

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**MESTRADO ACADÊMICO**

**INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs) DO SARS-CoV-2  
POR ENSAIO DISCRIMINATÓRIO DE RT-qPCR EM SALVADOR, BAHIA**

**YASMIN SANTOS FREITAS MACÊDO**

**Salvador – Bahia**

**2022**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCS) DO SARS-COV-2  
POR ENSAIO DISCRIMINATÓRIO DE RT-QPCR EM SALVADOR, BAHIA**

**YASMIN SANTOS FREITAS MACÊDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz para a obtenção do grau de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gräf

Coorientadora: Profa. Dra. Isadora Siqueira

**Salvador – Bahia**

**2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**M141i** Macêdo, Yasmin Santos Freitas

Investigação das variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 por ensaio discriminatório de RT-qPCR em Salvador, Bahia. / Yasmin Santos Freitas Macêdo. \_ Salvador, 2022.

55 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gräf  
Coorientadora: Profa. Dra. Isadora Siqueira

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Variantes de preocupação. 4. Epidemiologia molecular. 5. RT-qPCR. I. Título.

CCU 614.4

“INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs) DO SARS-CoV-2 POR ENSAIO DISCRIMINATÓRIO DE RT-qPCR EM SALVADOR, BAHIA”.

**YASMIN SANTOS FREITAS MACÊDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de novembro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA




---

Dra. Carolina Moreira Voloch  
Professora Associada I  
UFRJ



---

Dr. Fernando Couto Motta  
Tecnologista Senior  
IOC/FIOCRUZ



---

Dr. Bruno Solano de Freitas Souza  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

## AGRADECIMENTOS

Em um ciclo de pandemia consegui as grandiosas orientações do Dr. Tiago Gräf e da Dra. Isadora Siqueira para trabalhar exatamente com o que eu amo, a virologia e biologia molecular. Não foi fácil estar ligada física e psicologicamente a um vírus que nos isolou e levou em tempo real nossos familiares e amigos, esse trabalho foi realizado com muita dedicação, amor e como também uma homenagem aos que se foram pelo vírus.

Deixo registrada uma enorme gratidão aos meus pais Catherine Mazzafera, Mário Mazzafera e Roberto Macedo, dindos Ágatha Wicks e Wallace Wicks e irmãos Enzo Mazzafera e Júlia Macêdo, sem vocês eu não conseguiria realizar nada na minha vida e carreira.

Às minhas avós Amenaide Macêdo, Cleuza Francisca e Paulo Freitas e a toda família Santos, Freitas, Macêdo e Wicks que sempre me estimulam a ser uma pessoa melhor, mais resiliente, esforçada e determinada a cada dia sendo minha rocha para tudo nessa passagem na terra;

A Fada Prates, Geraldo Baptista, Arthur Prates e toda família Prates/Baptista, por serem a doze anos um imenso símbolo de amor e união para mim;

Às minhas melhores amigas Maria Paula, Thainá Fialho, Luciana Carneiro, Júlia Lacerda, Wendy Wicks, Brenda Wicks, Amanda Brito, Amanda Wicks e amigos Marcos Lima, Bruno Serrano e Pablo Gantóis que estão sempre do meu lado para tudo, se fazendo presentes nos momentos mais felizes e importantes da minha vida;

Aos meus colegas do Lapex e amigos da Plataforma de Vigilância: Júlia Lacerda, Jessica Silva, Ellen Pimentel, Fernanda Miranda, Rafael Tibúrcio, Marina Santana, Fernanda Lessa, Vanusa e Thais por sempre estarem disponíveis para me ajudar de todas as formas, sendo compreensíveis diante as pressões finais do mestrado, servindo como um exemplo de esforço e amor a ciência para mim;

Ao Dr. Ricardo Khouri por me acolher na Plataforma de Vigilância Molecular quando eu mais precisei me dando oportunidades significativas e fundamentais para meu crescimento profissional dentro da área que eu amo trabalhar;

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

A Fiocruz Bahia, LAPEX e a Plataforma de Vigilância Molecular do IGM e mais uma vez ao meu orientador Dr. Tiago Gräf por me acolher em meio a uma pandemia prestando uma orientação paciente, respeitosa, fluída, sempre trabalhando em equipe comigo, fazendo a diferença no árduo mundo acadêmico. Aqui deixo registrada toda a minha gratidão.

MACÊDO, Yasmin Santos Freitas. **Investigação das variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 por ensaio discriminatório de RT-qPCR em Salvador, Bahia**. 2022. 55 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), responsável pela pandemia, possui no Brasil uma incidência de mais de 14 mil casos/100.000 habitantes e mortalidade de 2,2%, provando ser um grande problema de saúde pública. A identificação de VOCs tradicionalmente exige o sequenciamento genômico do vírus, limitando o número de amostras que podem ser processadas. Em Salvador, Bahia, ainda existem poucos dados a respeito da circulação das variantes de preocupação (VOCs) disponíveis e a realização de mais estudos com métodos de maior capacidade de processamento se fazem necessários. **OBJETIVO:** O presente projeto tem como propósito utilizar um método de identificação de VOCs por RT-qPCR para investigar sua circulação na cidade de Salvador, caracterizando o período de introdução e a velocidade de crescimento de frequência na população amostrada. **METODOLOGIA:** Amostras do biorrepositório da Plataforma de Vigilância Molecular FIOCRUZ-IGM, coletadas a partir de dezembro de 2020 a fevereiro de 2022, via swabs nasofaríngeos, foram analisadas por ensaio discriminatório de RT-qPCR que dispõe de *primers* e sondas específicos às regiões deletadas dos genomas das VOCs Alfa, Beta, Gama e Ômicron. **RESULTADOS:** Cerca de 900 amostras previamente positivas para o vírus SARS-CoV-2 foram localizadas no biorrepositório da Plataforma de Vigilância do IGM e testadas a partir de ensaio molecular com 94% de sensibilidade 95% de especificidade e 98% de acurácia a fim da verificação de suas linhagens. Das amostras encontradas 628 apresentaram resultados validos onde a sugestão da presença de VOC's foi verificada em 84% delas. A VOC Gama foi a linhagem mais frequente entre os testes representando 74% do total de amostras validas seguida das linhagens não-VOC (17%) e da VOC Ômicron (9%). Indivíduos do sexo feminino e com idade entre 40-44 demonstraram-se predominantes dentre os testes realizados entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2022 na cidade de Salvador. **CONCLUSÃO:** Mostramos aqui a validade de métodos alternativos de rastreamento de novas variantes do SARS-CoV-2, que podem ser aplicados complementarmente ao sequenciamento genético e auxiliar nas tomadas de decisões relativos a medidas de contenção da pandemia.

**Palavras-chave:** COVID-19. SARS-CoV-2. Variantes de preocupação. Epidemiologia molecular. RT-qPCR.

MACÊDO, Yasmin Santos Freitas. **Investigation of variants of concern (VOCs) of SARS-CoV-2 BY RT-qPCR discriminatory test in Salvador, Bahia.** 2022. 55 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2022.

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The coronavirus disease 2019 (COVID-19), responsible for the pandemic, has an incidence of more than 14,000 cases/100,000 inhabitants in Brazil and a mortality rate of 2.2%, proving to be a major public health problem. Identification of VOCs has traditionally required genomic sequencing of the virus, limiting the number of samples that can be processed. In Salvador, Bahia, there are still few data regarding the circulation of variants of concern (VOCs) available and further studies with methods with greater processing capacity are needed. **OBJECTIVE:** The purpose of this project is to use a method for identifying VOCs by RT-qPCR to investigate their circulation in the city of Salvador, characterizing the period of introduction and the speed of frequency growth in the sampled population. **METHODOLOGY:** Samples from the FIOCRUZ-IGM Molecular Surveillance Platform biorepository, collected from December 2020 to February 2022, via nasopharyngeal swabs, were analyzed using a discriminatory RT-qPCR assay, which uses primers and probes specific to the deleted regions of the genomes of Alpha, Beta, Gamma and Omicron VOCs. **RESULTS:** About 900 samples previously positive for the SARS-CoV-2 virus were located in the biorepository of the IGM Surveillance Platform and tested using a molecular assay with 94% sensitivity, 95% specificity and 98% accuracy in order to verification of their lineages. Of the samples found, 628 presented valid results where the suggestion of the presence of VOC's was verified in 84% of them. VOC Gamma was the most frequent strain among the tests, representing 74% of the total valid samples, followed by non-VOC strains (17%) and VOC Ômicron (9%). Female individuals aged between 40-44 were predominant among the tests carried out between December 2020 and February 2022 in the city of Salvador. **CONCLUSION:** We show here the validity of alternative methods for screening new variants of SARS-CoV-2, which can be applied in addition to genetic sequencing and help in decision-making regarding measures to contain the pandemic.

**Keywords:** COVID-19. SARS-CoV-2. Worry variants. Molecular epidemiology. RT-qPCR.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo de infecção de SARS-CoV-2 a células humanas	18
<b>Figura 2</b>	Média móvel (7 dias) de mortes de COVID-19 confirmadas por milhão de habitantes	21
<b>Figura 3</b>	Frequência das linhagens presentes de SARS-Cov-2 no Brasil	24
<b>Figura 4</b>	Média móvel de casos por COVID-19 na cidade de Salvador	26
<b>Figura 5</b>	Curva de amplificação do teste 4plex Bio-Manguinhos de amostras não-VOC (NVOC)	35
<b>Figura 6</b>	Curva de amplificação do teste 4plex Bio-Manguinhos para amostras VOCs Gama e Alfa	36
<b>Figura 7</b>	Número semanal de amostras testadas e proporção de validação dos testes 4plex Bio-Manguinhos.	37
<b>Figura 8</b>	Comparação da mediana de CTs dos alvos de diagnóstico positivos para SARS-CoV-2 entre as amostras validadas e invalidadas pelo ensaio 4plex Bio-Manguinhos.	38
<b>Figura 9</b>	Boxplots detalhando a idade dos pacientes para as três principais variantes detectadas	40
<b>Figura 10</b>	Razão de sexo dos pacientes testados pelo ensaio 4Plex Bio- Manguinhos entre os meses dezembro de 2020 e fevereiro de 2022	41
<b>Figura 11</b>	Frequência das linhagens do SARS-CoV-2 presentes no Estado da Bahia	42

## LIST ADE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Interpretação do ensaio discriminatório de RT-qPCR	31
<b>Quadro 2</b>	Critérios de aceitação dos controlos 4-Plex Bio-Manguinhos	32
<b>Quadro 3</b>	Cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio	34
<b>Quadro 4</b>	Sensibilidade e especificidade do alvo 69/70 no ensaio 4plex	37
<b>Quadro 5</b>	Sensibilidade e especificidade do alvo ORF1a no ensaio 4plex	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Gênero mais frequente diante as principais linhagens detectadas	42
-----------------	---	----

-

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACE2</b>	Do inglês, <i>Angiotensin Converting Enzyme II</i>
<b>BRA</b>	Brasil
<b>COVID-19</b>	Doença por coronavírus 2019
<b>CDC</b>	Do inglês, <i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
<b>CI</b>	Do inglês, Confidence Interval
<b>E</b>	Proteína de Envelope
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>HCoV</b>	Coronavírus Humanos
<b>MERS</b>	Síndrome Respiratória Aguda do Oriente Médio
<b>MRCAS</b>	Ancestrais Comuns Mais Recentes
<b>M</b>	Proteína de membrana
<b>N</b>	Proteína de nucleocapsídeo
<b>NPIs</b>	Intervenções não farmacêuticas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	Do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
<b>RT</b>	Transcriptase Reversa
<b>RBD</b>	Do inglês, <i>Receptor Binding Domain</i>
<b>R0</b>	Número de reprodução viral
<b>SARS</b>	Síndrome Respiratória Aguda
<b>SARS-CoV-2</b>	Síndrome Respiratória Aguda pelo Coronavírus 2
<b>SRAG</b>	Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>S</b>	Proteína Spike
<b>SGTF</b>	Do inglês, <i>S gene target failure</i>
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>UK</b>	Reino Unido
<b>VOCS</b>	Do inglês, <i>Variants of Concern</i>
<b>VOI</b>	Do inglês, <i>Variants of interest</i>
<b>ZA</b>	África do Sul

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA</b>	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1	CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS CORONAVÍRUS	16
2.2	SARS-COV-2: ESTRUTURA, CICLO REPLICATIVO E CLÍNICA DA DOENÇA	16
2.3	EVOLUÇÃO DO SARS-COV-2, A EMERGÊNCIA DE NOVAS LINHAGENS E O IMPACTO NA PANDEMIA DE COVID-19	19
2.4	FERRAMENTAS DE VIGILÂNCIA GENÔMICA DO SARS-COV-2	24
2.5	EPIDEMIOLOGIA EM SALVADOR	25
3	<b>OBJETIVOS</b>	28
3.1	GERAL	28
3.2	ESPECÍFICOS	28
4	<b>METODOLOGIA</b>	29
4.1	AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS	29
4.2	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	29
4.3	ENSAIOS RT-QPCR DISCRIMINATÓRIO DE VOCS	30
4.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
4.5	SEQUENCIAMENTO AMOSTRAL	34
5	<b>RESULTADOS ALCANÇADOS</b>	35
5.1	TESTAGEM DO ENSAIO 4-PLEX VOC BIO-MANGUINHOS COM AMOSTRAS CARACTERIZADAS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	35
5.2	AMOSTRAS VALIDADAS E INVALIDADAS	36
5.3	SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DO ENSAIO 4PLEX BIO-MANGUINHOS	37
5.4	PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE VOCS EM SALVADOR A PARTIR DO ENSAIO 4PLEX BIO-MANGUINHOS	38
5.5	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AMOSTRAS DE RESULTADO VÁLIDO E INVÁLIDO PARA O TESTE 4PLEX BIO-MANGUINHOS	39
5.6	ANÁLISES DEMOGRÁFICAS	41
6	<b>DISCUSSÃO</b>	44
7	<b>CONCLUSÃO</b>	48
	<b>REFERÊNCIAS</b>	49

## 1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

Em 31 de dezembro de 2019, casos de pneumonia viral de etiologia desconhecida iniciados na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, foram notificados à organização mundial da saúde (CHEN et al., 2020a; WHO, 2020a). Os pacientes infectados apresentavam sintomas clínicos sugestivos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e lesões pulmonares. Inicialmente esses casos estavam ligados geograficamente ao mercado atacadista de frutos do mar de Huanan, em Wuhan, conhecido por vender animais de caça recém abatidos, incluindo morcegos. Posteriormente o vírus responsável pelo surto foi identificado como um novo coronavírus e denominado como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) (CHAN et al., 2020; LI et al., 2020).

Como agente causador da doença por coronavírus 2019 (COVID-19), até o dia 26 de janeiro de 2020, o SARS-CoV-2 ocasionou 2.794 casos confirmados e 80 mortes por COVID-19 na China e em seguida espalhou-se de forma rápida por outros países (ZHOU et al., 2020c). No dia 11 de março de 2020 a organização mundial da saúde (OMS) declarou uma pandemia de COVID-19 com 114 países afetados, mais de 118.000 casos confirmados e aproximadamente 4,2 mil mortes por COVID-19 no mundo (WHO, 2020b).

De uma forma geral, a COVID-19 foi caracterizada por várias ondas epidêmicas no mundo. A primeira foi causada pelo SARS-CoV-2 que foi inicialmente identificado em Wuhan e se disseminou pelo mundo e as subsequentes, foram causadas por variantes genéticas do SARS-CoV-2, que começaram a surgir em diferentes pontos do globo a partir de setembro de 2020 (MARTIN et al., 2021). Por serem mais transmissíveis que a primeira versão do vírus, estas variantes genéticas causaram o colapso dos sistemas de saúde de diversos países, e em alguns causaram até mais mortes que a primeira onda. Por esta característica, estas novas linhagens genéticas do SARS-CoV-2 foram denominadas como Variantes de Preocupação (VOCs).

No Brasil, pelo menos duas ondas epidêmicas foram causadas por VOCs do SARS-CoV-2. A segunda onda nacional, causada pela VOC Gama, variante surgida no Estado do Amazonas no final de 2020 e responsável por centenas de milhares de mortes no país (NAVECA et al., 2021a) e a VOC Ômicron, introduzida no final de 2021 e responsável pela terceira onda de COVID-19 no Brasil.

Além destas, as VOCs Alfa e Delta também circularam no país, mas sem grandes consequências para a epidemia nacional da COVID-19. O surgimento das VOCs é caracterizado por um acúmulo grande de mutações benéficas no genoma do vírus, e, ocasionalmente, de deleções. O sequenciamento do genoma completo do SARS-CoV-2 é a técnica padrão-ouro para a detecção de VOCs e outras variantes virais, entretanto é um método caro e laborioso. A presença de deleções no genoma viral de algumas VOCs pode ser explorada a partir de técnicas de biologia molecular, como o RT-qPCR, em ensaios desenvolvidos para amplificar especificamente regiões genômicas com as deleções específicas de cada alvo investigado, diferenciando assim as variantes virais. Devido a seu menor custo e capacidade de processamento de várias amostras, estas técnicas podem ser muito úteis na detecção e rastreamento de VOCs.

Em Salvador, apesar de dados genômicos do SARS-CoV-2 estarem disponíveis, nenhum estudo analisou ainda a circulação de VOCs na cidade. Desta forma, este trabalho se propôs investigar, através de técnicas de RT-qPCR, a presença de diferentes VOCs em amostras da cidade de Salvador coletadas entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2022 e armazenadas no biorrepositório da Plataforma de Vigilância Molecular do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia. Nosso objetivo foi entender quando ocorreu a introdução das VOCs e qual foi a frequência de circulação delas na cidade. A constante vigilância genômica das VOCs do SARS-CoV-2, mesmo que de forma retrospectiva, pode trazer informações importantes sobre a tomada de decisões em saúde pública para diminuição da dispersão viral. Além disso, a padronização de um sistema de vigilância molecular da circulação de VOCs do SARS-CoV-2 pode contribuir no monitoramento de novos surtos ou ondas epidêmicas deste vírus, informando sobre a necessidade de adoção de medidas restritivas mais vigorosas e outras intervenções não farmacológicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS CORONAVÍRUS

Os Coronavírus (CoVs) são vírus envelopados pertencentes à família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales*, divididos em quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Os dois primeiros são conhecidos por infectar exclusivamente mamíferos e causar doenças no trato respiratório, já os dois últimos infectam majoritariamente aves e causam doenças gastrointestinais (CUI; LI; SHI, 2018). Os primeiros coronavírus humanos (HCoVs) foram descritos na década de 1960 a partir de pacientes com sintomas gripais (SU et al., 2016), desde então seis espécies de HCoVs são conhecidas sendo duas delas HCoV-229E, HCoV-NL63 pertencentes ao gênero *Alfacoronavirus* e quatro HCoV- OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV ao gênero *Betacoronavirus* (CUI; LI; SHI, 2018).

Os coronavírus ganharam mais importância para a virologia humana com o surgimento do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), descoberto no ano de 2002 em Guangdong, China (POON et al., 2004). A epidemia causada pelo SARS-CoV durou cerca de nove meses, onde 8273 casos e 775 mortes foram relatados, resultando em uma taxa de mortalidade de cerca de 10% (SU et al., 2016; TORTORICI; VEESLER, 2019; WOO et al., 2010). Posteriormente se identificou origem zoonótica do SARS-CoV em civetas de palmeira e morcegos-ferradura chineses, considerados reservatórios naturais e que eram vendidos em mercados de animais vivos na China (GE et al., 2013; LUK et al., 2019).

Dez anos após a epidemia de SARS-CoV, o vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) foi identificado na Península Arábica, no ano de 2012 tornando ainda mais patogênico que o SARS-CoV por causar pneumonia, choque séptico e insuficiência renal aguda em humanos. Investigações sub-genômicas sugerem que o vírus MERS-CoV possui uma origem em comum ao SARS-CoV, onde os dromedários foram identificados como seu possível reservatório natural, explicando assim a grande concentração de casos nos países do Oriente Médio (ZUMLA; HUI; PERLMAN, 2015).

### 2.2 SARS-COV-2: ESTRUTURA, CICLO REPLICATIVO E CLÍNICA DA DOENÇA

Com o agravamento do número de casos de um surto de pneumonia de etiologia desconhecida em Wuhan, China, em 2019, investigações metagenômicas subsequentes



determinaram que o agente etiológico responsável pertencia à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus* e ao subgênero *Sarbecovirus*. Esse novo espécime viral foi identificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus como o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), devido sua similaridade de 76-78% com o SARS-CoV, quando comparadas ambas as proteínas spike (GORBALENYA et al., 2020; WAN et al., 2020).

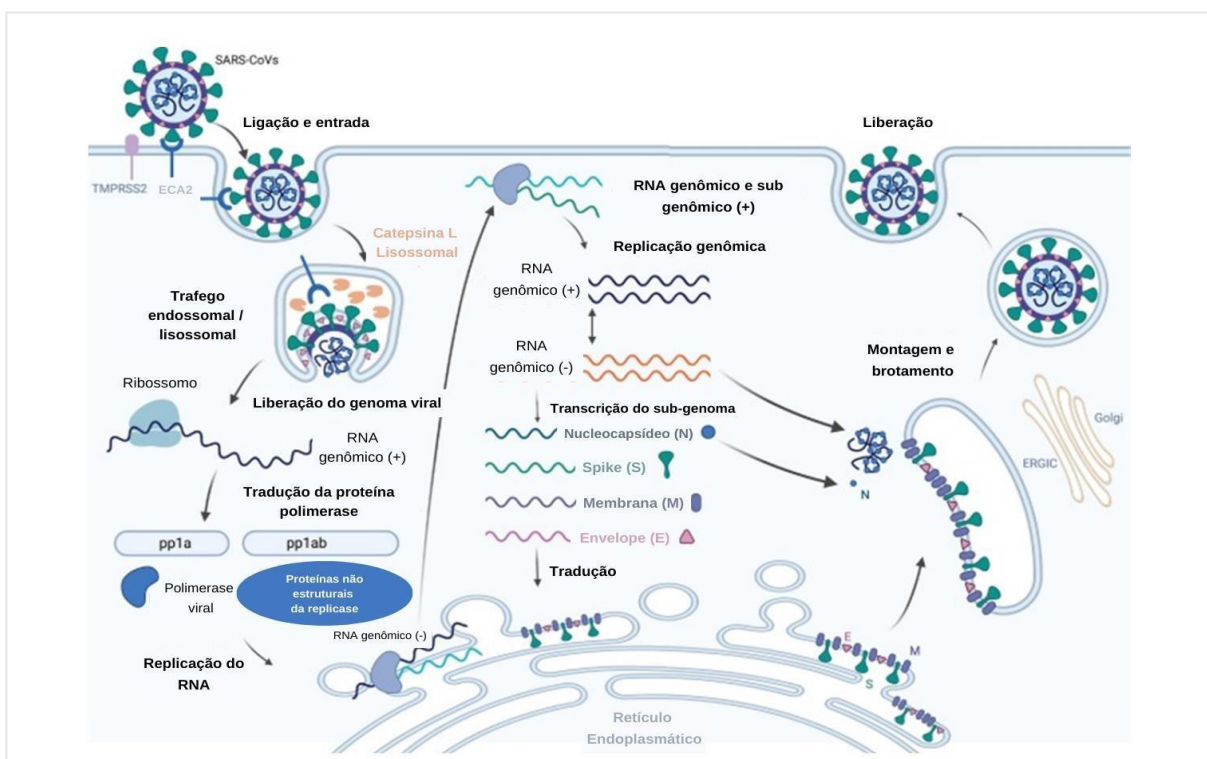
O SARS-CoV-2 possui cerca de 94,6% de identidade a um coronavírus de morcego chamado RaTG13 e 92,4% a coronavírus de pangolins, sendo essa uma evidência de uma origem natural (ANDERSEN et al., 2020; ZHOU et al., 2020b). O genoma do SARS-CoV-2 apresenta RNA fita simples de senso positivo (+)ssRNA de aproximadamente 30 mil nucleotídeos. Cerca de 2/3 de seu genoma é ocupado pelo gene ORF1ab, que codifica proteínas não estruturais (NSP). Já o outro 1/3 do genoma, próximo a extremidade 3', é composto por genes que codificam quatro proteínas estruturais (SP): *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), além de nove proteínas acessórias, todas com papéis importantes no ciclo replicativo viral (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

O SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), uma proteína transmembrana, como receptor para interação inicial com as células alvo (Figura 1) (CHEN et al., 2020a; WAN et al., 2020). Essa interação do vírus aos receptores ACE2 das células hospedeiras é promovida por uma região da proteína S chamada domínio de ligação do receptor (RBD), que ocasiona mudanças conformacionais na *spike*, expondo o sítio de clivagem entre regiões S1 e S2 para proteases da célula hospedeira. A principal dessas enzimas é a serino-protease TMPRSS2. Além disso, a proteína S do SARS-CoV-2 também possui um sítio de clivagem para a protease furina (V'KOVSKI et al., 2021). A presença deste sítio no SARS-CoV-2 é algo único entre espécies do subgênero *Sarbecovirus*, mas está presente em outros coronavírus humanos, como o MERS-CoV e o HCoV-HKU1.

A ação da furina na proteína S aumenta o potencial de transmissão do vírus e, devido a esta protease ser muito comum no organismo de vários animais, acredita-se que a presença deste sítio de clivagem no SARS-CoV-2 foi um importante passo evolutivo que determinou seu sucesso epidêmico (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; PÖHLMANN, 2020).

Seguidamente à clivagem, a cathepsina L medeia a fusão do vírus com a membrana celular na superfície (HOFFMANN et al., 2020). Após a entrada e fusão celular, o RNA genômico é então liberado no citosol onde ORF1a e 1b são traduzidos nas poliproteínas virais pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são clivadas via proteases em 16 NSPs individuais, gerando a RNA polimerase dependente de RNA (NSP12) e todas as outras enzimas do complexo de replicação

viral. Além da síntese completa do RNA genômico, cópias sub-genômicas também são sintetizadas pelo complexo de replicação. As proteínas estruturais e acessórias são então traduzidas a partir das cópias de RNA subgenômico e montadas no retículo endoplasmático. Quando maduros, os vírus recém-sintetizados são secretados da membrana celular via exocitose para formação de novas partículas virais (Figura 1) (FEHR; PERLMAN, 2015; HARRISON; LIN; WANG, 2020).



**Figura 1** - Ciclo de infecção de SARS-CoV-2 a células humanas.  
**Fonte:** Adaptada de (HARRISON, 2020)

A transmissão de SARS-CoV-2 se dá principalmente por via aérea através de gotículas respiratórias expelidas pela fala, espirros e tosse. A transmissão também pode se dar pelo contato direto, por meio de fômites ou objetos contaminados como plástico, aço inoxidável, papelão e cobre (MORAWSKA; CAO, 2020). Medidas de prevenção como a lavagem das mãos e, principalmente, o uso de máscaras são de fundamental importância para a redução da transmissão.

A apresentação clínica da infecção por SARS-CoV-2 se dá por meio da doença COVID-19, onde o vírus possui um período de incubação que varia entre 5-14 dias (LAUER et al., 2020). Os quadros leves da doença representam 81% dos indivíduos acometidos, que demonstram sintomas gripais como febre, cefaléia, tosse e coriza, além de anosmia e ageusia.

Já nos quadros graves, 14%, há ocorrência de lesões pulmonares, insuficiência renal e pneumonia, que podem evoluir para estados críticos resultando em choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e óbito (CHEN et al., 2020b).

Indivíduos de idade mais avançada são os mais acometidos pela COVID-19 severa, além disso pacientes portadores de doenças subjacentes como hipertensão, obesidade, diabetes, doenças coronárias e doenças do sistema respiratório apresentam maior risco para desfechos graves e pior prognóstico da doença, quando comparados a indivíduos sem comorbidades pré-existentes (BELLO-CHAVOLLA et al., 2021; FANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020a). A taxa de mortalidade por infecção (IFR) é, desta forma, altamente dependente da idade do indivíduo, variando de 0,001% entre indivíduos de 5-9 anos de idade, até 8,29% em indivíduos com mais de 80 anos (O'DRISCOLL et al., 2021).

O diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 é feito principalmente pela identificação do genoma do vírus ou peptídeos em amostras coletadas em trato respiratório, via *swab* nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo ou lavado broncoalveolar. A OMS recomenda principalmente a utilização de testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) e em tempo real (RT-qPCR), a fim da detecção e quantificação da carga viral. O tempo ideal de detecção molecular do vírus se dá entre o 3º e o 7º dia da infecção (WHO, 2020c).

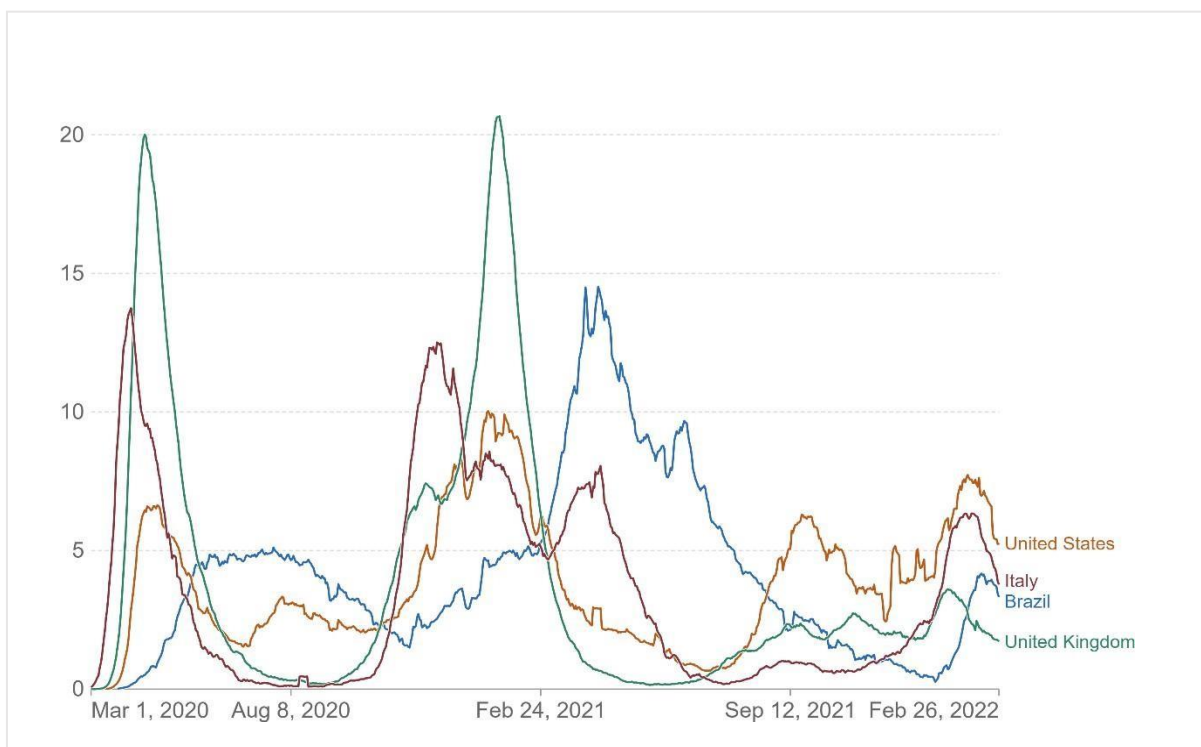
### 2.3 EVOLUÇÃO DO SARS-COV-2, A EMERGÊNCIA DE NOVAS LINHAGENS E O IMPACTO NA PANDEMIA DE COVID-19

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA e como tal ele possui uma rápida taxa evolutiva. Em geral a rápida taxa evolutiva dos vírus de RNA é dada pelo grande número de erros cometidos pela enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) no processo de replicação (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008). Esses erros são mutações que servem de matéria-prima para a evolução viral. Curiosamente, o complexo de replicação dos coronavírus possui uma função de correção de erros (ZIEBUHR, 2005). No SARS-CoV, a proteína NSP14 já foi demonstrada como responsável por tal função (MA et al., 2015) e devido à alta homologia, podemos inferir o mesmo para a NSP14 do SARS-CoV-2 (PACHETTI et al., 2020). Entretanto, devido a enorme produção viral, o SARS-CoV-2 possui ainda assim uma alta taxa evolutiva, variando entre 0,8 e  $1,0 \times 10^{-3}$  substituições por sítio por ano (TAIAROA et al., 2020). Essa rápida taxa evolutiva, faz com que o vírus esteja constantemente mudando, fazendo surgir novas variantes genéticas.

Para o entendimento do processo de diversificação do SARS-CoV-2, foram criados diferentes esquemas de classificação do vírus, que variam em sua abrangência e detalhamento. Um dos esquemas mais utilizados agrupa as variantes do SARS-CoV-2 em linhagens e tem por objetivo detectar o surgimento de novas variantes, mesmo que inicialmente elas apenas tenham importância local (RAMBAUT et al., 2020b). Este esquema, chamado de *Pango Lineages*, já identificou mais de mil linhagens diferentes do SARS-CoV-2 circulando no mundo. A maioria delas teve apenas uma circulação local, enquanto outras foram bem-sucedidas em espalhar-se globalmente.

Seguindo este esquema, as linhagens A e B foram as primeiras identificadas em Wuhan, em 2019. A linhagem B.1 é uma derivação da B e foi responsável por iniciar a pandemia (KORBER et al., 2020). B.1 possui uma mutação na região RBD da proteína *Spike*, identificada como D614G, uma substituição de ácido aspártico (D) por glicina (G) na posição 614 da proteína. Esta mutação está fortemente associada ao aumento da infecciosidade viral, promovendo maior potencial de disseminação dessa variante (DI GIALLONARDO et al., 2020; KORBER et al., 2020; KOYAMA; PLATT; PARIDA, 2020; VIDAL et al., 2021). B.1 gerou mais de 70 linhagens descendentes como a B.1.1, B.1.2 e assim sucessivamente.

A primeira onda de COVID-19 no mundo foi causada pela variante B.1 e suas sub-linhagens. Após o surgimento do SARS-CoV-2 na China, o primeiro país a enfrentar uma grande epidemia de COVID-19 foi a Itália, registrando seu primeiro caso em 30 de janeiro de 2020. Em março de 2020, a Itália se tornou o novo epicentro da pandemia, quando notificou um pico de 814 mortes em um único dia. Ao final da primeira onda epidêmica, o país notificou cerca de 240.000 casos e 34.000 mortes por COVID-19, que ocorreram em grande maioria na região norte do país (DI GIALLONARDO et al., 2020). O SARS-CoV-2 logo se espalhou pelo restante da Europa, e países como Espanha, Reino Unido e França tiveram epidemias da mesma magnitude registrada na Itália (MACHHI et al., 2020). Os Estados Unidos também foram afetados mais ou menos na mesma época, sendo o pior momento de sua primeira onda, o mês de abril. De uma forma geral, a primeira onda de COVID-19 no hemisfério norte durou de março a agosto de 2020, gerando cerca de 857.408 óbitos nos Estados Unidos e mais 147.621 óbitos na Europa com um aumento de 15.121 mortes em uma semana (Figura 2) (<https://covid19.who.int/?mapFilter=deaths>).



**Figura 2** - Média móvel (7 dias) de mortes de COVID-19 confirmadas por milhão de habitantes.

**Fonte:** (RITCHIE, 2020).

O primeiro registro de infecção por SARS-CoV-2 no Brasil foi notificado em 25 de fevereiro de 2020 no estado de São Paulo, através da introdução de linhagens europeias (PAIVA et al., 2020). Durante o início do ano de 2020, as linhagens B.1 e B.1.1 se disseminaram via transmissão comunitária resultando no surgimento de duas novas linhagens nacionais, denominadas B.1.1.28 e B.1.1.33 (CANDIDO et al., 2020; RESENDE et al., 2021). Essas novas linhagens foram transmitidas com sucesso por todo o país sendo predominantes dentre os casos registrados na primeira onda epidêmica da COVID-19. O crescimento exponencial da primeira onda no Brasil se deu a partir do mês de março, o número máximo de mortes foi registrado entre os meses de junho e julho de 2020, quando a epidemia permaneceu num platô de cercade 1.000 mortes por dia. A primeira onda da COVID-19 no Brasil durou até aproximadamente o início de novembro de 2020, quando cerca de 160.000 mortes já haviam sido reportadas (Figura 2).

A chegada do outono no hemisfério norte fez novamente os casos de COVID-19 aumentarem na Europa e nos Estados Unidos, iniciando-se uma segunda onda (Figura 2). Esta, foi acelerada pelo surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2, mas transmissíveis, acarretando o crescimento rápido de casos no hemisfério norte, fazendo a segunda onda ser ainda pior que a primeira em muitos países. O mesmo aconteceu no Brasil entre os meses de novembro e dezembro, quando uma nova variante do vírus surgiu no estado do Amazonas e posteriormente espalhou-se por todo o país (GRÄF et al., 2022).

Em setembro de 2020 o Reino Unido identificou a primeira variante de preocupação do SARS-CoV-2, notificada como VOC pela OMS em 18 de dezembro de 2020 (WHO, 2020d). A VOC B.1.1.7, atualmente nomeada pela OMS como Alfa apresentou importantes mutações na proteína Spike, entre elas a N501Y presente no RBD do vírus, que a confere uma maior transmissibilidade e letalidade (DAVIES et al., 2021). Alfa se disseminou em quase todos os países do mundo tornando-se a mais prevalente em vários países da Europa e América do Norte, aumentando o número de casos e óbitos pela COVID-19 e sendo responsável pela segunda onda epidêmica desses países (VOLZ et al., 2021). No Reino Unido o pico de mortes decorrentes da VOC Alfa se deu no mês de janeiro de 2021 onde foram registrados cerca de 21 óbitos por milhão de habitantes (Figura 2).

Quase ao mesmo tempo da descoberta da VOC Alfa, uma segunda VOC foi detectada na África do Sul, ocasionando a segunda onda epidêmica no país com pico de casos registrados em meados do mês de julho com mais de 7.000 óbitos notificados por semana (TEGALLY et al., 2021). Designada como linhagem B.1.351, conhecida como Beta, a nova VOC compartilha da mutação N501Y com a VOC Alfa, mesmo possuindo origens distintas, sendo essa mutação resultado de convergência evolutiva. Além da N501Y Beta carrega outras mutações importantes em sua proteína S, destacando-se a K417N, e E484K. Estas três mutações ficam na região RBD da *Spike* e além de aumentarem a afinidade do vírus pelo receptor ACE2, facilitam a evasão do vírus a anticorpos neutralizantes. (PAVLOVA et al., 2021; RAMBAUT et al., 2020a; TEGALLY et al., 2020). A VOC Beta se distribuiu por diversas províncias da África do Sul predominando no Cabo Oriental e Cabo Ocidental e ocasionando aumentos significativos no número de novas infecções e taxa de transmissão, quando comparados com a primeira onda do país (TEGALLY et al., 2020).

Durante a primeira onda de SARS-CoV-2 no Brasil a linhagem B.1.1.28 se disseminou em todo o país e dela surgiu a linhagem P.1, também conhecida como VOC Gama. Esta foi primeiramente identificada no Japão em janeiro de 2021, em viajantes retornando do estado do Amazonas (FUJINO et al., 2021). Pesquisas posteriores mostraram que Gama surgiu provavelmente no final de novembro em Manaus, e possui 21 novas mutações, sendo 10 na proteína *Spike* (NAVECA et al., 2021a). Entre as mutações mais preocupantes estão algumas que surgiram na região RBD da *Spike*, como a N501Y, também presente nas VOC's Alfa e Beta e associada a um aumento da afinidade do vírus pelo receptor ACE2, e a mutação E484K, também presente na VOC Beta e associada com um aumento da capacidade de evasão do sistema imune (NELSON et al., 2021).

A VOC Gama foi identificada em 74% das amostras rastreadas na primeira quinzena

de janeiro de 2021 no Amazonas, associando-se como a forma predominante na segunda onda de COVID-19 no Brasil, iniciada nos meados de novembro de 2020 e sendo a terceira VOC identificada no mundo (NAVECA et al., 2021a). O afrouxamento de medidas de distanciamento social entre setembro e outubro de 2020 em Manaus e uma crescente circulação do vírus podem ter promovido o acúmulo de mutações necessárias ao surgimento da VOC Gama (MS, 2021). A VOC Gama se espalhou rapidamente pelo Brasil e em janeiro de 2021, praticamente todos os estados já possuíam circulação local desta variante (GRÄF et al., 2022). A segunda onda epidêmica no Brasil, em decorrência da VOC Gama, se iniciou em dezembro de 2020, com uma rápida ascensão do número de casos, e teve uma queda lenta que durou até o final de 2021 (Figura 2). Ela foi cerca de duas vezes maior que a primeira onda, onde em 31 de dezembro de 2021 o Brasil já registrava mais de 618.817 óbitos acumulados por COVID-19 com uma média de 171 óbitos por dia (WHO, 2022).

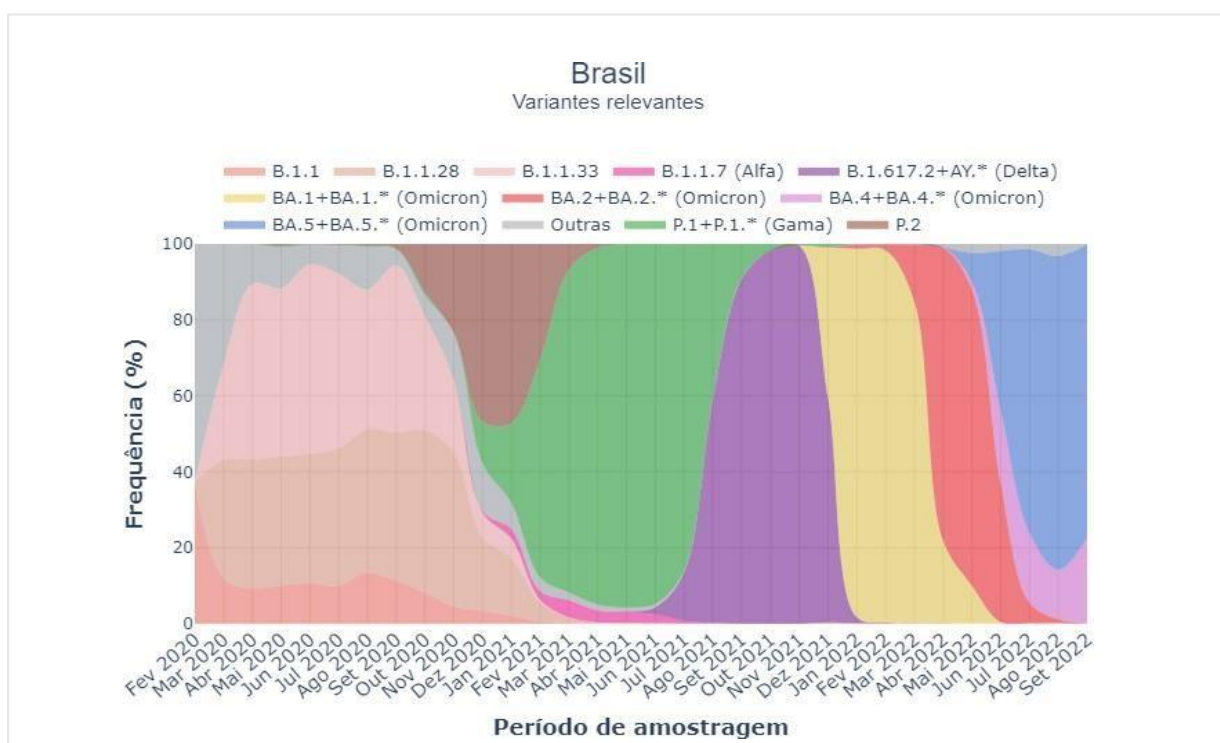
A quarta variante de preocupação, B.1.617.2, também conhecida como VOC Delta, foi primeiramente identificada no estado de Maharashtra na Índia em dezembro de 2020 e logo se expandiu pelo mundo, superando a predominância da VOC Alfa e sendo responsável pela terceira onda de COVID-19 em muitos países (MLCOCHOVA et al., 2021). Primeiramente Delta foi identificada como uma variante de interesse (VOI) ao final de abril de 2021, porém em decorrência da rápida disseminação pelo globo e do seu elevado poder transmissibilidade, devido à presença de mutações importantes na proteína *Spike* como a L452R e P681H, Delta foi considerada pela OMS uma variante de preocupação no mês de maio de 2021 (WHO, 2020e). A VOC Delta se disseminou na Índia também no mês de maio, onde o país registrou um pico de amostras positivas no dia 3 de maio com 2.738.957 casos notificados e um pico de óbitos no dia 17 de maio onde foram registradas cerca de 28.982 mortes em apenas um dia (<https://covid19.who.int/region/amro/country/br>).

A dispersão de Delta para a Europa e América do Norte resultou numa nova onda de mortes por COVID-19, porém menos impactante que as ondas anteriores (Figura 2), devido às campanhas de vacinação que já estavam bastante avançadas em muitos países (TELENTI; HODCROFT; ROBERTSON, 2022). No Brasil, Delta também dominou a diversidade genética do SARS-CoV-2, sobrepondo a VOC Gama ao se tornar a variante mais frequente a partir do mês de agosto de 2021 (Figura 3), apesar dessa predominância, Delta não gerou um aumento significativo do número de casos e mortes pela COVID-19, que seguiram em queda até o surgimento da quinta VOC, Ômicron (Figura 2).

Também conhecida como, B.1.1.529, a VOC Ômicron foi primeiramente identificada na província de Gauteng, na África do Sul, em 23 de novembro de 2021 após um aumento

significativo no número de casos de COVID-19 no país (VIANA et al., 2022). Ômicron foi rapidamente reconhecida como VOC devido possuir mais de 30 mutações na proteína *Spike*, conferindo um aumento de transmissibilidade e, principalmente, alta capacidade de escape do sistema imune (TELENTI; HODCROFT; ROBERTSON, 2022). Ômicron foi responsável pela quarta onda de COVID-19 em muitos países que registraram recordes de números de casos de COVID-19, mas com menor letalidade se comparado às ondas anteriores (Figura 2).

No Brasil a VOC Ômicron foi detectada no final do mês de dezembro de 2021 e rapidamente se tornou a variante dominante (Figura 3). O pico de amostras positivas deu entre os meses janeiro e fevereiro de 2022, onde nesses meses 269.968 casos e 799 óbitos e 298.408 casos e 1.523 óbitos foram registrados respectivamente (<https://covid19.who.int/region/amro/country/br>).



**Figura 3** - Frequência das linhagens do SARS-Cov-2 presentes no Brasil.  
**Fonte:** (FIOCRUZ, 2022)

#### 2.4 FERRAMENTAS DE VIGILÂNCIA GENÔMICA DO SARS-COV-2

O sequenciamento genômico do vírus foi e tem sido uma ferramenta de extrema importância no monitoramento da pandemia. Nunca se acompanhou tão de perto a evolução de um patógeno humano, seus padrões de dispersão mundial e adaptação ao sistema imune do hospedeiro. Isso só foi possível devido aos mais de 10 milhões de genomas do SARS-CoV-2



gerados no mundo todo e disponibilizados publicamente na plataforma GISAID (<https://gisaid.org/submission-tracker-global/>). Entretanto, devido aos custos e complexidade dos métodos de sequenciamento, a cobertura de genomas é muito heterogênea no mundo. Enquanto a Dinamarca sequenciou cerca de 18% de todos os casos de COVID-19, o Brasil sequenciou apenas 0,5%. Esse dado mostra a importância da utilização de métodos alternativos e mais acessíveis de monitoramento da introdução e circulação de novas variantes virais.

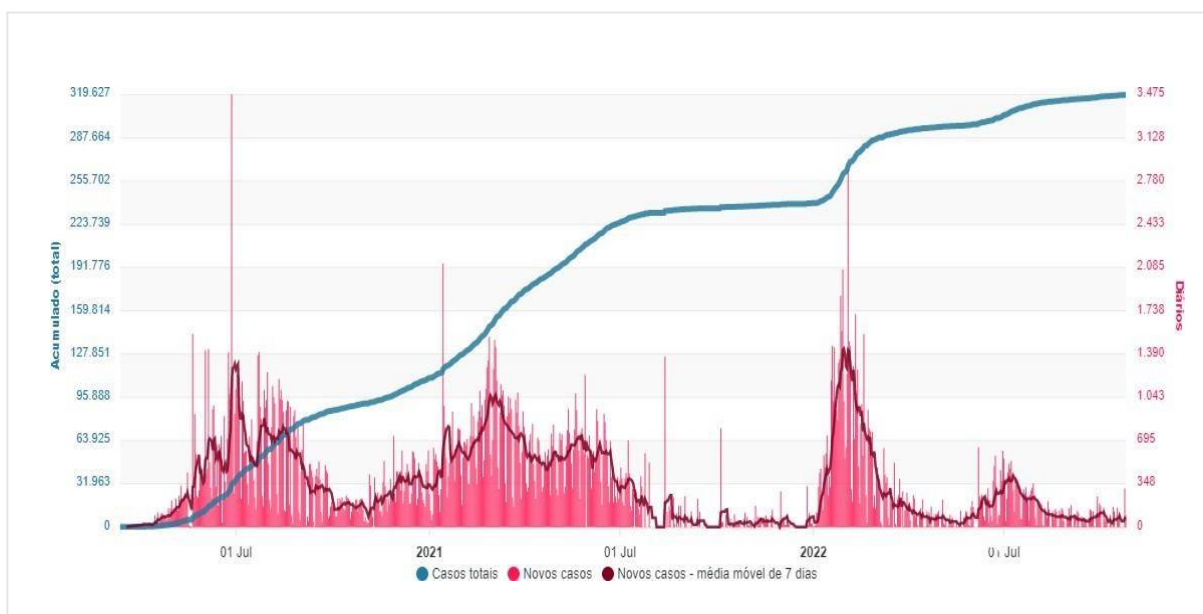
A rápida emergência das variantes virais de SARS-CoV-2 exigem meios de detecção mais rápidos e acessíveis. Com essa finalidade, ensaios de RT-qPCR foram desenvolvidos e validados com ênfase na detecção das deleções presentes nos genomas de algumas VOCs específicas (VOGELS et al., 2021). Diferente de mutações de ponto, deleções são grandes modificações no genoma do vírus que podem alterar a capacidade de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e as sondas em reações de PCR. Essa propriedade tem sido usada no desenvolvimento de métodos capazes de inferir a presença de VOCs pelo padrão de amplificação de regiões do genoma do SARS-CoV-2 com deleções. Essa via de monitoramento pode beneficiar de forma significativa a vigilância epidemiológica da COVID-19, possibilitando a detecção precoce de variantes virais com um padrão de deleções distinto da variante dominante no momento e então encaminhando esta amostra para o sequenciamento do genoma viral completo para o estudo em detalhes das mutações (CHUNG et al., 2022). Além disso, este método também é útil para estudar a circulação de VOCs em uma localidade e entender melhor o padrão de introduções e substituição de variantes a partir de uma amostragem maior que a possível de ser sequenciada.

## 2.5 EPIDEMIOLOGIA EM SALVADOR

Após a declaração de Emergência em Saúde Pública, a cidade de Salvador entrou em alerta se preparando para a chegada do SARS-CoV-2 e passou a informar boletins diários de monitoramento de casos na Bahia. No dia 11 de março de 2020, mesma data em que a COVID-19 foi considerada uma doença pandêmica, Salvador notificou seu primeiro caso suspeito, sendo ele importado devido histórico de viagem à Europa (SMS, 2020a). No fim do mês de março 131 novos casos de COVID-19 foram detectados, sendo 45 importados e 42 via transmissão comunitária. Devido aos casos comunitários, a prefeitura passou a adotar medidas de isolamento domiciliar a partir da restrição de circulação da população, com propósito de diminuir a transmissão comunitária e mitigar a ocorrência de novos casos, que

consequentemente evitariam os colapsos no sistema de saúde (SMS, 2020b). No final de maio, Salvador registrou 446 óbitos de COVID-19, onde 44,6% (386/446) dos indivíduos apresentavam histórico de comorbidades. As doenças mais notadas por fatores de risco na cidade foram hipertensão 89,5% (128/143) e a obesidade 10,5% (15/143) (SMS; CIEVS SSA, 2020a).

O mês de junho marcou o maior pico da primeira onda de COVID-19 na cidade de Salvador notificando 1.993 novos casos em um único dia (**Figura 4**) e um aumento de 22% dos casos e 13% dos óbitos, quando comparados a semanas epidemiológicas anteriores (SMS; CIEVS SSA, 2020b). Até o final de agosto, Salvador registrou cerca de 2.347 óbitos por COVID-19 e 76.415 novos casos de COVID-19 (<http://www.saude.salvador.ba.gov.br/covid/indicadorescovid/>).



**Figura 4** - Média móvel de casos por COVID-19 na cidade de Salvador.  
**Fonte:** (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE, 2023)

A segunda onda de COVID-19 na cidade de Salvador iniciou em novembro de 2020, quando os casos começaram a aumentar, chegando a uma média móvel com mais de 1000 novos casos registrados por dia (**Figura 4**). Após o pico de casos em junho, onde houve no dia 27 o registro de 3.475 casos confirmados, a taxa de crescimento de novos casos ficou estável até o início de janeiro de 2021, quando começou a subir novamente. No mês de março de 2021, o pior momento da segunda onda em Salvador, a cidade chegou a notificar uma média móvel de 1.061 novos casos e 48 mortes por dia (<https://covid19br.wcota.me>).

Até o final da segunda onda na cidade, por volta de agosto de 2021, Salvador já havia acumulado cerca de 7,7 mil óbitos por COVID-19. A terceira onda na cidade de Salvador foi marcada pela VOC Ômicron, onde ocorreram nos meses de janeiro e fevereiro de 2022 um aumento acentuado na média móvel de casos por semana para mais de 1.500 registros (**Figura 4**). Ao todo, os meses de janeiro e fevereiro acumularam 262.212 casos e 8.170 óbitos e 286.295 casos e 8.516 óbitos, respectivamente (<https://covid19br.wcota.me>).

Até o momento não há ainda estudos específicos em Salvador a respeito das variantes circulantes de SARS-CoV-2. Dados da Bahia disponíveis no site da Rede Genômica da Fiocruz, mostram que a VOC Gama se tornou a dominante a partir de março de 2021 (<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>). Entretanto, um estudo de vigilância molecular do SARS-CoV-2 em Salvador detectou, ainda em dezembro de 2020, a VOC Gama em casos importados do Amazonas (DE SIQUEIRA et al., 2021). Além disso, casos da VOC Alfa com provável transmissão local também já foram relatados no estado da Bahia (<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>), mas sem uma maior caracterização de sua frequência e dinâmica de dispersão. Portanto, neste estudo, através de técnicas de PCR, pretendemos investigar a presença de VOCs em amostras positivas para SARS-CoV-2 de Salvador, avaliando a viabilidade da técnica e provendo dados complementares aos gerados pelo sequenciamento genômico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a circulação de variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 através de um método de RT-qPCR discriminatório e caracterizar os dados demográficos e espaço-temporais das amostras testadas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Aplicar um ensaio de RT-qPCR capaz de diferenciar amostras positivas para VOCs do SARS-CoV-2;
- II. Avaliar a capacidade do teste em gerar resultados confiáveis em comparação com o sequenciamento genômico.
- III. Caracterizar a proporção de VOCs entre as amostras testadas em Salvador, a partir do mês de dezembro de 2020;
- IV. Caracterizar as amostras positivas para VOCs com dados demográficos e clínicos do paciente, quando disponíveis.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS

As amostras selecionadas para o projeto foram provenientes do biorrepositório da Plataforma de Vigilância Molecular do Instituto Gonçalo Moniz (PVM-IGM), Fiocruz- BA, que fornece para os pacientes residentes em Salvador um serviço de diagnóstico molecular para COVID-19 em cooperação com a Prefeitura de Salvador, Hospitais Aeroporto e Teresa de Lisieux, Escola Baiana de Medicina (ADAB) e o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFBA). A partir do biorrepositório da Plataforma de Vigilância foram incluídas todas as amostras com o diagnóstico positivo para o vírus SARS-CoV-2, de pacientes residentes em Salvador, recebidas a partir do mês de dezembro de 2020, quando se estima que a VOC Gama foi introduzida na cidade, ao mês de fevereiro de 2022. O diagnóstico das amostras realizado pela PVM ao longo da pandemia contou com diversos kits de detecção como Seegene, IBMP, CDC *in house* e Bio-Manguinhos EDx, todos visando alvos estruturais do vírus SARS-CoV-2 e utilizando genes endógenos para o rastreamento de qualidade da extração dos materiais genéticos.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o parecer 30162720.8.0000.0040. Uma autorização de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtida junto ao CONEP.

### 4.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

As extrações do material genético de SARS-CoV-2 foram realizadas em nível de Biossegurança 2 (NB-2), utilizando o kit comercial automatizado MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). O RNA viral foi obtido a partir de 200µL de amostras coletadas via nasofaringe, inseridas em meio de transporte viral (VTM). A aquisição do material genético da amostra foi realizada em placas *Deep Well* de 96 poços preparados em fluxo laminar, sendo duas delas voltadas para tampões de lavagem (Lavagem 1 e Lavagem 2), uma para amostras e uma para eluição final. Primeiramente 265 µL de *Binding Solution* e 200 µL de amostra foram adicionados em cada poço para uma posterior incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. Enquanto a incubação ocorria, realizavam-se as preparações das placas de reagentes: Lavagem 1, adicionando 500µL de *Wash Buffer*; Lavagem 2, adicionando 1000 µL de etanol 80% preparado

a fresco e a placa de eluição adicionando 50  $\mu$ L de *Elution Solution*. As placas eram em seguida seladas e reservadas até a preparação total da placa de amostras. Após a incubação da placa de amostras, eram adicionados 5  $\mu$ L de Proteinase K, 10  $\mu$ L de *Magnetic Beads* e 25  $\mu$ L de controle exógeno por amostra. Após a preparação de todas as placas, elas eram inseridas na máquina King Fisher Flex (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) e o protocolo de extração automatizada para alvo viral era então ativado. Ao fim do processo se obtinham 50  $\mu$ L de eluição final do material genético para os posteriores ensaios de amplificação em tempo real (RT-qPCR).

Além do kit comercial semi automatizado MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), também foram utilizados para algumas amostras os kits Zymo Research Quick-RNA Viral (Biomedical Products Services, California, Estados Unidos) e Maxwell RSC simply RNA Tissue (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos), seguindo os protocolos preconizados pelos fabricantes.

#### 4.3 ENSAIOS RT-QPCR DISCRIMINATÓRIO DE VOCS

O teste utilizado neste projeto foi o ensaio molecular RT-qPCR SARS-CoV-2 4-Plex VOCs Bio-Manguinhos (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brasil), projetado para detectar a presença de VOCs através de mutações específicas em seus genomas. O ensaio detecta a presença de uma deleção de nove nucleotídeos no gene NSP6 da região ORF1a, relativo às posições nucleotídicas 11288-11296 do genoma e aos aminoácidos S106, G107 e F108 da região ORF1a. Essa deleção denominada neste trabalho como (ORF1a) está presente nas VOCs Alfa, Beta, Gama e Ômicron (BA.2) e só é encontrada em 0,03% de outros genomas. Além disso, o ensaio também detecta uma deleção de seis nucleotídeos na proteína Spike (denominada Spike\_69/70, relativo às posições nucleotídicas 21765-21770 do genoma e aos aminoácidos H69 e V70 presente nas VOCs Alfa e Ômicron (BA.1, BA.4 e BA.5). No método utilizado pelo ensaio, os primers da reação flanqueiam as regiões de interesse, amplificando-as, enquanto as sondas se anelam as regiões de possível deleção do genoma. A ausência de detecção da fluorescência significa a presença das deleções e a sugestão da identificação das variantes nas amostras. O Quadro 1 apresenta o algoritmo de interpretação dos resultados.

Devido ao fato de diferentes VOCs poderem apresentar padrões iguais de deleções, utilizamos também a data de coleta da amostra como informação para definir cada variante. Essas datas são baseadas em dados da Rede Genômica da Fiocruz sobre a circulação de

variantes do SARS-CoV-2 no Brasil (<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>).

**Quadro 1** - Interpretação do ensaio 4-Plex VOC Bio-Manguinhos

RESULTADOS	DETECÇÃO	RNAseP	Spike_69/70	ORF1a	N
Não VOC	Até 01/07/2021	CT ≤ 35	CT ≤ 35	CT ≤ 35	CT ≤ 40
Potencial Alfa	Até 30/11/2021	CT ≤ 35	Indetectável	Indetectável	CT ≤ 40
Potencial Gama	Até 31/12/2021	CT ≤ 35	CT ≤ 40	Indetectável	CT ≤ 40
Potencial Delta	A partir de 01/07/2021	CT ≤ 35	CT ≤ 40	CT ≤ 40	CT ≤ 40
Potencial Ômicron BA.1	A partir de 01/12/2021	CT ≤ 35	Indetectável	Indetectável	CT ≤ 40
Potencial Ômicron BA.2	A partir de 01/01/2022	CT ≤ 35	CT ≤ 40	Indetectável	CT ≤ 40
Outra linhagem	-	CT ≤ 35	CT ≤ 40	CT ≤ 40	CT ≤ 40
Inconclusivo	Não aplicável	CT > 35	Qualquer valor	Qualquer valor	CT > 40

**Fonte:** Elaborado pela autora

As amplificações das amostras com o ensaio 4plex Bio-Manguinhos, foram realizadas em um formato quadriplex (detecção de quatro alvos), com sondas do tipo TaqMan. No presente ensaio o controle positivo (CP) foi implementado a partir de um RNA purificado de um pool de amostras sem as deleções citadas (perfil selvagem), permitindo à amplificação dos 4 alvos, que deveriam sempre amplificar para a validação das corridas. Além dos oligonucleotídeos para a detecção das deleções, o ensaio também amplifica uma região do gene N do SARS-CoV-2 (que deve amplificar independente da variante) e um gene constitutivo humano RNAse P (RP), utilizado como controle interno (CI) de extração e qualidade das amostras testadas. Para serem consideradas validadas, todas as amostras deveriam possuir os alvos RP e N com CT maior que 0 e menor ou igual a 40, caso não, eram consideradas invalidadas e sua amplificação de material viral era repetida. Nos casos em que o alvo N amplificava dentro dos parâmetros e o alvo RP não amplificou, as amostras eram consideradas positivas devido o alvo N ser o principal alvo de interpretação das corridas (Quadro 2). Para o preparo do Master Mix (MM) foram adicionados a um tubo de 2,0 ml, primerse sondas numa concentração de trabalho de 10 µM, que tinham como alvo (I) o gene constitutivo humano RNAse P (ROX); (II) Gene SARS-CoV-2 N (VIC); (III) deleção

presente na região ORF1a do gene NSP6 (Cy5); e (IV) a deleção presente no gene Spike (FAM). No tubo para uma reação o protocolo com a versão disponibilizada para este trabalho preconizou 3,75 µL da mistura de PCR e 6,25 µL do Mix Primers e Probes. Em seguida 10 µL da reação preparada eram adicionados a placa de amplificação juntamente com 10 µL de amostras previamente extraídas e os controles em cada poço.

**Quadro 2** - Critérios de aceitação dos controles 4-Plex Bio-Manguinhos

Controles	Ct	Resultados
Negativo	Não detectado para todos os alvos virais e detectado para o alvo RP	<b>Rotina válida</b>
	Detectado com $Ct \leq 40$ para qualquer um dos alvos	<b>Rotina inválida</b> *Repetir o teste por possível contaminação.
Positivo	$Ct \leq 40$ para o alvo N	<b>Rotina válida</b>
	$Ct \leq 35$ para o alvo RP	<b>Rotina válida</b>
	$Ct > 35$ para o alvo RP	<b>Rotina inválida</b> *Repetir o teste

Fonte: Elaborado pela autora

Após a preparação da mistura de PCR com o mix de *primers* e *probes*, as placas de reação óptica eram seladas, levadas a vórtex a fim de homogeneizar as misturas por 2 minutos a 1200 rpm, e centrifugação por 30 segundos para retirada de possíveis bolhas/gotículas. As corridas de amplificação dos materiais foram realizadas nos equipamentos Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems e QuantStudio-5 PCR Systems das plataformas de sequenciamento e vigilância molecular (PVM) do Instituto Gonçalo Moniz. A ciclagem preconizada pelo fabricante para as amplificações foi 50°C por 15 minutos para transcrição reversa e conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), 95°C por 2 minutos para o processo de desnaturação do RNA e ativação da Taq polimerase, seguida por 40 ciclos de 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C para a ligação total dos primers e probes e as amplificações dos alvos. Os resultados das corridas foram analisados através do software QuantStudio™ Design and Analysis Software versão 2.6. Como linha de base para o ensaio o protocolo estabelece parâmetros de leitura das amplificações com *Cycle Threshold* de 30.000 e escala eixo Y do gráfico com valor mínimo de 1.000 e máximo de 2.000.000 para todos os alvos, *Baseline (start: 3, end:10)* para os alvos Ne Spike\_69/70, *Baseline (start: 3, end:15)* para o alvo RNase P e *Baseline (start: 1, end: 9)* para o alvo ORF1a.



#### 4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após as etapas de processamento e extração das amostras, amplificação em PCR tempo real e interpretação dos resultados conforme protocolo do teste, os resultados das corridas foram exportados em formato tsv e posteriormente unificados em um arquivo contendo o número da corrida, identificação (ID) Fiocruz da amostra, data de coleta e resultados de Ct dos alvos (Spike\_69/70, ORF1a, N e RP). Estes dados brutos foram importados e analisados no programa RStudio versão 4.2.0 (<https://www.rstudio.com>), que utiliza a linguagem R.

Devido a constante evolução do SARS-CoV-2 e a chegada de novas VOCs ao longo da pandemia, com perfis similares de deleções, além do resultado de amplificação dos alvos de PCR, foram considerados também a data de coleta das amostras a fim da diferenciação precisa de variantes com os mesmos perfis de deleções como as VOCs Gama e Ômicron BA.2, Alfa e Ômicron BA.1, perfil NVOC e Delta (Quadro 1). As datas consideradas para cada variante foram baseadas no primeiro registro de detecção dos genomas conforme o painel de monitoramento de variantes da Rede Genômica Fiocruz (<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboardpt/>). Após a execução do algoritmo de identificação de VOCs, separamos os resultados das amostras validadas e invalidadas e em seguida calculamos a frequência (%) de cada variante na cidade de Salvador, entre os meses de dezembro de 2020 e fevereiro de 2022. Para tanto, utilizamos o pacote ggplot2 (disponível na linguagem R) a fim de construir gráficos demonstrando a variação da frequência por mês, a proporção de VOCs detectadas e o número de amostras testadas por semana.

Para fim de avaliar o desempenho do ensaio 4plex Bio-Manguinhos em detectar a presença das VOCs, foram realizados cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. A capacidade do teste em detectar a presença ou ausência das deleções Spike\_69/70 e ORF1a foi comparada ao sequenciamento genômico de algumas amostras, por esse método ser considerado o padrão-ouro para identificação de variantes do SARS-CoV-2. A sensibilidade (proporção de resultados verdadeiros positivos para a presença das deleções), e especificidade (proporção de resultados verdadeiros negativos para a ausência das deleções) foram calculados conforme o Quadro 3, onde a sensibilidade é dada pela fórmula  $a/a+b$  e especificidade pela fórmula  $d/c+d$ . A acurácia (proporção dos resultados com a classificação correta) do teste foi calculada considerando os dois alvos (Spike\_69/70 e ORF1a) por meio da razão entre o número de testes assertivos e o total de testes realizados  $(a+d/a+b+c+d)$ .

**Quadro 3** - Cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia do ensaio

Resultados do ensaio	Resultados do Sequenciamento		Total
	Presença da deleção	Ausência da deleção	
Presença da deleção	(a) Coincidem em encontrar a deleção (VP)	(b) 4 plex detecta, mas o sequenciamento não detecta a deleção (FP)	a+b
Ausência da deleção	(c) 4 plex não detecta, mas o sequenciamento detecta (FN)	(d) Coincidirem em não encontrar a deleção (VN)	c+d
<b>Total</b>	<b>a+c</b>	<b>b+d</b>	<b>a+b+c+d</b>

Fonte: Elaborado pela autora

Também realizamos uma comparação dos CTs de diagnóstico para COVID-19 (de acordo com os com os alvos utilizados pela plataforma de vigilância molecular da Fiocruz Bahia) entre as amostras validadas e invalidadas pelo método 4plex de diferenciação de VOCs. A normalidade da distribuição dos dados foi testada pelo método de Shapiro-Wilk e a comparação das médias foi feita através do teste não paramétrico de Wilcoxon. Por fim, realizamos a caracterização da distribuição de sexo e idade dos pacientes entre variantes não-VOC e as VOCs Gama e Ômicron BA.1, que foram as variantes mais frequentemente detectadas nas amostras estudadas no presente trabalho. A distribuição da idade foi visualizada através de gráficos de boxplot (utilizando o pacote do R ggplot2) e a distribuição do dado qualitativo sexo foi feito em tabelas de contingência com teste Qui-quadrado de Person aplicado para analisar se as frequências se desviam do esperado (utilizando o pacote do R gmodels).

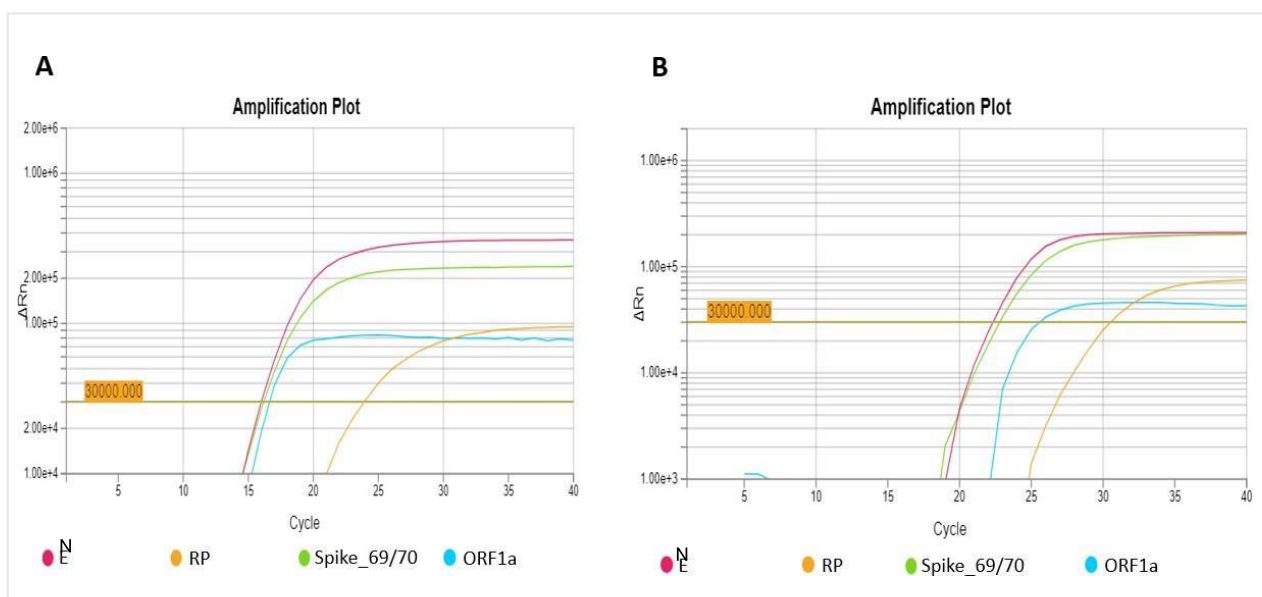
#### 4.5 SEQUENCIAMENTO AMOSTRAL

Para confirmação do ensaio discriminatório, um grupo representativo das amostras positivas para VOCs com parâmetros de ct inferior a 25 obtiveram seu genoma totalmente sequenciado pela Plataforma de Vigilância molecular através da utilização do sistema COVIDseq (Illumina, CA, USA) em um equipamento MiSeq.

## 5 RESULTADOS ALCANÇADOS

### 5.1 TESTAGEM DO ENSAIO 4-PLEX VOC BIO-MANGUINHOS COM AMOSTRAS CARACTERIZADAS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

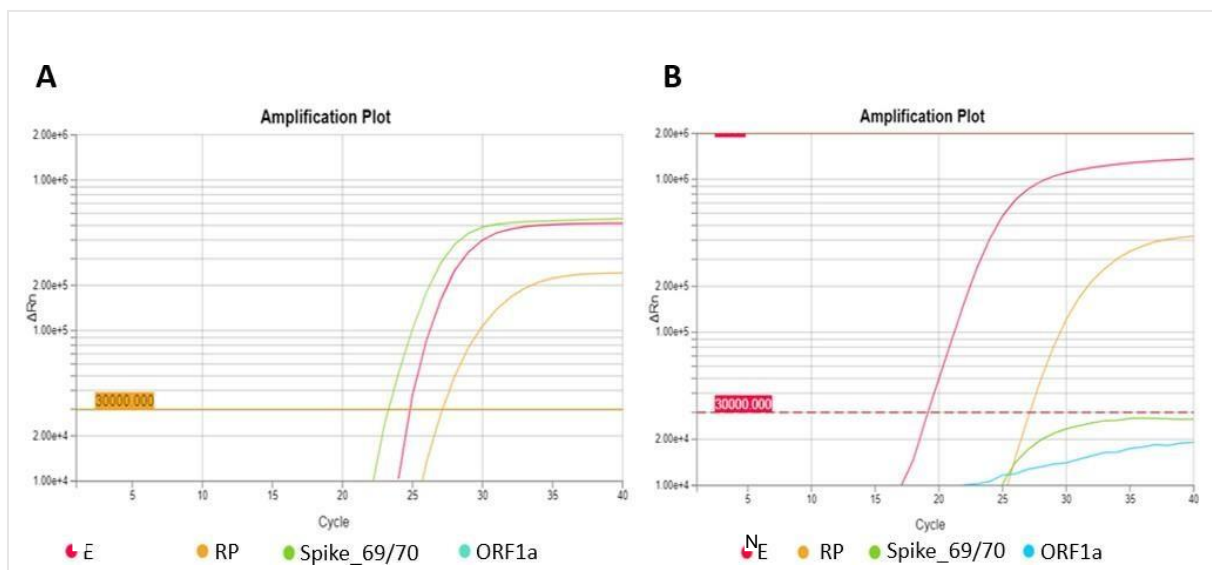
Inicialmente, para a verificação de funcionamento do ensaio de identificação de VOCs, testamos os primers e sondas em amostras positivas para SARS-CoV-2 onde a presença das VOCs Gama e Alfa foram identificadas por sequenciamento genético. Também utilizamos como controle nos testes amostras identificadas por sequenciamento como não-VOCs (NVOC), como as linhagens B.1.1 e P.2, que circularam durante a epidemia da COVID-19 no Brasil em 2020 e início de 2021. A Figura 4 demonstra a reação de RT-qPCR das amostras NVOC, onde a amostra B.1.1 apresentou amplificação das regiões alvo com CTs 16 para Spike\_69/70, 18 para o alvo ORF1a, 15 para o alvo N e 24 para o alvo RNase P (RP). Já a amostra P.2 obteve amplificação das regiões alvo com CTs 27 para Spike\_69/70, 28 para ORF1a, 25 no alvo N e 22 no alvo RP (Figura 5).



**Figura 5** - Curva de amplificação do teste 4plex Bio-Manguinhos de amostras não- VOC (NVOC). (A) Amostra B.1.1. (B) Amostra P.2. As cores das curvas estão conforme a legenda.

**Fonte:** Elaborado pela autora

No gráfico de amplificação da VOC Gama podemos observar as curvas de fluorescência dos alvos Spike\_69/70, N e RP com Cts 23, 24 e 27, respectivamente, e a falha de amplificação do alvo ORF1a, indicando a presença da deleção como esperado para sua identificação (Figura 6. A). Já na amostra VOC Alfa, observamos à amplificação das regiões N e RP com CTs 17 e 26 e falha de amplificação dos alvos ORF1a e Spike\_69/70 (Figura 6. B).



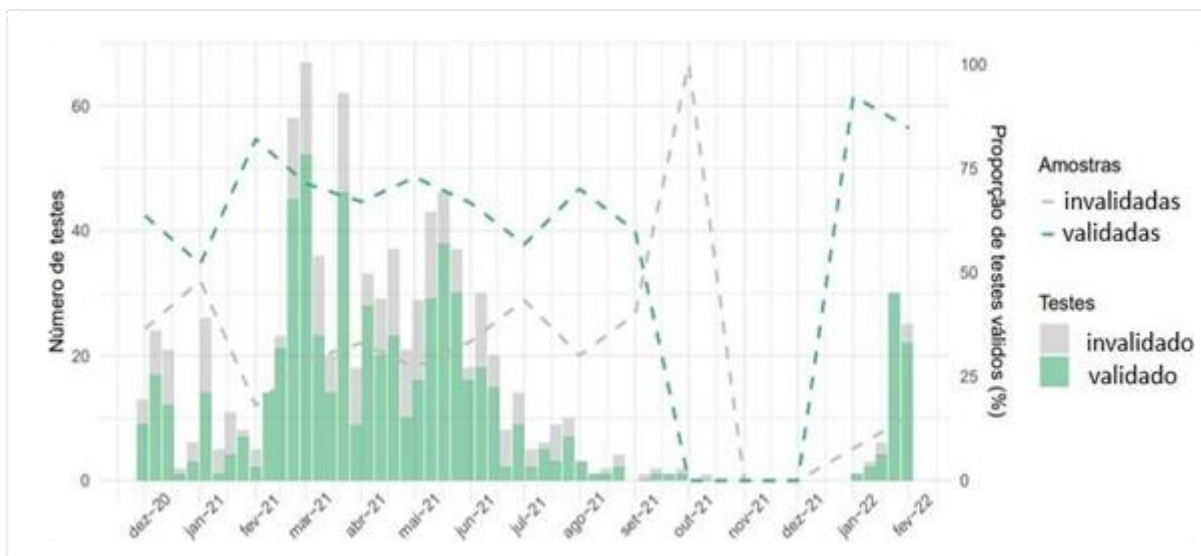
**Figura 6** - Curva de amplificação do teste 4plex Bio-Manguinhos para amostras VOCsGama e Alfa. **(A)** Amostra VOC Gama. **(B)** Amostra VOC Alfa. As cores das curvas estão conforme a legenda.

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 5.2 AMOSTRAS VALIDADAS E INVALIDADAS

A plataforma de vigilância molecular (PVM) do Instituto Gonçalo Moniz obteve entre os meses dezembro de 2020 a fevereiro de 2022 cerca de 989 amostras positivas para o vírus SARS-CoV-2 provenientes de pacientes residentes na cidade de Salvador, onde 850 (86%) delas foram localizadas no Biorrepositório da PVM e incluídas neste estudo. O pico de amostras positivas para o vírus SARS-CoV-2 se deu a partir da segunda metade do mês de fevereiro e no mês de maio de 2021, períodos de grande circulação da VOC Gama em Salvador, onde houve registros de mais de 60 casos positivos por semana. Um segundo pico de amostras positivas foi observado nos meses de janeiro e fevereiro de 2022, quando houve o aumento da circulação da VOC Ômicron BA.1. Entre esses dois picos, houve um período de poucas amostras positivas, sendo que para os meses de novembro e dezembro não houve registro de amostras positivas na PVM.

Do total de amostras localizadas cerca de 628 (74%) das amostras testadas por através do ensaio 4Plex Bio-Manguinhos obtiveram resultados validados, sendo possível inferir para essas amostras a variante viral enquanto o teste de 222 (26%) amostras foi considerado inválido. No mês de outubro apenas uma amostra foi registrada como positiva para o vírus SARS-CoV-2 e incluída no ensaio, porém devido a pouca testagem deste mês a análise da proporção de resultados válidos/inválidos não pôde ser realizada (Figura 7).



**Figura 7** - Número semanal de amostras testadas e proporção de validação dos testes 4plex Bio-Manguinhos. Barras verticais representam o número de amostras positivas para SARS-CoV-2 conforme a data de coleta (eixo-Y esquerdo) e linhas pontilhadas mostram a proporção de resultados válidos e inválidos (eixo-Y direito). Cores conforme a legenda.

**Fonte:** Elaborado pela autora

### 5.3 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA DO ENSAIO 4PLEX BIO-MANGUINHOS

Das 850 amostras testadas pelo 4plex Bio-Manguinhos, 379 (45%) foram também sequenciadas. Os sequenciamentos foram realizados apenas em amostras com  $CT \leq 25$ . A partir deste quantitativo, foi possível avaliar a performance do teste. Para a detecção do alvo Spike<sub>69/70</sub>, o ensaio 4plex apresentou 87% (7/8) de sensibilidade, 99,69% (324/325) de especificidade e 99,40% de acurácia. Para a detecção do alvo ORF1a, o ensaio apresentou 99,35% (304/306) de sensibilidade, 90,91% (30/33) de especificidade e 98,53% de acurácia. Considerando ambos os alvos, a acurácia média para identificação de VOCs do ensaio 4Plex Bio-Manguinhos foi de 98,96% (Quadro 5).

**Quadro 4** - Sensibilidade e especificidade do alvo 69/70 no ensaio 4plex

Resultados do ensaio 4 plex	Resultados do Sequenciamento		Total
	Presença da deleção	Ausência da deleção	
Presença da deleção 69/70	(a) 7	(b) 1	8
Ausência da deleção 69/70	(c) 1	(d) 324	325
<b>Total</b>	8	325	<b>333</b>

**Fonte:** Elaborado pela autora

**Quadro 5** - Sensibilidade e especificidade do alvo ORF1a no ensaio 4plex

Resultados do ensaio 4plex	Resultados do Sequenciamento		Total
	Presença da deleção	Ausência da deleção	
Presença da deleção ORF1a	(a) 304	(b) 3	307
Ausência da Deleção ORF1a	(c) 2	(d) 30	32
<b>Total</b>	306	33	<b>339</b>

Fonte: Elaborado pela autora

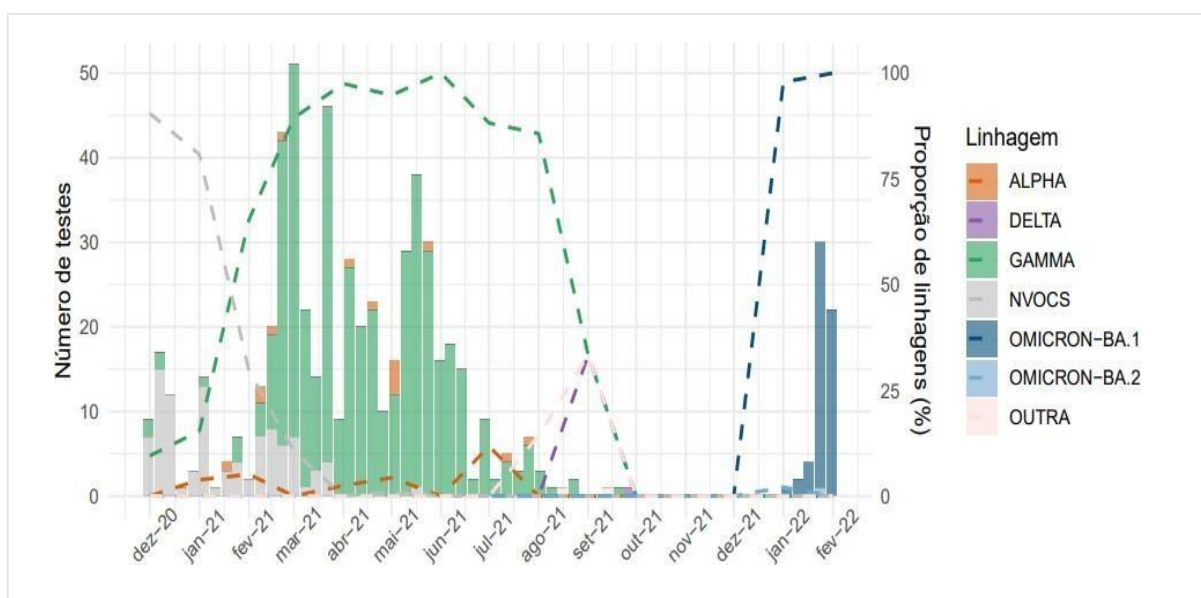
### 5.3 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE VOCS EM SALVADOR A PARTIR DO ENSAIO 4PLEX BIO- MANGUINHOS

Dentre os meses de dezembro de 2020 a fevereiro de 2022, o ensaio 4plex sugeriu a presença de VOCs em 84% (528/628) das amostras validadas e um perfil NVOC em 12% (98/628) das amostras testadas. A primeira VOC detectada pelo ensaio foi Gama, em 03 de dezembro de 2020. Durante os meses de dezembro de 2020 e janeiro de 2021, Gama circulou em Salvador com baixa frequência, sendo presente em 6,06% e 8%, respectivamente (Figura 8). Nestes meses, a linhagem NVOC se demonstrou frequente representando 81% (21/26) e 30% (23/78) das amostras nos meses dezembro e janeiro, respectivamente. Em 19 de janeiro de 2021 detectamos a primeira VOC Alfa, que foi detectada com baixa frequência durante as testagens com o ensaio 4Plex sendo sinalizada em 4% a 12% das amostras testadas entre janeiro e junho de 2021, não sendo mais inferida a partir do mês de julho de 2021. No mês de fevereiro de 2021 a VOC Gama aumentou acentuadamente sua frequência, tornando-se predominante ao final do mês e representando 62,20% das amostras testadas. Entre os meses março e junho de 2021, a VOC Gama representou mais de 96% (380/396) das amostras testadas na cidade de Salvador e sua frequência começou a decair a partir do mês de agosto, juntamente ao número de testes devido à escassez de amostras positivas.

Entre os meses agosto e dezembro de 2021 apenas 10 amostras foram registradas como positivas pela PVM e testadas com o ensaio 4plex, sendo sete do mês de agosto e três de setembro. No Brasil, este período é caracterizado pela dominância de Delta em um pequeno número de novas infecções. No presente trabalho o ensaio 4plex infere a presença de apenas uma VOC Delta, sendo esta detectada em uma amostra coletada no dia 30 de setembro de 2021. Além disso, foram detectadas nos meses de agosto e setembro duas amostras com o perfil indicativo da presença dos alvos Spike\_69/70 e ausência de ORF1a. Este perfil não

condiz com nenhuma VOC conhecida e por isso essas amostras foram classificadas como “Outra” nesse estudo.

Nos meses de janeiro e fevereiro de 2022 um novo pico de amostras positivas foi registrado decorrente de uma nova onda de COVID-19 no Brasil. Os resultados do ensaio 4Plex demonstraram que esta nova onda foi causada pela circulação da VOC Ômicron-BA.1 em Salvador, detectada primeiramente em 04 de janeiro de 2022. A VOC Ômicron-BA.1 apresentou frequência de 98% e 100% das amostras entre os meses de janeiro e fevereiro de 2022, respectivamente. Além disso, detectamos uma amostra Ômicron-BA.2 em 28 de janeiro de 2022 (Figura 8).



**Figura 8** - Circulação de linhagens do SARS-CoV-2 conforme ensaio 4plex em Salvador/BA. Barras representando o número de amostras testadas (eixo-Y esquerdo) conforme a semana de coleta e linhas pontilhadas demonstrando a proporção mensal de cada linhagem (eixo-Y da direita). Cores conforme a legenda.

**Fonte:** Elaborado pela autora

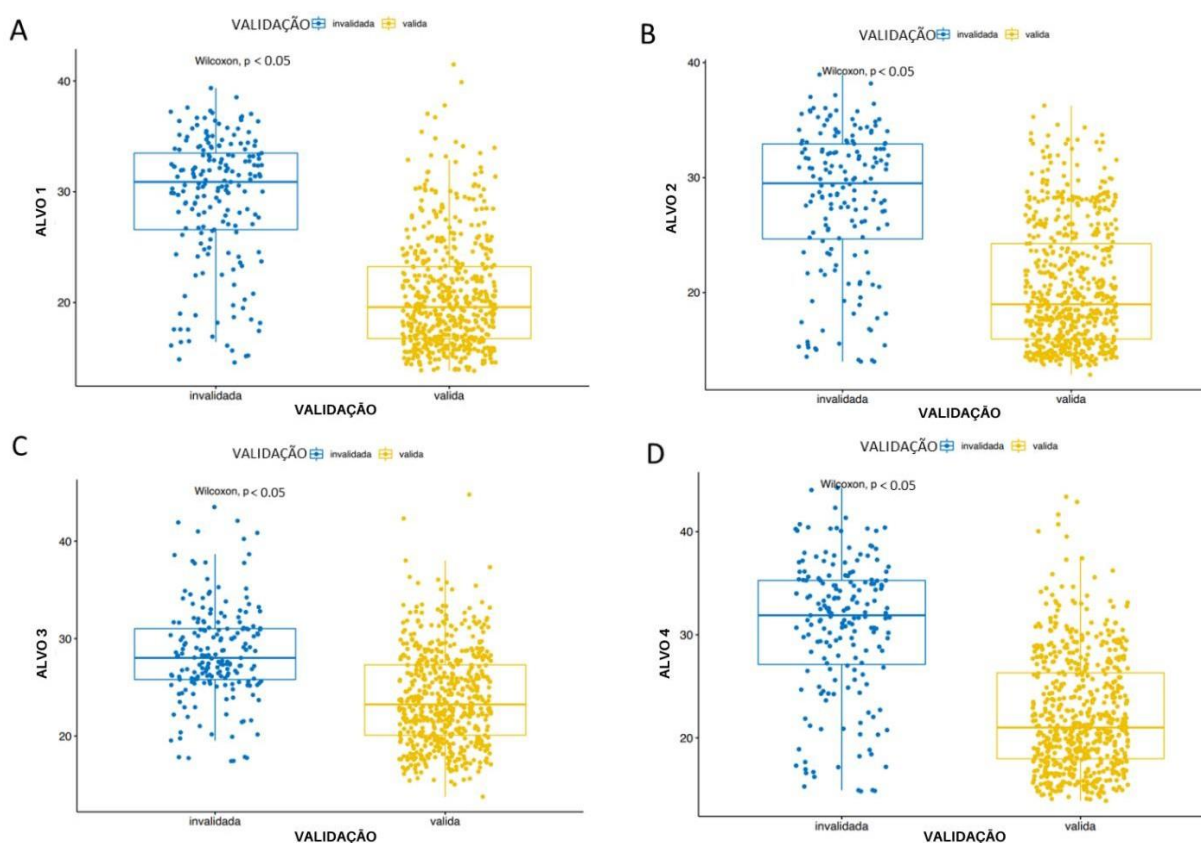
#### 5.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AMOSTRAS DE RESULTADO VÁLIDO E INVÁLIDO PARA O TESTE 4PLEX BIO-MANGUINHOS

Devido ao considerável número de amostras com resultado inválido (29%), fizemos uma investigação mais detalhada sobre os motivos que poderiam estar levando a falha do teste 4plex na inferência de VOCs. Para tanto, comparamos o CT de diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 da PVM, entre amostras de resultado válido e inválido para o ensaio 4plex. Ao longo do período de seleção das amostras deste estudo, a PVM utilizou diferentes kits e alvos de diagnóstico da COVID-19. Na análise apresentada aqui, classificamos de forma genérica os alvos de detecção viral como Alvo 1, Alvo 2 e Alvo 3. Além disso, também avaliamos o CT do



Gene Endógeno (Alvo 4), que funcionou como controle da extração do RNA total e da integridade das amostras.

Em análises comparativas realizadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon as amostras de resultados inválidos possuíram um CT médio de diagnóstico mais elevado diante as amostras de resultado validado, com diferenças estatisticamente significantes e valores de  $p < 0.05$  (Figura 9). Para o Alvo 1, as amostras com resultados invalidados apresentaram uma mediana de CT de 31 (IQR 26-33), enquanto o CT para as amostras de resultados validados foi 19 (IQR 17-23) (Figura 9. A). O Alvo 2 apresentou uma mediana de CT de 29 (IQR 25-33) e 18 (IQR 16-24) para as amostras de resultados invalidados e validados, respectivamente (Figura 9. B). O Alvo 3 apresentou uma mediana de CT de 31 (IQR 27-35) e 21 (IQR 18-26) para as amostras de resultados invalidados e validados, respectivamente (Figura 9. D). E por fim, o Gene Endógeno (Alvo 4) apresentou mediana de CT de 28 (IQR 26-31) para as amostras de resultado invalidado e 23 (IQR 20-27) para as amostras de resultados validados (Figura 9. C).



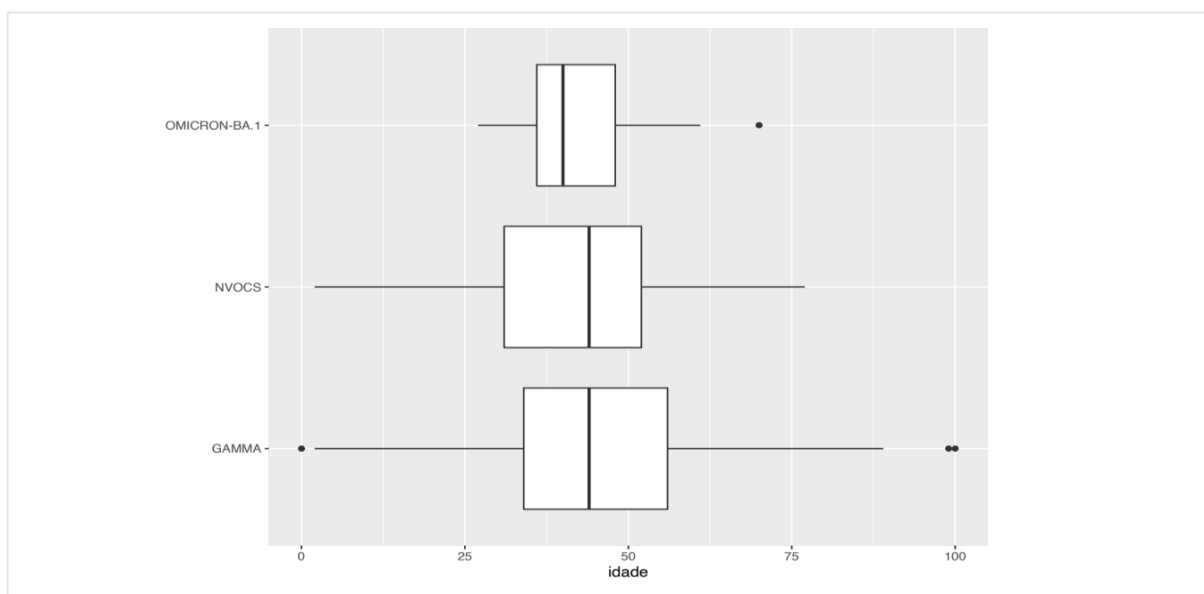
**Figura 9** - Comparação da mediana de CTs dos alvos de diagnóstico positivos para SARS-CoV-2 entre as amostras validadas e invalidadas pelo ensaio 4plex Bio- Manguinhos. Número de amostras validadas e invalidadas do ensaio 4Plex (eixo-X) e Ciclo Threshold (CT) dos alvos de diagnóstico da PVM (eixo-Y). Descrição de alvos: Alvo 1 (A), Alvo 2 (B), Alvo 3 (C) e Alvo 4 (D).

**Fonte:** Elaborado pela autora



## 5.5 ANÁLISES DEMOGRÁFICAS

Perante os resultados validados pelo ensaio 4plex Bio-Manguinhos, dados demográficos referentes a sexo e idade estavam disponíveis para cerca de 94% (589/628) das amostras testadas. Inicialmente, comparamos a idade média dos pacientes entre as três principais variantes detectadas, VOC Gama (74%) e Ômicron-BA.1 (9,24%) e linhagens não VOC (NVOC) (16%). As medianas de idade dessas três variantes não foram estatisticamente diferentes, sendo 44 anos (IQR 34-56), 44 anos (IQR 31-52) e 40 anos (IQR 36-48) para a VOC Gama, NVOC e a VOC Ômicron-BA.1, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10** - Boxplot detalhando a idade dos pacientes para as três principais variantes detectadas. A mediana é representada pela linha dentro da caixa, cujos limites mostram 25% e 75% da distribuição dos dados. Os pontos representam valores atípicos e as linhas horizontais fora das caixas representam a distribuição total dos dados.

**Fonte:** Elaborado pela autora

Em seguida caracterizamos a distribuição de sexo entre as amostras com resultado validado. Cerca de 63% (369/589) corresponderam ao sexo feminino enquanto 37% (220/589) ao sexo masculino (Tabela 1). Ao observarmos a distribuição de sexo entre as três principais variantes, notamos que para as amostras caracterizadas como NVOC, há 44% de homens, um valor estatisticamente maior que o esperado ( $p < 0.05$ ) quando comparado à distribuição na população total amostrada.

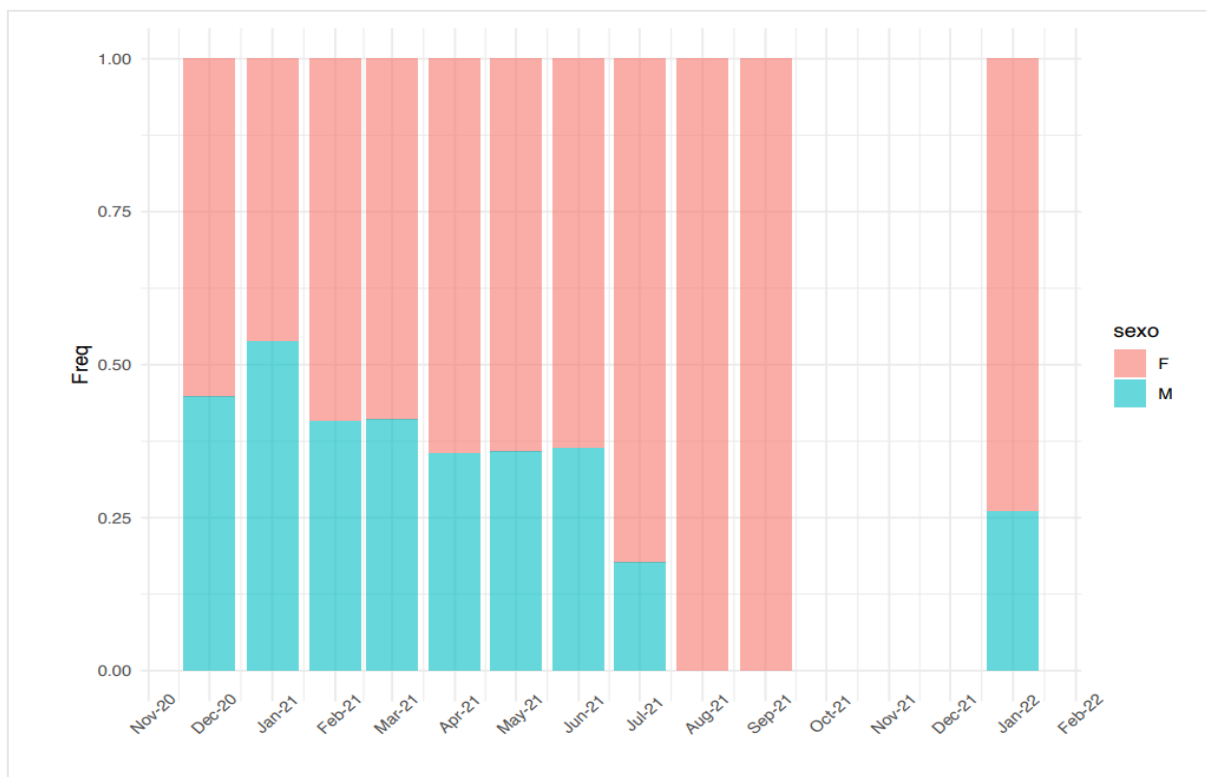
**Tabela 1** - Gênero mais frequente diante as principais linhagens detectadas

<b>Linhagens principais</b>	<b>Porcentagem por Sexo</b>	
	<b>Feminino</b>	<b>Masculino</b>
Gama	249 (64%)	158 (36%)
NVOC	48 (52%)	44 (48%)*
Ômicron-BA.1	34 (75%)	11 (24%)
<b>Total da Coluna</b>	<b>361 (63%)</b>	<b>213 (37%)</b>

NVOC – linhagem não VOC; \* p<0.05

**Fonte:** Elaborado pela autora

Para entender melhor a maior frequência de homens em linhagens NVOC e sabendo da distribuição temporal diferente das variantes, nós também analisamos a razão de sexo ao longo dos meses amostrados. Nos meses de dezembro de 2020 e janeiro de 2021, os homens correspondem a 45% e 54%, respectivamente (Figura 11). Essa proporção diminui em fevereiro e fica aproximadamente estável até junho de 2021, variando entre 41% e 35%. A partir de julho, quando o número de amostrastestadas cai muito, a porcentagem de mulheres aumenta, chegando a 100% em agosto e setembro. No mês de janeiro de 2022, com o aumento do número de casos, notou-se novos registros de amostras referentes ao sexo masculino que corresponderam 26% (12/46) das amostras validadas com dados demográficos disponibilizados.



**Figura 11** - Razão de sexo dos pacientes testados pelo ensaio 4Plex Bio- Manguinhos entre os meses dezembro de 2020 e fevereiro de 2022. Em vermelho a proporção de testes positivos para o sexo feminino. Em azul a proporção de testes positivos para o sexo masculino.

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6 DISCUSSÃO

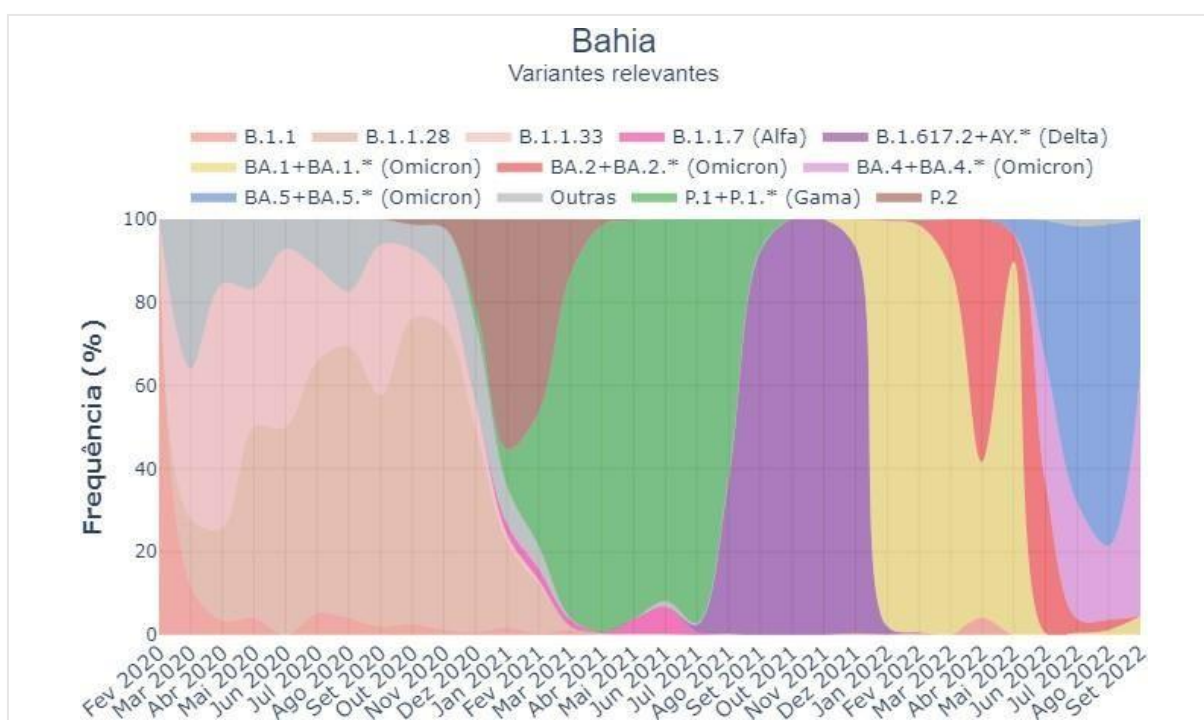
Ao longo dos dois anos da pandemia, nós conduzimos um estudo transversal e retrospectivo com a finalidade de investigar a distribuição das variantes de preocupação do vírus SARS-CoV-2 na cidade de Salvador. No presente estudo detectamos as principais linhagens circulantes através da técnica molecular RT- qPCR, uma abordagem muito útil de vigilância genômica do SARS-CoV-2 por sua capacidade em avaliar grandes quantidades de amostras de forma mais acessível economicamente e menos laboriosa que o sequenciamento de nova geração, considerado padrão-ouro para identificação de variante do SARS-CoV-2 (LIU et al., 2020).

O ensaio de RT-qPCR aqui utilizado foi o 4plex, desenvolvido por Bio- Manguinhos. Ele demonstrou uma alta capacidade de inferir as linhagens de cada amostra analisada, apresentando 99% de acurácia quando comparado ao teste padrão ouro. Os resultados corroboraram a cronologia de detecção das linhagens circulantes no Estado da Bahia confirmadas via sequenciamento e divulgadas pela Rede Genômica Fiocruz dentre os meses dezembro de 2020 a fevereiro de 2022 (Figura 12) (<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>).

Embora capaz de detectar as variantes por meio de suas deleções, observamos que o ensaio 4plex não conseguiu inferir a linhagem de 26% das amostras testadas. Quando comparados os CTs das amostras invalidadas com os das amostras validadas foi possível observar que as amostras invalidadas obtiveram CTs maiores que os das amostras validadas com significância estatística ( $p < 0,05$ ). Esta análise revela o quão delicado é trabalhar com vírus de RNA (CAMPOS-PARDOS et al., 2021) e, possivelmente, houve degradação do material genético do SARS-CoV-2 das amostras. Aquelas que já possuíam uma pequena carga viral (alto CT de diagnóstico) foram as mais prejudicadas e a quantidade de RNA presente na amostra pode ter caído a níveis abaixo da sensibilidade do teste. Mesmo assim, o teste 4plex nos permitiu inferir a VOC presente para mais amostras que o sequenciamento genético, que utiliza um limite de  $CT < 25$ , poderia ser aplicado. Em 145 amostras com resultados validados para o 4plex neste trabalho, os critérios de CT não permitiram o sequenciamento genético.

Nossas análises com o ensaio 4plex indicaram as VOCs Gama, Ômicron e o perfil selvagem NVOC como as principais linhagens circulantes na cidade de Salvador entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2022. A VOC Gama foi identificada em 74% das amostras validadas, enquanto a linhagem NVOC e a VOC Ômicron representaram 12% e 9% do total de amostras, respectivamente. Devido a finalização dos experimentos no início do mês de

fevereiro de 2022 não foi possível obter o real quantitativo da circulação da VOC Ômicron. Entretanto a cronologia de linhagens circulantes referente a segunda onda na cidade esteve de acordo com os resultados divulgados pela rede Genômica Fiocruz, onde a VOC Gama e a linhagem NVOC estiveram frequentes em cerca de 48% e 16% das amostras confirmadas via sequenciamento no Estado da Bahia (Figura 12).



**Figura 12** - Frequência das linhagens do SARS-CoV-2 presentes no Estado da Bahia.  
**Fonte:** (FIOCRUZ, 2022)

A primeira detecção da VOC Gama na cidade de Salvador por meio do ensaio 4plex se deu em 3 de dezembro de 2020, mesmo mês em que nosso grupo de pesquisa publicou um relato de caso notificando a detecção da variante na cidade confirmada via RT-qPCR e sequenciamento de nova geração a partir de pacientes com apresentação clínica severa de COVID-19 após o dia 23 de dezembro de 2020, primeira data do surgimento dos sintomas.

Esse grupo de pacientes retornava de férias da cidade de Manaus, local onde a VOC Gama foi primeiramente rastreada e notificada à OMS (DE SIQUEIRA et al., 2021; FUJINO et al., 2021). Os resultados obtidos nesse estudo de vigilância molecular enfatizam a importância de um diagnóstico rápido, eficiente e capaz de inferir as linhagens circulantes em cada amostra para a tomada de decisões assertivas pelas instâncias governamentais que minimizem a circulação de variantes altamente transmissíveis como a VOC Gama, diminuindo assim os índices de novos casos e óbitos por COVID-19 em cada região.

Em nosso estudo a VOC Alfa foi detectada com uma baixa frequência dentre as amostras

analisadas e se manteve circulante junto a VOC Gama dentre os meses de janeiro e julho de 2021, resultados muito similares aos observados pela vigilância genômica feita através do sequenciamento genômico (Figura 12). Entretanto, para a VOC Delta, a escassez de amostras entre os meses de outubro e dezembro de 2021 não nos permitiu detectar seu período de dominância. Dados genômicos da Bahia mostram que Delta chegou a representar 100% dos genomas entre os meses de outubro e novembro de 2021 (Figura 12), entretanto, esse foi um período de baixíssimo número de casos em Salvador (Figura 4) e na PVM, nenhuma amostra positiva estava disponível para ser testada.

Outro ponto interessante de ser destacado no presente estudo é que nos meses de agosto e setembro de 2021 encontramos duas amostras com padrão de deleções não típico para nenhuma VOC conhecida, sendo aqui classificadas com “Outra”. Essas amostras apresentaram a deleção 69/70 na proteína *Spike* e amplificaram normalmente na região ORF1a. Uma dessas amostras chegou a ser sequenciada pela Plataforma de Vigilância do IGM onde o resultado de VOC Delta com a deleção 69/70 da proteína *Spike* foi observado. Esse resultado exemplifica o fenômeno de convergência evolutiva entre as variantes do SARS-CoV-2, onde a mesma mutação ocorre de forma independente e é selecionado por ser vantajosa em diferentes momentos da história evolutiva do vírus. A região 69/70 da *Spike* fica na porção N-terminal da proteína e é uma região apresentadora de vários epítomos de anticorpos (McCarthy et al., 2021). Portanto, deleções nessa região são frequentes no SARS-CoV-2, sendo uma forma do vírus escapar de alguns anticorpos neutralizantes. No Brasil, variantes apresentando a deleção da região 69/70 da *Spike* já foram observadas na VOC Gama e na sua ancestral B.1.1.28 (RESENDE et al., 2021).

Dentre os meses de janeiro e fevereiro de 2022 a VOC Ômicron se apresentou frequente em 100% das amostras testadas no ensaio 4plex, onde sua primeira detecção foi verificada no dia 4 de janeiro. Nesse mesmo período o Brasil enfrentava uma explosão de casos por Ômicron em sua terceira onda epidêmica de COVID-19 registrando dentre os dias 24 de dezembro de 2021 a 06 de janeiro de 2022 um aumento de 405% de casos e um cumulativo de 298.408 casos em um único dia no mês de fevereiro de 2022 (MS, 2022). A primeira identificação do genoma da VOC Ômicron no Brasil foi registrada no mês de janeiro de 2021, enquanto na Bahia foi registrado em dezembro de 2021 (Figura 12). Já em nosso estudo, a primeira amostra Ômicron foi coletada em 4 de janeiro de 2022, logo no início de um acentuado crescimento de amostras positivas para o COVID-19 chegando à PVM, onde todas foram diagnosticadas como pertencentes a VOC Ômicron.

Em relação a idade das amostras testadas, não observamos diferenças estatística entre as

principais variantes detectadas e a mediana de idade variava entre 40 e 44 anos. Cerca de 63% das amostras investigadas em Salvador dentre os meses de dezembro de 2020 a fevereiro de 2022 eram de pacientes do sexo feminino. Encontramos uma diferença significativa na distribuição de sexos entre as variantes Gama, Ômicron e NVOC, onde a última mostrou ter uma frequência (48%) de pacientes masculinos maior do que o esperado ( $p < 0,05$ ). Entretanto, também observamos que a frequência de amostras de homens era maior no início da série histórica avaliada nesse estudo, diminuindo gradativamente conforme também diminuía o número de amostras recebidas pela PVM e só voltando a aumentar com a explosão de casos em janeiro de 2022. Possivelmente, a associação observada entre NVOC e indivíduos do sexo masculino se deve a um viés de amostragem que favoreceu a coleta de homens no mesmo período que as NVOCs circulavam mais (dezembro de 2020 e janeiro de 2021).

## 7 CONCLUSÃO

O ensaio 4plex aqui utilizado demonstrou-se eficiente na detecção e rastreamento das variantes de preocupação do vírus SARS-CoV-2 circulantes na cidade de Salvador, tendo a maioria de seus resultados validados diante de amostras previamente positivas e com alta concordância comparado ao método padrão-ouro. Dessa forma, essa ferramenta é complementar a métodos de sequenciamento genético para a vigilância genômica do SARS-CoV-2, podendo prover mais agilidade na análise de amostras e fornecer informações em tempo oportuno para a tomada de medidas de contenção que visem diminuir o número de novos casos e óbitos.

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho podemos concluir que:

- I. Durante a pandemia por COVID-19 as principais linhagens circulantes na cidade de Salvador se referiram as VOCs Gama, Ômicron e a linhagem de perfil selvagem NVOC;
- II. Quando comparado com o sequenciamento genômico o ensaio 4plex apresentou valores altos de acurácia, sensibilidade e especificidade demonstrando-se confiável para a identificação das variantes de SARS-CoV-2;
- III. A dinâmica de substituição de linhagens inferida através do teste 4plex é muito similar aos dados genômicos da Bahia, com predominância de variantes NVOC até janeiro de 2021, domínio de Gama de fevereiro a julho de 2021 e de Ômicron a partir de janeiro de 2022. No período de agosto a dezembro de 2021, a pequena amostragem que tivemos acesso não nos permitiu inferir de forma confiável as variantes circulantes;
- IV. Dentre as linhagens mais predominantes nesse estudo, indivíduos do sexo feminino e com a mediana de idade de 44 anos foram os mais acometidos pela COVID-19 na cidade de Salvador.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL LATIF, A. et al. **P.1 lineage report**. Disponível em: <<https://outbreak.info/situation-reports?pango=P.1>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- ABATE, B. B. et al. Original research: Sex difference in coronavirus disease (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, v. 10, n. 10, p. 40129, 6 out. 2020.
- ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v.26, n. 4, p. 450–452, 17 abr. 2020.
- BELLO-CHAVOLLA, O. Y. et al. Unequal Impact of Structural Health Determinants and Comorbidity on COVID-19 Severity and Lethality in Older Mexican Adults: Considerations beyond Chronological Aging. **Journals of Gerontology-Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 76, n.3, p. E52–E59, 1 mar. 2021.
- BOLZE, A. et al. Rapid displacement of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 by B.1.617.2 and P.1 in the United States. **medRxiv**, p. 2021.06.20.21259195, 30 jun. 2021.
- CALLAWAY, E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature*, v. 595, n. 7865, p. 17–18, 1 jul. 2021. CANDIDO, D. S. et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1255–1260, 4 set. 2020.
- CHAN, J. F. W. et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514–523, 15 fev. 2020.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 1 set. 2015.
- CAMPOS-PARDOS, E. et al. Discrepancies in the detection of SARS-CoV-2 by qRT-PCR are dependent on the target gene used for its amplification: implications in the diagnosis of clinical infection. **medRxiv**, p. 2021.08.30.21262536, 31 ago. 2021.
- CDC. **CDC Diagnostic Tests for COVID-19**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/testing.html>>. Acesso em: 26 out. 2022.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n.10223, p. 507–513, 15 fev. 2020a.
- CHEN, T. et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: Retrospective study. **The BMJ**, v. 368, 26 mar. 2020b.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin, and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, 1 mar. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7097006/](https://www.nature.com/articles/PMC7097006)>. Acesso em: 15 fev. 2021
- DAVIES, N. G. et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS- CoV-2 lineage

B.1.1.7. **Nature**, v. 593, n. 7858, p. 270–274, 13 maio 2021.

DE SIQUEIRA, I. C. et al. Early detection of P.1 variant of SARS-CoV-2 in a cluster of cases in Salvador, Brazil. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 11 maio 2021.

DI GIALLONARDO, F. et al. Genomic epidemiology of the first wave of sars- cov-2 in Italy. **Viruses**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2020.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18319742/>>. Acesso em: 8 jul.2021

FANG, X. et al. Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Aging**, v. 12, n. 13, p. 12493–12503, 2020.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. **Coronaviruses**, v. 1282, p. 1, 26 fev. 2015.

FUJINO, T. et al. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerging Infectious Diseases*, v. 27, n. 4, p. 1243, 1 abr. 2021.

GE, X. Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 535–538, 2013.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome- related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 1 abr. 2020.

GRÄF, T. Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-CoV-2. In: Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. [s.l.] **EDUFBA**, 2020. p.1–19.

GRÄF, T. et al. Phylogenetic-based inference reveals distinct transmission dynamics of SARS-CoV-2 lineages Gamma and P.2 in Brazil. **iScience**, v. 25, n. 4, p. 104156, 4 abr. 2022.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 1 dez. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271, 16 abr. 2020.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A multibasic cleavage site in the spike protein of sars-cov-2 is essential for infection of human lung cells. **Molecular. Cell**, v. 78, n. 4, p.779, 21 maio 2020.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, v. 19, p. 100682, 1 jun. 2020.

KORBER, B. et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases

Infectivity of the COVID-19 **Virus.Cell**, v. 182, n. 4, p. 812- 827.e19, 20ago. 2020.

KOYAMA, T.; PLATT, D.; PARIDA, L. Variant analysis of SARS-cov-2 genomes. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 98, n. 7, p. 495–504, 1 jul. 2020.

LAI, A. et al. Molecular Tracing of SARS-CoV-2 in Italy in the First Three Months of the Epidemic. **Viruses**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2020.

LAUER, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 9, p. 577–582, 5 maio 2020.

LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020.

LIU, R. et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. **Clinic Chimica Acta**, v. 505, p. 172–175, 1 jun. 2020.

LUK, H. K.H. et al. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of SARS coronavirus Infection, Genetics and Evolution. **Elsevier B.V.**, , 1 jul. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC7106202/>. Acesso em: 13 fev. 2021MA,

Y. et al. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14– nsp10 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n. 30, p. 9436–9441, 28 jul. 2015.

MACHHI, J. et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 1,1 set. 2020.

MARTIN, D. P. et al. The emergence and ongoing convergent evolution of the N501Y lineages coincides with a major global shift in the SARS-CoV-2 selective landscape. **medRxiv**, 5 mar. 2021.

MORAWSKA, L.; CAO, J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. **Environment International Elsevier**, 1 jun. 2020. Disponível em:</pmc/articles/PMC7151430/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

McCarthy, K. R., Rennick, L. J., Nambulli, S., Robinson-McCarthy, L. R., Bain, W. G., Haidar, G., & Paul Duprex, W. (2021). Recurrent deletions in the SARS- CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. **Science**. New York, v. 371, n. 6534, 1139. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABF6950>

M S. Situação epidemiológica da Covid-19. [s.l: s.n.]. Disponível em:<<https://ourworldindata.org/coronavirus>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

**MS. 95 Boletim epidemiológico COVID-19.** [s.l: s.n.].

NAVECA, F. G. et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of

endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, 2021.

NELSON, G. et al. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escap. **bioRxiv**, p.2021.01.13.426558, 13jan. 2021.

NYBERG, T. et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10332, p. 1303, 4 abr. 2022.

O'DRISCOLL, M. et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS- CoV-2.34. **Nature**, v. 590, n. 7844, p. 140–145, 4 fev. 2021.

OPAS. Implementação de Ag-TDRs. [s.l: s.n.]. Disponível em:<<https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-antigen/>>. Acesso em: 22 jul.2021.

PACHETTI, M. et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 179, 22 abr. 2020.

PAIVA, M. H. S. et al. Multiple introductions followed by ongoing community spread of sars-cov-2 at one of the largest metropolitan areas of northeast brazil. **Viruses**, v.12, n. 12, 1 dez. 2020.

PAVLOVA, A. et al. Machine learning reveals the critical interactions for SARS-CoV-2 Spike Protein Binding to ACE2. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 5494–5502, 17 jun. 2021.

PIJLS, B. G. et al. Original research: demographic risk factors for COVID-19 infection, severity, ICU admission and death: a meta-analysis of 59 studies. **BMJ Open**, v. 11, n. 1, p. 44640, 11 jan. 2021.

POON, L. L. M. et al. The etiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. **Lancet Infectious Diseases**, 1 nov. 2004. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15522678/>>. Acesso em: 1 jul. 2021

RAMBAUT, A. et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations-SARS- CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology-Virological. Disponível em: <<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>>. Acesso em: 17 jun. 2021a.

RAMBAUT, A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 15nov. 2020b.

RESENDE, P. C. et al. Evolutionary Dynamics and Dissemination Pattern of the SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.33 During the Early Pandemic Phase in Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 17 fev. 2021.

RESENDE, P. C. et al. The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)- terminal domain of the spike protein. **Virus Evolution**, v. 7, n. 2, 2021.

RIBAS FREITAS, A. R.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 4, 8 fev. 2021.

RITCHIE, H. et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Disponível em: <<https://ourworldindata.org/coronavirus>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

RODE, O. Đ. et al. Antibody response and the clinical presentation of patients with COVID-19 in Croatia: the importance of a two-step testing approach. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 2, p. 261, 1 fev.2021.

SMS. **Boletim epidemiológico 05 Covid-19**. Salvador: [s.n.]. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/11/protocolo-manejo-coronavirus.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2021a.

SMS. **Boletim epidemiológico 07 Covid-19**. Salvador: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.saude.salvador.ba.gov.br/covid/wpcontent/uploads/sites/27/2020/06/BOLETIM-07-2020\\_SMS-CIEVS-SSA\\_COVID-19a.pdf](http://www.saude.salvador.ba.gov.br/covid/wpcontent/uploads/sites/27/2020/06/BOLETIM-07-2020_SMS-CIEVS-SSA_COVID-19a.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2021b.

SMS; CIEVS SSA. **Boletim epidemiológico 11 Covid-19**. Salvador: [s.n.].

SMS; CIEVS SSA. **Boletim epidemiológico 12 Covid-19**. Salvador: [s.n.].

SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology Elsevier Ltd**, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmic.2016.05.001>>. Acesso em: 14 fev 2021.

TAIAROA, G. et al. Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV- 2. **bioRxiv**, p. 2020.03.05.976167, 3 abr. 2020.

TEGALLY, H. et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa med. **Rxiv Constantinos**, 22 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

TELENTI, A.; HODCROFT, E. B.; ROBERTSON, D. L. The Evolution and Biology of SARS-CoV-2 Variants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 12, n. 5, p. a041390, 1 maio 2022.

TORTORICI, M. A.; VEESLER, D. Structural insights into coronavirus entry. In: **Advances in Virus Research**. Academic Press Inc., 2019. v. 105p. 93–116.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1, 1 mar. 2021.

VIDAL, S. J. et al. Correlates of Neutralization Against SARS-CoV-2 Variants of Concern by

Early Pandemic Sera. **Journal of Virology**, 23 abr. 2021.

VIANA, R. et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 679, 24 mar. 2022.

VOGELS, C. B. F. et al. Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. **PLOS Biology**, v. 19, n. 5, p. e3001236, 7 maio 2021.

VOLZ, E. et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. **medRxiv**, p. 2020.12.30.20249034, 4jan. 2021.

WAN, Y. et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: 36 Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 7, 17 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **MERS-CoV**. Disponível em: <[https://www.who.int/csr/don/archive/disease/coronavirus\\_infections/en/](https://www.who.int/csr/don/archive/disease/coronavirus_infections/en/)>. Acesso em: 15 fev. 2021.

WHO. Pneumonia of unknown cause—China World Health Organization. [s.l.]

WHO. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>>. Acesso em: 7 jun. 2021b.

WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications?publicationtypes=f85a3610-b102-4287-a6df-f3bc0b2e9f7c>>. Acesso em: 24 fev. 2021c.

WHO. **COVID-19 weekly epidemiological update 43**. Disponível em: <[https://www.reports/weekly\\_epidemiological\\_update\\_22.pdf](https://www.reports/weekly_epidemiological_update_22.pdf)>.

WOO, P. C. Y. et al. **Coronavirus genomics and bioinformatics analysis Viruses MDPIAG**. 2010. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3185738/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3185738/)>. Acesso em: 13 fev. 2021.

WORLDOMETER. COVID Live Update. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/coronavirus/>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n.10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020a.

ZHOU, H. et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. **Current Biology**, v. 30, n.11, p. 2196, 8 jun. 2020b.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020c.

ZIEBUHR, J. The Coronavirus Replicase. *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*, v. 287, p. 57, 2005.

ZUMLA, A.; HUI, D. S.; PERLMAN, S. Middle East respiratory syndrome. **The Lancet**, 5 set. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4721578/>. Acesso em: 14fev. 2021