



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETECÇÃO DE VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs)
DO SARS-CoV-2 NO EXTREMO SUL DO BRASIL**

LEONARDO FRANCISCO DA SILVA

RIO GRANDE/RS
2024



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETECÇÃO DE VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs)
DO SARS-CoV-2 NO EXTREMO SUL DO BRASIL**

LEONARDO FRANCISCO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Pasqualim

RIO GRANDE/RS
2024

LEONARDO FRANCISCO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**DETECÇÃO DE VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs)
DO SARS-CoV-2 NO EXTREMO SUL DO BRASIL**

Banca Examinadora

Prof. Dra. Ivy Bastos Ramis – FURG (Titular)

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco – UFRGS (Externo)

Prof. Dra. Vanusa Pousada da Hora – FURG (Suplente)

Profa. Dra. Gabriela Pasqualim - FURG (Orientadora)

Ficha Catalográfica

S586d

Silva, Leonardo Francisco da.

Detecção de variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2
no extremo sul do Brasil / Leonardo Francisco da Silva - 2024.
86 f

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS. 2024.
Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Pasqualim.

1. COVID-19 2. SARS-CoV-2 3. Pandemia 4. Vigilância Genômica
I. Pasqualim, Gabriela II. Título.

CDU 616

ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA

A banca examinadora, designada pela Portaria nº 2184/2024 de onze de setembro de dois mil e vinte e quatro, em sessão presidida e registrada pela orientadora Profa. Dra. Gabriela Pasqualim, reuniu-se no dia vinte e cinco de setembro de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, por meio de videoconferência (<https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/gabriela-pasqualim-gabriela>), para avaliar a Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: “Detecção de variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 no extremo sul do Brasil.” do mestrando Leonardo Francisco da Silva. Para o início dos trabalhos, a Senhora Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 30 (trinta) minutos para a apresentação da dissertação pelo mestrando, que iniciou às 14 horas e 07 minutos e terminou às 14 horas e 47 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a dissertação de mestrado avaliada foi aprovada.

Rio Grande, 25 de setembro de 2024.

Profa. Dra. Gabriela Pasqualim (Orientadora – FURG)

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELA PASQUALIM
Data: 25/09/2024 16:50:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ana Cláudia Franco (Externo – UFRGS)

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA CLAUDIA FRANCO
Data: 24/10/2024 08:37:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis (Titular – FURG)

Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora (Suplente - FURG)

CIENTE: _____

Mestrando Leonardo Francisco da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser o meu alicerce e base durante toda a minha vida. Em todos os meus momentos de fraqueza você foi sem dúvidas a minha maior força.

Aos meus pais Vilma e Olivan por todo o amor, dedicação e suporte que desprenderam durante toda a minha vida acadêmica e todo esse esforço me fizeram chegar até aqui. Nós conseguimos!

Ao meu namorado, Wendel, que em todos os momentos desta trajetória esteve comigo, suportando as minhas crises e me dando ânimo nos momentos de dificuldade para concluir esta etapa.

Dedico esta dissertação também a minha bisavó Geralda e ao meu avô Joaquim, *in memoriam*. Mesmo que não estejam presentes fisicamente, sei que estão intercedendo e torcendo por mim onde quer que estejam.

Aos meus amigos, alunos e pessoas próximas que torcem por mim, agradeço por todo o apoio e energias positivas durante esta trajetória.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Gabriela Pasqualim, que sempre esteve disponível em todas as minhas dúvidas e questionamentos. Agradeço por toda a paciência e compreensão durante a realização deste projeto. Sem o seu apoio nada disso seria possível.

A equipe do Laboratório de Apoio Diagnóstico em Infectologia (LADI) do Hospital Universitário da FURG, em especial a Jéssica da Silva Dittgen e Luísa Dias da Mota pelo esforço fornecido e por todo o acolhimento e disponibilidade durante todo o período das análises.

Aos colaboradores e alunos do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo acolhimento e espaço fornecido que permitiu que algumas etapas do projeto fossem concluídas. Um agradecimento especial à doutoranda Vanise Pereira Medeiros por todo seu apoio, disponibilidade e contribuição na realização deste projeto.

Aos demais professores, servidores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina e da Universidade Federal de Rio Grande, pelo apoio, pelos conhecimentos construídos e compartilhados e pela oportunidade de fazer novas amizades ao longo dessa trajetória.

RESUMO

A pandemia de COVID-19 provocada pelo SARS-CoV-2 aconteceu em um período histórico de grande globalização que permitiu com que a circulação do vírus acontecesse de maneira muito mais rápida e trouxesse grandes consequências. A detecção de variantes do SARS-CoV-2 através do sequenciamento completo do genoma viral representa o padrão-ouro dentro da vigilância genômica, porém ainda inacessível a algumas regiões mais distantes como o extremo sul do país pelo seu alto custo e necessidade de mão de obra qualificada. O objetivo desse projeto foi a detecção de variantes de preocupação no extremo sul do Brasil através de metodologias de vigilância genômica mais acessíveis. Neste estudo foi realizada a análise de 363 amostras de *swab* nasofaríngeo provenientes de um laboratório de referência em infectologia na cidade de Rio Grande, no extremo sul do Brasil, coletadas no período de janeiro a junho de 2022. Elaboramos um pacote de ensaios para detecção de mutações-chave por genotipagem baseando-se no perfil das variantes circulantes no período do estudo no Brasil e no mundo. Algumas destas amostras (n=67) foram selecionadas aleatoriamente por semana epidemiológica para a realização do sequenciamento parcial da região RBD. Durante o período de estudo houve um grande domínio da variante Ômicron presentes nas amostras do estudo, com a BA.1 dominando o período de janeiro a março, tendo o seu domínio substituído no mês de abril pela BA.2 e a partir de junho sendo alcançado pela BA.4/5. O resultado de todas as amostras que foram sequenciadas foram compatíveis com os resultados encontrados pelos ensaios de genotipagem. As variantes BA.2 e BA.2.56 foram detectadas inicialmente nos meses de janeiro e abril, respectivamente, nas amostras do estudo, sendo detectadas um mês antes nas amostras do estudo quando comparadas as sequências depositadas no estado do Rio Grande do Sul no GISAID. Estes pontos levantados podem sugerir que há alguma diferença na circulação viral presente na cidade de Rio Grande quando comparados às demais cidades da região pelas suas características geográficas e epidemiológicas. Técnicas alternativas de vigilância como a genotipagem e o sequenciamento parcial da região RBD garante bons resultados para o monitoramento e triagem de amostras em períodos críticos como a pandemia pela COVID-19, onde não seja possível realizar o sequenciamento completo.

Palavra-chave: COVID-19. SARS-CoV-2. Pandemia. Vigilância Genômica.

Esta dissertação está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização Mundial da Saúde, contemplando o ODS 3 que busca assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todas e todos, em todas as idades. Dentro desse objetivo, contemplando a meta 3.3 que busca acabar com as epidemias de doenças transmissíveis e a meta 3.b que busca apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas e medicamentos para doenças transmissíveis e não transmissíveis, proporcionar o acesso a medicamentos e vacinas essenciais a preços acessíveis.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 occurred in a historical period of great globalization that allowed the virus to circulate much faster and bring major consequences. The detection of SARS-CoV-2 variants through complete sequencing of the viral genome represents the gold standard within genomic surveillance, however it is still inaccessible to some more distant regions such as the extreme south of the country due to its high cost and need for manpower. qualified work. The objective of this project was to detect variants of concern in the extreme south of Brazil through more accessible genomic surveillance methodologies. In this study, an analysis was carried out of 363 nasopharyngeal swab samples from a reference laboratory in infectious diseases in the city of Rio Grande, in the extreme south of Brazil, collected from January to June 2022. We developed a package of tests to detect mutations -key by genotyping based on the profile of variants circulating during the study period in Brazil and around the world. Some of these samples (n=67) were randomly selected per epidemiological week to carry out partial sequencing of the RBD region. During the study period there was a great dominance of the Ômicron variant present in the study samples, with BA.1 dominating the period from January to March, having its dominance replaced in April by BA.2 and from June being carried out by BA.4/5. The results of all samples that were sequenced were compatible with the results found by genotyping assays. The BA.2 and BA.2.56 variants were initially detected in the months of January and April, respectively, in the study samples, being blocked a month earlier in the study samples respectively when comparing the sequences deposited in the state of Rio Grande do Sul in GISAID. These points raised may indicate that there is some difference in the viral circulation present in the city of Rio Grande when compared to other cities in the region due to their geographic and epidemiological characteristics. Alternative surveillance techniques such as genotyping and partial sequencing of the RBD region guarantee good results for monitoring and screening samples in critical periods such as the COVID-19 pandemic, where it is not possible to carry out complete sequencing.

Keyword: COVID-19. SARS-CoV-2. Pandemic. Genomic Surveillance.

This dissertation is aligned with the World Health Organization's Sustainable Development Goals (SDGs), covering SDG 3, which seeks to ensure a healthy life and promote well-being for everyone, at all ages. Within this objective, contemplating target 3.3 which seeks to end epidemics of communicable diseases and target 3.b which seeks to support the research and development of vaccines and medicines for communicable and non-communicable diseases, providing access to essential medicines and vaccines at affordable prices.

Em memória de todos os seres humanos que morreram em decorrência da COVID-19, especialmente aqueles que pereceram pela inépcia de seus governantes.

(Kelvin Maciel da Silva)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variantes de preocupação do SARS-CoV-2	25
Tabela 2.	Mutações definidoras de linhagem compartilhadas pelas principais subvariantes da Ômicron na proteína Spike (S).....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Plataformas comumente usadas para análise de sequenciamento do SARS-CoV-2 e suas características	43
------------------	--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de classificação dos coronavírus	15
Figura 2. Genoma e proteínas associadas do SARS-CoV-2.....	18
Figura 3. Interação molecular entre a glicoproteína S e o receptor ACE-2	20
Figura 4. O ciclo replicativo do SARS-CoV-2	22
Figura 5. Filogenia das variantes de SARS-CoV-2	24
Figura 6. Circulação das variantes do SARS-CoV-2 ao longo do tempo no Brasil, por número de sequências e data de coleta da amostra depositada no GISAID.....	34
Figura 7. Distribuição da frequência das principais linhagens de SARS-CoV-2 circulantes no Brasil entre fevereiro de 2020 a maio de 2024, segundo genomas sequenciados e depositados no GISAID	35
Figura 8. Frequência das linhagens relevantes em circulação do estado do Rio Grande do Sul entre março de 2020 e dezembro de 2023	38
Figura 6. Automatização do método de Sanger	41

LISTA DE SIGLAS

ACE-2	Enzima conversora de angiotensina
CEVS	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
COVs	Coronavírus
COVID-19	Doença do coronavírus - 2019
CTD	domínio C-terminal
DNA	ácido desoxirribonucleico
E	Proteína de envelope
<i>et al</i>	E colaboradores
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GISAID	<i>Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data</i>
HCoV-229E	Coronavírus humano 229E
HCoV-NL63	<i>Coronavirus humano NL63</i>
HCoV-OC43	<i>Coronavirus humano OC43</i>
HCoV-HKU1	<i>Coronavirus humano HKU1</i>
IBV	<i>Infectious Bronchitis Virus</i>
M	Proteína de membrana
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>
N	Proteína do nucleocapsídeo
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NSPS	Proteínas não estruturais
NTD	domínio N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>

PEDV	<i>Porcine Epidemic Diarrhea Virus</i>
RBD	domínio de ligação ao receptor
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
RSV	Vírus sincicial respiratório
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa quantitativa
S	<i>Proteína spike</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane Serine Protease 2</i>
VOC	<i>variant of concern</i>
VOI	<i>variant of interest</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 HISTÓRIA DOS CORONAVÍRUS	14
1.2 ORIGEM DO SARS-CoV-2	16
1.3 ESTRUTURA DO SARS-CoV-2	17
1.4 CICLO REPLICATIVO DO SARS-CoV-2	19
1.5 VARIABILIDADE GENÔMICA	22
1.5.1 VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs)	23
1.5.1.1 Variante Alfa (B.1.1.7)	25
1.5.1.2 Variante Beta (B.1.351)	26
1.5.1.3 Variante Gama (B.1.1.28.1)	27
1.5.1.4 Variante Delta (B.1.617.2)	28
1.5.1.5 Variante Ômicron (B.1.1.529)	28
1.6 HISTÓRIA DA PANDEMIA NO BRASIL	33
1.6.1 História da pandemia no estado do Rio Grande do Sul	36
1.7 TRIAGEM E VIGILÂNCIA GENÔMICA	39
1.7.1 Sequenciamento parcial do genoma - Método de Sanger	40
1.7.2 Sequenciamento do genoma completo (WGS - <i>whole genome sequencing</i>)	42
1.7.3 Genotipagem	45
2. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
RESEARCH ARTICLE	60
SUPPLEMENTARY MATERIAL	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 HISTÓRIA DOS CORONAVÍRUS

Os coronavírus (CoVs) são um grande grupo de vírus que provocam infecções respiratórias, que inicialmente foram limitadas a animais, classificados como enzoóticos, mas algumas espécies progrediram para um quadro de zoonose ao infectar seres humanos também (GRAF *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2021).

Os coronavírus que causam infecções em animais dentro da medicina veterinária já são estudados desde 1930 e diversas espécies altamente patogênicas como o Vírus da Bronquite Infecciosa - IBV (do inglês, *Infectious Bronchitis Virus*) em aves e o Vírus da Diarreia Epidêmica dos suínos - PEDV (do inglês, *Porcine Epidemic Diarrhea Virus*), são responsáveis por grandes perdas anuais dentro do setor agropecuário mundial (GRAF *et al.*, 2020; COLVERO *et al.*, 2015; SCHULZ; TONSOR, 2015).

A primeira espécie de coronavírus foi identificada em 1965 por Tyrrell e Bynoe em uma amostra de cultura de tecido traqueal humano (TYRRELL; BYNOE, 1966). O microorganismo desconhecido apresentava uma superfície com aspecto de coroa, característica essa que foi usada para a denominação do grupo (TYRRELL *et al.*, 1975). A partir disso então sete espécies com característica zoonótica representantes do grupo já foram identificadas, dentre elas o 229E (HCoV-229E), NL63 (HCoV-NL63), OC43 (HCoV-OC43), HKU1 (HCoV-HKU1), SARS-CoV (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), MERS-CoV (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) e SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). (GRAF *et al.*, 2020). **(Figura 1).**

De todas as espécies de COVs identificadas, o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 são capazes de provocar uma infecção a nível respiratório mais intensa, severa, com amplo número de sintomas e maiores taxas de infecção e mortalidade. Isso faz com que essas espécies sejam estudadas com mais atenção pela comunidade científica de maneira geral (FERREIRA, 2020a; MACHADO *et al.*, 2021).

Os primeiros casos da Síndrome Respiratória Aguda Grave - SARS provocada pelo SARS-CoV foram notificados ao final do ano de 2002 na província de Guangdong, China (KSIAZEK *et al.*, 2003). Rapidamente o vírus se espalhou para mais de doze países da América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, tendo como resultado mais de 8 mil pessoas infectadas e aproximadamente 800 mortes (WOO *et al.*, 2009; POON *et al.*, 2004). A epidemia foi controlada no ano de 2003 e não se tem mais casos notificados até o momento.

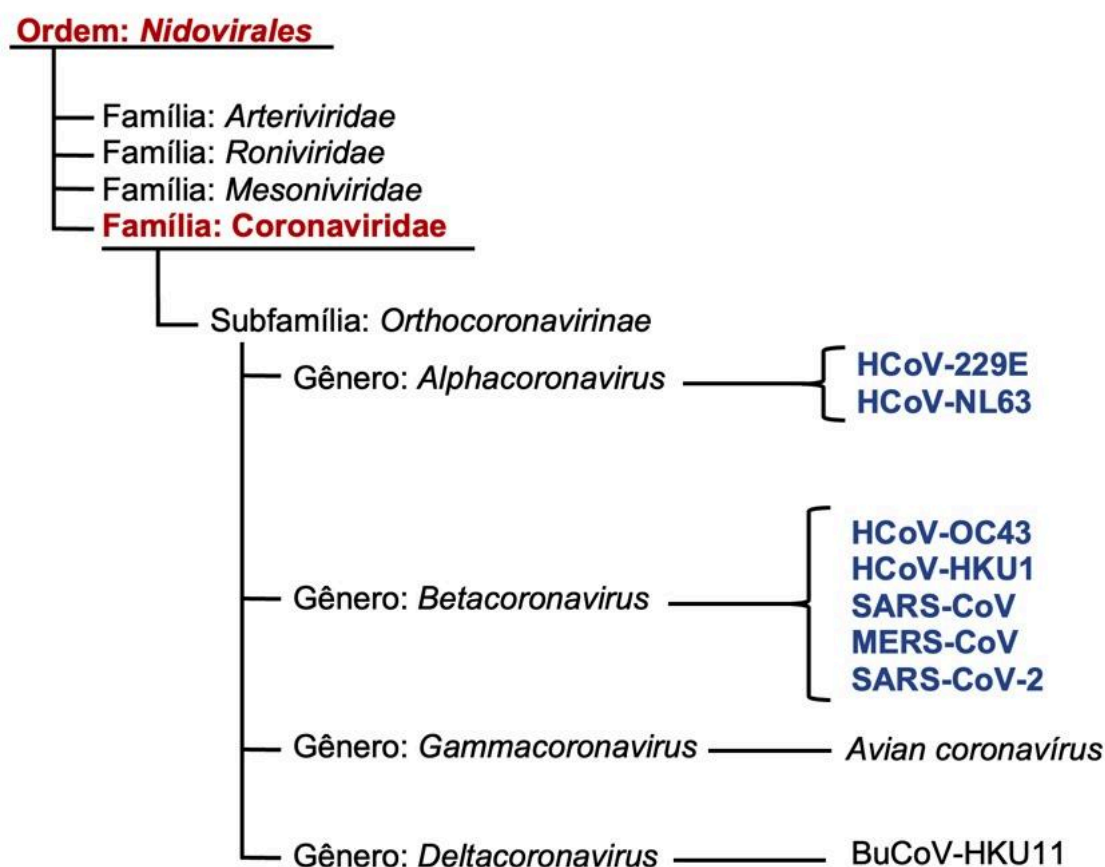


Figura 1. Esquema de classificação dos coronavírus.

Fonte: YAN *et al.*, 2020 (adaptado).

Na Arábia Saudita no ano de 2012, foram notificados os primeiros casos da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), causada pelo coronavírus zoonótico conhecido como MERS-CoV. Através de estudos filogenéticos, acredita-se que a origem da infecção tenha acontecido inicialmente em morcegos e posteriormente transmitida para dromedários, que foram os prováveis transmissores da infecção para os humanos. O contágio acontece por contato direto ou indireto

entre humanos e animais infectados e já foram relatados casos de infecção em dromedários em vários países da África, Oriente Médio e sul asiático. A infecção em humanos já foi relatada em 27 países desde 2012 e 858 mortes confirmadas por complicações da síndrome (WHO, [2015]; NASSAR *et al.*, 2018).

1.2 ORIGEM DO SARS-CoV-2

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que, em 31 de Dezembro de 2019, foi informada sobre os primeiros casos de um quadro de pneumonia grave de causa desconhecida na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China. (ZHU *et al.*, 2020; OPAS, 2020a).

Em 7 de Janeiro de 2020, foi confirmado pelas autoridades chinesas que se tratava de uma nova espécie de coronavírus e no dia 11 de Janeiro foi confirmada a primeira morte, de uma paciente de 61 anos. Com isso, em 30 de Janeiro de 2020, a OMS declarou que este novo surto identificado se tratava de uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), sinalizando a nível global um estado de alerta e a necessidade de uma cooperação internacional para conter a propagação deste novo vírus. (OPAS, 2020a).

O sequenciamento genômico das primeiras amostras mostrou que se tratava de um coronavírus que apresentava uma grande semelhança com o SARS-CoV causador da epidemia em 2002, sendo nomeado pela Comissão Internacional de Classificação Viral posteriormente como SARS-CoV-2. (GORBALENYA *et al.*, 2020).

O quadro de pneumonia e as manifestações clínicas advindas da infecção pelo SARS-CoV-2 receberam a denominação pela OMS de Doença do Coronavírus 2019 - COVID-19 (do inglês, *Coronavirus disease 2019*). (WHO, 2020a).

Com uma grande capacidade de transmissão e infectividade, o vírus se espalhou rapidamente globalmente, fazendo com que em 11 de março de 2020 a OMS elevasse a emergência de saúde pública em status de pandemia. (WHO, 2020b). No dia 11 de Janeiro de 2020, autoridades chinesas confirmaram a primeira morte provocada pelo SARS-CoV-2. (TAYLOR, 2021). Até Junho de 2024 em números acumulados já foram notificados pela OMS mais de 775 milhões de casos de infecções e mais de 7 milhões de mortes. (WHO, 2023a).

1.3 ESTRUTURA DO SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus (subgênero *Sarbecovirus*) pertencente à família *Coronaviridae* (subfamília *Orthocoronavirinae*). É um vírus de RNA de fita simples (ssRNA), polaridade positiva, esférico, envolto por um envelope que é constituído por uma camada dupla de lipídeos e proteínas estruturais e não estruturais (Nsps). (FERREIRA *et al.*, 2020b; OPAS, 2021a). O paciente zero infectado pelo SARS-CoV-2 foi identificado em 26 de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, se tornando a cepa de referência para os estudos posteriores (acesso do GenBank MN908947). (OPAS, 2021a).

O genoma do SARS-CoV-2 compartilha grandes semelhanças com o SARS-CoV e MERS-Cov. Ele tem 29.903 nucleotídeos (nt), 4 genes de proteínas estruturais (*S*, *E*, *M*, *N*), 11 genes de proteínas acessórias (*ORF3a*, *ORF3b*, *ORF3c*, *ORF3d*, *ORF6*, *ORF7a*, *ORF7b*, *ORF8*, *ORF9b*, *ORF9c*, e *ORF10*) e 16 genes de proteínas não estruturais (*Nsps 1-16*). (OPAS, 2021a; ZHU *et al.*, 2020). **(Figura 2)**.

As proteínas estruturais, *spike* (*S*), envelope (*E*), membrana (*M*) e nucleocapsídeo (*N*), e não estruturais (*Nsps*) em conjunto com o RNA viral facilitam a replicação do vírus dentro da célula hospedeira. (V'KOVSKI *et al.*, 2021).

A proteína de membrana *S* (~150 kDa) é extremamente importante no início do processo de infecção ao permitir a entrada do vírus dentro da célula hospedeira pela ligação ao receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2, do inglês: *angiotensin-converting enzyme 2*). (ARYA *et al.*, 2021). Grande parte das pesquisas sobre alvos terapêuticos para a fabricação de medicamentos e vacinas foram voltadas para entender o mecanismo de interação entre a proteína *S* e sua afinidade com o receptor celular ACE-2. Como se trata de uma proteína importante no processo de infecção pelo SARS-CoV-2, mutações nesse alvo são extremamente comuns e preocupantes. A proteína *S* é clivada em dois polipeptídeos, *S1* (envolvida no reconhecimento da célula hospedeira e na ligação a ela) e *S2* (envolvida na fusão da membrana e na entrada do vírus nas células) por uma protease do hospedeiro semelhante à furina. (ZHANG *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022).

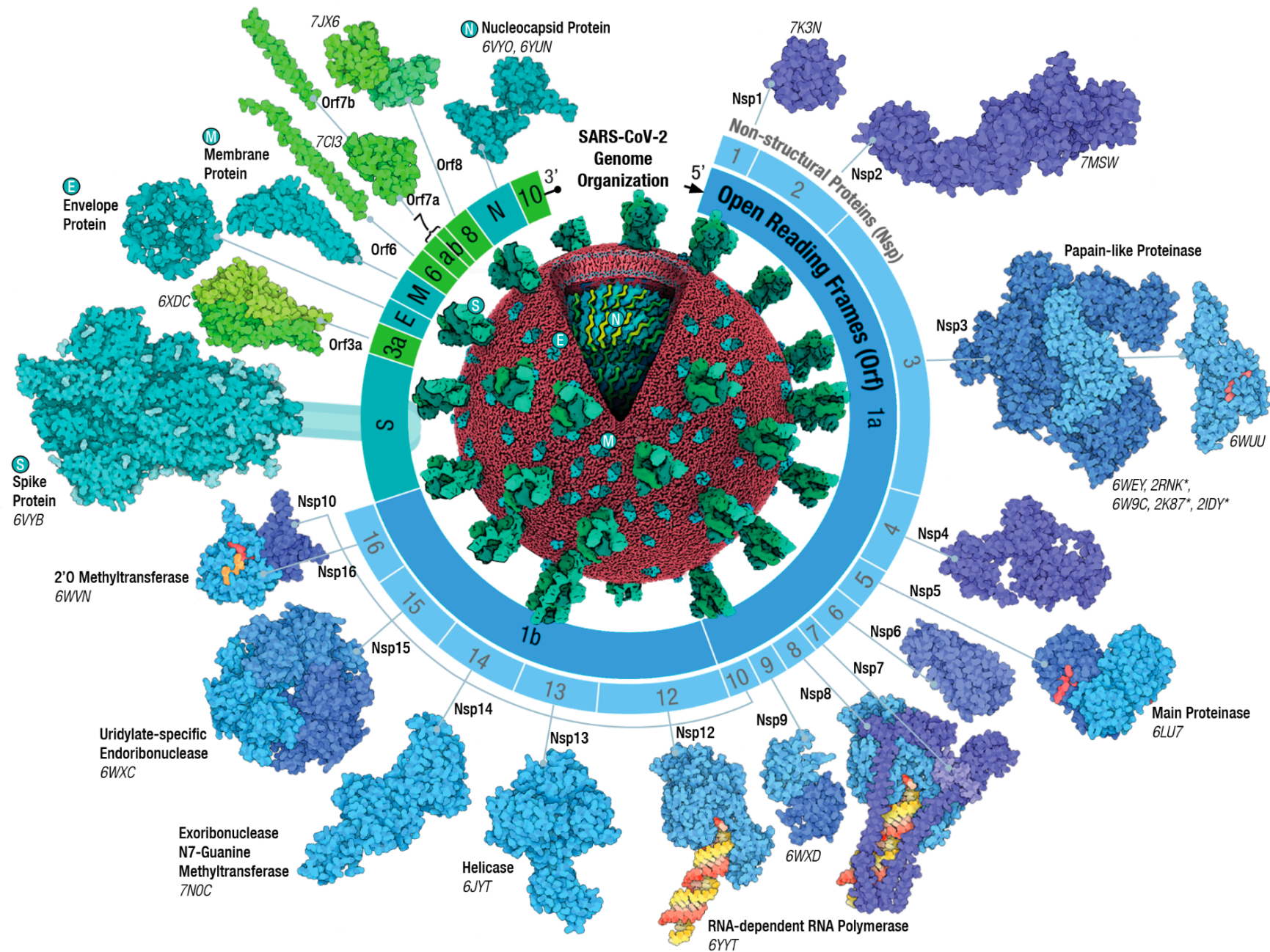


Figura 2. Genoma e proteínas associadas do SARS-CoV-2.

Fonte: LUBIN *et al.*, 2021 (adaptado).

A proteína M (~25-30 kDa) é uma glicoproteína transmembrana, sendo a mais abundante de todas as proteínas estruturais virais. (ARYA *et al.*, 2021). Apresenta três domínios principais: ecto-domínio N-terminal, endo-domínio C-terminal e as hélices transmembranares. (ARYA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

Através da sua interação com as outras proteínas estruturais, a proteína M desempenha um papel importante e central na montagem e morfogênese do vírus. (ARYA *et al.*, 2021).

A proteína do nucleocapsídeo (N), promove principalmente a ligação e o empacotamento do complexo RNA ribonucleoprotéico, sendo a única proteína que se liga ao genoma do SARS-CoV-2. É composta por dois domínios separados, um domínio N-terminal (NTD) e um domínio C-terminal (CTD). (KHAN *et al.*, 2021). Esta proteína possui a característica de ser mais semelhante estruturalmente com diferentes tipos de coronavírus se comparada com a proteína S. O desenvolvimento de uma nova vacina que ofereça proteção contra o SARS-CoV-2 utilizando a proteína N como um alvo poderia conferir proteção conjunta a outras espécies de coronavírus também. (CADDY, 2020).

A proteína de envelope (E), tem ~8-12 kDa e é a menor proteína estrutural, sendo incorporada ao envelope viral. (ARYA *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2021). Seu papel na invasão, replicação e liberação viral ainda não está totalmente esclarecido. Durante o processo de replicação viral, a proteína E é bastante produzida dentro de cada célula infectada e maior parte desta proteína está presente no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, locais de transporte intracelular e que contribui assim para a montagem e brotamento viral. Além disso, apresenta grande permeabilidade iônica, acreditando-se que ela desempenhe um papel importante no equilíbrio iônico e contribuindo assim para a patogenicidade viral. (CAO *et al.*, 2021).

1.4 CICLO REPLICATIVO DO SARS-CoV-2

Os CoVs precisam realizar a modulação da síntese de proteínas utilizando o mecanismo de tradução da célula hospedeira, conseguindo frear a tradução dos RNAs da célula hospedeira e estimular a produção das proteínas virais pela mesma (V'KOVSKI *et al.*, 2021).

O processo de infecção inicial da célula hospedeira pelo SARS-CoV-2 inicia-se com a ligação do domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor Binding Domain*) da proteína viral S com o receptor celular ACE-2, permitindo a interiorização do vírus na célula. (BRITO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021). **(Figura 3).** O tropismo do SARS-CoV-2 pelo receptor ACE-2 juntamente com a grande concentração deste receptor no tecido pulmonar é fator determinante para que as manifestações dos sintomas e as lesões afetem na sua grande maioria este sistema, porém outros tecidos, como o gastrointestinal, hepático e renal também apresentam concentrações consideráveis deste receptor e podem ser alvo da ação e consequências da infecção viral. (BRITO *et al.*, 2020).

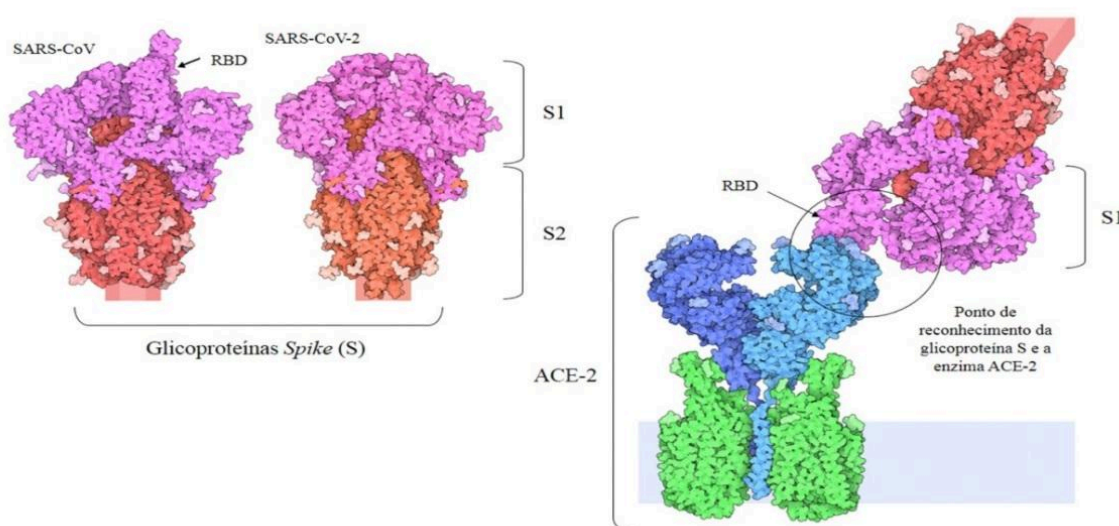


Figura 3. Interação molecular entre a glicoproteína S e o receptor ACE-2.
Fonte: CRUZ, LIMA, PEREIRA, 2021.

A proteína Serina Protease Transmembrana 2 (TMPRSS2, do inglês *Transmembrane Serine Protease 2*) também é importante no processo de infecção pelo SARS-CoV-2. Após a interação S-ACE2, a proteína S é clivada em duas subunidades: S1 (que se liga a ACE-2) e S2 que é clivada pela TMPRSS2. A clivagem ativa a subunidade S2 e promove a fusão entre a célula hospedeira e a estrutura viral. Estudos recentes demonstram que as células que apresentam expressão de TMPRSS2 apresentam uma ativação e penetração mais rápida e mais eficiente do SARS-CoV-2 se comparado em regiões de expressão de outras proteases que apresentam o mesmo papel. (NOBREGA *et al.*, 2022).

Regiões com alta expressão de ACE-2 e TMPRSS2 são portas de entrada para a infecção do SARS-CoV-2. Segundo estudo publicado por Sungnak e colaboradores (2020), as células caliciformes e ciliadas da região nasal apresentam altos índices de expressão de ACE-2 e TMPRSS2 quando comparadas a todas as demais células das vias aéreas. O papel importante destas estruturas na infecção e no processo de internalização do vírus sugere que estas células sejam as principais responsáveis no processo de infecção e transmissão do mesmo.

A TMPRSS2 apresenta uma expressão diferenciada em diversos órgãos, variando também durante a sua fase de desenvolvimento, a exemplo das altas taxas de transcrição no cérebro fetal quando comparada a expressão no cérebro adulto, já a transcrição no tecido pulmonar fetal se apresenta baixa quando comparado ao tecido pulmonar adulto. (THUNDERS; DELAHUNT, 2020). Além destes, o gene TMPRSS2 apresenta expressão diferenciada em outros órgãos, tais como fígado, coração, e trato gastrointestinal, órgãos que podem ser afetados pelo SARS-CoV-2 durante a infecção. (NOBREGA *et al.*, 2022).

A maioria das proteínas do genoma do SARS-CoV-2 são traduzidas a partir de duas regiões de leitura aberta (ORFs, *Open reading frame*) sobrepostas, ORF1a e ORF1b. **(Figura 4)**. Na sequência da infecção viral, o genoma de SARS-CoV-2 é liberado no citoplasma da célula hospedeira e se inicia a tradução das proteínas virais. A ORF1a codifica a poliproteína pp1a que posteriormente será clivada em 10 proteínas não-estruturais (NSP1-10) e a ORF1b codifica a poliproteína pp1ab, que será clivada nas 16 proteínas não estruturais. (ARYA *et al.*, 2021).

As proteínas estruturais S, E e M são direcionadas para um compartilhamento intermediário entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (ERGIC), onde os genomas virais são encapsulados pelas proteínas N e posteriormente associados a outras proteínas estruturais, formando os vírions. (V'KOVSKI *et al.*, 2021). Após as proteínas M, E e N se ligarem e a proteína S se incorporar, os vírions são transportados para a superfície da célula e liberados via exocitose. **(Figura 4)**.

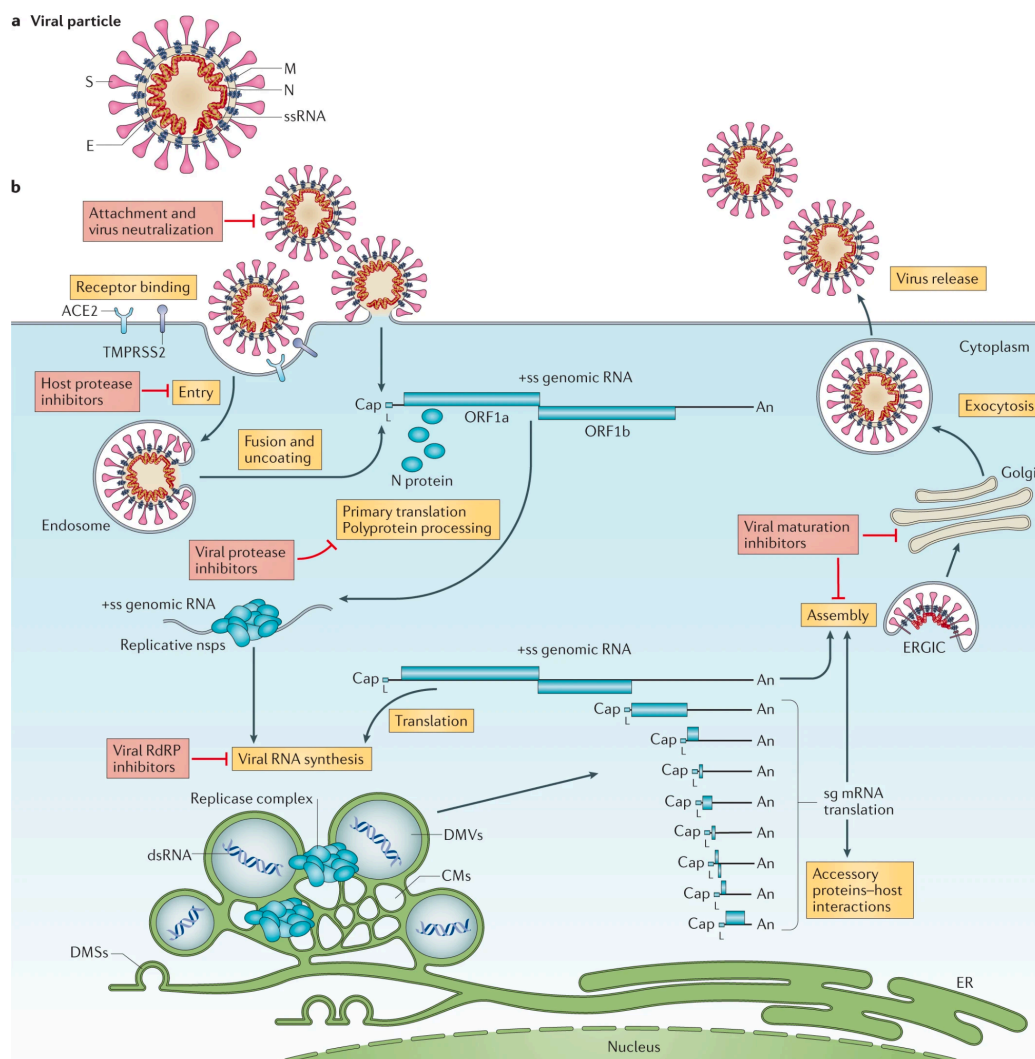


Figura 4. O ciclo replicativo do SARS-CoV-2.

Fonte: V'KOVSKI *et al.*, 2021.

1.5 VARIABILIDADE GENÔMICA

Os estudos com o genoma viral do SARS-CoV-2 permitiram a identificação de diversas linhagens detectadas em várias partes do mundo. Cada linhagem apresenta uma sequência de diferentes mutações definidoras distintas, distribuídas por todo o genoma do vírus. Isso está de acordo com o fato da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do SARS-CoV-2 ser a RNA polimerase viral conhecida mais rápida, com alta processividade, o que implica em baixa fidelidade. Apesar de todos os coronavírus possuírem mecanismos de correção de erros de replicação, eles não são suficientes para garantirem um processo livre de mutações. No SARS-CoV-2, as proteínas envolvidas no processo de correção são a NSP14 e

NSP10, auxiliadas pela NSP13 (STEINER *et al.*, 2024; DUFFY, 2018). Estas mutações podem impactar na infecciosidade, transmissibilidade viral, eficiência de replicação, bem como propriedades de virulência em diferentes partes do mundo. (KORBER *et al.*, 2020; PACHETTI *et al.*, 2020; PLANTE *et al.*, 2021). A história evolutiva do SARS-CoV-2 e suas variantes está demonstrado na **Figura 5**.

1.5.1 VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO (VOCs)

As diversas variantes do SARS-CoV-2 são classificadas de acordo com as mutações e ramificações evolutivas que possuem, analisando a sua transmissibilidade, patogenicidade e capacidade de escape da resposta imune. Essas variantes foram classificadas pela OMS como variantes de interesse (VOI - do inglês, *variant of interest*) e variantes de preocupação (VOC, do inglês *variant of concern*). (OPAS, 2021b).

As VOIs foram assim classificadas pela OMS por possuírem mutações que mudam o fenótipo do vírus em comparação com a variante original e serem identificadas como causadoras de transmissão comunitária, de múltiplos casos ou terem sido detectadas em vários países. São exemplos de VOIs classificadas pela OMS: Epsilon (B.1.427), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1). Atualmente, as VOIs são referidas pelos sistemas de nomenclatura científica estabelecidos, como os utilizados pelas iniciativas Nextstrain e Pango, com por exemplo: XBB.1.5/23A. (OPAS, 2023b). As VOIs foram monitoradas pelo Grupo de Trabalho de Evolução do Vírus SARS-CoV-2 da OMS e em 2024, a OMS criou o *WHO Coronavirus Network* (CoViNet). (OPAS, 2021b, 2024).

As VOCs apresentam uma mutação ou um pacote de mutações específicas capazes de provocar um aumento na transmissibilidade e/ou aumento da virulência e/ou diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis, por isso são as variantes que mais demandam atenção e monitoramento pela comunidade científica mundial devido a sua importância. (CHOI, SMITH, 2021). São exemplos de variantes classificadas pela OMS como de preocupação Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (B.1.1.28.1 também conhecida como P.1), Delta (B.1.617.2) e mais recentemente a Ômicron (B.1.1.529) e suas sublinhagens e recombinações. (OPAS, 2021b; CHOI, SMITH, 2021).

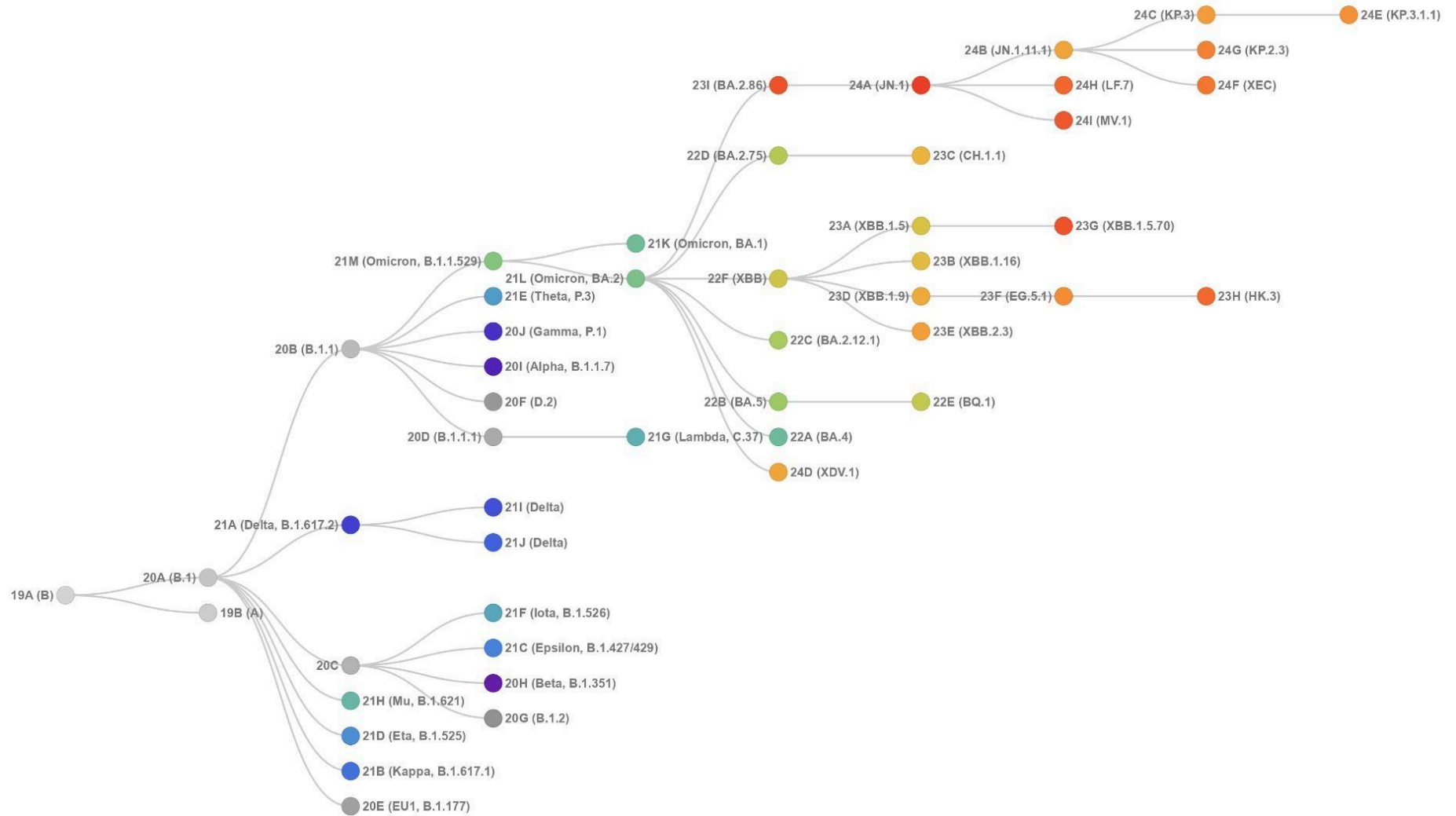


Figura 5. Filogenia das variantes do SARS-CoV-2.

Fonte: HADFIELD *et al.*, 2018.

A classificação dada pela OMS às variantes é dinâmica, usando os critérios de características genômicas e do impacto epidemiológico regional ou global. (WHO, 2023b).

Desde o início da pandemia, a OMS e sua rede de especialistas internacionais vem monitorando todas as mutações que surgiram derivadas da cepa original para traçar metas e mudanças necessárias para evitar a propagação e danos maiores diante da pandemia. (OPAS, 2021a,b).

As variantes de preocupação do SARS-CoV-2 e suas principais características podem ser verificadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Variantes de preocupação do SARS-CoV-2.

VOCS previamente circulantes						
OMS	clado Nextrain	linhagem Pango	clado GISAID	Primeira detecção	Primeiras amostras documentadas	Mutações características
Alfa	20J/501Y.V1	B.1.1.7	GRY GR/501Y.V1	Reino Unido	Set 2020	ORF1ab: del3675/3677 S:del69/70, del144/145, N501Y, A570D, P681H
Beta	20H/501Y.V2	B.1.351	GH/501Y.V2	África do Sul	Maio 2020	ORF1ab: del3675/3677 S: K417N, E484K, N501Y
Gama	20J/501Y.V3	B.1.1.28.1 conhecida como P.1	GR/501Y.V3	Brasil e Japão	Nov 2020	ORF1ab: del3675/3677 S: K417T, E484K, N501Y
Delta	21A/S:478K	B.1.617.2	G/478 KV1	Índia	Out 2020	S: del157/158, L452R, T478K, P681R
VOC atualmente em circulação						
Ômicron	21K/L/M 22A/C/D/E/F 23A	B.1.1.529	GR/484A	Botswana / Hong Kong / África do Sul	Nov 2021	> 37 mutações definidoras em S e 310 sublinhagens da linhagem original.

Fonte: MICHELON, 2021. (adaptado).

1.5.1.1 Variante Alfa (B.1.1.7)

No dia 14 de novembro de 2020 o departamento do Conselho de Estado do Reino Unido notificou a OMS a detecção de uma nova variante no país graças ao seu sistema de vigilância chamado *COVID-19 Genomics UK Consortium*. (WISE, 2020; UK, 2020a). Esta variante apresentou um aumento na transmissibilidade viral quando comparada às demais variantes identificadas anteriormente, isso porque as

mutações presentes nesta variante permitiram uma maior afinidade do SARS-CoV-2 com o receptor ACE-2. Posteriormente esta variante recebeu o nome de Alfa (linhagem Pango B.1.1.7) e foi designada como a primeira variante de preocupação do SARS-CoV-2 em 18 de dezembro de 2020 pela *Public Health England*. (UK, 2020b).

Em dezembro de 2020 houve a primeira identificação da linhagem no Brasil, e nesse mesmo período foi constatado que a mesma se tornava a linhagem dominante no Reino Unido. (MICHELON, 2021).

Comparando com a cepa de referência identificada do SARS-CoV-2, na cidade de Wuhan, a variante Alfa apresenta 17 mutações definidoras, incluindo 8 presentes na proteína S. Um exemplo de mutação importante é a substituição do aminoácido asparagina pela tirosina na posição 501 do RBD da proteína S, conhecida como N501Y. Esta pequena alteração que dá origem a mutação aumenta em sete vezes a afinidade do vírus com o receptor celular ACE-2. (LEUNG *et al.*, 2020; SANTOS, PASSOS, 2021). Isso provoca um impacto muito grande na capacidade de infectividade do vírus.

A variante alfa também apresenta algumas deleções como S:del69/70 e S:Y144del que geram a perda de aminoácidos no domínio N-terminal (NTD) da proteína S, que é um sítio de ligação de anticorpos neutralizantes. (UK, 2020b).

A deleção S:del69/70 contribuiu para o escape viral da resposta imunológica e afeta na sensibilidade de kits diagnósticos cujas sondas ou primers se anelem a esta região, gerando assim resultados falso-negativos. Esta falha no diagnóstico afeta também outras variantes que apresentam essa deleção na proteína S, como as subvariantes da Ômicron (BA.1, BA.4, BA.5 e BQ.1). (TERMOFISHER SCIENTIFIC, 2022; UK, 2020b). Mutações na proteína *spike* são preocupantes pois além de fornecer escapes imunológicos e uma vantagem de aptidão, contribui também para uma maior frequência de disseminação e virulência potencialmente alterada. (LAHA *et al.*, 2020).

1.5.1.2 Variante Beta (B.1.351)

A variante Beta (linhagem Pango B.1.351) foi identificada no início de outubro de 2020 inicialmente no município metropolitano Nelson Mandela Bay, localizada na costa da província do Cabo Oriental, na África do Sul. Em um curto período de

tempo, a variante tornou-se dominante na região. (TEGALLY *et al.*, 2021; MICHELON, 2021).

A variante Beta carrega quinze mutações pontuais não sinônimas e duas deleções. Sete destas mutações pontuais (S:D80A, S:D215G, S:K417N, S:E484K, S:N501Y, S:D614G, S:A701V) e uma deleção (del241/243) estão localizadas na proteína S. As demais estão localizadas nas regiões ORF1a (T265I, K1655N, K3353R, del3675/3677), ORF1b (P314L), ORF3a (Q57H), proteína E (P71L) e proteína N (T205I). As mutações K417N, E484K e N501Y são as mais importantes da variante B.1.351 pois aumentam a afinidade de ligação do vírus com o receptor ACE-2 e contribuem para um aumento do escape imunológico e resistência à neutralização por anticorpos. (TEGALLY *et al.*, 2021; MICHELON, 2021).

1.5.1.3 Variante Gama (B.1.1.28.1 ou P.1)

A variante Gama (linhagem Pango B.1.1.28.1 ou P.1) foi relatada à OMS em janeiro de 2021 pelas autoridades sanitárias do Japão após sua identificação em japoneses regressando ao país após viagem para a região amazônica. A cidade de Manaus, no estado do Amazonas, local onde esses viajantes estiveram em janeiro de 2021, identificou que 91% das amostras coletadas nesse período se tratavam da nova variante identificada pelas autoridades japonesas. Isso sugere transmissão local, que posteriormente se espalhou para outros estados brasileiros. Segundo o Boletim epidemiológico semanal da OMS, em 20 de abril de 2021, mais de 52 países já haviam notificado a presença da variante gama nas amostras coletadas. (WHO, 2021a).

A variante Gama apresenta 23 mutações não sinônimas, sendo 12 destas na proteína S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I e V1176F) e o restante distribuídas nas regiões ORF1ab (8), ORF8 (2) e proteína N (1). (FARIA *et al.*, 2021; WHO, 2021a). A variante gama compartilha com as variantes alfa e beta a mesma mutação N501Y, com um diferencial de três mutações na região RBD da proteína S: K417T, T20N, P681H. (FARIA *et al.*, 2021).

Com a introdução da variante Gama, houve um aumento dos casos graves e mortes por COVID-19 entre jovens e mulheres e crescimento na taxa de mortalidade em ambos os sexos de pessoas de 20 a 59 anos hospitalizadas. (FREITAS *et al.*, 2021; NAVECA *et al.*, 2021). Isso provocou um colapso do sistema

de saúde no estado, com aumento das internações, falta de equipamentos hospitalares, oxigênio hospitalar, sobrecarga de trabalho e afastamentos dos profissionais de saúde. (NAVECA *et al.*, 2021).

1.5.1.4 Variante Delta (B.1.617.2)

A variante Delta (linhagem Pango B.1.617.2) foi relatada inicialmente durante a segunda onda de infecções no estado indiano de Maharashtra em outubro de 2020 (MICHELON *et al.*, 2021) e elevada ao status de VOC pela OMS em 11 de maio de 2021. (WHO, 2023b).

Essa variante se mostrou mais transmissível que as variantes anteriormente identificadas. Isso se deve a uma melhoria da eficiência na invasão celular através de substituições de aminoácidos em regiões importantes e estratégicas para o vírus, como S:L452R e S:T478K na região RBD; S:P681R na região de clivagem S1/S2; S:T19R e S:157-158del na região NTD. (MICHELON *et al.*, 2021).

Estas mutações parecem ser responsáveis por aprimorar a capacidade de replicação viral tornando-o mais infectivo. Segundo estudo publicado por Li *et.* (2022), os pacientes infectados com a variante Delta apresentavam uma carga viral 1.000 vezes maior que os pacientes infectados com a versão original do SARS-CoV-2 identificada em 2019 em Wuhan. Além disso, a variante trouxe uma preocupação no processo de vacinação já que apresentou um grau de resistência à neutralização utilizando soro de indivíduos vacinados com as vacinas disponíveis na época. (DHAWAN *et al.*, 2022).

1.5.1.5 Variante Ômicron (B.1.1.529)

Os primeiros casos de infecção pela variante Ômicron (linhagem Pango B.1.1.529) foram detectados na África do Sul em novembro de 2021 após o aumento de casos de COVID-19. (VIANA *et al.*, 2022; WHO, 2021b). Em 26 de novembro do mesmo ano, a OMS declarou a variante Ômicron como uma VOC. (WHO, 2021b).

A Ômicron apresenta diversas subvariantes, sendo as principais BA.1 (ou B.1.1.529.1), BA.2 (ou B.1.1.529.2), BA.4 (ou B.1.1.529.4), BA.5 (ou B.1.1.529.5),

BA.2.12.1, BA.2.75, BQ1, XBB, XBB1.5 FE.1, JD.1 e JN.1+BA.2.86. (KHARE *et al.*, 2021).

A linhagem inicial da Ômicron apresenta 15 mutações na região RBD; fazendo um comparativo com a linhagem ancestral de Wuhan; que são consideradas mutações definidoras de linhagem, sendo estas G339D, N440K, S477N, T478K, N501Y, K417N, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, H655Y, N679K e P681H. (VIANA *et al.*, 2022).

A G339D, N440K, S477N, T478K e N501Y demonstraram a capacidade de melhorar a ligação do vírus com o receptor ACE-2. (STARR *et al.*, 2022). Enquanto a K417N, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R e N501Y foram associadas a capacidade de escape de pelo menos três das quatro classes dos principais anticorpos neutralizantes contra o domínio RBD. (GREANEY *et al.*, 2021).

Estas mutações no RBD associadas a algumas mutações, deleções e inserções no domínio N-terminal, estão relacionadas com a redução da sensibilidade dessa variante à neutralização por anticorpos vacinais ou de infecções anteriores (PLANAS *et al.*, 2022; HONG *et al.*, 2022). Já o conjunto de mutações H655Y, N679K e P681H estão relacionadas ao aumento da transmissibilidade do vírus ao aumentar a clivagem e fusão da proteína S durante a adsorção à célula hospedeira. A mutação S:P681H está presente em todas as subvariantes da Ômicron, uma região bem próxima da mutação S:P681R presente na variante Delta, possibilitando um resultado falso positivo em ensaios de genotipagem para esta variante. **(Tabela 2).**

Desde a primeira detecção da variante Ômicron (B.1.1.529+BA.*) até o dia 28 de junho de 2024, 215 países já compartilharam 9.271.529 sequências do genoma da Ômicron no GISAID (do inglês, *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*). No Brasil esse número chega a 128.028 sequências (KHARE *et al.*, 2021, acesso em 28 jun. 2024).

O Brasil apresenta um dos piores índices no acompanhamento genômico das variantes segundo dados de sequenciamento do projeto *Our World in Data* da Universidade de Oxford. Desde o período que a variante Ômicron vem sendo acompanhada, a maior porcentagem dos casos confirmados de SARS-CoV-2 que foram sequenciados no Brasil foi de 5% em 3 de janeiro de 2022, atrás da Alemanha com 25,6%, Itália com 22,4%, França com 19%, Estados Unidos com 14,4% e Índia com 8,9%. (ROSER *et al.*, 2021, acesso em 3 jan. 2022).

[illegible]

<i>S:D614G</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:H655Y</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:N679K</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:P681H</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:N764K</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:D796Y</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:Q954H</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S:N969K</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Mutações exclusivas									
<i>S:K147E</i>	-	-	-	-	-	Positivo	-	-	-
<i>S:W152R</i>	-	-	-	-	-	Positivo	-	-	-
<i>S:I210V</i>	-	-	-	-	-	Positivo	-	-	-
<i>S:G257S</i>	-	-	-	-	-	Positivo	-	-	-
<i>S:K444T</i>	-	-	-	-	-	-	Positivo	-	-
<i>S:G252V</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	Positivo
<i>S:S704L</i>	-	-	-	-	Positivo	-	-	-	-
<i>S:A67V</i>	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: CoVariants.org

1.6 HISTÓRIA DA PANDEMIA NO BRASIL

O primeiro caso de infecção pelo SARS-CoV-2 no Brasil e na América Latina foi notificado no dia 26 de fevereiro de 2020 no estado de São Paulo (OPAS, 2020b; BRASIL, 2020a; JESUS *et al.*, 2020) e alguns dias depois, no dia 12 de março do mesmo ano foi confirmada a primeira morte relacionada a COVID-19 em uma paciente de 57 anos que havia sido internada no dia anterior em um hospital da Zona Leste da cidade de São Paulo. (BRASIL, 2020a).

O Ministério da Saúde declarou os casos de infecções posteriores como um surto de transmissão comunitária em larga escala após todos os estados brasileiros confirmarem casos de infecção depois da confirmação do primeiro caso no país. (BRASIL, 2020b). Até Julho de 2024 já foram notificados quase 39 milhões de casos confirmados e mais de 712 mil mortes pela COVID-19 no país. (BRASIL, 2020c).

As variantes Alfa e Beta foram as primeiras VOCs identificadas e classificadas pela OMS, tendo os primeiros casos sequenciados no país em dezembro de 2020 e abril de 2021, respectivamente. (KHARE *et al.*, 2021). Estas duas variantes não apresentaram números de infecção e disseminação importantes quando comparados às demais VOCs e não foram capazes de alterar significativamente o cenário epidemiológico do país. (BRASIL, 2023).

Diferentemente, a VOC Gamma foi identificada em Janeiro de 2021 no Japão através de amostras de turistas que estiveram em Manaus em novembro do mesmo ano e no período de 2 meses após a sua identificação já assumiu o domínio das amostras sequenciadas no país. (GIOVANETTI *et al.*, 2022a). As mutações encontradas na variante Gamma foram responsáveis pela formação de uma variante com alta transmissibilidade, uma maior evasão da defesa imunológica do hospedeiro e casos de reinfeção pelo SARS-CoV-2, trazendo como consequência uma segunda onda epidêmica de COVID-19 no Brasil que colocou o país no epicentro mundial dos casos de infecção no período. (GIOVANETTI *et al.*, 2022a; NAVECA *et al.*, 2021).

Em Junho de 2021, houve a introdução da quarta VOC que recebeu o nome de Delta e substituiu a VOC Gamma no domínio das sequências em agosto do mesmo ano. Diferente do que foi visto em outros países, a Delta não levou ao aumento do número de casos e mortes notificados no Brasil. Acredita-se que em parte isso se deve ao avanço bem sucedido do processo de vacinação na época e a

imunidade adquirida pela população em infecções anteriores. (GIOVANETTI *et al.*, 2022b).

A variante Ômicron foi o último grupo de variantes classificadas pela OMS como VOCs. No Brasil, o primeiro caso foi confirmado em 30 de novembro de 2021 na cidade de São Paulo (SÃO PAULO, 2021) e esta variante foi responsável pelo maior pico de casos de COVID-19 já registrados no país. Embora a Ômicron apresentasse uma alta taxa de transmissibilidade, a maioria dos casos registrados de infecção apresentaram-se com sintomas leves e sem grandes complicações. (BRASIL, 2023; SILVA *et al.*, 2022). Em janeiro de 2022, a Ômicron já era identificada em mais de 98% das sequências registradas nas amostras brasileiras. (KHARE *et al.*, 2021).

Com a evolução da Ômicron no mundo, a mesma começou a originar diversas linhagens descendentes e recombinações. Com o grande domínio das sublinhagens da Ômicron nos casos registrados no país, as variantes Alfa, Beta, Gamma, Delta e a linhagem parental Ômicron (B.1.1.529) deixaram de apresentar relevância epidemiológica, sendo estão rebaixadas a VOCs previamente circulantes. (WHO, 2023b; BRASIL, 2023).

A evolução da circulação das diferentes variantes e linhagens do SARS-CoV-2 ao longo do tempo no Brasil encontram-se na **Figura 6**.

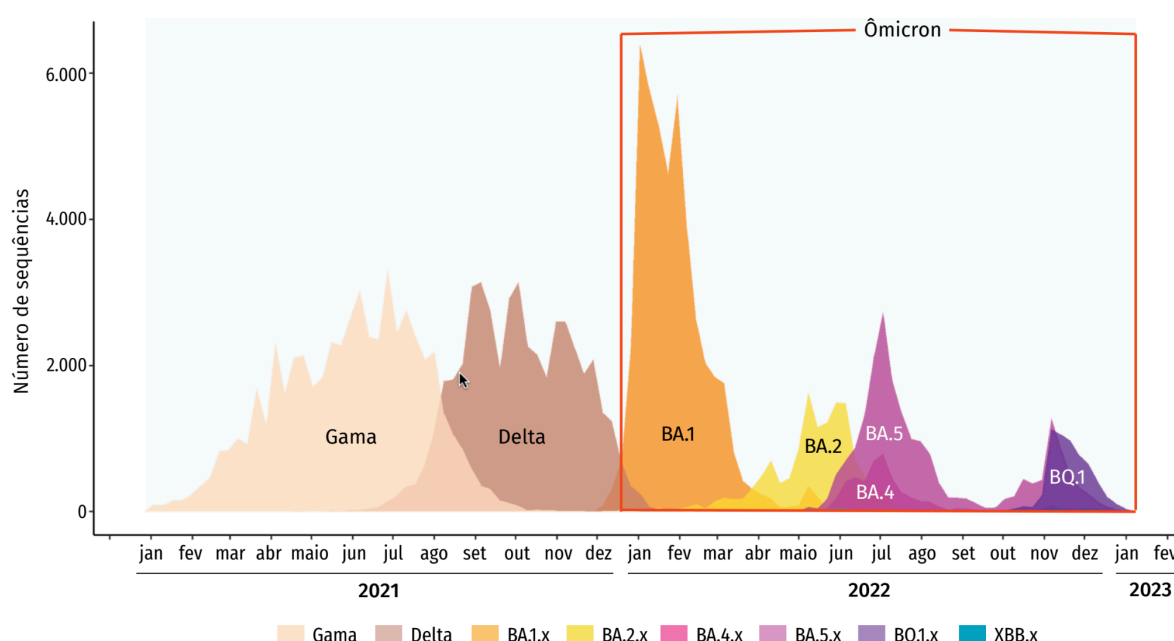


Figura 6. Circulação das variantes do SARS-CoV-2 ao longo do tempo no Brasil, por número de sequências e data de coleta da amostra depositadas no GISAID.

Fonte: BRASIL, 2023.

A Ômicron foi a VOC mais divergente de todas que surgiram, com alta transmissibilidade, uma frequência de transmissão diferente, várias mutações, inúmeras sublinhagens, porém nem todas com relevância epidemiológica. Diante disso, a OMS criou uma categoria de monitoramento própria denominada “Linhagens da VOC Ômicron sob monitoramento”, com o objetivo de monitorar e classificar as sublinhagens Ômicron de maneira independente e sinalizar quais sublinhagens da Ômicron pudessem apresentar alguma ameaça adicional à saúde pública mundial. (BRASIL, 2023).

A distribuição da frequência das principais linhagens de SARS-CoV-2 por período pode ser conferido na **Figura 7**.

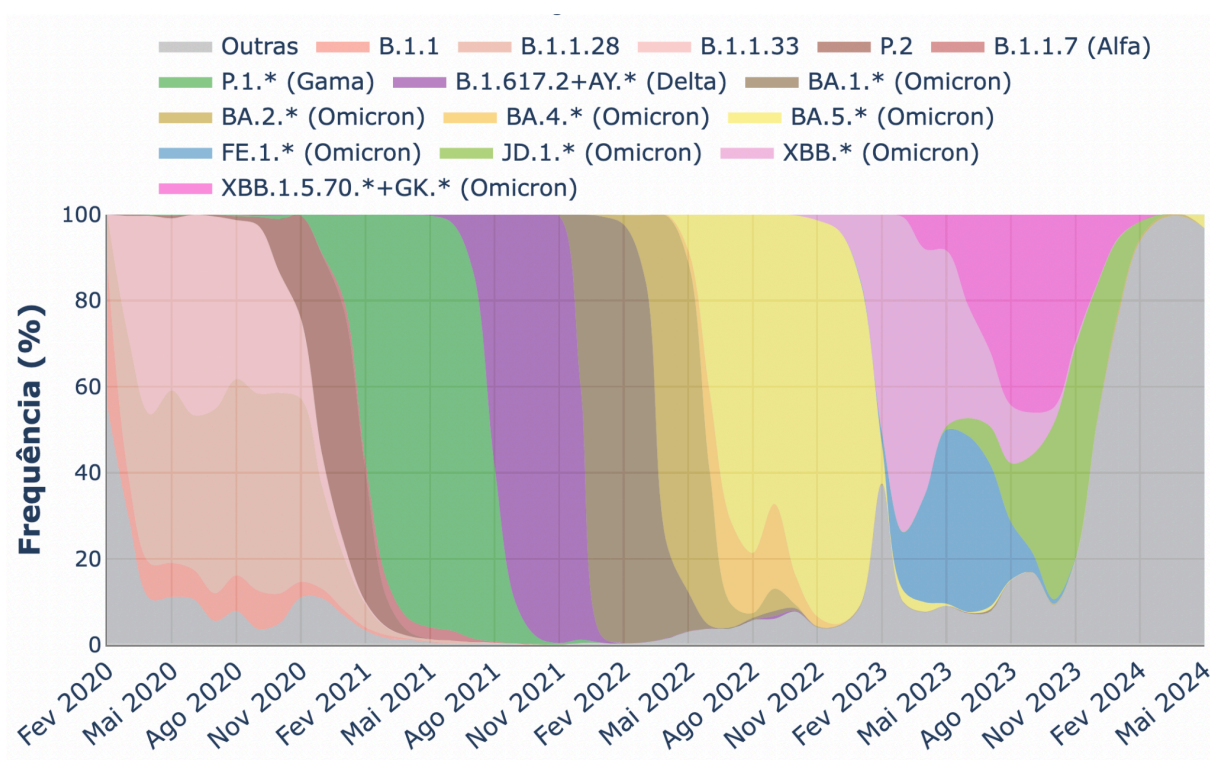


Figura 7. Distribuição da frequência das principais linhagens de SARS-CoV-2 circulantes no Brasil entre fevereiro de 2020 a maio de 2024, segundo genomas sequenciados e depositados no GISAID.

Fonte: REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2023.

Para frear a disseminação do vírus, assim como outros países, o Brasil investiu em vacinação. A campanha de vacinação nacional contra a COVID-19 começou oficialmente no dia 17 de janeiro de 2021, utilizando a vacina CoronaVac (vírus inativado). Essa vacina foi desenvolvida pela empresa biofarmacêutica chinesa Sinovac Biotech e produzida no Brasil pelo Instituto Butantan. Em seguida, outras vacinas produzidas por outros laboratórios foram incorporadas ao plano

nacional de vacinação, como a Oxford/Covishield (vetor de adenovírus recombinante) desenvolvida pela farmacêutica AstraZeneca e produzida no Brasil pela Fiocruz; Comirnaty (RNA mensageiro sintético) produzida pela farmacêutica Pfizer e Janssen Vaccine (vetor de adenovírus sorotipo 26 - Ad26) produzida pela farmacêutica Janssen-Cilag . (BRASIL, 2021).

Segundo dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (2024) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no primeiro trimestre de 2023, cerca de 188,3 milhões de pessoas acima de 5 anos de idade haviam recebido pelo menos a primeira dose da vacina contra a COVID-19. Este dado representa cerca de 93,9% desta população. A região brasileira com a maior proporção de vacinados com a primeira dose foi a região Sudeste, seguida pelas regiões Nordeste (94%); Sul (93,1%); Centro-Oeste (91,0%); e Norte (88,2%). Segundo dados do Ministério da Saúde até o dia 16 de julho de 2024 já foram aplicadas cerca de 520,2 milhões de doses no país. (IBGE, 2024).

No dia 5 de maio de 2023, a OMS retirou o status da COVID-19 como uma emergência de saúde pública de interesse internacional, declarando oficialmente o fim da pandemia. Isso foi possível graças ao controle do número de casos de infecção e mortes provocadas pela doença e pelo sucesso e alta cobertura vacinal nos países. (OPAS, 2023a).

1.6.1 História da pandemia no estado do Rio Grande do Sul

O primeiro caso de infecção pelo SARS-CoV-2 no Estado do Rio Grande do Sul (RS) foi confirmado laboratorialmente pela Secretaria Estadual de Saúde (SES) em 10 de março de 2020. Se tratava de um paciente do sexo masculino, 60 anos, com histórico de viagem recente a cidade de Milão, na Itália entre os dias 16 e 23 de fevereiro. (RIO GRANDE DO SUL, 2020a). Em 24 de março de 2020, houve a notificação da primeira morte causada pela COVID-19 em um hospital na cidade de Porto Alegre após 6 dias de internação. (RIO GRANDE DO SUL, 2020b).

A SES notificou que ao término da semana epidemiológica número 17, no dia 25 de abril de 2020, o estado havia superado a marca de 1.286 casos confirmados de infecção pelo SARS-CoV-2 e 43 óbitos (RIO GRANDE DO SUL, 2020c) e ao término da semana epidemiológica número 29, no dia 22 de Julho do mesmo ano, foram 5.798 casos confirmados e 1.256 óbitos. Ao final da semana epidemiológica

29 a taxa de letalidade hospitalar do estado havia chegado a marca de 29% (RIO GRANDE DO SUL, 2020d). Atualmente, em julho de 2024, o número acumulado de pessoas infectadas superou a marca de 3,1 milhões de casos e quase 43 mil óbitos no estado. (BRASIL, 2020c).

O primeiro caso notificado da variante P.1 (Gama) no RS veio de uma amostra coletada em 14 de janeiro de 2021, na cidade turística de Gramado de um paciente sem histórico de viagens. (RIO GRANDE DO SUL, 2021a). Segundo estudo publicado por Salvato e colaboradores (2021), no início de fevereiro do mesmo ano já havia relatos de transmissão comunitária da variante P.1 na cidade de Gramado.

A variante P.1 surgiu com uma alta frequência de casos e se espalhou rapidamente do Norte do Brasil para outros estados. Com o colapso na Saúde Pública no estado do Amazonas após a rápida disseminação da VOC P.1, alguns pacientes tiveram que ser transferidos para outros estados para continuarem a sua assistência de saúde. Três destes pacientes foram transferidos para o estado do Rio Grande do Sul no mês de fevereiro de 2020, porém na análise filogenética originada destes pacientes as sequências foram agrupadas em ramos diferentes da filogenia P.1, sugerindo cadeias de transmissão distintas e transmissão local na cidade de Gramado. (RIO GRANDE DO SUL, 2021a; SALVATO *et al.*, 2021).

No RS, houve a descrição pela primeira vez da mutação D614G na linhagem P.1. Anteriormente, esta mutação só havia sido descrita em 6 sequências de outras linhagens na Ásia (A.24), América do Norte (B.12) e Europa (B.1.1.7). Esta mutação havia sido descrita em 10% das sequências globais em março de 2020, e de 1 de abril a 18 de maio de 2020 já estava presente em 78% das sequências. Esta rápida disseminação desta mutação globalmente pode estar relacionada a uma vantagem na eficiência de replicação, aumentando a probabilidade de transmissão. (DEMOLINER *et al.*, 2021).

Os dois primeiros casos da variante Delta (B.1.1.617.2) no RS foram confirmados no dia 9 de Julho de 2021 e assim como a variante P.1 também pertenciam à cidade de Gramado. O primeiro caso foi confirmado por sequenciamento completo pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro e o segundo caso foi confirmado por sequenciamento parcial pelo Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). Os dois pacientes eram próximos (vínculo epidemiológico) e não

possuíam histórico de viagem para outro estado ou viagem internacional. (RIO GRANDE DO SUL, 2021b).

A variante Ômicron (B.1.1.529) teve seu primeiro caso confirmado pelo CEVS no dia 03 de dezembro de 2021, se tratando de uma mulher residente no município de Santa Cruz do Sul com histórico prévio de viagem à África do Sul. (RIO GRANDE DO SUL, 2021c). Após a identificação da cepa original, várias sublinhagens da Ômicron no estado foram sequenciadas, identificadas e tiveram suas sequências depositadas no GISAID, sendo as mais relevantes a BA.1 (outubro/2021), BA.2 (fevereiro/2022); BA.2.12.1 (maio/2022), BA.4 (maio/2022), BA.5 (maio/2022), XBB (novembro/2022) e FE.1 (janeiro/2022). (KHARE *et al.*, 2021).

No primeiro semestre de 2022, foram identificadas no RS alguns casos de uma cepa recombinante XQ (unindo o genoma de duas variantes BA.1 e BA.2). Anteriormente a mesma só havia sido detectada em casos isolados em outros estados, porém as amostras analisadas do estado entre os meses de março e maio pela FIOCRUZ sugeriram uma transmissão local desta cepa pela primeira vez, devido a indicação de um cluster de transmissão. (RIO GRANDE DO SUL, 2021d).

A frequência das linhagens relevantes no estado do Rio Grande do Sul está presente na **Figura 8**.

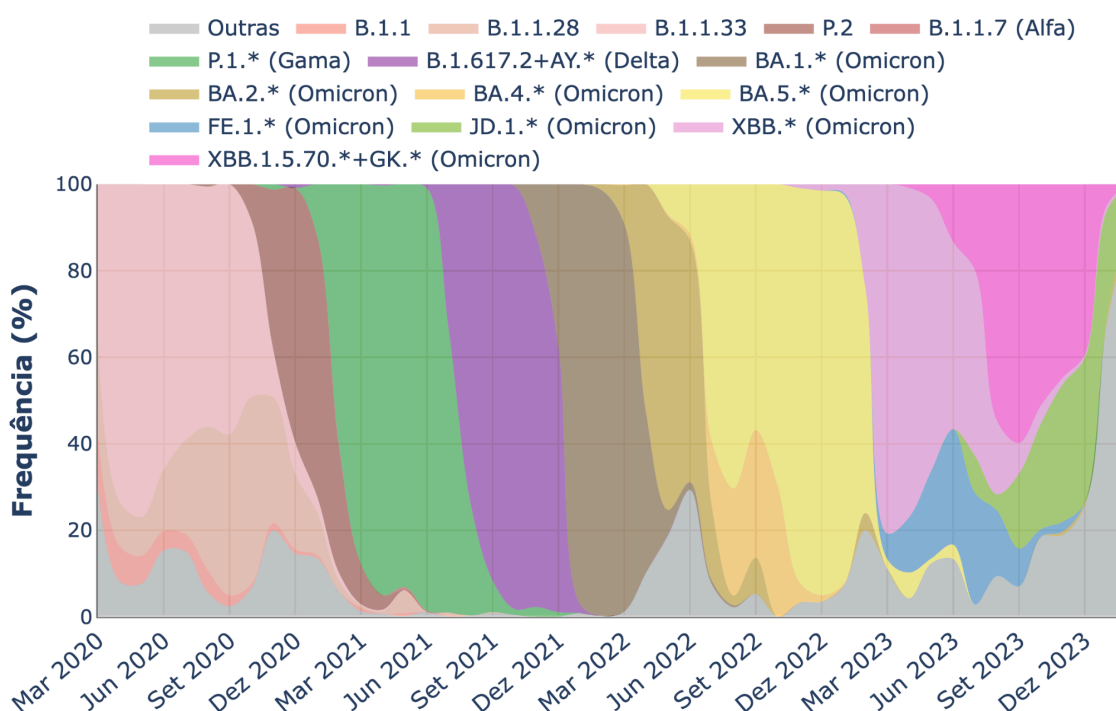


Figura 8. Frequência das linhagens relevantes em circulação do estado do Rio Grande do Sul entre março de 2020 a dezembro de 2023.

Fonte: REDE GENÔMICA FIOCRUZ. 2023.

Em Janeiro de 2022, a Ômicron já se estabelecia como a VOC dominante no país e no Estado. (BRASIL, 2023). Ao final de janeiro do mesmo ano, aproximadamente 75% da população gaúcha já havia recebido pelo menos a primeira dose da vacina contra a COVID-19, fato este que em conjunto com as infecções prévias da população pode ter contribuído para amenizar o impacto da Ômicron no país e no Estado. (RIO GRANDE DO SUL, 2021e).

1.7 TRIAGEM E VIGILÂNCIA GENÔMICA

Desde os primeiros casos identificados, o SARS-CoV-2 se mostrou como um vírus com uma alta capacidade de mutações, promovendo uma sequência de alterações fenotípicas que dificultaram algumas medidas de enfrentamento e controle da infecção, sendo extremamente necessários e importantes os sistemas de vigilância genômica para o monitoramento e acompanhamento da evolução viral. (BAKER *et al.*, 2021). Com isso, tanto a identificação do SARS-CoV-2 como agente etiológico da COVID-19 (ZHU *et al.*, 2020), e posteriormente o monitoramento da evolução viral foi possível graças ao sequenciamento do genoma viral de amostras colhidas em várias regiões do mundo durante todo o período pandêmico, permitindo a reconstrução filogenética e identificação das variantes que surgiram desde a identificação e classificação da primeira sequência identificada no paciente zero em 2019. (LAURING; HODCROFT, 2021; ZIEGLER *et al.*, 2020).

A realização do monitoramento e da vigilância genômica é extremamente importante em todos os cenários da evolução de qualquer infecção de caráter transmissível. Através dele é possível fazer novas descobertas, traçar metas e medidas que evitem um maior agravamento do quadro epidêmico, controle do número de infectados, mortes, possibilidade de tratamento e o controle do desenvolvimento de uma pandemia. Quanto maior a circulação viral, maiores as chances de surgimento de novas variantes. Essas diversas linhagens que surgem podem afetar a eficácia das medidas de saúde pública que são tomadas, bem como sobrecarregar os sistemas de saúde público e privado. (OPAS, 2021a).

Os métodos de vigilância das VOCs do SARS-CoV-2 deveriam idealmente apresentar um padrão de acessibilidade com um custo-benefício que permitisse a sua distribuição para todas as regiões do mundo. Embora o sequenciamento do genoma completo seja considerado o padrão-ouro dentro da vigilância genômica, o

mesmo não se encontra acessível para muitas regiões, devido ao seu custo, a falta de recursos financeiros e humanos capazes de permitir a inserção deste padrão dentro da rotina.

Na impossibilidade do sequenciamento genômico de todos os casos necessários, a triagem através da genotipagem e do sequenciamento de uma parte importante do vírus; como a região RBD; se mostra como uma alternativa viável, mais acessível, com bons resultados e necessária para auxiliar em momentos críticos como na pandemia pelo SARS-CoV-2. (VOGELS *et al.*, 2021).

1.7.1 Sequenciamento parcial do genoma - Método de Sanger

O princípio das técnicas de sequenciamento apresenta a limitação de permitir o sequenciamento apenas de pequenos fragmentos de DNA, não sendo possível o sequenciamento do genoma inteiro de uma só vez. Uma das estratégias usadas é de então fragmentar o DNA; utilizando-se enzimas de restrição ou quebra aleatória por fragmentação mecânica; sequenciar esses fragmentos e depois realizar uma montagem do genoma através do alinhamento dos fragmentos utilizando *softwares* específicos que irão se basear em regiões de sobreposição para a obtenção do genoma completo. (FIETTO; MACIEL, 2015).

Desde o início da pandemia, a principal forma de identificação das variantes do SARS-CoV-2 foi através do sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*). Embora bastante eficaz, o NGS apresenta a limitação de ser excessivamente caro, demorado e com a necessidade de mão de obra especializada para a execução correta. Grande parte das mutações presentes nas variantes do SARS-CoV-2 estão localizadas no gene S, podendo o sequenciamento ser direcionado para esta região de interesse com técnicas mais tradicionais como o método de Sanger. (OPAS, 2021a).

O método de Sanger é uma adaptação da dinâmica de sequenciamento químico anteriormente proposto por Alan Maxam e Walter Gilbert no mesmo ano (SANGER *et.*, 1977). Inicialmente, era bastante manual e com algumas desvantagens como o uso de compostos radioativos durante as reações. Posteriormente a técnica passou por algumas modificações que permitiram a sua automatização, buscando tornar a técnica mais fácil e mais rápida de ser executada. (FIETTO; MACIEL, 2015). **(Figura 9).**

Salles e colaboradores (2022) propõem um protocolo de sequenciamento por Sanger utilizando oito conjuntos de primers que conseguem cobrir 100% do gene S (3.822 pb) do SARS-CoV-2 produzindo amplicons únicos e sem nenhuma interferência nas regiões dos primers que pudesse levar ao escape de alguma VOC conhecida.

Alhamlan e colaboradores (2023) elaboraram um protocolo rápido e econômico para o sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 e identificação das VOCs utilizando *primers* projetados e validados em 282 amostras de *swab* nasofaríngeo positivo para SARS-CoV-2 na técnica de Sanger e realizando o comparativo dos resultados com o NGS (metodologia Ion AmpliSeq). Os resultados encontrados das VOCs por Sanger apresentaram 100% de precisão pela semelhança com os resultados do NGS e $\geq 98\%$ de semelhança da sequência completa do genoma, mostrando que o método de Sanger apresenta bons resultados comparados ao NGS.

O sequenciamento parcial direcionado em regiões de interesse da VOCs auxilia na rápida identificação de mutações e alterações que possam efetivamente auxiliar na elaboração e aperfeiçoamento de métodos diagnósticos e profiláticos, além de evitar a geração de excesso de sequências pouco aproveitáveis nos bancos de dados. (DANIELS *et al.*, 2021).

Essa metodologia de sequenciamento parcial nos permite inferir uma provável linhagem viral. Portanto, diferentemente do sequenciamento completo, não contempla o genoma viral inteiro e por isso, até o momento, não pode ser considerado como confirmatório.

1.7.2 Sequenciamento do genoma completo (WGS - *whole genome sequencing*)

O sequenciamento completo do genoma (WGS, do inglês *whole genome sequencing*) é uma técnica que busca mapear a distribuição e sequência correta dos nucleotídeos presentes em cada molécula de DNA ou RNA. Através desta leitura é possível identificar as informações genéticas presentes em cada estrutura. (OPAS, 2021a; FIETTO; MACIEL, 2015).

Desde os primeiros sequenciamentos genômicos realizados até o momento, houveram muitas mudanças e grandes aperfeiçoamentos que permitiram a

automatização, diminuição do tempo e de custo das técnicas e a possibilidade de sequenciamento do genoma completo. (MARDIS, 2008).

O aperfeiçoamento das técnicas permitiu a geração de novas tecnologias para o WGS ou NGS. Para o sequenciamento e análise do SARS-CoV-2 podemos citar a Illumina, com os sequenciadores iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq; a *Oxford Nanopore Technologies* com o Flongle, MinION, GridION, PromethION e a *Ion Torrent*, tornando possível a realização do sequenciamento completo de um genoma em questão de horas. (OPAS, 2021a).

Cada técnica de sequenciamento apresenta vantagens, desvantagens e características diferenciais que permitem abranger diversas finalidades e realidades dentro das pesquisas. As principais vantagens e limitações de cada tecnologia estão resumidas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Plataformas comumente usadas para análise de sequenciamento do SARS-CoV-2 e suas características.

Ferramentas	Vantagens	Limitações	Tempo de execução da ferramenta	Taxa de transferência de sequenciamento	Disponibilidade e custo relativos por sequenciamento
Sanger	Amplamente acessível. Fácil de usar. Sequenciamento com boa relação custo-efetividade se poucos alvos forem necessários.	Taxa de transferência muito baixa. Amplicons (com frequência não mais do que 1000 pb) devem ser amplificados e sequenciados individualmente. Dispendioso para genomas completos. Impróprio para metagenômica.	Normalment e algumas horas.	100 kB-2 Mb por execução única.	Amplamente disponível. Custo relativamente baixo para alguns alvos.
Illumina (por exemplo, iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq)	Possível rendimento de sequenciamento muito alto iSeq de precisão muito alta é portátil. Os métodos de tratamento de dados estão bem estabelecidos.	Com exceção do Illumina iSeq, bastante caro para compra e manutenção em comparação com algumas outras plataformas. Comprimento máximo de leitura 2 x 300 pb.	10–55 h, dependendo da ferramenta.	1,2-6000 Gb, dependendo da ferramenta.	Altos custos de manutenção e inicialização. Custos de funcionamento moderados.
Ion Torrent	Resposta rápida uma vez que o sequenciamento começa.	Dificuldades com homopolímeros. Alto preço. Comprimento máximo de leitura típico em torno de 400 pb.	2h – 1 dia, dependendo do chip e dispositivo.	30 Mb–50Gb dependendo do dispositivo e chips.	Custos moderados.
Oxford Nanopore Technologies (Flongle, MinION,	Dados portáteis, sequenciamento direto em tempo real. Custos de inicialização e manutenção baixos.	Dificuldades com homopolímeros. A taxa de erro por leitura é de ~ 5% (células de fluxo R9.4), por isso o uso de	Leituras disponíveis imediatamente. Pode ser monitorado	Varia de <2 Gb para célula de fluxo Flongle a 220 Gb para célula de fluxo	Sem manutenção e com baixo custo de inicialização Custos de funcionamento

GridION, PromethION)	Alcança comprimentos de leitura muito longos (excedendo o comprimento total do genoma SARS-CoV-2).	pipelines apropriados é fundamental para obter sequências de consenso de alta precisão. Atualmente inadequado para determinar a variação intra-hospedeiro, a menos que seja usado sequenciamento replicado.	e executado por até vários dias, conforme necessário.	PromethION Até 48 células de fluxo podem ser usadas no PromethION.	moderados.
----------------------	--	---	---	--	------------

Fonte: OPAS, 2021a (adaptado).

A evolução do sequenciamento genômico viral nas investigações clínicas e epidemiológicas pode ser notada quando fazemos um comparativo sobre a velocidade e escala entre as respostas genômicas de dois vírus que provocaram pandemias em momentos diferentes. A pandemia provocada pelo vírus HIV por volta de 1980 trouxe grandes consequências que se estendem até os dias atuais. Porém, o sequenciamento do genoma completo do vírus HIV só foi concluído e divulgado pela equipe de pesquisadores da Universidade da Carolina do Norte, EUA, em 2009. (WATTS *et al.*, 2009). Em contraste, com o SARS-CoV-2, o primeiro caso foi sequenciado utilizando uma combinação de sequenciamento Illumina e sequenciamento nanopore para identificação do agente etiológico da COVID-19 dentro de uma semana após a doença ser relatada pelas autoridades de saúde chinesas. (ZHU *et al.*, 2020). O primeiro caso confirmado no Brasil foi sequenciado em 48 horas e o segundo caso em 24 horas pela equipe da Dra. Jaqueline Goes de Jesus no Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP) em parceria com o Instituto Adolfo Lutz. (JESUS *et al.*, 2020).

Embora a metodologia de NGS seja hoje a representação da tecnologia de ponta para o sequenciamento de genomas, ainda há certas dificuldades para a popularização dessa tecnologia em determinados grupos científicos em regiões subdesenvolvidas e emergentes. A falta de infraestrutura, recursos financeiros e pessoal qualificado dificultam esse processo. Isso culmina no dado estimado por Ko e colaboradores (2022) de que apenas 2% das linhagens circulantes no mundo tenham sido sequenciadas por NGS e estejam divulgados no GISAID.

Além disso, o NGS apresenta a limitação do sequenciamento para amostras com baixa carga viral ($Ct > 25$), não podendo ser usado em todas as amostras clínicas. O método de Sanger nestes casos apresenta a vantagem de ser mais viável e barato em comparação ao NGS. (KO *et al.*, 2022).

As informações fornecidas pelo sequenciamento genômico tem se mostrado uma grande aliada no controle e monitoramento de infecções virais. Através dela é possível trabalhar no desenvolvimento ou aperfeiçoamento de métodos diagnósticos, medicamentos e medidas profiláticas e protetivas. (OPAS, 2021a).

Um detalhe importante a ser analisado no sequenciamento é a precisão e qualidade das sequências geradas pelo mesmo. Amostras com Ct alto, dados brutos de baixa qualidade e erros na montagem das sequências, podem contribuir para a geração de sequenciamentos de qualidade duvidosa que preenchem os bancos de dados e acabam interferindo na análise de dados de boa qualidade.

1.7.3 Genotipagem

A genotipagem é um método de triagem pela análise de uma região de interesse do genoma. Através desta técnica é possível realizar a detecção de mutações específicas presentes nas VOCs do SARS-CoV-2.

As sequências que são importantes e necessárias são escolhidas de acordo com as informações fornecidas por banco de dados públicos, onde é feita uma avaliação das posições polimórficas do genoma viral que são importantes e diferenciadas das demais variantes através de um protocolo apropriado, tornando a técnica mais barata e mais rápida de ser executada. Os protocolos de genotipagem são formados e precisam ser constantemente revisados baseados nas sequências que são fornecidas pelo sequenciamento completo. (WATTS *et al.*, 2019).

Segundo o estudo realizado por Harper *et al.* (2021), a genotipagem se mostra como uma importante técnica de triagem adicional e sem a necessidade de equipamentos específicos para sua realização. A genotipagem não é uma técnica que substitui o sequenciamento do genoma completo, mas sim complementa os dados fornecidos pelo sequenciamento do genoma através da triagem das regiões de interesse.

Os painéis de genotipagem precisam ser cruzados com os alinhamentos de sequência de genoma completo em intervalos regulares para garantir que novas mutações sejam incluídas na análise de genotipagem, como o painel VOGELS para identificação da deleção 69/70 presente em algumas sublinhagens da Ômicron.

Crisóstomo e colaboradores (2023) desenvolveram um ensaio de genotipagem por RT-qPCR multiplex baseado em *molecular beacons* visando as

mutações ORF1a:S3675/G3676/F3677, S:del69/70, S:E156/F157, S:N211, S:ins214EPE e S:L242/A243/L244 encontradas nas variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2), e Ômicron (BA.1, BA.2, BA.4, BA.5) do SARS-CoV-2. Os ensaios realizados confirmaram o genótipo de todas as amostras testadas das VOCs e os marcadores moleculares obtiveram bons resultados no RT-qPCR, sendo a genotipagem é uma ferramenta valiosa para a triagem e monitoramento das VOCs e de outras variantes emergente.

Umunakwe e colaboradores (2022), avaliaram a especificidade e precisão do ensaio de genotipagem Allplex Variants II para as variantes Beta (K417N) e Delta (L452R). Na análise da especificidade do ensaio foi verificado a reatividade cruzada para o vírus Influenza-A H1, Influenza-A H3, Influenza B, *Haemophilus influenzae*, vírus sincicial respiratório (RSV) em 160 amostras positivas e negativas para o SARS-CoV-2 antes do surgimento das variantes Beta e Delta. Para avaliar a precisão do ensaio, 38 amostras que foram anteriormente sequenciadas por plataformas NGS foram testadas pelo ensaio e tiveram seus resultados comparados. O resultado apresentado pela genotipagem demonstrou 100% de concordância com os resultados obtidos pelo NGS e nenhuma reatividade cruzada foi verificada no ensaio, demonstrando alta especificidade e precisão do método de genotipagem para a triagem de variantes. Uma limitação apresentada pelos autores é a dificuldade da genotipagem em amostras com o Ct acima de 35, sugerindo a necessidade de uma seleção cuidadosa das amostras para a genotipagem, assim como para o sequenciamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as variantes do SARS-CoV-2 circulantes na cidade do Rio Grande/RS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Desenvolver protocolos de *screening* com sondas comerciais taqman para a variante de preocupação (VOC, do inglês *variant of concern*) Ômicron em amostras positivas da cidade do Rio Grande/RS.

2.2.2 Comparar a eficiência da triagem pela genotipagem e sequenciamento parcial do genoma das variantes de SARS-CoV-2 circulantes na cidade de Rio Grande/RS.

2.2.3 Comparar o perfil e a filogenia das variantes circulantes de SARS-CoV-2 na cidade de Rio Grande com o estado do Rio Grande do Sul e do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAMLAN, Fatimah S. *et al.* SARS-CoV-2 spike gene Sanger sequencing methodology to identify variants of concern. **BioTechniques**, v. 74, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0114>

ARYA, Rimanshee *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 422, n. 2, 2021. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.11.024

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico nº 14 - Boletim COE Coronavírus**. 2020a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2020/boletim-epidemiologico-no-14-boletim-coe-coronavirus/view>. Acesso em: 17 mai. 2024.

_____. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde declara transmissão comunitária nacional**. 2020b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/marco/ministerio-da-saude-declara-transmissao-comunitaria-nacional#:~:text=O%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%BAde%20declarou,se%20unir%20contra%20o%20v%C3%ADrus.>>. Acesso em 17 mai. 2024.

_____. COVID-19. Ministério da Saúde. **Painel Coronavírus**. 2020c. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 30 jun. 2024.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacinas - Covid-19**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 26 jul. 2024.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de vigilância genômica do SARS-CoV-2: uma abordagem epidemiológica e laboratorial**. 2023. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_genomica_sarscov2.pdf >. Acesso em 18 jun. 2024.

BAKER, D. J. *et al.* CoronaHiT: high-throughput sequencing of SARS-CoV-2 genomes. **Genome medicine**, v.13, n.1, 1-11, 2021.

BRITO, Sávio Breno P. *et al.* Mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção por SARS-CoV-2. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020. DOI: 10.5935/1676-2444.20200056.

CABRAL, Gabriela Bastos *et al.* Use of Sanger protocols to identify variants of concern, key mutations and track evolution of SARS-CoV-2. **Journal of Virological Methods**, v. 300, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114422>

CADDY, SL. **Covid vaccines focus on the spike proteins – but here's another target**. The Conversation, 10 de dezembro de 2020. Disponível em: <<https://theconversation.com/covid-vaccines-focus-on-the-spike-protein-but-heres-another-target-150315>>. Acesso em: 29 jan. 2023.

CAO, Yipeng *et al.* Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. **Protein Science**, v. 30, n. 6, 2021. DOI: [10.1002/pro.4075](https://doi.org/10.1002/pro.4075)

CHOI, Jun Yong; SMITH, Davey M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.961>

COLVERO, L. P. *et al.* Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. **Revue Scientifique et Technique, Paris**, v. 34, n. 3, p. 993-999, Dec. 2015. DOI: [10.20506/rst.34.3.2411](https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2411)

CRISÓSTOMO, Andreas C. Detection of Circulating SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs) Using a Multiallelic Spectral Genotyping Assay. **Life**, v. 13, n. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/life13020304>

CRUZ, Kleber Augusto Tomé da; LIMA, Patrícia de Sousa; PEREIRA, André Luiz Araújo. Principais aspectos do novo coronavírus SARS-CoV-2: Uma ampla revisão. **Arquivos do Mundi**, v. 25, n. 1, 2021. DOI: doi.org/10.4025/arqmudi.v25i1.55455.

DANIELS, Rodney S. *et al.* A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. **Influenza Other Respiratory Viruses**, v. 15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12892>

DEMOLINER, Meriane *et al.* Predominance of SARS-CoV-2 P.1 (Gamma) lineage inducing the recent COVID-19 wave in southern Brazil and the finding of an additional S: D614A mutation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105134>

DHAWAN M. *et al.* Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. **Hum Vaccin Immunother**. 2022 Nov 30;18(5):2068883. doi: [10.1080/21645515.2022.2068883](https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2068883).

DORLASS, Erick Gustavo *et al.* Survey of SARS-CoV-2 genetic diversity in two major Brazilian cities using a fast and affordable Sanger sequencing strategy. **Genomics**, v. 113, n. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.015>

DUFFY, S. Why are RNA virus mutation rates so damn high? **PLOS Biology**, v. 16, n. 8, p. e3000003, 13 ago. 2018.

FARIA, Nuno R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, v. 372, p. 815-821, 2021. DOI: [10.1126/science.abh2644](https://doi.org/10.1126/science.abh2644).

FERREIRA, Giulia Magalhães. **Análise da variabilidade genômica de SARS-CoV-2 circulantes no estado de Minas Gerais**. 2020a. 88 f. Dissertação

(Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2020. DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.661>

FERREIRA, Eskálath Morganna S. *et al.* **SARS-COV-2 - Aspectos relacionados à biologia, propagação e transmissão da doença emergente COVID-19.** Revista Desafios. v. 7, n. Supl., 2020b. DOI: doi.org/10.20873/uftsuple2020-8859

FIETTO, Juliana Lopes Rangel; MACIEL, Talles Eduardo Ferreira. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, Leandro Marcio. **Ciências genômicas : fundamentos e aplicações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015, p. 27-64. Disponível em: <https://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/Sequ%C3%A2nciando%20genomas.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2023.

FREITAS, André Ricardo Ribas. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 1, 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.lana.2021.100021

GIOVANETTI, M., Slavov, S.N., Fonseca, V. *et al.* Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nature Microbiology**, v. 7, p. 1490–1500, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01191-z>

GIOVANETTI, Marta *et al.* Replacement of the Gamma by the Delta variant in Brazil: Impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. **Virus Evolution**, v. 8, n.1, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/veac024>

GORBALENYA, Alexander E. *et al.* Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCov and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. 2020. DOI: 10.1038/s41564-020- 0695-z.

GRAF, T. **Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-COV-2.** In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020. v. 1. DOI: <https://doi.org/10.9771/9786556300443.001>.

GREANEY, A. J. Comprehensive mapping of mutations in the SARSCoV-2 receptorbinding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. **Cell Host & Microbe**, v. 29, p. 463–476, 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PNAD Contínua - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua.** 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/17270-pnad-continua.html?edicao=39911>. Acesso em: 15 jun. 2024.

JESUS, Jaqueline Goes de *et al.* Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062030>

HADFIELD *et al.*, Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution, **Bioinformatics**, 2018.

HARPER, Helen *et al.* Detecting SARS-CoV-2 variants with SNP genotyping. **Plos One**, v. 16, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243185>

HONG, Qin *et al.* Molecular basis of receptor binding and antibody neutralization of Ómicron. **Nature**, v. 604, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04581-9>

KHARE, Shritu *et al.* **GISAID's Role in Pandemic Response**. China CDC Wkly. 2021 Dec 3;3(49):1049-1051. DOI: 10.46234/ccdcw2021.255.

KHAN, Muhammad Tahir *et al.* Structures of SARS-CoV-2 RNA-Binding Proteins and Therapeutic Targets. **Intervirology**, v. 64, n. 2, 2021. DOI: 10.1159/000513686

KSIAZEK, T. G. *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953-66, May 15 2003.

KO, Ko *et al.* Mass Screening of SARS-CoV-2 Variants using Sanger Sequencing Strategy in Hiroshima, Japan. **Scientific Report**, v. 12. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04952-2>

KORBER, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 812-827.e19, ago. 2020.

LAHA, S. *et al.* Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104445, nov. 2020.

LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic variants of SARS-CoV-2—what do they mean?. **JAMA**, v. 325, n. 6, p. 529-531, 2021. DOI: [doi:10.1001/jama.2020.27124](https://doi.org/10.1001/jama.2020.27124)

LEUNG, K. *et al.* Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. **Euro Surveill**, v. 26, n. 1, 2021. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106

LI, B. *et al.* Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. **Nat Commun**. v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28089-y.

LUBIN, Joseph H. *et al.* Evolution of the SARS-CoV-2 proteome in three dimensions (3D) during the first 6 months of the COVID-19 pandemic. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 2021. DOI: doi.org/10.1002/prot.26250

MACHADO, Denis Jacob *et al.* Fundamental evolution of all *Orthocoronavirinae* including three deadly lineages descendent from Chiroptera-hosted coronaviruses:

SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2. **Cladistics**, v. 37, n. 5, 2021. DOI: [10.1111/cla.12454](https://doi.org/10.1111/cla.12454)

MACIEIRA, Luana. **CTVacinas registra primeiro caso de subvariante responsável por nova onda de COVID-19**. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/ctvacinas-registra-primeiro-caso-de-subvariant-e-responsavel-por-nova-onda-de-covid-19>. Acesso em: 6 mar. 2022.

MARDIS, Elaine R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 3, 2008.

MICHELON, Cleonice Maria. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 2, 2021. DOI: [10.21877/2448-3877.202100961](https://doi.org/10.21877/2448-3877.202100961)

NASSAR, M. S. *et al.* Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection: epidemiology, pathogenesis and clinical characteristics. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 2018. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/4956-4961.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2023.

NAVECA, Felipe Gama *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, p. 1230–1238, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>

NOBREGA, Matheus de Castro. **TMPRSS2 e outras serino proteases transmembrana tipo II (TTSPS): sinal de uma corrida armamentista de longo período entre vírus e mamíferos placentários**. 2022. 31f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2022. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/254161/001159578.pdf?sequence=1>. Acesso em: 14 jul. 2024.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. **Histórico da pandemia de COVID-19**. [2020a]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **Brasil confirma primeiro caso de infecção pelo novo coronavírus**. 2020b. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/69303>. Acesso em: 17 set. 2022.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **Sequenciamento genômico do SARS-CoV-2**. Guia de implementação para máximo impacto na saúde pública. 8 de janeiro de 2021. Brasília, D.F. 2021a. DOI: doi.org/10.37774/9789275723890.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2**. 2021b. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faais-pronunciar-para-variantes-interesse-e>>. Acesso em 07 jun. 2024.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **OMS declara fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19**. 2023a.

Disponível em:

<[https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente#:~:text=%C3%A0%20COVID%2D19-,OMS%20declara%20fim%20da%20Emerg%C3%Aancia%20de%20Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica,Internacional%20referente%20%C3%A0%20COVID%2D19&text=Bras%C3%ADlia%2C%205%20de%20maio%20de,\)%20referente%20%C3%A0%20COVID%2D19.](https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente#:~:text=%C3%A0%20COVID%2D19-,OMS%20declara%20fim%20da%20Emerg%C3%Aancia%20de%20Sa%C3%BAde%20P%C3%BAblica,Internacional%20referente%20%C3%A0%20COVID%2D19&text=Bras%C3%ADlia%2C%205%20de%20maio%20de,)%20referente%20%C3%A0%20COVID%2D19.)>. Acesso em: 12 jun. 2024.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants**. 2023b. Disponível em:

<<https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>>. Acesso em: 01 ago. 2024.

_____. Organização Pan-Americana de Saúde. **WHO Coronavirus Network (CoViNet)**. 2024. Disponível em:

<<https://www.who.int/groups/who-coronavirus-network>>. Acesso em: 01 ago 2024.

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

PLANAS, D. *et al.* Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. **Nature**, v. 602, p. 671-675, 2022.

PLANTE, J. A. *et al.* Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. **Nature**, v. 592, n. 7852, p. 116–121, 2021.

POON, L. L. M. *et al.* The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. **Lancet Infectious Diseases**, [London], v. 4, n. 11, p. 663-671, Nov. 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01172-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01172-7).

REDE GENÔMICA FIOCRUZ. Dashboard. **Vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Brasil**. São Paulo: Rede Genômica Fiocruz, 01 fev. 2023. 2023. Disponível em: <http://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>. Acesso em: 01 fev. 2023.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde. **Confirmado o primeiro caso de novo coronavírus no Rio Grande do Sul**. 2020a.

Disponível em:

<<https://saude.rs.gov.br/confirmado-o-primeiro-caso-de-novo-coronavirus-no-rio-grande-do-sul>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

RIO GRANDE DO SUL. Centro de Operações de Emergências do Rio Grande do Sul/COERS. **Informe epidemiológico - COVID-19 em 25/03/2020**. 2020b. Disponível em: <<https://coronavirus.rs.gov.br/informe-epidemiologico>>. Acesso em: 19 maio 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Centro de operações de emergência do Rio Grande do Sul/COERS. **Boletim Epidemiológico COVID-19. Semana Epidemiológica 1 a 16 de 2020**. 2020c. Disponível em:

<<https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202005/07181724-boletim-epidemiologico-covid-19-coers-se-16.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Centro de operações de emergência do Rio Grande do Sul/COERS. **Boletim Epidemiológico COVID-19. Semana Epidemiológica (SE) 29 de 2020**. 2020d. Disponível em:

<<https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202007/22082858-boletim-epidemiologico-resumido-se-29.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Rio Grande do Sul. **Boletim Genômico, 2021**. 2021a. Disponível em:

<<https://www.estado.rs.gov.br/upload/arquivos/papo-cientifico-boletim-genomico-11-mar2021-atualizado.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Secretária da Saúde. **Confirmados dois primeiros casos da variante Delta no RS**. 2021b. Disponível em:

<[https://saude.rs.gov.br/confirmados-dois-primeiros-casos-da-variante-delta-no-rs#:~:text=Foram%20confirmados%2C%20nesta%20segunda%2Dfeira,%E2%80%93%20de%20origem%20na%20%C3%8Dndia\).>](https://saude.rs.gov.br/confirmados-dois-primeiros-casos-da-variante-delta-no-rs#:~:text=Foram%20confirmados%2C%20nesta%20segunda%2Dfeira,%E2%80%93%20de%20origem%20na%20%C3%8Dndia).>)>. Acesso em: 19 jan. 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado. **Estado confirma primeiro caso da variante ômicron**. 2021c. Disponível em:

<<https://www.estado.rs.gov.br/estado-confirma-primeiro-caso-da-variante-omicron>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Rio Grande do Sul. **Boletim Genômico 11 (24/05/2024)**. 2021d. Disponível em:

<<https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202207/11161447-bg11.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. **Monitoramento da Imunização Covid-19**. 2021e. Disponível em:

<<https://vacina.saude.rs.gov.br/>>. Acesso em: 17 jun. 2024.

ROSER, Max *et al.* Our World in data. **Share of SARS-CoV-2 sequences that are the omicron variant**. 2021. Disponível em:

<<https://ourworldindata.org/grapher/covid-cases-omicron?country=GBR~FRA~BEL~DEU~ITA~ESP~USA~ZAF~BWA~AUS>>. Acesso em: 28 jun. 2024.

SALLES, Thiago Souza *et al.* Genomic surveillance of SARS-CoV-2 Spike gene by sanger sequencing. **Plos One**, v. 17, n.1, 2022. DOI: [10.1371/journal.pone.0262170](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262170)

SALVATO, Richard Steiner *et al.* Epidemiological investigation reveals local transmission of SARS-CoV-2 lineage P.1 in Southern Brazil. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v. 11, n. 1. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.17058/reci.v1i1.16335>>. Acesso em: 15 mai. 2024.

SANGER, Frederick *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage [phi]X174 DNA. **Nature**, 1977. DOI: [10.1038/265687a0](https://doi.org/10.1038/265687a0)

SANTOS, J; PASSOS, G. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. **bioRxiv Prepr**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.29.424708>

SÃO PAULO. Governo do Estado. **SP confirma os dois primeiros casos da variante Ômicron no Brasil**. 2021. Disponível em: <<https://www.saopaulo.sp.gov.br/noticias-coronavirus/sp-confirma-os-dois-primeiros-casos-da-variante-omicron-no-brasil/>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

SCHULZ, L. L.; TONSOR, G. T. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 93, n. 11, p. 5111-5118, 2015. DOI: [10.2527/jas.2015-9136](https://doi.org/10.2527/jas.2015-9136).

SILVA, Mariana Soares da *et al.* Genomic and epidemiologic surveillance of SARS-CoV-2 in Southern Brazil and identification of a new Ômicron-L452R sublineage. **Virus Research**, v. 321, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198907>

SOUZA, Pedro F. N. *et al.* The spike glycoprotein of SARS-CoV-2: A review of how mutations of spike glycoproteins have driven the emergence of variants with high transmissibility and immune escape. **Int J Biol Macromol**. 2022. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2022.03.058](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.058)

STARR, T. N. *et al.* Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. **Cell**, v. 182, p. 1295–1310, 2020.

STEINER, Silvio *et al.* SARS-CoV-2 biology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22 , 206–225, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>

SUNGNACK, W., Huang, N., Bécavin, C. *et al.* Os fatores de entrada do SARS-CoV-2 são altamente expressos em células epiteliais nasais, juntamente com genes imunes inatos. **Nature Medicine**, v. 26, p. 681–687. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>

TAYLOR, Derrick Bryson. The New York Times. **A Timeline of the Coronavirus Pandemic**. 2021. Disponível em: <<https://www.nytimes.com/article/coronavirus-timeline.html>>. Acesso em: 17 jan. 2024.

TEGALLY, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, 15 abr. 2021.

TERMOFISHER SCIENTIFIC. Frequently asked questions (FAQs). **Omicron and Alpha variants: The impact of the 69-70del mutation in the Spike protein of SARS-CoV-2 on TaqPath COVID-19 testing assays**. 2022. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/69-70del-s-gene-mutation-eua-faq.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

THUNDERS, Michelle; DELAHUNT, Brett. Gene of the month: TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). **Journal of Clinical Pathology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206987>

TYRRELL, D. A. *et al.* Coronaviridae. **Intervirology**, v. 5, n. 1-2, p. 76-82, 1975. DOI: doi.org/10.1159/000149883

TYRRELL, D. A.; BYNOE, M. L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. **Lancet**, v. 1, n. 7428, p. 76-7, 1966. DOI: [doi.org/10.1016/S0140-6736\(66\)92364-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(66)92364-6)

UMUNNAKWE, Chijioke N. Evaluation of a commercial SARS-CoV-2 multiplex PCR genotyping assay for variant identification in resource-scarce settings. **Plos one**. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269071>

WATTS, Joseph M. *et al.* Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08237>

WHO. World Health Organization. **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)**. [2015]. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1>. Acesso em: 15 jan. 2023.

_____. World Health Organization. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. 2020a. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>. Acesso em: 11 jun. 2024.

_____. World Health Organization. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

_____. World Health Organization. **COVID-19 Weekly Epidemiological Update**. 20 april 2021. 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-april-2021>>. Acesso em: 02 jun. 2023.

_____. World Health Organization. **Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern**. 2021b. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)>. Acesso em: 23 jan. 2023.

_____. World Health Organization. **Enhancing response to Ômicron SARS-CoV-2 variant: Technical brief and priority actions for Member States**. Genova. 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-\(b.1.1.529\)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states](https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-(b.1.1.529)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states)>. Acesso em: 18 jan. 2023.

_____. World Health Organization. **Enhancing response to Ômicron SARS-CoV-2 variant**. 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-\(b.1.1.529\)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states](https://www.who.int/publications/m/item/enhancing-readiness-for-omicron-(b.1.1.529)-technical-brief-and-priority-actions-for-member-states)>. Acesso em: 17. jun. 2024.

_____. World Health Organization. **WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard**. 2023a. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/data>>. Acesso em: 21 mai. 2024.

_____. World Health Organization. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. 2023b. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>>. Acesso em: 14 jul. 2024.
WOO, P. C. *et al.* Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 10, p. 1117-27, 2009.
DOI: <<https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>>

WISE, Jacqui. Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. **BMJ**, 2020.
DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m4857>>

UK. Government of United Kingdom. Public Health England. **PHE investigating a novel variant of COVID-19**. London, United Kingdom, 2020a. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/news/phe-investigating-a-novel-variant-of-covid-19>>. Acesso em: 18 fev. 2024

UK. Government of United Kingdom. Public Health England. **Investigation of novel SARS-COV-2 variant: variant of concern 202012/01**. London, United Kingdom, 2020b. Disponível em: <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959438/Technical_Briefing_VOC_SH_NJL2_S H2.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2024.

VIANA, R. *et al.* Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. **Nature**, v. 603, p. 679–686, 2022.

VOGELS Chantal B. F. *et al.* Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. **Plos Biology**, v. 19, v. 5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3>

V'KOVSKI, Philip *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, 2021.

YAN, Yuxin *et al.* The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17. 2020. [doi:10.3390/ijerph17072323](https://doi.org/10.3390/ijerph17072323)

ZHANG, Jun *et al.* Structure of SARS-CoV-2 spike protein. **Current Opinion in Virology**. 2021. DOI: [10.1016/j.coviro.2021.08.010](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010)

ZHANG, Zhikuan *et al.* Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. **Nature Communications**, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32019-3>

ZHU, Na; *et al.* **A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019.** The New England Journal of Medicine. v. 382, n. 8, 2019. DOI: doi.org/10.1056/NEJMoa2001017.

ZIEGLER, K. *et al.* SARS-CoV-2 samples may escape detection because of a single point mutation in the N gene. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 39, p. 2001650, 2020. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.39.2001650

ARTIGO

DETECTION OF SARS-CoV-2 VARIANTS AND GENOMIC SURVEILLANCE
IN THE EXTREME SOUTHERN OF BRAZIL

STATUS

Submetido

PERIÓDICO

Brazilian Journal of Microbiology

FATOR DE IMPACTO

2.1

RESEARCH ARTICLE

Detection of SARS-CoV-2 variants and genomic surveillance in the extreme southern Brazil

Leonardo Francisco da Silva^{a,b}, Vanise Pereira de Medeiros^{c,d}, Livia Lemos Menegaro^b, Luísa Dias da Mota^e, Jéssica da Silva Dittgen^e, Núbia Rejane Goulart Oliveira^e, Sara Hartke^c, Ilma Simoni Brum da Silva^{c,d}, Gabriela Pasqualim^{a,b,c}

a. Graduate Program in Health Sciences (PPGCS). Federal University of Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brazil.

b. Genetics Laboratory. Institute of Biological Sciences. FURG. Brazil.

c. Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET), Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Federal University of Rio Grande do Sul. (ICBS-UFRGS). Porto Alegre. Brazil.

d. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

e. Diagnostic Support Laboratory in Infectious Diseases (LADI). University Hospital of the Federal University of Rio Grande. Rio Grande. Brazil.

Corresponding author: Professor Gabriela Pasqualim, Institute of Biological Science, Federal University of Rio Grande, Km 8 Avenida Itália Carreiros, Rio Grande - RS, CEP: 96203-900, ORCID 0000-0002-6250-9609
E-mail: gpasqualim@gmail.com

ABSTRACT

During the SARS-CoV-2 pandemic, the need for molecular surveillance increased, particularly regarding the identification of variants of concern (VOCs). However, the existence of limited sequencing resources and lack of genomic surveillance programs in many regions further away from large research centers hindered the identification of VOCs worldwide. Therefore, the purpose of this study was to perform genomic surveillance of SARS-CoV-2 VOCs with affordable screening technologies in Rio Grande, a portuary city in the extreme South of Brazil. A total of 363 nasopharyngeal swab samples with COVID-19 patients diagnosed from January to June, 2022, were included. Four S gene mutations were evaluated by genotyping RT-qPCR: S:P681R, S:T20N, S:K417N and S:69/70del. Sequencing of the RBD region was carried out in 67 samples. The Omicron variant was identified in 98.9% of samples tested by genotyping. The genotyping and sequencing results achieved high agreement. Sequencing data showed that BA.1.1 (47.7%) and BA.2 (23.8%) were the most frequent Omicron subvariants, followed by BA.1 (14.9%) in the period. These results are in agreement with the profile found in the rest of the State and the country. Furthermore, the BA.2 and BA.2.56 variants were identified in January and April 2022, a month before they were detected in other parts of the State, respectively. Therefore, genotyping using a set of targeted mutations and RBD focused sequencing proved efficient in identifying the previously unknown profile of circulating lineages in the extreme southern Brazil.

Keywords: SARS-CoV-2; Variants of Concern; Epidemiological Surveillance.

1. Introduction

SARS-CoV-2 is a betacoronavirus, which makes it more prone to developing mutations during its replication process [1]. Mutations present in the receptor binding domain (RBD) of the viral spike protein, a key part of virus infection process, can give rise to variants of concern (VOCs), which impact hospitalization and mortality rates and are monitored worldwide. [2,3].

Genomic surveillance has been an important tool during the pandemic period, allowing the identification and monitoring of these VOCs and their epidemiological implications. [4]. It also allows monitoring of infections by other viruses and microorganisms with pandemic potential, enabling a faster and more efficient response to control outbreaks, epidemics, and pandemics. [4,5]. Ideally, this surveillance is performed with Next-generation sequencing (NGS) techniques. They allow the genome sequencing of viruses such as SARS-CoV-2 quickly and with great reliability. [6]. However, they require costly infrastructure and consumables, as well as qualified labor, and are unavailable in routine diagnosis and for all research centers worldwide, especially in underdeveloped and emerging regions.

The SARS-CoV-2 reference genome was generated from the first complete genomic sequences of the first cases using metatranscriptomic approaches, complemented by PCR and Sanger sequencing. [7]. From this, it was possible to develop diagnostic and screening methods such as real-time PCR and genotyping. [7,8]. Unlike NGS techniques, traditional Sanger sequencing is widespread worldwide due to its more affordable cost and the possibility of performing partial genome sequencing in important regions for genomic surveillance. [9,10,11].

Previously published studies have already demonstrated the efficiency of Sanger sequencing for identifying SARS-CoV-2 VOCs, including saliva samples with low viral titers. [10,11,12,13]. Moreover, in regions with limited sequencing resources, the possibility of performing genotyping as a screening method is an accessible alternative for analyzing regions of interest in the SARS-CoV-2 genome. Previous studies have already demonstrated that the genotyping approach offers an elaborate performance to WGS for already discovered SARS-CoV-2 VOCs, including the most recent Omicron strains. Thus, being an important screening mechanism with faster results, a lower cost, greater flexibility, and the use of the same laboratory analysis instruments. [14,15,16,17].

Located on the southern coast of the Brazilian state of Rio Grande do Sul, the municipality of Rio Grande has limited sequencing resources and lacks genomic surveillance programs. Moreover, it is a portuary city and its proximity to other countries such as Uruguay and Argentina mean that the municipality of Rio Grande receives a considerable flow of people from other regions, as well as cargo from all over the world, which enables greater viral circulation in comparison to the rest of the State.

The lack of information about VOC spread and overall genomic surveillance in the extreme south of the State of Rio Grande do Sul/Brazil, highlights the need for molecular epidemiologic surveillance methodologies that are more accessible to regions further away from large research centers. Therefore, the purpose of this study was to perform genomic surveillance of SARS-CoV-2 VOCs with affordable screening technologies in Rio Grande, a portuary city in the extreme South of Brazil.

2. Materials and methods

2.1 Sample selection

The samples selected in this study were collected by nasopharyngeal swab for the molecular diagnosis of SARS-CoV-2 infection and were stored at -80C° in the Diagnostic Support Laboratory in Infectious Diseases (LADI) of the University Hospital of the Federal University of Rio Grande (HU- FURG).

The inclusion criteria for this study were: samples collected from January to June 2022 with positive results by RT-qPCR for SARS-CoV-2, sufficient amount of biological material for the assays and threshold cycle (Ct) less than 35. The samples selected according to the study criteria presented a mean and median Ct of 22 and a minimum and maximum value of 6 and 34, respectively. Data regarding gender, age group and origin of collection were obtained from the patients' medical records.

RNA extraction was performed in the KingFisher Flex equipment with MagMAX kits (Thermo Fisher Scientific, USA) at Instituto de Ciências Básicas da Saúde at Federal University of Rio Grande do Sul (ICBS - UFRGS). A new RT-qPCR reaction for sample validation was performed with Allplex™ SARS-CoV-2 assay (Seegene Brazil, Brazil), according to the manufacturer's instructions in QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, USA).

2.2 Genotyping

The assays were selected to detect SARS-CoV-2 variants and sublineages based on their global distribution and transmissibility profile in the analyzed period. All selected mutations had frequencies of at least 95% in the circulating strains in the analyzed period or were in regions close to other frequent mutations in B.1.1.529 sublineages that could determine the pattern of circulating variants and sublineages, according to GISAID data. **(Table S1)**. The assays were directed to the spike gene for mutations S:P681R (present in the B.1.617.2 lineage), S:T20N (present in the P.1 lineage), S:K417N (present in the B.1.351 lineage and sub-lineage of B.1.1.529, such as BA.1.BA.2.BA.4.BA.5 and BQ.1) and the S:69/70 deletion (present in lineage B.1.1.7, and BA.1, BA .4, BA.5 and BQ.1). The genotyping reactions were performed with a final volume of 12.5 μ L, consisting of 7.5 μ L of Agpath RT-PCR Buffer, 0.5 μ L of enzyme mix, 1x TaqMan SARS-CoV-2 assays and 1.75 μ L of nuclease-free water. The Step One Plus equipment was used with the following cycling conditions: initial incubation at 60°C for 30s, incubation with reverse transcriptase at 50°C for 15 minutes, initial denaturation at 95°C for 10 minutes and 45 cycles at 95°C for 15 seconds and then 60°C for 30 seconds and post-read an incubation at 60°C for 30 seconds.

2.3 Sequencing of the RBD region

From all genotyped samples, 80 samples were randomly selected, including samples from each epidemiological week with Ct below 30 for Sanger sequencing of the RBD region of the S gene. cDNA was generated from viral RNA using the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, USA) with Oligo(dT). The primers (5'-GACCTTGACCCTCTCTCAGAAAC-3') and (3'-GTCTGTGGATCACGGACAGC-5') were used for RDB amplification and were designed with the Primer-BLAST program and the reference sequence #NC_045512.2. **(Fig. 1)**.

Amplicons were purified with 20% PEG 8000 solution in 2.5M NaCl, quantified in agarose gel by comparison with the low mass standard (Thermo Fisher Scientific, USA), and sequenced in ABI3500 equipment with BigDye Terminator v3 .1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

We used Nexclade software [18] and GISAID-enabled CoVServer (www.gisaid.org) to identify synonymous and non-synonymous mutations and determine lineages. Sequences were aligned with the Wuhan wild-type sequence (#NC_045512.2).

Whole genome sequences from Brazil, the State of Rio Grande do Sul and Pelotas, a more developed city nearby, filtered for high quality data were used for comparison of variant spread.

2.3.1 Phylogenetic analysis of the RBD region of the spike protein

2.3.1.1 Data collection and subsampling and selection

Complete SARS-CoV-2 sequences were obtained from the GISAID database, covering the period January to June 2022. We implemented a subsampling strategy, selecting a representative sequence by Brazilian state, by viral lineage and by month, from the 21K clades , 21J, 21L, 22B, 22C, 22A, ensuring a comprehensive representation of viral diversity, totaling 1206 sequences.

Next, sequence categorization was performed based on genetic substitutions. To cluster the sequences based on genetic differences, numerical vectorization was performed using the TF-IDF technique, followed by K-Means clustering, implemented via the Scikit-Learn library in Python 3.12. The optimal number of clusters was determined to be 19, utilizing the elbow method and the silhouette coefficient, which yielded an average value of 0.76, indicating a good separation between clusters. The sequences were subsequently grouped according to similarities in nucleotide substitutions within the RBD region of the spike protein.

From each homogeneous group of sequences, we selected one sample per State and without ambiguous nucleotides or gaps, we kept each group that had more than 3 representatives. This selection aimed to maintain geographic representativeness and genetic diversity and this process allowed us to reduce redundancy.

2.3.1.2 Phylogenetic analysis

Initially, the genomic sequences were aligned using the MAFFT software, v7.520 in Python v3.10. After alignment, the regions corresponding to the receptor binding domain (RBD) of the spike protein, located between positions 22515 and 23185 of the viral genome, were specifically extracted from all sequences. Phylogenetic analysis was then conducted in IQ-TREE v2.20 using the General Time Reversible (GTR) model, we applied 1000 replications of the Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) and 1000 bootstrap replications. The figure was generated in FigTree v 1.4.4.

2.4 Epidemiological data

Epidemiological data from the samples analyzed in this study was obtained from LADI's database. Data from the Health Department of the State of Rio Grande do Sul database were accessed through the "Painel Coronavírus RS" [19].

3. Results

3.1 Sample characterization

Cases of SARS-CoV-2 infection confirmed by the Municipal Health Department in the municipality of Rio Grande and by LADI HU-FURG were analyzed by epidemiological week, totaling 26 weeks (January to June 2022). (**Fig 2**). Diagnosis was made with RT-qPCR kits by LADI (HU-FURG) while the municipality also used antigen tests.

A total of 711 nasopharyngeal swab samples were collected from patients with confirmed the diagnosis of SARS-CoV-2 and stored at -80°C at LADI HU-FURG. Of this total, 363 samples (51%) had sufficient volume and Cts of up to 35 cycles and were included in this study.

The positivity rate for SARS-CoV-2 *per* epidemiological week in the municipality of Rio Grande showed a mean of 26%, median of 30.5% and standard deviation of 10.3% and an abnormal distribution by the Shapiro-Wilk method ($p = 0.002$). The positivity rate found in the LADI HU-FURG showed a mean of 21%,

median of 23%, standard deviation of 11.3% and a normal distribution according to the Shapiro-Wilk method ($p= 0.054$).

Sample characterization is shown on **Table 1**. Most patients were female (63%), the mean patient age was 40.1 years [95% CI (38 - 41.1)], and the age ranged between 0 and 97 years. The age groups 18 to 29, 30 to 39 and 40 to 49 years were the age groups with the highest number of cases in the analyzed period, corresponding together to 66.4% of all samples analyzed.

3.2 Genotyping

Genotyping results are summarized in (**Table 2**) and (**Fig. 3**). The S:P681R assay used to identify samples with a B.1.617.2 profile presented inconclusive results in 99.7% of the samples, with 1 sample presenting a positive result. The S:K417N assay used for detection of omicron lineage (B.1.1.519 and its sublineages) tested positive in approximately 99.4% of samples, with two inconclusive samples. The S:T20N assay was negative in 55.65% of the samples and the remaining results were inconclusive. The assay developed by Vogels et al. [20] was reproduced in the study samples to identify spike 69/70del mutation, with the aim of differentiating B.1.1.519 sublineages based on their previously described profiles. (**Table S1**).

BA.1 was dominant from January to March during the study period, with its dominance replaced by BA.2 from April onwards. Genotyping does not allow the BA.4 and BA.5 groups to be differentiated due to their similar pattern, meaning the results are grouped together.

3.3 RBD region sequencing

From the 80 selected samples, 67 produced reliable data by Sanger sequencing (**Fig. 4c**). It was possible to detect one B.1.617.2 sample and identify the sublineages of the group B.1.1.529, BA.1 (10/67), BA.1.1 (32/67), BA.2 (16/67), BA.2.12.1 (1/67), BA.2.56 (1/67), BA.4/5 (6/67). The results found in the study were compared with whole genome sequences from Brazil and the State of Rio Grande do Sul, collected in the same period of the study, deposited on GISAID (**Figs. 4a and 4b**). There was only one sequence in GISAID from the municipality of Rio Grande.

GISAID Sequences from Porto Alegre (n=345, Fig S1), the State's capital, Pelotas (n=40, Fig S2), a larger city nearby, and Brazil (n=64.253) were also evaluated.

Data from Brazil showed a marked dominance of the BA.1 variant, followed by BA.1.1 in the months of January to March 2022. From April onwards, they were replaced by BA.2 and in June, BA.4/5 took over as the most dominant variant in the country. The State of Rio Grande do Sul and its capital, Porto Alegre, show similar patterns to Brazil (**Figs 4b and S1a**). Lineages BA.1/BA.1.1 and BA.2 were the most frequent ones from January to March and April to June, respectively. However, differently from what was observed in the country, XAG was frequently detected in the State in April, with expressive detection in Porto Alegre in May. Moreover, lineages BA.4/5 were not as common in June as seen in Brazil. There was only one sequence previously identified as BA.2, in May, which was deposited in GISAID belonging to the city of Rio Grande.

Pelotas, (**Fig S1b**) had low lineage diversity, with BA.1 as the dominant variant between January and April during the study period and BA.2 assuming dominance between the months of May and June. No other variants were identified besides these three.

The sequences from this study, from the city of Rio Grande, showed a similar pattern to the sequences from the state of Rio Grande do Sul, with BA.2 assuming dominance from April onwards. However, in Rio grande, lineages BA.4/5 and not XAG were the second most prevalent from May to June.

3.4 *Phylogenetic analysis*

Subsampling and selection of GISAID sequences resulted in 256 samples, in addition to the 67 sequences of the study. Results from the phylogenetic analysis are shown in (**Fig. 5**).

4. Discussion

The emergence of the Omicron variant was responsible for the large spike in infection cases during the first quarter of 2022. Fortunately, the number of serious cases and deaths did not follow this same rate, reducing the impact of the Omicron variant on the country. [21].

Between epidemiological weeks 9 and 16 of the first half of 2022, it was possible to observe a drop in the positivity rate of cases in the municipality of Rio Grande and shortly thereafter this rate showed a large increase that continued during the first half of the year (**Fig. 2**). The increase in cases after this period coincides with early easing of security measures adopted throughout the country and a greater sense of security among the population after vaccination progress.

Cases of SARS-CoV-2 infection in the municipality of Rio Grande and in the State through data released by the State Department of Health with samples provided by LADI (HU-FURG) shows a very close profile during all epidemiological weeks in the first half of 2022. This demonstrates that the analysis carried out among the samples provided by LADI (HU-FURG) is representative of the general infection panorama in the municipality and that it follows the same trend as the State.

Genotyping for the S:K417N mutation, a defining mutation of the Omicron lineage, confirmed it as the main variant found during the first half of 2022 in the municipality of Rio Grande. This is a pattern similar to that found in the country. A study limitation, however, is that mutations selected for the genotyping did not allow differentiation between samples with profile BA.1 and BA.1.1 or BA.2 and their derivations within the clade or BA.4 and BA.5. Analysis of key mutations presents a limited result in identifying possible circulating lineages, as it is not possible to differentiate all sublineages that branch from a main group, particularly in a diverse group as Omicron. However, it still presents an effective result in identifying lineages and sublineages when we perform an assay using specific techniques and point mutations to differentiate clades. Furthermore, the greater the number of mutations selected in the assays, the greater the differentiation power that genotyping will present. The inclusion of the assay for 69/70del in our study allowed us to classify samples with a pattern similar to BA.1, BA.4 and BA.5 and differentiate the BA.2 group that does not have this deletion. This differentiation was important to be carried out in the study samples, taking into account the profile of variants circulating during the analyzed period.

Sequencing data of the RBD region is comparable with those achieved by genotyping, with a 100% concordance rate between both methodologies (**Table 3**). The BA.1 and BA.1.1 sublineages predominated in the country, state and Rio Grande between the months of January and March of the same year. This dominance was exceeded by BA.2 in April. [22].

Rio Grande sequences presented a profile with alternating prevalent lineages, close to that found in the state of Rio Grande do Sul. A difference was found in the prevalence of BA.4/5. In June, it was the most frequent lineage in the country and second most frequent in Rio Grande. However, it did not show great dominance in the State of Rio Grande do Sul, where BA.2 prevailed, followed by XAG. On the other hand, XAG did not show large numbers in the sequences deposited in the country and was not identified in the study sequences during the study period. Furthermore, the detection of some lineages was previously carried out in the municipality of Rio Grande compared to the state. BA.2 and BA.2.56 were identified in January and April 2022 respectively, one month before the sequences identified in the state of Rio Grande do Sul.

In the phylogenetic analysis, clade 21K (BA.1.1) is distinguished from BA.1 by the S:R346K mutation. The analysis also showed a diversification structure within clade 21L (BA.2). Sublineages such as BA.2.9/BA.2.9.3 and BA.2.81 were detected in multiple clusters with loss or gain mutation events in the clade. Sublineages may evolve differently in different populations or geographic contexts. The RBD, being a region of high functional importance, can evolve at variable rates, and the occurrence of homoplasy (where the same genetic trait appears in different lineages not through common descent, but through parallel or convergent evolution) can be more frequent [23].

In clade 21L (BA.2), we can observe a set of mutations in the RBD that are shared by everyone in this clade, such as S:T376A, S:D405N, S:R408, making it possible to differentiate clade 21K (BA.1). Clade 22C (BA.2.12.1) can be differentiated from clade 21L by the S:L452Q mutation. Clades 22A (BA.4) and 22B (BA.5) are not differentiated by the RBD region, although their R340 sequence is BA.4.6, which has differentiation S:S325P, S:I326F and S:R346T, has other sublineages, such as like BF.7(22B) which is in the same cluster.

Sanger sequencing limits the size of the fragment to be sequenced. Therefore, it does not allow a more complete investigation of all mutations present in the genome for differentiation of all clades [24]. However, although the identification of SARS-CoV-2 in samples from the first cases of infection occurred through complete genomic sequencing, this approach is not feasible for routine viral diagnosis due to its high cost and the delay in execution. Sanger sequencing can be an important ally during critical periods in faster monitoring of VOCs in circulation and in helping

decision-making to formulate control strategies and dissemination of new variants [24,25]. It is important to highlight that the use of Sanger does not replace NGS due to the limitations of the technique, but still, the development of genotyping and partial sequencing tests in regions of interest such as the RBD region are viable and important alternatives to be prioritized in endemic periods.

This study has limitations regarding the total sample size for sequencing and a discrepancy between the number of samples analyzed in each month of study. The latter is justified by the low positivity in certain months and the low quality and/quantity of some samples. **(Table 3)**. However, there are only 40 samples from Pelotas, a neighboring city, and a single sample from Rio Grande from the time period analyzed deposited at GISAID. To this date, only two sequences from Rio Grande and 119 from Pelotas can be found. Moreover data from Porto Alegre are overrepresented within samples from the State. To the best of our knowledge, this is the first study to systematic analyzed variant spread in the Rio Grande. Therefore, given the lack of genomic surveillance in the study region, our data contributes to determine the spread of variants in our region.

5. Conclusion

Rapid and effective identification of VOCs is essential for SARS-CoV-2 genomic surveillance. In this study, the genotyping results were in agreement with the results obtained by Sanger sequencing, which together demonstrated a great predominance of VOC Omicron during the study period. The BA.2 and BA.2.56 variants were identified a month earlier in the city of Rio Grande when comparing the sequences deposited in GISAID by the state of Rio Grande do Sul. Our study suggests that the differences in viral circulation present in the city of Rio Grande may be related to the city's geographic and economic characteristics. Given the scarcity of data available, this study makes an important contribution for genomic surveillance in the country's extreme south.

Acknowledgments

We would like to thank the collaborators at the Hospital for Diagnostic Support in Infectious Diseases at the Federal University of Rio Grande and the Institute of

Basic Health Sciences of Porto Alegre for welcoming us and for providing vacancies to carry out this research.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

VPM received doctoral fellowship funding from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LLM received a Scientific initiation scholarship from Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Ethics approval statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande (FURG, CAAE 58580222.7.0000.5324) and by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, CAAE No. 58580222.7.3001.5347). All analyses were performed in samples recovered from diagnostic discard after routine processing, with no additional risks to the patients, and all patient data were anonymized. Therefore, the requirement for individual informed consent was waived by both the ethics committee. All methods were carried out following relevant guidelines and regulations of our Ethics Committees.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Harvey W T et al (2022) SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>
2. Brito Sávio, Breno P et al (2020) Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. *J Bras Patol Med Lab.* <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200056>
3. Zhang Jun, Xiao Tianshu, Cai Yongfei, Chen Bing (2021) Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology.* <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>

4. Tosta Stephane et al (2023) Global SARS-CoV-2 genomic surveillance: What we have learned (so far). *Infect Genet Evol.*
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105405>
5. Menezes Diego et al (2022) SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Brazil: A Systematic Review with Scientometric Analysis. *Viruses.*
<https://doi.org/10.3390/v14122715>
6. McCombie W R, McPherson J D, Mardis E R (2019) Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.*
10.1101/cshperspect.a036798.
7. Zhou P et al (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
8. Chiara M et al (2021) Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform.*
<https://doi.org/10.1093/bib/bbaa297>
9. Daniels Rodney S et al (2021) A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. *Influenza Other Respi Viruses.* <https://doi.org/10.1111/irv.12892>
10. Ko Ko et al (2022) Mass Screening of SARS-CoV-2 Variants using Sanger Sequencing Strategy in Hiroshima, Japan. *Sci Rep.*
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-04952-2>
11. Salles, Thiago Souza et al (2022) Genomic surveillance of SARS-CoV-2 Spike gene by sanger sequencing. *Plos One.*
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262170>
12. Dhanasooraj Dhananjayan et al (2022) Genomic surveillance of SARS-CoV-2 by sequencing the RBD region using Sanger sequencing from North Kerala. *Frontiers in Public Health.* <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.974667>
13. Deminco Felice et al (2022) A Simplified Sanger Sequencing Method for Detection of Relevant SARS-CoV-2 Variants. *Diagnostics.*
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12112609>
14. Chrysostomou A C et al (2023) Detection of Circulating SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs) Using a Multiallelic Spectral Genotyping Assay. *Life*
<https://doi.org/10.3390/life13020304>
15. Bray Neil (2024) RT-PCR genotyping assays to identify SARS-CoV-2 variants in England in 2021: a design and retrospective evaluation study. *The Lancet Microbe.* [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00320-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00320-8)
16. Vanoni S et al (2022) SARS-CoV-2 variants of concern surveillance including Ómicron using RT-PCR-based genotyping offers comparable performance to whole genome sequencing. *Front Cell Infect Microbiol.*
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.960065>
17. Koets Lianne et al (2023) Efficient SARS-CoV-2 Surveillance during the Pandemic-Endemic Transition Using PCR-Based Genotyping Assays. *Microbiol Spectr.* <https://doi.org/10.1128/spectrum.03450-22>
18. Aksamentov Ivan et al (2021) Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J Open Source Softw.*
<https://doi.org/10.21105/joss.03773>
19. Brazil. Ministry of Health (2020) Painel Coronavírus.
<https://covid.saude.gov.br>. Accessed 30 jun 2024.

20. Vogels Chantal B F et al (2021) Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. PLOS Biology. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001236>
21. Paho (2022) As COVID-19 cases nearly double in the Americas, health workers must be protected, PAHO says. <https://www.paho.org/en/news/12-1-2022-covid-19-cases-nearly-double-americas-health-workers-must-be-protected-paho-says>. Accessed 15 september 2024.
22. Khare S et al (2021) GISAID's Role in Pandemic Response. China CDC Weekly. 10.46234/ccdcw2021.255
23. Gobeil Sophie M.-C. et al (2021) Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity. Science. <https://doi.org/10.1126/science.abi6226>
24. Rodrigues G M et al (2023) SARS-CoV-2 Variants of Concern: Presumptive Identification via Sanger Sequencing Analysis of the Receptor Binding Domain (RBD) Region of the S Gene. Diagnostics. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13071256>
25. Silva Thais et al (2024) Enhancing the epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 using Sanger sequencing to identify circulating variants and . Braz J Microbiol. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01387-x>

Table 1. Nasopharyngeal swab samples characterization. (n=363)

Variable	%	n		
Sex				
Male	36.9	134		
Female	63.1	229		
Age group				
			Male	Female
0 a 2 years	4.9	18	10	8
3 to 4 years	0.5	2	1	1
5 to 11 years	1.4	5	3	2
12 to 17 years	1.4	5	3	2
18 to 29 years	20.4	74	29	45
30 to 39 years	27.8	101	33	68
40 to 49 years	18.2	66	24	42
50 to 59 years	10.5	38	10	28
60 to 69 years	6.1	22	9	13
70 to 79 years	3.3	12	4	8
80 years or more	5.5	20	8	12
Sample origin				
MHD RG	32	116		
Santa Casa Rio Grande	1.9	7		
HU-FURG employees	29.2	106		
HU-FURG patients	36.9	134		

*MHD RG = Municipal Health Department of Rio Grande

Table 2. Genotyping results (n=363).

<i>Group</i>	<i>Samples</i>	Mutation				<i>Probable variant</i>
		<i>S:P681R (B.1.617.2)</i>	<i>S:T20N (P.1)</i>	<i>S:K417N (B.1.1.529)</i>	<i>S:del69/70 (BA.1/2/4/5/BQ.1)</i>	
1	1	Positive	Negative	Negative	Negative	B.1.617.2
2	1	Inconclusive	Negative	Inconclusive	Positive	Inconclusive
2	201	Inconclusive	Negative	Positive	Positive	BA.1
3	2	Inconclusive	Negative	Positive	Negative	Inconclusive
4	96	Inconclusive	Inconclusive	Positive	Negative	BA.2
5	62	Inconclusive	Inconclusive	Positive	Positive	BA.4/5

Positive: Positive result for the probe that marks the mutation region.

Negative: Negative result for the probe marking the reference region.

Inconclusive: Negative result for the probe that marks the reference and mutation regions.

Table 3. Identification of VOCs found in clinical samples by Sanger sequencing and comparison with genotyping results. (n=67).

Sample ID	Month	RT-qPCR Ct	Genotyping	aa substitution differential	Sanger identification	WHO VOCs
1	January	17.45	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
2	January	18.95	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
3	January	17.36	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
4	January	16.45	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
5	January	19.09	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
6	January	19.05	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
7	January	19.87	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
8	January	18.78	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
9	January	15.93	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
10	January	18.81	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
11	January	17.53	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
12	January	19.05	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
13	January	25.04	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
14	January	28.08	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
15	January	29.37	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
16	January	18.67	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
17	January	18.68	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
18	January	19.95	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
19	January	21.75	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
20	January	17.64	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
21	January	21.41	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
22	January	18	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
23	January	16.52	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
24	January	17.7	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
25	January	17.3	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
26	January	29.7	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
27	January	17.7	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
28	January	25.3	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
29	January	16.6	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
30	January	20.2	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
31	January	24.6	AY.4	S:L452R,S:T478K	AY.4	Delta
32	January	23.2	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
33	January	20.0	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
34	January	16.0	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
35	January	18.1	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron

36	January	29.5	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
37	January	20.9	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
38	January	19.5	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
39	January	20.9	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
40	January	16.5	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron
41	February	18.8	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
42	March	15.8	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
43	March	20.58	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
44	March	18.94	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
45	April	22.06	BA.2	S:L452M,S:K417N	BA.2.56	Omicron
46	April	20.71	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
47	May	20.83	BA.1	S:R346K,S:K417N	BA.1.1	Omicron
48	May	18.94	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
49	May	19.78	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
50	May	19.78	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
51	May	18.73	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
52	June	17.84	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
53	June	27.82	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
54	June	28.5	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
55	June	10.9	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
56	June	12.0	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
57	June	10.4	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
58	June	10.7	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
59	June	15.2	BA.2	S:L452Q,S:K417N	BA.2.12.1	Omicron
60	June	13.4	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
61	June	11.7	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
62	June	8.6	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
63	June	13.6	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
64	June	15.2	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
65	June	17.7	BA.4/5	S:K417N,S:L452R,S:F486V	BA.4/5	Omicron
66	June	11.9	BA.2	S:T376A,S:D405N,S:R408S	BA.2	Omicron
67	June	11.7	BA.1	S:K417N	BA.1	Omicron

Ct = cycle threshold, aa = amino acids

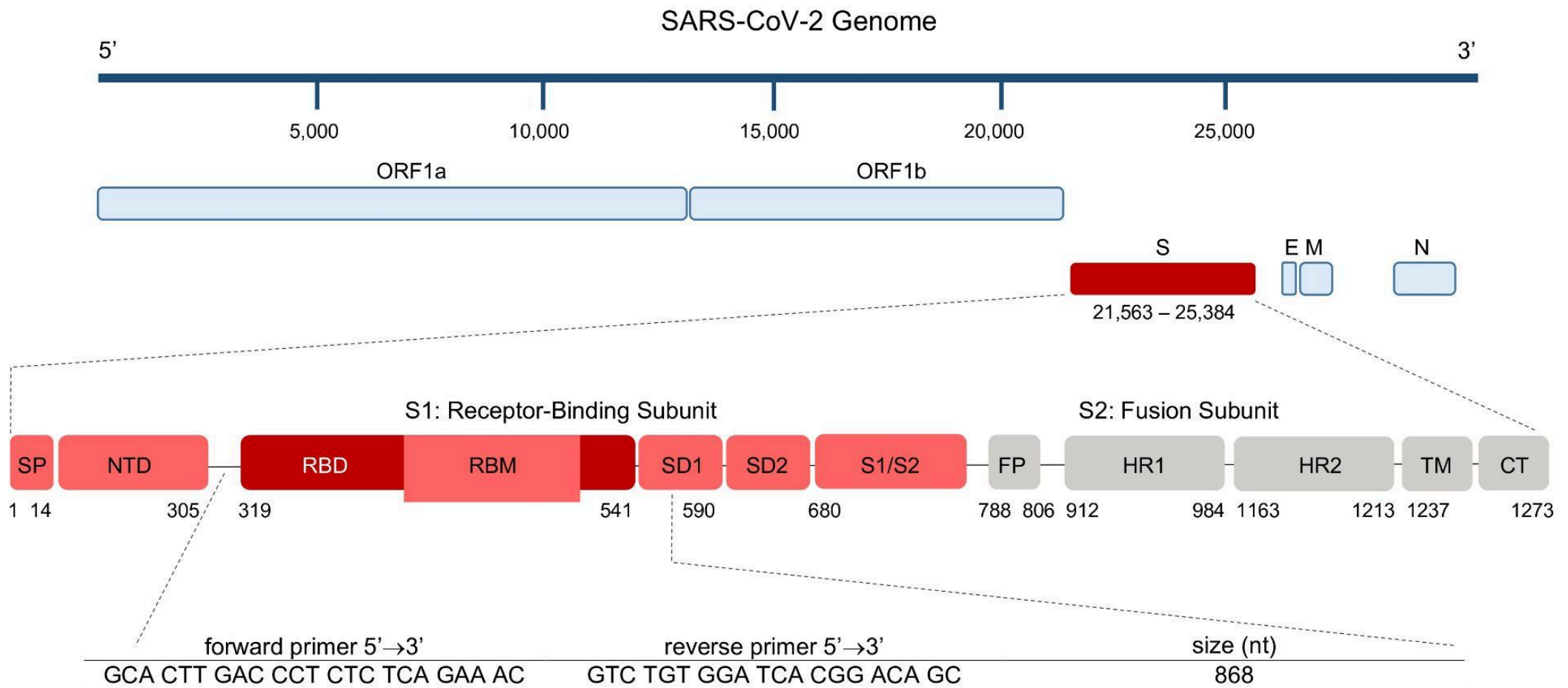


Fig 1. SARS-COV-2 genome and primers used for sequencing the RBD region.

ORF: Open reading frame. S: spike protein. E: Envelope protein. M: membrane protein. N: nucleocapsid protein. SP: Signal Peptide. NTD: N-Terminal Domain. RBD: Receptor-Binding Domain. RBM: Receptor-Binding Motif. SD: Subdomain. FP: Fusion protein. HR: heptad repeat. TM: Transmembrane domain. CT: Cytosolic Tail.

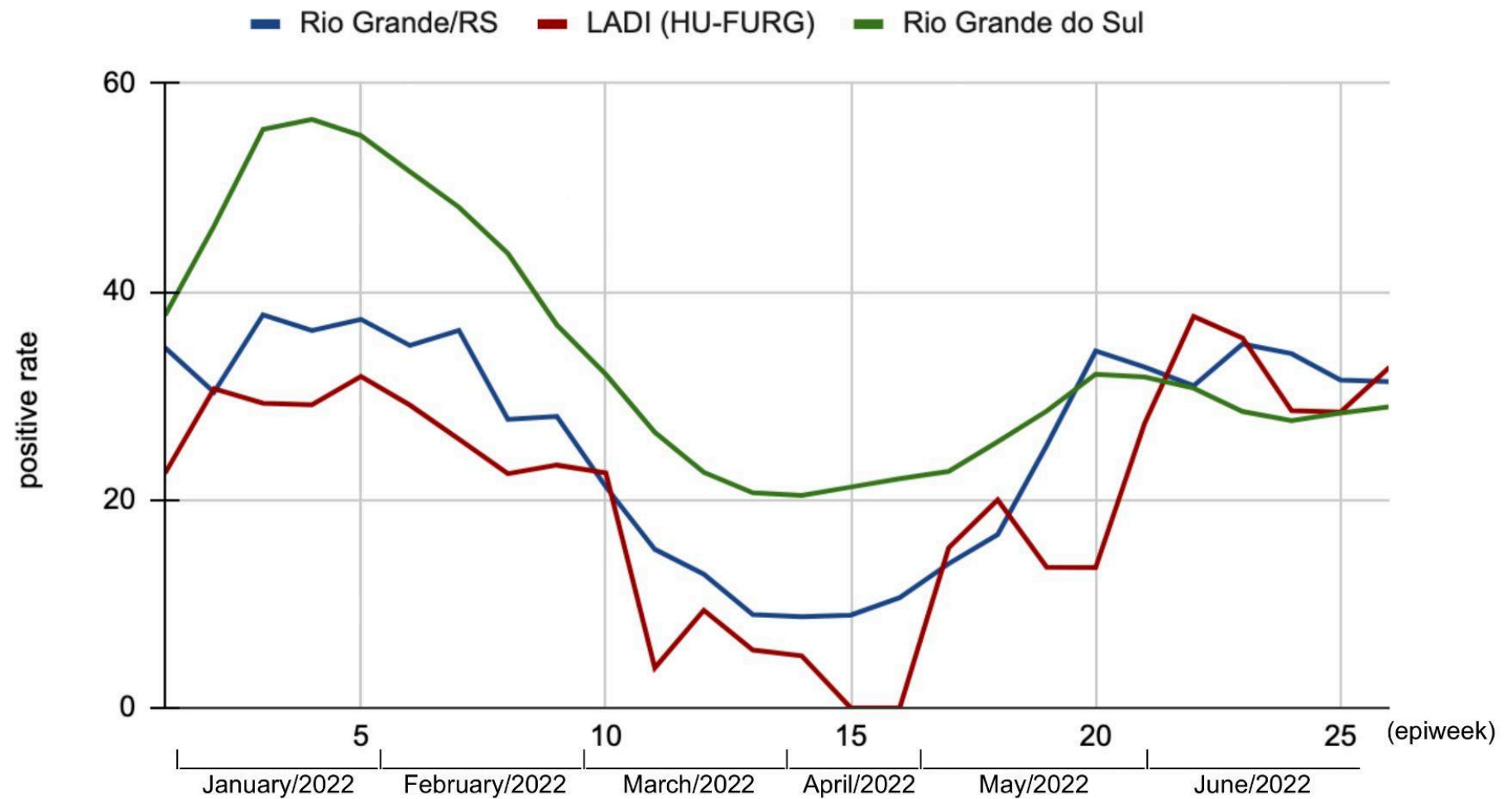


Fig. 2 - SARS-CoV-2 infection positivity rate per epidemiological week in the state of Rio Grande do Sul and the city of Rio Grande, extreme south of Brazil, from January to June 2022.

Source: State Health Department of Rio Grande do Sul e LADI HU-FURG.

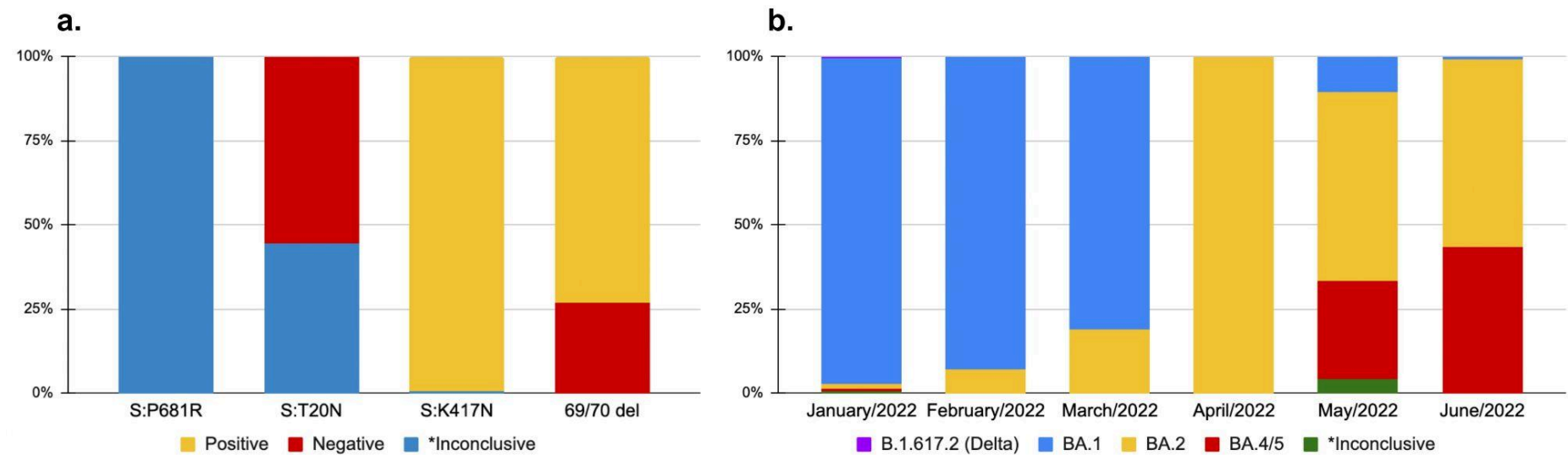


Fig 3. Distribution of VOCs identified by genotyping in nasopharyngeal swab samples from the city of Rio Grande, extreme south of Brasil (n=363). **a.** Overall genotyping results for each mutation. **b.** Monthly distribution of variants. **Inconclusive: lack of signal in genotyping assays, despite sample quality.*

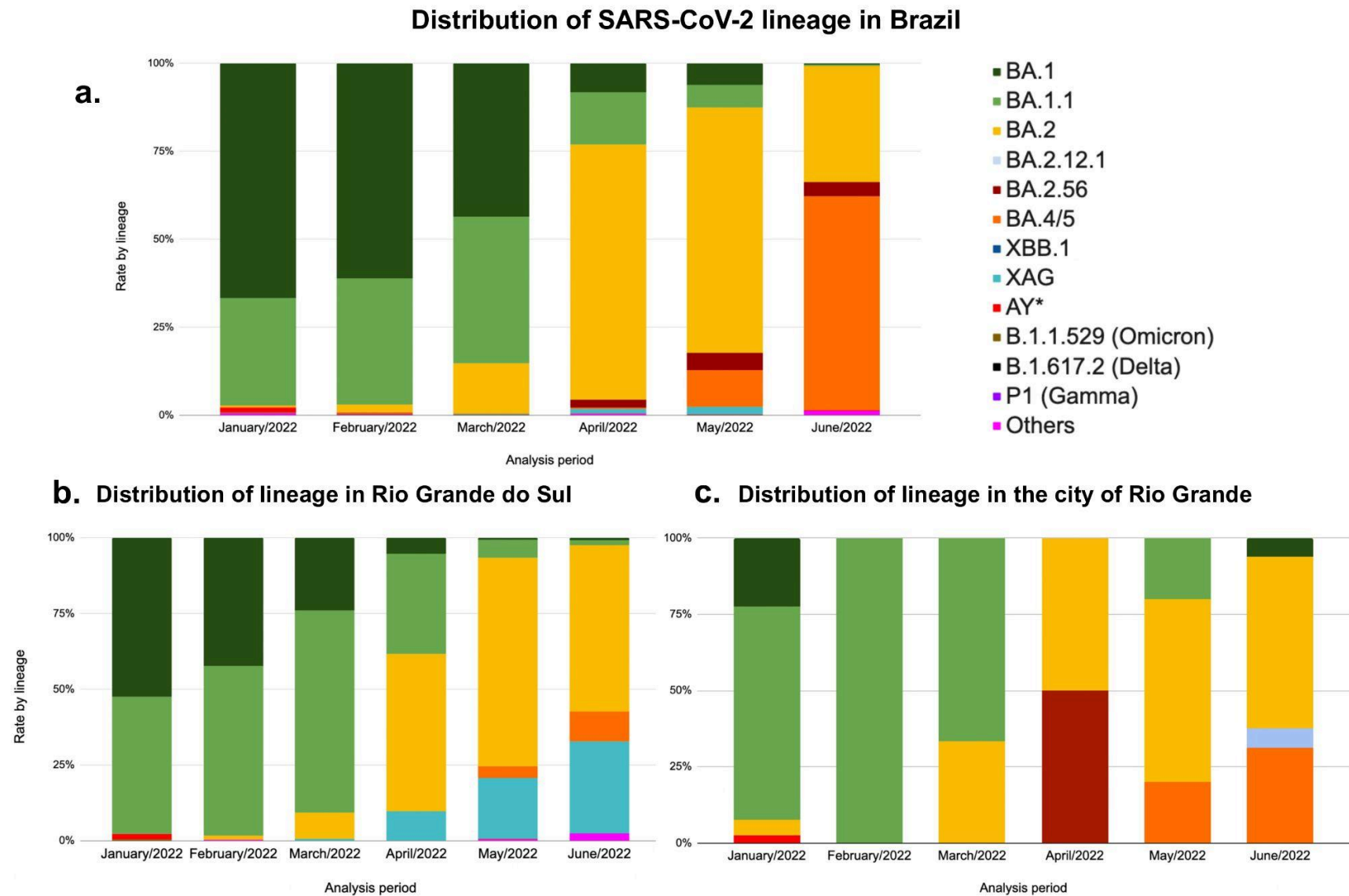


Fig 4. Distribution of SARS-CoV-2 lineage from January and June 2022. **a.** GISAID lineages from Brazil (n=64.253). **b.** GISAID lineages from Rio Grande do Sul (n=2.304). **c.** Lineages from the city of Rio Grande (n=67).

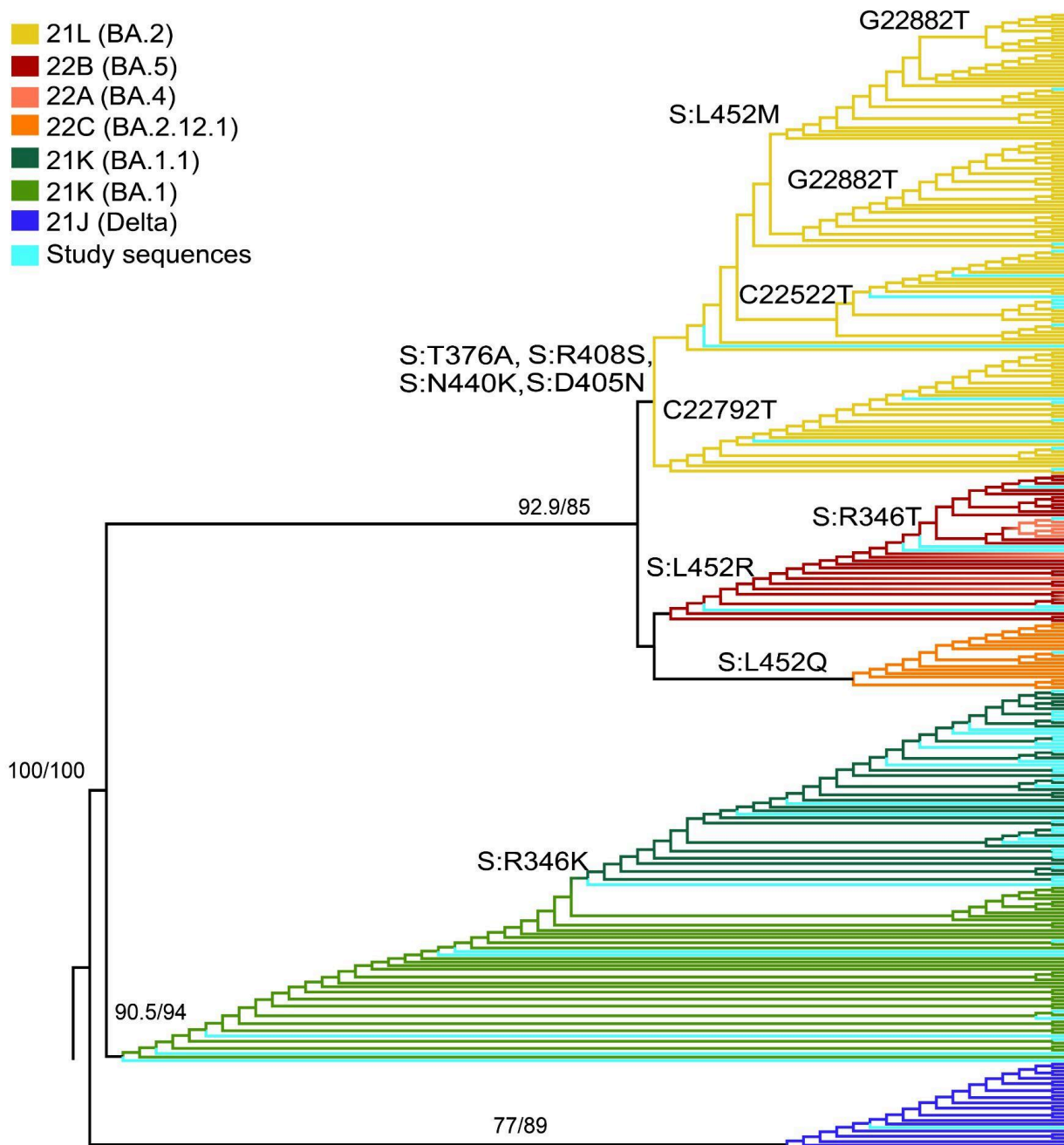


Fig 5. Phylogenetic analysis by subsampling of the 256 complete SARS-CoV-2 genomes deposited in GISAID representing the Brazilian states and clades of circulating viral lineages (21K, 21J, 21L, 22B, 22C and 22A) and comparison with the 67 genomes from the study in months from January to June 2022. The figure was generated in FigTree v 1.4.4.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Expected profile of mutations in SARS-CoV-2 lineages.

<i>Lineage</i>	<i>Mutation</i>				
	<i>S:P681R</i> (B.1.617.2)	<i>S:P681H</i> (B.1.1.529)	<i>S:T20N</i> (P.1)	<i>S:K417N</i> (B.1.1.529)	<i>S:del69/70</i> (BA.1/4/5/BQ.1)
B.1.617.2	Positive	Inconclusive	-	-	-
BA.1	Inconclusive	Positive	-	Positive	Positive
BA.2	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	-
BA.4	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	Positive
BA.5	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	Positive
BA.2.12.1	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	-
BQ.1	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	Positive
XBB	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	-
XBB.1.5	Inconclusive	Positive	Inconclusive	Positive	-

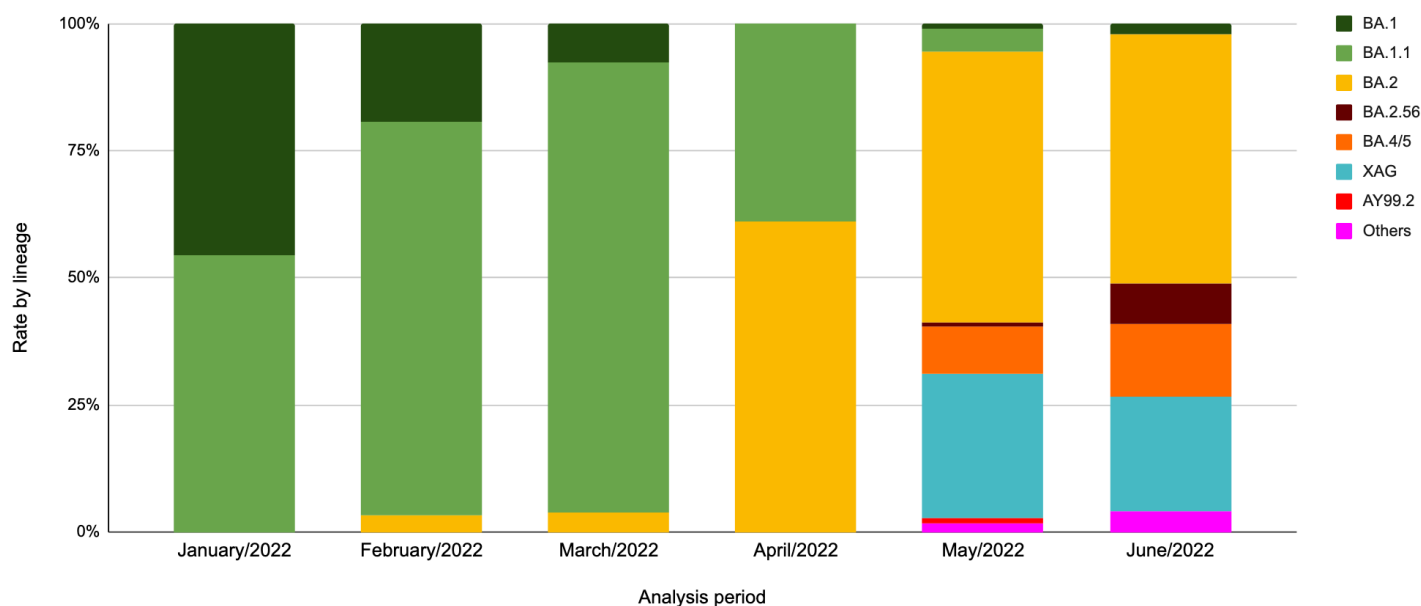
Source: CoVariants.org

Positive: Positive result for the probe that marks the mutation region.

Negative: Negative result for the probe marking the reference region.

Inconclusive: Negative result for the probe that marks the reference and mutation regions.

a. Distribution of lineages in the city of Porto Alegre.



b. Distribution of lineages in the city of Pelotas.

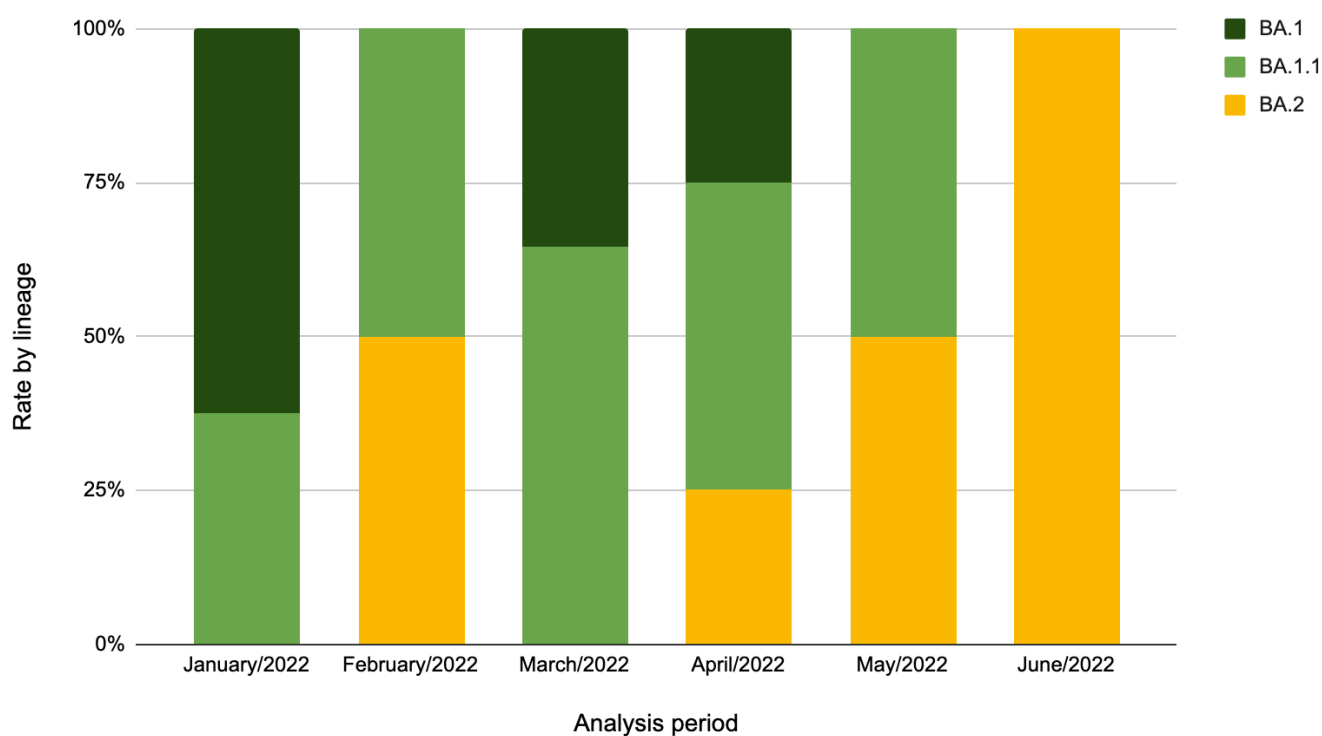


Fig S1. SARS-CoV-2 sequences deposited in GISAID between January and June 2022. **a.** SARS-CoV-2 lineages in the city Porto Alegre (n= 290). **b.** SARS-CoV-2 lineages in the city Pelotas (n= 40).

Source: Khare et al., 2023.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo de *screening* com sondas comerciais Taqman desenvolvido durante este projeto foi validado e trouxe bons resultados ao conseguir realizar a triagem das variantes presente nas amostras do estudo, utilizando o perfil epidemiológico do período e selecionando mutações-chaves para a identificação provável da variante presente nas amostras.

Os resultados obtidos pela triagem realizada utilizando o método de genotipagem e o sequenciamento parcial do genoma do SARS-CoV-2 apresentaram resultados concordantes em 100% das amostras, validando a qualidade do protocolo que foi desenvolvido durante este estudo.

O perfil das variantes circulantes de SARS-CoV-2 presente nas amostras do estudo apresentou um perfil próximo ao que foi encontrado nas amostras do país durante o período. Em uma análise comparativa entre as amostras do estudo e o perfil das variantes circulantes no estado do Rio Grande do Sul é possível verificar que a BA.2 foi identificada no mês de janeiro de 2022, um mês antes da identificação das primeiras sequências depositadas pelo estado do Rio Grande do Sul. O mesmo aconteceu com a BA.2.56 que foi identificada pela primeira vez no mês de abril pelo estudo e só sendo identificada nas amostras do estado no mês de maio do mesmo ano. Ao analisar a circulação de variantes de SARS-CoV-2 na cidade de Porto Alegre é possível identificar que se trata de um perfil muito próximo ao apresentado pelo estado do Rio Grande do Sul, já a cidade de Pelotas apresentou pouca diversificação das variantes circulantes, não sendo identificada nenhuma sequência pertencente a BA.2.56 ou do grupo BA.4/5 que dominou as sequências entre os meses de Maio e Junho de 2022 e esteve presente nas amostras do estado e nas amostras do estudo pertencentes a cidade de Rio Grande.

As diferenças de circulação viral presentes na cidade de Rio Grande, no extremo sul do país, pode sugerir um perfil diferente na circulação de cepas virais pelas suas características geográficas e econômicas. As limitações do estudo quanto ao tamanho amostral para o sequenciamento genômico podem ser diminuídas através de metodologias mais baratas e mais acessíveis como a genotipagem e o sequenciamento de Sanger, que podem ajudar a diminuir as disparidades de informações disponíveis para a vigilância genômica e contribuir na tomada de decisão durante período de críticos.