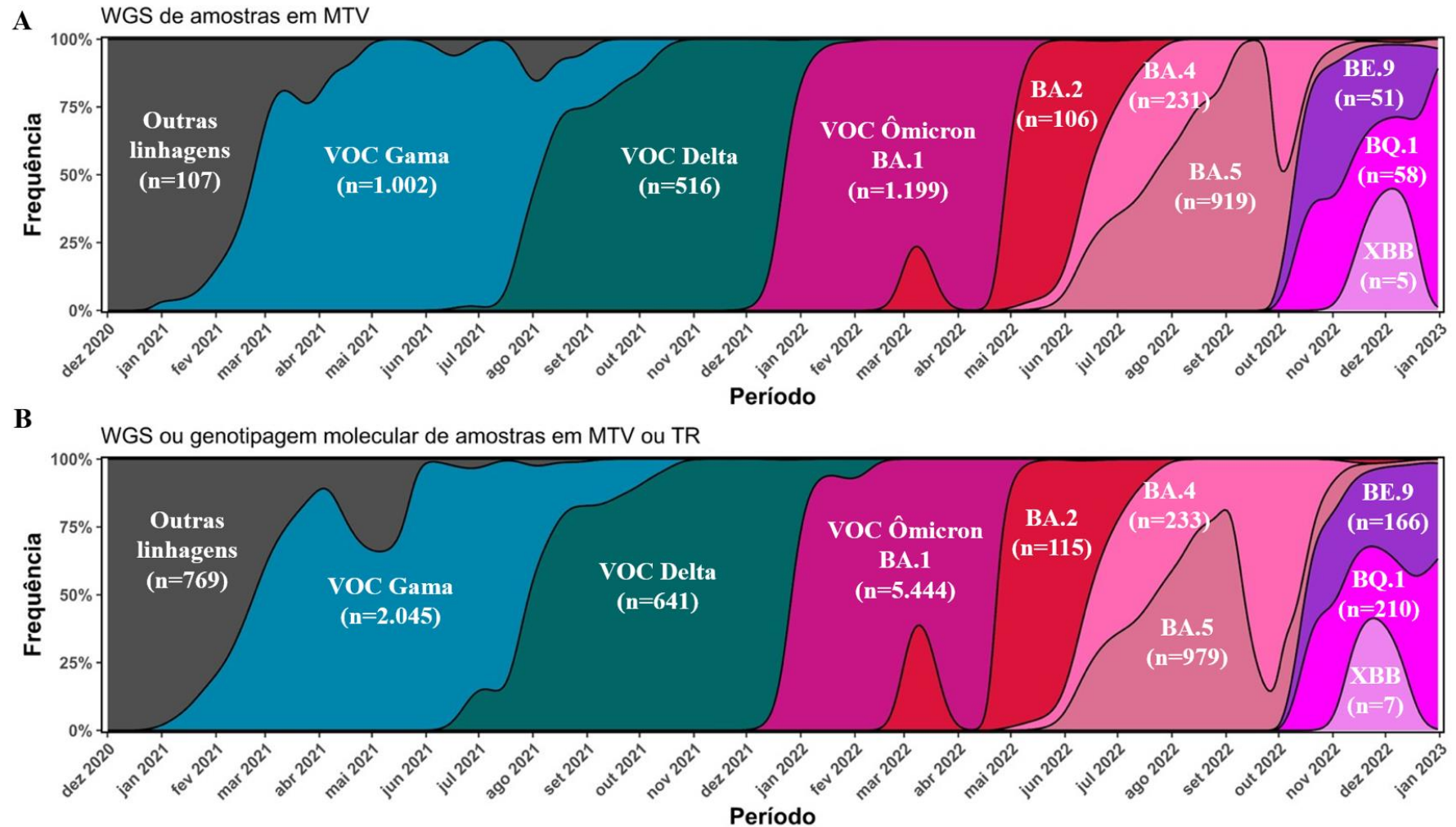
Figura 19-Número de casos de COVID-19 em Fortaleza notificados no IntegraSUS em relação a data de detecção por WGS de novas variantes de SARS-CoV-2 na cidade.



O período posterior à detecção de uma nova variante de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza, por vezes, esteve associado ao aumento abrupto no quantitativo de casos de COVID-19 e ao início de uma nova onda pandêmica (Figura 19). A introdução das primeiras linhagens do vírus desencadeou a primeira onda, atingindo seu pico máximo com 1.653 casos diários em março de 2020. A segunda onda pandêmica ocorreu após a introdução da VOC Gama, em janeiro de 2021, com um pico de 2.878 casos diários. A detecção subsequente da VOC Delta não resultou em um aumento significativo no número de casos, mas a terceira onda pandêmica emergiu de maneira acentuada após a identificação da VOC Ômicron, em dezembro de 2021, atingindo o máximo de 4.909 casos diários. Em 2022, enquanto a detecção da VOC Ômicron BA.2 no início do ano não se associou a um aumento notável de casos, ocorreram dois surtos de COVID-19, o primeiro após a detecção da circulação das VOC Ômicron BA.4 e BA.5, seguido por outro surto após a detecção da circulação das VOC Ômicron BE.9 e BQ.1.

Os resultados obtidos por análises de WGS, associados aos resultados obtidos por ensaios de genotipagem molecular e pelo incremento no número de amostras com TR, permitiram a estimativa da frequência de circulação de variantes de SC2 na cidade de Fortaleza com um maior número de casos investigados (Figura 20). Apesar do padrão de resultados ser similar entre ambas as estratégias, o aumento do quantitativo de casos analisados permitiu estimar, de forma mais robusta, a frequência de circulação de linhagens de SARS-Cov-2 em Fortaleza. Isso é observado, sobretudo, em períodos iniciais da introdução e expansão de uma nova variante (como VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron BA.2).

Figura 20- Frequência de circulação de variantes de SARS-CoV-2 em Fortaleza no período de dezembro de 2020 a dezembro de 2022, estimados por: (A) WGS de amostras de swab nasofaríngeo após testagem molecular; (B) WGS ou genotipagem de amostras de swab nasofaríngeo após testagem molecular ou de TR de antígeno



A primeira variante de preocupação detectada na cidade foi a VOC Gama. Rapidamente, essa variante se tornou predominante no país e ocasionou em mudanças no perfil epidemiológico da COVID-19, por estar associada ao aumento do número de casos graves e óbitos (Banho *et al.*, 2022). A alta transmissibilidade da VOC Gama estava associada com o aumento da carga viral desta variante, estimada em cerca de 10 vezes maior do que a de pacientes infectados pelas linhagens virais iniciais (Naveca *et al.*, 2021). Essa variante foi responsável pelo maior número de óbitos por COVID-19 no país, com o pico diário registrado em 10 de abril de 2021, com 4.249 mortes (OMS, 2023).

Apesar da alta transmissibilidade da VOC Gama, essa variante co-circulou com outras linhagens de SARS-CoV-2, sobretudo, com a VOI P.2, até que ambas foram substituídas pela VOC Delta, que se tornou a variante prevalente até o início de dezembro de 2021. Mesmo a VOC Delta sendo mais transmissível que as variantes anteriores, houve uma diminuição significativa dos números de infecções e do número de óbitos no país e em Fortaleza, o que foi associado a cobertura vacinal do país e ao alto nível de exposição da população à VOC Gama (Giovanetti *et al.*, 2022).

A 3ª onda pandêmica, caracterizada por um alto pico de casos, foi associada a emergência da VOC Ômicron (sublinhagem BA.1). Estudos associam a alta transmissibilidade da VOC Ômicron com o aumento da eficiência de replicação viral nos brônquios humanos (Hui *et al.*, 2022), de forma que a linhagem parental da VOC Ômicron é entre três a seis vezes mais infecciosa que a VOC Delta, e possui uma replicação viral ainda mais eficiente, o que resultou em sua rápida expansão e prevalência global (Callaway; Ledford, 2021).

Subsequentemente, em 2022, a emergência e co-circulação de sublinhagens da VOC Ômicron começou a ocorrer e é o que marca o cenário epidemiológico até os dias atuais. Devido a maior transmissibilidade, essas variantes foram capazes de se tornarem prevalentes em diversos países, ocasionando surtos de casos, como o Brasil, e novas ondas epidêmicas, como na África do Sul (Tegally *et al.*, 2022). A alta transmissibilidade destas linhagens, associada a essa baixa letalidade de casos indica que estas estão mais adaptadas que às variantes anteriores, caminhando para uma forma endêmica de circulação.

6 DISCUSSÃO

Vigilância genômica integrada com ensaios de genotipagem de alvos dirigidos

A vigilância genômica permite não tão somente gerar uma substancial base de conhecimentos ao confirmar agentes etiológicos associados com um determinado quadro infeccioso, mas também investigar, de forma inequívoca, assinaturas moleculares e monitorar a população viral circulante durante um surto, o que é particularmente relevante para implementação de medidas de intervenção não-farmacológica e orientação de políticas de saúde no enfrentamento de agravos de potencial epidêmico e pandêmico. Ao propiciar a realização de investigações minuciosas a nível molecular do genoma de patógenos, a vigilância genômica baseada em WGS é considerada uma área de fronteira ao também possibilitar a detecção precoce de mutações que podem estar associados à emergência e expansão de novas linhagens filogenéticas, concomitante ao monitoramento de variantes associadas à pressão seletiva decorrentes de evasão imunológica (escape vacinal) ou resistência a antimicrobianos.

Apesar das inúmeras vantagens advindas da introdução de tecnologias inovadoras baseadas em WGS, a necessidade de equipamentos e insumos de alto custo, requisitos rigorosos de qualidade amostral combinados com a necessidade de mão-de-obra e análises computacionais bastante especializadas, evidenciam o fato que as técnicas baseadas em sequenciamento são ainda de difícil implementação e descentralização. Consequentemente a investigação de casos fica limitada a apenas uma pequena fração do número total circulante e ainda restringindo a grandes centros ou locais com recursos financeiros e profissionais especializados, distantes da realidade de muitas localidades afetadas pela pandemia da COVID-19. Como reflexo da heterogeneidade de estratégias de vigilância genômica entre países, a representatividade dos genomas gerados mostra um viés em direção a um conjunto restrito de países com maior recurso financeiro e que possuem uma capacidade significativamente mais elevada de sequenciamento, o que pode influenciar no tempo de resposta após o rastreamento do surgimento de novas mutações de interesse e/ou variantes (Chen *et al.*, 2022; Munnink *et al.*, 2021).

A contínua evolução viral do SARS-CoV-2 e de outros patógenos de potencial epidêmico/pandêmico, como a Influenza, evidenciam a necessidade do contínuo desenvolvimento de soluções que visem o fortalecimento dos sistemas de vigilância em saúde do mundo de forma igualitária. Além da manutenção das estruturas existentes, o planejamento deve contemplar o aprimoramento de ações que possam ser implementadas de forma célere e

eficaz para o enfrentamento de futuros surtos e emergências sanitárias. Para tanto, uma agenda de preparo e antecipação em vigilância genômica viral deve garantir minimamente a ampliação do quantitativo de amostras triadas e analisadas para obtenção de máxima representatividade, balanceando-se de forma racional abordagens metodológicas que sejam ao mesmo tempo: i) custo-efetivas; ii) aplicáveis a amostras de variada carga viral; iii) compatíveis com as principais fontes de amostras biológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial dos agravos em questão; e iv) viáveis para integração com os sistemas das unidades de saúde (atenção primária e hospitais), laboratórios de diagnóstico e centros de vigilância regionais. Em suma, uma abordagem efetiva de vigilância genômica não se restringe necessariamente a técnicas baseadas em WGS, mas sim a uma integração inteligente com metodologias convencionais de fácil descentralização, especialmente de ensaios de RT-qPCR dirigidos a assinaturas moleculares das variantes virais monitoradas.

Para viabilizar-se a investigação pontual e representativa das linhagens circulantes de SARS-CoV-2 de maior relevância sanitária no Brasil, foram criteriosamente selecionadas assinaturas moleculares consideradas sinapomórficas (linhagens específicas) e que pudessem ser utilizadas como alvos genômicos para rastreamento de variantes emergentes através da genotipagem molecular. Para tanto, realizou-se consultas regulares a bases de dados genômicos públicas de SARS-CoV-2 durante todo o estudo, além de atualizações baseadas nas próprias sequências genômicas geradas pelo próprio estudo (Quadro 06 e Figura 11). Em conformidade com as orientações da OMS preconizando a vigilância extensiva de VOCs, e considerando-se os altos níveis de circulação nacional das VOCs de SARS-CoV-2 a partir de 2021 e conseqüente impacto epidemiológico no cenário global, a priorização de alvos genômicos de VOCs para a introdução de ensaios dirigidos, constituiu em uma importante estratégia de expansão de testagens para rastreamento de variantes em expansão (OMS, 2023).

Desta forma, o mapeamento consistente de assinaturas moleculares características de genomas de SARS-CoV-2 circulantes no Brasil, permitiu a seleção criteriosa das regiões-alvos utilizadas para elaboração de ensaios de genotipagem molecular para a inferência das principais variantes circulantes no país durante o período deste estudo (VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron, sublinhagens BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, BQ.1 e BE.9). Para o desenho racional dos ensaios de detecção de VOCs de escolha, foi considerada a frequência consistente das mutações-alvo escolhidas em contraste com a ausência completa ou relativa das mesmas em linhagens alternativas circulantes no mesmo período, os quais ratificaram o elevado potencial

discriminatório dos ensaios utilizados. Adicionalmente, a convergência de alterações genéticas em variantes que emergiram de forma independente, geograficamente e temporalmente, denota que ensaios moleculares previamente desenvolvidos e validados podem ser subsequentemente reposicionados, mesmo que as linhagens iniciais, para as quais os ensaios foram originalmente customizados, deixassem de circular. Citam-se como exemplos: a deleção de 9 bases do gene que codifica a NSP6: S106del/G107del/F108del (presente em VOCs Alfa, Beta, Gama e Ômicron); e a deleção de 6 bases no domínio NTD do gene que codifica a proteína Spike: H69del/V70del (presente em VOC Alfa e em VOC Ômicron sublinhagens BA.1/BA.4/BA.5). O mapeamento e verificação de mutações consideradas discriminatórias das variantes de estudo a partir de genomas de SARS-CoV-2 gerados de amostras coletadas na região de Fortaleza, conforme esperado, seguiu um padrão de frequência e distribuição equivalente aos encontrados no Brasil.

Após a definição criteriosa dos alvos moleculares, oito ensaios de genotipagem foram customizados ou adquiridos, comparativamente analisados e validados durante os sucessivos ciclos pandêmicos em comparação aos dados equivalentes gerados por NGS, considerados padrão-ouro para definição de linhagens filogenéticas. O quantitativo de amostras utilizados na validação de cada ensaio variou de acordo com o fluxo amostral e a incidência de casos de COVID-19 para os períodos avaliados, além da disponibilidade orçamentária e de recursos técnicos para a realização dos NGS. Os resultados demonstram que os painéis de genotipagem molecular utilizados foram capazes de detectar com sensibilidade comparáveis aos ensaios diagnósticos, combinando especificidade para inferência das variantes de SARS-CoV-2 sob investigação para os períodos pretendidos. Além de apresentar altas taxas de concordância com o padrão-ouro após avaliação comparativa de 72 linhagens virais, o desempenho dos ensaios customizados foram equivalentes aos obtidos com ensaios comerciais. Reitera-se que a concordância dos resultados agregados obtidos com os ensaios de genotipagem *versus* NGS foram semelhantes aos reportados na literatura para os ensaios NSP6del9 (100% n=266), SGTF (99,3%, n=904) e BioM 4Plex VOC (99,2% n=1.568) (Fontana-Maurell *et al.*, 2023; McMillen *et al.*, 2022; Naveca *et al.*, 2021), o que evidencia a robustez da estratégia adotados por este trabalho e a reprodutibilidade metodológica.

A complementação racional de ensaios dirigidos com o monitoramento periódico do cenário epidemiológico das variantes circulantes por meio de WGS, asseguraram a aplicabilidade e a utilidade investigativa dos ensaios moleculares selecionados dentro de um

contexto de aumento de representatividade e fortalecimento da vigilância genômica do SARS-CoV-2 durante dois anos críticos de ondas pandêmicas e significantes substituições de variantes na cidade de Fortaleza, que, de maneira geral, refletiu o cenário vivenciado à nível nacional. Por meio deste estudo, foi possível conceber e viabilizar um modelo de vigilância genômica mais responsivo e efetivo, com profundidade de informações e incremento de tamanho amostral sem precedentes na literatura (Quadro 04).

Neste estudo, a primeira variante circulante monitorada por ensaios de genotipagem molecular foi a VOC Gama, sobretudo pela necessidade urgente de rastreamento por ter se originado no país. Apesar da deleção de 9 nucleotídeos dentro do gene NSP6 (NSP6del9) ser uma característica molecular compartilhada com outras VOCs do período avaliado, Alfa e Beta, a baixa frequência observada dessas duas últimas variantes no território nacional (0,042% e 0,001%, respectivamente), possibilitou a rápida genotipagem deste marcador em que sua simples detecção na prática se traduziu em inferência causal da presença da VOC Gama. Estratégia similar foi adotada por Naveca *et al.* (2021) para estimar-se a trajetória temporal de expansão da variante Gama (à época denominada linhagem P.1) no estado do Amazonas desde sua emergência no final do ano de 2020.

Ensaio complementares para detecção de outras assinaturas genômicas da VOC Gama foram implementados para se assegurar maior especificidade no rastreamento utilizando-se como alvos a inserção 28262:AACA na região intergênica no final do genoma do SARS-CoV-2 e a mutação K417T dentro do gene que codifica a proteína Spike. Ao passo que os ensaios para rastreamento da NSP6del9 e para 28262:AACA ambos foram customizados para a identificação positiva através da amplificação desses alvos (infere-se que a ausência de amplificação se refere ao alelo de referência, ou forma selvagem), o ensaio comercial *Taqman Genotyping* K417T (*ThermoFisher Scientific*) é constituído de dupla-sonda que apesar do maior custo, permite aferir-se a amplificação individualizada de ambos os alelos (K417 e T417), este último característico da VOC Gama. Na prática a aplicação deste ensaio também possibilitou a confirmação de dois casos de coinfeção com linhagens virais distintas (P1 e P2), e que foram subsequentemente confirmadas por WGS (Dezordi *et al.*, 2022). Apesar do desempenho laboratorial dos três ensaios ter sido comparável, a utilização de ensaios de dupla-sonda propicia uma segurança adicional na análise e interpretação dos resultados do que os ensaios dirigidos somente para a presença dos alvos em questão, que potencialmente podem gerar resultados falso-negativos para a forma selvagem decorrentes de potenciais falhas de amplificação dos

ensaios se os mesmos não estiverem devidamente otimizados e controles/calibradores não forem utilizados.

Com o fim da circulação das linhagens não-VOC e a rápida expansão da VOC Delta com confirmação do primeiro caso regional por análise de WGS em meados de 2021, tornou-se necessário revisar a interpretação utilizada dos resultados de genotipagem molecular, em que o padrão de resultado “negativo para VOC Gama”, fosse contextualizado como “possível VOC Delta” em substituição de “possível linhagem selvagem”. Complementarmente, foi introduzido um novo ensaio para a detecção de uma mutação exclusiva da VOC Delta localizada dentro do gene que codifica a proteína Spike (L452R) e que coincidiu com um período de aparente estabilidade no número de notificações de casos da COVID-19. A posterior emergência e expansão global da VOC Ômicron (sublinhagem BA.1) e o pico epidêmico por ela ocasionado foi monitorado pelo rastreamento da deleção S: H69del, V70del contida nos ensaios comerciais multiplex TaqPath SARS-CoV-2 (ThermoFisher Scientific) - comumente denominado de SGTF devido à ausência de amplificação deste alvo, e BioM 4Plex VOC (Fiocruz Biomanguinhos) em que ao menos um dos alvos virais permanece conservado para fins de confirmação diagnóstica.

Com o desaparecimento da VOC Delta e a subsequente introdução da sublinhagem BA.2, que não contém a deleção S: H69del, V70del, e confirmação de sua circulação regional, uma nova revisão do padrão de interpretação de resultados foi requerida. A ausência da deleção de 6 nucleotídeos S: H69del, V70del deixou de ser interpretada como “possível VOC Delta” e passou a ser interpretada como “possível subvariante BA.2”, sem a necessidade de substituição dos ensaios existente. A posterior introdução e expansão das subvariantes BA.4 e BA.5 em meados de 2022, simplesmente foram adicionadas ao mesmo padrão de interpretação adotado para a subvariante BA.1 por possuírem as mesmas assinaturas moleculares genotipadas. Considerando que a BA.1 já não apresentava mais níveis de circulação basais no período de expansão supracitado destas novas sublinhagens, todos os resultados foram atribuídos às subvariantes BA.4 ou BA.5, complementados pela utilização de um ensaio específico para a diferenciação da BA.4 e direcionado a uma deleção de 9 nucleotídeos dentro do gene NSP1 (NSP1del9).

Com a posterior disseminação e predomínio das sublinhagens BQ.1 e BE.9 no último trimestre de 2022, ambas descendentes da BA.5 da VOC Ômicron, foi concebida e implementada uma estratégia de ensaio de genotipagem direta sem a utilização de marcação de

sondas em função da geração prévia de genomas completos e o conhecimento das assinaturas sinapomórficas estruturais. Ambas as sublinhagens apresentaram elevada similaridade e um conjunto expressivo de mutações convergentes, apesar de nitidamente possuírem origens independentes, crucialmente a sublinhagem BQ.1 proveniente de importação afro-européia, enquanto a BE.9 originária da Amazônia e que apresentaram grande expansão e co-circulação geográfica e temporal de forma heterogênea. Desta forma, um ensaio foi concebido para discriminação dessas duas sublinhagens, a partir do reposicionamento de um conjunto de oligonucleotídeos que originalmente compunham o painel de amplificação e construção das bibliotecas genômicas virais, cuja região alvo foi uma deleção de 244pb localizada no gene acessório ORF7a, detectável por curva de dissociação e presente somente na sublinhagem BE.9.

Essa escolha propiciou economia de tempo e de recursos financeiros, evitando-se o desenho e síntese de novos oligonucleotídeos e sondas, ao fazer uso de insumos pré-existentes para a obtenção de um ensaio customizado, praticamente em tempo real. No entanto, apesar da elevada sensibilidade do método desenvolvido, observou-se um valor inferior de especificidade (88,9) e concordância com a classificação obtida por WGS (93,4%) em relação aos demais ensaios testados. Tais resultados, embora satisfatórios, podem ser atribuídos à maior especificidade de detecção quando são empregadas uma segunda etapa de verificação por meio de sondas de hibridização com fluorescência quando comparadas com abordagens baseadas em oligonucleotídeos intercalados seguido de curvas de dissociação, mas que refletem em maior custo metodológico e retorno de resultados (Zhang *et al.*, 2013).

Ainda assim, ensaios direcionados de genotipagem baseados em assinaturas moleculares RT-qPCR possuem custos de implementação, computacional e analítico substancialmente inferiores aos realizados por NGS (Pinkhover *et al.*, 2022). Soma-se isso a dispensa de requisitos rigorosos de qualidade amostral e complexidade metodológica, que maximizem a quantidade e a representatividade de casos investigados com maior tolerância na variação de amplitude do coeficiente limiar de amplificação – valores CTs (Figura 13). Considerando que as VOCs de SARS-CoV-2 costumam possuir uma carga viral mais elevada, análises baseadas exclusivamente em NGS tendem a intrinsicamente apresentar um viés de seleção ao favorecer variantes de maior competência viral. Consequentemente, a vigilância genômica baseada unicamente em WGS expõe potenciais limitantes para o efetivo monitoramento do cenário epidemiológico a nível populacional (OMS, 2021a, 2023), além de indubitavelmente ser mais laborioso e delongado. Como consequência, ao incrementar-se a

representatividade das amostras, a integração analítica através de ferramentas de WGS com soluções de genotipagem direcionada constitui uma abordagem inovadora e mais robusta para a operacionalização de diligências de vigilância e monitoramento ativo da evolução da população viral dentro de um contexto epi-pandêmico. Ressalta-se, que este tipo de estratégia integrada requer avaliações contextualizadas e interdependentes de controle de qualidade e de interpretação de resultados, primariamente a partir de genomas de alta qualidade obtidos por WGS dentro da janela de investigação.

Inovações de resposta rápida baseadas no reaproveitamento amostral de testes rápidos de antígenos

Apesar do incremento amostral promovido pela utilização dos ensaios de genotipagem, desde o primeiro semestre de 2022 tem havido um decréscimo no nível geral de exames diagnósticos para SARS-CoV-2, com declínio significativamente mais acentuado da testagem molecular quando comparada à testagem imunocromatográfica (testes rápidos de antígenos). Isso tem culminado com uma drástica queda na cobertura das investigações genômicas no último trimestre de 2022, muito em função de uma significativa redução na adesão da população aos métodos tradicionais de coleta de swab nasofaríngeo para detecção molecular por RT-qPCR, que tem sido a fonte primária de amostras para triagem de vigilância genômica. Os últimos dois anos foram acompanhados por um aumento expressivo na utilização dos testes rápidos de antígeno no Brasil, especialmente a partir de 2022 (Figura 08).

Apesar do quantitativo de resultados notificados através de TR para o período ser inferior, correspondendo a pouco mais da metade do total de testes realizados por RT-qPCR, é possível assumir que o número absoluto real excede o número de exames moleculares realizados, visto que a notificação por esta modalidade frequentemente é negligenciada. Somase a isso a disponibilização nesse mesmo período da venda direta de autotestes de antígenos com a OMS conferindo valor diagnóstico aos mesmos, em uma estratégia para se promover oferta, acessibilidade e incremento nos níveis gerais de testagem (OMS, 2022). Estima-se que a testagem por TRs tenha suplantado o número de exames realizados por RT-qPCR bem anteriormente ao que tem sido reportado, tornando-se o método de escolha inicial do público em geral para a testagem diagnóstica da COVID-19 em função da sua praticidade, baixo custo e rapidez (Martin *et al.*, 2022). Esta combinação envolvendo a adoção maciça dos TRs, incluindo as modalidades de auto-testagem, e as elevadas taxas de subnotificações de casos contribuíram para que os recentes grandes surtos/ondas pandêmicas, em meados de 2022

(surto/4ª onda associada às subvariantes BA.4 e BA.5) e no último trimestre de 2022 (surto/5ª onda associada às subvariantes BQ.1 e BE.9) fossem popularmente descritas como as ondas das subnotificações, em que houve um contraste entre os indicadores epidemiológicos reportados e o número real de casos projetados, em que o último superaria em muito os casos notificados.

Portanto, alterações no comportamento populacional e nos fluxos amostrais de assistência diagnóstica podem resultar em um alto número de casos relevantes não triados para fins de vigilância laboratorial e genômica, impactando negativamente na avaliação racional do cenário epidemiológico e no monitoramento ativo de variantes emergentes (Hassouneh *et al.*, 2022). Tal situação evidencia a necessidade de se continuamente aprimorar os atuais fluxos de captação e de seleção representativa (geográfica e temporal) para realização de vigilância genômica integrada com amostras de swab, mas também de outras matrizes biológicas para a manutenção da representatividade amostral no país. Devido à abundância das mesmas, a utilização de amostras remanescentes dos testes rápidos constitui em uma estratégia de alto potencial de incremento para a captação suplementar de amostras para vigilância genômica, potencializando o número de casos investigados sem ônus ao sistema visto que a estratégia faz uso de reaproveitamento de material que do contrário estariam sujeitos ao descarte (Hassouneh *et al.*, 2023). A necessidade de avaliação da viabilidade e compatibilidade deste tipo de abordagem a partir de amostras de TR para com os requisitos metodológicos de WGS advém do fato que componentes presentes na formulação podem impactar ou mesmo comprometer a qualidade dos dados gerados pelo NGS, visto que os mesmos não foram concebidos para a conservação de material viral, tal qual ocorre com o MTV.

O estabelecimento e operacionalização de um fluxo de captação de amostras de TR com resultado reagente para SC2 culminou com a realização deste trabalho entre novembro e dezembro de 2022 durante um dos mais recentes surtos de COVID-19 (também chamada de 5ª onda pandêmica). Esta iniciativa em parceria com os sistemas de saúde público municipais resultou não apenas em um grande incremento amostral, como também em uma maior abrangência geográfica e cobertura de subregionais (Figura 14). Além de potencializar a integração entre unidades básicas de saúde, laboratórios de diagnóstico molecular e órgãos regionais de vigilância genômica, o trabalho promoveu um aumento significativo da representatividade dos casos investigados em um período considerado de baixa adesão aos exames tradicionais de rt-PCR.

No que tange ao conteúdo e formulação das soluções tampões dos testes rápidos, ressalta-se o fato dos mesmos não terem sido idealizados para a preservação de ácidos nucleicos, ou mesmo transporte de material viral, ao contrário do MTV. Todavia, observou-se uma notável eficácia no processamento de recuperação do material genético do SARS-CoV-2 a partir volumes reduzidos de material remanescente. Essa eficácia foi confirmada através de detecção objetiva de material amplificado por RT-qPCR em 93% das amostras avaliadas, destacando-se o considerável potencial de reaproveitamento do material, constituindo em uma estratégia inovadora de baixíssimo custo e de grandes perspectivas ao simples descarte pós-testagem.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da extração em volumes amostrais reduzidos, dado o escasso volume de solução remanescente de TR após a utilização do volume requerido para a execução do teste (cerca de 300 μ l), procedeu-se à transferência do volume amostral remanescente em alíquotas racionalizadas de 50 μ l para realização de testes comparativos. Esta redução não comprometeu a taxa geral de recuperação de material genético dessas amostras que permaneceu elevada, indicando que abordagem metodológica escolhida permaneceu robusta mesmo com a redução do volume de amostra disponível (Figura 14). No entanto, dentro das expectativas, amostras obtidas a partir do volume padrão (200 μ l) apresentaram um valor CT significativamente menor, sugerindo uma maior quantidade de cópias virais presentes em um volume de reação 4 vezes maior (Figura 16). Considerando não ter havido influência do volume de material inicial na classificação filogenética, nem tampouco na definição de linhagens dos genomas gerados por NGS (Illumina NextSeq2000) a partir de amostras com valores $CT \leq 30$, é seguro afirmar que impossibilidade de obtenção de um volume reacional padrão (200 μ l), a extração pode ser viabilizada a partir de volume racionalizado de 50 μ l para realização de WGS e análises filogenéticas subsequentes.

Visando definir o tempo em que as amostras de TR podem ficar armazenadas em conservadora até a liberação para o processamento e obtenção do material genético viral, bem como a potencial utilidade de soluções tampões de conservação, um subgrupo de amostras de TR (n = 145) foi selecionado para fracionamento em volumes de 50 μ l e submetidas à extração no primeiro dia pós-recebimento e no 7º dia pós-recebimento, com e sem adição de solução tampão de conservação. A utilização de soluções conservantes que busquem preservar a integridade de ácidos nucleicos podem maximizar a sensibilidade e especificidade dos ensaios moleculares e consequentemente a acurácia da testagem, diminuindo a possibilidade de

obtenção de resultados falso-negativos (Duan *et al.*, 2023). Nesse contexto, o Isotiocianato de Guanidina destaca-se por ser um poderoso agente caotrópico com compatibilidade com diversos protocolos de extração de ácidos nucleicos. Amplamente empregado como desnaturante de proteínas, em combinação com agentes quelantes como EDTA ou citrato de sódio, a utilização dessas soluções tampões tem sido descritas como eficazes na inativação de RNAses e DNAses endógenas e outros contaminantes capazes de clivar as ligações fosfodiéster presentes na cadeia de moléculas de RNA e DNA (Weidner *et al.*, 2022).

Observou-se que a conservação das amostras por até sete dias à 4°C não influenciou significativamente na taxa de recuperação do material genético viral, no valor CT obtido e na definição de linhagens por NGS. Contudo, foi observado um comprometimento da qualidade destas amostras em relação aos genomas gerados a partir de amostras conservadas por até sete dias na ausência de solução tampão e que poderia estar associada à presença de possíveis compostos mutagênicos presentes em algumas formulações de TRs avaliados, conforme constam nas bulas disponibilizadas. Desta forma, recomenda-se que amostras de TR encaminhadas para fluxos de vigilância genômica sejam armazenadas por um mínimo período de tempo possível a fim de se minimizar possíveis alterações químicas que possam impactar negativamente na qualidade do sequenciamento.

Apesar dos potenciais benefícios advindos das soluções tampões selecionadas na manutenção da qualidade e conservação das amostras, não foram observados efeitos significativos durante o período de tempo avaliado. Estudos metodológicos indicam que diferentes tipos de amostras requerem diferentes concentrações de soluções conservantes para se reunir as propriedades requeridas para a preservação e estabilidade do RNA viral (Weidner *et al.*, 2022). Portanto, é plausível que modificações na concentração e molaridade dos reagentes utilizados possam também influenciar na conservação de amostras de TR. No entanto, como resultados satisfatórios foram obtidos mesmo na ausência dessas soluções por um período de tempo considerável, a adoção de soluções aditivas em um fluxo de encaminhamento de amostras de teste rápido para vigilância genômica é um processo considerado dispensável, pelo menos em relação ao sistema de TR avaliado para este estudo.

As sequências genômicas geradas a partir de amostras de TR, em sua maioria, apresentaram valores de cobertura, profundidade e qualidade bastante satisfatórios, parâmetros considerados essenciais para a acurácia e robustez das análises de NGS (Figura 17). É possível

que o valor $CT \leq 30$, utilizado como ponto de corte, não tenha influenciado de maneira significativa na definição e classificação de linhagens a nível filogenético devido à estratégia empregada de sequenciamento ter sido dimensionada utilizando a plataforma Illumina NextSeq2000, que oferece uma maior amplitude e profundidade de cobertura para o mapeamento e geração de sequências genômicas completas, o que em parte compensa algumas das limitações técnicas quando se emprega uma combinação de amostras de qualidade heterogêneas em plataformas de sequenciamento e células de fluxo de menores portes. Neste contexto, claramente investigações adicionais serão requeridas para se avaliar precisamente a real influência da qualidade amostral em plataformas de sequenciamento alternativas, considerando-se uma maior variação de carga viral relativa (aferida por valores CT), como ponto de partida para a triagem de vigilância genômica.

Vigilância genômica de SARS-CoV-2 na cidade de Fortaleza-CE

Amostras de TR não aprovadas no controle de qualidade para sequenciamento foram passíveis de análises complementares ao NGS (genotipagem molecular) para definição da linhagem viral, o que incrementou a base de dados e análises, contribuindo para a geração de informações adicionais para composição do panorama e avaliação da dinâmica de evolução viral através do monitoramento ativo da população viral circulante de SARS-CoV-2, particularmente com ênfase em variantes consideradas emergentes, sejam elas originárias da região ou introduzidas por importação. A combinação de diferentes estratégias de fortalecimento da vigilância genômica baseadas na: i) integração de ensaios de genotipagem molecular dirigidos a alvos específicos e; ii) de incremento amostral proveniente de reaproveitamento de material oriundo de TRs, demonstram a relevância do desenvolvimento de soluções de resposta rápida efetivos e que indubitavelmente são complementares às ações de vigilância genômica integrada, que é centrada na construção de mapas e o monitoramento viral por meio de WGS (Figura 18).

A integração estratégica de mapas genômicos gerados por WGS com as inovações de resposta rápida baseadas em genotipagem dirigidas a alvos virais e validação de um fluxo de captação a partir de amostras de TR para vigilância genômica, ofereceram significativos ganhos na cobertura investigativa durante o período deste estudo. Entretanto, este incremento de cobertura e representatividade não foi homogêneo. Nota-se que em períodos intermitentes com baixa circulação de casos o benefício tende a ser mais modesto, justificado pela melhor

viabilidade de ser triar uma proporção maior de casos para a realização de WGS e a menor necessidade de se lançar mão de estratégias complementares como as que foram propostas. Em contraste, em períodos de recrudescimento de casos, especialmente de surtos e ondas epi-pandêmicas, a implementação de soluções alternativas de vigilância genômica se tornam preponderantes para se atingir um nível mínimo de cobertura e representatividade dos casos positivos, sendo 5% um limiar mínimo de investigações comumente proposto por especialistas para a detecção de variantes emergentes com um nível incipiente de circulação entre 0,1% e 1,0% (Vavrek *et al.*, 2021).. A vigilância molecular investida com níveis mínimos de sensibilidade seria um pré-requisito técnico para o efetivo monitoramento ativo de novos eventos, particularmente na detecção precoce de variantes emergentes de maior competência viral antes que atingissem uma taxa de circulação acima de 1%, resultando na implementação de medidas de contenção e bloqueio mais eficazes (Vavrek *et al.*, 2021).

A utilização de um ensaio molecular dual de diagnóstico/inferência (SGTF) na rotina do Laboratório de Assistência Diagnóstica da COVID-19 do Hemocentro, permitiu a investigação otimizada de mais de 5.000 casos. É notório que durante um ciclo epi-pandêmico, a escolha de um método diagnóstico versátil que realize a detecção direta, mas que também classifique genotipicamente o agente infeccioso em uma mesma reação oferece inúmeras vantagens práticas e de tempo de resposta, promovendo uma melhora considerável na vigilância epidemiológica e no rastreamento de casos prioritários ao possibilitar uma avaliação em tempo real de múltiplos parâmetros, mesmo em laboratórios com infraestrutura modesta e recursos limitados, que é na prática o reflexo da maioria das regiões afetadas pelas sucessivas ondas pandêmicas do SARS-CoV-2 (Fontana-Maurell *et al.*, 2023).

É válido reiterar que, antes do início deste estudo, apenas 29 casos de COVID-19 do município de Fortaleza haviam sido sequenciados e cujos genomas estavam disponibilizados em repositórios de acesso público. Muito disso, decorrente da ausência de recursos humanos especializados, além de equipamentos e insumos requeridos para a mínima operacionalização de uma infraestrutura de vigilância genômica. Conseqüentemente, não foi possível reconstruir a histórica natural da introdução e expansão do SARS-CoV-2, nem tampouco realizar-se o monitoramento da população viral e da dinâmica evolutiva (por exemplo, mutações que confirmam vantagens seletivas) durante o primeiro ano da pandemia. Isso evidencia uma crítica necessidade de manutenção e de aprimoramento das iniciativas existentes, assim como o contínuo investimento no desenvolvimento estratégico de soluções custo-efetivas e na

formação de recursos humanos visando o fortalecimento de um sistema de vigilância ativa de rápida resposta, centrada no preparo/antecipação, sustentabilidade e integração de informações, apta para o enfrentamento de futuras emergência sanitárias.

Somente com o agravamento da pandemia e colapso dos sistemas de saúde no país a partir de dezembro de 2020, e significativos investimentos de recursos emergenciais, a temática de vigilância genômica foi finalmente reconhecida como agenda prioritária para o enfrentamento da COVID-19. Nesse sentido, no início de 2021 foi constituída e estruturada em caráter emergencial a Rede Genômica Fiocruz no Ceará e, posteriormente outras iniciativas se sucederam em que outros laboratórios passaram a atuar no monitoramento genômico do SARS-CoV-2 na região, dentre eles o Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE). Os genomas gerados e depositados por este estudo ou de forma colaborativa (n = 3.819), em conjunto com outras sequências produzidas por outras instituições para o município de Fortaleza e que foram disponibilizados em bases e repositórios de acesso público (n=434) foram coletivamente utilizados para estimar-se a frequência de circulação de variantes de SARS-CoV-2 e de assinaturas moleculares específicas (Figura 20A). A combinação de estratégias de vigilância genômica baseadas em ensaios de genotipagem molecular dirigidas a alvos virais e, posteriormente, a operacionalização de um fluxo inédito de sequenciamento a partir do tampão residual de amostras provenientes de testes rápidos de antígenos serviram para incrementar-se a cobertura geográfica e temporal de vigilância genômica que era baseada unicamente em casos com dados de WGS, portanto, retratando um panorama epidemiológico mais realístico com maior granularidade de informações (Figura 20B).

Apesar do padrão geral de resultados dos infográficos parecer ser comparativamente similares entre base de dados combinada versus base de dados somente com WGS, o significativo quantitativo de casos adicionais analisados da estratégia combinada permitiu estimar de forma mais robusta e antecipada, a frequência de circulação das linhagens mais relevantes de SARS-Cov-2 em Fortaleza. Essas diferenças são, sobretudo, mais aparentes durante a fase introdutória de variantes emergentes importadas e durante o período de maior expansão de variantes consideradas mais competentes das VOCs, como Gama, Delta e Ômicron BA.2. Como exceção, cita-se a VOC Ômicron subvariante BA.1 em que sua introdução e consequente expansão foi extremamente rápida e aguda e, portanto, as diferenças entre as duas abordagens foram bastante discretas com predomínio quase absoluto, tanto no cenário regional,

como nacional, em um intervalo de menos de 4 semanas desde a identificação do primeiro caso índice.

Alterações no cenário epidemiológico, tais como elevação na taxa de positividade dos exames realizados, recrudescimento no número de casos diagnosticados e na taxa de ocupação de leitos (hospitalização) são considerados indicadores importantes de um novo ciclo epidêmico, todavia é notório que pela qualidade e granularidade de informações geradas, o monitoramento genômico do patógeno tem contribuído de forma imperativa na geração de evidências, na ratificação de uma situação epidemiológica, e potencialmente na tomada de decisões sanitárias. A assertiva é reforçada pelo fato que historicamente, a emergência e disseminação de novas VOCs de SARS-CoV-2 e as sucessivas substituições de linhagens estão intimamente ligadas ao aparecimento de novos surtos e a sucessivos ciclos pandêmicos, em maior ou menor grau (Figura 19). Por outro lado, é notório que desde a introdução das primeiras linhagens da VOC Ômicron, a proporção de óbitos atribuídos a COVID-19 e de casos graves que requerem hospitalização tem decrescido e uma leitura acurada do real cenário epidemiológico tem sido cada vez mais desafiador. Parte disso, explica-se pelas sucessivas exposições da população ao patógeno e consequente múltiplas reinfecções, acrescenta-se a isso a introdução de vacinas/imunizantes e mais recentemente antivirais específicos no início de 2021. Entretanto, é amplamente reconhecido que a própria dinâmica de evolução viral do patógeno, moldada por fatores de pressão seletiva diversos tem desempenhado um papel preponderante na epidemiologia e no que é hoje a COVID-19. Manifestações clínicas mais moderadas, altas taxas de reinfecção com diminuição da proteção relativa conferida pelos imunizantes, ao mesmo tempo mantendo elevadas taxas de transmissibilidade e competência viral, indicam uma confluência de mutações e assinaturas moleculares que conferem vantagens seletivas em relação às primeiras linhagens documentadas, em um processo de especiação e perpetuação da espécie. Ao possibilitar a constante geração de conhecimentos, estratégias de vigilância genômica consistem em uma importante estratégia para entendimento pleno da dinâmica de evolução viral e dos processos envolvidos.

7 CONCLUSÃO

Considerando-se que o sucesso de um modelo de vigilância genômica está diretamente associado a um balanço racional entre aspectos quantitativos (número de amostras analisadas) e qualitativos (representatividade dos casos), o desenvolvimento de estratégias de fortalecimento do monitoramento de agente infecciosos é imprescindível. O rápido desenvolvimento e implementação de ensaios de genotipagem molecular dirigidos a alvos específicos das VOCs investigadas na rotina laboratorial propiciaram o monitoramento rápido, robusto e complementar aos WGS com incremento substancial no quantitativo amostral disponível para a vigilância do cenário epidemiológico da COVID-19. Adicionalmente, amostras de testes rápidos de antígenos constituem importantes fontes de amostras para o fortalecimento da vigilância epidemiológica de SARS-CoV-2, fortalecendo as estratégias de vigilância genômica no país. A utilização de estratégias desenvolvidas e validadas por esse estudo provaram-se inovadoras e efetivas para o monitoramento do cenário epidemiológico da cidade de Fortaleza, e extremamente complementares para a consolidação de uma a vigilância genômica integrada.

8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, H. R. A. *et al.* **COVID-19 Pathogenesis and Clinical Manifestations**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2022.
- AHLBOM, Anders. **Modern Epidemiology, 4th edition**. TL Lash, TJ VanderWeele, S Haneuse, KJ Rothman. **Wolters Kluwer, 2021**. [S. l.]: NLM (Medline), 2021.
- AKIN, Levent; GÖZEL, Mustafa Gökhan. **Understanding dynamics of pandemics**. [S. l.]: Turkiye Klinikleri, 2020.
- AKKIZ, Hikmet. **The Biological Functions and Clinical Significance of SARS-CoV-2 Variants of Concern**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2022.
- ALCANTARA, L. C. J. *et al.* SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: How the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. **Virus Research**, [s. l.], v. 315, p. 1–5, 2022.
- ALHAMID, Galyah *et al.* **SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.
- ALMEHDI, Ahmed M. *et al.* **SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.
- AO, Danyi *et al.* **The rapid rise of SARS-CoV-2 Omicron subvariants with immune evasion properties: XBB.1.5 and BQ.1.1 subvariants**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2023.
- ARCHER-DIABY, Lenos. Lessons Learned from a Global History of Pandemics. **MICROBIOL & INFECT DIS**, [s. l.], v. 1, p. 38–41, 2020.
- BABIKER, Ahmed *et al.* Single-amplicon multiplex real-time reverse transcription-pcr with tiled probes to detect sars-cov-2 spike mutations associated with variants of concern. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 12, 2021.
- BAI, Zhihua *et al.* **The sars-cov-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation**. [S. l.]: MDPI AG, 2021.
- BAI, Chongzhi; ZHONG, Qiming; GAO, George Fu. **Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins**. [S. l.]: Science Press (China), 2022.
- BAJ, Andreina *et al.* Spike protein evolution in the SARS-CoV-2 Delta variant of concern: a case series from Northern Lombardy. **Emerging Microbes and Infections**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 2010–2015, 2021.
- BAKER, Rachel E. *et al.* **Infectious disease in an era of global change**. [S. l.]: Nature Research, 2022.
- BAL, Antonin *et al.* Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern. **medRxiv**, [s. l.], p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.11.10.20228528>.
- BANHO, Cecília Artico *et al.* Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city. **Communications**

Medicine, [s. l.], v. 2, n. 1, 2022.

BAROUCH, Dan H. Covid-19 Vaccines — Immunity, Variants, Boosters. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 387, n. 11, p. 1011–1020, 2022.

BHADORIA, Pooja; GUPTA, Gaurisha; AGARWAL, Anubha. Viral pandemics in the past two decades: An overview. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 2745, 2021.

BOEHRINGER, Hans R.; O'FARRELL, Brendan J. **Lateral Flow Assays in Infectious Disease Diagnosis**. [S. l.]: Oxford University Press, 2022.

BORCZUK, Alain C.; YANTISS, Rhonda K. **The pathogenesis of coronavirus-19 disease**. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2022.

BORGES, Vítor *et al.* **Tracking SARS-CoV-2 VOC 202012/01 (lineage B.1.1.7) dissemination in Portugal: insights from nationwide RT-PCR Spike gene drop out data (lineage B.1.1.7) dissemination in Portugal: insights from nationwide RT-PCR Spike gene drop out data**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://insaflu.insa.pt/covid19/>. .

BRASIL. **Anvisa aprova venda do medicamento Paxlovid em farmácias**. [S. l.], 2022a.

BRASIL. **Ministério da Saúde incorpora vacina Covid-19 para crianças de 6 meses a menores de 5 anos no SUS**. [S. l.], 2022b.

BRASIL. **Remdesivir**. [S. l.], 2021.

BRITO, Anderson F. *et al.* Global disparities in SARS-CoV-2 genomic surveillance. **Nature communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 7003, 2022.

BROOKS, Daniel R. *et al.* **Emerging infectious disease: An underappreciated area of strategic concern for food security**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2022.

BUSS, Lewis F. *et al.* Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. **Science**, [s. l.], v. 371, n. 6526, p. 288–292, 2021.

BYRNE, J. P.; HAYS, J. N. **Epidemics and Pandemics [2 volumes]: From Ancient Plagues to Modern-Day Threats [2 volumes]**. [S. l.]: Bloomsbury Publishing USA., 2021. v. 2

CALLAWAY, E.; LEDFORD, H. How bad is Omicron? What scientists know so far. **Nature**, [s. l.], v. 600, p. 197–199, 2021.

CAZA, Mélissa *et al.* Evaluation of the clinical and analytical performance of the Seegene allplex™ SARS-CoV-2 variants I assay for the detection of variants of concern (VOC) and variants of interests (VOI). **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 144, 2021.

CERAMELLA, Jessica *et al.* **Drugs for COVID-19: An Update**. [S. l.]: MDPI, 2022.

CHEN, Zhiyuan *et al.* Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 499–507, 2022.

CHEN, Kai Wei K.; TSUNG-NING HUANG, Daniel; HUANG, Li Min. **SARS-CoV-2**

variants – Evolution, spike protein, and vaccines. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

CHIARA, Matteo *et al.* **Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: Challenges, applications and opportunities.** [S. l.]: Oxford University Press, 2021.

CHINTA, Siddharth *et al.* **COVID-19 therapy and vaccination: a clinical narrative review.** [S. l.]: Bioexcel Publishing LTD, 2023.

CHOI, Jun Yong; SMITH, Davey M. **SARS-CoV-2 variants of concern.** [S. l.]: Yonsei University College of Medicine, 2021.

CHONG, Yuh Ping *et al.* **SARS-CoV-2 Testing Strategies in the Diagnosis and Management of COVID-19 Patients in Low-Income Countries: A Scoping Review.** [S. l.]: Adis, 2023.

CLARK, Andrew *et al.* Global, regional, and national estimates of the population at increased risk of severe COVID-19 due to underlying health conditions in 2020: a modelling study. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e1003–e1017, 2020.

COLAVITA, Francesca *et al.* Covid-19 rapid antigen test as screening strategy at points of entry: Experience in lazio region, central italy, august–october 2020. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–8, 2021.

CUI, Feiyun; ZHOU, Zhiru; ZHOU, H. Susan. **Molecularly imprinted polymers and surface imprinted polymers based electrochemical biosensor for infectious diseases.** [S. l.]: MDPI AG, 2020.

DASGUPTA, Soumit; CRUNKHORN, Rosa. A History of pandemics over the ages and the human cost. **The Physician**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2020.

DAVIES, Nicholas G. *et al.* Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Science**, [s. l.], v. 372, n. 6538, 2021a. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abg3055>.

DAVIES, Nicholas G. *et al.* Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. **Nature**, [s. l.], v. 593, n. 7858, p. 270–274, 2021b.

DEZORDI, Filipe Zimmer *et al.* Unusual SARS-CoV-2 intrahost diversity reveals lineage superinfection. **Microbial Genomics**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2022.

DI GIACOMO, Simone *et al.* Preliminary report on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike mutation T478K. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 93, n. 9, p. 5638–5643, 2021.

DIKDAN, Ryan J. *et al.* Multiplex PCR Assays for Identifying all Major Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants. **Journal of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 309–319, 2022.

DITCHBURN, Jae Llanc; HODGKINS, Ryan. **Yersinia pestis, a problem of the past and a re-emerging threat.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.

DUAN, Xiuzhi *et al.* How to better select SARS-CoV-2 preservation solution of virus nucleic

acid testing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 37, n. 15–16, 2023.

ECCLES, Ronald *et al.* **Treatment of COVID-19 symptoms with over the counter (OTC) medicines used for treatment of common cold and flu**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2023.

ELLIS, P. *et al.* Decoding Covid-19 with the SARS-CoV-2 Genome. **Current Genetic Medicine Reports**, [s. l.], v. 9, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/>.

FAÍCO-FILHO, Klinger Soares; PASSARELLI, Victor Cabelho; BELLEI, Nancy. Is higher viral load in SARS-CoV-2 associated with death?. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 103, n. 5, p. 2019–2021, 2020.

FARIA, Nuno R *et al.* **Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil**. *Mélodie Monod*. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <http://pangolin.cog-uk.io>.

FDA. **FDA Approves First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19 in Adults**. [S. l.], 2023.

FERNANDES, Queenie *et al.* **Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2022.

FILCHAKOVA, Olena *et al.* **Review of COVID-19 testing and diagnostic methods**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

FONTANA-MAURELL, Marcela *et al.* **A straightforward one-step strategy for SARS-CoV-2 diagnosis and screening of variants of concern: a multicenter study**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://orcid.org/0000-0003-0313-877X>.

FUJINO T. *et al.* Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 1243–1245, 2021.

FUNK, Tjede *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 26, n. 16, 2021.

G1. **Brasil bate marca de 4 mil mortes por Covid registradas em um dia pela 1ª vez e soma 337,6 mil na pandemia**. [S. l.], 2021a.

G1. **Família faz fila em frente a empresa fornecedora de oxigênio em Manaus**. [S. l.], 2021b.

GARCÍA-BERNALT DIEGO, Juan; FERNÁNDEZ-SOTO, Pedro; MURO, Antonio. **The Future of Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Diagnostics after COVID-19: Time to Walk the Walk**. [S. l.]: MDPI, 2022.

GIOVANETTI, Marta *et al.* Replacement of the Gamma by the Delta variant in Brazil: Impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. **Virus Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2022.

GIRON, Carolina Corrêa; LAAKSONEN, Aatto; BARROSO DA SILVA, Fernando Luís. Up State of the SARS-COV-2 Spike Homotrimer Favors an Increased Virulence for New Variants.

Frontiers in Medical Technology, [s. l.], v. 3, 2021.

GOËRTZ, Yvonne M.J. *et al.* Persistent symptoms 3 months after a SARS-CoV-2 infection: The post-COVID-19 syndrome?. **ERJ Open Research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1–10, 2020.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, Luis Daniel; ARENAS, Miguel. **Molecular Evolution of SARS-CoV-2 during the COVID-19 Pandemic**. [S. l.]: MDPI, 2023.

GOSWAMI, Barna *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 variant of interest B.1.525 (Eta) in Bangladesh. **Biologicals**, [s. l.], v. 84, p. 101714, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105623000520>.

HAIM-BOUKOBZA, S. *et al.* **Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.

HAIM-BOUKOBZA, S. *et al.* Rapid Spread of SARS-CoV-2 Variants, France. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 1496–1499, 2021. Disponível em: www.cdc.gov/eid.

HARRINGTON, Walter N.; KACKOS, Christina M.; WEBBY, Richard J. **The evolution and future of influenza pandemic preparedness**. [S. l.]: Springer Nature, 2021.

HASAN, Mohammad R. *et al.* Real-Time SARS-CoV-2 Genotyping by High-Throughput Multiplex PCR Reveals the Epidemiology of the Variants of Concern in Qatar. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 112, p. 52–54, 2021.

HASSOUNEH, A. D. S. *et al.* Antigen test swabs are comparable to nasopharyngeal swabs for sequencing of SARS-CoV-2. **medRxiv**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.06.09.22276150>.

HASSOUNEH, Sayf Al Deen *et al.* Antigen test swabs are comparable to nasopharyngeal swabs for sequencing of SARS-CoV-2. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2023.

HE, Jiahuan. Next-Generation Sequencing on COVID-19 Pandemic. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 30–38, 2022.

HESKIN, Joseph *et al.* **Caution required with use of ritonavir-boosted PF-07321332 in COVID-19 management**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

HILL, Verity *et al.* **The origins and molecular evolution of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the UK** The COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, †. [S. l.: s. n.], 2022.

HILT, Evann E.; FERRIERI, Patricia. **Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. [S. l.]: MDPI, 2022.

HUANG, Jing Tao *et al.* Chronological Changes of Viral Shedding in Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 16, p. 2158–2166, 2020.

HUI, Kenrie P.Y. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. **Nature**, [s. l.], v. 603, n. 7902, p. 715–720, 2022.

IACOPETTA, Domenico *et al.* COVID-19 at a Glance: An Up-to-Date Overview on Variants,

Drug Design and Therapies. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 3, 2022.

ILLUMINA. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology**. [S. l.: s. n.], 2015.

ISLAM, Md Rabiul; SHAHRIAR, Mohammad; BHUIYAN, Mohiuddin Ahmed. **The latest Omicron BA.4 and BA.5 lineages are frowning toward COVID-19 preventive measures: A threat to global public health**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2022.

JÄÄSKELÄINEN, A. E. *et al.* Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 137, 2021.

JESUS, Jaqueline Goes *et al.* Importation and early local transmission of covid-19 in brazil, 2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 62, 2020.

KAUR, Harmanjot *et al.* International Journal of Pharmacological Research A Review: Epidemics and Pandemics in Human History QR Code. **International Journal of Pharmacological Research**, [s. l.], v. 10, n. 04, 2020. Disponível em: www.ssjournals.com:e5399. Doi:10.7439/ijpr.v10i4.5399 Available from: <https://ssjournals.com/index.php/ijpr/article/view/5399>.

KAYE, Alan D. *et al.* **Economic impact of COVID-19 pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives**. [S. l.]: Bailliere Tindall Ltd, 2021.

KEVADIYA, Bhavesh D. *et al.* **Diagnostics for SARS-CoV-2 infections**. [S. l.]: Nature Research, 2021.

KHAN, Abbas *et al.* Higher infectivity of the SARS-CoV-2 new variants is associated with K417N/T, E484K, and N501Y mutants: An insight from structural data. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 236, n. 10, p. 7045–7057, 2021.

KISO, Maki *et al.* In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 strains resistant to nirmatrelvir. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2023.

KOH, David. **Occupational risks for COVID-19 infection**. [S. l.]: Oxford University Press, 2020.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. **SARS-CoV-2 pathogenesis**. [S. l.]: Nature Research, 2022.

LEE, Wei Lin *et al.* Quantitative SARS-CoV-2 Alpha Variant B.1.1.7 Tracking in Wastewater by Allele-Specific RT-qPCR. **Environmental Science and Technology Letters**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 675–682, 2021.

LEPAN, Nicholas. **Visualizing the history of pandemics**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest>.

LEUNG, Nancy H.L. **Transmissibility and transmission of respiratory viruses**. [S. l.]: Nature Research, 2021.

LI, Xingguang. Concerns on the multiple nomenclature systems for SARS-CoV-2. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 1224–1226, 2022.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza *et al.* **The Importance of Vaccination in the Context of the COVID-19 Pandemic: A Brief Update Regarding the Use of Vaccines.** [S. l.]: MDPI, 2022.

MAGLEBY, Reed *et al.* Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 11, p. E4197–E4205, 2020.

MARTIN, Genevieve E. *et al.* **Maintaining genomic surveillance using whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 from rapid antigen test devices.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

MCMILLEN, Tracy *et al.* The spike gene target failure (SGTF) genomic signature is highly accurate for the identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 variants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Medidas adotadas pelo Governo Federal no combate ao coronavírus - 2 de abril.** [S. l.], 2022a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano nacional de expansão da testagem para COVID-19.** [S. l.: s. n.], 2022b.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Programa Nacional de Imunizações - Vacinação.** [S. l.], 2023.

MORAIS, T. N. B. **COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DA CURVA DE CONTAMINAÇÃO POR COVID-19 NO BRASIL: ANÁLISE DE SÉRIE TEMPORAL.** 2023. 1–33 f. Monografia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2023.

MUNNINK, Bas B. O. *et al.* **The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: real-time molecular epidemiology.** [S. l.]: Nature Research, 2021.

MURAKAMI, Naoka *et al.* **Therapeutic advances in COVID-19.** [S. l.]: Nature Research, 2023.

MUSTAFA, Mujahed I; MAKHAWI, Abdelrafie M. What learned from Omicron Sub-Variants BQ.1 and BQ.1.1. [s. l.], 2022. Disponível em: www.preprints.org.

NARASIMHAN, Madhusudhanan *et al.* **Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered, and Vaccinated Groups.** [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jcm>. .

NAVECA, Felipe Gomes *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 1230–1238, 2021.

NEOPANE, Puja *et al.* SARS-CoV-2 variants detection using TaqMan SARS-CoV-2 mutation panel molecular genotyping assays. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 14, p. 4471–4479, 2021.

NHEAN, Salin *et al.* **COVID-19: A Review of Potential Treatments (Corticosteroids, Remdesivir, Tocilizumab, Bamlanivimab/Etesevimab, and Casirivimab/Imdevimab) and Pharmacological Considerations.** [S. l.]: SAGE Publications Inc., 2023.

NII-TREBI, Nicholas Israel. **Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges**. [S. l.]: Hindawi Limited, 2017.

OFFIT, Paul A. Bivalent Covid-19 Vaccines — A Cautionary Tale. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 388, n. 6, p. 481–483, 2023.

OMS. **Genomic sequencing of SARS-CoV-2 A guide to implementation for maximum impact on public health**. [S. l.: s. n.], 2021.

OMS. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. [S. l.], 2023.

OMS. Use of SARS-CoV-2 antigen-detection rapid diagnostic tests for COVID-19 self-testing. [s. l.], 2022.

OMS. **WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. [S. l.], 2020.

ONG, David S.Y. *et al.* Rapid screening method for the detection of SARS-CoV-2 variants of concern: Rapid screening of SARS-CoV-2 variants of concern. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 141, 2021.

OPAS. **Indicadores de saúde. Elementos conceituais e práticos**. [S. l.]: Organización Panamericana de la Salud, 2018. v. 1

OPAS. **OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2**. [S. l.], 2021.

OXFORD, J. S. *et al.* A hypothesis: The conjunction of soldiers, gas, pigs, ducks, geese and horses in Northern France during the Great War provided the conditions for the emergence of the “Spanish” influenza pandemic of 1918-1919. **Vaccine**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 940–945, 2005.

PALAMIM, Camila Vantini Capasso *et al.* **Increase in COVID-19 underreporting among 3,282,337 Brazilian hospitalized patients due to SARS: A 3-year report and a major concern for health authorities**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2023.

PARRA-LUCARES, Alfredo *et al.* **Emergence of SARS-CoV-2 Variants in the World: How Could This Happen?**. [S. l.]: MDPI, 2022.

PEARSON, C. A. B. *et al.* **Estimates of severity and transmissibility of novel South Africa SARS-CoV-2 variant 501Y.V2**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://github.com/cmimid/SA2UK>. .

PEELING, Rosanna W. *et al.* **Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

PETRAKIS, Vasilios *et al.* The Antiviral Effect of Nirmatrelvir/Ritonavir during COVID-19 Pandemic Real-World Data. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 4, 2023.

PINKHOVER, Nicholas P *et al.* SARS-CoV-2 Variant Surveillance Using Tandem Targeted RT-PCR-based Genotyping Assays and Whole Genome Sequencing. **MedRxiv**, [s. l.], p. 1–7, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.01.31.22270226>.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. **Pandemics Throughout History**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021.

PRABHU, S.R. **Infectious and Communicable Diseases: An Overview**. In: **Textbook of General Pathology for Dental Students**. . [S. l.: s. n.], 2023. v. 1

QUEIROZ, J. P. M. **EVOLUÇÃO DE SARS-COV-2 E SEU IMPACTO NA PANDEMIA**. 2022. 1–87 f. Monografia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2022.

RABAAN, Ali A. *et al.* **Viral dynamics and real-time rt-pcr ct values correlation with disease severity in covid-19**. [S. l.]: MDPI, 2021.

RAO, Sonia N *et al.* Clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-41867/v1>.

REDE GENÔMICA FIOCRUZ. **Relatório 27 Rede Genômica Fiocruz 2 de Dezembro de 2022 a 28 de Fevereiro de 2023**. [S. l.: s. n.], 2023.

RODRIGUES, Rosana Souza *et al.* Increased Lung Immune Metabolic Activity in COVID-19 Survivors. **Clinical Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 1019–1025, 2022.

ROSA, G. L. *et al.* Rapid screening for SARS-CoV-2 variants of concern in clinical and environmental samples using nested RT-PCR assays targeting key mutations of the spike protein. **Water Research**, [s. l.], v. 197, 2021.

RUSSELL, Clark D.; LONE, Nazir I.; BAILLIE, J. Kenneth. **Comorbidities, multimorbidity and COVID-19**. [S. l.]: Nature Research, 2023.

S. PAVIA, Charles; M. PLUMMER, Maria. **The evolution of rapid antigen detection systems and their application for COVID-19 and other serious respiratory infectious diseases**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021.

SALEHI-VAZIRI, Mostafa *et al.* **The ins and outs of SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs)**. [S. l.]: Springer, 2022.

SALVATORI, Giovanni *et al.* **SARS-CoV-2 spike protein: An optimal immunological target for vaccines**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2020.

SCHUCHAT, Anne. Human Vaccines and Their Importance to Public Health. **Procedia in Vaccinology**, [s. l.], v. 5, p. 120–126, 2011.

SHAMSI, Anas *et al.* **Potential drug targets of SARS-CoV-2: From genomics to therapeutics**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2021.

SHARMA, Aadya *et al.* **Comparing the socio-economic implications of the 1918 Spanish flu and the COVID-19 pandemic in India: A systematic review of literature**. [S. l.: s. n.], 2021.

SILVA, L. V. *et al.* COVID-19 mortality underreporting in Brazil: Analysis of data from government internet portals. **Journal of Medical Internet Research**, [s. l.], v. 22, n. 8, 2020.

SIVAPALAN, Pradeesh *et al.* Azithromycin and hydroxychloroquine in hospitalised patients

with confirmed COVID-19: a randomised double-blinded placebo-controlled trial. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 59, n. 1, 2022.

SMITH, Kristine M. *et al.* **Infectious disease and economics: The case for considering multi-sectoral impacts**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.

SMITHGALL, Marie C. *et al.* Comparison of Cepheid Xpert Xpress and Abbott ID Now to Roche cobas for the Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 128, 2020.

SOUZA, William Marciel *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 856–865, 2020.

SOUZA, Layse Costa de *et al.* SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: uma revisão narrativa dos principais Coronavírus do século / SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: a narrative review of the main Coronaviruses of the century. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1419–1439, 2021.

SPIESS, Katja *et al.* Rapid and Flexible RT-qPCR Surveillance Platforms To Detect SARS-CoV-2 Mutations. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.03591-22>.

SUKEISHI, Asami *et al.* Population pharmacokinetic modeling of GS-441524, the active metabolite of remdesivir, in Japanese COVID-19 patients with renal dysfunction. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 94–103, 2022.

SUKUMARAN, Ajaikumar *et al.* Diagnostic Accuracy of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen Self-Test in Comparison to Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Applied Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 871–880, 2022.

TALLEI, Trina Ekawati *et al.* **Update on the omicron sub-variants BA.4 and BA.5**. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2023.

TAMBOLKAR, Sampada *et al.* Comparison of public health measures taken during Spanish flu and COVID-19 pandemics: A Narrative Review. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1642, 2022.

TAMURA, Tomokazu *et al.* Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2023.

TANG, Yuanji *et al.* **Epidemiology of COVID-19 in Brazil: using a mathematical model to estimate the outbreak peak and temporal evolution**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2020.

TATSI, Elizabeth Barbara; FILIPPATOS, Filippos; MICHOS, Athanasios. **SARS-CoV-2 variants and effectiveness of vaccines: A review of current evidence**. [S. l.]: Cambridge University Press, 2021.

THYE, A. Y.; JODI, W. L. Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Gamma (P.1), and Omicron (B.1.1.529). However, as of. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, [s. l.], v. 5, 2022. Disponível em: <http://journals.hh-publisher.com/index.php/pmmb>.

TIAN, Dandan *et al.* **The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant.** [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2022.

TOM, Michael R.; MINA, Michael J. **To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value.** [S. l.]: Oxford University Press, 2020.

TORRETTA, Sara *et al.* **Diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR Using Different Sample Sources: Review of the Literature.** [S. l.]: SAGE Publications Ltd, 2021.

TRAN, Nam K.; MAY, Larissa. **Evolution of COVID-19 Testing and the Role of Rapid Antigen Testing in a Molecular-Focused World.** [S. l.]: College of American Pathologists, 2022.

UMUNNAKWE, Chijioke N. *et al.* Evaluation of a commercial SARS-CoV-2 multiplex PCR genotyping assay for variant identification in resource-scarce settings. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 6 June, 2022.

VAVREK, Darcy *et al.* Genomic surveillance at scale is required to detect newly emerging strains at an early timepoint. **Medrxiv**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.01.12.21249613>.

VELUMANI, A. *et al.* SARS-CoV-2 Seroprevalence in 12 Cities of India from July-December 2020. **medRxiv**, [s. l.], p. 1–17, 2021.

VOGELS, Chantal B F *et al.* PCR assay to enhance global surveillance for SARS-CoV-2 variants of concern. **medRxiv: the preprint server for health sciences**, [s. l.], 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33758901>.

WALKER, A. Sarah *et al.* CT threshold values, a proxy for viral load in community sars-cov-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time. **eLife**, [s. l.], v. 10, 2021.

WANG, Xiaoli *et al.* Neutralizing antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in coronavirus disease 2019 inpatients and convalescent patients. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 2688–2694, 2020.

WATSON, Oliver J. *et al.* Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1293–1302, 2022.

WEIDNER, Lisa *et al.* Sample Buffer Containing Guanidine-Hydrochloride Combines Biological Safety and RNA Preservation for SARS-CoV-2 Molecular Diagnostics. **Diagnostics**, [s. l.], v. 12, n. 5, 2022.

WHO. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** [S. l.], 2023.

WHO. **WHO issues its first emergency use validation for a COVID-19 vaccine and emphasizes need for equitable global access.** [S. l.], 2020.

WU, Xianyong *et al.* **Diagnostic techniques for COVID-19: A mini-review.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

WU, Can rong *et al.* **Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug**

design templates for COVID-19. [*S. l.*]: Springer Nature, 2022.

YANG, Haitao; RAO, Zihe. **Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development.** [*S. l.*]: Nature Research, 2021.

YUAN, Yongliang *et al.* **The development of COVID-19 treatment.** [*S. l.*]: Frontiers Media S.A., 2023.

ZHANG, Lina *et al.* Comparison of high-resolution melting analysis, taqman allelic discrimination assay, and sanger sequencing for clopidogrel efficacy genotyping in routine molecular diagnostics. **Journal of Molecular Diagnostics**, [*s. l.*], v. 15, n. 5, p. 600–606, 2013.

ZHAO, Xingwang *et al.* **Airborne transmission of COVID-19 virus in enclosed spaces: An overview of research methods.** [*S. l.*]: John Wiley and Sons Inc, 2022.

ZHENG, X. *et al.* **Accuracy of serological tests for COVID-: A systematic review and meta-analysis.** [*S. l.: s. n.*], 2019.

ZHOU, Yongbing; ZHI, Huilin; TENG, Yong. **The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages, immune escape, and vaccine effectivity.** [*S. l.*]: John Wiley and Sons Inc, 2023.