



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE**



FELICE DEMINCO ALVES SANTOS

**VARIABILIDADE DO GENE S DO NOVO CORONAVÍRUS EM
PACIENTES ATENDIDOS NO COMPLEXO HOSPITALAR
PROFESSOR EDGARD SANTOS-UFBA.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Salvador
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE**



FELICE DEMINCO ALVES SANTOS

**VARIABILIDADE DO GENE S DO NOVO CORONAVÍRUS EM
PACIENTES ATENDIDOS NO COMPLEXO HOSPITALAR
PROFESSOR EDGARD SANTOS - UFBA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves

**Salvador
2022**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Felice Deminco Alves

Variabilidade do Gene S do Novo Coronavírus em Pacientes Atendidos no Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos-UFBA / Felice Deminco Alves Santos. —

- - Salvador, 2022.

99 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde) - - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2022

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. SARS-CoV-2. 2. Sequenciamento de Sanger. 3. Variantes virais. 4. Vigilância epidemiológica.

FELICE DEMINCO ALVES SANTOS

**VARIABILIDADE DO GENE S DO NOVO CORONAVÍRUS EM
PACIENTES ATENDIDOS NO COMPLEXO HOSPITALAR
PROFESSOR EDGARD SANTOS-UFBA.**

Dissertação de autoria de Felice Deminco Alves Santos intitulada Variabilidade do Gene S do Novo Coronavírus em Pacientes Atendidos no Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos-UFBA, apresentada a Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde.

Salvador, 12 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA



Gubio Soares Campos

Doutor em Virologia

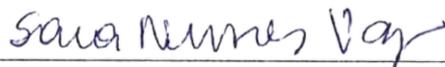
Universidade Federal da Bahia



Fabianna Marcia Maranhão Bahia

Doutora em Medicina e Saúde

Universidade Federal da Bahia



Sara Nunes Vaz

Doutora em Medicina e Saúde

Fundação Bahiana de Infectologia

Acima de todas as pessoas que já me ajudaram na vida está a minha mãe, símbolo de mulher batalhadora e mãe, pois graças aos esforços e sacrifícios feitos por ela, eu pude chegar até aqui. Eu dedico essa conquista a ela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a todos que me apoiaram, me ajudaram e auxiliaram durante todo esse percurso.

Primeiramente começo a agradecer aos meus pais, Edilene Deminco e Raimundo Sousa, por terem cuidado de mim e zelado pela minha educação. Se não fossem por todas as advertências e sacrifícios feitos para que eu tivesse uma boa formação, com certeza eu não teria manifestado minha paixão pela pesquisa.

Agradeço aos meus amigos que sempre acreditaram em mim, me deram apoio e me acalmaram nos meus momentos de insegurança.

Agradeço a Bruna, minha namorada, por acreditar em mim e me incentivar a ser a pessoa a qual estou trabalhando para ser. Você esteve comigo em todos os meus maus e bons momentos desde quando começamos a estar juntos e isso me trouxe mais conforto para encarar o dia-a-dia.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros do LAPI por terem me ensinado tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Trabalhar no LAPI foi uma verdadeira “escola da vida”, como Augusto já havia me avisado no meu primeiro dia de trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório e do setor da pesquisa que me ensinaram, fizeram críticas construtivas e me apoiaram. Vocês contribuíram ao meu amadurecimento pessoal e profissional.

A Sara e Daniele, minhas tias do laboratório, que sempre zelaram pelo meu bem-estar e progresso, contribuindo ativamente nisso. Vocês duas são amigas valiosas que vou querer levar para a vida toda.

A Rafaela por ser uma das maiores parceiras de trabalho que já tive na vida e que trabalharia novamente em outras oportunidades. Você além de ter se mostrado como ótima parceira, também foi ótima amiga por escutar meus problemas e me aconselhar no que podia.

Agradeço ao meu orientador, Doutor Brites, por ter aberto as portas e ter acreditado em mim. O senhor também me dá inspiração a ser o pesquisador que eu quero ser.

Agradeço a Doutor Eduardo por ter me auxiliado em momentos importantes e me dado mais maturidade científica, o que irá me ajudar em futuros trabalhos acadêmicos.

Agradeço especialmente a Doutora Celia que me adotou no laboratório e foi a maior responsável pelo meu crescimento tanto pessoal quanto profissional. Além de chefe, você foi uma mentora, amiga e até mesmo mãe por todas as instruções, puxões de orelha, cuidado e carinho.

À Fundação Bahiana de Infectologia (FBal) por ter fornecido todos os recursos necessários para o trabalho.

Ao PPgMS por sempre quererem ajudar os alunos e tornar os nossos problemas mais fáceis de serem resolvidos.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo Da Vinci.

RESUMO

Deminco, Felice. **Variabilidade do gene S do novo coronavírus em pacientes atendidos no complexo Hospitalar Professor Edgard Santos-UFBA.** 2022. Dissertação (Mestrado) – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

Introdução: A COVID-19 é a nova doença causada por um coronavírus humano, cujo agente etiológico é o SARS-CoV-2. Dois anos se passaram e o SARS-CoV-2 possui uma grande diversidade genética, a qual favoreceu ao surgimento de variantes emergenciais durante diversos períodos da pandemia. Devido a importância empregada na vigilância viral e as limitações encontradas nas plataformas de sequenciamento de nova geração, o objetivo desse trabalho foi identificar a variabilidade na região de Spike do SARS-CoV-2, a partir de uma plataforma de sequenciamento de Sanger, em pacientes com COVID-19 atendidos pelo Hospital Universitário Professor Edgard Santos em Salvador-BA. **Métodos:** Trata-se de um estudo observacional transversal com amostras preservadas, positivas para SARS-CoV-2, de indivíduos maiores de 18 anos, funcionários ou pacientes, atendidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES). Todas as amostras dos participantes envolvidos foram confirmadas para COVID-19 por um ensaio de RT-qPCR. O material genético viral extraído foi utilizado para um ensaio de NESTED-PCR no gene S do SARS-CoV-2 e os resultados revelados em gel de agarose a 1,5%. A reação de sequenciamento utilizando o BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit foi realizada em uma região de 1.120 pares de base e o resultado dessa reação foi lido pelo equipamento de eletroforese capilar SeqStudio. Os arquivos das sequências geradas pelo equipamento foram analisados para a construção da sequência consenso a partir da sequência referência e identificação das mutações ao longo do genoma. **Resultados:** De todas as 103 amostras sequenciadas, 69 continham variantes relevantes representadas por 20 BA.1, 13 delta, 22 gama e 14 zeta, identificadas entre junho de 2020 e fevereiro de 2022. Todas as sequências encontradas foram alinhadas com sequências representativas do variantes. **Conclusões:** O protocolo desenvolvido por esse trabalho foi capaz de identificar e acompanhar a variabilidade do gene S do SARS-CoV-2 e, por consequência, identificar as variantes mais relevantes para a pandemia, podendo ser uma metodologia alternativa para vigilância molecular viral.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Sequenciamento de sanger; Variantes virais; Vigilância epidemiológica;

ABSTRACT

Deminco, Felice. **Variability of the new coronavirus S gene in patients treated at the Professor Edgard Santos-UFBA Hospital complex.** Dissertation (Master's) – University Hospital Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Salvador, 2022.

Introduction: COVID-19 is a new disease caused by a human coronavirus, whose etiological agent is SARS-CoV-2. Two years have passed and SARS-CoV-2 has a great genetic diversity, which favored the emergence of emergency variants during different periods of the pandemic. Due to the importance employed in viral surveillance and the limitations found in new generation sequencing platforms, the objective of this work was to identify the variability in the Spike region of SARS-CoV-2, from a Sanger sequencing platform, in patients with COVID-19 treated at the University Hospital Professor Edgard Santos in Salvador-BA. **Methods:** This is a cross-sectional observational study with preserved samples, positive for SARS-CoV-2, of individuals over 18 years of age, employees, or patients, treated at the Professor Edgard Santos University Hospital (HUPES). All samples from the enrolled participants were confirmed for COVID-19 by an RT-qPCR assay. The extracted viral genetic material was used for a NESTED-PCR assay on the SARS-CoV-2 S gene and the results revealed on a 1.5% agarose gel. The sequencing reaction using the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit was performed in a region of 1,120 base pairs and the result of this reaction was read by the SeqStudio capillary electrophoresis machine. The files of sequences generated by the machine were analyzed for the construction of the consensus sequence from the reference sequence and identification of mutations throughout the genome. **Results:** Of all 103 sequenced samples, 69 contained relevant variants represented by 20 BA.1, 13 delta, 22 gamma and 14 zeta, identified between June 2020 and February 2022. All sequences found were aligned with sequences representative of the variants. **Conclusions:** The protocol developed by this work was able to identify and monitor the variability of the SARS-CoV-2 S gene and, consequently, identify the most relevant variants for the pandemic, which could be an alternative methodology for viral molecular surveillance.

Keywords: SARS-CoV-2. Sanger sequencing. Viral variants. Epidemiological surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição das variantes estudadas entre 2020 e 2022.....	45
Figura 2	Localização dos Primers e cobertura de detecção.....	46
Figura 3	Alinhamento das sequencias obtidas nas amostras com as representativas de cada variantes e a referência gerada em Wuhan.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações dos primers usados no NESTED PCR e sequenciamento.....	44
Tabela 2	Mutações e prováveis variantes identificadas pelo protocolo...	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19	Doença causada pelo Coronavírus
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
LAPI	Laboratório de Pesquisa em Infectologia
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
SARSr-CoVs	Coronavírus Relacionados ao SARS-CoV
RaTG13	Coronavírus de <i>Rhinolophus affinis</i>
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
HCoV	Coronavírus Humano
MERSr-CoV	Coronavírus relacionados ao MERS
S	Proteína Spike
UTR-5'	Região não Tradutora 5'
UTR-3'	Região não Tradutora 3'
RdRp	Polimerase de RNA dependente de RNA
ExonN	Domínio de Exoribonuclease
ORFs	Região de Codificação Aberta
-1 PRF	-1 Mudança de Quadro de Leitura Ribossomal Programada
E	Proteína Envelope
N	Proteína Nucleocapsídeo
M	Proteína Membrana
ACE2	Enzima Conversora em Angiotensina 2
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor
NTD	Domínio N-Terminal

RBM	Motivo de Ligação ao Receptor
CTD	Domínios C-Terminais
PF	Peptídeo de Fusão
FPPR	Região Proximal do Peptídeo de Fusão
CH	Hélice Central
CD	Conector do Domínio
HR2	Repetição Hepta 2
TM	Segmento Transmembranar
CT	Cauda Citoplasmática
CDC	Centro para Controle de Doenças e Prevenção
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
VOC	Variante de Preocupação
VOI	Variante de Interesse
VUM	Variante em Monitoramento
PANGOLineage	Atribuição Filogenética de Linhagem de Surto Global
e	Nomeada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RT-qPCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
NESTED-PCR	Nested Reação em Cadeia da Polimerase
SGTF	Falha no Alvo do Gene S
NGS-AS	Vigilância Genômica na África do Sul
WT	Tipo Selvagem
GISAID	Iniciativa Global de Compartilhamento de Dados da Gripe Aviária
TAG-VE	Grupo Consultivo Técnico sobre Evolução do Vírus SARS-CoV-2
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
RT	Transcrição Reversa
SESAB	Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Pandemia da COVID-19	19
3.1.1 Origem do SARS-CoV-2	20
3.1.2 Genoma do SARS-CoV-2	23
3.2 Epidemiologia Molecular da COVID-19	25
3.2.1 VOC's do SARS-CoV-2	27
3.3 Vigilância Molecular do SARS-CoV-2	35
3.3.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	36
3.3.2 Sequenciamento de SANGER	38
4. METODOLOGIA	40
4.1 Design do Estudo	40
4.2 Protocolo de Amplificação	40
4.3 Purificação e Sequenciamento	41
4.4 Análise de Dados	41
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A – Produção Científica Relacionada: Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection, Braz J Infect Dis. 2020.	64
APÊNDICE B – Produção Científica Relacionada: The First Two Cases of Monkeypox Infection in MSM in Bahia, Brazil, and Viral Sequencing, Viruses. 2022.	70
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	76
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética	79

1. INTRODUÇÃO

A doença causada pelo Coronavírus (COVID-19) é a nova doença causada por um coronavírus humano, cujo agente etiológico é o SARS-CoV-2. Os primeiros casos dessa doença foram relatados na China em dezembro de 2019 e em março de 2020 esse vírus já passou a ser considerado como pandêmico (1). SARS-CoV-2 é um vírus RNA, podendo estar mais suscetível a erros por replicação, além de recombinações, evento comum entre os vírus pertencentes à família Coronaviridae (2).

Após 2 anos de pandemia o SARS-CoV-2 apresenta uma grande diversidade genética, associada ao surgimento de variantes de importância epidemiológica durante diversos períodos da pandemia (3). O surgimento das variantes sempre vinha acompanhado pela preocupação quanto à sua capacidade replicativa, transmissibilidade, e evasão frente à ação protetora dos anticorpos gerados após vacina ou infecções prévias pelo SARS-CoV-2 e suas variantes. As medidas adotadas para o combate e controle desse coronavírus envolveram o uso de máscara, distanciamento social e adesão à política de vacinação contra a COVID-19 (3). A detecção dos casos por meio dos testes diagnósticos ajuda no isolamento dos indivíduos afetados e a contenção da disseminação do vírus. Além disso, a vigilância epidemiológica através das técnicas de sequenciamento de genoma permite avaliar o potencial em interferir na resposta imune gerada por vacina, além de avaliar se as mutações podem afetar a acurácia dos testes diagnósticos moleculares disponíveis (4).

Duas metodologias têm sido empregadas para o monitoramento viral – plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS - do inglês *Next Generation Sequencing* -) e o sequenciamento via metodologia de Sanger. As plataformas de NGS são as mais utilizadas, mas possuem acesso limitado devido ao seu alto custo-operacional (5).

A metodologia de Sanger garante sequenciamento em menor tempo e com custo operacional mais acessível (6). Visto que a vigilância molecular viral deve ser mais abrangente e que a metodologia de Sanger pode funcionar como uma técnica

alternativa para detecção de mutações e variantes importantes, o objetivo desse trabalho é identificar a variabilidade na região de Spike do SARS-CoV-2, a partir de uma plataforma de sequenciamento de Sanger, em pacientes com COVID-19 atendidos pelo Hospital Universitário Professor Edgard Santos, em Salvador-BA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar a variabilidade do gene S do SARS-CoV-2, a partir de uma plataforma de sequenciamento de Sanger, de pacientes com a COVID-19 atendidos no ambulatório e enfermarias do Hospital Universitário Professor Edgard Santos em Salvador-BA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PANDEMIA DA COVID-19

Em 30 de dezembro de 2019, agentes de saúde reportaram à Organização Mundial de Saúde (OMS) o surgimento de casos, em Wuhan, de pneumonia cujo agente etiológico ainda era desconhecido ^(3,7). Esses casos foram relatados em diferentes hospitais e alguns deles tinham ligação com o mercado Huanan, em Wuhan ⁽⁸⁾. Algumas amostras foram enviadas para o Instituto de Virologia de Wuhan e o resultado revelou que 5 das 7 amostras encaminhadas foram positivas para coronavírus ⁽⁷⁾. A partir de mais análises subsequentes foi descoberto que o SARS-CoV-2, anteriormente chamado de 2019-nCov, era o agente etiológico da COVID-19, causador de manifestações moderadas a severas ⁽⁷⁾.

Ao contrário de outros agentes pertencentes à família *Coronaviridae*, o SARS-CoV-2 se tornou pandêmico, gerando uma crise de saúde pública mundial e forçando a adoção de políticas de controle como o lockdown e a pressa na formulação de vacinas eficazes contra o vírus. Atualmente não se sabe ao certo a origem desse vírus, embora saibamos que o mercado de alimentos de Wuhan tenha sido um possível epicentro da doença e que o SARS-CoV-2 tenha relação filogenética muito próxima com coronavírus relacionados ao SARS (SARSr-CoVs) encontrados em morcegos ^(7,9).

3.1.1 ORIGEM DO SARS-CoV-2

Os mecanismos evolutivos dos coronavírus, principalmente os que derivaram no surgimento do SARS-CoV-2, é um assunto muito estudado. As especulações para a origem do SARS-CoV-2 trouxeram à tona a ideia de que o vírus tivesse sido criado em laboratório. Seguindo o caminho contrário dessa teoria, dois cenários foram postulados para explicar a origem: 1 – seleção natural em um reservatório animal, anterior à transmissão interespecie, 2 – seleção natural viral no ser humano, posterior à transmissão interespecie ⁽¹⁰⁾. Os morcegos são considerados como reservatórios animais do SARS-CoV-2, visto que análises filogenéticas vêm apontando alta similaridade com SARSr-CoVs vindo desses animais ⁽³⁾. O coronavírus encontrados nos morcegos-ferradura, *Rhinolophus affinis* (RaTG13), possui 96,2% de identidade com o SARS-CoV-2, obtendo o maior grau de proximidade genética já detectado ⁽⁷⁾. Coronavírus relacionados ao SARS-CoV-2 foram encontrados em outros morcegos do gênero *Rhinolophus*, como nos *Rhinolophus shameli* e *Rhinolophus cornutus*, cujas amostras foram colhidas em 2010 e 2013, em dois países diferentes, Cambódia e Japão, respectivamente ^(11,12).

Um estudo conduzido por Temmam et al. relatou que 645 morcegos que viviam em cavernas de calcário, comuns em países como China, Laos e Vietnã, apresentavam uma grande diversidade genética de coronavírus, incluindo os relacionados ao SARS-CoV-2, as quais foram identificados apenas em morcegos do gênero *Rhinolophus* ⁽¹³⁾. Além disso, alguns desses coronavírus encontrados possuíam elevada taxa de identidade genômica com o SARS-CoV-2, assim como evidenciado pelo RaTG13. Esses resultados indicam a circulação desse vírus entre diferentes espécies de morcego, sugerindo essa espécie de animal como a mais provável fonte de origem do SARS-CoV-2.

Não é a primeira vez que um coronavírus causador de pneumonia severa em humanos apresenta relações filogenéticas com outros coronavírus encontrados em morcegos. Em 2002 o SARS-CoV, descoberto em Guangdong, província da China, ficou conhecido como o primeiro coronavírus pandêmico e o terceiro descoberto dentre os coronavírus causadores de doenças em humanos (HCoV) ^(9,14). Sua origem também está relacionada à transmissão dos morcegos para os humanos. Em 2012 o segundo coronavírus causador de pandemia, agora descoberto na Arábia

Saudita, ficou conhecido como coronavírus causador da síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV) ^(9,15).

Assim como o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, o MERS-CoV também possuía relação com coronavírus, encontrados em morcegos, relacionados ao MERS (MERSr-CoV). Uma característica importante que SARS-CoV e MERS tem em comum é ausência de um ancestral comum direto e levando em consideração que a recombinação genética é um evento comum dentre esses vírus e que algumas espécies de morcegos podem comportar coronavírus de alta diversidade genética, tanto SARS-CoV quanto o MERS-CoV podem ter surgido a partir de eventos recombinantes entre ancestrais virais encontrados tanto nos morcegos quanto nos hospedeiros intermediários ⁽⁹⁾. As Civetas das Palmeiras e os Camelos Dromedários foram considerados como os hospedeiros intermediários para o SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente ^(16,17). A proporção de pacientes infectados que tiveram contato com esses animais e o isolamento dos agentes etiológicos nesses animais permitiram identificar as possíveis fontes de origem.

A comercialização de animais silvestres na China já havia sido banida após o aparecimento do SARS-CoV, visto que o surgimento desse vírus estava relacionado à venda de Civetas das Palmeiras e Guaxinins ⁽¹⁶⁾. Esse cenário não foi muito diferente para o SARS-CoV-2. Worobey et al. estudaram a importância do mercado de frutos do mar, Huanan, de Wuhan para o surgimento de casos da COVID-19 ⁽¹⁸⁾.

Segundo eles os primeiros casos de COVID-19, identificados em dezembro de 2019, tiveram uma distribuição geográfica associada ao mercado de Huanan, visto que os casos que tinham relação ou não com mercado foram detectados nas suas proximidades. Além disso, amostras ambientais colhidas nesse mercado testaram positivo para o SARS-CoV-2, com ênfase na região sudoeste do mercado, onde residia a atividade de vendas de animais selvagens vivos, tais como cães-guaxinim, texugos de porco e raposas vermelhas ⁽¹⁸⁾. Oito casos da COVID-19, detectadas em dezembro de 2019, foram de pessoas que haviam frequentado a mesma região do mercado. Esses resultados reforçam a ideia de que Huanan foi o epicentro da pandemia da COVID-19, além de sugerir a presença de um hospedeiro intermediário, entre os morcegos e o ser humano ⁽¹⁸⁾.

A venda de animais silvestres no mercado de Huanan sugeriu a possibilidade do contágio humano a partir desses animais possivelmente infectados, embora nenhuma amostra dos animais comercializados tenha sido testada para a presença do SARS-CoV-2 ^(18,19). Lam, T.TY et al. investigaram a presença do coronavírus relacionados ao SARS-CoV-2 em amostras de Pangolins Malaios, as quais foram obtidas a partir de uma operação anti-contrabando realizada por funcionários da alfândega de Guangxi ⁽²⁰⁾. Esses animais são uma das espécies mais traficadas do mundo (21). Dessas amostras foram encontradas sequências completas ou parciais de coronavírus agrupados à mesma linhagem relatada ao SARS-CoV-2, onde também faz parte o vírus RaTG13 ⁽²⁰⁾. Uma característica que chama muito atenção é a similaridade (97,4%) dos aminoácidos do Domínio de Ligação ao Antígeno (do inglês *Binding Domain Spike - RBD*) do gene Spike (S) dos coronavírus encontrados nos Pangolins Malaios com o SARS-CoV-2. Essa similaridade foi superior à encontrada entre RaTG13 e SARS-CoV-2 na mesma região, possuindo 89,2% de identidade. Embora a elevada similaridade encontrada em RBD, os coronavírus encontrados nesses animais possuíram de 85,5% a 92,4% de similaridade genômica com o SARS-CoV-2, sendo menor que a similaridade encontrada entre RaTG13 e SARS-CoV-2. Esses resultados sugerem uma evolução convergente seletiva entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus encontrados nos pangolins, estabelecendo os pangolins como os possíveis hospedeiros intermediários do SARS-CoV-2, visto que o contrabando desse animal é usado para fonte de alimento e suas escamas destinadas para a medicina oriental chinesa ⁽²⁰⁾.

3.1.2 GENOMA DO SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA senso positivo composto por 14 regiões de codificação aberta (*ORF* - do inglês *Open Reading Frame*), sendo 4 estruturais, 2 compondo o complexo replicativo e as restantes acessórias, codificando ao todo 27 proteínas ⁽²²⁾. O genoma viral possui cerca de 30 mil pares de bases (pb), ou 30 quilobases (kb), de tamanho, e além das ORFs já mencionadas, o vírus possui uma Região não Tradutora 5' (*UTR 5* - 'do inglês *Untranslated Region*), a Região não Tradutora 3' (*UTR 3'*) e uma cauda poli A ⁽²²⁾.

A orientação do genoma, senso positivo, já o torna molde para a replicação viral, funcionando como um RNA mensageiro (mRNA). As duas primeiras ORFs, ORF1a e ORF1b, ocupam cerca de 70% do genoma viral e a partir dela as enzimas replicativas serão geradas ⁽²²⁾. A expressão gênica dessas duas regiões é mediada por um mecanismo chamado -1 Mudança de Quadro de Leitura Ribossomal Programada (*1 PRF* - do inglês *-1 programmed ribosomal frameshifting*), que transcreve duas poliproteínas de ORF1a e ORF1b em uma única transcrição, gerando a poliproteínas pp1ab a qual será clivada em 16 proteínas não estruturais (nsps - do inglês non-structural proteins). A clivagem proteolítica das proteínas virais é mediada pelas enzimas 3CL^{pro} e M^{pro} (nsp5) ⁽²²⁾.

Outras enzimas muito importantes para a transcrição viral são as nsp12, conhecida como Polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) e nsp14, também conhecida como Domínio de Exoribonuclease (ExoN). Ambas as enzimas atuam ativamente na transcrição viral, onde a RdRp irá produzir uma nova fita de RNA e a ExoN funciona como uma enzima revisora ^(22,23). Os vírus de RNA não possuem um mecanismo de reparo/revisão do material genético, deixando-os suscetível às mutações por erros na replicação. Entretanto, o SARS-CoV-2 possui essa enzima que a protege de possíveis mutagêneses, além de serem resistentes aos análogos nucleosídicos ⁽²³⁾. Embora ela tenha essa função, Gribble e colaboradores relataram que a ausência da ExoN levou à diminuição nos eventos de recombinação gênica dos coronavírus, tornando-a necessária para que ocorra as recombinações entre os coronavírus ⁽²³⁾.

O SARS-CoV-2 possui 4 proteínas estruturais: Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N). Dentre todas, a proteína S é a mais importante. A proteína spike é diretamente envolvida no processo de infecção da célula alvo. A entrada do vírus é mediada pela interação com a Enzima conversora de Angiotensina 2 (ACE2), as quais não estão presentes apenas nas células pulmonares, estando mais distribuídas por outras partes do organismo humano como o endotélio vascular e células renais ⁽²⁴⁾. A proteína S é dividida em duas subunidades, S1 e S2.

A subunidade S1 atua na interação direta entre a proteína S e o receptor ACE2, a partir do domínio de ligação ao receptor (RBD, aminoácidos 331 a 528) e a subunidade de S2 que atua como a força mecânica da proteína ao promover a entrada do vírus ⁽²⁵⁾. A subunidade S1 possui o Domínio N-Terminal (*NTD* - do inglês *N-Terminal Domain*, aminoácidos 14 a 306), o Motivo de Ligação ao Receptor (*RBM* - do inglês *Receptor Binding Motif*, aminoácidos 436 a 506) pertencente a RBD, os Domínios C-Terminais (*CTD* - do inglês *C-Terminal Domain*) – CTD1, aminoácidos 528 a 591 e CTD2, aminoácidos 598 a 686) ⁽²⁶⁾. A subunidade S2 possui um sítio de clivagem proteolítica em uma região entre S1 e S2, chamado de *S1/S2 boundary clivagem*. A clivagem proteolítica é mediada por enzimas do hospedeiro, tais como catapsinas, furina e TMPRSS2, e essa ação enzimática promove a ativação irreversível da proteína S e fusão na membrana celular ⁽²²⁾. Essa subunidade possui mais outras estruturas – Peptídeo de Fusão (*fusion peptide* – *PF*, aminoácidos 816 a 836), Região Proximal do Peptídeo de Fusão (*fusion-peptide proximal region* – *FPPR*, aminoácidos 837 a 857), Hélice Central (*central Helix* – *CH*, aminoácidos 986 a 1036), Conector do Domínio (*connector domain* – *CD*, aminoácidos 1037 a 1068), Repetição Hepta 2 (*heptad repeat 2* – *HR2*, aminoácidos 1164 a 1211), Segmento Transmembranar (*transmembrane segment* – *TM*, aminoácidos 1212 a 1234) e Cauda Citoplasmática (*cytoplasmic tail* – *CT*, aminoácidos 1235 a 1273). Todas essas estruturas compõem uma proteína com 3.821 pares de bases ⁽²²⁾.

3.2 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA COVID-19

Desde o surgimento dos primeiros casos em Wuhan até os dias de hoje, foram mais de 636 milhões de casos acumulados e 6 milhões de mortes notificadas no mundo todo ⁽²⁷⁾. Dentre todos os países afetados, os Estados Unidos, Índia, França, Alemanha e Brasil lideram em número de casos, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, quando se trata de dados de mortalidade, o Brasil está à frente de diversos países como Índia, Itália e Alemanha, perdendo apenas para os Estados Unidos ⁽²⁷⁾.

Apenas no Brasil foram contabilizados cerca de 35 milhões de casos com 689 mil mortes notificadas. A OMS estimou que a taxa de mortalidade da COVID-19 para o mundo todo é de 2,2% ⁽²⁸⁾. Entretanto, essa taxa de mortalidade varia de país para país e sofre influência dos fatores de risco tais como pacientes acima de 60 anos de idade ou com comorbidades preexistentes como obesidade, doença cardiovascular, doença renal crônica, diabetes e doença pulmonar crônica ^(28,29). Um estudo utilizando dados epidemiológicos de 1.320.488 casos de COVID-19, reportado pelo Centro para Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention – CDC*), identificou que casos de hospitalização foram 6 vezes maiores em pacientes com comorbidades (45,4%) do que aqueles que não apresentavam nenhuma comorbidade (7,6%) e os casos de óbitos foram 12 vezes maior em pacientes com comorbidades (19,5%) em relação à aqueles que não tinham (1,6%) ⁽³⁰⁾.

Salvador, a capital da Bahia, fica entre as 10 capitais brasileiras com maior número de notificações, e até junho de 2022 a capital apresentava 267.936 casos confirmados e 8.260 óbitos ⁽³¹⁾. Apesar do grande número de casos registrados, aproximadamente 96,5% evoluíram para cura, podendo essa estatística estar associada às medidas de combate à COVID-19 como a criação de hospitais de campanha, miniunidades de pronto atendimento, gripários e leitos exclusivos, visando um atendimento mais focado na COVID-19, evitando a sobrecarga do sistema de saúde municipal ⁽³¹⁾.

Pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) sob contagem de células imunes CD4 baixa e sem boa adesão aos antirretrovirais estão suscetíveis ao desenvolvimento da COVID-19 ⁽²⁹⁾. A pneumonia é uma manifestação severa da COVID-19, mas não é a única. Em Wuhan 41 dos pacientes testados para COVID-19 entre 16 de dezembro de 2019 a 2 de janeiro de 2020, 100% tiveram pneumonia, 29% tiveram síndrome do desconforto respiratório, 15% tiveram injúria cardíaca aguda e 12% tiveram infecções secundárias ^(29,32). Desses pacientes, 10% foram internados e 15% foram a óbito.

Embora a patogenicidade do SARS-CoV-2 não seja superior ao SARS-CoV e MERS-CoV, a sua taxa de transmissão e replicação é alta levando, no final do ano de 2020 ao surgimento de variantes virais que passaram a dominar os cenários epidemiológicos do mundo todo. A OMS tratou de classificá-las como Variante de Preocupação Mundial (VOC - do inglês *variant of concern*), Variante de Interesse Mundial (VOI - do inglês *variant of interest*) e Variante em Monitoramento (VUM - do inglês *variant under monitoring*) ⁽³³⁾. A OMS também criou uma nomenclatura para cada variante a partir do alfabeto grego (alfa, beta, gama, delta...) com o intuito de facilitar a divulgação, visto que cada variante já possuía uma nomenclatura científica menos acessível para o público em geral. A classificação é dada de acordo com o grau de preocupação, sendo as VOCs de maior importância por possuírem maior transmissibilidade, aumento na virulência e impacto nas medidas de contenção viral como as metodologias de diagnóstico, eficácia das vacinas e das terapias disponíveis ⁽³³⁾.

3.2.1 VOC's DO SARS-CoV-2

No início da pandemia, apenas duas linhagens eram descritas para o SARS-CoV-2, as linhagens A e B ⁽¹⁹⁾. Ao decorrer da pandemia novas mutações foram surgindo e algumas delas foram responsáveis por aumentar a taxa de transmissão viral, como a D614G ⁽²⁶⁾. Atualmente essa mutação está prevalente em aproximadamente 100% dos vírus sequenciados, incluindo todas as VOCs e VOIs. Embora a enzima ExoN seja capaz de reduzir a taxa de mutação do SARS-CoV-2 (0,0004 mutações por nucleotídeo por ano), ainda assim muitas mutações surgiram ao longo do genoma, principalmente no gene S, promovendo o surgimento de variantes virais, pondo em risco métodos de enfrentamento da pandemia e tornando realidade as reinfecções por variantes diferentes ^(23,26).

Existem dois sistemas para nomenclatura das variantes - *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineage* (PANGOLineage) e o sistema NextStrain. PANGOLineage é o sistema mais utilizado ⁽³⁴⁾. Essa nomenclatura fornece uma letra alfabética como prefixo e numerações como sufixo, podendo conter até 3 numerações separados por pontos (ex: B.1.1.7).

A primeira variante a gerar preocupações no mundo foi a B.1.1.7, alfa, inicialmente relatada em setembro de 2020 na Inglaterra e posteriormente classificada como VOC pela OMS em 18 de dezembro de 2020 ⁽³³⁾. Entre novembro de 2020 e janeiro de 2021 essa variante se propagou rapidamente, promovendo uma mudança no cenário epidemiológico, onde a alfa passa a dominar os casos de COVID-19 ⁽³⁵⁾. Até o segundo trimestre de 2021 a variante alfa era responsável por grande parte dos casos de COVID-19 nos Estados Unidos e outros países europeus ⁽²⁶⁾. A variante alfa possui mutações e deleções importantes no gene S. A deleção presente na posição 69-70 da proteína (NTD) ficou conhecida por interferir na amplificação, por RT-qPCR, dos pares de primers e sonda destinada ao gene S do ensaio de qPCR TaqPath da Thermo-Fisher (36). Essa incapacidade de amplificar o seguimento alvo de S na variante alfa acabou sendo utilizada para identificar todas as variantes do SARS-CoV-2 que possuíam a mesma deleção, sendo assim conhecida como Falha no Alvo do Gene S (SGTF - do inglês *S-gene target failure*).

Outras mutações encontradas nessa variante são G142D, N501Y (única mutação presente em RBD), A570D, D614G, P681H, T716I, S982A e D1118H ^(26,37).

Essa variante é bastante suscetível à resposta humoral gerada por anticorpos oriundos de plasmas de pacientes anteriormente infectados pelo SARS-CoV-2 e plasma de pacientes que receberam o esquema vacinal de duas doses COVID-19 ^(26,38,39).

Assim como a variante alfa, em 18 de dezembro de 2020 a B.1.351 (beta) foi a segunda a ser classificada como VOC pela OMS ⁽⁴⁰⁾. A África do Sul entrou em sua segunda onda de casos após pouco tempo depois de a primeira ter terminado, o que intensificou a vigilância epidemiológica no país pela Rede de Vigilância Genômica na África do Sul (NGS-AS), a qual analisou 2882 genomas completos de SARS-CoV-2 entre 5 de março a 10 de dezembro de 2020 ⁽⁴¹⁾. As análises filogenéticas revelaram um grupo monofilético distinto das antigas linhagens que dominaram o cenário epidemiológico na primeira onda de casos. Inicialmente, os vírus pertencentes a esse grupo não apresentavam todo o conjunto de mutações que definem a variante beta, indicando que esses vírus seriam os precursores da variante. Com o decorrer do período coletado, a frequência de mutações como K417N, E484K e N501Y foi se tornando mais prevalente e as variantes pertencentes a esse grupo já apresentavam número de mutações tanto em S quanto no genoma superior às antigas variantes ⁽⁴¹⁾.

A B.1.351 dominou o cenário epidemiológico e esteve associado à segunda onda de casos, onde mais de 30% já havia desenvolvido a COVID-19 ⁽²⁶⁾. Oito mutações estão presentes no gene S dessa variante – D80A, D215G, K417N, E484K, N501Y, P681H e deleção nas posições 242 a 244. Essas mutações, principalmente as detectadas em RBD, possuem importante papel para os mecanismos virais ^(33,41). As mutações K417N, E484K e N501Y presentes em RBD contribuem com mecanismo de resistência viral aos anticorpos gerados por vacina e por infecções prévias ⁽³³⁾. A mutação E484K está localizada em um sítio de ligação ao anticorpo, gerando interferência na ação neutralizante desses anticorpos ⁽²⁶⁾. As outras duas mutações, sozinhas, não conferem resistência a esses monoclonais, embora estejam presentes em outras variantes e contribuindo com o mecanismo de resistência à ação neutralizante dos anticorpos ⁽⁴²⁾.

Em 2020 o Brasil passou por duas ondas de casos de COVID-19, tendo a segunda apresentado crescimento exponencial em dezembro de 2020. Durante a segunda onda, a cidade de Manaus obteve destaque tanto pelo impacto que a COVID-19 teve no sistema de saúde quanto pelo surgimento da variante P.1, também conhecido como variante gama ^(40,43). P.1 foi classificada como VOC em 11 de janeiro de 2021 pela OMS e foi primeiramente descrita em viajantes japoneses que saíram da Amazônia em direção ao Japão e ao pousar em Tokyo descobriram que estavam infectados pelo SARS-CoV-2, em 02 de janeiro de 2021 ⁽⁴⁴⁾. Na Amazônia houve dois processos de substituição epidemiológica, evento comum na pandemia, onde a primeira linhagem B.1.1.95, dominante na primeira onda epidemiológica, foi substituída pela B.1.1.28, prevalente na fase entre os dois picos, que por sua vez foi substituída pela variante P.1, a qual dominou o quadro epidemiológico da segunda onda ⁽⁴³⁾.

Em pouco tempo o vírus alcançou todos os estados brasileiros, evento esse favorecido não somente pela transmissibilidade viral, mas também pelo período no qual a variante gama surgiu, onde festas de final de ano e o deslocamento das pessoas para diferentes regiões do país estava em alta ⁽⁴³⁾. Antes da primeira detecção da variante gama, 3 membros de um grupo familiar que tinham viajado para Salvador em férias, em 19 de dezembro de 2020, tinham sido infectados pela variante gama do SARS-CoV-2 ⁽⁴⁵⁾. Esses relatos de casos reforçaram a emergência epidemiológica causada por essa VOC, onde casos fora de Manaus já vinham acontecendo antes do primeiro relato.

A variante gama possui 10 mutações no gene S, sendo elas – L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y e H655Y ^(26,37). Assim como aparece na variante beta, a gama possui mutação na posição K417, entretanto a mudança no aminoácido é diferente. Essa variante também está associada à resistência a ação neutralizante de anticorpos gerados por infecções prévias e pela campanha vacinal, podendo também gerar casos de reinfecções ⁽⁴²⁾.

A partir de março de 2021 uma nova variante viral começou a ser relatada na Índia, associada ao crescimento repentino no número de casos de COVID-19 ⁽⁴⁶⁾.

Em 11 de maio de 2021 a variante B.1.617.2 ficou conhecida como delta, a quarta variante de preocupação mundial nomeada pela OMS ⁽⁴⁰⁾. Em setembro de 2021 a variante delta já havia se espalhado pelos 6 continentes e suas infecções possuíam características como menor tempo de incubação após a exposição (2 a 3 dias), elevada capacidade de transmissão e elevada carga viral ⁽⁴⁷⁾. Entre maio e julho de 2021 a variante delta predominou em número de casos de COVID-19 na Inglaterra, sendo responsável em 28 de julho por 324.192 mil casos enquanto a variante alfa contava com 277.303 mil casos ⁽⁴⁸⁾.

Na Bahia a chegada da variante delta começou a ser notificada a partir de julho de 2021 e em setembro ela passou a dominar os casos de COVID-19, em um estado em que a grande maioria dos casos eram causados pela gama, se mantendo 100% prevalente até dezembro do mesmo ano ⁽⁴⁹⁾. Esses dados indicaram que além da alta transmissibilidade viral, ela foi capaz de substituir as VOCs dominantes em cada região geográfica. Além da variante delta, outras duas, B.1.617.1 (variante Kappa) e B.1.617.3, surgiram no mesmo período, porém não tiveram tanta importância epidemiológica quanto B.1.617.2, embora possuíssem em comum 3 mutações em spike – L452R, D614G e P681R ⁽⁴⁷⁾.

Além dessas 3 mutações, a variante delta possui mais 6 outras mutações em S – T19R, G142D, E156G, Del 157/158, T478K e D950N. A T478K é uma mutação presente na região de RBM e junta com Del 157/158 e E156G eram unicamente encontradas na variante delta ⁽⁴⁷⁾. A presença de T478K em RBM pode aumentar a afinidade entre RBD e ACE2, aumentando a capacidade do vírus em invadir as células do hospedeiro. Embora a quantidade de mutações presentes em spike e a preocupação causada por essa variante quanto à eficácia das vacinas em proteger as pessoas de possíveis infecções e casos mais severos da doença, as políticas de vacinação utilizando esquema de 2 doses demonstraram eficácia contra a COVID-19 e os casos graves no período epidemiológico da variante delta ⁽⁵⁰⁾.

Ao final do ano de 2021, quando as campanhas de vacina já tinham chegado à sua segunda dose, uma nova variante (B.1.1.529) surgiu e seus primeiros casos foram reportados em Botswana e África do Sul 11 e 14 de novembro, respectivamente ⁽⁵¹⁾. Em 25 de novembro de 2021 essa nova variante foi reportada à OMS e no dia 26 de novembro essa nova variante foi classificada como VOC, agora nomeada também como Omicron ⁽⁵²⁾. Uma característica peculiar explica a rapidez

entre o primeiro relato e a classificação pela OMS, o número de mutações presente em seu genoma e principalmente em spike.

São 34 alterações gênicas em spike, contando com 30 mutações, 3 deleções e 1 inserção e dentre as mutações relatadas, algumas já haviam aparecido em outras variantes e outras são únicas ^(51,53). Quinze das mutações em spike estão concentradas em RBD, gerando preocupação quanto a eficácia das vacinas, possibilidade de reinfecções em pessoas que haviam se infectado por VOCs antigas e taxa de transmissão viral. As mutações em S da omicron são A67V, Del69/70, T95I, G142D, Del143–145, Del211, L212I, ins214EPE, G339D, S371 L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K e L981F ⁽⁵³⁾.

Mutações como T478K, N501Y, D614G e a deleção 69/70 podem aumentar a afinidade de ligação entre RBD e ACE2 ou a velocidade nos eventos de fusões célula-células, características as quais podem aumentar a infectividade dessa variante ⁽⁵¹⁾. A presença de outras mutações em outras partes do gene S, tais como a presença dupla de Q498R-N501Y e tripla de H655Y-N679K-P681H, das quais as últimas 3 estão próximas ao sítio de clivagem de furina, podem conferir melhora na afinidade de ligação entre proteína viral e receptor da célula hospedeira e aumentar velocidade de clivagem enzimática na região S1/S2, respectivamente ⁽⁵¹⁾. Essas características podem aumentar a infecção e replicação viral. Quanto a resistência à ação humoral, mutações como S371L, N440K, G446S e Q493R conferiram resistência aos anticorpos gerados de infecções prévias por outros VOCs ⁽⁵⁴⁾.

As preocupações quanto a eficácia das vacinas contra a nova variante do SARS-CoV-2 foram bem justificadas por um estudo realizado por Hoffman et al.,2022 onde duas doses da vacina BNT162b2, da Pfizer-BioNTech, tiveram ação neutralizante 34 vezes menor quando comparada com a linhagem antiga B.1 e 12 vezes menor quando comparada com a variante delta ⁽⁵⁵⁾. Apesar da resistência apresentada pela omicron perante a vacina avaliada, uma terceira dose, ou dose reforço, aumentou o nível da resposta vacinal contra a omicron. Entretanto, plasma de pacientes que já haviam contraído as formas leves ou severas da COVID-19 mostraram uma eficiência reduzida em inibir a infecção viral. O efeito disso tem sido

visto nos casos de reinfeção decorrentes do surgimento da omicron e a nova onda epidemiológica ⁽⁵²⁾.

A descoberta da omicron em 2021 indicou a presença de três subvariantes, BA.1, BA.2 e BA.3 ⁽⁵²⁾. Logo após suas descobertas, BA.1 já era responsável por infectar pessoas por diversos países, tais como casos de COVID-19 em diversos outros países, tais como Bélgica, Hong Kong, Israel, Austria, Austrália, França, Dinamarca e Alemanha ⁽⁵¹⁾. Em janeiro de 2022 a BA.2 começou a tomar proporções globais, sendo classificada como VOC e logo em seguida superando a BA.1 quanto ao número de infectados por essa subvariante ⁽⁵⁶⁾. Ambas as subvariantes possuem 51 mutações espalhadas pelo genoma, 32 das quais são comuns entre as duas variantes ⁽⁵⁷⁾. Das 32 mutações, 21 estão presentes em S, BA.1 possui 13 mutações únicas em S e BA.2 possui 7 mutações únicas no mesmo gene. Uma diferença importante que pode servir como critério de diagnóstico são as múltiplas deleções em NTD de BA.1 e ausentes em BA.2, podendo diferenciá-las em qPCR através do ensaio de SGTf ⁽⁵³⁾. Embora BA.2 possua menor quantidade de mutações em S em relação a BA.1 (28 e 34 mutações respectivamente), BA.2 se comportou de forma mais transmissível do que BA.1, podendo também reinfectar pessoas anteriormente infectadas pela BA.1 ⁽⁵⁶⁾. As mutações presentes no gene S de BA.2 são - T19I, L24S, ins25PPA, D142D, V213G, G339D, S371L, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K, sendo T19I, ins25PPA, V213G, S371F, T376A, D405N e R408S únicas quando comparadas a BA.1 ⁽⁵⁷⁾. As mutações A67V, Del69/70, T95I, Del143-145, Del211, L212I, ins214EPE, S371L, G446S, G496S, T547K, N856K, L981F são únicas em BA.1 quando comparadas com BA.2 ⁽⁵⁷⁾.

BA.1, BA.2 e BA.3 não foram as únicas subvariantes da omicron relatadas no mundo. Diversas outras subvariantes foram surgindo e algumas chamaram atenção por conta das preocupações quanto ao potencial transmissível e de evasão da ação dos anticorpos gerados por vacina ou por infecções prévias. BA.4 e BA.5 foram primeiramente identificadas na África do Sul em janeiro de 2022 e sua disseminação mundial levou na substituição da BA.2, a qual era a variante dominante do SARS-CoV-2 no mundo até abril de 2022 ⁽⁵⁸⁾. Sendo assim, além das variantes BA.1 e BA.2, BA.4 e BA.5 passaram a ser considerados como VOC pela OMS. As proteínas

spike de ambas as subvariantes, BA.4 e BA.5, são idênticas e muito semelhantes a da BA.2 ^(58,59). As diferenças proteicas encontradas em BA.4 e BA.5 são a presença da deleção Del69/70, as mutações L452R e F486V e a forma selvagem (*wild type* - WT) na posição Q493. A mutação L452R, também descrita na variante delta, tem sido associada a um aumento da afinidade entre spike e ACE2, além de estar associada com redução da ação neutralizante dos anticorpos ^(59,60). A mutação F486V tinha uma prevalência muito baixa antes da BA.4 e BA.5, visto que a taxa de mutações sinônimas e não sinônimas nesse aminoácido apontou uma seleção negativa, favorecendo a permanência da forma selvagem F. Entretanto, mutações nessa posição favorecem à evasão da proteína à ação neutralizante dos anticorpos ⁽⁵⁹⁾.

Algumas outras subvariantes da omicron são oriundas de recombinações entre variantes diferentes. Como já foi dito, as recombinações são eventos muito importantes para explicar o surgimento das espécies dos coronavírus. As formas recombinantes do SARS-CoV-2 já foram relatadas, sendo a maioria oriundas a partir de recombinações entre BA.1 e BA.2 ⁽²⁾. Em janeiro de 2022 algumas sequencias depositadas na Iniciativa Global de Compartilhamento de Dados da Gripe Aviária (GISAID - do inglês *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*) apontavam para formas recombinantes entre delta e omicron, posteriormente conhecidas como Deltacron, mas que foram removidas na plataforma após inspeções apontarem que essas sequencias indicavam fontes de contaminação ⁽²⁾. Entretanto, outras sequências depositadas na mesma plataforma evidenciavam pontos de recombinação entre delta e omicron. As subvariantes XD (encontrada na França e Dinamarca), XF (encontrada na Inglaterra) e XS (encontrada nos Estados Unidos) são casos de recombinação entre delta e omicron. Dentre as formas recombinantes entre BA.1 e BA.2 a XE é a mais importante por apresentar vantagem propagativa em relação a BA.2 ⁽²⁾.

Recentemente mais duas variantes da omicron começaram a ganhar destaque – a BQ.1 e XBB.1 ⁽⁶¹⁾. O Grupo Consultivo Técnico sobre Evolução do Vírus SARS-CoV-2 (TAG-VE) discutiu as últimas evidências sobre as variantes da omicron e as implicações quanto ao surgimento dessas duas novas subvariantes. Ambas já foram detectadas em diversos outros países e suas prevalências estão em crescimento. A BQ.1 foi identificada em 65 países, enquanto a XBB.1 em 35. A BQ.1

é uma sublinhagem da BA.5 a qual se diferencia genotipicamente com a presença das mutações K444T e N460K, ambas contidas em RBM. Embora não haja ainda nenhum indício de aumento da gravidade da doença, essas mutações adicionais podem conferir a essa variante evasão aos anticorpos gerados por infecções prévias das variantes antigas da omicron, sugerindo risco de reinfecção ⁽⁶¹⁾. A XBB.1 é uma forma recombinante entre BA.2.10.1 e BA.2.75. As principais mutações associadas a essa variante são V445P, G446S, F486S e F490S, todas pertencentes a RBM. Embora as evidências de possibilidades de reinfecções em pessoas que já haviam se infectados pela omicron, essa variante precisa ser mais investigada ⁽⁶¹⁾.

3.3 VIGILÂNCIA MOLECULAR DO SARS-CoV-2

Durante 2 anos de pandemia o SARS-CoV-2 esteve em constante evolução e o impacto disso foram as diversas ondas de casos de COVID-19 pelo mundo. Tão importante quanto às campanhas vacinais, destinadas ao controle de novas infecções e hospitalizações, as metodologias de monitoramento epidemiológico da COVID-19 são ferramentas essenciais para lidar com a emergência de saúde global gerada pelo SARS-CoV-2. Diversas são as formas de diagnóstico e vigilância, como testes de abordagem imunológica, que detectam antígenos e/ou anticorpos, como por exemplo os testes Imunoenzimáticos (ELISA), os testes de imunocromatografia (testes rápidos) e os testes de neutralização, e moleculares, onde o objetivo é investigar a presença do material genético do hospedeiro, quantificá-lo e avaliar sua característica genotípica ⁽⁴⁾. O diagnóstico a partir do isolamento do material genético viral permitiu a identificação das variantes prevalentes nas diferentes fases da pandemia. A melhor forma de conduzir a vigilância molecular viral é a partir das técnicas de sequenciamento, as quais podem ser de genoma completo ou parcial. O sequenciamento parcial do gene S é o suficiente para confirmar a infecção de variantes conhecidas ^(4,52). A identificação de novas variantes e suas classificações filogenéticas só são possíveis a partir do sequenciamento de genoma completo.

Outras metodologias podem auxiliar na detecção de variantes, como por exemplo o SGTF que pode indicar ou identificar variantes como a alfa e as subvariantes da omicron ⁽³⁶⁾. As plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e a metodologia convencional de Sanger tem sido empregadas na pandemia para a geração de dados de sequências de genoma completo ou parcial, auxiliando no monitoramento da evolução viral, identificação das variantes responsáveis pelas ondas de casos epidemiológicos e avaliação do impacto de suas mutações na ação neutralizante dos anticorpos oriundos das vacinas e infecções prévias, consolidando-se como ferramentas essenciais para a vigilância molecular viral.

3.3.1 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

No início do surto epidemiológico da COVID-19, o agente etiológico por trás desses casos foi identificado através da técnica de metagenoma de RNA, a qual é capaz de sequenciar múltiplos genomas em uma única amostra biológica ⁽⁷⁾. A partir da descoberta do SARS-CoV-2, diversas outras amostras colhidas de pacientes acometidos por esse patógeno foram submetidas ao sequenciamento de genoma completo e os dados publicados em bancos de dados genômicas como o GenBank e GISAID. Esses dados gerados são importantes para o monitoramento da evolução do agente etiológico, desenvolvimento de testes diagnósticos sejam sorológicos ou moleculares, análise filogenética, rastreabilidade da origem do patógeno e desenvolvimento de vacinas. As plataformas de NGS oferecem a detecção em elevado rendimento de múltiplos patógenos sem que a equipe médica dependa de métodos de cultura e hipóteses clínicas, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários/parasitas ⁽⁵⁾.

São diversas plataformas que utilizam a tecnologia de NGS sob diferentes mecanismos, embora todas se apropriem dos mesmos princípios básicos ⁽⁵⁾. Em todas as plataformas o material genético alvo, podendo ser DNA ou RNA, será preparado em uma biblioteca de DNA, seja esse material previamente fragmentado ou não, podendo passar por etapa de amplificação por PCR, e, no caso do material alvo ser RNA torna-se necessária a PCR por transcrição reversa (RT), amplificando e sequenciando individualmente o fragmento genômico, gerando leituras (reads) que serão analisadas em conjunto para que o genoma seja montado com alta confiança ⁽⁵⁾. Como no NGS há a geração de diversas leituras por toda região alvo, podendo ser de todo o genoma ou de uma região parcial de um genoma, então a quantidade dessas leituras que abrangem um dado nucleotídeo (cobertura) vai definir o grau de confiança para cada posição analisada, onde posições com alta cobertura possuirão maior confiabilidade na hora da chamada das bases (base call). Os subtipos de NGS são: Pirosequenciamento, sequenciamento por síntese, sequenciamento por ligação, sequenciamento por ion-semicondutor e sequenciamento de molécula única em tempo real ⁽⁵⁾. Dentre eles, o mais comum é o sequenciamento por síntese (do inglês *sequencing by synthesis – SBS*), utilizado por diversas empresas, com destaque da Illumina.

Dadas as possibilidades fornecidas pelas tecnologias de NGS, pesquisadores do mundo todo estiveram coletando amostras e sequenciando-as por diferentes plataformas e diferentes finalidades. No início da pandemia, na China, alguns laboratórios investigaram em paralelo o SARS-CoV-2, além do CDC chinês a qual utilizou as plataformas MiSeq ou iSeq da Illumina ⁽⁶²⁾. O resultado desses sequenciamentos permitiu a identificação não só do clado filogenético do SARS-CoV-2, mas suas relações com outros vírus já conhecidos como o SARS-CoV, com 79% de similaridade entre ambos os genomas, e outros coronavírus encontrados em morcegos, podendo estabelecer uma rota de origem para esse patógeno. Moore et al. utilizou a plataforma MinION, fabricada pela Oxford Nanopore Technologies, para realizar um trabalho de metagenômica para identificar o SARS-CoV-2, a partir da tecnologia de NGS baseado em amplicon, onde ao invés de obter diversos fragmentos dos genomas contidos na amostra analisada, (procedimento comum em metagenômica), os autores usaram 200 pares de primers para obter produtos de 1000 pares de bases de cada par de primer anelado ao longo do genoma do SARS-CoV-2 ⁽⁶³⁾. Essa técnica permitiu a identificação do genoma viral com maior cobertura do que a metagenômica convencional. Outro trabalho realizado por C.Charre et al. comparou a performance entre 4 plataformas de NGS para sequenciamento de genoma completo do SARS-CoV-2, sendo uma dessas também usando sequenciamento baseado no amplicon ⁽⁶⁴⁾. Embora todas as plataformas tenham alto grau de concordância, rendendo genomas quase completos, a plataforma utilizando sequenciamento baseado em amplicon foi a única sensível para sequenciar amostras com carga viral moderada a baixa, com Cycle Threshold (C.T) de 33.

Amostras com carga viral baixa é um fator limitante para essas plataformas de NGS, visto que amostras com C.T superior a 25 normalmente não são bem sequenciadas ⁽⁵⁾. Além disso, outro ponto negativo é o custo operacional elevado para implementação da técnica e treinamento de pessoal, tornando essa plataforma de acessibilidade limitada. Visto que o SARS-CoV-2 se tornou um vírus pandêmico, plataformas alternativas de genotipagem devem ser empregadas para permitir uma vigilância molecular de forma mais globalizada.

3.3.2 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

As dificuldades envolvidas na obtenção dos dados de genoma por parte das tecnologias de NGS podem prejudicar o monitoramento da real situação epidemiológica do SARS-CoV2, visto que esse vírus está em constante evolução e mutações e variantes surgem periodicamente. De uma maneira alternativa, a tecnologia proposta por Sanger em sequenciar um fragmento de material genético pode ser mais viável do que sequenciar o genoma inteiro, além de servir como opção de custo operacional mais vantajosa ⁽⁴⁾.

A metodologia de Sanger funciona de forma mais simples que as plataformas de NGS, não exigindo produção de biblioteca de DNA e preparações bem elaboradas dos fragmentos do material genético alvo. O PCR ou RT-PCR, se o genoma for de RNA (como é o caso do SARS-CoV-2), é aplicado como uma etapa essencial para o sequenciamento. O sequenciamento de Sanger será realizado no fragmento amplificado (amplicon) alvo da PCR, ou seja, esse é um sequenciamento que pode ser utilizado para qualquer PCR já implementada anteriormente em um laboratório de diagnóstico molecular, funcionando como uma metodologia adaptável ⁽⁶⁵⁾.

Para que o resultado do sequenciamento seja de ótima qualidade é necessário que a extração do material genético e a qualidade do ensaio do PCR seja garantida, portanto, a eficácia do processo vai depender do kit de extração utilizado, o conjunto de primers e os reagentes para o ensaio de PCR. Em um laboratório que já realize ensaios de PCR para fins de diagnóstico ou pesquisa e que já tenham padronizado todo o protocolo de extração de ácidos nucleicos e PCR, a adoção do sequenciamento de Sanger não necessitará de treinamentos adicionais de equipe.

Ao sequenciar a região alvo e inserir os produtos do sequenciamento na máquina de eletroforese capilar, os resultados serão visualizados em um cromatograma, a qual representa cada base identificada pelo aparelho e a análise dos dados envolve a interpretação desses cromatogramas e dados brutos. A metodologia de Sanger permite o sequenciamento de 800 a 1000 pares de base por fragmento alvo. A partir das sequências geradas, será montada a sequência consenso, referente à região alvo analisada, quee então será comparada com uma sequência referência para identificar os pontos de mutação na região alvo ⁽⁶⁵⁾.

Embora essa seja uma metodologia antiga, ainda é muito utilizada para sequenciamento de fragmentos pequenos do genoma, identificação de mutações e confirmação de dados de sequenciamento gerados por NGS, permanecendo como um padrão ouro na determinação das sequências nucleotídicas, sejam em material genético isolado de amostras biológicas ou produzidos sinteticamente ^(5,65). A partir disso, alguns autores utilizaram essa metodologia para identificar as variantes virais do SARS-CoV-2. Um estudo conduzido por Chaki et al. foi capaz de identificar variantes como alfa, delta e omicron BA.2 a partir de um sequenciamento de fragmento curto (<275 pb) a qual faz parte de RBM, em amostras que o CT chegou em 35.7, considerado como carga viral baixa ⁽⁶⁶⁾. Outro estudo relatou a identificação de variantes do SARS-CoV-2 em Hiroshima durante diferentes períodos da pandemia, sequenciando uma região de 798 pb no gene S ⁽⁶⁷⁾. Esses trabalhos demonstram a capacidade da metodologia de Sanger em identificar variantes importantes do SARS-CoV-2 a partir da região mais variável do genoma, substituindo a utilização de NGS através de uma metodologia de melhor custo-benefício e com resultados em tempo mais curto.

4. METODOLOGIA

4.1 DESIGN DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional transversal, desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

Foram selecionadas amostras preservadas, positivas para SARS-CoV-2, de indivíduos maiores de 18 anos, que chegaram a este centro com sintomas de infecção, bem como de profissionais de saúde do HUPES que desenvolveram COVID-19. Os indivíduos foram atendidos no ambulatório de pneumologia do HUPES de junho de 2020 a fevereiro de 2022. Todas as amostras dos participantes envolvidos foram confirmadas para COVID-19 por meio da detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva por um ensaio de RT-qPCR, usando o kit comercial da 1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit (1Drop, Seongnam-si), para a detecção de SARS-CoV-2 a partir da amplificação de 3 genes: E, N e RdRp. As amostras foram consideradas detectáveis com C.T igual ou inferior a 40 em todos os 3 genes.

4.2 PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

Utilizamos 2,5 ul de RNA extraído da saliva em um ensaio de transcrição reversa utilizando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Massachusetts) conforme manual do fabricante. As ciclagens das duas etapas são 72°C a 5 minutos (1ª etapa), choque térmico a 3 minutos (após o tempo térmico) e 50°C a 10 minutos, 55°C a 10 minutos, 58°C a 10 minutos e 94°C a 1 minuto (2ª etapa). Todo os 6 uL de reação da transcriptase reversa foi usado em uma reação de PCR a um volume final de 25 uL. A enzima utilizada foi a Platinum Taq Polimerase, Brasil (Invitrogen, Massachusetts). As sequências dos primers para amplificação da primeira e segunda rodada, exibidos na Tabela 1, foram retiradas de trabalhos publicados ⁽⁶⁸⁾ (https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/blob/master/primer_schemes/nCoV-2019/V3/nCoV-2019.tsv).

As concentrações dos reagentes, tanto da produção de cDNA quanto das duas rodadas de amplificação usando a enzima Platinum Taq, foram usadas com base nas informações dos kits enzimáticos. A ciclagem do primeiro round é 94°C a 2 minutos, 94° a 20 segundos, 60° a 30 segundos, 72° a 1 minuto e 30 segundos por 35 ciclagens e 72° a 2 minutos. 2 uL do primeiro round foi utilizado para uma segunda rodada de PCR (NESTED PCR) em um volume final de 60 uL, sob a ciclagem 94° a 2 minutos, de 94° a 20 segundos, 60° a 30 segundos, 72° a 1 minuto e 10 segundos por 35 ciclos e 72° por 2 minutos. Ao término do PCR, 10 uL do produto foi destinado à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Utilizamos o kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Massachusetts) conforme manual do fabricante, obtendo um material purificado de 40 uL. Os primers de sequenciamento são capazes de abranger uma região de cerca de 1000 pb no gene S. A reação de sequenciamento foi realizada usando o kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit. O produto da reação de BigDye foi purificado usando isopropanol a 75% e no final acrescentou-se 10 uL de formamida em cada poço para sequenciamento utilizando o equipamento SeqStudio (Applied Biosystems, Massachusetts).

4.4 ANÁLISE DE DADOS

Os resultados foram analisados pelo software Geneious 9.0.5, (Dotmatics, Massachusetts) para a construção da sequência consenso a partir da sequência referência NC_045512.2 e identificação das mutações ao longo do genoma. As sequências que continham mutações comuns a variantes importantes foram alinhadas a outras sequências depositadas na plataforma GISAID (EPI_ISL_12838762, EPI_ISL_12838749, EPI_ISL_12587800, EPI_ISL_7566330), representativas de variantes de preocupação e importância através do editor de sequências alinhadas BioEdit. As sequências geradas neste estudo foram depositadas na plataforma GISAID. A classificação adotada para as variantes foi com base na nomenclatura PANGOLineage, proposta por Rambaut ⁽³⁴⁾.

5. RESULTADOS

5.1 ARTIGO ORIGINAL

Artigo nº1

**A SIMPLIFIED SANGER SEQUENCING METHOD FOR DETECTION OF
RELEVANTS SARS-COV-2 VARIANTS**

Diagnostics 2022; 12: 1-10

Publicado

Article

A Simplified Sanger Sequencing Method for Detection of Relevant SARS-CoV-2 Variants

Felice Deminco , Sara N. Vaz, Daniele S. Santana, Celia Pedroso, Jean Tadeu, Andreas Stoecker , Sueli M. Vieira, Eduardo Netto and Carlos Brites * 

Laboratório de Pesquisa em Infectologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia (UFBA)/EBSERH, Salvador 40170-110, Bahia, Brazil

* Correspondence: crbrites@gmail.com; Tel.: +55-71-3646-3750

Abstract: Molecular surveillance of the new coronavirus through new genomic sequencing technologies revealed the circulation of important variants of SARS-CoV-2. Sanger sequencing has been useful in identifying important variants of SARS-CoV-2 without the need for whole-genome sequencing. A sequencing protocol was constructed to cover a region of 1000 base pairs, from a 1120 bp product generated after a two-step RT-PCR assay in samples positive for SARS-CoV-2. Consensus sequence construction and mutation identification were performed. Of all 103 samples sequenced, 69 contained relevant variants represented by 20 BA.1, 13 delta, 22 gamma, and 14 zeta, identified between June 2020 and February 2022. All sequences found were aligned with representative sequences of the variants. Using the Sanger sequencing methodology, we were able to develop a more accessible protocol to assist viral surveillance with a more accessible platform.

Keywords: SARS-CoV-2; Sanger; variants; surveillance



Citation: Deminco, F.; Vaz, S.N.; Santana, D.S.; Pedroso, C.; Tadeu, J.; Stoecker, A.; Vieira, S.M.; Netto, E.; Brites, C. A Simplified Sanger Sequencing Method for Detection of Relevant SARS-CoV-2 Variants. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2609. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12112609>

Academic Editor: Chao-Min Cheng

Received: 3 October 2022

Accepted: 24 October 2022

Published: 27 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

SARS-CoV-2, a new coronavirus that causes a severe acute respiratory syndrome (COVID-19), was first reported in December 2019 [1] and soon after became a pandemic due to its high transmission rate, which favored the formation of new genomic mutations and contributed to the emergence of new variants [2].

As of November 2020, three new variants of the coronavirus emerged, originating from Brazil (gamma variants -P.1), the United Kingdom (alpha variant -B.1.1.7), and South Africa (beta variant -B.1.351) [3–5]. They rapidly spread across continents and were classified by the World Health Organization (WHO) as Variants of World Concern (VOC). Currently, the sub-variants of omicron (B.1.1.529), BA.2, BA.4, and BA.5, are the only ones with this classification [6].

In the middle of 2021, the delta variant caused an outbreak, becoming the most prevalent and worrying worldwide [7]. However, the emergence of new cases and the prevalence of the omicron variant in South Africa evidenced the change in the epidemiological landscape, whereas the circulation of the delta variant has been suppressed by the high transmissibility of the omicron [8].

Molecular surveillance of the new coronavirus through new genomic sequencing technologies has played a fundamental role in the monitoring of COVID-19 evolution by allowing the identification and screening of the main variants responsible for outbreaks around the world [9].

Methodologies involving Next Generation Sequencing (NGS) has been essential during the pandemic, from the detection of the etiological agent in the first samples until the determination of variants from the sequencing data deposited on platforms such as GISAID [10]. However, NGS is a platform with restricted accessibility due to operational costs, making difficult the viral molecular tracking in a widespread way [11]. Although Sanger sequencing is an old methodology, it is still very useful for mutation analysis and

confirmation of NGS data. Recently, it has been used to identify important variants of SARS-CoV-2 without need of the whole-genome sequencing [11].

In this study, we implemented an amplification and sequencing protocol for SARS-CoV-2 to identify the most important variants from a segment of the S gene. Our protocol included the Receptor Domain Binding (RBD) in the S1 subunit, the S1/S2 cleavage site, and the start of the S2 subunit, thus spanning amino acids K417 through T716, in a single 1120 bp PCR product.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

This is an observational cross-sectional study, developed at the Research Laboratory for Infectious Diseases (LAPI) at Hospital Universitario Professor Edgard Santos (HUPES) in Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

We selected preserved samples, positive for SARS-CoV-2, from individuals over 18 years of age, who came to this center with symptoms of infection, as well as from HUPES healthcare workers who developed COVID-19. Individuals were attended to at the HUPES pneumology outpatient clinic from June 2020 to February 2022. All samples from involved participants were confirmed for COVID-19 through [12] detection of SARS-CoV-2 in saliva samples by an RT-qPCR assay, using the commercial kit 1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit (1Drop, Seongnam-si), for amplification of 3 genes: E, N, and RdRp. Samples were considered detectable with Cycle Threshold (C.T) equal to or less than 40 in all 3 genes.

2.2. Amplification Protocol

We used 2.5 µL of RNA extracted from saliva in a reverse transcription assay using the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's manual. The cycles of the two stages are 72 °C at 5 min (1st stage), thermal shock at 3 min (after thermal time), 50 °C at 10 min, 55 °C at 10 min, 58 °C at 58 min, and 94 °C at 1 min (2nd stage). For PCR reaction, 6 µL of reverse transcriptase reaction was used at a final volume of 25 µL. The enzyme used was Platinum Taq Polymerase from Brazil (Invitrogen, Massachusetts). The sequences of primers for the first and second rounds of amplification, shown in Table 1, were taken from published works [13] (https://github.com/artic-network/artic-ncov2019/blob/master/primer_schemes/nCoV-2019/V3/nCoV-2019.tsv accessed on 12 April 2021). The concentrations of all reagents used followed the guidelines of the enzymatic kits. The cycling of the first round is 94 °C for 2 min, 94 °C for 20 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 30 s for 35 cycles, and 72 °C for 2 min. An amount of 2 uL of the first round was used for a second round PCR (Nested PCR) in a final volume of 60 uL, cycling at 94 °C for 2 min, 94 °C for 20 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 10 s for 35 cycles and 72° for 2 min. At the end of the PCR, 10 uL of the product was used for electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

Table 1. Information of primers used in nested PCR and sequencing.

	Primer's Name	Sequence	T.M	T.A	Position
1R	Primer forward 75 ^(a)	AGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGT	64.5°	60°	22.517–22.524
	Primer reverse 79 ^(a)	CATTTCATCTGTGAGCAAAGGTGG	64.4°	60°	24.146–24.169
2R	Primer forward CoV17 ^(b)	ATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGC	64.5°	60°	22.728–22.752
	Primer reverse 78 ^(a)	TGTGTACAAAACTGCCATAITGCA	64.5°	60°	23.823–23.847
SEQ	Primer forward 77 ^(a)	CCAGCAACTGTTTGTGGACCTA	64.9°	60°	23.123–23.144
	Primer reverse 77 ^(a)	CAGCCCTAATAACAGCCTGC	65.4°	60°	23.501–23.522

The name, sequence, melting temperature (T.M), annealing temperature (T.A), and position are shown. The terms in bold represent the steps of RT-PCR, where the first round (1R) will produce a 1645 bp strand and the second round (2R) will produce a 1120 bp strand. The sequencing of the strand generated by the 2R will allow the identification of 25 important target mutations. (a): removed primers from ARTICnetwork; (b): removed primers from Shaibu et al. [13].

2.3. Purifications and Sequencing

We used the commercial kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, MA, USA) according to the manufacturer's manual, obtaining a purified product of 40 μ L. The sequencing primers can cover a region of about 1000 base pairs (bp) in the S gene. The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit. The BigDye reaction product was purified using 75% isopropanol, and at the end 10 μ L of formamide was added to each well for sequencing using the SeqStudio (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

2.4. Data Analysis

The results were analyzed by the Geneious 9.0.5 software (Dotmatrix, MA, USA) for the construction of the consensus sequence from the reference sequence NC_045512.2 and identification of mutations along the genome. Sequences that contained mutations common to important variants were aligned to others, deposited on the GISAID and NCBI GenBank platforms, representative of variants of concern. The sequences generated in this study were deposited on the GISAID and GenBank platforms' Table S1. The classification adopted for the variants was based on the PANGO lineage nomenclature, proposed by Rambout et al. 2020 [14].

3. Results

A total of 103 samples obtained from people with COVID in the period from 23 June 2020 to 12 February 2022 were used (Figure 1). The proportion of men in the sample was 53.2%. The age of the participants ranged from 18 to 85 years with a mean of 48 years. Among all the participants, cough was the most prevalent symptom (60%); HIV infection was the most common health condition, comprising 18% of the samples collected.

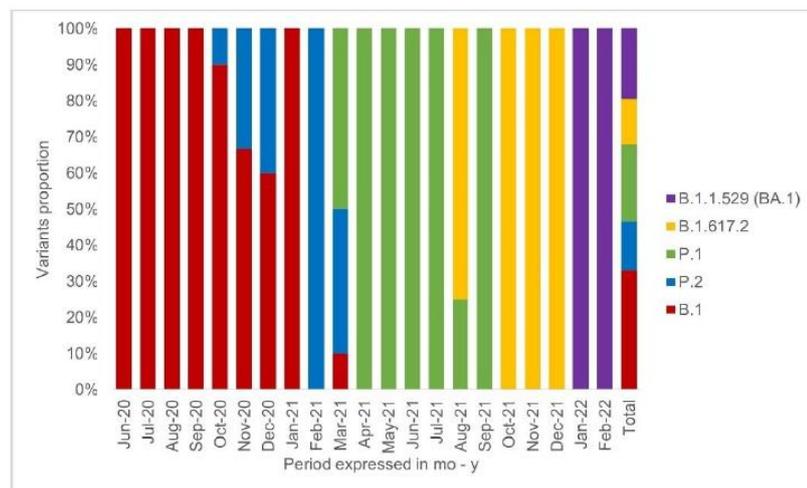


Figure 1. Distribution of studied variants in 2020 to 2022. Distribution of the variants detected in the study period, by month: wild type (B.1) as red, zeta (P.2) as blue, gamma (P.1) as green, delta (B.1.617.2) as yellow, omicron (BA.1) as purple. It can be observed that the B.1 strains and the P.1 variant had the highest prevalence among the analyzed samples, while the BA.1 was the only variant found in the first two months of 2022.

We were able to amplify a single, extensive region of DNA of 1120 bp in all samples, which is enough to identify important mutations for the characterization and differentiation of emerging variants (Figure 2). The CT values for the samples ranged from 4.6 to 37.

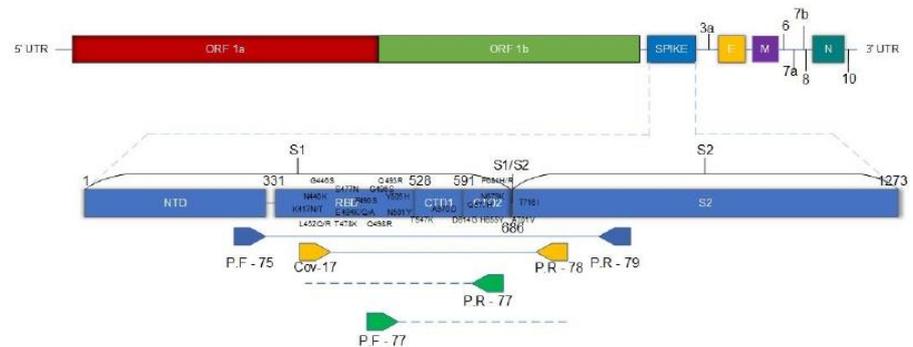


Figure 2. Primer placement and detection coverage. Positioning of the amplification and sequencing primers within the S gene. The positioning of the primers allows identification of the 25 mutations signaled in the image. The first round of PCR (primer forward 75 and primer reverse 79) amplifies an extensive region of the gene, covering the entire portion of RBD up to the initial portion of the S2 subunit. The product of the second round (Primer Forward CoV-17 and Primer Reverse 78) delimits the region for sequencing and identification of mutations.

In total, 28 important mutations are potentially identified, all located between amino acids K417 to T716 that are present in VOCs and VOIs, from position 1251 to 2148 of the S gene (Table 2). In all samples, we identified 23 mutations. All of these mutations allowed us to identify and differentiate 15 viral variants, including 4 omicron subvariants.

Among the sequenced samples, we found 4 relevant variants, represented by 13 delta variants (19%), 20 omicron variants (BA.1) (29%), 22 gamma variants (32%), and 14 zeta variants (20%) in a total of 69 samples. Currently, BA.2, BA.4, and BA.5 are classified as VOC. Two samples presented mutations suggestive for Lambda (C.37), L452Q and D614G, but none showed the F490S mutation. Thirty-four samples (33%) belong to the wild lineages (B.1) that prevailed at the beginning of the pandemic.

The sequences corresponding to the variants found were aligned with representative sequences of these variants, deposited on the GISAID platform, plus the first one generated in Wuhan, NC_045512.2. All detected mutations representative of each variant were paired with those found in the sequences removed for alignment (Figure 3).

Table 2. Mutations and possible variants identified by the protocol.

Lineage	Zeta	Gama	Delta	Omicron			Alfa	Beta	Lambda	Eta	Iota	Kappa	Epsilon	Mu	
Mutation	P.2	P.1	B.1.617.2	BA.1	BA.2	BA.4	BA.5	B.1.1.7	B.1.351	C.37	B.1.525	B.1.526	B.1.617.1	B.1.427	B.1.621
K417N				X	X	X	X		X						
K417T		X													
N440K				X	X	X	X								
G446S				X	X	X	X								
L452Q										X					
L452R			X			X	X						X	X	
S477N				X	X	X	X					X			
T478K			X	X	X	X	X								
E484A				X	X	X	X								
E484K	X	X							X		X				X
E484Q													X		
F486V						X	X								
F490S										X					
Q493R				X	X										
G496S				X											
Q498R				X	X	X	X								
N501Y		X		X	X	X	X	X	X						X
Y505H				X	X	X	X								
T547K				X											
A570D								X							
D614G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H655Y		X		X	X	X	X								
Q677H											X				
N679K				X	X	X	X								
P681H				X	X	X	X	X							X
P681R			X										X		
A701V									X			X			
T716I								X							

The set of these mutations is sufficient for the identification and differentiation of these 15 variants, represented in bold (zeta, gamma, delta, BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, alpha, beta, lambda, eta, iota, kappa, epsilon, and mu), since some individual mutations are specific and each variant has a combination of mutations capable of differentiating them from each other. Four omicron sublineages can be differentiated due to the absence of two mutations, G496S and T547K (BA.2), and presence of L452R and F486V (BA.4/BA.5). The "X" marking in the body of the table represents the presence of mutations in each variant.

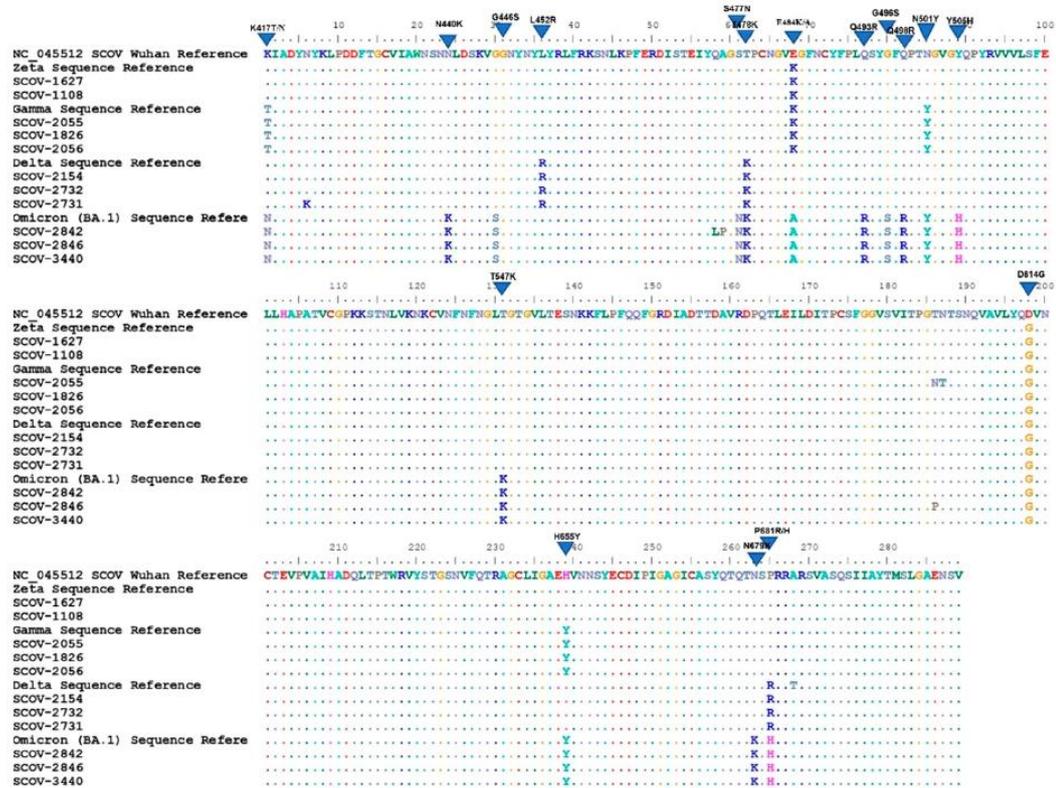


Figure 3. Alignment of the sequences with the representative of each variant and the reference generated in Wuhan. Protein sequences of some samples were aligned with templates for zeta (P.2), gamma (P.1), delta (B.1.617.2), and omicron (B.1.1.529). BA.1 plus the reference sequence generated in Wuhan. This alignment was done in the BioEdit program. The mutation profile found in each sample was paired with the one found in the template samples, confirming the classification adopted for the samples (SCOV-1627, SCOV-1108—zeta; SCOV-2055, SCOV-1826, SCOV-2056—gamma; SCOV-2154, SCOV-2732, SCOV-2731—delta; SCOV-2842, SCOV-2846, SCOV-3440—omicron). The illustrated protein alignment corresponds to position 417 to 705 of the spike.

4. Discussion

The emergence of new SARS-CoV-2 variants has raised concerns about the new challenges of the pandemic. Sanger sequencing seems to be a viable alternative tool for identifying emerging SARS-CoV-2 variants [15]. In this work, we used Sanger sequencing technology to construct a simplified protocol for detecting the most important variants in the global scenery. We were able to identify several variants of SARS-CoV-2 during two years of pandemic, using a simplified protocol that allowed us to follow the changes in circulating variants.

The protocol was constructed with the aim of identifying 28 key mutations in the S gene of SARS-CoV-2, RBD, S1/S2 cleavage region and the beginning of the S2 subunit. In this region there are mutations characteristic of 11 main variants of the coronavirus plus 4 subvariants of omicron (B.1.1.529), such as Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), BA.1, BA.2, BA.4, and BA.5 (B.1.1.529), Beta (B.1.351), Zeta (P.2), Theta (P.3), Lambda (C.37), Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Mu (B.1.621), and Epsilon (B.1.427) [2].

Other authors using the same technology were also able to identify mutations in the same region [16–18]. Salles et al. developed a sequencing protocol covering the entire S gene where they were able to identify the gamma variant without the need to sequence the entire genome [11]. Besides the gamma variant, others such as delta, alpha, beta, epsilon,

iota, kappa, and eta could be identified by other authors by sequencing five regions of the S gene [19]. Our protocol has the advantage of identifying the main variants of the coronavirus using only a single amplified fragment.

NGS platforms are useful tools for tracking viral gene variability in an infected individual, as well as for tracking mutations not detected by the Sanger platform [20]. As the pandemic progressed and new variants emerged, the genome sequencing data could not timely follow the increase in the number of cases worldwide, as more than 600 million cases were reported by May 2022 and only 13 million sequences have been deposited in the GISAID database since the beginning of the pandemic [9]. This confirms the weakness of current viral molecular surveillance, as the use of these platforms is concentrated in places with more sophisticated facilities and greater research resources. In addition, for a virus such as SARS-CoV-2 that does not present a high mutation rate [21] observed in other viruses such as HIV [22], Sanger technology becomes a more affordable alternative for screening important variants associated with new outbreaks worldwide [15].

In our study, we were able to sequence 103 samples from different periods of the pandemic, distributed over the peak periods. There were 38 (37%) between June 2020 and December 2020, 45 (44%) during year of 2021, and 20 (19%) in the months of January and February 2022. The C.T value of all samples was used to evaluate the effectiveness of the protocol against different viral loads. Our protocol was able to sequence samples with C.T from 4.6 to 37.0, showing its robustness despite the variation of viral load in clinical samples.

We included samples from 2020 to 2022, which provided us a way to follow the prevalence of variants over time. We detected the circulation of four important variants in addition to those belonging to wild strains predominant in 2020. In Bahia, in June 2020, variants B.1.1.28 and B.1.1.33 dominated the epidemiological picture, being suppressed by the emergence of gamma (P.1) and zeta (P.2) in January 2021 [23]. In total, we identified 34 samples containing wild-type strains, not specified by our protocol.

Among the important variants found in 69 samples, four variants are no longer circulating: gamma (P.1), zeta (P.2), delta (B.1.617.2), and the omicron subvariant BA.1 (B.1.1.529). When it was discovered, the omicron variant had 36 spike mutations, 15 of which are in RBD, some of which are present in other variants such as delta, beta, and gamma (K417N, T478K, N501Y, H655Y and P681H) [24] and are associated with viral escape to vaccines [25,26]. Our protocol was able to identify 13 mutations belonging to this variant, in which it was possible to visualize omicron-specific mutations (N440K, G446S, S477N, E484A, Q493R, G496S, Q498R, Y505H, T547K, N679K) [24,27].

The omicron variant is composed of several sublines, three of which are considered VOC, BA.2, BA.4, and BA.5, and basically have the same number of mutations [28,29]. Currently, BA.4 and BA.5 dominate the world epidemiological scenario, demonstrating greater transmissibility than BA.2. In addition, BA.4 and BA.5 can reinfect individuals who have already had COVID-19 by previous subvariants of omicron [30,31]. In our study, we identified 20 omicron variants, all characterized as BA.1. We did not identify the newest subvariants. Our protocol can differentiate BA.1, BA.2, BA.4, and BA.5, even though it cannot cover mutations such as D405N and D408S present in BA.2, BA.4, and BA.5. It is also able to continue identifying relevant variants as the viral evolution progresses. The absence of substitutions G446S, G496S, and T547K in BA.2 and the presence of L452R, F486V in BA.4/BA.5 became a differentiating criterion between them (Table 2) [27,28].

Thirteen sequences were classified as delta variants. This variant was first discovered in October 2020 but named by the WHO in May 2021 [6]. It has been considered a VOC due to its high transmissibility, short incubation period, and potential evasion of the neutralizing activity of antibodies generated by vaccine and previous infections [7,32]. In these samples, we identified three delta-specific mutations (L452R, T478K, and P681R) in addition to D614G, in agreement with other sequencing protocols, that used the same technology, capable of identifying delta [33].

The gamma variant, which is no longer important in the overall epidemiological picture of the pandemic, was identified in 22 samples. This variant was initially discovered in Japanese travelers returning from Manaus in November 2020 and was associated with the peak of cases in that city [34]. In these samples, we could find the common mutations described to gamma (K417T, E484K, N501Y, and H655Y). The E484K mutation was also found in 14 more samples, identified as zeta, a former VOI that is no longer circulating. Zeta was prevalent in Brazil in late 2020, where its emergence was accompanied by the spread of strains containing the E484K mutation [35].

The target region of our sequencing protocol comprises important amino acids for the infection mechanism of SARS-CoV-2 [36]. The amino acid K417, the first to be identified in our protocol, is part of the receptor-binding domain and is immediately adjacent to the receptor-binding motif (RBM), which encompasses the amino acids at positions 438 to 506 [2]. The S1 domain exhibits greater variability in amino acids compared to the S2 domain, with RBM being the most variable portion of RBD [2]. Within this RBM region, there are numerous important mutations, and all the VOCs already identified have at least one mutation in this region, conferring resistance to neutralizing antibody action and enhanced antigen-receptor interaction [37–40]. The enzymatic cleavage region between S1 and S2 stands out, because three essential mutations for the identification of important variants (H655Y, N679K and P681H) increase the proteolytic activity in this region, leading to increased viral infectivity and replication [27].

Mutations in the S gene responsible for the genotypic characterization of SARS-CoV-2 variants also influence their phenotypic characteristics, conferring escape to antibodies generated by vaccine or previous infections. Booster doses have emerged with the goal of improving vaccination coverage due to the emergence of new variants and the possibility of reinfection [41,42]. Success in identifying the variants through our protocol allowed us to observe that 100% of those who had the omicron variant and 70% of those who became infected with delta were vaccinated. The current protocol proved to be a simplified and effective tool for variant detection and could be applied to variant monitoring in vaccinated individuals.

5. Conclusions

Molecular surveillance of SARS-CoV using genome sequencing methodologies has provided worldwide data on viral evolution and adaptability as new cases emerged. The use of NGS for this purpose played an important role in this pandemic, although it is a platform of limited access due to operational costs. With the Sanger sequencing methodology, we were able to develop a more accessible protocol, which allowed us to identify four important variants from a single amplified DNA fragment. Thus, this protocol can assist viral surveillance from a more accessible platform.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12112609/s1>, Table S1: Sequence access number.

Author Contributions: Conceptualization, F.D., C.B. and C.P.; methodology, F.D., C.B., C.P., S.N.V. and A.S.; investigation, F.D., C.B., C.P., A.S., S.N.V., D.S.S. and J.T.; formal analysis, F.D., C.B., C.P. and E.N.; project administration, C.B.; resources, C.B.; supervision, C.B. and C.P.; validation, F.D., S.N.V., A.S., D.S.S. and C.P.; visualization, F.D.; writing—original draft preparation, F.D., C.B., C.P., S.N.V., D.S.S., S.M.V., A.S. and E.N.; writing—review and editing, F.D., C.B., C.P., S.N.V., D.S.S., S.M.V., A.S. and E.N.; funding acquisition, C.B. and C.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki the Research Ethics Committee of the Climério de Oliveira Maternity Hospital-UFBA (4,042,620), code number 4,290,254, 21 September 2020.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Table S1 (Supplementary Materials).

Acknowledgments: This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265–269. [CrossRef]
2. Tao, K.; Tzou, P.L.; Nouhin, J.; Gupta, R.K.; de Oliveira, T.; Kosakovsky Pond, S.L.; Fera, D.; Shafer, R.W. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *22*, 757–773. [CrossRef]
3. Fujino, T.; Nomoto, H.; Kutsuna, S.; Ujii, M.; Suzuki, T.; Sato, R.; Fujimoto, T.; Kuroda, M.; Wakita, T.; Ohmagari, N. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1243–1245. [CrossRef]
4. Chand, M.; Hopkins, S.; Dabrera, G.; Achison, C.; Barclay, W.; Ferguson, N.; Volz, E.; Loman, N.; Rambaut, A.; Barrett, J. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant Variant of Concern 202012/01. Available online: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959361/Technical_Briefing_VOC202012-2_Briefing_2.pdf (accessed on 10 May 2022).
5. Tegally, H.; Wilkinson, E.; Giovanetti, M.; Iranzadeh, A.; Fonseca, V.; Giandhari, J.; Doolabh, D.; Pillay, S.; San, E.J.; Msomi, N.; et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* **2021**, *592*, 438–443. [CrossRef]
6. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. 2022. Available online: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (accessed on 29 May 2022).
7. Tian, D.; Sun, Y.; Zhou, J.; Ye, Q. The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 751778. [CrossRef]
8. Karim, S.S.A.; Karim, Q.A. Omicron SARS-CoV-2 variant: A new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet* **2021**, *398*, 2126–2128. [CrossRef]
9. Munnink, B.B.O.; Worp, N.; Nieuwenhuijse, D.F.; Sikkema, R.S.; Haagmans, B.; Fouchier, R.A.M.; Koopmans, M. The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: Real-time molecular epidemiology. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1518–1524. [CrossRef]
10. GISAID Initiative [Internet]. Available online: <https://www.gisaid.org/> (accessed on 23 March 2021).
11. Salles, T.S.; Cavalcanti, A.C.; da Costa, F.B.; Dias, V.Z.; de Souza, L.M.; de Meneses, M.D.F.; da Silva, J.A.S.; Amaral, C.D.; Felix, J.R.; Pereira, D.A.; et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 Spike gene by sanger sequencing. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0262170. [CrossRef]
12. Vaz, S.N.; de Santana, D.S.; Netto, E.M.; Pedrosa, C.; Wang, W.-K.; Santos, F.D.A.; Brites, C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Braz. J. Infect. Dis.* **2020**, *24*, 422–427. [CrossRef]
13. Shaibu, J.O.; Onwuamah, C.K.; James, A.B.; Okwurawie, A.P.; Amoo, O.S.; Salu, O.B.; Ige, F.A.; Liboro, G.; Odewale, E.; Okoli, L.C.; et al. Full length genomic sanger sequencing and phylogenetic analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Nigeria. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0243271. [CrossRef]
14. Rambaut, A.; Holmes, E.C.; O’Toole, Á.; Hill, V.; McCrone, J.T.; Ruis, C.; du Plessis, L.; Pybus, O.G. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 1403–1407. [CrossRef]
15. World Health Organization. *Genomic Sequencing of SARS-CoV-2: A Guide to Implementation for Maximum Impact on Public Health*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
16. Jørgensen, T.S.; Blin, K.; Kuntke, F.; Salling, H.K.; Michaelsen, T.Y.; Albertsen, M.; Larsen, H. A rapid, cost efficient and simple method to identify current SARS-CoV-2. *medRxiv* **2021**. [CrossRef]
17. Daniels, R.S.; Harvey, R.; Ermetal, B.; Xiang, Z.; Galiano, M.; Adams, L.; McCauley, J.W. A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. *Infl. Other Respir. Viruses* **2021**, *15*, 707–710. [CrossRef]
18. Bezerra, M.F.; Machado, L.C.; De Carvalho, V.D.C.V.; Docena, C.; Brandão-Filho, S.P.; Ayres, C.F.J.; Paiva, M.H.S.; Wallau, G.L. A Sanger-based approach for scaling up screening of SARS-CoV-2 variants of interest and concern. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *92*, 104910. [CrossRef]
19. Lim, H.J.; Park, M.Y.; Jung, H.S.; Kwon, Y.; Kim, I.; Kim, D.K.; Yu, N.; Sung, N.; Lee, S.-H.; Park, J.E.; et al. Development of an efficient Sanger sequencing-based assay for detecting SARS-CoV-2 spike mutations. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0260850. [CrossRef]
20. Tzou, P.L.; Ariyaratne, P.; Varghese, V.; Lee, C.; Rakhmanaliev, E.; Villy, C.; Yee, M.; Tan, K.; Michel, G.; Pinsky, B.A.; et al. Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00105-18. [CrossRef]
21. Lauring, A.S.; Hodcroft, E.B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? *JAMA* **2021**, *325*, 529–531. [CrossRef]
22. Cuevas, J.; Geller, R.; Garjjo, R.; López-Aldeguer, J.; Sanjuán, R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002251. [CrossRef]

23. LACEN-Ba. *Boletim de Sequenciamento SARS-CoV-2*; LACEN-Ba: Salvador, Brazil, 2022.
24. Wang, L.; Cheng, G. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa. *J. Med Virol.* **2021**, *94*, 1728–1733. [[CrossRef](#)]
25. Dejnirattisai, W.; Huo, J.; Zhou, D.; Zahradnik, J.; Supasa, P.; Liu, C.; Duyvesteyn, H.M.; Ginn, H.M.; Mentzer, A.J.; Tuekprakhon, A.; et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell* **2022**, *185*, 467–484.e15. [[CrossRef](#)]
26. Garcia-Beltran, W.F.; St Denis, K.J.; Hoelzemer, A.; Lam, E.C.; Nitido, A.D.; Sheehan, M.L.; Berrios, C.; Ofoman, O.; Chang, C.C.; Hauser, B.M.; et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell* **2022**, *185*, 457–466.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tian, D.; Sun, Y.; Xu, H.; Ye, Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J. Med Virol.* **2022**, *94*, 2376–2383. [[CrossRef](#)]
28. Tegally, H.; Moir, M.; Everatt, J.; Giovanetti, M.; Scheepers, C.; Wilkinson, E.; Subramoney, K.; Makatini, Z.; Moyo, S.; Amoako, D.G.; et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 1785–1790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Majumdar, S.; Sarkar, R. Mutational and phylogenetic analyses of the two lineages of the Omicron variant. *J. Med. Virol.* **2021**, *94*, 1777–1779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Callaway, E. What Omicron’s BA.4 and BA.5 variants mean for the pandemic. *Nature* **2022**, *606*, 848–849. [[CrossRef](#)]
31. World Health Organization. Statement on Omicron sublineage BA.2 [Internet]. 2022. Available online: <https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage-ba.2> (accessed on 29 May 2022).
32. Singh, J.; Rahman, S.A.; Ehtesham, N.Z.; Hira, S.; Hasnain, S.E. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1131–1133. [[CrossRef](#)]
33. Ko, K.; Takahashi, K.; Nagashima, S.; Bunthen, E.; Ouoba, S.; Hussain, R.A.; Akita, T.; Sugiyama, A.; Sakaguchi, T.; Tahara, H.; et al. Mass Screening of SARS-CoV-2 Variants using Sanger Sequencing Strategy in Hiroshima, Japan. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2419. [[CrossRef](#)]
34. Naveca, F.G.; Nascimento, V.; de Souza, V.C.; Corado, A.D.L.; Nascimento, F.; Silva, G.; Costa, Á.; Duarte, D.; Pessoa, K.; Mejía, M.; et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1230–1238. [[CrossRef](#)]
35. Ferrareze, P.A.G.; Franceschi, V.B.; Mayer, A.D.M.; Caldana, G.D.; Zimmerman, R.A.; Thompson, C.E. E484K as an innovative phylogenetic event for viral evolution: Genomic analysis of the E484K spike mutation in SARS-CoV-2 lineages from Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *93*, 104941. [[CrossRef](#)]
36. Walls, A.C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6; *Erratum in Cell* **2020**, *183*, 1735. [[CrossRef](#)]
37. Fantini, J.; Yahji, N.; Colson, P.; Chahinian, H.; La Scola, B.; Raoult, D. The puzzling mutational landscape of the SARS-2-variant Omicron. *J. Med Virol.* **2022**, *94*, 2019–2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Starr, T.N.; Greaney, A.J.; Dingens, A.S.; Bloom, J.D. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *bioRxiv* **2021**, *22*, 431683, Update in *Cell Rep. Med.* **2021**, *2*, 100255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Liu, Y.; Liu, J.; Plante, K.S.; Plante, J.A.; Xie, X.; Zhang, X.; Ku, Z.; An, Z.; Scharon, D.; Schindewolf, C.; et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature* **2021**, *602*, 294–299. [[CrossRef](#)]
40. Kumar, S.; Thambiraja, T.S.; Karuppanan, K.; Subramaniam, G. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. *J. Med Virol.* **2021**, *94*, 1641–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Naveca, F.; da Costa, C.; Nascimento, V.; Souza, V.; Corado, A.; Nascimento, F.; Costa, Á.; Duarte, D.; Silva, G.; Mejía, M.; et al. SARS-CoV-2 reinfection by the new Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil. *Virological* **2021**. Available online: <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596> (accessed on 15 February 2022).
42. Hoffmann, M.; Arora, P.; Groß, R.; Seidel, A.; Hörnich, B.F.; Hahn, A.S.; Krüger, N.; Graichen, L.; Hofmann-Winkler, H.; Kempf, A.; et al. SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell* **2021**, *184*, 2384–2393.e12. [[CrossRef](#)]

6. DISCUSSÃO

Durante 2 anos de pandemia o SARS-CoV-2 evoluiu disseminando-se pelo mundo todo, multiplicando-se e adquirindo mutações por todo o seu genoma. Mutações no gene S do vírus trouxe preocupações diante das formas de enfrentamento ao vírus, visto que a presença de muitas mutações nessa região aumentou a transmissão viral e a capacidade de evasão à ação de anticorpos neutralizantes, tornando o vírus capaz de superar a proteção gerada pelas vacinas e infecções prévias, trazendo à tona casos de infecção em pacientes já vacinados e reinfecções em indivíduos previamente infectados pelo SARS-CoV-2 ⁽³³⁾.

As plataformas de sequenciamento são essenciais para o acompanhamento da evolução viral e devido ao limitado acesso à essas tecnologias, a metodologia de sequenciamento de Sanger vem à tona como uma plataforma alternativa de detecção de variantes relevantes do SARS-CoV-2 de forma mais acessível ⁽⁴⁾. Neste trabalho utilizamos a tecnologia de sequenciamento Sanger para detectar as variantes mais importantes no cenário global. Conseguimos identificar 4 variantes do SARS-CoV-2, durante dois anos de pandemia, utilizando um protocolo simplificado que nos permitiu acompanhar as alterações das variantes circulantes.

O protocolo foi construído com o objetivo de identificar mutações-chave no gene S de SARS-CoV-2, RBD, região de clivagem S1/S2 e o início da subunidade S2. Nessa região existem mutações características de 11 variantes principais do coronavírus mais 7 subvariantes do ômicron (B.1 .1.529), como Alfa (B.1.1.7), Gama (P.1) Delta (B.1.617. 2), BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, BQ.1, BA.2.75 e a forma recombinante XBB.1 (B.1 .1.529), Beta (B.1.351), Zeta (P.2), Teta (P.3), Lambda (C .37), Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Mu (B.1.621) e Epsilon (B.1.427) ^(26,61,69).

Atualmente a omicron continua classificada como VOC visto que, desde sua descoberta em novembro de 2021, diversas variantes pertencentes a essa linhagem vão surgindo e obtendo vantagens sobre as variantes da omicron previamente circulantes ⁽⁶⁹⁾. As principais variantes da omicron são BA.1, BA.2, BA.4, BA.5 e, as mais novas, BQ.1 e XBB.1 as quais estiveram associadas a ondas de casos epidemiológicos em diferentes períodos de 2022, causando casos e reinfecções e comprometendo o nível de proteção gerado pelas vacinas. A identificação das

subvariantes da omicron e a diferenciação entre elas torna-se possível com a utilização desse protocolo, por ele conseguir cobrir a região de RBM, tão importante para o SARS-CoV-2 e principalmente para os vírus pertencentes à linhagem da omicron, já que uma grande parte das mutações acontecem em RBD e RBM ^(26,69).

Segundo o último levantamento epidemiológico molecular feito pela Secretaria de Saúde da Bahia (SESAB), no dia 28/11/2022, em 64 amostras analisadas, as novas variantes da omicron foram encontradas, sendo a BQ.1 e suas subvariantes possuindo a maior prevalência (75%) dentre outras como BA.5, BA.2, XBB.1 e BE.9 ⁽⁷⁰⁾. Embora o protocolo seja capaz de identificar e diferenciar BQ.1, XBB.1, BA.2 e BA.4/BA.5, não foi possível identificar essas variantes, visto que o estudo avaliou amostras até o período de fevereiro de 2022, onde BA.1 era a única variante da omicron em circulação ⁽⁷⁰⁾. Segundo a SESAB, a BA.2 começou a entrar em circulação na Bahia em março de 2022, dois meses após o início da disseminação dessa variante no mundo ⁽⁵¹⁾. Além da BA.1, as variantes B.1 (linhagem selvagem), zeta, gama e delta foram identificadas em diferentes períodos de coleta, representando os momentos em que essas variantes surgiram e participaram das ondas de casos epidemiológicos.

Outros autores também utilizaram a metodologia de Sanger para identificar variantes importantes para a pandemia. Lim et al. foram capazes de identificar nove mutações essenciais para caracterização de variantes relevantes como alfa, beta, gama e delta a partir de cinco pares de primers com alvo no gene S de alta sensibilidade analítica ⁽⁷¹⁾. Outro estudo conduzido por M.Bloemen et al. foi capaz de identificar a variante omicron BA.1 a partir de um protocolo elaborado capaz de detectar as 15 das 34 mutações da omicron presentes no gene S ⁽⁷²⁾. Nosso protocolo foi capaz de identificar essas variantes já relatadas por esses outros trabalhos, porém a metodologia criada para esse trabalho foi capaz de identificar as variantes mais importantes em todos os períodos coletados da pandemia sem que houvesse a necessidade de alteração metodológica. A explicação para isso está no fragmento sequenciado de 1.120 pb, a qual abrange outras mutações definidoras de linhagem importantes para a diferenciação entre as variantes.

As plataformas de NGS são úteis para rastrear a variabilidade genética viral em um indivíduo infectado, bem como rastrear mutações não detectadas pela plataforma Sanger ⁽⁷³⁾. À medida que a pandemia avançava e novas variantes surgiam, os dados de sequenciamento do genoma não conseguiam acompanhar o aumento do número de casos em todo o mundo, já que mais de 630 milhões de casos foram relatados até novembro de 2022 e apenas 14 milhões de sequências foram depositadas no banco de dados GISAID desde o início da pandemia ⁽⁷⁴⁾. Isso apenas confirma a fragilidade da vigilância molecular viral atual, já que o uso dessas plataformas está concentrado em locais com instalações mais sofisticadas e maiores recursos de pesquisa. Além disso, para um vírus como o SARS-CoV-2, que não apresenta altas taxas de mutação observadas em outros vírus como o HIV, a tecnologia Sanger torna-se uma alternativa mais acessível para a triagem de variantes importantes associadas a novos surtos mundial ^(75,76). Sendo assim, os resultados desse trabalho confirmam a capacidade que esse protocolo tem em substituir o uso das plataformas de NGS para a detecção das variantes mais relevantes do SARS-CoV-2, a partir de uma abordagem simplificada e sem a necessidade de adaptações, podendo progredir com a vigilância molecular viral.

7. CONCLUSÃO

O protocolo elaborado por esse trabalho foi capaz de identificar e acompanhar a variabilidade do gene S do SARS-CoV-2 e, por consequência, identificar as variantes mais relevantes para a pandemia, sendo uma antiga VOI, duas antigas VOCs e uma atual VOC em um período de 2 anos de amostragem. Uma característica muito importante é a não necessidade em modificar o protocolo para conseguir identificar e diferenciar variantes, sendo assim um protocolo estável e capaz de continuar detectando novas variantes relevantes que estão emergindo ao longo da pandemia. A elaboração desse protocolo poderá contribuir com a vigilância molecular viral a partir do monitoramento da prevalência das variantes em diferentes regiões, funcionando como uma metodologia alternativa para os laboratórios que não conseguirem implementar plataformas de sequenciamento de nova geração.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report –51 [Internet]. World Health Organization. 2020 [citado 2022 dez 3]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10
2. Focosi D, Maggi F. Recombination in Coronaviruses, with a Focus on SARS-CoV-2. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
3. da Silva SJR, do Nascimento JCF, Germano Mendes RP, Guarines KM, Targino Alves Da Silva C, da Silva PG, et al. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. Vol. 8, *ACS Infectious Diseases*. American Chemical Society; 2022. p. 1758–814.
4. WHO, ECDC. Methods for the detection and characterisation of SARS-CoV-2 variants: second update. 2022.
5. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-generation sequencing (Ngs) in covid-19: A tool for sars-cov-2 diagnosis, monitoring new strains and phylodynamic modeling in molecular epidemiology. Vol. 43, *Current Issues in Molecular Biology*. MDPI AG; 2021. p. 845–67.
6. Lee SH. A Routine Sanger Sequencing Target Specific Mutation Assay For SARS-CoV-2 Variants Of Concern And Interest. 2021; Available from: www.preprints.org
7. Zhou P, Yang X lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 mar 12;579(7798):270–3.
8. Zhang YZ, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. Vol. 181, *Cell*. Cell Press; 2020. p. 223–7.
9. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Vol. 17, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 181–92.
10. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Vol. 26, *Nature Medicine*. Nature Research; 2020. p. 450–2.
11. Murakami S, Kitamura T, Suzuki J, Sato R, Aoi T, Fujii M, et al. Detection and Characterization of Bat Sarbecovirus Phylogenetically Related to SARS-CoV-2, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2020 dez;26(12):3025–9.
12. Delaune D, Hul V, Karlsson EA, Hassanin A, Ou TP, Baidaliuk A, et al. A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nat Commun*. 2021 dez 1;12(1).
13. Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature*. 2022 abr 14;604(7905):330–6.

14. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome SARS in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*. 2003;362:1353–8.
15. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*. 2012 nov 8;367(19):1814–20.
16. Kan B, Wang M, Jing H, Xu H, Jiang X, Yan M, et al. Molecular Evolution Analysis and Geographic Investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in Palm Civets at an Animal Market and on Farms. *J Virol*. 2005 set 15;79(18):11892–900.
17. Haagmans BL, al Dhahiry SHS, Reusken CBEM, Raj VS, Galiano M, Myers R, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: An outbreak investigation. *Lancet Infect Dis*. 2014 fev;14(2):140–5.
18. Worobey M, Levy JI, Serrano LM, Crits-Christoph A, Pekar JE, Goldstein SA, et al. The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic [Internet]. 2022. Available from: <https://www.science.org>
19. Worobey M. Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. Vol. 374, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2021. p. 1201–2.
20. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020 jul 9;583(7815):282–5.
21. Shi W, Shi M, Que TC, Cui XM, Ye RZ, Xia LY, et al. Trafficked Malayan pangolins contain viral pathogens of humans. *Nat Microbiol*. 2022 ago 1;7(8):1259–69.
22. Rastogi M, Pandey N, Shukla A, Singh SK. SARS coronavirus 2: from genome to infectome. Vol. 21, *Respiratory Research*. BioMed Central Ltd; 2020.
23. Gribble J, Stevens LJ, Agostini ML, Anderson-Daniels J, Chappell JD, Lu X, et al. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. *PLoS Pathog*. 2021 jan 19;17(1).
24. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 abr 16;181(2):281-292.e6.
25. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020 maio 14;581(7807):221–4.
26. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. Vol. 22, *Nature Reviews Genetics*. Nature Research; 2021. p. 757–73.

27. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2022. Available from: <https://covid19.who.int>
28. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di R, Affiliations N. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Internet]. StatPearls. 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/?report=printable>
29. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Patidar R, Younis K, Desai P, et al. Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. *SN Compr Clin Med* [Internet]. 2020;2:1069–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00363-4>
30. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El S, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020;69(24):759–65. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reporting-pui.html>.
31. Schramm Neto FAR, Faria CD de, Leão L de A, Barretto LM, Cavalcante TC, Silva MP da, et al. Análise do perfil epidemiológico dos casos de COVID-19 em Salvador-BA, entre 2020-2022. *Research, Society and Development*. 2022 jul 18;11(9):e54111932391.
32. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020 fev 15;395(10223):497–506.
33. WHO. Guidance for surveillance of SARS-CoV-2 variants: interim guidance [Internet]. World Health Organization. 2021 [citado 2022 dez 3]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/WHO_2019-nCoV_surveillance_variants
34. Rambaut A, Holmes EC, O’Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. 2020 nov 1;5(11):1403–7.
35. PHE. Investigation of novel SARS-COV-2 variant Variant of Concern 202012/01 [Internet]. 2021 [citado 2022 dez 5]. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201>
36. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*. 2021 maio 13;593(7858):266–9.
37. Ramesh S, Govindarajulu M, Parise RS, Neel L, Shankar T, Patel S, et al. Emerging sars-cov-2 variants: A review of its mutations, its implications and vaccine efficacy. Vol. 9, *Vaccines*. MDPI; 2021.
38. Abu-Raddad LJ, Chemaitelly H, Butt AA. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *New England Journal of Medicine*. 2021 jul 8;385(2):187–9.

39. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *The Lancet*. 2021 maio 15;397(10287):1819–29.
40. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. World Health Organization. 2022 [citado 2022 dez 5]. Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
41. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. 2021 abr 15;592(7854):438–43.
42. Hoffmann M, Arora P, Groß R, Seidel A, Hörnich BF, Hahn AS, et al. SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*. 2021 abr 29;184(9):2384-2393.e12.
43. Naveca FG, Nascimento V, de Souza VC, Corado A de L, Nascimento F, Silva G, et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat Med*. 2021 jul 1;27(7):1230–8.
44. Fujino T, Nomoto H, Kutsuna S, Ujiie M, Suzuki T, Sato R, et al. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. *Emerg Infect Dis*. 221DC mar;27(4):1243–5.
45. de Siqueira IC, Camelier AA, Maciel EAP, Nonaka CKV, Neves MCLC, Macêdo YSF, 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*. 2021 jul 1;108:252–5.
46. Singh J, Rahman SA, Ehtesham NZ, Hira S, Hasnain SE. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. Vol. 27, *Nature Medicine*. *Nature Research*; 2021. p. 1131–3.
47. Tian D, Sun Y, Zhou J, Ye Q. The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. *Frontiers Media S.A.*; 2021.
48. UK Health Security Agency. Variants: distribution of casedata, 30 July 2021 [Internet]. GOV.UK. 2021 [citado 2022 dez 5]. Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-case-data-30-july-2021>
49. LACEN/Ba. Boletim Informativo LACEN/BA - Edição 13 [Internet]. Secretaria da Saúde. 2021 [citado 2022 dez 5]. Available from: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2022/03/15.03-BOLETIM-INFORMATIVO-SEQUENCIAMENTO-LACEN-EDICAO-13-1.pdf>
50. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *New England Journal of Medicine*. 2021 ago 12;385(7):585–94.

51. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. Vol. 94, *Journal of Medical Virology*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 2376–83.
52. WHO. Enhancing response to Omicron SARS-CoV-2 variant: Technical brief and priority actions for Member States. World Health Organization. 2022.
53. Saxena SK, Kumar S, Ansari S, Paweska JT, Maurya VK, Tripathi AK, et al. Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective. *J Med Virol*. 2022 abr 1;94(4):1738–44.
54. Tiecco G, Storti S, Antoni MD, Focà E, Castelli F, Quiros-Roldan E. Omicron Genetic and Clinical Peculiarities That May Overturn SARS-CoV-2 Pandemic: A Literature Review. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
55. Hoffmann M, Krüger N, Schulz S, Cossmann A, Rocha C, Kempf A, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell*. 2022 fev 3;185(3):447-456.e11.
56. WHO. Statement on Omicron sublineage BA.2 [Internet]. World Health Organization. 2022 [citado 2022 dez 5]. Available from: <https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage-ba.2>
57. Majumdar S, Sarkar R. Mutational and phylogenetic analyses of the two lineages of the Omicron variant. *J Med Virol*. 2022 maio 1;94(5):1777–9.
58. Mohapatra RK, Kandi V, Sarangi AK, Verma S, Tuli HS, Chakraborty S, et al. The recently emerged BA.4 and BA.5 lineages of Omicron and their global health concerns amid the ongoing wave of COVID-19 pandemic – Correspondence. Vol. 103, *International Journal of Surgery*. Elsevier Ltd; 2022.
59. Tegally H, Moir M, Everatt J, Giovanetti M, Scheepers C, Wilkinson E, et al. Continued Emergence and Evolution of Omicron in South Africa: New BA.4 and BA.5 lineages. *medRxiv preprint [Internet]*. 2022; Available from: <https://doi.org/10.1101/2022.05.01.22274406>
60. Jhun H, Park HY, Hisham Y, Song CS, Kim S. SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant: A unique T478K mutation in receptor binding motif (RBM) of spike gene. Vol. 21, *Immune Network*. Korean Association of Immunologists; 2021.
61. WHO. TAG-VE statement on Omicron sublineages BQ.1 and XBB [Internet]. World Health Organization. 2022 [citado 2022 dez 5]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-10-2022-tag-ve-statement-on-omicron-sublineages-bq.1-and-xbb>
62. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 fev 22;395(10224):565–74.

63. Moore SC, Penrice-Randal R, Alruwaili M, Dong X, Pullan ST, Carter DP, et al. Amplicon based MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomic characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19. medRxiv preprint [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.20032011>
64. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol.* 2020 jul 1;6(2).
65. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2020 nov 1;32(6):767–75.
66. Chaki SP, Kahl-McDonagh MM, Neuman BW, Zuelke KA. Receptor-Binding-Motif-Targeted Sanger Sequencing: a Quick and Cost-Effective Strategy for Molecular Surveillance of SARS-CoV-2 Variants. *Microbiol Spectr.* 2022 jun 29;10(3).
67. Ko K, Takahashi K, Nagashima S, Bunthen E, Ouoba S, Takafuta T, et al. Exercising the Sanger Sequencing Strategy for Variants Screening and Full-Length Genome of SARS-CoV-2 Virus during Alpha, Delta, and Omicron Outbreaks in Hiroshima. *Viruses.* 2022 abr 1;14(4).
68. Shaibu JO, Onwuamah CK, James AB, Okwuraiwe AP, Amoo OS, Salu OB, et al. Full length genomic sanger sequencing and phylogenetic analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Nigeria. *PLoS One.* 2021 jan 1;16(1).
69. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022 set 1;32(5).
70. LACEN/BA. Boletim Informativo Sequenciamento SARS-CoV-2 -LACEN/BA: Edição 06/2022. Secretaria da Saúde. 2022;
71. Lim HJ, Park MY, Jung HS, Kwon Y, Kim I, Kim DK, et al. Development of an efficient Sanger sequencing-based assay for detecting SARSCoV-2 spike mutations. *PLoS One.* 2021 dez 1;16(12 December).
72. Bloemen M, Rector A, Swinnen J, Ranst M van, Maes P, Vanmechelen B, et al. Fast detection of SARS-CoV-2 variants including Omicron using one-step RT-PCR and Sanger sequencing. *J Virol Methods.* 2022 jun 1;304.
73. Tzou PL, Ariyaratne P, Varghese V, Lee C, Rakhmanaliev E, Villy C, et al. Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018;56(6):e00105-18. Available from: <https://www.hiv.lanl.gov/content/>
74. Oude Munnink BB, Worp N, Nieuwenhuijse DF, Sikkema RS, Haagmans B, Fouchier RAM, et al. The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: real-time

- molecular epidemiology. Vol. 27, Nature Medicine. Nature Research; 2021. p. 1518–24.
75. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? JAMA [Internet]. 2021 fev 9;325(6):529–31. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124>
 76. Cuevas JM, Geller R, Garijo R, López-Aldeguer J, Sanjuán R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. PLoS Biol. 2015 set 16;13(9).

APÊNDICE

APÊNDICE A – Produção Científica Relacionada: Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection, Braz J Infect Dis. 2020.

BRAZ J INFECT DIS 2020;24(5):422-427



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection



Sara Nunes Vaz ^a, Daniele Souza de Santana ^a, Eduardo Martins Netto ^a,
Celia Pedroso ^a, Wei-Kung Wang ^b, Felice Deminco Alves Santos ^a,
Carlos Brites ^{a,*}

^a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Salvador, BA, Brazil

^b University of Hawaii at Mānoa (UH Mānoa), Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, Hawaii, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2020

Accepted 8 August 2020

Available online 31 August 2020

Keywords:

SARS-CoV-2

COVID-19

saliva

Diagnostics

ABSTRACT

Background: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the cause of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Although Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) of respiratory specimens is the gold standard test for detection of SARS-CoV-2 infection, collecting nasopharyngeal swabs causes discomfort to patients and may represent considerable risk for healthcare workers. The use of saliva as a diagnostic sample has several advantages.

Objectives: The aim of this study was to validate the use of saliva as a biological sample for diagnosis of COVID-19.

Methods: This study was conducted at Infectious Diseases Research Laboratory (LAPI), in Salvador, Brazil. Participants presenting with signs/symptoms suggesting SARS-CoV-2 infection underwent a nasopharyngeal swab (NPS) and/or oropharyngeal swab (OPS), and saliva collection. Saliva samples were diluted in PBS, followed by RNA isolation and RT-Real Time PCR for SARS-CoV-2. Results of conventional vs saliva samples testing were compared. Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0.

Results: One hundred fifty-five participants were recruited and samples pairs of NPS/OPS and saliva were collected. The sensitivity and specificity of RT-PCR using saliva samples were 94.4% (95% CI 86.4–97.8) and 97.62% (95% CI 91.7–99.3), respectively. There was an overall high agreement (96.1%) between the two tests.

Conclusions: Use of self-collected saliva samples is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results may allow a broader use of molecular tests for management of COVID19 pandemic, especially in resources-limited settings.

© 2020 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail addresses: saranunes02@hotmail.com (S.N. Vaz), dnssan@hotmail.com (D.S. Santana), nettoeduardom@hotmail.com (E.M. Netto), cpedrosoj@gmail.com (C. Pedroso), wangwk@hawaii.edu (W. Wang), fdeminco@gmail.com (F.D. Santos), crbrites@gmail.com (C. Brites).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>

1413-8670/© 2020 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

In December 2019, China reported the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as the cause of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).¹ Although Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV)² and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)³ infections have higher mortality rates than COVID-19, SARS-CoV-2 spreads much more rapidly than MERS-CoV and SARS-CoV. On March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) announced that epidemic of the novel coronavirus was a pandemic, and as of July 8, 2020, the number of confirmed cases globally was 11,874,226, associated to over 545,481 deaths in 216 countries or territories.⁴ At that time, Brazil confirmed over 1.7 million cases, 67,964 deaths, and a mortality rate of 32.3/100,000.⁵

Direct human-to-human transmission of SARS-CoV-2 occurs through droplet inhalation while coughing, sneezing, or even talking, and transmissions caused by contact with nasal, ocular and oral mucous membranes are also possible. Several clinical symptoms are associated to COVID-19, such as fever, cough, shortness of breath, sore throat, chest pain, headache, anosmia and ageusia.⁶ Although 80% of cases has light or mild symptoms, the remaining 20% can present with severe disease, and around 5% will require intensive care treatment, especially those with chronic health conditions including cardiopathy, arterial hypertension, diabetes and obesity.⁷

Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) of respiratory specimens (oropharyngeal and nasopharyngeal swabs, bronchoalveolar lavage, tracheal aspirate) is the gold standard test for detection of SARS-CoV-2 infection.⁸⁻¹⁰ However, collecting nasopharyngeal swabs causes discomfort to patients due to invasiveness of the procedure, which can reduce the possibility of patient consent to retest, and may represent considerable risk for healthcare workers, because of its potential to induce patients to sneeze or cough, expelling virus particles.¹¹

Previous studies have shown high detection rate using saliva as specimens for laboratory diagnosis of respiratory viruses.^{12,13} Recent studies reported the use of oral fluids/saliva for the detection of SARS-CoV-2.¹⁴⁻¹⁸ The use of saliva as a diagnostic sample has several advantages, such as easy self-collection even at home, and no need of specialized personnel for sample collection. In addition, saliva collection is much more comfortable for the patient than nasopharyngeal/ oropharyngeal swabs procedure.¹⁷ It also saves time, and is less costly, because it does not require the use of personal protective equipment nor viral transportation solution.

Timely, accurate and non-invasive samples for SARS-CoV-2 detection will facilitate effective large-scale pandemic control measures to prevent the spread of COVID-19. The aim of this study was to validate the use of saliva as a biological sample for the diagnosis of COVID-19.

Material and methods

Study population

This study was conducted at Infectious Diseases Research Laboratory (LAPI), of Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (C-HUPES), Federal University of Bahia, in Salvador, Brazil.

C-HUPES healthcare workers presenting with signs/symptoms suggesting SARS-CoV-2 infection, as well as patients at the COVID-19 ward of C-HUPES, underwent a nasopharyngeal swab (NPS) and/or oropharyngeal swab (OPS) collection. All participants recruited to this study, after signing informed consent, were asked to provide a sample of self-collected saliva.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Maternidade Clímério de Oliveira – UFBA (4.042.620).

Sample collection

Saliva samples were collected into 30ml sterile urine cups. Participants were instructed to repeatedly spit until approximately 2 ml of sample was obtained, thus avoiding mucous secretions from oropharynx or lower respiratory tract (i.e., sputum). Samples were transported to LAPI in a thermal box at 2–8°C, and stored at -80°C until nucleic acid extraction. Whenever possible, RNA was isolated from fresh saliva within six hours after collection.

Sample processing and viral nucleic acid isolation

Samples were homogenized by repeated pipetting and diluted 1:1 with PBS 1x (phosphate buffered saline) before RNA isolation. RNA isolation was performed by using QIAGEN QIAamp® RNA Mini Kit, according to manufacturer's instructions. Viral nucleic acid was extracted from 140 µl diluted saliva, and eluted to 60 µl of elution buffer.

Testing of samples pools with one positive and four negative samples and one positive and nine negative samples was also performed. It included positive samples (RT-Real Time PCR) with low viral load and high viral load.

RT-Real time PCR

Nasopharyngeal and oropharyngeal specimens were sent to Bahia Central Laboratory (LACEN), a State Reference Laboratory, for SARS-CoV-2 investigation by RT-PCR method, in accordance to BIOMOL OneStep/ COVID-19 Kit (Paraná Molecular Biology Institute) protocol.

For saliva samples RNA template was subjected to amplification according to Charité-Berlin protocol.¹⁰ This protocol consisted of three stages: first (screening) to amplify the E gene, a confirmatory and eliminatory step. The last two stages, targeted RdRp gene, were run in case nucleic acid

Table 1 – Characteristics of participants enrolled in this study.

	Overall (n = 149) ^a	COVID-19 (n = 67)	Non-COVID 19 (n = 82)	p-value
Age (years), median (IQR)	40 (33–48.5)	40 (35–50)	39.5 (33–48.3)	0.588
Male, n (%)	46 (30.9)	23 (34.32)	23 (28.04)	0.470
Onset of symptoms before the test (days), median (IQR)	4 (3–6)	4 (3–6)	4.5 (3–6)	0.548
Symptoms at sample collection				
Headache, n (%)	82 (61.2)	33 (53.2)	49 (68.1)	0.109
Cough, n (%)	60 (45.1)	30 (49.2)	30 (41.7)	0.484
Myalgia, n (%)	54 (40.3)	25 (40.3)	29 (40.3)	1
Sore throat, n (%)	50 (37.3)	14 (22.6)	36 (50)	0.001
Fever, n (%)	37 (27.6)	25 (40.3)	12 (16.7)	0.003
Anosmia, n (%)	29 (21.6)	20 (32.3)	9 (12.5)	0.007
Ageusia, n (%)	28 (20.9)	18 (29.0)	10 (13.9)	0.035
Chills, n (%)	27 (17.9)	10 (16.1)	14 (19.4)	0.658
Chest pain, n (%)	18 (13.4)	9 (14.5)	9 (12.5)	0.802
Dyspnea, n (%)	16 (11.9)	9 (14.5)	7 (9.7)	0.433

^a Concordant results for SARS-CoV-2 by RT-PCR between swab and saliva samples.

was detected on screening. Amplification reactions were carried out on Applied Biosystems 7500 Real Time PCR detector, and results were classified as positive for SARS-CoV-2 when both E and RdRp genes were detected and cycle threshold (Ct, number of cycles required for the fluorescent signal to exceed background level) values were less than or equal to 40.

Immunological assay

In order to confirm the absence of SARS-CoV-2 infection in some discordant results, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Euroimmun, Lübeck, Germany) was performed. Detection of IgG antibodies was attempted in plasma samples collected after three weeks of symptoms onset, according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Descriptive statistics were presented as a percentage (%) for categorical variables and median (interquartile range; IQR) for continuous variables. Fisher's and Mann-Whitney tests were used for categorical and continuous variables, respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and a 95% confidence intervals (CI) were calculated to assess diagnostic performance. The kappa coefficient was used to estimate the agreement beyond chance between saliva and NPS/OPS RT-PCR results. All statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0.

Results

Between May 5th and June 5th 2020, 155 participants were recruited and samples pairs of NPS/OPS and saliva were collected. Of these, 149 (96.1%) had concordant results on the detection of SARS-CoV-2 RT-PCR in both specimens. Forty-six individuals (30.9%) were male, median (IQR) age was 40 (33–48.5) years, and median (IQR) time from onset of symptoms was 4 (3–6) days. Participants characteristics are shown in Table 1.

The prevalence of COVID-19 diagnosed by NPS/OPS RT-PCR and by saliva RT-PCR in this study were 45.8% and 43.22%, respectively. Most of the tested healthcare workers (51.6%) were nurses/nursing technicians.

All the 67 participants diagnosed with COVID-19 had mild to moderate symptoms. No one needed hospitalization or intubation. No death was reported. The most common symptoms at sampling time were headache (53.2%), cough (49.2%) and myalgia (40.3%). Frequency of fever and anosmia was significantly higher ($p = 0.003$; 0.007), among patients tested positive for COVID-19, while, frequency of sore throat was significantly lower ($p = 0.001$) (Table 1).

Using RT-PCR of NPS/OPS samples as the gold standard, the sensitivity and specificity of RT-PCR using saliva samples were 94.4% (95% CI 86.4–97.8) and 97.62% (95% CI 91.7 – 99.3), respectively (Table 2). Positive predictive value and negative predictive value were 97.1% (95% CI 90.0–99.2) and 95.35% (95% CI 88.6–98.2), respectively. There was an overall high agreement (96.1%) between the two tests (kappa coefficient 0.922, 95% CI 0.765–1.00, $p < 0.001$). The median (IQR) Ct values of

Table 2 – Detection of SARS-CoV-2 RT-PCR using NPS/OPS and saliva samples.

			SWAB		Total
			Detectable	Non detectable	
Saliva	Detectable	n. (%)	67 (94.4)	2 (2.4)	69 (44.5)
	Non detectable	n. (%)	4 (5.6)	82 (97.6)	86 (55.5)
	Total	n. (%)	71 (100)	84 (100)	155 (100)

Table 3 – Characteristics of the participants who had discordant result on detection of SARS-CoV-2 RT-PCR by NPS/OPS and saliva.

Participant N	Sex	Age	NPS/OPS	Saliva	Onset of symptoms (days)	Symptoms	Ct	IgG
1	F	82	ND	D	3	Fever, dyspnea, dry cough and myalgia	35.72	NA
2	M	41	ND	D	3	Chills, myalgia, headache, rhinorrhea, dry cough, anosmia and ageusia	32.24	NA
3	F	41	D	ND	6	Nasal congestion and dry cough	-	R
4	F	27	D	ND	4	Headache, sneezing, runny nose and sore throat	-	R
5	F	39	D	ND	7	Headache, rhinorrhea, dry cough and sore throat	-	NR
6	F	49	D	ND	3	Headache, dry cough and sore throat	-	R

Abbreviations: F, female; M, male; D, detected; ND, not detected; NPS, nasopharyngeal swab; OPS, oropharyngeal swab; Ct, cycle threshold; R, reactive; NR, not reactive; NA, not available.

the E gene was 33 (29–36.6), and of the RdRp gene was 34 (29.5–37.4).

The detection rate of SARS-CoV-2 in saliva was slightly lower than that of NPS/OPS, but without reaching statistical significance. Six participants had discordant results between saliva and NPS/OPS RT-PCR assays, including two participants with virus detected in saliva but not in NPS/OPS, and four participants with virus detected in NPS/OPS but not in saliva (Table 3).

After 20 days of symptoms onset, participants with negative saliva results (n=4) were invited to collect new blood samples for anti-SARS-CoV-2 antibodies. IgG was reactive in all but one of them, confirming that at least one patient probably had not been previously infected by SARS-CoV-2. Participant n° 5 (negative antibody detection) had unspecific symptoms, common to any viral infection (Table 3). The two participants with saliva positive/NP-negative testing did not provide blood samples for antibody testing.

One positive and four negative (low dilution) and one positive and nine negative (high dilution) saliva samples were pooled. Low and high dilution were positive for low Ct samples (high viral load), but only positive in low dilution when a low viral load sample was included.

Discussion

Our findings demonstrate that testing saliva as an alternative to NP swabs is sensitive and specific enough to be used in a routine practice. Concordance between RT-PCR results for SARS-CoV-2 detection in saliva and NP swabs was 96.1%. In addition, among samples with discrepant results we had one that was negative for SARS-CoV-2 antibodies three weeks after diagnosis, suggesting that patient had a diagnosis other than COVID-19. In this case, the sensitivity of saliva testing would increase from 94.4 to 95.7%, while the specificity of NP swabs testing would decrease in a similar way.

The use of NP swabs has been the standard of care for SARS-CoV-2 diagnosis in Brazil, but it requires the use of full personal protective equipment, increase the risk of infection for the health professional who collects the sample, and also,

the cost of testing. Saliva has been shown to be a reliable specimen for detecting SARS coronavirus since 2004. Wang et al. (2004) reported a high viral load of SARS-CoV in saliva samples when compared to throat wash.¹³ To et al. reported a high concordance between saliva and nasopharyngeal aspirates for the detection of respiratory viruses and monitoring SARS-CoV-2 viral load during the course of infection.^{12,16} There are several advantages of using saliva samples for detection of SARS-Cov-2: first, saliva can be provided easily by the patient without any invasive procedures. Therefore, the use of saliva samples could reduce the risk of virus transmission to healthcare professionals.¹⁷ Second, the use of saliva will allow sample collection outside hospitals or health centers areas. Finally, it could be conveniently pooled to screen larger populations, as demonstrated in this work. In these settings, where a large number of individuals require screening, saliva represents a practical and non-invasive specimen type.¹⁹

In the present study saliva was self-collected by participants inside the hospital area. Despite the recommendation of some authors to use samples collected immediately upon waking up,^{11,16} without previous food consumption or teeth brushing, we collected saliva at any time from patients who had a test requested by a physician. This easy to perform, simple procedure, provided a similar sensitivity/specificity to samples collected by NP swabs.¹¹

In some previous studies, saliva was obtained using special collection devices,²⁰ improving quality and quantity of obtained saliva. However, these collection devices are not usually available in general medical care centers, especially in low-income countries. Furthermore, saliva collection using such devices requires the assistance of healthcare workers. In the present study, participants were instructed to repeatedly spit into a sterile urine cup used routinely in our hospital. As no special device is required, the use of saliva can be implemented as a routine in clinical practice without compromising the sample quality, as previously reported.^{19,21}

The high level of concordance between the two methods demonstrates that the use saliva for detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR is as reliable as the use of NP/OP swabs, but with lower costs and risks. Brazil has almost 1.5 million cases diag-

nosed so far, which means that a simpler testing procedure could potentially reduce the risks and costs involved in sample collection. Despite these numbers, the proportion of patients tested by PCR in Brazil is very low, and the estimates on the dynamics of the pandemic is largely based on flow lateral immunochromatographic tests, which have been considered inaccurate to define serological status for SARS-CoV-2.²²

Our results were comparable to similar studies that used saliva for SARS-CoV-2 detection and were obtained from a population of patients closely followed up in a university hospital.²³ The two participants presenting negative results in saliva samples but positive in NP swabs had very non-specific symptoms and could not fulfill a clinical diagnosis of COVID-19. The most predictive symptoms for COVID-19 in our population were not present in these two cases, increasing the possibility of a false-positive result by NP swab. The use of a three-step amplification protocol also increases the sensitivity of the test. A recent study showed that some variations in SARS-CoV-2 genome can negatively impact the sensitivity of RT-PCR test used for its detection, and reinforces the need of protocols able to maintain sensitivity and specificity,²⁴ like the one used in this study.

Our work presents some limitations including the absence of serological confirmation of COVID-19 in all cases, and the lack of ct values for the tests using NPS samples, as they were performed in a referral laboratory and were not available for comparison purposes. However, we were able to closely evaluate health care workers and inpatients admitted to our hospital and compare the use of two approaches for molecular detection of SARS-CoV-2, with a high degree of concordance.

In conclusion, we demonstrated that using self-collected saliva samples is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results can allow a broader use of molecular tests for management of COVID-19 pandemic, especially in resources-limited settings.

Conflict of interest

The author declares no conflicts of interest.

REFERENCES

- Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265-9, <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
- Cheng VCC, Lau SKP, Woo PCY, Kwok YY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:660-94, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00023-07>.
- Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:465-522, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00102-14>.
- World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
- Ministerio da saude. Painel Coronavirus. Available at: <https://covid.saude.gov.br/>.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395:497-506, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
- Ramanathan K, Antognini D, Combes A, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 2020:19-21.
- Center of Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. May 22. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
- Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92:538-9, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25721>.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25:1-8, <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *MedRxiv*. 2020, <http://dx.doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>, 2020.04.16.20067835.
- To KKW, Yip CCY, Lai CYW, et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:372-8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.009>.
- Wang W-K, Chen S-Y, Liu I-J, et al. Detection of SARS-associated Coronavirus in Throat Wash and Saliva in Early Diagnosis. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1213-9.
- Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020;81:e45-50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>.
- Chen L, Zhao J, Peng J, et al. Detection of 2019-nCoV in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *SSRN Electron J*. 2020, <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3557140>.
- To KKW, Tsang OTY, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:565-74, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1).
- Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020;50, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00776-20>.
- McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, et al. Saliva as an alternate specimen source for detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020, <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01109-20>.
- To KKW, Tsang OTY, Chik-Yan Yip C, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*. 2020;4-6, <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- Sueki A, Matsuda K, Yamaguchi A, et al. Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays. *Clin Chim Acta*. 2016;71-4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.006>.
- To KK, Lu L, Yip CC, et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6, <http://dx.doi.org/10.1038/em.2017.35>.
- Ong DSY, Man SJDe, Lindeboom FA, Koeleman JGM. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. *Clin Infect Dis*. 2020.

-
23. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2020, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>.
24. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;97:225-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.027>.

APÊNDICE B – Produção Científica Relacionada: The First Two Cases of Monkeypox Infection in MSM in Bahia, Brazil, and Viral Sequencing, *Viruses*. 2022.



Case Report

The First Two Cases of Monkeypox Infection in MSM in Bahia, Brazil, and Viral Sequencing

Carlos Brites ^{*}, Felice Deminco [†], Marcia Sampaio Sá, Jean Tadeu Brito, Estela Luz [†] and Andreas Stocker [†]

LAPI—Laboratório de Pesquisa em Infectologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador 40110060, Brazil

^{*} Correspondence: crbrites@ufba.br

Abstract: Monkeypox infection is rapidly spreading across the world. Despite the increasing number of cases, only a few reports have been published, and most are on people living without HIV. We report here the first two cases of monkeypox infection in Bahia, Brazil, one of them in a person living with HIV, on stable treatment. Both cases had a similar evolution, with a limited number of lesions and mild symptoms, with a complete recovery after 7–10 days. The potential route of transmission was via oral sex for the first case and was undefined for the second one. Both cases were confirmed through detection of the viral genome by PCR, and the partial sequence of the first case indicates the infection was caused by the West African clade. These cases confirm that monkeypox infection is currently being transmitted in Brazil and that people living with HIV on stable treatment are not likely to present a more severe form of monkeypox.

Keywords: monkeypox; HIV; MSM; Brazil



Citation: Brites, C.; Deminco, F.; Sá, M.S.; Brito, J.T.; Luz, E.; Stocker, A. The First Two Cases of Monkeypox Infection in MSM in Bahia, Brazil, and Viral Sequencing. *Viruses* **2022**, *14*, 1841. <https://doi.org/10.3390/v14091841>

Academic Editor: Benjamin M. Liu

Received: 2 August 2022
Accepted: 21 August 2022
Published: 23 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Monkeypox

Monkeypox is an uncommon viral disease, caused by an *Orthopoxvirus*, family Poxviridae. It is an enveloped, double-stranded DNA virus that belongs to the same genus that includes variola, vaccinia and cowpox viruses. Although the source of the disease remains unclear, the virus can infect African rodents and non-human primates (such as monkeys) as well as humans. Monkeypox was first described in 1958, after two outbreaks in colonies of monkeys used for scientific studies, in Copenhagen, Denmark [1].

The monkeypox virus has two distinct genetic clades, the Central African (Congo Basin) clade and the West African clade. The first one (Congo Basin) is linked to more severe disease and seems to be more transmissible [2]. The only country where the two clades coexist is Cameroon.

2. Human Infection

The first monkeypox case in humans was reported in 1970. Since then, many outbreaks were reported, mostly in African countries, with occasional reports in other regions [3–5]. The last reported outbreak of human infection outside Africa occurred in 2003 [6]. Transmission of the monkeypox virus from one person to another is associated with close contact with lesions, respiratory droplets, body fluids and contaminated materials such as bedding. The usual average incubation period of monkeypox varies from 6 to 13 days but can range from 5 to 21 days.

Monkeypox is usually a self-limited disease. Most cases present with mild symptoms, and there is a complete recovery in about two weeks. However, children, pregnant women, or people with immune suppression due to other health conditions can present with a more severe disease, especially those infected with the Congo Basin clade. The fatality rate increases from 3.6% (for the West African clade) to 10.6% in cases of infection by the Congo Basin clade [2].

2.1. Case Report 1

A 37-year-old MSM living with HIV since 2012 on stable cART (lamivudine + tenofovir + efavirenz in a fixed-dose combination pill) and undetectable HIV-1 RNA plasma viral load since the beginning of treatment came to a medical visit reporting that 3 days ago, he developed night fever (38.5 °C), chills and generalized muscle pain. His last CD4-positive cell count was 604 (41%), in December 2021. He also noted a urethral burning sensation during urination. The following morning, he noted small papules/vesicles, on an erythematous base, on the glans and scrotal sac. Five other small lesions were observed on his forehead, nose, thorax, and left leg. The lesions were mildly painful, without pruritus. He was initially attended by a urologist who requested tests for sexually transmitted infection (molecular detection tests for Chlamydia, *Mycoplasma*, genital herpes virus and HPV) and prescribed doxycycline (100 mg bid, for 10 days) plus ceftriaxone (1 g IM, single dose). He started treatment and scheduled a next day visit to an infectious disease specialist. He has been engaged in a stable relationship with the same partner for over 15 years. He had a business trip to Europe (Italy) in the last 30 days, returning to Brazil 22 days before the onset of symptoms. He denied any close contact with other people during the traveling period. However, he had received oral sex from an occasional partner 14 days before symptom onset and had no information on the current health conditions of that partner. He only knew that the occasional partner was a frequent traveler, with frequent trips to other Brazilian regions and other countries.

He did not use psychoactive substances and reported only moderate alcohol intake. He never smoked. During the medical evaluation he was in good clinical condition, had normal temperature and presented with the lesions described above (Figures 1 and 2); some of them were ulcerated but showed no signs of bacterial infection or crusts. The only additional finding at physical examination was lymphadenopathy, with enlargement and tenderness of inguinal lymph nodes, the largest measuring 1.2 × 0.5 cm. We suspected monkeypox infection and asked for a molecular detection test. The PCR was carried out at the Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), at Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, as described in the next section. The lesions began to heal in the following days, and after one week of symptoms onset, he showed only a residual process, as seen in Figure 2.

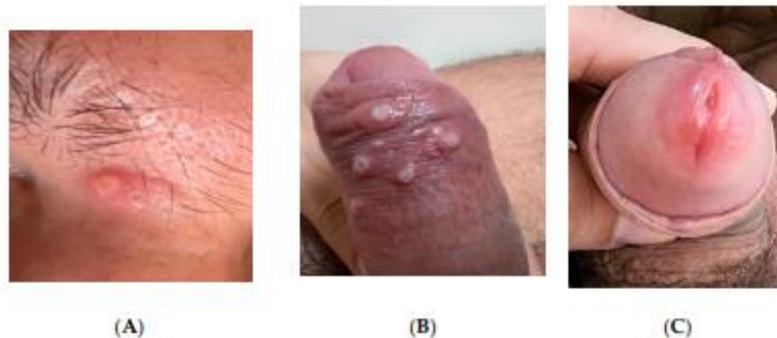


Figure 1. Acute lesions presented by the first case (A–C).



Figure 2. Lesions aspect after 1 week.

2.2. Case Report 2

The patient was a 31-year-old MSM reporting sudden onset of fever, headache, back pain and lymph node enlargement in the cervical region, followed by a cutaneous, papular-vesicular rash that started 4 days before the medical visit. During the medical evaluation, he was in good clinical condition and had normal temperature. The lesions were predominantly on his head, but isolated lesions were detected on the legs, trunk, hands, and perianal area. He did not use psychoactive substances and never smoked, reporting only moderate alcohol intake. He reported no recent trip or sexual contact with new partners in the last 3 weeks. He is engaged in a stable relationship with another man and declared no close contact with other people in the last 2 weeks. He persisted with active lesions for one additional week, without any other clinical event. Figure 3 shows some of the lesions detected during physical examination. We suspected monkeypox infection and asked for a molecular detection test. A swab collection of vesicles' contents and crusts tested positive for monkeypox. The PCR was carried out at the Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), at Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia. The value of the threshold cycle for this case was 18.29.

Both patients provided written informed consent. The case reports were approved by the institutional committee on ethics in research.

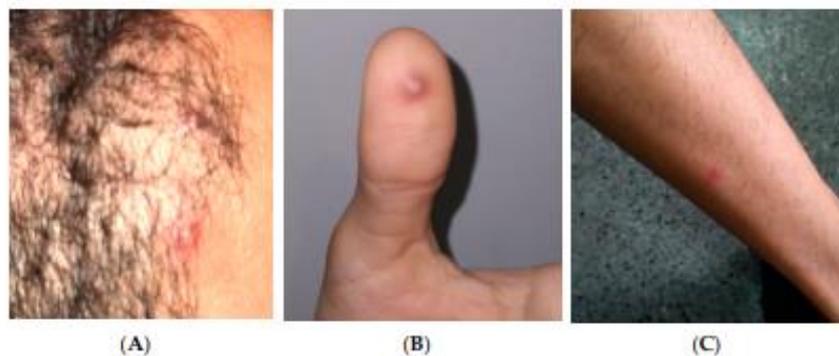


Figure 3. Lesions presented by case 2 at medical visit (A–C).

3. Laboratorial Diagnostic Procedures

Two sample swabs of the skin lesions' secretions were collected and kept in viral transport solution. After 15 min of incubation at room temperature, the material was shortly vortexed and aliquoted. The original tube with swabs and 200 μ L were immediately extracted and purified by PureLink Genomic DNA Mini Kit/Invitrogen. Some aliquots

were kept in an ultra-freezer at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analyses in the reference lab (Fiocruz/Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The analysis was performed using two modified TaqMan qPCR assays, already published [7]. One assay is specific for the Western African (WA) MPXV, and the other is a generic qPCR for all MPXV. To reduce the potential risk of mispriming caused by mutations, we did not use the TaqMan probes and used an unspecific SYBR Master Mix (Power SYBRTM Green PCR Master Mix Applied BiosystemsTM, Waltham, MA, USA). The run was performed on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Mixes and temperature cycles were adapted, and the PCR reaction of either 25 μL of WA or generic assay contents, 12.5 μL of Power SYBR Green PCR Master Mix (2 \times), 1.0 μL of BSA 1 mg/mL (0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.75 μL of forward and reverse primer 10 μM solution (0.3 μM), 5 μL of ultrapure PCR water to complete the volume and 5 μL of extracted sample DNA was carried out. The run was performed with an initial denaturation of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min and 45 two-step cycles with 20 s of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 40 s of $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by a melting curve.

To evaluate the results by Sanger sequencing, the amplicons were purified using a PureLink PCR Purification Mini Kit/Invitrogen, quantified by IQant Touch/Loccus (WA: 19 ng/ μL ; generic: 27 ng/ μL) and labeled in a 10 μL BigDye Terminator 3.1/Applied Biosystems reaction using 1 μL of Big Dye Terminator solution (2.5 \times), 1.5 μL reaction buffer (5 \times), 2.0 μL of forward or reverse primer 2.0 μM (0.4 μM), 3.5 μL of ultrapure PCR water to complete the volume and 2.0 μL of purified PCR product. The run was performed in a Mastercycler Gradient/Eppendorf using denaturation of $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min and 25 three-step cycles of $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 s and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 min. After purification by isopropanol 75% precipitation, sequencing was performed in a SeqStudio/Applied Biosystems using the short-sequence run protocol. The quality of chromatograms using Basecaller/Applied Biosystem values was evaluated using TREV Software (Staden Package), and sequences were aligned with four reference sequences from the original publication and evaluated in BioEdit software [7].

The value of the threshold cycle for the first case was 16.06 for both assays. In addition, the melting curve was clean and showed, for every assay, a single product; $T_m = 75.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the WA assay and $T_m = 75.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the generic assay (Figure 4).

It could be shown that the two PCR products were a 100% match with the published MPXV sequences (Figures 4 and 5) [7].

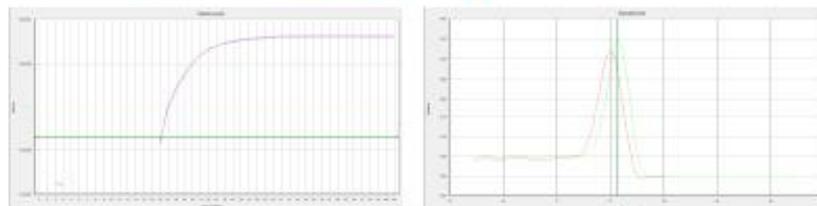


Figure 4. Amplification and melting curves of WA. Amplification curves of WA (red, Ct = 16.06) and generic (blue, Ct = 16.06) assay. Melting curve of WA ($T_m = 75.0\text{ }^{\circ}\text{C}$) and generic ($T_m = 75.7\text{ }^{\circ}\text{C}$) assay.

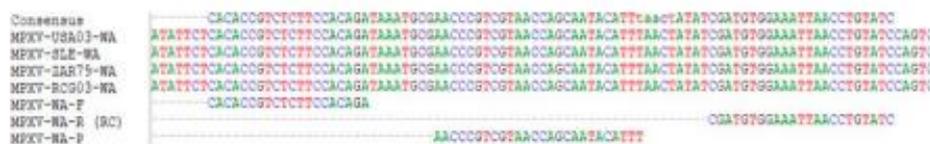


Figure 5. Cont.

```

Consensus      ...GGAAAATGTAAGACACAGAAACAGAAAGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG
MPXV-GSA03-gen CAATGGAAAATGTAAGACACAGAAACAGAAAGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG
MPXV-SLE-gen   CAATGGAAAATGTAAGACACAGAAACAGAAAGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG
MPXV-ZAR79-gen CAATGGAAAATGTAAGACACAGAAACAGAAAGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG
MPXV-RC003-gen CAATGGAAAATGTAAGACACAGAAACAGAAAGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG
MPXV-gen-F     ...GGAAAATGTAAGACACAGAAACAG
MPXV-gen-R (RC) ...AGCCGTAATCTATGTTGCTATCGTGTCTCCGGAACTTACGGTTCCAGATTATGGATAG

```

Figure 5. Previously published MPXV sequence. Alignment of the sequenced WA assay product (consensus) with reference sequences and PCR oligos. Alignment of the sequenced generic assay product (consensus) with reference sequences and PCR oligos.

4. Discussion and Literature Review

The first human case of monkeypox was recorded in 1970 [3]. Since then, monkeypox has been reported in people in central and western African countries as well as in the USA [4–6]. Prior to the 2022 outbreak, nearly all monkeypox cases in people outside of Africa were linked to international travel to countries where the disease commonly occurs or to imported animals.

Since 13 May, an increasing number of human monkeypox cases have been reported to the WHO, and the cases have rapidly spread to different countries and regions. Most of cases have been associated with traveling to another country and were also predominantly detected in MSM. In addition, the lesions were detected mainly in the perineal/genital areas in association with inguinal lymphadenopathy [8].

Only a few reports on monkeypox in people living with HIV (PLWH) have been published. To date, there is little available information on the disease course in such a population—only three cases reported on patients in Romania, Czech Republic and Portugal [9–11]. One of these reports describes monkeypox coinfection with syphilis while another describes a case of monkeypox and acute HIV coinfection. In Brazil, over 800 cases of monkeypox have been reported to public health authorities so far, most of them among MSM, but we were not able to find information on the infection among PLWH. We did not find previous reports on monkeypox cases in Brazil, and there are only a few published cases on monkeypox infection in PLWH worldwide.

In the present report, we describe a monkeypox case in a PLWH and a second case in a HIV-negative subject. Both cases showed a mild presentation of disease and prompt recovery, suggesting that the monkeypox infection's natural course probably is not changed in stable, on treatment, PLWH. The clinical presentation was quite similar for both patients, reinforcing the idea that controlled HIV infection is not a risk for a more severe monkeypox disease. In addition, the history of case 1 suggests that receptive oral sex can be a potential route of transmission, because it was the only exposure risk reported by the patient. The fact that his steady partner was apparently not infected by monkeypox reinforces the available evidence informing that asymptomatic patients are less able to transmit the infection, even to close contacts. The second case also indicates that community transmission is already occurring in Brazil, because the patient had no history of recent travel or sexual contact with occasional partners. In addition, his sexual partner was asymptomatic, but he was not tested for monkeypox. Both cases occurred in MSM, but the absence of a clear sexual exposure in the second case suggests that there may be other routes of transmission, as already indicated by some authors [12–15].

The genetic sequencing of the virus confirms that it belongs to the Western African clade, the less aggressive viral clade. There is still no available information on the outcomes of Congo Basin clade infections in PLWH. Monkeypox has already been declared as a world emergence by the WHO, and the fast spread of cases in Brazil is a concerning problem for health authorities. To date, there is no established treatment for monkeypox, and vaccines against it are not widely available. Preventive strategies must be implemented to allow the proper control of the current outbreak and to identify potential epidemiological changes that increase the risk of monkeypox dissemination to non-endemic countries and make its

control difficult [15]. In addition, the clinical evolution and the outcome of monkeypox among PLWH without treatment or with uncontrolled disease deserve further studies.

Author Contributions: Conceptualization: C.B., E.L., A.S. and M.S.S.; Methodology: A.S., F.D., J.T.B. and C.B.; formal analysis: all authors; original data preparation: C.B., F.D. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira -UFBA (protocol number 5.580.151, 12 August 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data are available under request to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Magnus, P.; Andersen, E.K.; Petersen, K.B.; Birch-Andersen, A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Path. Micro Scand.* **1959**, *46*, 156–176. [CrossRef]
- Chen, N.; Li, G.; Liszewski, M.K.; Atkinson, J.P.; Jahrling, P.B.; Feng, Z.; Schriewer, J.; Buck, C.; Wang, C.; Lefkowitz, E.J.; et al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology* **2005**, *340*, 46–63. [CrossRef] [PubMed]
- Foster, S.O.; Brink, E.W.; Hutchins, D.L.; Pifer, J.M.; Lourie, B.; Moser, C.R.; Cummings, E.C.; Kuteyi, O.E.; Eke, R.E.; Titus, J.B.; et al. Human monkeypox. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46*, 569–576. [PubMed]
- Jezek, Z.; Marennikova, S.S.; Jutumbo, M.; Nakano, J.H.; Paluku, K.M.; Szczeniowski, M. Human monkeypox: A study of 2510 contacts of 214 patients. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 551–555. [CrossRef] [PubMed]
- Meyer, H.; Perrichot, M.; Stemmler, M.; Emmerich, P.; Schmitz, H.; Varaine, F.; Shungu, R.; Tshioko, F.; Formenty, P. Outbreaks of disease suspected of being due to human monkeypox virus infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2919–2921. [CrossRef] [PubMed]
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **2003**, *52*, 642–646.
- Li, Y.; Zhao, H.; Wilkins, K.; Hughes, C.; Damon, L.K. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. *J. Virol. Methods* **2010**, *169*, 223–227. [CrossRef] [PubMed]
- World Health Organization (WHO). Disease Outbreak News; Multi-Country Monkeypox Outbreak in Non-Endemic Countries. Available online: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON385> (accessed on 2 August 2022).
- Oprea, C.; Ianache, I.; Piscu, S.; Tardei, G.; Nica, M.; Ceausu, E.; Popescu, C.P.; Florescu, S.A. First report of monkeypox in a patient living with HIV from Romania. *Travel Med. Infect. Dis.* **2022**, *49*, 102395. [CrossRef] [PubMed]
- de Sousa, D.; Patrocinio, J.; Frade, J.; Correia, C.; Borges-Costa, J.; Filipe, P. Human monkeypox coinfection with acute HIV: An exuberant presentation. *Int. J. STD AIDS* **2022**. [CrossRef] [PubMed]
- Bižová, B.; Veselý, D.; Trojáněk, M.; Rob, F. Coinfection of syphilis and monkeypox in HIV positive man in Prague, Czech Republic. *Travel Med. Infect. Dis.* **2022**, *49*, 102368. [CrossRef] [PubMed]
- Adalja, A.; Inglesby, T. A Novel International Monkeypox Outbreak. *Ann. Intern. Med.* **2022**, *175*, 1175–1176. [CrossRef] [PubMed]
- Daskalakis, D.; McClung, R.P.; Mena, L.; Mermin, J.; Centers for Disease Control and Prevention's Monkeypox Response Team. Monkeypox: Avoiding the Mistakes of Past Infectious Disease Epidemics. *Ann. Intern. Med.* **2022**, *175*, 1177–1178. [CrossRef] [PubMed]
- Iñigo Martínez, J.; Gil Montalbán, E.; Jiménez Bueno, S.; Martín Martínez, F.; Nieto Juliá, A.; Sánchez Díaz, J.; García Marín, N.; Córdoba Deorador, E.; Nunziata Forte, A.; Alonso García, M.; et al. Monkeypox outbreak predominantly affecting men who have sex with men, Madrid, Spain, 26 April to 16 June 2022. *Euro Surveill.* **2022**, *27*, 2200471. [CrossRef] [PubMed]
- Al-Tammemi, A.B.; Albakri, R.; Alabsi, S. The Outbreak of Human Monkeypox in 2022: A Changing Epidemiology or an Impending Aftereffect of Smallpox Eradication? *Front. Trop. Dis.* **2022**, *3*, 951380. [CrossRef]

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

<p>Título do Estudo “Caracterização clínico-epidemiológica, resposta imune, e avaliação diagnóstica da COVID-19 na Bahia”</p> <p>Pesquisador Responsável: Dr. Carlos Brites</p>
<p>INTRODUÇÃO: Você está sendo convidado a participar de um estudo porque é profissional de saúde, portador do HIV, está em tratamento para tuberculose ou está em uso de hidroxicloroquina. Antes que decida participar ou não como voluntário nesta pesquisa é importante que você leia cuidadosamente este formulário e compreenda por que esta pesquisa está sendo feita, o que ela envolve, como sua participação poderá ajudá-lo (a) e o que é esperado de você durante a pesquisa. Este termo de consentimento foi revisado e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), que é responsável por revisar estudos de pesquisa com o objetivo de proteger os direitos e o bem-estar das pessoas que estão participando. Algumas informações contidas neste termo de consentimento são exigidas por normas brasileiras.</p>
<p>Objetivo do Estudo O objetivo deste estudo é saber quantas pessoas foram e estão infectadas com a COVID-19 em populações específicas na cidade de Salvador e avaliar a evolução dessa doença. Além disso, pretendemos estudar os fatores associados com os diferentes níveis de gravidade da doença.</p>
<p>Duração do Estudo A sua participação no estudo é estimada em 45 dias, pois pretendemos repetir os testes iniciais após este período, para saber se ocorreram infecções em pessoas que antes tinham testes negativos para a doença. Caso seu teste seja positivo nas avaliações iniciais, você será convidado a repetir o exame após 6 meses, para avaliar a mudança nos níveis de anticorpos nesse período.</p>
<p>Descrição do Estudo Este estudo será realizado pela Fundação Bahiana de Infectologia. Incluiremos no estudo profissionais de saúde e indivíduos atendidos nos ambulatórios de referência para HIV e tuberculose.</p>
<p>Procedimento do Estudo Após entender e concordar em participar, solicitaremos seus dados através de entrevista no momento da admissão no estudo, coletaremos amostras de sangue (2 colheres de sopa), e saliva para realização dos testes para coronavírus. Para os participantes do grupo de profissionais de saúde será realizado um questionário de qualidade vida e uma avaliação dos sinais de esgotamento.</p>
<p>Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade Conforme descrito acima, o sangue armazenado será mantido em local seguro no Biorrepositório (local de armazenamento das amostras biológicas). Para esta pesquisa, o biorrepositório ficará no Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), localizado em Salvador, onde esta pesquisa também será realizada. Nenhuma amostra coletada será identificada com seu nome, usaremos códigos para manter a sua confidencialidade. Esse material poderá ficar armazenado por um período de até 10 anos. Se desejarmos armazenar o material por mais tempo, uma renovação desse período será solicitada às autoridades aplicáveis e o armazenamento só continuará se forem recebidas as devidas aprovações. Pesquisas futuras serão submetidas a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, antes de serem iniciadas. Se houver aprovação, você será contatado para dizer se concorda com o uso do seu material biológico (sangue), a cada nova pesquisa, através da assinatura de novo Termo de Consentimento específico.</p>

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica da Pessoa que obteve o TCLE: _____
 Rubrica do Representante Legal ou Testemunha: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Precisamos saber se você aceita que suas amostras sejam armazenadas. Por favor, marque SIM ou NÃO abaixo:

SIM NÃO

Você tem direito de saber os resultados obtidos com a utilização do seu material e a receber orientações quanto às consequências destes resultados, caso haja alguma. Para isso você poderá contatar o pesquisador responsável pelo estudo (Dr. Carlos Brites) através do telefone no fim deste documento.

O sangue armazenado neste biorrepositório continuará sendo seu, permanecendo, entretanto, sob responsabilidade da instituição. Assim, você, ou seu representante legal, pode retirar o consentimento de armazenamento das amostras a qualquer tempo, sem nenhum prejuízo para você ou seu tratamento. Para isso, você deverá formalizar sua desistência através de um documento assinado e datado por você ou por seu representante legal. A desistência será válida a partir desta data e nós destruiremos suas amostras. Você pode desistir de participar do estudo e manter suas amostras já coletadas armazenadas para o estudo e/ou para estudos futuros, sem nenhum prejuízo.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto.

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta do sangue. Raramente desmaio ou infecções no local da coleta podem ocorrer. Para minimizar estes riscos o procedimento será feito por profissional qualificado usando material adequado.

Benefícios para o Participante

Os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar os médicos a entender melhor a infecção por Coronavírus, identificar pacientes que podem evoluir com maior gravidade e com isso melhorar o tratamento desses pacientes. Você pode não obter benefício direto nesse estudo, mas, esse conhecimento pode ajudar futuros pacientes. Se houver algum resultado que possa beneficia-lo, iremos comunicar-lhe imediatamente.

Compensação

Você não terá nenhum custo para participar deste protocolo de pesquisa. De acordo com as normas brasileiras, você não será pago por participar deste estudo.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação nesse estudo não alterará a sua relação da equipe médica caso você esteja em tratamento. Após assinar este consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Como participante de pesquisa, sua privacidade será respeitada, seu nome e qualquer outro dado que possa lhe identificar serão mantidos em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade das informações, bem como a não exposição dos dados de pesquisa. Somente nos casos previstos em Lei será possível a quebra do sigilo e confidencialidade.

Todos os questionários e outros formulários utilizados neste projeto serão armazenados em armário trancado. Esses dados serão destruídos assim que não forem mais necessários. Os resultados desta pesquisa serão analisados e possivelmente publicados em revistas médicas, mas em momento algum seu nome será exposto ou divulgado.

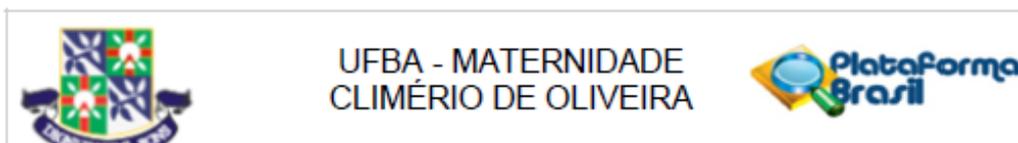
Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica da Pessoa que obteve o TCLE: _____
 Rubrica do Representante Legal ou Testemunha: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

<p><u>Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida</u></p> <p>Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O responsável pelo estudo nesta instituição é Dr. Carlos Brites que poderá ser encontrado no endereço abaixo: Fundação Bahiana de Infectologia, Rua João das Botas, Centro Médico João das Botas, 185, sala 705, Canela. CEP: 40.110-160. Salvador/BA Número de telefone do centro de pesquisa: (71) 3283-8123 Número de telefone 24 horas: (71) 98643-7227</p>	
<p>Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar: Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia - Largo do Terreiro de Jesus, s/n, Centro Histórico, CEP 40.026-010, Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: +55 (71) 3283-5564</p>	
<p><u>Registros médicos e assinatura</u></p> <p>Eu autorizo a utilização dos meus dados e ou registros médicos (prontuários médicos) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição. Este consentimento foi elaborado em duas vias. Você vai receber uma via deste consentimento para mantê-lo com você, e outra via ficará com o pesquisador.</p>	
Nome do Participante de Pesquisa	Data
Assinatura do Participante de Pesquisa	
Nome do Representante Legal ou Testemunha (quando aplicável)	Data
Assinatura do Representante Legal ou Testemunha (quando aplicável)	
Nome da pessoa que obteve o Consentimento	Data
Assinatura da Pessoa que obteve o Consentimento	

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização clínico-epidemiológica, resposta imune, e avaliação diagnóstica da COVID-19 na Bahia.

Pesquisador: CARLOS BRITES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31748320.3.1001.5543

Instituição Proponente: Fundação Bahiana de Infectologia

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.042.620

Apresentação do Projeto:

A doença clínica denominada COVID-19 é causada por um novo betacoronavírus, atualmente chamado SARS-CoV-2. O SARS-CoV-2 compartilha 88% de identidade de sequência com o SARS-CoV, o vírus que causou um grande surto em 2002-2003. O número de casos desta nova doença começou a aumentar exponencialmente, alguns dos quais não já tinham exposição ao mercado animal vivo de Wuhan, sugerindo o fato de que a transmissão humano-humano estava ocorrendo. Os casos continuaram a aumentar exponencialmente e os estudos de modelagem relataram inicialmente uma epidemia duplicando com o tempo de 1,8 d. Dados iniciais mostravam que dos infectados, 20% se apresentavam em estado crítico, 25% se recuperaram e 3310 (3013 na China e 297 em outros países) morreram já no fim de janeiro. Todas as idades são suscetíveis ao SARS-CoV2. A infecção é transmitida através de grandes gotículas geradas durante a tosse e espirro por pacientes sintomáticos, mas também pode ocorrer a partir de pessoas assintomáticas e antes do início dos sintomas. Estudos iniciais têm mostrado maiores cargas virais nas cavidades nasais em comparação com a garganta sem diferença na carga viral entre pessoas sintomáticas e assintomáticas. O vírus pode permanecer viável em superfícies por dias em condições atmosféricas favoráveis, mas são destruídos em menos de um minuto por desinfetantes comuns como hipoclorito sódico, peróxido de hidrogênio, etc. A infecção é adquirida por inalação dessas gotículas ou por superfícies de toque contaminadas por elas e, em seguida, tocando o nariz, boca

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

CEP: 40.055-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

E-mail: cepmco@ufba.br



UFBA - MATERNIDADE
CLIMÉRIO DE OLIVEIRA



Continuação do Parecer: 4.042.620

e olhos. O vírus também está presente nas fezes e a contaminação do abastecimento de água e posterior transmissão via aerossolização/rota oral fecal também é uma hipótese. Estudos identificaram o receptor de angiotensina 2 (ACE2) como o receptor através do qual o vírus entra na mucosa respiratória, o mesmo receptor de entrada do SARS-CoV (10–12). A taxa básica de reprodução de casos (BCR - R_0) é estimada em 2 a 6,47 em vários estudos de modelagem (10,13). Em comparação, o BCR de SARS foi de 2 e 1,3 para gripe pandêmica H1N1 2009 (14) ele é bastante mais agressivo. Hipóteses: 1. A incidência e prevalência da infecção por COVID-19 varia para diferentes populações². A severidade da COVID-19 é associada ao perfil de produção de citocinas pro-inflamatórias e ao perfil genético do paciente³. A pandemia por COVID-19 afeta negativamente a qualidade de vida de profissionais de saúde.

Populações: doenças autoimunes: No ambulatório de referência para pacientes com do HUPES, 300 pacientes no momento de seu comparecimento à farmácia para retirada da hidroxiquina (HC). Os pacientes serão testados para anticorpos contra o coronavírus, e coleta de saliva para detecção de antígenos do coronavírus. As amostras reagentes para antígenos serão confirmadas por RT-PCR. Uma fração (10%) dos pacientes negativos será testada para avaliar a concordância com o teste sorológico e possível detecção da doença aguda, justificado pelo avanço rápido da pandemia na região, uma vez que casos assintomáticos podem ocorrer, também serão testados

Populações: tuberculose ativa, pacientes infectados pelo HIV-1 e profissionais de saúde: Resposta imunológica alterada em relação à população de profissionais de saúde: avaliação de desfechos clínicos naqueles com testes positivos para SARS-CoV-2. Testes rápidos para detecção de anticorpos para avaliar exposição ao SARS-CoV-2 em portadores de HIV-1 (N=300), e de tuberculose (N=100). Serão utilizados testes imunocromatográficos, de fluxo lateral, para detecção de anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV-2 e testes para detecção de antígeno. Cada paciente será submetido a punção venosa para retirada de amostra de sangue (20 ml) para testagem e dosagem de citocinas, naqueles que tiverem os testes reagentes, e em uma amostra pareada por sexo e idade nos que testarem negativos. Todos os pacientes positivos serão retestados para anticorpos após 45 e 180 dias, para avaliação da cinética de anticorpos, titulados por diluições sucessivas.

Endereço: Rua do Linoelro, 137

Bairro: Nazaré

CEP: 40.055-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

E-mail: cepmco@ufba.br



UFBA - MATERNIDADE
CLIMÉRIO DE OLIVEIRA



Continuação do Parecer: 4.042.620

Populações: profissionais de saúde: C-HUPES 1700 funcionários de diversas especialidades, e não participa da rede referencial do estado para COVID-19, por ser uma instituição federal. Entretanto, tem ocorrido casos de COVID-19 entre funcionários e pacientes, desde o início da pandemia. O Instituto Couto Maia (ICOM) é um hospital especializado em infectologia, é a principal referência para o atendimento a COVID-19 no estado, e tem concentrado a maioria dos casos diagnosticados com a doença. O ICOM tem 140 leitos (40 de UTI), sendo que a maioria deles está dedicada à atenção a pacientes diagnosticados com COVID-19, contando com aproximadamente 750 funcionários. O Hospital da Bahia é um hospital privado, e principal referência para atendimento aos funcionários públicos do estado. Tem 300 leitos e 1700 funcionários e vem atendendo casos de COVID-19 desde o início da pandemia. Estas 3 instituições fornecem um perfil aproximado da rede de saúde do estado, devido às suas características complementares.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL

1. Avaliar incidência e prevalência da COVID-19 em populações específicas. 2. Avaliar resposta imune e associação da evolução da doença com características genéticas de pacientes e do vírus.

SECUNDÁRIOS

1. Comparar a proporção de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 em usuários crônicos de hidroxiquina com familiares residindo no mesmo endereço, que não utilizam a medicação;

2. Avaliar a incidência e prevalência da COVID-19 em pacientes com diagnóstico de tuberculose ativa e pacientes infectados pelo HIV-1;

3. Avaliar a incidência e prevalência da COVID-19 e o impacto da pandemia sobre a qualidade de vida em profissionais de saúde atendendo em um hospital terciário em Salvador, BA.

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

CEP: 40.055-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

E-mail: cepmco@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.042.620

4. Avaliar perfil de produção de citocinas pro-inflamatórias em pacientes nas diversas fases da COVID-19, e presença de marcadores genéticos virais e do hospedeiro potencialmente associados aos desfechos clínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

"Trata-se de estudo sem intervenção ativa. Os riscos basicamente se restringem à quebra de confidencialidade ou reações locais à coleta de sangue. Será assegurada a confidencialidade dos participantes através da codificação de seus dados, de modo que apenas os investigadores serão capazes de acessar as informações referentes aos mesmos. A retirada de sangue pode ocasionar desconforto, sangramento leve, ou formação de equimose. Sempre que possível, as coletas serão realizadas por ocasião de exames de rotina, evitando-se novas punções."

BENEFÍCIOS:

"Os participantes da pesquisa provavelmente não terão benefício direto. Porém, a sua população de origem (todos infectados ou que possam vir a ser infectados pelo COVID-19) pode se beneficiar com os achados. Produzir mais conhecimento sobre a apresentação e evolução da infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19), assim como avaliar a prevalência e incidência da COVID-19 e o impacto da pandemia sobre a qualidade de vida em profissionais de saúde atendendo em hospitais de Salvador, BA. Os resultados serão publicados em literatura médica formal permitindo a difusão do conhecimento."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional de prevalência e coorte (uma avaliação apenas em 45 dias), estudos genéticos e citocinas em diversas populações (HIV, TB, profissionais de saúde, pacientes com doenças crônicas usuários de hidroxiquina). Bem argumentado. Ético.

Endereço: Rua do Limoeiro, 137
 Bairro: Nazaré CEP: 40.055-150
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-9210 E-mail: cepmco@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.042.620

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: contém elementos RE466/12. ADEQUADO.

ORÇAMENTO: R\$ 1.800000. Financiamento CNPq ADEQUADO.

Cronograma: ADEQUADO.

Carta de confidencialidade: Assistentes Nadja Sales Pacheco Equipe: Estela Luz, Marcia Lilian Sampaio e Sampaio Sá, Celia Pedroso Jorge Liliane Elze Falcão Lins Kusterer Michael Santos Rocha, Ceuci de Lima Xavier Nunes, Leonardo Augusto Kister de Toledo, Camila Figueredo ADEQUADO.

Carta anuência da instituição: ANEXADA FBAI, HUPES, INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, DA UFBA; HOSPITAL DA BAHIA, INSTITUTO COUTO MAIA. ADEQUADO

Contrapartida da instituição: há contrapartida anotada ADEQUADO.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

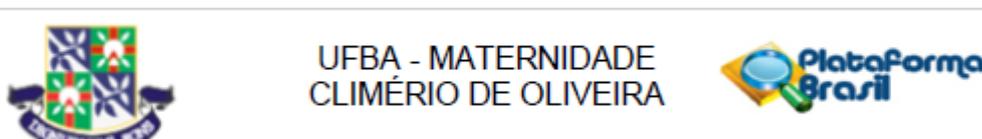
Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

-O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 466/12 CNS/MS) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

-O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. 466/12 CNS/MS), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador

Endereço: Rua do Limoetro, 137
 Bairro: Nazaré CEP: 40.055-150
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-9210 E-mail: cepmco@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.042.620

com a resolução 466/12 CNS/MS.

-O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

-Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

-Relatórios PARCIAIS devem ser apresentados ao CEP SEMESTRALMENTE e FINAL na conclusão do projeto.

-Assegurar aos participantes da pesquisa ou sua população fonte os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (466/12 CNS/MS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1544710.pdf	21/05/2020 15:13:54		Aceito
Outros	Notificacao_N402020_Resposta_Pendencia_CEP_Parecer_4029418.pdf	21/05/2020 15:11:50	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Notificacao_N402020_Resposta_Pendencia_CEP_Parecer_4029418.doc	21/05/2020 15:11:34	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_3_WHOQOL_Bref_Portugueses.pdf	21/05/2020 15:09:31	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_2.pdf	21/05/2020 15:09:16	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_1_MASLACH_BURNOUT_INVENTORY_MBI.pdf	21/05/2020 15:08:58	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_3_WHOQOL_Bref_Portugueses.docx	21/05/2020 15:05:29	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_2.docx	21/05/2020 15:05:10	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Questionario_1_MASLACH_BURNOUT_INVENTORY_MBI.docx	21/05/2020 15:04:50	Nadja Sales Pacheco	Aceito

Endereço: Rua do Ilmoeiro, 137

Bairro: Nazaré

UF: BA

Telefone: (71)3283-9210

Município: SALVADOR

CEP: 40.055-150

E-mail: cepmco@ufba.br



UFBA - MATERNIDADE
CLIMÉRIO DE OLIVEIRA



Continuação do Parecer: 4.042.620

Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Leonardo_Kister.pdf	21/05/2020 15:03:23	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Ceuci_Nunes_lcom.pdf	21/05/2020 15:03:14	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Camila_Figueiredo.pdf	21/05/2020 15:03:06	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_FJS.pdf	21/05/2020 15:02:09	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_ICS_UFBA.pdf	21/05/2020 15:01:04	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HUPES.pdf	21/05/2020 15:00:33	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Hospital_da_Bahia.pdf	21/05/2020 14:59:49	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_lcom.pdf	21/05/2020 14:59:07	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Declaração de concordância	Declaracao_de_Anuencia_HUPES.pdf	21/05/2020 14:57:51	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_COVID19_CNPq_versao1_17ABRIL2020.docx	21/05/2020 14:56:56	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_COVID19_CNPq_versao1_17ABRIL2020.pdf	21/05/2020 14:56:44	Nadja Sales Pacheco	Aceito
Outros	Notificacao_N372020_Submissao_Projeto_CEP_13MAI2020.doc	13/05/2020 16:44:13	CARLOS BRITES	Aceito
Outros	Notificacao_N372020_Submissao_Projeto_CEP_13MAI2020.pdf	13/05/2020 16:39:28	CARLOS BRITES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao1_datada_de_17ABR2020.pdf	13/05/2020 16:10:57	CARLOS BRITES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao1_datada_de_17ABR2020.doc	13/05/2020 16:10:49	CARLOS BRITES	Aceito
Orçamento	Orcamento_versao1_17ABRIL2020.pdf	13/05/2020 16:10:17	CARLOS BRITES	Aceito
Orçamento	Orcamento_versao1_17ABRIL2020.docx	13/05/2020 16:10:08	CARLOS BRITES	Aceito
Cronograma	Cronograma_versao1_17ABRIL2020.pdf	13/05/2020 16:09:59	CARLOS BRITES	Aceito
Cronograma	Cronograma_versao1_17ABRIL2020.docx	13/05/2020 16:09:48	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Liliane_Lins.pdf	13/05/2020 15:20:48	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de	Termo_de_Compromisso_Estela_Luz.	13/05/2020	CARLOS BRITES	Aceito

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

CEP: 40.055-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

E-mail: cepmco@ufba.br



UFBA - MATERNIDADE
CLIMÉRIO DE OLIVEIRA



Continuação do Parecer: 4.042.620

Pesquisadores	pdf	14:32:27	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Marcia_Sampaio_HB.pdf	13/05/2020 14:13:12	CARLOS BRITES	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_FBAl.pdf	13/05/2020 12:55:25	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_FBAl.pdf	13/05/2020 12:55:11	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Celia_Pedroso.pdf	13/05/2020 12:54:51	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_Michael.pdf	13/05/2020 12:54:40	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Nadja_Pacheco.pdf	13/05/2020 12:54:30	CARLOS BRITES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_13MAIO2020.pdf	13/05/2020 12:54:19	CARLOS BRITES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 22 de Maio de 2020

Assinado por:
Eduardo Martins Netto
(Coordenador(a))

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

CEP: 40.055-150

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

E-mail: cepmco@ufba.br