



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

BÁRBARA NAZLY RODRIGUES SANTOS

**DISTRIBUIÇÃO E PADRÕES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR SARS-COV-2 E  
DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DO TIPO “POINT-OF-CARE” PARA O  
DIAGNÓSTICO DA COVID-19**

Recife  
2022

BÁRBARA NAZLY RODRIGUES SANTOS

**DISTRIBUIÇÃO E PADRÕES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR SARS-COV-2 E  
DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DO TIPO “POINT-OF-CARE” PARA O  
DIAGNÓSTICO DA COVID-19**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Suelen Cristina de Lima

Recife

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

Santos, Bárbara Nazly Rodrigues

Distribuição e padrões de contaminação ambiental por SARS-CoV-2 e desenvolvimento de um teste do tipo "Point-of-Care" para o diagnóstico da COVID-19 / Bárbara Nazly Rodrigues Santos – 2022.

159 f. : il., fig., tab.

Orientador: Lindomar José Pena.

Coorientadora: Suelen Cristina de Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Coronavírus- infecções 2. Diagnóstico 3. Transmissão I. Pena, Lindomar José (orient.) II. Lima, Suelen Cristina de (coorient.) III. Título.

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -226

BÁRBARA NAZLY RODRIGUES SANTOS

**DISTRIBUIÇÃO E PADRÕES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR SARS-COV-2 E  
DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DO TIPO “POINT-OF-CARE” PARA O  
DIAGNÓSTICO DA COVID-19**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Aprovada em: 30/08/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Lindomar José Pena  
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães

---

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Sandrin Garcia  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior  
Universidade Federal de Alagoas

---

Prof. Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

A minha família pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões pessoais e profissionais, as quais me impulsionaram a chegar até aqui. Eles são minha motivação e inspiração diária.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter permitido que tudo acontecesse, sem Ele eu jamais teria conseguido. Todos os dias oro, agradeço e peço que Ele me guie, e assim tem sido. Que SEMPRE seja feita à Sua vontade!

Aos meus pais Lídia e Josivaldo, e ao meu irmão Jordan, vocês são minha vida e minha base. Obrigada por me incentivarem e acreditarem em mim, obrigada pelos conselhos, palavras de consolo, abraços, apoio constante, todos os sacrifícios para que eu alcançasse os meus sonhos. Vocês são o que tenho de mais precioso. Tudo que faço é por vocês.

Ao meu marido Thiago, meu amor e amigo, compartilhar essa vida com você é uma benção Divina. Obrigada por se fazer presente em cada gesto do dia a dia, obrigada por cuidar tão bem de mim e apoiar as minhas escolhas, desde que eu lhe conheci eu nunca mais me senti sozinha. Nosso caminho é longo, sigamos.

A minha estrelinha Mel, perder você nesses dois anos foi o momento mais difícil que enfrentei. Obrigada por ter me ensinado tanto sobre o amor. Durante as noites em claro, escrevendo esse trabalho, era a sua companhia (mesmo que só em uma foto ao lado do computador) que me animava e me fazia prosseguir.

A minha amiga e irmã Hemilly, que está vivendo mais uma vez esse momento especial ao meu lado. Encontrar você e passar a tê-la na minha vida foi a maior benção que conquistei desde o início da minha carreira profissional. A nossa trajetória sempre será marcada por termos uma a outra. Não importa aonde estejamos, seguiremos juntas, vencendo os desafios e conquistando sonhos.

Aos demais amigos e familiares, em especial ao meu avô José Nicodemos, que sempre se alegra e orgulha com minhas conquistas, ter o senhor na minha vida é muito especial.

Ao meu orientador Lindomar Pena, que no momento de maior fragilidade que vivenciei me acolheu e acreditou no meu potencial. Aceitou o desafio de me integrar ao seu grupo de pesquisa restando apenas 10 meses para o término do Doutorado. Para mim parecia impossível, para ele nunca foi. Ele sempre fez questão de deixar claro que eu iria conseguir. Obrigada por ter permitido que eu evoluísse tanto nesses anos de trabalho, o aprendizado que adquiri me tornaram uma profissional muito mais preparada.

A minha coorientadora Suelen, por todo conhecimento repassado (na teoria e na prática, literalmente, rs), conselhos e palavras de incentivo. Professora, pesquisadora e amiga brilhante. Muito obrigada por ter me guiado com tanta sabedoria e paciência.

A Jefferson, por ter idealizado este estudo, liderado e me repassado todos os ensinamentos para que eu conduzisse até o dia da minha defesa, sempre com muito generosidade e humildade. Você é um profissional raro, trabalhar ao seu lado é sensacional.

Aos meus colegas Renata, Isabela, Ronaldo, Wendel, Poliana, Willyene, Jéssica, Caroline e Alysson, vocês são/foram muito mais do que companheiros de rotina laboratorial. Grata demais pela amizade e por toda contribuição dada para conclusão deste trabalho. Essa equipe é inigualável.

Ao Laboratório Central de Pernambuco (LACEN/PE), especialmente ao Dr. Jurandy e também ao Dr. Abelardo da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pelas amostras fornecidas e pelos comentários críticos durante a execução dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora Drs. Antônio Carlos, Abelardo, Ronaldo e Dra. Paula por aceitarem o convite de avaliar este trabalho e contribuir para o meu crescimento profissional.

Ao programa de Pós Graduação em Genética, corpo docente, administrativo e colegas de turma do Doutorado por todo o suporte acadêmico e amizade nesses quase 6 anos.

Aos profissionais do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ-PE, em especial aos pesquisadores do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), por todo suporte técnico para realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Saúde (FIOTEC), pelo financiamento do projeto e bolsas de pesquisa.

## RESUMO

A pandemia COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, disseminou-se rapidamente devido a alta transmissibilidade do vírus, o qual infecta humanos a partir do contato direto com pessoas infectadas, ou por contato indireto através de superfícies contaminadas. Atualmente, o diagnóstico da COVID-19 é realizado através da RT-qPCR. Porém, devido às limitações desta técnica, testes simples, sensíveis e de baixo custo, como o RT-LAMP, passaram a ser aplicados para detecção do SARS-CoV-2. Este estudo teve por objetivo analisar os padrões da contaminação ambiental por SARS-CoV-2 em áreas urbanas públicas e desenvolver um teste POC baseado em RT-LAMP para o diagnóstico da COVID-19 em amostras humanas. Um total de 400 amostras de superfícies foram coletadas em fevereiro de 2021 no Recife, 24,2% foram positivas para o SARS-CoV-2 e 97,4% dos locais de coleta apresentaram pelo menos uma amostra contaminada. Em paralelo, ensaios RT-LAMP foram conduzidos para padronização da técnica, avaliação da sensibilidade e especificidade, e validação clínica com 317 amostras humanas. O RT-LAMP apresentou elevada sensibilidade, detectando o SARS-CoV-2 em 15 minutos, sem necessidade de extração de RNA. O desempenho foi similar ao RT-qPCR, porém com tempo e custo reduzidos. Os dados aqui apresentados demonstram os pontos de controle críticos para interrupção da transmissão do SARS-CoV-2 em Recife, cidade muito afetada pela COVID-19. Além da possibilidade de aplicação POC da plataforma diagnóstica desenvolvida, visando controlar a pandemia especialmente em áreas com poucos recursos.

**Palavras-chave:** Fômites; Transmissão; Diagnóstico; RT-LAMP; COVID-19; SARS-CoV-2.

## ABSTRACT

COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, spread rapidly due to high transmissibility of the virus, which infects humans through direct contact with infected people, or through indirect contact contaminated surfaces. Currently, the diagnosis of COVID-19 is performed for RT-qPCR. However, due to the limitations of this technique, simple, sensitive and low-cost tests, such as RT-LAMP, have been applied to detect SARS-CoV-2. This study aimed analyze the patterns of environmental contamination by SARS-CoV-2 in public urban areas and develop an RT-LAMP-based POC test for the diagnosis of COVID-19 in human samples. A total of 400 surface samples were collected in February 2021 in Recife, 24.2% were positive for SARS-CoV-2 and 97.4% of the collection sites had at least one contaminated sample. In parallel, RT-LAMP assays were conducted for standardization of the technique, evaluation of sensitivity and specificity, and clinical validation with 317 human samples. RT-LAMP showed high sensitivity, detecting SARS-CoV-2 in 15 minutes, without the need for RNA extraction. The performance was similar to RT-qPCR, but with reduced time and cost. The data presented here demonstrate the critical control points for interrupting the transmission of SARS-CoV-2 in Recife, a city heavily affected by COVID-19. In addition to the possibility of POC application of the diagnostic platform developed, aiming to control the pandemic especially in areas with few resources.

**Keywords:** Fomites; Transmission; Diagnosis; RT-LAMP; COVID-19; SARS-CoV-2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Classificação taxonômica (A) e posições para os sete HCoV conhecidos, e (B) análise da árvore filogenética dos CoVs construída com base no gene S usando o software “Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6” sob o método de junção de vizinhos e 1000 valores de bootstrap ..... 30
- Figura 2 - Disseminação da COVID-19 a nível mundial com enfoque para o número de casos e mortes obtidos a partir de dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) no dia 15 de julho de 2022 ..... 33
- Figura 3 - Representação esquemática dos três HCoV (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) e o ciclo de transmissão para humanos a partir de morcegos e dos hospedeiros intermediários ..... 40
- Figura 4 - Potenciais vias de transmissão para o SARS-CoV-2 .....42
- Figura 5 - Representação esquemática da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2 baseada na sequência referência (EPI\_ISL\_412026). (A) As proteínas estruturais que recobrem o vírion são as proteínas spike (S), bem como as proteínas de membrana (M) e envelope (E). O RNA genômico encontra-se associado a proteínas nucleocapsídicas fosforiladas (N) dentro de bicamadas fosfolipídicas. (B) O genoma do SARS-CoV-2 (~ 29kb) é composto pela região 5' UTR, ORF1a/b que codifica 16 nsps responsáveis pela replicação do vírus, quatro genes que codificam proteínas estruturais (S, E, M e N), seis a nove genes que codificam proteínas acessórias (3, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 10b, 13 e 14) e região 3' UTR. Abreviaturas: 5' UTR, região 5' não traduzida; ORF, quadro de leitura aberto; nsp, proteína não estrutural ..... 50
- Figura 6 - Representação esquemática da glicoproteína Spike (S) do SARS-CoV-2, com destaque para as suas subunidades, domínios que as compõem e respectivas funções desempenhadas durante o processo de infecção

viral. Abreviaturas: HR1, repetição heptada 1; HR2, repetição heptada 2; S1, subunidade 1; S2, subunidade 2 ..... 52

Figura 7 - Características clínicas da COVID-19. Os sintomas típicos da COVID-19 são febre, tosse seca, fadiga e, em casos graves dispneia. Crianças e adultos jovens geralmente são assintomáticos, enquanto idosos e pessoas com comorbidades correm maior risco de doença grave, insuficiência respiratória e morte ..... 57

Figura 8 - Linha do tempo da COVID-19 pós-aguda. A COVID-19 aguda geralmente dura até 4 semanas a partir do início dos sintomas, além do qual o SARS-CoV-2 competente em replicação não foi isolado. A COVID-19 pós-aguda é definida como sintomas persistentes e/ou complicações tardias ou de longo prazo além de 4 semanas do início dos sintomas. Os sintomas comuns observados na COVID-19 pós-aguda estão resumidos na figura ..... 59

Figura 9 - Replicação viral do SARS-coV-2 em células alveolares, mediadores imunológicos envolvidos no processo e as principais manifestações clínicas desencadeadas ..... 62

Figura 10 - Plataformas diagnósticas para detecção da COVID-19 ..... 65

Figura 11 - Teste sorológico para detecção do SARS-CoV-2. O fluxo de trabalho começa com a adição do soro do paciente ao poço de fluxo de amostra. (1) O tampão salino é adicionado por gotejamento (2) na amostra de soro (3) até que o anticorpo-ouro de coelho apareça no poço de controle ©. Uma banda de teste positiva indica a presença de anticorpos contra COVID-19 (4-6). Os resultados sem uma banda C positiva são inválidos (7). Este ensaio mostra uma resposta pós-imune e pode mostrar resultados negativos para pacientes recentemente infectados. Também pode detectar vírus em pessoas previamente infectadas, mas assintomáticas ..... 69

Figura 12 - Ensaio de RT-qPCR para detecção de infecção por SARS-CoV-2. 1. Coleta de amostra de pacientes (swab nasofaríngeo). 2 -3. O RNA é extraído de fluidos que contêm células infectadas com SARS-CoV-2 e partículas virais livres. O RNA viral recuperado é então transcrito reversamente para cDNA e amplificado para detecção de ácidos nucleicos virais. 4. As regiões conservadas dos genes RdRP e E são as sequências virais alvo para amplificação utilizando sonda fluorogênica por PCR quantitativa. 5. Casos positivos ultrapassam o limite de detecção ..... 75

Figura 13 - Oligonucleotídeos utilizados na reação LAMP. FIP (primer interno direto) contém uma região F2 complementar a F2c do molde e uma região livre F1c complementar a F1 na fita recém-formada; BIP (primer interno reverso) contém uma região B2 complementar a B2c do molde e uma região livre B1c complementar a B1 na fita recém-formada; F3 (primer externo direto) contém uma região F3 complementar a F3c do molde; B3 (primer externo reverso) contém a região B3 complementar a B3c do molde; FL (primer loop direto) é complementar ao loop de fita simples entre as regiões F2 e F1; BL (primer loop reverso) é complementar ao loop de fita simples entre as regiões B2 e B ..... 81

Figura 14 - Princípios de amplificação do LAMP. (A) Etapa não cíclica (1-8): Onde ocorre a formação das alças-hastes de DNA com estrutura em forma de haltere em ambas as extremidades e que está preparada para entrar na etapa de amplificação cíclica. Inicialmente, a atividade de deslocamento de fita da Bst DNA polimerase auxilia na síntese de uma fita complementar de DNA, começando com FIP. O *primer* externo (F3) então desloca a fita complementar ligada a FIP, que forma uma estrutura de haste-alça na extremidade 5', a qual servirá como um molde para a síntese de DNA iniciada por BIP e subsequente síntese de DNA por deslocamento de fita iniciada por B3. O produto final é uma estrutura com alças de haste em cada extremidade. (B) Princípios de amplificação LAMP. Etapa de amplificação cíclica (9-11): amplificação de alça-haste

utilizando *primers* internos. O produto são as estruturas de tamanhos diferentes que consistem em repetições alternadamente invertidas da sequência alvo na mesma fita, dando uma estrutura semelhante à couve-flor (C) Amplificação LAMP acelerada usando primers de loop. Os primers de loop são complementares à região de loop de fita simples. Eles fornecem locais de partida adicionais para a síntese de DNA e aceleram a amplificação, reduzindo assim o tempo de reação para menos de 30 min .....83

Figura 15 - Esquema simplificado com algumas alternativas de métodos para detecção dos produtos LAMP. A) A análise visual ao final da reação ocorre pelo uso de corantes que exibem mudanças simples de cor ou turbidimetria após a amplificação. B) Semelhante ao qPCR, os métodos de detecção em tempo real usam corantes fluorescentes para monitorar o aumento da carga viral à medida que a amplificação avança. O sinal fluorescente pode ser independente de sequência (por exemplo, intercalantes de DNA) ou dependente de sequência (baseado em hibridização). C) Os produtos de amplificação do LAMP podem ser verificados por eletroforese em gel de agarose seguida de coloração de DNA, embora isso exija manipulação pós-amplificação e o risco maior de contaminação cruzada entre experimentos ..... 87

Figura 16 - Etapas no processamento de amostras para a reação LAMP. Reação LAMP em um banho-maria simples e detecção dos produtos de amplificação ..... 88

Figura 17 - Esquema demonstrando as diferenças entre as técnicas RT-LAMP e RT-PCR para uso diagnóstico ..... 93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição/características das variantes de preocupação do SARS-CoV-2 .....	38
Tabela 2 - Resumo com as principais plataformas vacinais para COVID-19 disponíveis atualmente .....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(IP)-10	Interferon gama
2019-nCoV	Novo Coronavírus de 2019
3CLpro	Protease 3C-like
a.c	Antes de Cristo
Ac	Anticorpo
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
Ag	Antígeno
Ag-RDTs	Testes rápidos baseados em antígeno
ALERT	Teste rápido habilitado para LAMP
Alpha-CoV	Alphacoronavirus
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BCoV	Coronavírus bovino
Beta-CoV	Betacoronavirus
Bioedit	<i>BioEdit Sequence Alignment Editor</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i> DNA Polimerase
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CF	Livre de Célula – <i>Cell Free</i>
CLIA	Ensaio enzimático de quimioluminescência
CoV	Coronavírus
CoV RatG13	Coronavírus de <i>Rhinolophus affinis</i>
COVID-19	Doença Coronavírus 19 – <i>Coronavirus Disease 19</i>
Cq	Ciclo de quantificação
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Interespçadas - <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSG	Grupo de estudo <i>Coronaviridae</i> - <i>Coronaviridae Study Group</i>
Ct	Ciclo que cruza o limiar – <i>Cycle threshold</i>

Delta-CoV	Deltacoronavírus
DENV	Vírus da Dengue
DETECTR	<i>DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
E	Proteína do Envelope
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática – <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPI	Equipamento de proteção individual
EUA	Estados Unidos da América
EV	<i>Ebola Virus</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FIPV	Vírus da peritonite infecciosa felina
Gamma-CoV	<i>Gammacoronavirus</i>
GC	Guanina-Citosina
GGO	Opacidade em vidro fosco
gRNA	RNAs guias
HCoV	Coronavírus humanos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNB	Azul de hidroxinaftol
HPAI	Gripe aviária de alta patogenicidade
HR	Repetição heptada
HRV	Rinovírus humano
IBV	Vírus da bronquite infecciosa
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IFA	Ensaio de imunofluorescência
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INFs	Intervenções não farmacêuticas
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

JAK	Janus quinase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública “Dr Milton Bezerra Sobral”
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop
LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LB	Luria Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
LFA	Ensaio de fluxo lateral
M	Glicoproteína de membrana
MEM	Meio mínimo essencial
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
MIS-C	Síndrome inflamatória multissistêmica em crianças
M-LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop multiplex
mRNA	RNA mensageiro
N	Glicoproteína do Nucleocapsídeo
NB	Nível de Biosegurança
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NGS	Sequenciamento de última geração – <i>Next - Generation Sequencing</i>
nsp	Proteína não estrutural
NTC	Controle sem molde - <i>No template control</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORFs	Quadro de leitura aberto - <i>Open reading frames</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
PFU	Unidade formadora de colônia - <i>Plaque forming unit</i>
PLpro	Protease semelhante à papaína
Pmol	Picomolar
POC	Ponto de atendimento - <i>Point-of-care</i>
PoCT	Teste em ponto de atendimento - <i>Point-of-care testing</i>
Pol	Polimerase

PTSD	Desordem do estresse pós-traumático
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteínas
RPA	Reação de amplificação da recombinase polimerase
RT	Transcriptase reversa
RT-LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real
S	Proteína Spike
SARS-CoV	Coronavirus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SHERLOCK	Desbloqueio Específico De Repórter Enzimático De Alta sensibilidade - <i>Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking</i>
TAE	Tris-acetate-EDTA
TC	Tomografia computadorizada
TCID50	Média da dose infecciosa de cultura de tecidos - <i>Median Tissue Culture Infectious Dose</i>
TGEV	Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos
TLR-4	Receptores especiais do tipo 4
TMPRSS	Transmembrane protease
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTR	Região não-traduzida - <i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
Vero	Células primárias de rins de macaco verde africano
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VIPR	<i>Virus Pathogen Database and Analysis Resource</i>
VLP	Partículas semelhantes a vírus

VOC	Variantes de preocupação – <i>Variants of concern</i>
VOHC	Variantes de alta consequência – <i>Variants of High consequence</i>
VOI	Variantes de interesse - <i>Variants of interest</i>
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
VRS	Vírus sincicial respiratório

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
3'	Extremidade 3'
5'	Extremidade 5'
CO <sub>2</sub>	Óxido de carbono
fg	Fentograma
g	Gramma
H	Hora
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	Litro
Mg	Miligrama
Mg <sup>2+</sup>	Íons de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Nº	Número
°C	Graus Celsius
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
R <sub>0</sub>	Número básico de reprodução
U	Unidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	26
2.1	CORONAVÍRUS: CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM	26
2.2	EPIDEMIOLOGIA	31
2.2.1	<b>Epidemiologia genômica e propagação do SARS-CoV-2</b>	34
2.2.2	<b>Propagação do SARS-CoV-2 no Brasil</b>	35
2.2.3	<b>Emergência das Variantes do SARS-CoV-2</b>	36
2.3	TRANSMISSÃO	38
2.3.1	<b>Rotas de transmissão</b>	41
2.3.1.1	Transmissão respiratória e contato direto	42
2.3.1.2	Transmissão por fômites	43
2.3.1.3	Transmissão por animais	45
2.3.1.4	Vias alternativas de transmissão	47
2.4	ESTRUTURA MORFOLÓGICA E GENÔMICA DO SARS-COV-2	48
2.4.1	<b>Proteína Spike (S)</b>	51
2.4.2	<b>Proteína de Membrana (M)</b>	53
2.4.3	<b>Proteína do Envelope (E)</b>	54
2.4.4	<b>Proteína do Nucleocapsídeo (N)</b>	54
2.4.5	<b>Diversidade genética do SARS-CoV-2</b>	55
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E FATORES DE RISCO DA COVID-19	56
2.5.1	<b>Resposta imunológica durante a infecção pelo SARS-CoV-2</b>	60
2.6	DIAGNÓSTICO DO SARS-CoV-2	63
2.6.1	<b>Amostras, biossegurança para manuseio e processamento</b>	65
2.6.2	<b>Isolamento do SARS-CoV-2</b>	66
2.6.3	<b>Métodos sorológicos</b>	67

<b>2.6.4</b>	<b>Métodos baseados em antígenos</b> .....	70
<b>2.6.5</b>	<b>Métodos moleculares</b> .....	71
2.6.5.1	Sequenciamento de Genomas .....	71
2.6.5.2	Sistemas baseados em CRISPR/Cas.....	72
2.6.5.3	Sensores.....	73
2.6.5.3	RT-qPCR.....	74
2.6.5.4	Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) .....	79
2.6.5.4.1	<i>Desenho de primers e características do método LAMP</i> .....	80
2.6.5.4.2	<i>Protocolo para os ensaios de amplificação LAMP</i> .....	85
2.6.5.4.3	<i>Métodos de detecção dos produtos após reação LAMP</i> .....	85
2.6.5.4.4	<i>Aplicações do LAMP no diagnóstico de doenças virais</i> .....	87
2.6.5.4.5	<i>Aplicações do LAMP no diagnóstico da COVID-19</i> .....	89
2.6.5.4.6	<i>Variações do método LAMP para detecção do SARS-CoV-2</i> .....	90
2.6.5.4.7	<i>Limitações e desafios do uso do RT-LAMP no diagnóstico da COVID-19</i> ...92	
2.7	TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA COVID-19.....	95
2.8	PREVENÇÃO E CONTROLE DA COVID-19.....	96
<b>2.8.1</b>	<b>Plataformas vacinais</b> .....	98
<b>2.8.2</b>	<b>Testagem em massa para controle da COVID-19</b> .....	100
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	103
3.1	OBJETIVO GERAL.....	103
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	103
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	104
	<b>SYSTEMATIC REVIEW ON RT-LAMP CLINICAL VALIDATION CRITERIA FOR SARS-CoV-2 DIAGNOSTIC</b> .....	104
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	106

<b>DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP) ASSAY FOR RAPID DETECTION OF SARS-CoV-2 AT THE POINT-OF-CARE .....</b>	<b>106</b>
<b>6 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>108</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>155</b>
APÊNDICE A – PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO DA TESE.....	155
<b>ANEXOS.....</b>	<b>156</b>
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	156

## 1 INTRODUÇÃO

A doença Coronavírus 19 (COVID-19) causada pelo novo beta coronavírus conhecido como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), foi primeiramente relatada na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019 (HUANG et al., 2020a). Considerado altamente transmissível entre humanos, a COVID-19 se espalhou rapidamente pelo mundo, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar uma pandemia em março de 2020.

Nos estágios iniciais da pandemia, o número de casos confirmados e mortes cresceram rapidamente. Além da natureza infecciosa do SARS-CoV-2, a falta de conscientização popular, kits de diagnóstico, tratamentos e vacinas disponíveis foram fatores determinantes para impactar a saúde pública global. Atualmente, já são mais de 635 milhões de casos totais e mais de 6,6 milhões de mortes no mundo (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2022).

Prevalentemente, o SARS-CoV-2 é transmitido por gotículas contendo vírus, liberadas do trato respiratório de indivíduos infectados através de espirros, tosse ou quando ocorre interação com maior proximidade entre as pessoas (LI et al., 2020b; LIU et al., 2020b). Além do contato direto, em alguns casos, a transmissão pode ocorrer de forma indireta, ao tocar em superfícies contaminadas (fômites).

No início da pandemia, não se tinha clareza até que nível a transmissão por fômites teria relevância quanto à epidemiologia. Hoje, sabe-se que o risco de infecção por essa rota possivelmente depende da influência de múltiplos fatores, tais como distância da fonte viral, quantidade de vírus a qual a pessoa é submetida e o tempo desde o momento em que o vírus foi depositado na superfície até ser tocada. Além de fatores ambientais que podem comprometer a viabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies ao longo do tempo (CHIN et al., 2020; VAN DOREMALEN et al., 2020).

A maioria dos estudos de detecção do SARS-CoV-2 em superfícies contaminadas, são realizados em ambientes hospitalares ou unidades de saúde, fortalecendo a necessidade de investigações em áreas comunitárias, principalmente em países com alta densidade populacional como o Brasil. Além disso, entender as implicações das amostras de superfícies positivas em termos de potencial infeccioso para o ser humano apresenta

grande impacto para a determinação dos pontos críticos durante a implementação de medidas para controle da COVID-19.

Mesmo com a disponibilidade de diversas plataformas vacinais apropriadas para uso emergencial durante a pandemia da COVID-19 pela OMS (FIOLET et al., 2022), a emergência das Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 trouxe um novo problema à tona. Essas linhagens são conhecidas pela alta transmissibilidade e potencial de redução da neutralização por anticorpos produzidos após infecção anterior ou vacinação prévia (SILVA et al., 2022). Diante disso, a ampliação dos testes diagnósticos, como medida de saúde pública para retardar a propagação dessas variantes, apresenta grande importância.

A COVID-19 exibe uma variedade de sintomas e frequentemente pacientes mais jovens são assintomáticos, favorecendo a transmissão do SARS-CoV-2. A maioria das infecções leves e assintomáticas permanecem sem diagnóstico, e seu número é consideravelmente maior que o número de casos diagnosticados.

Atualmente, o teste mais confiável e amplamente utilizado para detecção do SARS-CoV-2 é a PCR quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR). No entanto, a técnica apresenta algumas limitações, como a necessidade de pessoal qualificado, equipamentos especializados, além do custo dos reagentes e fluxo longo de trabalho para obtenção dos resultados (MINAMI et al., 2021).

A amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) é uma técnica que combina transcrição reversa e amplificação de DNA auto cíclico em uma única temperatura, produzindo um teste altamente sensível, versátil e robusto. A química do LAMP é mais resistente a inibidores do que a RT-qPCR, permitindo a simplificação e até mesmo a remoção do procedimento de extração de RNA da amostra. Devido a sua eficiência e baixo custo, tem sido aplicada para a detecção de uma ampla gama de patógenos, incluindo o SARS-CoV-2 (AUGUSTINE et al., 2020).

A detecção precoce de uma pessoa infectada com ensaios rápidos e sensíveis e o corte da rota de transmissão são pontos cruciais para controlar a COVID-19 (BEHERA; MISHRA; THATOI, 2021).

Diante do exposto, o presente estudo se propôs a avaliar as medidas mais eficazes para controlar a pandemia da COVID-19, desde a análise da transmissibilidade em áreas urbanas públicas, até o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica baseada em RT-

LAMP para detecção do SARS-CoV-2 em amostras humanas. Trabalhos como este podem auxiliar as autoridades governamentais na tomada de medidas eficazes para desaceleração da pandemia e redução de danos ainda maiores para os sistemas econômicos e de saúde com a retomada das atividades sociais e profissionais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CORONAVÍRUS: CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM

Desde o final da década de 1930, os coronavírus causadores de doenças em animais foram primeiramente identificados. O vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV), coronavírus bovino (BCoV), vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV) e vírus da bronquite infecciosa (IBV) (Saif 2004). Já os coronavírus humanos (HCoVs), tiveram a sua evolução associada aos processos de urbanização acelerada e avicultura, que de acordo com estudos recentes possibilitavam o intercâmbio frequente de espécies e o cruzamento simplificado da barreira de espécies com recombinação genômica entre esses diferentes grupos de vírus (JONES et al., 2013).

A classificação atual dos CoVs, reconhece 39 espécies, 27 subgêneros, cinco gêneros e duas subfamílias que fazem parte da família *Coronaviridae*, subordem *Cornidovirineae*, ordem *Nidovirales* e reino *Riboviria*. A classificação e taxonomia das famílias dos CoVs são executadas pelo Grupo de Estudo *Coronaviridae* (“*Coronaviridae* Study Group – CSG”), o qual compõe o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (“International Committee for Virus Taxonomy – ICTV”) (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020; SIDDELL et al., 2019).

Os HCoVs compõem a subfamília *Coronavirinae* e são genotipicamente e sorologicamente divididos em quatro gêneros principais denominados, *Alphacoronavirus* (*alpha-CoV*), *Betacoronavirus* (*beta-CoV*), *Gammacoronavirus* (*gamma-CoV*), e *Deltacoronavirus* (*delta-CoV*). Os gêneros de HCoVs divergiram uns dos outros em aproximadamente 2400 a 3000 a.C. e estão relacionados a infecções em diferentes grupos de animais. Os Alphacoronavirus e Betacoronavirus são comumente encontrados em mamíferos, já os Gammacoronavirus e Deltacoronavirus são frequentes em aves, sendo os Gammacoronavirus também associados a infecções em cetáceos, como baleias e golfinhos (KING et al., 2018; SINGH; YI, 2021; WOO et al., 2012).

Embora os relatos iniciais de infecções causadas pelos CoVs em animais tenham sido divulgados na década de 1940 (CHEEVER; DANIELS, 1949), os casos de HCoVs só foram identificados a partir de 1960. Os primeiros agentes infecciosos causadores de

doenças respiratórias leves, foram denominados HCoV-229E e HCoV-OC43 (HAMRE; PROCKNOW, 1966; MCINTOSH et al., 1967).

Após a identificação dos HCoVs mencionados, a busca por novos vírus voltou a intensificar-se apenas em 2002, devido a surtos provocado pelo SARS-CoV. Até aquele momento, os coronavírus não eram conhecidos por causarem doenças graves na maior parte dos humanos, sendo frequentemente associados a casos de resfriado comum (KANWAR; SELVARAJU; ESPER, 2017), provocando quadros mais graves com risco de vida apenas em indivíduos imunocomprometidos e crianças (WALSH; SHIN; FALSEY, 2013). Esse panorama foi alterado com a emergência do SARS-CoV em um mercado de animais localizado no sul da China, afetando 8000 pessoas e ocasionando 774 mortes no mundo todo (DROSTEN et al., 2003). Após isso, os HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 foram identificados em 2004 e 2005, respectivamente (VAN DER HOEK et al., 2004; WOO et al., 2005).

Em 2012, foi identificado um novo coronavírus responsável pela síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), infectando mais de 2500 pessoas e causando 927 mortes (“Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations”, [s.d.]; ZAKI et al., 2012). O SARS-CoV e o MERS-CoV originaram-se de morcegos e depois saltaram para outro hospedeiro mamífero, a civeta das palmeiras do Himalaia (*Paguma lavarta*) no caso do SARS-CoV e o camelo dromedário (*Camelus dromedarius*) no caso do MERS-CoV, antes de chegar a causar infecções em humanos (AZHAR et al., 2014; SONG et al., 2005).

Embora a emergência do SARS-CoV e MERS-CoV tenha causado preocupação, ambos os vírus não conseguiram se estabelecer eficientemente dentro da população humana. Isso só veio a acontecer após a emergência de um terceiro CoV altamente patogênico, em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei na China, responsável por dezenas de casos de pneumonia grave em trabalhadores de um mercado local de peixes e animais selvagens (LU et al., 2020a).

Análises baseadas na tecnologia de sequenciamento de nucleotídeos do genoma do vírus isolado após coleta de amostras de garganta, sangue e fluido pulmonar de quinze indivíduos infectados, permitiu a identificação do agente causador do surto. Além disso, com o uso da microscopia eletrônica, a aparência típica de um coronavírus foi constatada (GORBALENYA et al., 2020). Assim, um mês após os primeiros relatos da infecção, em

uma conferência de imprensa ocorrida na China, foi anunciado que os casos haviam sido provocados por um novo tipo de coronavírus, inicialmente nomeado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o novo Coronavírus de 2019 (2019-nCoV) (LU et al. 2020a), que mais tarde viria a ser chamado de Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), vírus pandêmico e agente etiológico da Doença Coronavírus 2019 (COVID-19) (SOHRABI et al., 2020).

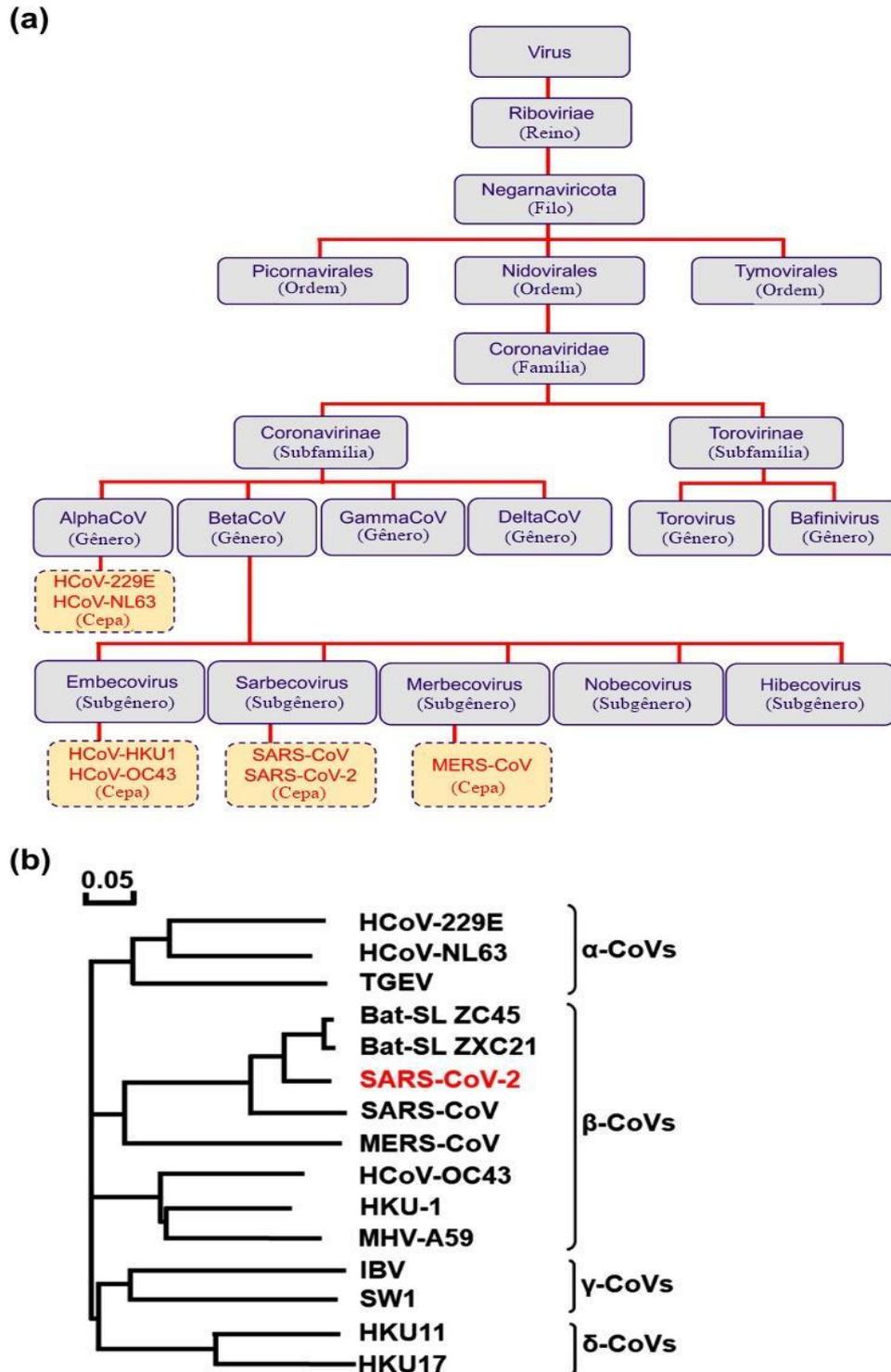
A construção da árvore filogenética para os CoVs antes da emergência do SARS-CoV-2, era realizada com base nas sequências dos genes *Polimerase (Pol)* ou "*Nucleocapsid*" (*N*). Inicialmente, esse método indicou que o SARS-CoV era membro do Gênero *gamma-CoV*. Outras análises sobre o domínio aminoterminal da proteína "*Spike*" (*S*) do SARS-CoV, demonstraram que 19 dos 20 resíduos de cisteína possuíam estrutura conservada no grupo *beta-CoV*, enquanto que nos grupos *alpha-CoV* e *gamma-CoV* foram combinados apenas 5 resíduos conservados (ROTA et al., 2003). Subsequentemente, toda a análise filogenética baseada em genoma indicou que o SARS-CoV pertencia a linhagem *beta-CoV* B, já o MERS-CoV foi identificado como membro de uma nova linhagem *beta-CoV* C com alta patogenicidade (MEMISH et al., 2013). As análises da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e filogenética baseada na sequência do gene S também enfatizaram que o SARS-CoV era membro do subgrupo *beta-CoV* (EICKMANN et al., 2003).

Finalmente, as investigações da sequência de SARS-CoV-2 demonstraram uma distante identidade de 79% e 50% com o SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente, e estabeleceu 88% de similaridade com as sequências de dois CoVs próximos ao SARS e derivados de morcegos: bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21. O CoV RaTG13, da espécie de morcego *Rhinolophus affinis*, também tem um parentesco muito próximo com o SARS-CoV-2, compartilhando 93.1% de identidade com a sequência de nucleotídeos do gene S e 98% de identidade com a sequência de aminoácidos da proteína codificada. Então, assim como os demais CoVs padêmicos, o SARS-CoV-2 parece ter se originado de morcegos, acumulando mutações que com o passar do tempo lhe deram a capacidade de transmissão zoonótica (LU et al., 2020b; ZHOU et al., 2020; DA SILVA TORRES et al., 2022) (Figura 1).

De acordo com a classificação taxonômica atual, os HCoV-229E e HCoV-NL63 são do gênero *alpha-CoV*, enquanto os HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV e MERS-CoV

são pertencentes ao gênero *beta-CoV* (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020). Recentemente, ocorreu a introdução da classificação de subgênero na taxonomia dos vírus, e o SARS-CoV e MERS-CoV foram distribuídos pelo CSG nos subgêneros Sarbecovirus e Merbecovirus, respectivamente. Já o mais SARS-CoV-2, diverge dos outros vírus pandêmicos zoonóticos, sendo portanto incluído em outra posição taxonômica, mais especificamente no subgênero Sarbecovirus (DE GROOT et al., 2013; GORBALENYA; SNIJDER; SPAAN, 2004). Porém, é importante ressaltar que com base em novas evidências essa classificação tende a ser modificada (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Classificação taxonômica (A) e posições para os sete HCoV conhecidos, e (B) análise da árvore filogenética dos CoVs construída com base no gene S usando o software “Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6” sob o método de junção de vizinhos e 1000 valores de bootstrap.



Fonte: Adaptado de KIRTIPAL et al., (2020).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Na fase inicial do surto do SARS-CoV-2, até meados de janeiro de 2020, 41 casos foram confirmados na China. Em seguida, por volta de 13 de janeiro, deu-se início a segunda fase, caracterizada pela dispersão do vírus em ambiente hospitalar e pela transmissão familiar por contato próximo. Dessa forma, em 23 de janeiro, 29 províncias da China e outros seis países já somavam quase 900 casos. A terceira fase começou em 26 de janeiro, onde ocorreu um acelerado aumento dos casos de forma geral, ocasionados pela transmissão comunitária (SUN et al., 2020).

Em 30 de janeiro já haviam mais de 9000 casos confirmados e a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a epidemia da COVID-19 como uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). Desde então, a doença alcançou todos os continentes do mundo, sendo declarada como uma pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b).

Essa rápida disseminação global do SARS-CoV-2 com comprometimento dos sistemas econômico e de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020c), bem como o aumento exponencial do número de casos de pessoas infectadas, obrigou as autoridades de saúde pública e órgãos governamentais a aplicar estratégias para controlar a progressão da COVID-19. A exigência do uso de máscaras, restrições de viagens e toques de recolher em larga escala, isolamento social e quarentena de indivíduos infectados, foram as principais medidas (KHAN et al., 2020).

Primeiramente, vários países da Ásia foram acometidos até chegar no Irã e na Itália, neste último as barreiras sanitárias foram impostas de forma tardia, permitindo a disseminação drástica da COVID-19 e causando, até março de 2020, uma taxa de óbitos cerca de três vezes maior que a da China (LA MAESTRA; ABBONDANDOLO; DE FLORA, 2020). O SARS-CoV-2 acabou se estabelecendo na Europa e América do Norte nos dois primeiros meses de 2020: Além da Itália, no final de janeiro, no estado de Washington no início de fevereiro, seguido por Nova York no final daquele mesmo mês (WOROBAY et al., 2020).

No início da pandemia, cerca de dois terços dos casos aconteceram em pessoas que haviam viajado recentemente para os três países mais afetados (China, Irã ou Itália),

comprovando como as viagens internacionais para alguns países contribuíram para a transmissão global do SARS-CoV-2 (DAWOOD et al., 2020).

No Brasil, o primeiro caso foi registrado em 26 de fevereiro de 2020, em uma pessoa que havia viajado para a Itália e retornado para São Paulo. Posteriormente, cerca de 100 introduções internacionais do SARS-CoV-2 foram identificadas no país (CANDIDO et al., 2020).

No ramo da epidemiologia de doenças infecciosas, uma unidade matemática fundamental chamada número básico de reprodução ( $R_0$ ) é utilizada, a qual é definida como o número de casos secundários gerados quando um patógeno é introduzido em população susceptível. Ou seja, um  $R_0 = 2$  indica que uma pessoa infectada deve transmitir a doença para outras duas (DIEKMANN; HEESTERBEEK; METZ, 1990).

Estudos preliminares realizados no início da pandemia, demonstraram um  $R_0$  de aproximadamente 2,5 a nível global (KHAN et al., 2020). No Brasil, especificamente em São Paulo e Rio de Janeiro, após confirmação do primeiro caso e devido aos atrasos nas notificações e escassez de testes para a população, foi identificado um  $R_0 > 3$ , sugerindo a evolução de forma crescente da infecção. Somente após a adoção das práticas de intervenção não-farmacêuticas (NPIs), o  $R_0$  reduziu para um valor próximo de 1 (CANDIDO et al., 2020).

A natureza altamente infecciosa do SARS-CoV-2, assim como a falta de conscientização popular, kits de diagnóstico e tratamentos e vacinas disponíveis nos estágios iniciais da pandemia, levaram ao elevadíssimo número de casos. Na data de hoje (15/11/2022), de acordo com os dados do “Coronavirus Resource Center” da “Johns Hopkins University (JHU)” (disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>), a pandemia já provocou mais de 635 milhões de casos e mais de 6,6 milhões de morte em todo o mundo (Figura 2), principalmente nos EUA, Brasil, Índia e países europeus. Só no Brasil, o número de casos ultrapassa 34,9 milhões e de óbitos 689 mil (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2022).

Figura 2 - Disseminação da COVID-19 a nível mundial com enfoque para o número de casos e mortes obtidos a partir de dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) no dia 15 de julho de 2022.



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION (<disponível em: <https://covid19.who.int/>>).

É importante destacar que nem todos os casos foram diagnosticados e o número real de infecções e mortes é provavelmente muito maior. Como exemplo disto, em um estudo de modelagem realizado nos EUA, constatou-se que aproximadamente 24% dos casos fatais de COVID-19 são subnotificados, representando mais de 180.000 mortes, o que indica que quase um quarto das mortes não são relatadas como causadas pela COVID-19 nos atestados de óbito (IULIANO et al., 2021).

De acordo com os dados do “*Worldometer*” (disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>), atualmente, o continente americano é responsável por quase metade das mortes por COVID-19 mundialmente, seguido pelo continente europeu, apesar deste último abranger regiões onde o número total de casos de COVID-19 é superior. Provavelmente, essa visível desigualdade ocorre em razão da escassez de testes de diagnóstico na maioria dos países da América Latina, principalmente, levando a subestimação da verdadeira incidência da COVID-19.

Tais divergências, podem ser relacionadas ao acesso do paciente a cuidados de alta qualidade. Em um estudo realizado no Brasil, incluindo os primeiros 250.000 pacientes com COVID-19 internados em hospitais, observou-se que 80% dos que necessitaram de

ventilação invasiva vieram à óbito, superando a taxa de mortalidade relatada em pacientes intubados na Europa (51,7 a 69%) (RANZANI et al., 2021).

Mais de dois anos após o início da pandemia, o SARS-CoV-2 continua sendo uma ameaça à saúde pública. A taxa global de mortalidade da COVID-19 é de cerca de 1,2%, apesar do número de casos e mortes ter reduzido mundialmente principalmente por causa da implantação em larga escala de vacinas eficazes (DONG; DU; GARDNER, 2020).

Com a pandemia da COVID-19, estudos de epidemiologia genômica intensificaram-se, principalmente devido à diversidade genética do SARS-CoV-2 e emergência de novas variantes, as quais possuem uma vantagem substancial de transmissão e escape da imunidade induzida pelas vacinas, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade (KAMPS et al., 2021).

### **2.2.1 Epidemiologia genômica e propagação do SARS-CoV-2**

O sequenciamento do primeiro genoma do SARS-CoV-2 (Zhou et al. 2020) e os esforços internacionais para o sequenciamento viral, possibilitaram a disponibilização de mais de onze milhões de genomas do SARS-CoV-2 no banco de dados *GISAID* até o momento. Essas sequências podem ser utilizadas para estudos de epidemiologia genômica e acompanhamento da história e evolução do vírus ao longo do tempo e espaço (RAMBAUT et al., 2020).

Para entender a história evolutiva e como ocorre a dispersão geográfica do SARS-CoV-2, uma nomenclatura dinâmica para classificação dos isolados foi criada no mundo todo. De modo geral, para caracterizar as principais linhagens, inicia-se utilizando uma letra. Na raiz da árvore filogenética do SARS-CoV-2 estão as duas linhagens denominadas A (sequência de Wuhan/WH04/2020: 5 de janeiro de 2020) e B (sequência Wuhan-Hu-1: 26 de dezembro de 2019). Para as demais linhagens que apresentarem descendência com A ou B se atribui um número (exemplo, A.1 ou B.1). Já a distribuição de linhagens de vírus associadas em uma região geográfica diferente ou em um momento posterior, resulta em uma nova designação (exemplo, A.1.1). Esse processo dinâmico pode atingir um máximo de três subníveis (exemplo, A.1.1.1), após o qual as novas linhagens descendentes

recebem uma nova letra em ordem alfabética (exemplo, A.1.1.1.1 se tornaria C.1 e A.1.1.1.2 se tornaria C.2) (RAMBAUT et al., 2020).

Essa forma de caracterização permite entender de maneira clara os padrões locais e globais da diversidade genética do SARS-CoV-2, rastrear linhagens emergentes e sua propagação entre países e populações, abranger a nova diversidade de vírus conforme é originada, e incorporar o aparecimento e desaparecimento de linhagens virais ao longo do tempo (RAMBAUT et al., 2020).

As linhagens globais (*PANGO lineages*) seguindo a nomenclatura anteriormente explicada, foram atribuídas ao software pangolin (disponível em: <https://github.com/cov-lineages/pangolin>), o qual é bastante utilizado pela comunidade científica para a classificação dos genomas recentemente sequenciados.

No Brasil, os genomas sequenciados no país por mês e estado, assim como a frequência das principais linhagens de acordo com as regiões geográficas, a quantidade de linhagens por estado e demais informações, são disponibilizados pelos pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) na forma de gráficos na plataforma da Rede Genômica Fiocruz Genoma hCoV da Fiocruz (disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/>).

### **2.2.2 Propagação do SARS-CoV-2 no Brasil**

No início da pandemia, o entendimento a respeito da dinâmica de transmissão do SARS-CoV-2 no Brasil, deu-se a partir do sequenciamento de 490 genomas proporcionalmente ao número de casos por estado. A partir disto, pode-se concluir que a maioria (76%) dos genomas analisados, pertenciam a três clados introduzidos da Europa entre o final de fevereiro e início de março de 2020. O clado 1 encontrava-se predominantemente em São Paulo, o clado 2 foi considerado o mais disseminado, circulando em 16 estados brasileiros, e o clado 3 concentrou-se no Ceará e era composto por sequências oriundas da Europa (CANDIDO et al., 2020).

No estado de Pernambuco (Nordeste brasileiro), 88% das 101 sequências foram classificadas como linhagem B.1.1 e seis clados locais foram determinados, com a ocorrência de aproximadamente cinco eventos de importação internacional (PAIVA et al., 2020). Em Minas Gerais (Sudeste brasileiro), 92,5% dos 40 genomas de março de 2020

também faziam parte da linhagem B (especialmente B.1.1), e de forma distinta ao que se observava nos outros estados do Sudeste, a distribuição de casos e mortes era mais uniforme espacialmente de acordo com análise epidemiológica realizada (XAVIER et al., 2020).

Dentre as linhagens brasileiras relatadas, duas delas disseminaram-se amplamente, sendo denominadas de B.1.1.33 e B.1.1.28 (CANDIDO et al., 2020). Posteriormente, as linhagens P.1 (FARIA et al., 2021; NAVECA et al., 2021) e P.2 (VOLOCH et al., 2021), derivadas da B.1.1.28, as substituíram. Sendo a linhagem P.1 classificada como uma Variante de preocupação (VOC) denominada Gama devido ao excesso de mutações na proteína Spike e associação com altas cargas virais (NAVECA et al., 2021), transmissibilidade, evasão imune e letalidade (FARIA et al., 2021), ultrapassando as demais linhagens brasileiras até 2021.

Ao longo desse período, novas linhagens também foram identificadas no Brasil, como a P.4 primeiramente relatada em São Paulo (BITTAR et al., 2021), N.9 (RESENDE et al., 2020) e N.10 (RESENDE ET AL., 2021) no Norte e Nordeste e P.12 no Sudeste (FRANCISCO JUNIOR et al., 2021) e Sul (FRANCESCHI et al., 2021) do país.

### **2.2.3 Emergência das Variantes do SARS-CoV-2**

Os vírus de RNA são conhecidos por apresentarem altos índices de mutação por causa da baixa capacidade da enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) em corrigir os erros que ocorrem durante o processo de replicação do genoma. Porém, a família Coronaviridae e conseqüentemente o SARS-CoV-2 são uma exceção, visto que o aparelho de replicação desses vírus contém um domínio com atividade de exonuclease 3' - 5' e capacidade de revisão (OGANDO et al., 2019).

Em concordância com essa informação, após a análise de diferentes genomas publicados, inicialmente o SARS-CoV-2 demonstrou uma baixa diversidade global de nucleotídeos. Embora, com o aumento da sua incidência, conseqüentemente ocorreu um aumento da diversidade nucleotídica do vírus, corroborando com dados divulgados na literatura (FLORES-ALANIS et al., 2021).

Essas mutações acumuladas no vírus ao longo do tempo promoveu a emergência de variantes do SARS-CoV-2, ou seja, cepas virais geneticamente diferentes da primeira linhagem inicialmente identificada. Tais mutações podem se comportar como neutras, sem impacto fenotípico ou alterações na biologia viral, ou causar algum efeito vantajoso, melhorando a adaptação viral e a capacidade de replicação (LAURING; HODCROFT, 2021).

As variantes do SARS-CoV-2, carregam especialmente mutações na glicoproteína *Spike* (S), a qual medeia a interação com o receptor ACE2. Sendo assim, o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (anti-SARS-CoV-2) e das vacinas desenvolvidas (WALLS et al., 2020).

Essas variantes foram classificadas em três grupos: variantes de interesse (VOI); variantes de preocupação (VOC) e variantes de alta consequência (VOHC), de acordo com o “Center for Disease Control and Prevention” (CDC). As VOIs são as que apresentam uma disseminação limitada, com poucas mutações que afetam a transmissão, diagnóstico, tratamento ou sensibilidade a anticorpos produzidos após exposição ou vacinação prévia. As VOCs são aquelas que destacam-se quanto ao aumento da incidência/transmissão, falha diagnóstica ou no tratamento, além da redução da neutralização por anticorpos produzidos após exposição ou vacinação prévia. As VOHCs são aquelas para as quais medidas de prevenção ou contramedidas médicas têm a eficácia diminuída. Com a evolução da pandemia de COVID-19, as variantes do SARS-CoV-2 foram frequentemente e repetidamente identificadas ao longo do tempo (SILVA et al., 2022).

Para facilitar a comunicação entre especialistas e público leigo, a OMS criou uma nomenclatura baseada em letras gregas para caracterizar as cinco variantes do SARS-CoV-2 que foram classificadas com VOCs: Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron (disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>). Mais informações sobre essas VOCs estão resumidas na tabela 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020d).

Tabela 1 - Descrição/características das variantes de preocupação do SARS-CoV-2.

Variante/ nomenclatura OMS	Linagem	Descrição	Aminoácidos adicionais/ principais mutações
Alfa (GALLOWAY et al., 2021; WALENSKY et al., 2021; DAVIES et al., 2021)	B. 1. 1. 7	Linagem de preocupação do Reino Unido, associada à mutação N501Y; Reino Unido, setembro-2020; +++ Transmissibilidade ++ Gravidade	+S: 484K +S:452R N501Y P681H Deleções: H69-V70 Y144/145
Beta (TEGALLY et al., 2021; WIBMER et al., 2021)	B. 1. 351	África do Sul, maio-2020; +Transmissibilidade; Gravidade: possível	+S:L18F N501Y K417N E484K
Gama (WANG et al., 2020a; CANDIDO et al., 2020)	P.1	Linagem brasileira com várias mutações de <i>spike</i> com provável significado funcional E484K, K417T e N501Y Brasil, dez-2020; ++ Transmissibilidade; Gravidade: possível	+S:681H N501Y K417T E484K
Delta (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2021; MOTOZONO et al., 2021)	B. 1. 617. 2	Linagem predominantemente da Índia com várias mutações de <i>spike</i> ; Índia, outubro-2020; +++ Transmissibilidade; +++ Gravidade	+S:417N +S:484K L452R E484Q
Ômicron (CALLAWAY 2021; GAO et al., 2022)	B. 1. 1. 529 BA.1	Várias mutações que são encontradas em outras VOCs e que acredita-se tornar o vírus mais infeccioso; Vários países, novembro-2021	D614G N501Y K417N

Fonte: Adaptado de DA SILVA TORRES et al., (2022).

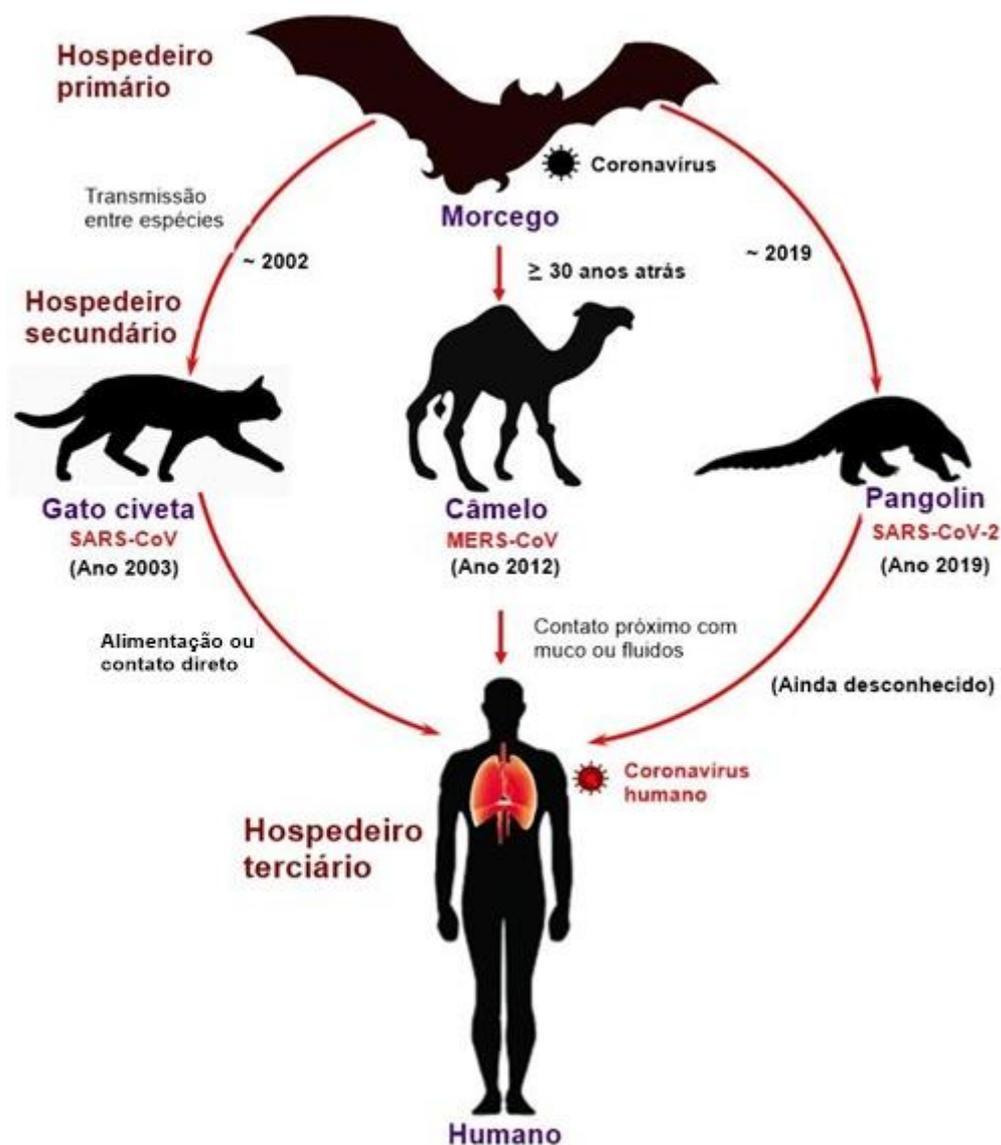
## 2.3 TRANSMISSÃO

A identificação dos hospedeiros intermediários é de grande importância para implementação de medidas de saúde pública e prevenção de futuros surtos causados pelo SARS-CoV-2 ou outros vírus relacionados (ANDERSEN et al., 2020; PERLMAN, 2020; RELMAN, 2020). No entanto, o conhecimento a respeito dos hospedeiros

intermediários do SARS-CoV-2 necessita de maiores investigações (XU, 2020; ZHOU et al., 2020).

Vários estudos realizados com isolados de CoV obtidos de pagolins da Malásia demonstraram a associação dos mesmos com o SARS-CoV-2, especialmente devido à alta similaridade nas sequências de aminoácidos analisadas das proteínas estruturais desses vírus (LIU et al., 2020a; LAM et al., 2020; XIAO et al., 2020; WACHARAPLUESADEE et al., 2021). Esses dados fortalecem a hipótese de que os pagolins possam atuar como hospedeiros intermediários do SARS-CoV-2 (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática dos três HCoV (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) e o ciclo de transmissão para humanos a partir de morcegos e dos hospedeiros intermediários.



Fonte: Adaptado de KIRTIPAL et al., (2020).

Embora tenha-se conhecimento a respeito das possíveis e principais vias de transmissão do SARS-CoV-2, definir com precisão a fonte da infecção ao constatar-se a contaminação de um indivíduo continua sendo um desafio (DA SILVA TORRES et al., 2022). Conforme destacado anteriormente, acredita-se que a disseminação da COVID-19 ocorreu a partir da ingestão de animais infectados como fonte de alimento, ocasionando a transmissão zoonótica (JI et al., 2020a).

Em relação à ecologia do SARS-CoV-2, o vírus apresenta-se em concentrações mais elevadas no trato respiratório superior no início da infecção e tende a aumentar no trato respiratório inferior à medida que a doença progride (HUANG et al., 2020; ZHU et al., 2020a; WÖLFEL et al., 2020; WANG et al., 2020b). O vírus também pode ser encontrado em níveis mais reduzidos em outros sítios, como no rim, fígado, coração, cérebro e sangue (PUELLES et al., 2020).

Além do corpo humano, de forma geral, o SARS-CoV-2 têm maior estabilidade em ambientes mais frios e com baixa umidade, já em locais com temperaturas mais elevadas e alta umidade ocorre o encurtamento da meia-vida do vírus (Matson et al. 2020). No ar (na forma de aerossóis), o SARS-CoV-2 pode ser identificado por até três horas, em papelão por até 24 horas e em materiais plásticos ou de aço inoxidável o vírus pode ser detectado em até dois a três dias (VAN DOREMALEN et al., 2020).

Em áreas hospitalares o RNA viral é mais comumente encontrado nos setores ocupados por pacientes infectados pela COVID-19 (ZHOU et al., 2021). Uma pesquisa já relatou a contaminação de vasos sanitários, pia, maçaneta da porta, ventiladores e saída de ar, demonstrando a diversidade de habitats onde SARS-CoV-2 pode se estabelecer transitoriamente (ONG et al., 2020).

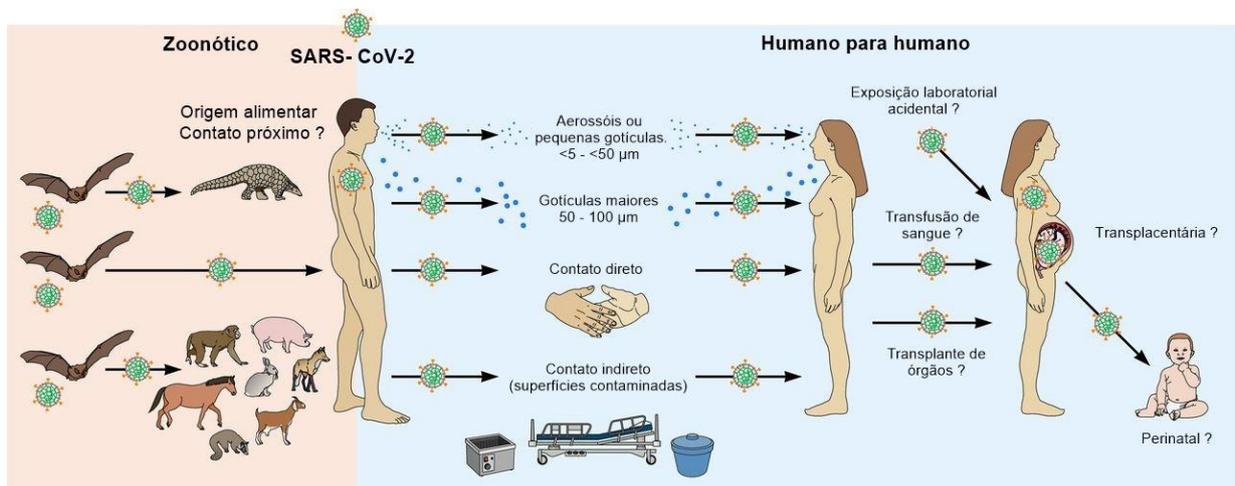
### **2.3.1 Rotas de transmissão**

Podem ocorrer diversas rotas ou modos de transmissão do SARS-CoV-2, sendo importante ressaltar que as chances de transmissão costumam modificar-se devido a alguns fatores relacionados com o vírus, com o hospedeiro e com o ambiente. Durante um evento de transmissão, diferentes rotas podem ter determinada contribuição, onde os efeitos dos fatores envolvidos em cada rota individualmente ou em várias rotas simultaneamente, muitas vezes são desconhecidos (Figura 4) (LEUNG, 2021).

Prevalentemente, o SARS-CoV-2 é transmitido por gotículas contendo vírus, liberadas do trato respiratório de pessoas infectadas através de espirros, tosse ou quando ocorre a interação com maior proximidade (menos de um metro de distância) e por um determinado tempo com outras pessoas (LI et al., 2020b; LIU et al., 2020b). Além do contato direto, em alguns casos, a transmissão pode ocorrer de forma indireta, ao tocar em

superfícies contaminadas (fômites), ou por rotas alternativas: transmissão sexual, fecal-oral e sanguínea, as quais são pouco documentadas, necessitando-se de mais estudos que confirmem a eficiência das mesmas (Figura 4) (MEYEROWITZ et al., 2021).

Figura 4 - Potenciais vias de transmissão para o SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de DHAMA et al.,(2020).

### 2.3.1.1 Transmissão respiratória e contato direto

O cenário ideal para maior transmissão do SARS-CoV-2 ocorre em espaços lotados, fechados e barulhentos, onde se tem contato próximo com pessoas infectadas e para se comunicar é necessário gritar ou falar alto, emitindo um fluxo contínuo de gotículas maiores ou aerossóis finos saturados de partículas virais. O SARS-CoV-2 é transmitido por meio dessas gotículas maiores ou macro gotículas que apresentam entre 5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, denominadas de gotículas respiratórias, e por meio de partículas menores, <math>< 5 \mu\text{m}</math> de diâmetro, conhecidas como núcleos de gotículas ou mais comumente como aerossóis (FENNELLY, 2020; HU et al., 2021).

O SARS-CoV-2 entra no corpo do indivíduo que teve contato com uma pessoa infectada por meio das membranas mucosas, olhos, boca ou nariz, se propagando pela cavidade nasal e garganta e se estabelecendo ao longo do trato respiratório (KAUR et al., 2021). A replicação viral se localiza inicialmente no trato respiratório superior, e ao longo da infecção vai progredindo para a região inferior (WÖLFEL et al., 2020).

Durante a infecção, a carga viral no trato respiratório superior atinge o pico juntamente com o início dos sintomas, no entanto, a disseminação do vírus pode começar a ocorrer 2 a 3 dias antes (pessoas pré-sintomáticas) (HE et al., 2020). A excreção de partículas virais da região faríngea é muito elevada durante a primeira semana de sintomas, alcançando uma média de  $7 \times 10^8$  cópias de RNA por swab, aproximadamente no quarto de dia de infecção. Além disso, a redução da carga viral pode não ser rápida, durando mais que o fim dos sintomas. Em estudo realizado, a detecção de RNA viral a partir da obtenção de amostras de escarros de pacientes, após o período sintomático, confirmou essa informação (WÖLFEL et al., 2020).

Além da transmissão por pessoas sintomáticas e pré-sintomáticas, estudos epidemiológicos e de modelagem já demonstraram a possibilidade de transmissão por indivíduos assintomáticos (BAI et al., 2020; JOHANSSON et al., 2021; ROTHE et al., 2020; WEI, 2020; ZHAO et al., 2020a), indicando que identificar e isolar somente os pacientes sintomáticos não controlará eficazmente a disseminação do SARS-CoV-2 (JOHANSSON et al., 2021).

A transmissão respiratória e por contato direto são consideradas as principais rotas para a dispersão do SARS-CoV-2 entre humanos (Liu et al. 2020b; Zhang et al. 2020; Santarpia et al. 2020; Falahi and Kenarkoohi 2020; Greenhalgh et al. 2021), a exposição a qualquer indivíduo infectado, sintomático ou não, está relacionada ao sucesso na transmissão viral (CHU et al., 2020a).

### 2.3.1.2 Transmissão por fômites

Para entender como a contaminação por fômites pode acontecer, primeiramente é importante saber como caracterizar essa rota de transmissão. Um fômite é qualquer objeto inanimado que, ao ser exposto e contaminado por agentes infecciosos (vírus, por exemplo), adquire a capacidade de transferir uma doença para outra pessoa. No início da pandemia do SARS-CoV-2, não se tinha clareza até que nível a transmissão por fômites teria relevância quanto à epidemiologia, o vírus parecia onipresente em locais habitados por pessoas infectadas, onde as secreções originadas das vias respiratórias serviam como um meio rico em proteínas protegendo o vírus expelido e aumentando a sua persistência e transmissão por fômites contaminadas (PASTORINO et al., 2020).

Hoje, sabe-se que o risco de infecção por essa rota possivelmente possui a influência de múltiplos fatores, tais como distância da fonte viral, quantidade de vírus a qual a pessoa é submetida e o tempo desde o momento em que o vírus foi depositado na superfície até ser tocada. Levando em consideração o fator tempo, a viabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies pode não ter uma grande durabilidade dependendo da atuação de alguns fatores ambientais, como umidade, temperatura e nível de radiação ultravioleta (CHIN et al., 2020; VAN DOREMALEN et al., 2020; ZHANG et al., 2020b).

O SARS-CoV-2 demonstrou a aptidão de permanecer infeccioso ao ser depositado em várias superfícies, como papel, vidro, aço inoxidável, de acordo com vários estudos realizados. A depender do material, o vírus pode se estabelecer por até 28 dias a 20°C, tempo muito superior ao que já foi demonstrado nos estudos que analisaram a permanência em aerossóis (até 3h) (van Doremalen *et al.* 2020).

Pesquisas recentes compararam a presença do SARS-CoV-2 no ar e em superfícies ambientais, como setores de saúde (CHIA et al., 2020; LIU et al., 2020b; SANTARPIA et al., 2020; COLANERI et al., 2020; ZHOU et al., 2021) e centros urbanos (ABRAHÃO et al., 2021; CARLO et al., 2020; DA SILVA et al., 2021a; LUO et al., 2020). Os dados obtidos, evidenciaram níveis divergentes de contaminação viral variando de elevado (ZHOU et al., 2021) a baixo (DA SILVA et al., 2021a), ou até mesmo a nenhuma contaminação pelo RNA de SARS-CoV-2 (CARLO et al., 2020). Adicionalmente, a maioria das amostras positivas obtidas de superfícies ambientais, demonstraram altos valores de ciclos de quantificação (Cqs >30) durante as análises por PCR quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) (DA SILVA et al., 2021a; ZHOU et al., 2021), o que indica a baixa carga viral e instabilidade do SARS-CoV-2 em fômites.

Apesar disso, é válido enfatizar que grande parte desses estudos não analisaram a competência do SARS-CoV-2 obtido das amostras de superfícies ambientais, de ser cultivado. Esse aspecto é de suma importância para compreender se as amostras positivas para a presença do RNA de SARS-CoV-2 são potencialmente infecciosas para as pessoas (COLANERI et al., 2020; DA SILVA et al., 2021a; ZHOU et al., 2021).

Em conclusão, a transmissão por fômites pode ser considerada uma rota indireta de contaminação, porém, a disseminação do SARS-CoV-2 por contato direto continua sendo a principal via.

### 2.3.1.3 Transmissão por animais

No início da pandemia não acreditava-se que os animais domésticos poderiam se infectar pelo SARS-CoV-2, até que os primeiros casos de cães, gatos e furões contaminados em Hong Kong, na Bélgica e na China, respectivamente, foram notificados (SHI et al., 2020; RICHARD et al., 2020; GARIGLIANY et al., 2020). Nos estudos divulgados, a transmissão ocorreu de seus donos para cães e gatos (NEWMAN 2020; GARIGLIANY et al., 2020), o que causou alerta da comunidade médica veterinária para outros possíveis casos de transmissão da COVID-19 de humanos para animais.

Em um estudo de cães infectados com o SARS-CoV-2, a confirmação da transmissão a partir de humanos deu-se pela análise das sequências genéticas do vírus, as quais eram idênticas às do vírus obtido a partir das amostras dos casos de infecção em humanos (SIT et al., 2020).

Os gatos podem transmitir o SARS-CoV-2 para outros gatos quando inoculados com o vírus. Um estudo demonstrou que mesmo sem apresentação de sintomas, todos os gatos excretaram partículas virais por cerca de 5 dias, e ainda desenvolveram títulos de anticorpos após 24 dias (HALFMANN et al., 2020).

Em outras pesquisas realizadas com macacos, furões, coelhos, raposas e hamsters, demonstrou-se a possibilidade de infecção pelo SARS-CoV-2 nesses animais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (EDWARDS; SANTINI, 2020).

Em março de 2020, enquanto Nova York era um epicentro global da pandemia, foram divulgados dados confirmando a contaminação de quatro tigres e três leões, com apresentação de sintomas respiratórios, pelo SARS-CoV-2. O RNA viral foi detectado a partir das secreções respiratórias e fezes desses animais. Análises epidemiológicas e genômicas demonstraram a possível transmissão de humanos, que trabalhavam como cuidadores, para os felídeos selvagens, sendo esses os primeiros casos de COVID-19 desses animais no mundo (MCALOOSE et al., 2020).

A hipótese de que os animais sejam os hospedeiros intermediários na cadeia de transmissão humano-animal de estimação-humano, atualmente parece incerto. Somente em casos específicos, como nas fazendas de criação de visons, onde se tem uma alta densidade populacional de animais, existe a possibilidade de maiores riscos de transmissão

do SARS-CoV-2 de animais para os seres humanos (ORESHKOVA et al., 2020; OUDE MUNNINK et al., 2021; ZHOU; SHI, 2021).

Em abril de 2020, pesquisadores relataram um surto de infecção pelo SARS-CoV-2 em duas fazendas de criação de visons na Holanda, onde os animais apresentaram problemas respiratórios e foram testados para a COVID-19. Após a condução de estudos epidemiológicos, verificou-se que os visons foram contaminados pelos tratadores que estavam infectados nas fazendas e subsequentemente transmitiram entre si, um dos tratadores apresentou sintomas após o surto e suspeita-se que possivelmente ele tenha sido contaminado pelos animais, assim como felinos domésticos que viviam nas redondezas. Nesse estudo também foram incluídas amostras de poeira e ar que estavam contaminados e serviram de fonte de transmissão para o visons e felinos (ORESHKOVA et al., 2020).

No momento, infecções em visons já foram relatadas em cerca de 10 países e a transmissão do SARS-CoV-2 de humanos para visons já ocasionou a emergência de uma nova variante viral associada a esses animais. Visons são muito vulneráveis a COVID-19 e possuem grande importância para a saúde pública devido a possibilidade de se tornarem uma fonte de infecção durante a pandemia, reintroduzindo variantes virais nas populações que resultam em alterações nos padrões de transmissibilidade ou virulência do SARS-CoV-2 e afetando a eficácia das vacinas e dos tratamentos utilizados atualmente ou em desenvolvimento (SHARUN et al., 2021).

Recentemente, cientistas canadenses divulgaram o primeiro caso confirmado de transmissão do SARS-CoV-2 de animais para humanos, após identificação de uma pessoa com COVID-19 que teve contato prévio com um cervo infectado. Esses pesquisadores coletaram amostras nasais e de linfonodos de cerca de 300 veados-de-cauda-branca que foram caçados no sudoeste de Ontário, onde 17 deles testaram positivo para uma nova linhagem do SARS-CoV-2. Após o resultado, os pesquisadores realizaram a busca pela nova linhagem em humanos e encontraram apenas uma pessoa infectada pela cepa e que havia tido contato com cervos, indicando a transmissão do vírus do animal para o paciente. Em estudos mais detalhados, constatou-se que essa nova linhagem apresenta similaridade genética com uma variante oriunda de amostras coletadas de humanos e visons de Michigan, EUA, dois anos atrás (PICKERING et al., 2022).

É importante mencionar que este estudo com as amostras coletadas de veados-de-cauda-branca encontra-se em pré-impressão e ainda não foi revisado por pares, embora os cientistas recomendem que os humanos precisam redobrar os cuidados ao interagir com animais selvagens, visto que o risco de transmissibilidade do SARS-CoV-2 entre as espécies é possível.

#### 2.3.1.4 Vias alternativas de transmissão

Existem várias vias possíveis de transmissão de SARS-CoV-2 que estão sendo estudadas em todo o mundo, incluindo as vias fecal-oral, sanguínea, sexual e vertical da mãe para os recém-nascidos.

A eliminação do SARS-CoV-2 nas fezes pode ser uma via potencial de transmissão fecal-oral, visto que o RNA viral já foi detectado em amostras de fezes de pacientes com COVID-19 (Ong et al. 2020; Wang et al. 2020b). Levando essa evidência em consideração, esgotos de hospitais devem ser devidamente desinfetados (YEO; KAUSHAL; YEO, 2020). Durante o surto de SARS-CoV em 2003, o vírus teve a capacidade de sobreviver no esgoto por 14 dias a 4°C e por dois dias a 20°C, demonstrando que as condições ambientais e de saneamento podem facilitar a contaminação pela via fecal-oral (WANG et al., 2005).

O SARS-CoV-2 também foi descrito em amostras de sangue, apesar do risco de transmissão apresentar-se diminuto (Wang et al. 2020b; Owusu et al. 2021). Em um estudo feito em Wuhan com 2430 amostras obtidas após doações de sangue, os pesquisadores encontraram RNA do SARS-CoV-2 no plasma de quatro doadores assintomáticos (Chang et al. 2020). Estudiosos coreanos também identificaram sete doadores de sangue assintomáticos como casos de COVID-19, porém nenhum dos pacientes que receberam as transfusões de sangue oriundas desses indivíduos testaram positivo para RNA de SARS-CoV-2 (KWON et al., 2020).

Em relação a transmissão sexual, até o momento não foram publicados dados que confirmem essa possibilidade. Os estudos divulgados mostraram o isolamento de RNA de SARS-CoV-2 do sêmen (Li et al. 2020b) e de fluido vaginal (SCORZOLINI et al., 2020), porém nenhuma partícula infecciosa foi detectada. Outro pequeno estudo realizado na França, onde foram acompanhados casais que continuaram a ter relações sexuais mesmo

enquanto um dos parceiros estava no período de infecciosidade, demonstrou que não houve transmissão por essa via (PRAZUCK et al., 2020).

Sobre a transmissão vertical, diversos estudos de meta-análise com base nos achados científicos da atualidade sugeriram um baixo risco da sua ocorrência na disseminação do SARS-CoV-2 (BARRERO-CASTILLERO et al., 2021; BELLOS; PANDITA; PANZA, 2021; CAPOBIANCO et al., 2020). O IgM para o SARS-CoV-2 foi relatado em nenonatos (DONG et al., 2020; ZENG et al., 2020a), embora não exista uma concordância a respeito dessa descoberta (KIMBERLIN; STAGNO, 2020). No momento não há evidências da ocorrência da transmissão vertical do SARS-CoV-2 ou de efeitos adversos graves em recém-nascidos (CHEN et al., 2020a; DASHRAATH et al., 2020; ZENG et al., 2020b). O SARS-CoV-2 também já foi detectado no leite materno (GROSS et al., 2020), embora a confirmação da transmissão a partir do leite também não tenha sido relatada (CHAMBERS et al., 2020; MARÍN GABRIEL et al., 2020).

Apesar dos poucos dados comprobatórios disponíveis a respeito da transmissão da COVID-19 por essas rotas alternativas, as mesmas não devam ser descartadas, visto que muitas pesquisas ainda encontram-se em andamento.

## 2.4 ESTRUTURA MORFOLÓGICA E GENÔMICA DO SARS-COV-2

Os vírus pertencentes à linhagem dos Beta-coronavírus ( $\beta$ -CoVs) compreendem uma família de vírus esféricos, envelopados, com uma faixa de diâmetro de 80 a 160 nm, contendo um nucleocapsídeo de proporção helicoidal, com um longo genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva, variando entre 26.4 a 31.7 kb de tamanho, o maior para qualquer vírus de RNA, e com o conteúdo GC variando de 32 a 43% (CHAN et al., 2020a, 2020b; MASTERS, 2006; WOO et al., 2010). Apresenta em sua estrutura um cap na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', permitindo a atuação como um RNA mensageiro (mRNA) para a tradução das poliproteínas replicase (FEHR; PERLMAN, 2015).

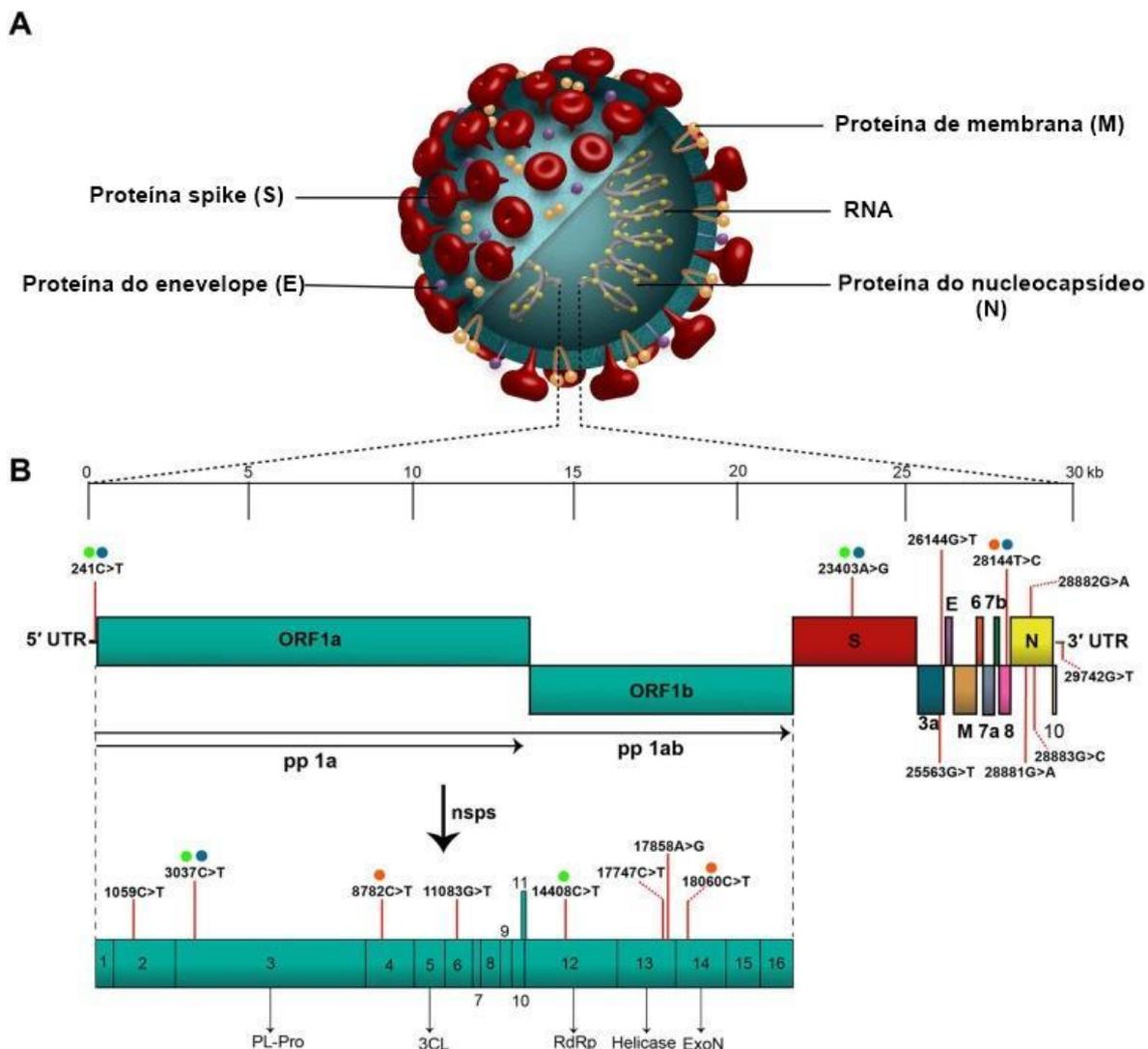
O genoma dos  $\beta$ -CoVs é geralmente formado por 15 quadros de leitura aberta ("Open Reading Frames" – ORFs), codificando aminoácidos que constituem aproximadamente 29 proteínas estruturais, não estruturais e acessórias existentes nesses vírus. Cerca de dois terços da extremidade 5' do genoma do SARS-CoV-2 são ocupados

pelas ORF1a e ORF1ab, as quais são traduzidas em poliproteínas 1a (pp1a) e 1ab (pp1ab), respectivamente. A poliproteína 1a codificada, é clivada em 11 proteínas não estruturais (nsps) promovida pela ação da protease 3C-like (3CLpro) e protease semelhante à papaína (PLpro). Enquanto, a pp1ab que é traduzida após a ocorrência de uma mudança de quadro ribossomal na posição -1 do códon de parada da ORF1a, é clivada em 16 nsps (DA SILVA et al., 2020a; SHANG et al., 2021).

O terço restante do genoma, próximo a extremidade 3', contém as ORFs que codificam as proteínas estruturais (proteínas de spike [S], membrana [M], envelope [E] e nucleocapsídeo [N]), responsáveis por desempenhar várias funções durante os processos de montagem de novas partículas virais e replicação (Shang et al. 2021a), além das proteínas acessórias (Figura 5) (RAHIMI; MIRZAZADEH; TAVAKOLPOUR, 2021).

O SARS-CoV-2 é composto por pelo menos seis a nove proteínas acessórias (3, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 10b, 13 e 14), codificados por genes que encontram-se distribuídos entre os genes estruturais (CHAN et al., 2020b; HARTENIAN et al., 2020; KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020). Diferente do SARS-CoV, o SARS-CoV-2 não possui a proteína 8a, e devido a isso apresenta uma proteína 8b maior, com cerca de 121 aminoácidos, e uma proteína 3b menor com 22 aminoácidos (WU et al., 2020a). Além das oito proteínas acessórias conhecidas, devido a rápida evolução dos estudos que estão sendo conduzidos, dados sugerem a presença de outras proteínas acessórias (ORF3c, ORF3d, ORF9c e ORF10) existentes no SARS-CoV-2 (Redondo et al. 2021; Shang et al. 2021a). Também pôde-se constatar que a extremidade 5' do genoma dos CoVs, contém uma região não traduzida (UTR), formando várias estruturas de alça e de hastes importantes para os processos de transcrição e replicação do RNA (Figura 5) (FEHR; PERLMAN, 2015).

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2 baseada na sequência referência (EPI\_ISL\_412026). (A) As proteínas estruturais que recobrem o virion são as proteínas spike (S), bem como as proteínas de membrana (M) e envelope (E). O RNA genômico encontra-se associado a proteínas nucleocapsídicas fosforiladas (N) dentro de bicamadas fosfolípidas. (B) O genoma do SARS-CoV-2 (~ 29kb) é composto pela região 5' UTR, ORF1a/b que codifica 16 nsps responsáveis pela replicação do vírus, quatro genes que codificam proteínas estruturais (S, E, M e N), seis a nove genes que codificam proteínas acessórias (3, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 10b, 13 e 14) e região 3' UTR. Abreviaturas: 5' UTR, região 5' não traduzida; ORF, quadro de leitura aberto; nsp, proteína não estrutural.



Fonte: Adaptado de RAHIMI et al., (2021).

Como citado anteriormente, as partículas virais do SARS-CoV-2 são compostas por quatro proteínas estruturais principais. As estruturas tridimensionais das proteínas S e N,

sendo esta última formada por dois domínios principais, foram determinadas, porém, as estruturas das proteínas M e E são mais difíceis de definir, devido à presença de motivos transmembrana em sua composição (BAI et al., 2022).

### 2.4.1 Proteína Spike (S)

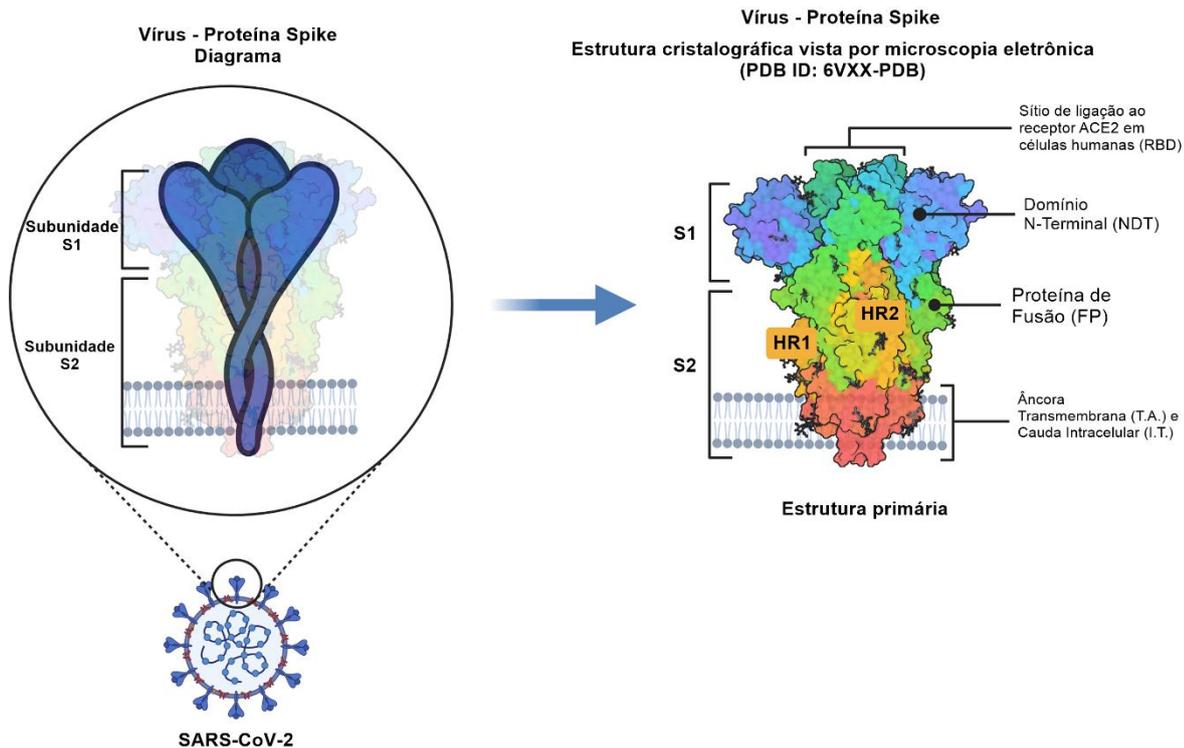
A partir da proteína S o vírus consegue ligar-se aos receptores da superfície celular do hospedeiro, favorecendo a fusão entre ambas as membranas (viral e da célula hospedeira) e facilitando a entrada do vírus nas células. A proteína S do SARS-CoV-2 compartilha aproximadamente 78% de identidade de sequência de aminoácidos com a proteína S do SARS-CoV, e similarmente a outras proteínas homologas de fusão da membrana de vírus tipo I, é formada por duas subunidades funcionais: uma porção N-terminal (S1) e uma porção C-terminal (S2) (Figura 6) (WALLS et al., 2020).

Entre essas duas subunidades (S1/S2) existem duas regiões de clivagem no SARS-CoV-2, a clivagem em S1/S2 desempenha um papel muito importante na eficiência de entrada do vírus nas células-alvo. Uma das regiões, denominada de sítio da furina é clivado pelas proteases do hospedeiro sobretudo durante a maturação, já a clivagem na segunda região (sítio de clivagem S2) acontece após a ligação à superfície da célula hospedeira (Figura 6). A presença desse sítios configura uma diferença bastante significativa entre o SARS-CoV e os outros beta-coronavírus (ÖRD; FAUSTOVA; LOOG, 2020).

Na subunidade S1 do SARS-CoV-2 encontra-se o domínio de ligação ao receptor (RBD), local de ligação aos receptores celulares que utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para entrada nas células-alvo (Figura 6) (Yan et al. 2020a; Walls et al. 2020). No SARS-CoV-2 a afinidade de ligação do RBD à ACE2 é 3 a 4 vezes maior do que no SARS-CoV (Yan et al. 2020a), o que possivelmente justifica a sua maior infectividade e transmissibilidade.

A subunidade S2 do SARS-CoV-2 medeia um processo essencial para a infecção viral, a fusão da membrana, que ocorre logo após a ligação de RBD-ACE2 e clivagem do sítio S2. Os dois domínios que compõem essa subunidade interagem entre si e formam uma estrutura conhecida como núcleo de fusão, promovendo a fusão da membrana viral-celular (Figura 6) (BOSCH et al., 2004).

Figura 6 - Representação esquemática da glicoproteína Spike (S) do SARS-CoV-2, com destaque para as suas subunidades, domínios que as compõem e respectivas funções desempenhadas durante o processo de infecção viral. Abreviaturas: HR1, repetição heptada 1; HR2, repetição heptada 2; S1, subunidade 1; S2, subunidade 2.



Fonte: Adaptado de GROBBELAAR et al., (2021).

A proteína S sempre foi vista como o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas, mas a descoberta de várias mutações nos seus epítomos antigênicos e alterações conformacionais em sua estrutura, exigem um estudo detalhado durante o projeto de uma vacina universal (BAI et al., 2022).

### 2.4.2 Proteína de Membrana (M)

A proteína M é classificada como uma glicoproteína do tipo III e é a proteína estrutural mais abundante do SARS-CoV-2. Essa pequena proteína (~ 25-30 kDa) com três domínios transmembrana, associa-se a outras proteínas virais estruturais e apresenta uma atuação central na montagem do coronavírus, definindo a formação do envelope e promovendo a matriz necessária para que o nucleocapsídeo se ligue e ocorra o brotamento (NEUMAN et al., 2011).

Em diferentes cepas de coronavírus pode-se visualizar uma maior variabilidade nas sequências de aminoácidos da proteína M, porém, em geral as características estruturais tendem a ser mantidas (ARNDT; LARSON; HOGUE, 2010). Em relação aos domínios que essa proteína possui, Fora do virion encontra-se um domínio glicosilado N-terminal curto e dentro do virion um domínio C-terminal bem maior que se prolonga de 6 a 8 nm na partícula viral (NAL et al., 2005).

A arquitetura viral é preservada a partir das interconexões que ocorrem entre as proteínas M, as quais são inseridas co-traducionalmente na membrana do retículo endoplasmático (RE) na ausência de uma sequência sinal. Dados revelam que a proteína M apresenta-se como um dímero no virion, possivelmente assumindo duas diferentes conformações, possibilitando a ocorrência da curvatura da membrana, assim como a ligação ao nucleocapsídeo (NEUMAN et al., 2011).

A proteína M também pode assumir o papel de um imunógeno significativo, devido às respostas imunes humoral e celular desencadeadas (LIU et al., 2010), também foi definida como um regulador negativo da resposta imune inata pelo fato de apresentar associação com uma proteína adaptadora comum, MAVS (FU et al., 2021). Tais particularidades indicam que a proteína M é um alvo potencial para o avanço de intervenções no SARS-CoV-2, incluindo o desenvolvimento de vacinas.

### 2.4.3 Proteína do Envelope (E)

A proteína E é a menor dentre as quatro principais proteínas estruturais (~8-12 kDa), atuando de forma multifuncional na montagem e liberação do vírus, assim como na patogênese e em sua virulência (NIETO-TORRES et al., 2014).

As suas sequências polipeptídicas são pequenas (76 a 109 aminoácidos) e divergem entre diferentes cepas de coronavírus, apesar de apresentarem uma estrutura comum. Na proteína E são encontrados três domínios: um domínio terminal amino hidrofílico curto, um domínio transmembranar hidrofóbico grande e um domínio C-terminal (SCHOEMAN; FIELDING, 2019).

As proteínas do envelope estão situadas especialmente no compartimento intermediário entre o RE e o aparelho de Golgi (LIAO et al., 2006) e são excessivamente expressas no interior das células infectadas no decorrer do ciclo de replicação. No entanto, somente uma pequena porção das proteínas E se unem no envelope do virion (VENKATAGOPALAN et al., 2015).

Além das funções exercidas na montagem e liberação do vírus, a proteína E também atua na formação de canais iônicos com baixa seletividade (VERDIÁ-BÁGUENA et al., 2012).

A proteína E do SARS-CoV-2 revelou uma composição de aminoácidos similar quando comparada à do SARS-CoV (WU et al., 2020a).

### 2.4.4 Proteína do Nucleocapsídeo (N)

A proteína N está entre as mais abundantes proteínas estruturais do SARS-CoV-2 e apresenta três porções intrinsecamente desarranjadas (o braço N, a região de ligação central e a cauda C) e dois domínios estruturais: N-terminal e C-terminal (KANG et al., 2020; ZINZULA et al., 2021).

Diferentemente das demais proteínas estruturais, a proteína N é a única que atua especialmente ligando-se ao RNA do coronavírus, constituindo o nucleocapsídeo (CHANG et al., 2016). Dessa forma, a proteína N associa-se ao RNA viral promovendo o seu

empacotamento e formando complexos de ribonucleoproteínas (RNP) os quais são importantes para manter o RNA ordenadamente ajustado, favorecendo a ocorrência dos processos de replicação e transcrição (Liang et al. 2020a).

A nucleoproteína age como chaperona molecular e é imprescindível para a síntese de RNA viral e regulação de alguns processos celulares, como apoptose celular e desenvolvimento do ciclo celular (ZÚÑIGA et al., 2010). Por ser estável, conservada, menos susceptível a mutações no decorrer da infecção e altamente imunogênica, a proteína N é avaliada como um marcador molecular de diagnóstico essencial e um alvo profilático (CHANG et al., 2016; RAHMAN et al., 2021; TAKEDA et al., 2008).

#### 2.4.5 Diversidade genética do SARS-CoV-2

A diversidade genética do SARS-CoV-2, assim como dos demais vírus de RNA, é essencial para a sobrevivência, aptidão e provavelmente sua patogênese. Conforme estudo realizado a respeito da origem do SARS-CoV-2, as mutações aleatórias e recombinação foram definidas como as duas principais fontes de diversidade genética neste vírus (DOMINGO, 2010; REHMAN et al., 2020).

Nove supostos padrões recombinantes foram determinados no genoma do SARS-CoV-2, abrangendo seis regiões críticas de recombinação existentes nos genes *S*, *RdRp*, *nsp13* e *ORF3a* (REHMAN et al., 2020). Informações obtidas do banco de dados público da *Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)* em julho de 2022, indicam que o SARS-CoV-2 apresenta uma taxa de mutação de cerca de  $8 \times 10^{-4}$  substituições nucleotídicas por sítio por ano (RE3DATA.ORG, 2012) (disponível em: <https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>).

Estudos de análise genômica realizados com o SARS-CoV-2, demonstraram mutações em vários genes, incluindo *ORF1ab*, *ORF3a*, *ORF6*, *ORF7*, *ORF8*, *ORF10*, *S*, *M*, *E* e *N* (HASSAN et al., 2020; LAHA et al., 2020). Dentre eles, *nsp1*, *nsp2*, *nsp3*, *nsp12* e *nsp15* da *ORF1ab*, assim como os genes *S* e *ORF8* foram descritos como os que mais apresentaram mutações (CHAN et al., 2020b; WEN et al., 2020).

Essas alterações nas sequências nucleotídicas podem exercer alguns papéis na patogênese e virulência, influenciando na estrutura e função das proteínas virais, assim

como alterando a resposta imune inata. Devido a isso, são necessários mais estudos que elucidem a respeito dos efeitos dessas mutações no surto de SARS-CoV-2, resumidamente, o papel das regiões mais mutáveis nos processos de replicação, transmissão e resposta imune induzida (WANG et al., 2020a; WEN et al., 2020; PHAN, 2020).

## 2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E FATORES DE RISCO DA COVID-19

O tempo médio de incubação (da exposição ao início dos sintomas) da COVID-19 é de cerca de 5 dias (intervalo de 2 a 14 dias) e grande parte dos pacientes fazem parte dos quadros leve ou moderado, com desaparecimento dos sintomas em uma semana e recuperação em domicílio.

Uma parte dos infectados (cerca de 10%) permanecem sintomáticos até a segunda semana, apresentando um maior risco de desenvolver as formas graves da COVID-19, com necessidade de hospitalização, terapia intensiva e ventilação mecânica invasiva. Muitas vezes as consequências da COVID-19 são imprevisíveis, principalmente em pacientes idosos e com comorbidades. Sendo assim, o quadro clínico pode variar de casos assintomáticos até fatais (KAMPS et al., 2021).

Estudos recentes demonstraram que pessoas de todas as idades são vulneráveis a se infectar pelo SARS-CoV-2, porém a idade média de infecção gira em torno dos 50 anos (CHEN et al., 2020b; GUAN et al., 2020; HUANG et al., 2020a; WANG et al., 2020c; WU; MCGOOGAN, 2020). Indivíduos do sexo masculino, com idade igual ou superior a 65 anos e com comorbidades, são os mais predispostos a evoluir para um quadro de doença respiratória grave, enquanto os mais jovens e a maioria das crianças apresentam infecção assintomática ou quadro leve (WANG et al., 2020d; GUAN et al., 2020).

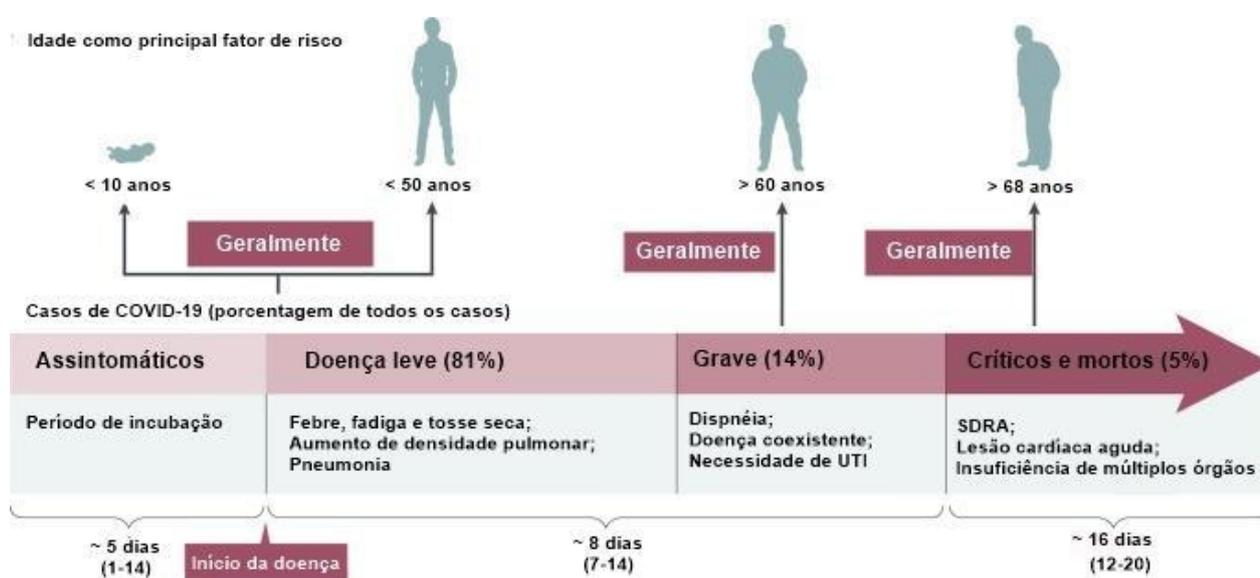
As manifestações clínicas do início da COVID-19 podem ser diversificadas e comumente são similares aos sintomas provocados por outras doenças virais respiratórias, como a gripe por exemplo. Por este motivo, o diagnóstico clínico preciso é bastante difícil (BORDI et al., 2020).

Dentre os sintomas mais comuns da infecção por SARS-CoV-2 estão a febre, tosse seca, fadiga e indisposição (CHEN et al., 2020b; GUAN et al., 2020; HUANG et al., 2020a; MAGALHÃES et al., 2020; WANG et al., 2020c). Já quanto aos outros sintomas menos

frequentes, pode-se citar as dores de cabeça, dores de garganta, dores musculares e articulares, além da dispneia, diarreia, vômito, calafrios e alterações no olfato e no paladar, sendo estes dois últimos bem característicos de pacientes com COVID-19 (CHEN et al., 2020b; DA SILVA et al., 2020b; GUAN et al., 2020; HUANG et al., 2020a; WANG et al., 2020c). Outras manifestações clínicas mais raras incluem alterações cutâneas, com apresentação de diferentes lesões (Figura 7) (ELMAS et al., 2020; RECALCATI, 2020; TAMMARO et al., 2020).

A COVID-19 é considerada uma doença multiorgânica, apresentando uma ampla gama de sintomas (NALBANDIAN et al., 2021; WIERSINGA et al., 2020). Um estudo robusto realizado com mais de 70.000 pessoas com COVID-19 na China, demonstrou que 5% dos casos apresentavam manifestações críticas, incluindo insuficiência respiratória, choque séptico e/ou falência de múltiplos órgãos (Figura 7) (CHEN et al., 2020b; WU et al., 2020b). O receptor ACE2, utilizado pelo SARS-CoV-2 para penetrar nas células, não é expresso apenas nos pulmões, mas também no coração, endotélio, epitélio tubular renal, epitélio intestinal e pâncreas, permitindo que o vírus invada esses tecidos, prolifere e destrua tais órgãos (ZHAO et al., 2020b).

Figura 7 - Características clínicas da COVID-19. Os sintomas típicos da COVID-19 são febre, tosse seca e fadiga e, em casos graves dispneia. Crianças e adultos jovens geralmente são assintomáticos, enquanto idosos e pessoas com comorbidades correm maior risco de doença grave, insuficiência respiratória e morte. Abreviaturas: SDRA, síndrome do desconforto respiratório agudo; UTI, unidade de terapia intensiva.

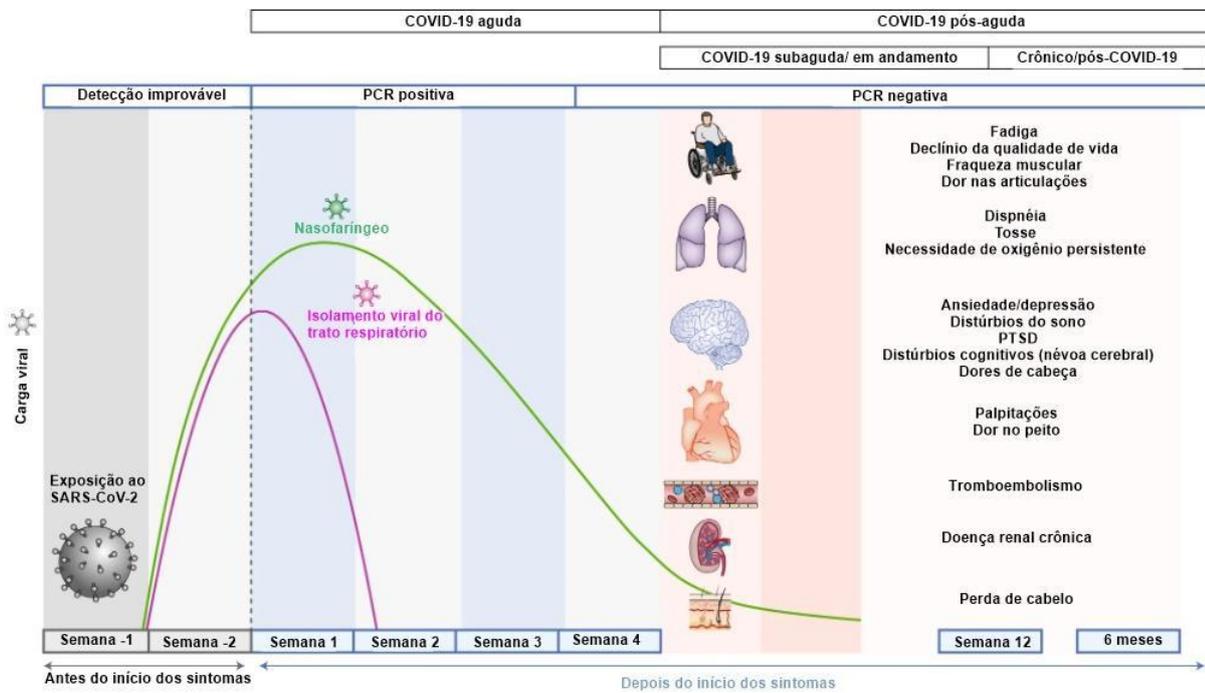


Fonte: Adaptado de HU et al., (2021).

Estão sendo publicados muitos estudos a respeito dos efeitos persistentes e prolongados após a fase aguda da COVID-19, sintomas ou complicações tardias que apresentam-se a longo prazo, após 3 – 4 semanas do início da infecção (DATTA; TALWAR; LEE, 2020; GREENHALGH et al., 2020; NALBANDIAN et al., 2021). Além de uma doença crônica ou síndrome pós-COVID que tem sido relatada em pacientes que desenvolvem sintomas persistentes além de 12 semanas do início da doença (Figura 8) (GREENHALGH et al., 2020; MORENO-PÉREZ et al., 2021; SHAH et al., 2021).

O desenvolvimento para os quadros graves da COVID-19 está associado a alguns fatores de risco, como a idade igual ou superior a 65 anos e pessoas com comorbidades (hipertensão, diabetes, doença pulmonar, cardiovascular, hepática ou renal crônica, imunodeficiências, câncer e obesidade (GARG, 2020; LIANG et al., 2020b; GRASSELLI et al., 2020; DU et al., 2020; PETRILLI et al., 2020; RICHARDSON et al., 2020).

Figura 8 - Linha do tempo da COVID-19 pós-aguda. A COVID-19 aguda geralmente dura até 4 semanas a partir do início dos sintomas, além do qual o SARS-CoV-2 competente em replicação não foi isolado. A COVID-19 pós-aguda é definida como sintomas persistentes e/ou complicações tardias ou de longo prazo além de 4 semanas do início dos sintomas. Os sintomas comuns observados na COVID-19 pós-aguda estão resumidos na figura. **Abreviaturas:** PTSD, desordem do estresse pós-traumático.



Fonte: Adaptado de NALBANDIAN et al., (2021).

Já em crianças e bebês, a COVID-19 é uma doença leve, e quando infectados são geralmente assintomáticos (GAYTHORPE et al., 2021). No entanto, os mecanismos desconhecidos da gravidade da COVID-19 em crianças, estão sendo elucidados. A presença de comorbidades, resposta imunológica e fatores genéticos foram analisados para o melhor entendimento da progressão da doença nesse grupo de indivíduos (CHOU; THOMAS; RANDOLPH, 2022). Dados demonstraram a ocorrência de uma síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MIS-C) ocasionada pela infecção pelo SARS-CoV-2 (CONSIGLIO et al., 2020; FELDSTEIN et al., 2021; VERDONI et al., 2020; WHITTAKER et al., 2020).

Em um estudo realizado recentemente, avaliando mais de 700 casos de MIS-C, foi possível constatar a elevada frequência de sintomas gastrointestinais com dor abdominal e diarreia, além de outros sintomas comuns da COVID-19, como tosse e desconforto

respiratório. Apesar da baixa letalidade, a MIS-C parece ser uma condição mais grave para os pacientes infectados (RADIA et al., 2021).

Resumidamente, as manifestações clínicas apresentadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2 estão relacionadas com os mecanismos do sistema imunológico que são acionados pelo organismo do hospedeiro à medida que a doença evolui. Essas respostas imunológicas devem ser melhor compreendidas para o direcionamento do tratamento eficaz, visando a atenuação dos sintomas.

### **2.5.1 Resposta imunológica durante a infecção pelo SARS-CoV-2**

O SARS-CoV-2 invade e replica-se principalmente nas células epiteliais alveolares, onde medeia o dano celular e induz uma resposta inflamatória nos tecidos. A resposta inflamatória desencadeada recruta células T auxiliares que produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucinas 2 e 12. As células alveolares após lesão também liberam interferons, citocinas e outros componentes intracelulares. Subsequentemente, outras células inflamatórias são recrutadas provocando uma “tempestade de citocinas”, que pode levar ao dano de órgãos e falência múltipla, característica dos quadros graves, conforme já destacado (LIU et al., 2020c).

Altas concentrações de mediadores imunológicos do sangue periférico, como IL6, proteína induzida por interferon gama (IP)-10 e IFN- $\gamma$  foram detectados em pacientes com COVID-19 (WU et al., 2020b). Os interferons podem provocar vários efeitos ao atuar nas células circundantes, preparando-as contra a infecção viral. Os macrófagos alveolares detectam a lesão celular e respondem às citocinas liberadas secretando citocinas e quimiocinas. A ocorrência de um processo inflamatório no parênquima pulmonar estimula as terminações nervosas responsáveis por iniciar o reflexo da tosse, sintoma comum que ocorre no início da COVID-19 (HU; CHRISTMAN, 2019).

Outros componentes como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  que são citocinas pró-inflamatórias que promovem o aumento da permeabilidade vascular e expressão de moléculas de adesão, recrutam mais células imunes como neutrófilos e monócitos que entram no local da lesão ao ligar-se as proteínas de adesão existentes na

superfície tecidual. A IL-8 recruta neutrófilos e outras quimiocinas atraem monócitos (MOORE; KUNKEL, 2019).

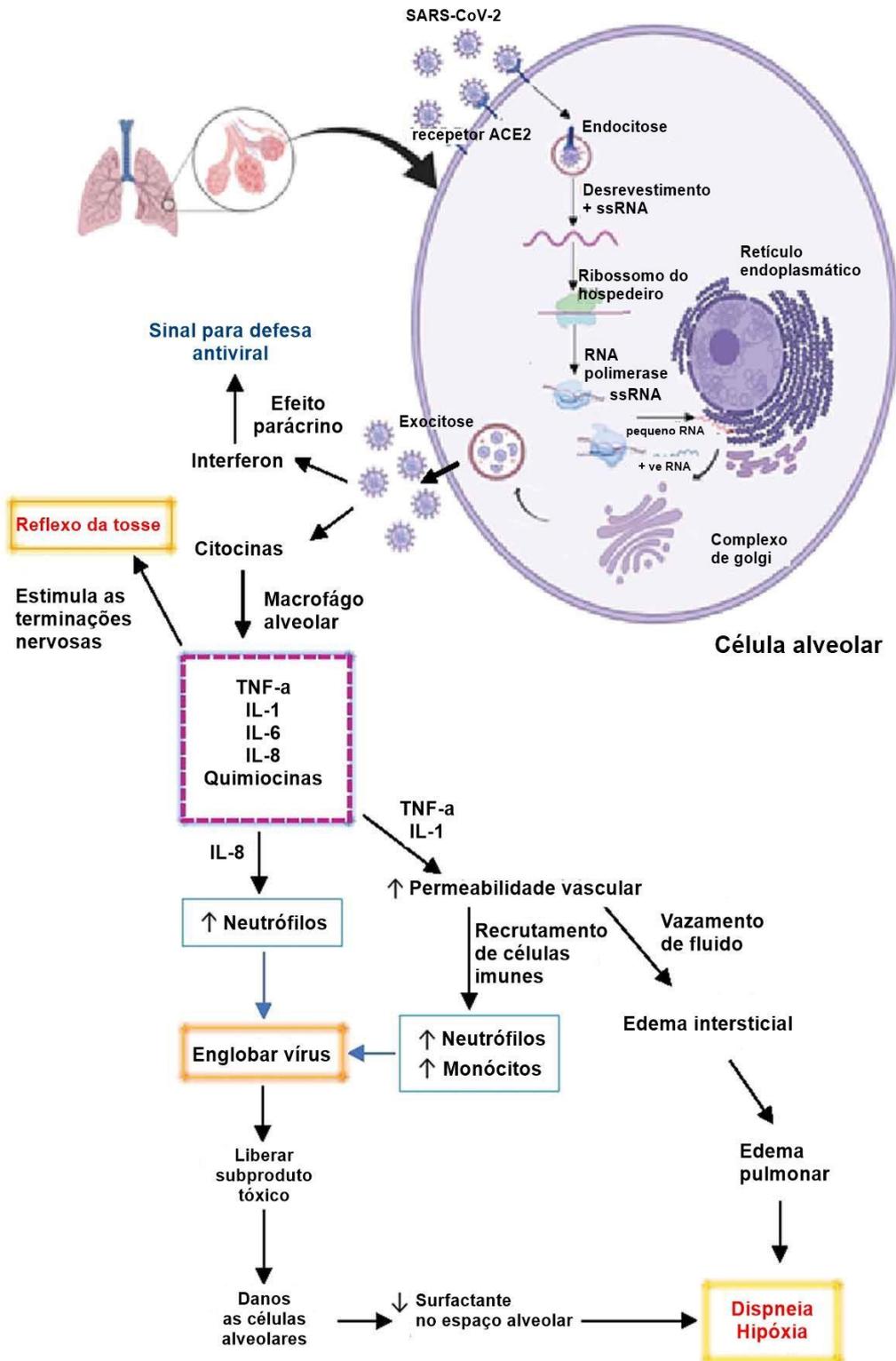
O extravasamento de líquido ocasionado pelo aumento da permeabilidade vascular, ocorre entre o espaço intersticial e os alvéolos, levando a um edema pulmonar e consequente dispneia e hipoxemia (Figura 9) (RAHMAN et al., 2021).

Outros mediadores inflamatórios são liberados pelo glóbulos brancos e células endoteliais prejudicadas, incluindo metabólitos de ácido araquidônico, leucotrienos e prostaglandinas. Os leucotrienos causam broncoconstrição, levando a ventilação prejudicada e também a hipoxemia. As prostaglandinas, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  são responsáveis por causar febre, uma manifestação clássica e inicial da COVID-19 (COSTELA-RUIZ et al., 2020; ROBB et al., 2020). Diante da diminuição de oxigênio no sangue, quimiorreceptores no centro cardiopulmonar do cérebro são estimulados, levando a um aumento da frequência inspiratória e rápido bombeamento do coração, buscando prover uma maior quantidade de oxigênio ao corpo (BRINKMAN; TORO; SHARMA, 2022). Por esse motivo, pacientes com hipoxemia em geral desenvolvem taquipneia e taquicardia (MARSHALL, 1998).

Resumidamente, essa elevada resposta imune provocando uma lesão alveolar, acúmulo de líquido, descompasso da ventilação/perfusão e hipoxemia leva a ocorrência da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), principal causa de mortalidade em pacientes com COVID-19 (BANSAL; MITTAL, 2020).

No caso dos indivíduos assintomáticos, o sistema imunológico mantém-se controlado, e quando há evolução do quadro apenas sintomas discretos de tosse, falta de ar e febre se desenvolvem. Os macrófagos alveolares também podem detectar o vírus através dos receptores especiais do tipo 4 (TLR-4), englobando as partículas virais pelo processo de fagocitose (CASCELLA et al., 2022).

Figura 9 - Replicação viral do SARS-coV-2 em células alveolares, mediadores imunológicos envolvidos no processo e as principais manifestações clínicas desencadeadas.



Fonte: Adaptado de RAHMAN et al., (2021).

## 2.6 DIAGNÓSTICO DO SARS-CoV-2

A rápida identificação e isolamento de indivíduos infectados é crucial para controlar a disseminação da COVID-19, sendo o diagnóstico feito por meio de características clínicas, laboratoriais e radiológicas. Devido à falta de especificidade dos sintomas e achados radiológicos da COVID-19, recomenda-se que a infecção por SARS-CoV-2 seja confirmada por ensaios moleculares baseados na detecção de sequências genéticas específicas do vírus (KAMPS et al., 2021).

A OMS publicou uma orientação provisória, a qual foi atualizada em setembro de 2020, a respeito dos testes diagnósticos para COVID-19 em casos humanos suspeitos (disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020d). Além disso, várias revisões gerais atualizadas sobre as técnicas laboratoriais para diagnóstico do SARS-CoV-2 foram publicadas (KILIC; WEISSLEDER; LEE, 2020; LOEFFELHOLZ; TANG, 2020).

De acordo com a OMS, a testagem deve ser realizada com base em fatores clínicos e epidemiológicos, visando apoiar o manejo clínico dos pacientes e as medidas de controle da infecção. Nos casos de pacientes sintomáticos, um teste específico deve ser realizado imediatamente, principalmente para profissionais de saúde com sintomas. Locais como lares de idosos e outras instalações que acomodam um grande número de pessoas, também devem ser priorizados devido a possibilidade de ocorrência de grandes surtos e alta mortalidade de residentes (KAMPS et al., 2021)

Em regiões com limitação de recursos, os pacientes só devem ser testados se o resultado do teste positivo for imprescindível para a tomada de medidas. As autoridades e instituições de vários países e estados atualizam constantemente as recomendações acerca dos grupos que devem ser testados, essas mudanças devem ser adaptadas à situação epidemiológica local. Quanto menor for a taxa de infecção e maiores as capacidades de teste, mais pacientes podem ser testados (KAMPS et al., 2021).

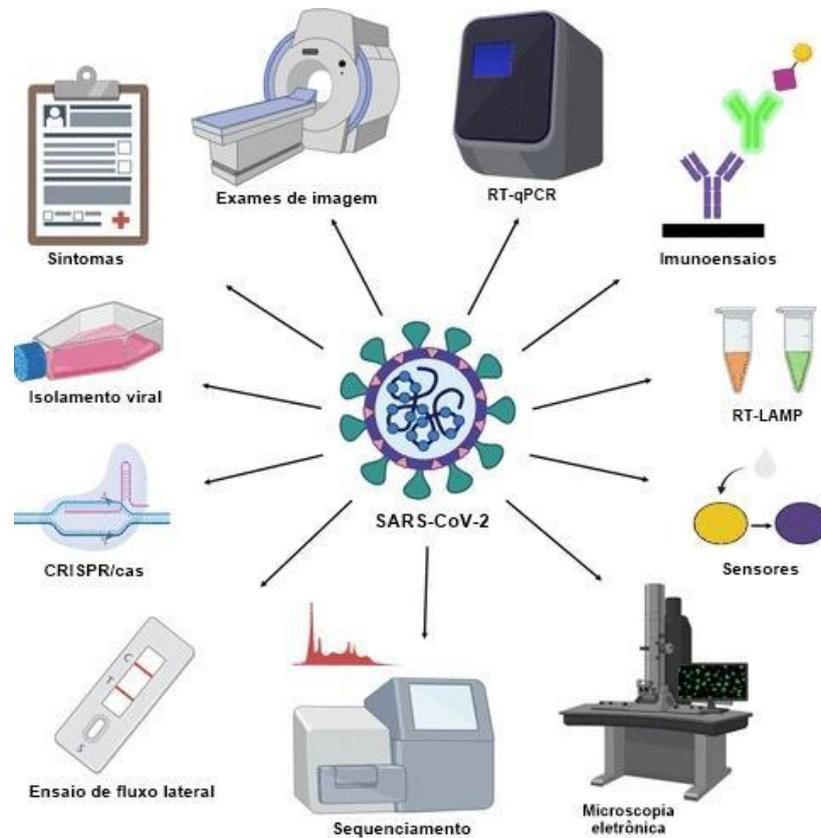
A disponibilidade de testes de diagnósticos para rastreamento da COVID-19 em todas as regiões seria um ponto de partida para contenção eficiente da pandemia, prevenindo a disseminação entre pessoas e comunidades que incluem pessoas infectadas assintomáticas, responsáveis em espalhar a infecção para idosos e pessoas com comorbidades, geralmente (LOEFFELHOLZ; TANG, 2020; WANG et al., 2020d).

É importante destacar que não só a disponibilidade dos testes faz-se urgentemente necessário, como também o aperfeiçoamento da sensibilidade e especificidade dos mesmos, visto que resultados falso-negativos afetam a segurança pública e permitem a dispersão da infecção (WINICHAKOON et al., 2020; LIU, et al. 2020d).

Atualmente a confirmação da COVID-19 pode ser realizada por meio do acompanhamento das manifestações clínicas apresentadas (informações abordadas no tópico 2.5 Manifestações clínicas e fatores de risco da COVID-19), achados nos exames de imagem, avaliação de biomarcadores nos exames laboratoriais, testes de ácido nucleico e métodos sorológicos. O desempenho destes ensaios são determinados a partir da utilização de vários parâmetros, incluindo sensibilidade clínica, especificidade clínica, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e precisão geral (AI et al., 2020).

A confirmação da infecção por SARS-CoV-2 pode ser alcançada por métodos diretos e indiretos. A detecção direta é mais específica e a amostra clínica é examinada diretamente quando à presença de partículas virais, antígenos ou RNA, enquanto os métodos indiretos são usados para detectar a resposta imunológica em indivíduos infectados, como os anticorpos IgM e IgG (Figura 10) (DA SILVA et al., 2020b). Nas próximas seções serão apresentados os diferentes métodos desenvolvidos e utilizados para o diagnóstico do SARS-CoV-2, abordando seus princípios, vantagens e limitações.

Figura 10 - Plataformas diagnósticas para detecção da COVID-19.



Fonte: Adaptado de DA SILVA et al. (2020b).

### 2.6.1 Amostras, biossegurança para manuseio e processamento

Uma etapa essencial para um diagnóstico confiável é a escolha da amostra apropriada. A infecção por SARS-CoV-2 pode ser detectada em uma variedade de amostras biológicas, como aspirados ou lavagens nasofaríngeas ou orofaríngeas, swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos, escarro, saliva, aspirados traqueais e lavado broncoalveolar (WÖLFEL et al., 2020; WANG et al., 2020b).

Amostra de nasofaringe coletada com um swab de fibra plástica é padrão-ouro para testes de detecção de SARS-CoV-2, visto que fornece resultados confiáveis e não é um processo muito invasivo. Quando a coleta de amostra nasofaríngea não é possível, swabs

orofaríngeos, swabs nasais médios ou swabs nasais (narinas anteriores) também são alternativas cabíveis. Os swabs devem ser colocados imediatamente após a coleta em tubos estéreis contendo 2 a 3 mL do meio de transporte viral para manutenção da integridade. Essas amostras devem ser armazenadas a 2 – 8°C se o processamento estiver programado para ocorrer em até 72h, caso contrário, o armazenamento deve ser realizado a -70°C ou abaixo (CDC 2020a).

Os cuidados durante a coleta, manuseio e armazenamento das amostras são muito importantes para evitar resultados falso-negativos ao realizar-se os testes diagnósticos específicos. Além das amostras do trato respiratório, o SARS-CoV-2 pode ser detectado em outras amostras (informações abordadas no tópico 2.4.1.4 Vias alternativas de transmissão). As amostras de soro e plasma são utilizadas para os ensaios sorológicos, geralmente uma semana após a ocorrência da infecção. O tempo médio de soroconversão para anticorpos anti-SARS-CoV-2 totais, IgM e IgG foram, 11, 12 e 14 dias respectivamente (ZHAO et al., 2020c)

De acordo com a OMS, todos os procedimentos realizados com amostras suspeitas para COVID-19 devem ser realizadas apenas por profissionais capacitados e em laboratório com nível de biossegurança adequado. Ensaio de diagnóstico não propagativos, por exemplo os testes de amplificação de ácidos nucleicos, sequenciamento e ensaios do tipo ELISA podem ser executados em laboratórios com nível de biossegurança 2 (NB-2), desde que o processamento inicial das amostras (antes da etapa de inativação viral) tenha sido feito em cabine de segurança biológica validada (DA SILVA et al., 2020b).

Já as etapas do trabalho que abrangem a propagação do vírus, como cultura de vírus, isolamento ou ensaios de neutralização, devem ser conduzidos em laboratórios equivalentes ao NB-3 utilizando práticas validadas. Os profissionais devem usar equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados e cumprir todos os procedimentos operacionais padrão relativos à coleta e manuseio das amostras (CDC, 2020b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

### **2.6.2 Isolamento do SARS-CoV-2**

O isolamento do vírus não é indicado como teste de diagnóstico apropriado para ser aplicado na rotina devido a sua reduzida sensibilidade, tempo longo de execução e

necessidade de laboratório NB-3. No entanto, tais métodos baseados em cultura para detecção do SARS-CoV-2 têm sido empregados em laboratórios de pesquisa e saúde pública em diferentes partes do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020d).

O SARS-CoV-2 pode ser cultivado em várias linhagens celulares, incluindo células epiteliais das vias aéreas humanas (ZHU et al., 2020a; LU et al., 2020b), Vero E6, Vero CCL-81 e células Huh-7 (HARCOURT et al., 2020; WÖLFEL et al., 2020; ZHOU et al., 2020). As células E6 expressam níveis elevados de ACE2 (REN et al., 2006), receptor celular chave para a infecção por SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020).

Em um estudo realizado para avaliar a suscetibilidade de várias linhagens celulares durante o processo de replicação do SARS-CoV-2, observou-se efeito citopático (CPE) apenas nas células Vero E6 e Vero CCL81, nas quais o vírus cresceu para  $>10^7$  unidade formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) 24h pós-infecção. O SARS-CoV-2 produziu placas diferentes nas células Vero E6, embora as placas nas células Vero CCL-81 não fossem tão evidentes, sugerindo que as células Vero E6 são a melhor opção para propagação, quantificação e estudo de fenótipos de placas de diferentes cepas de SARS-CoV-2 (HARCOURT et al., 2020).

### **2.6.3 Métodos sorológicos**

Técnicas analíticas que apresentam como finalidade a pesquisa de anticorpos que uma pessoa infectada produziu, ou seja, a detecção de infecções virais anteriores, é uma das maneiras mais eficazes para o controle da pandemia da COVID-19. Ensaios sorológicos são de suma importância para definir a soroprevalência, exposição prévia e identificar doadores humanos altamente reativos para a geração de soro convalescente como terapêutico (KAMPS et al., 2021).

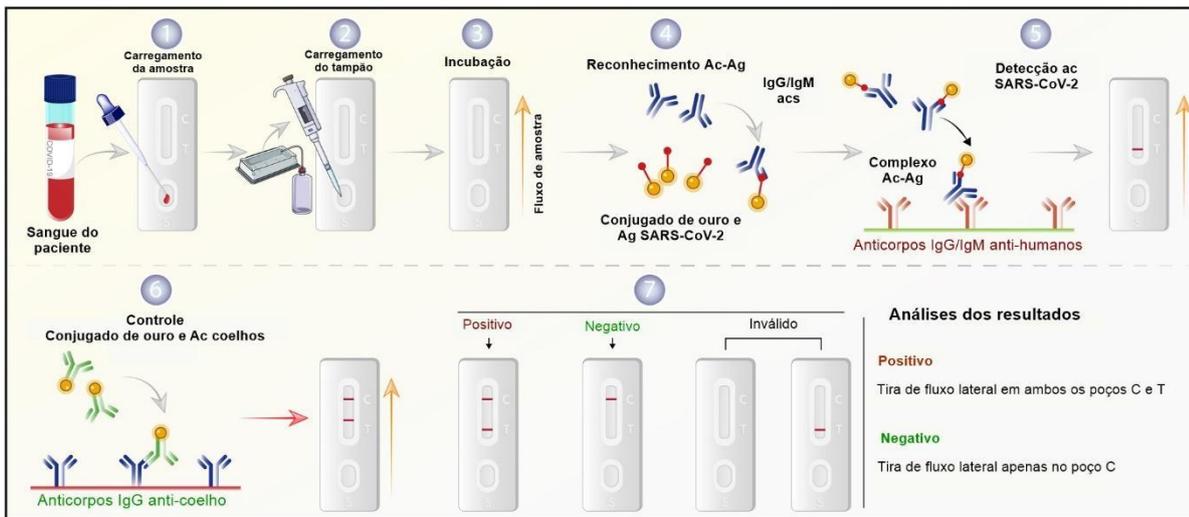
Esses testes também dão suporte para rastrear contatos, realizar a triagem de profissionais de saúde, ter uma ideia de quantas pessoas foram infectadas em determinadas populações e em quantas o vírus não foi devidamente diagnosticado por PCR, além disso, a taxa de assintomáticos também pode ser prevista, bem como a taxa real de mortalidade e eficácia da vacina (DA SILVA et al., 2020b; KAMPS et al., 2021).

Juntamente com estudos epidemiológicos bem planejados, os ensaios sorológicos podem reduzir os números não divulgados onipresentes nos cálculos divulgados atualmente (KAMPS et al., 2021).

Desde os primeiros relatos de infecções por SARS-CoV-2, um grande número de testes sorológicos foram desenvolvidos e comercializados. Distintas plataformas de ensaios baseados em sorologia foram executadas até o momento, como por exemplo os ensaios de fluxo lateral (LFA) (Figura 11), ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), ensaios enzimáticos de quimioluminescência (CLIA) e ensaios de imunofluorescência (IFA) (KONTOU et al., 2020). Destes, os métodos LFA, ELISA e CLIA são comumente utilizados na rotina para confirmação da COVID-19 (DA SILVA et al., 2020b)

Os testes sorológicos em geral usam antígenos recombinantes para detecção de uma ou mais classes de imunoglobulinas: IgA, IgM ou IgG. Devido à elevada antigenicidade, as proteínas S, S RBD e N são as mais utilizadas (TANG et al., 2020; WALLS et al., 2020; ZHENG; SONG, 2020). IgM e IgG são as mais frequentemente detectadas pelos métodos sorológicos para o SARS-CoV-2, sendo a detecção de IgA mais rara (Figura 11) (ESPEJO et al., 2020).

Figura 11 - Teste sorológico para detecção do SARS-CoV-2. O fluxo de trabalho começa com a adição do soro do paciente ao poço de fluxo de amostra. (1) O tampão salino é adicionado por gotejamento (2) na amostra de soro (3) até que o ouro-anticorpo de coelho apareça no poço de controle (C). Uma banda de teste positiva indica a presença de anticorpos contra COVID-19 (4-6). Os resultados sem uma banda C positiva são inválidos (7). Este ensaio mostra uma resposta pós-imune e pode mostrar resultados negativos para pacientes recentemente infectados. Também pode detectar vírus em pessoas previamente infectadas, mas assintomáticas. Abreviaturas: Ac, anticorpo; Ag, antígeno, C, controle; T, teste.



Fonte: Adaptado de KEVADIYA et al., (2021).

Estudos recentes demonstraram que os testes que utilizam o antígeno S apresentam uma maior sensibilidade do que aqueles baseados no antígeno N (KONTOU et al., 2020). A subunidade S1 da proteína S é um epítipo imunodominante muito importante gerado durante a resposta contra a infecção pelo SARS-CoV-2, indicando ser promissora para uso durante a elaboração de ensaios sorológicos (PREMKUMAR et al., 2020; OKBA et al., 2020). Além disso, testes baseados em N demonstram reatividade cruzada com outros anticorpos anti-coronavírus humanos (LONG et al., 2020; SILVA; PENA, 2021b).

Os métodos sorológicos apresentam limitação para diagnosticar a COVID-19 na fase aguda da doença, o tempo médio para detecção das respostas imunes à infecção pelo SARS-CoV-2 é de 1 a 2 semanas (TALI et al., 2021).

A alta sensibilidade, especificidade e precisão geral são parâmetros necessários para que um teste sorológico seja recomendado. No entanto, um grande número de resultados falsos positivos e falsos negativos já foram observados (HANSON et al., 2020;

SILVA; PENA, 2021b). Visando evitar tais problemas, os métodos sorológicos devem ser desenvolvidos a partir de um guia padrão como referência, e posteriormente, amostras de pacientes apropriadas e representativas de um cenário real devem ser utilizadas para validar o ensaio (HANSON et al., 2020; SILVA; PENA, 2021b).

Ensaio que medem títulos de anticorpos neutralizantes são amplamente utilizados para avaliar a imunidade contra o SARS-CoV-2, visto que esses anticorpos atuam como preditivos de proteção ao serem induzidos por infecção natural ou após vacinação (CROMER et al., 2022; KHOURY et al., 2021).

#### **2.6.4 Métodos baseados em antígenos**

A identificação de proteínas do SARS-CoV-2 a partir de reações imunológicas é o princípio dos testes de detecção de antígenos. Embora apresentem uma menor sensibilidade quando comparados aos métodos moleculares, o tempo para liberação do resultado é bem mais rápido, tendo utilidade principalmente nas fases iniciais da infecção quando se tem uma elevada carga viral (BRÜMMER et al., 2021; HABLI et al., 2021).

Vários grupos de pesquisa e empresas desenvolveram diversos testes de antígenos para detecção do SARS-CoV-2 desde a sua emergência (LIN et al., 2020; MAK et al., 2020; MAVRIKOU et al., 2020; PORTE et al., 2020; STADLBAUER et al., 2020).

Em um estudo de meta-análise realizado recentemente, usando mais de 200 conjuntos de dados clínicos e incluindo mais de 100 mil amostras de pacientes, a utilização de testes rápidos baseados em antígeno (Ag-RDTs) para detecção do SARS-CoV-2 foi avaliada (BRÜMMER et al., 2021). Os Ag-RDTs foram comparados com os dados obtidos por RT-qPCR para diagnóstico da COVID-19, método padrão atual. Os dados demonstraram uma elevada sensibilidade quando os testes baseados em antígeno foram realizados na primeira semana de início dos sintomas, ou seja, quando se tem uma alta carga viral (valores de C<sub>q</sub>s <20 na RT-qPCR) (BRÜMMER et al., 2021).

Tais informações demonstram a utilidade dos Ag-RDTs na detecção do SARS-CoV-2 no início da infecção, embora apresente baixa eficácia para diagnosticar a COVID-19 na fase tardia, limitando o valor do teste para essa finalidade.

## 2.6.5 Métodos moleculares

Comparados a todos os métodos abordados nos tópicos anteriores, o diagnóstico molecular é o que oferece uma abordagem mais segura para identificação do SARS-CoV-2 e diferenciação de outros vírus (HUANG et al., 2020b). Com o sequenciamento dos genomas virais e depósito em banco de dados como (GISAID, GenBank e Virus Pathogen Database and Analysis Resource – ViPR, por exemplo), foi o possível o desenvolvimento de *primers* e sondas para os diversos testes de diagnóstico molecular da COVID-19 (DA SILVA et al., 2022).

Nesta sessão abordaremos os testes moleculares para detecção do SARS-CoV-2, dando ênfase aos dois principais, RT-qPCR e RT-LAMP (AHIRWAR et al., 2021).

### 2.6.5.1 Sequenciamento de Genomas

Com o surgimento das novas variantes do SARS-CoV-2, o sequenciamento dos genomas tornou-se essencial para rastreamento das alterações genômicas virais ao longo do tempo, bem como conhecimento dos padrões de transmissão (DA SILVA et al., 2020b; PAIVA et al., 2020; SILVA; PENA, 2021a). Poucos relatos demonstraram o uso de sequenciamento de última geração (Next- Generation Sequencing - NGS) para detecção do SARS-CoV-2 (BHOYAR et al., 2021; BLOOM et al., 2021; NASIR et al., 2020).

Embora o NGS seja uma ferramenta potencial, dificuldades práticas, como elevado custo, escassez de suprimentos, necessidade de infraestrutura laboratorial especializada e instrumentação sofisticada, além de uma equipe bem treinada e com experiência em bioinformática, representam limitações importantes para implementação no diagnóstico da COVID-19, principalmente em países com poucos recursos (BEZERRA et al., 2021). Dentre os gargalos mencionados, as tecnologias NGS ainda apresentam baixa sensibilidade analítica, comprometendo negativamente a análise dos resultados (TALI et al., 2021). Por isso, recomenda-se o uso de amostras com elevadas cargas virais, ou seja, baixos valores de Cqs, visando a obtenção de resultados com maior qualidade (MEREDITH et al., 2020; NASIR et al., 2020).

Protocolos de sequenciamento baseados em métodos NGS (por exemplo, Illumina, BGI MGISEQ2000 e Nanopore – MinION) e Sanger estão sendo utilizados para obtenção

de sequências genômicas de SARS-CoV-2 utilizando amostras de pacientes (LU et al., 2020a; ZHOU et al., 2020; ZHU et al., 2020a).

Até novembro de 2022, 13.879.029 sequências genômicas foram depositadas no banco de dados GISAID, inclusive sequências de genoma completo de pacientes com COVID-19 de diferentes regiões mundiais.

Protocolos de sequenciamento rápidos e de baixo custo são muito importantes para utilização na discriminação das variantes emergentes do SARS-CoV-2 à medida que a pandemia evolui. Levando em consideração essa necessidade, um grupo de pesquisadores estabeleceram um protocolo rápido e acessível baseado no sequenciamento Sanger de um único fragmento de PCR capaz de identificar e discriminar linhagens de SARS-CoV-2 (BEZERRA et al., 2021).

Apesar de ainda não ser utilizado rotineiramente para detecção do SARS-CoV-2 em laboratórios de referência, o sequenciamento do genoma de amostras positivas, juntamente com ferramentas computacionais, possibilitam inúmeras aplicações em diversas áreas, como investigações de patogênese de doenças, diagnósticos, vacinas, drogas antivirais, epidemiologia molecular, evolução viral, ligação ao receptor celular, possíveis hospedeiros virais e resposta imune antiviral do hospedeiro (AHMED; QUADEER; MCKAY, 2020; DA SILVA et al., 2020a, 2022; LU et al., 2020a; PARASKEVIS et al., 2020).

#### 2.6.5.2 Sistemas baseados em CRISPR/Cas

A maquinaria de repetições palindrômicas curtas regularmente interespaçadas agrupadas (CRISPR)/Cas pode ser considerada uma outra categoria de técnica molecular a ser utilizada na detecção do RNA de SARS-CoV-2 (KAMINSKI et al., 2021). Os sistemas CRISPR são parte fundamental do sistema imunológico adaptativo microbiano contra ácidos nucleicos estranhos, e ao ser ativados guiam as proteínas Cas até sítios de reconhecimento e clivagem de sequências específicas (HILLE et al., 2018).

Ao longo dos últimos anos, estudos para entendimento do mecanismo e características dos sistemas CRISPR/Cas desencadearam muitos avanços tecnológicos na edição de genomas, com ênfase para aplicações diagnósticas e detecção de vírus de RNA (DE PUIG et al., 2021; MANGHWAR et al., 2020; WELCH et al., 2022).

De maneira geral, o sistema CRISPR/Cas é programado para clivar sequências de ácido nucleico específicas no alvo de RNA/DNA, e sua clivagem pode ser detectada por fluorescência ou leituras de fluxo lateral (PATCHSUNG et al., 2020).

O desbloqueio específico de repórter enzimático de alta sensibilidade (SHERLOCK) foi um dos primeiros métodos de detecção baseados em CRISPR/Cas. Descrito em 2017, em combinação com a pré-amplificação isotérmica, o SHERLOCK já foi utilizado para detecção de cepas específicas de vírus Zika e Dengue, e recentemente foi adaptado para detectar o RNA do SARS-CoV-2 (JOUNG et al., 2020; SCHERMER et al., 2020). Pesquisadores desenvolveram um teste de baixo custo para diagnóstico do SARS-CoV-2 e de suas variantes emergentes utilizando a tecnologia do sistema SHERLOCK (DE PUIG et al., 2021).

Essa descoberta destaca o potencial promissor dos sistemas de diagnóstico baseados em CRISPR/Cas para o diagnóstico de pacientes com COVID-19. No entanto, a maioria dos fluxos de trabalho baseados em CRISPR ainda exige várias etapas de manuseio das amostras, incluindo extração de RNA, além da necessidade de boa infraestrutura e equipamentos laboratoriais com custo relativamente elevado, limitando sua aplicabilidade em áreas remotas (DA SILVA et al., 2022).

### 3.6.5.3 Sensores

Os Sensores são dispositivos que detectam componentes químicos ou biológicos por meio da geração de sinais (BHALLA et al., 2016). Fornecem uma ferramenta de diagnóstico descentralizada, eliminando as limitações enfrentadas pela RT-qPCR, pois possuem alta capacidade e baixo custo para uso em locais com poucos recursos (MATTIOLI et al., 2020; QIN et al., 2020).

Atualmente, devido às inúmeras vantagens dos sensores, muitos estudos avaliam alternativas baseadas nessa metodologia para diagnóstico de pacientes com COVID-19. A maioria dos sensores desenvolvidos para o SARS-CoV-2 são baseados em plataformas utilizadas anteriormente para detecção de outros patógenos virais (DA SILVA et al., 2020b).

Diferentes tipos de sensores já foram feitos para o SARS-CoV-2, como os genossensores, imunossensores, sensores eletroquímicos e imunossensores elétricos (MATTIOLI et al., 2020).

Os sensores baseados em papel oferecem outra alternativa promissora para o diagnóstico da COVID-19, visto que possuem alta sensibilidade e especificidade, além da simplicidade de utilização, facilidade para adaptação, baixo custo e ausência de armazenamento e transporte em baixas temperaturas (PARDEE et al., 2016; TINAFAR; JAENES; PARDEE, 2019).

Estudos anteriores sobre diagnósticos baseados em biologia sintética, possibilitaram a utilização de reações livres de células (CF) para detecção de diferentes patógenos, como vírus Zika, vírus chikungunya, norovírus e vírus Ebola (EV) (GREEN et al., 2014; KARLIKOW et al., 2022; MA et al., 2018; PARDEE et al., 2014). Com esforços para controlar a pandemia da COVID-19, o mesmo sistema CF foi adaptado para diagnóstico do SARS-CoV-2, alcançando alta sensibilidade e especificidade (AMALFITANO et al., 2021).

Os dados disponíveis, demonstram o potencial de ferramentas baseadas em sensores para responder a crises sanitárias globais (DA SILVA et al., 2022).

#### 2.6.5.3 RT-qPCR

Atualmente, o RT-qPCR é considerado o método laboratorial padrão ouro para o diagnóstico do SARS-CoV-2 (DA SILVA et al., 2020b). Por apresentar elevada sensibilidade e especificidade, o procedimento permite a detecção de RNA viral tanto nos primeiros dias de infecção, após o início dos sintomas durante os estágios iniciais da doença, como nas fases pré-sintomática ou pós-sintomática (KEVADIYA et al., 2021; WÖLFEL et al., 2020).

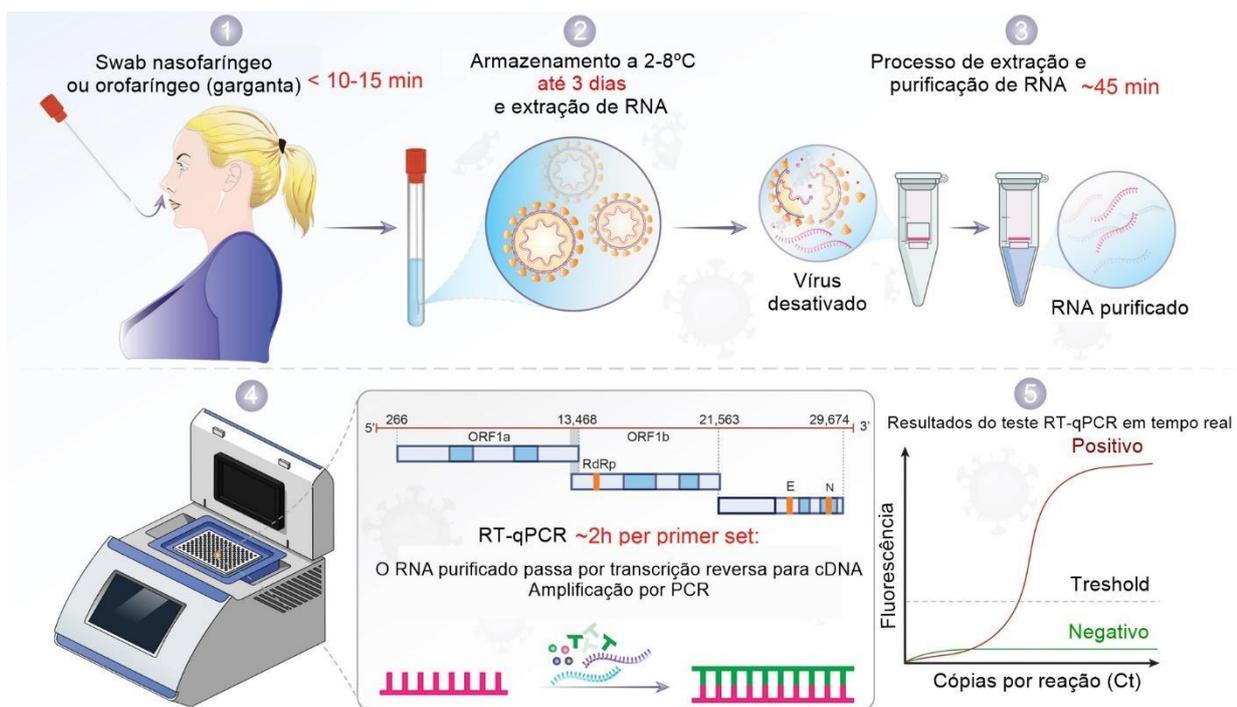
A escolha da amostra apropriada durante a testagem é um passo muito importante para que se tenha um diagnóstico de qualidade (DA SILVA et al., 2020b). A RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2, em geral é realizada com amostras obtidas do trato respiratório superior, principalmente swabs nasofaríngeos. Porém swabs orofaríngeos, aspirados ou lavagens, escarro e fluidos broncoalveolares também são amostras recomendadas (CDC, 2020b; ZOU et al., 2020; WÖLFEL et al., 2020; WANG et al., 2020b)

A amostragem do trato respiratório é minimamente invasiva, desconfortável, tem-se a necessidade de profissionais de saúde treinados, assim como apresenta risco de produção de aerossóis ou gotículas, aumentando a exposição dos responsáveis pela coleta. Diante disso, a utilização de métodos alternativos para obtenção de amostras de pacientes com COVID-19 estão sendo analisadas. Amostras menos invasivas, como saliva

e lavagens com gargarejo são opções promissoras para aplicação na rotina, especialmente para pacientes na fase inicial da infecção, com carga viral elevada (AZZI et al., 2020; GOLDFARB et al., 2021; MARICIC et al., 2020; WYLLIE et al., 2020).

O fluxo de trabalho durante o ensaio de RT-qPCR inclui além da coleta das amostras, o transporte para o laboratório, processamento ou lise das amostras, purificação do RNA viral a partir de métodos de extração de ácido nucleico, a transcrição reversa e amplificação durante a reação, e finalmente a análise dos dados obtidos (Figura 12). Antes da reação, as amostras são lisadas para que se tenha acesso ao RNA do SARS-CoV-2 e a extração ocorra eficientemente, a qual tem por finalidade a remoção de potenciais inibidores que possam impedir a amplificação do alvo. Todo o procedimento pode ser realizado sequencialmente por meio de processamento manual, ou de forma automatizada (TALI et al., 2021).

Figura 12 - Ensaio de RT-qPCR para detecção de infecção por SARS-CoV-2. 1. Coleta de amostra de pacientes (swab nasofaríngeo). 2 -3. O RNA é extraído de fluidos que contêm células infectadas com SARS-CoV-2 e partículas virais livres. O RNA viral recuperado é então transcrito reversamente para cDNA e amplificado para detecção de ácidos nucleicos virais. 4. As regiões conservadas dos genes RdRp e E são as sequências virais alvo para amplificação utilizando sonda fluorogênica por PCR quantitativa. 5. Casos positivos ultrapassam o limite de detecção.



Fonte: Adaptado de KEVADIYA et al., (2021).

Em um estudo de avaliação da eficiência dos diferentes métodos de extração de RNA de SARS-CoV-2, os kits comerciais demonstraram resultados mais satisfatórios do que os métodos manuais, como é o caso das extrações orgânicas contendo tiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio (AMBROSI et al., 2021). Embora a extração de RNA seja essencial para obtenção de uma sensibilidade satisfatória nos ensaios moleculares, estudos desenvolvidos recentemente descreveram protocolos sem extração para testes moleculares de detecção do SARS-CoV-2, apresentando uma estratégia para aplicação em regiões com poucos recursos ou nos casos de limitação no fornecimento dos reagentes de extração (BRUCE et al., 2020; FOMSGAARD; ROSENSTIERNE, 2020; HASAN et al., 2020; LÜBKE et al., 2020).

A reação de RT-qPCR abrange duas etapas principais, a primeira chamada de transcrição reversa, é quando o RNA viral gera um DNA complementar (cDNA) que servirá como molde para a etapa seguinte, e a segunda chamada de amplificação, onde ocorre a produção de fluorescência à medida que a sequência alvo é amplificada (CARTER et al., 2020; WONG; MEDRANO, 2005). Quando ocorre essa fluorescência, a mesma pode ser emitida a partir do uso de uma sonda de hidrólise duplamente marcada ou por corantes intercalantes que se ligam ao DNA de fita dupla, como o SYBR green (DORLASS et al., 2020; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2020; HIROTSU; MOCHIZUKI; OMATA, 2020). A fluorescência produzida é então capturada pelo equipamento (termociclador) em tempo real e se um limiar previamente definido for cruzado, o ciclo da reação em que isso ocorre é denominado de “Cycle Threshold” (Ct) ou Ciclo de quantificação (Cq). Os valores de Cq auxiliam na interpretação dos resultados, diferenciando-os em positivos, negativos ou indeterminados (CARTER et al., 2020; CORMAN et al., 2020).

A performance da RT-qPCR depende de muitas variáveis, incluindo o tipo de amostra, o momento da coleta, a qualidade e a quantidade de RNA viral, os oligonucleotídeos (“primers”) e sondas projetados, bem como seu alvo no RNA viral, os reagentes utilizados para o ensaio, o equipamento e seus parâmetros operacionais, além dos pontos de corte definidos para interpretação dos resultados (CORMAN et al., 2020; LEBLANC et al., 2020; UDUGAMA et al., 2020).

Geralmente, esse método diagnóstico apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade para o SARS-CoV-2. Em um estudo de meta-análise realizado recentemente, comparando dados de 29 trabalhos desenvolvidos, a sensibilidade geral da RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2 foi de 96% (IC 95%, 95,9% a 98,4%) e a especificidade geral de 98,1% (IC 95% 95,9% a 99,2%) (MUSTAFA HELLOU et al., 2021). Apesar disso, em outros estudos publicados, observou-se que a sensibilidade da técnica pode ser comprometida dependendo do tipo de amostra utilizada, por exemplo a sensibilidade do lavado brônquico foi de 93%, já amostras de swab nasal e faríngeo apresentaram valores de 63% e 32%, respectivamente (SETHURAMAN; JEREMIAH; RYO, 2020).

Adicionalmente, erros durante as etapas de armazenamento e transporte da amostra, bem como durante a extração de RNA e síntese de cDNA, ou até mesmo na análise e interpretação dos dados, levam a numerosos resultados falso negativos para a COVID-19, favorecendo a continuidade da transmissão da doença principalmente na comunidade. Resultados falso positivos também podem ocorrer devido ao longo fluxo que é necessário para a realização da reação, ocorrendo frequentemente problemas durante o manuseio das amostras e contaminação (RAHBARI; MORADI; ABDI, 2021).

Diferentes protocolos de RT-qPCR para diagnóstico da COVID-19 foram desenvolvidos e estão sendo aplicados nos laboratórios clínicos, de pesquisa e saúde pública (CORMAN et al., 2020; DA SILVA et al., 2022; “新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列 (Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus)”). Além dos ensaios recomendados pela OMS, vários kits moleculares de RT-qPCR para a detecção e amplificação do RNA do SARS-CoV-2 foram aprovados pela agência “Food and Drug Administration” (FDA) e estão atualmente disponíveis (<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medicaldevices/emergency-use-authorizations>). Os protocolos de RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2 mais frequentemente utilizados foram desenvolvidos pelo CDC da China (“新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列 (Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus)”), CDC dos Estados Unidos (CDC, 2020a), “Charité Institute of Virology, Universitätsmedizin Berlin (Charité) (CORMAN et al., 2020) e “Hong Kong University” (HKU) (CHU et al., 2020b).

A maioria dos ensaios são direcionados para um ou mais genes do SARS-CoV-2, sendo os principais alvos os genes S, E, N, os que compõem a ORF1ab e a RNA polimerase

RdRp (SETHURAMAN; JEREMIAH; RYO, 2020). No início da pandemia, protocolos de RT-qPCR desenvolvidos para a detecção de mais de um gene foram admitidos, visando garantir a especificidade do teste (LEBLANC et al., 2020). No entanto, com a progressão da pandemia e maior prevalência da COVID-19, passou-se a utilizar ensaios de detecção de alvo único do SARS-CoV-2 (TALI et al., 2021).

Recentemente, com a emergência das variantes do SARS-CoV-2 e consequente aumento da transmissibilidade e escape das respostas imunes, há uma maior necessidade de atenção para identificação dessas diferentes linhagens circulantes por parte dos laboratórios de diagnóstico em todo o mundo (VOGELS et al., 2021). Pesquisadores desenvolveram e validaram uma reação multiplex de RT-qPCR para detecção das VOCs do SARS-CoV-2. O protocolo estabelecido foi direcionado para regiões de deleções nucleotídicas na ORF1a e no gene S, possibilitando a indicação da presença das variantes alfa, beta e gama, assim como a diferenciação entre elas (VOGELS et al., 2021). Sendo assim, nota-se a importância da otimização e validação dos testes de diagnóstico utilizados atualmente à medida que a pandemia da COVID-19 evolui, visto que novas variantes do SARS-CoV-2 sempre estarão emergindo comprometendo a eficiência e precisão dos testes.

Finalmente, apesar das vantagens destacadas, responsáveis por torna-la a técnica padrão ouro no diagnóstico da COVID-19, a RT-qPCR apresenta inúmeras limitações, dentre elas o longo fluxo de trabalho (favorecendo maiores riscos de comprometimento na qualidade das amostras e atrasos quanto à liberação dos resultados), necessidade de dispositivos ou equipamentos caros e sofisticados, atuação de profissionais especializados para a realização de todo o protocolo e da análise dos dados e elevado custo geral por reação. Esses fatores dificultaram a utilização dos kits de RT-qPCR para a vigilância e triagem da COVID-19 em determinadas regiões ou países. Além disso, houve um aumento na demanda por reagentes e kits de extração de RNA ao longo da pandemia, com escassez de produtos em muitos laboratórios e busca por metodologias mais simples, rápidas e com baixo custo, que é o caso das técnicas baseadas em amplificação isotérmica, RT-LAMP por exemplo (TAKI et al., 2021).

#### 2.6.5.4 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

O método conhecido como amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) foi desenvolvido em 1998 por uma empresa japonesa chamada Eiken Chemical Co. Ltd, com o intuito de excluir as dificuldades oriundas da PCR (NOTOMI et al., 2000). Desde então, o LAMP passou por várias adaptações até ser colocado em prática para a detecção de patógenos em amostras que variam de animais, plantas e humanos (NOTOMI et al., 2000; WONG et al., 2018).

Em menos de uma hora de uma reação LAMP ocorre o aumento da quantidade de DNA amplificado em até um bilhão de cópias, diferente da PCR que produz um milhão de cópias durante o processo (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

O método é baseado em oligonucleotídeos exclusivamente projetados que originam uma estrutura de DNA em forma de “haltere” em loop que é “self-priming”. A enzima DNA polimerase utilizada no LAMP desloca as fitas de DNA ligadas à medida que avança e, portanto não há necessidade de termociclar a reação para que o DNA seja amplificado, pode-se utilizar equipamentos menos sofisticados como um bloco de aquecimento à seco ou um banho-maria. As etapas de ciclagem típicas da qPCR são substituídas pela atividade de deslocamento enzimático da fita pela Bst DNA polimerase, desempenhando a mesma função. Dessa forma, as reações LAMP ocorrem em uma única temperatura (em geral de 63 a 67°C), simplificando a metodologia e instrumentação necessária (MOORE et al., 2021; PARIDA et al., 2008).

O mecanismo detalhado que sustenta a amplificação do DNA no LAMP é complexo, e isso é devido, em grande parte, aos múltiplos locais de iniciação da polimerase, em consequência do uso de vários *primers* (quatro a seis), permitindo a distinção de até oito regiões específicas no molde de DNA, ao invés de apenas duas como na PCR convencional (PARIDA et al., 2008).

O LAMP pode ser utilizado para diagnósticos no local de atendimento (“Point-of-care”) em campo quando a técnica é combinada com detecção óptica direta (CALVERT et al., 2017; COOK et al., 2015; DA SILVA et al., 2021b; GONÇALVES et al., 2019; SNODGRASS et al., 2018).

#### 2.6.5.4.1 Desenho de primers e características do método LAMP

O desenvolvimento de um conjunto de *primers* altamente sensível e específico é um elemento decisivo responsável pela progressão correta da reação LAMP. Os vários pares de *primers* projetados devem ser otimizados levando em consideração uma série de fatores, incluindo composição da base, conteúdo GC (%), concentração, localização dos pares de nucleotídeos, distância entre as regiões do DNA e a formação de estruturas secundárias. Os *primers* devem ter uma estrutura de fita simples a 60-65°C e não devem criar uma estrutura de fita dupla estável. A utilização de um número maior de *primers* durante a amplificação de uma mesma sequência, pode aumentar as interações entre eles, por isso a necessidade de uma análise cautelosa de todos os parâmetros destacados (PARIDA et al., 2008; SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

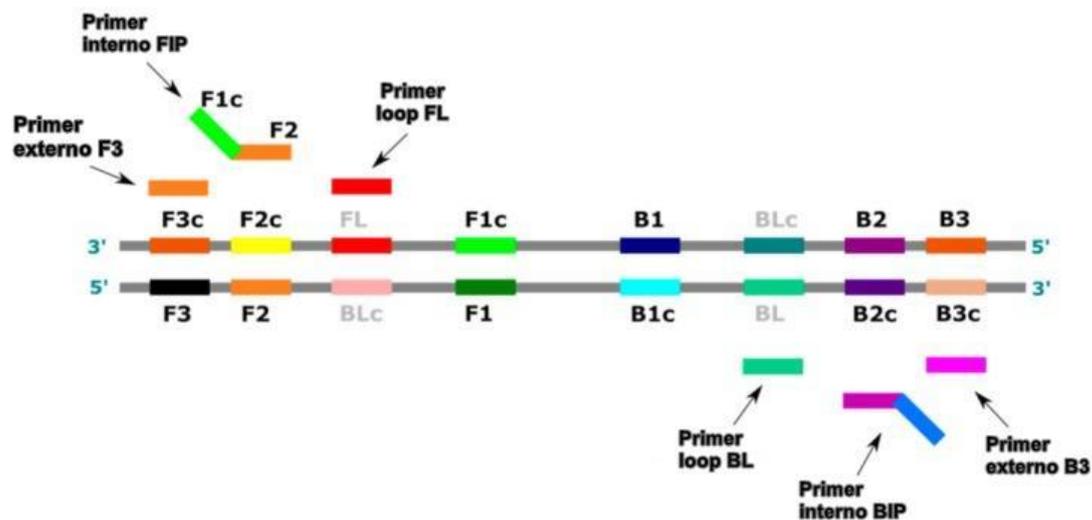
O desenho de *primers* LAMP pode ser realizado usando *softwares* online como *PrimerExplorer* (disponível em: <https://primerexplorer.jp/e/>), *LAMP Designer Optigene* (disponível em: <http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>) ou *Premier Biosoft* (disponível em: <http://www.premierbiosoft.com/isothermal/lamp.html>). Além disso, antes de definir o conjunto de *primers* a ser utilizado na reação, é preciso realizar uma análise prévia em busca das variações que podem ocorrer em um grande número de sequências genômicas na espécie alvo (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

O conjunto de *primers* para amplificação LAMP inclui um conjunto de seis *primers* compreendendo dois externos, dois internos e dois de alça ou loop, os quais reconhecem oito regiões distintas na sequência alvo. Os dois *primers* externos foram descritos como *primer* externo direto (F3) e *primer* externo reverso (B3), os quais são mais curtos e aplicados em concentrações mais baixas na mistura de reação, ligando-se ao molde de forma mais lenta que os *primers* internos e desempenhando um papel no deslocamento da fita apenas durante a etapa inicial da reação (não cíclica). Os *primers* internos foram descritos como *primer* interno direto (FIP) e *primer* interno reverso (BIP), são longos (45-49 bp) e complementares a dois locais distantes no molde (na fita senso e na fita antisenso). Ambos os pares (externos e internos), combinados com a Bst DNA polimerase, apresentam uma alta atividade de deslocamento de fita a 60-65 °C, criando uma estrutura de DNA

semelhante a um haltere (PARIDA et al., 2008; SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Além desses, podem ser utilizados iniciadores de alça, primer de alça direto (LF) e primer de alça reverso (LB), os quais foram projetados para acelerar a reação de amplificação a partir da ligação a sítios adicionais que não são acessados pelos *primers* internos. Finalmente, o desenho dos seis *primers* são baseados em oito regiões distintas do gene alvo, as quais são: F3c, F2c, F1c e FLP na extremidade 3' e as regiões B1, B2, B3 e BLP na extremidade 5' (Figura 13) (PARIDA et al., 2008)

Figura 13 - Oligonucleotídeos utilizados na reação LAMP. FIP (primer interno direto) contém uma região F2 complementar a F2c do molde e uma região livre F1c complementar a F1 na fita recém-formada; BIP (primer interno reverso) contém uma região B2 complementar a B2c do molde e uma região livre B1c complementar a B1 na fita recém-formada; F3 (primer externo direto) contém uma região F3 complementar a F3c do molde; B3 (primer externo reverso) contém a região B3 complementar a B3c do molde; FL (primer loop direto) é complementar ao loop de fita simples entre as regiões F2 e F1; BL (primer loop reverso) é complementar ao loop de fita simples entre as regiões B2 e B1.

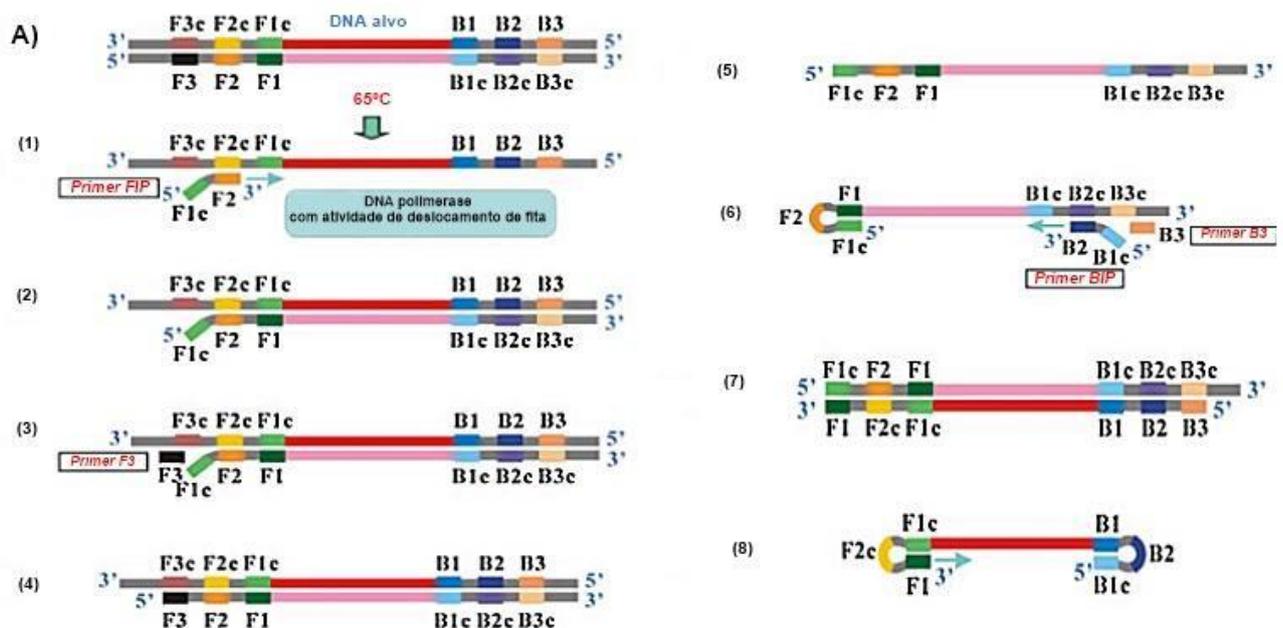


Fonte: Adaptado de SOROKA et al., (2021).

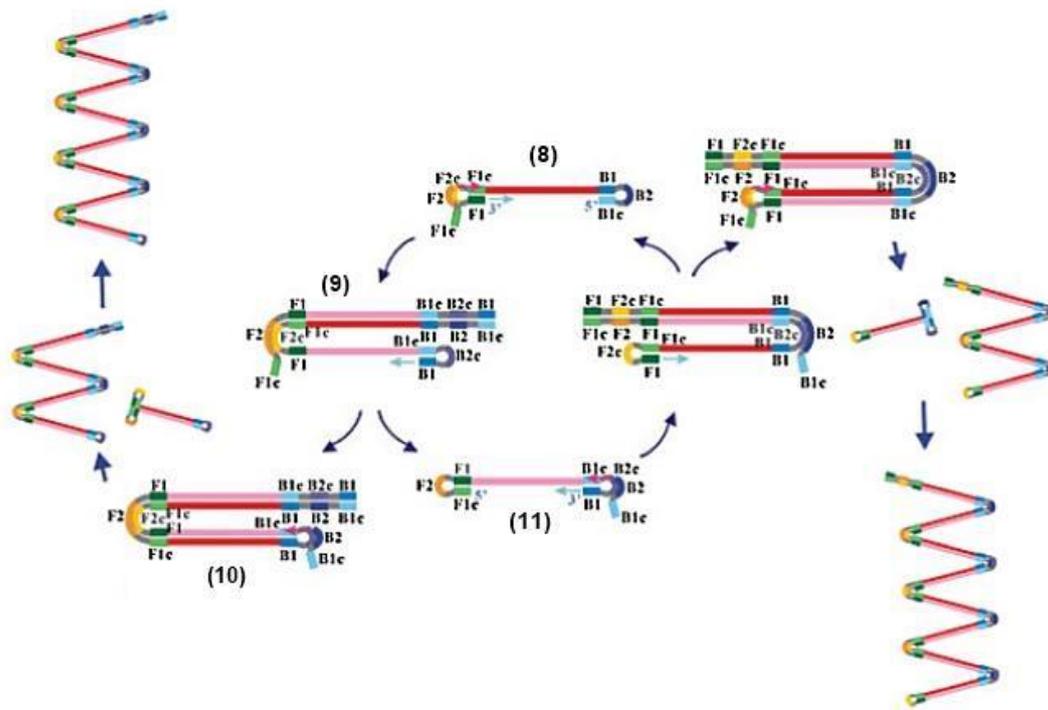
No início da reação LAMP, os *primers* internos (FIP ou BIP) hibridizam-se por complementaridade de bases com as regiões F2c ou B2c que estão localizadas na sequência alvo. Em seguida, os *primers* externos (F3 ou B3) hibridizam-se com as regiões

F3c ou B3c e iniciam a formação de estruturas em alça que se auto-hibridizam pela invasão de fitas de sequências de DNA abertas a partir dos *primers* internos, resultando no DNA em forma de haltere e originando à amplificação exponencial. O acréscimo dos *primers* de alça (LF e LB) aceleram esse processo de amplificação exponencial da sequência alvo e melhoram significativamente a eficiência e a sensibilidade da reação, reduzindo de cerca de 50% do tempo necessário. Esses *primers* de alça são ativados em apenas um momento, quando o molde é sintetizado, aumentando consideravelmente a seletividade da reação (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; SILVA; PARDEE; PENA, 2020). Ao final são obtidos uma mistura de estruturas similares a couve-flor com múltiplas alças e concatameros do DNA com hastes de diferentes comprimentos (Figura 14) (NOTOMI et al., 2000; SILVA; PARDEE; PENA, 2020; SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

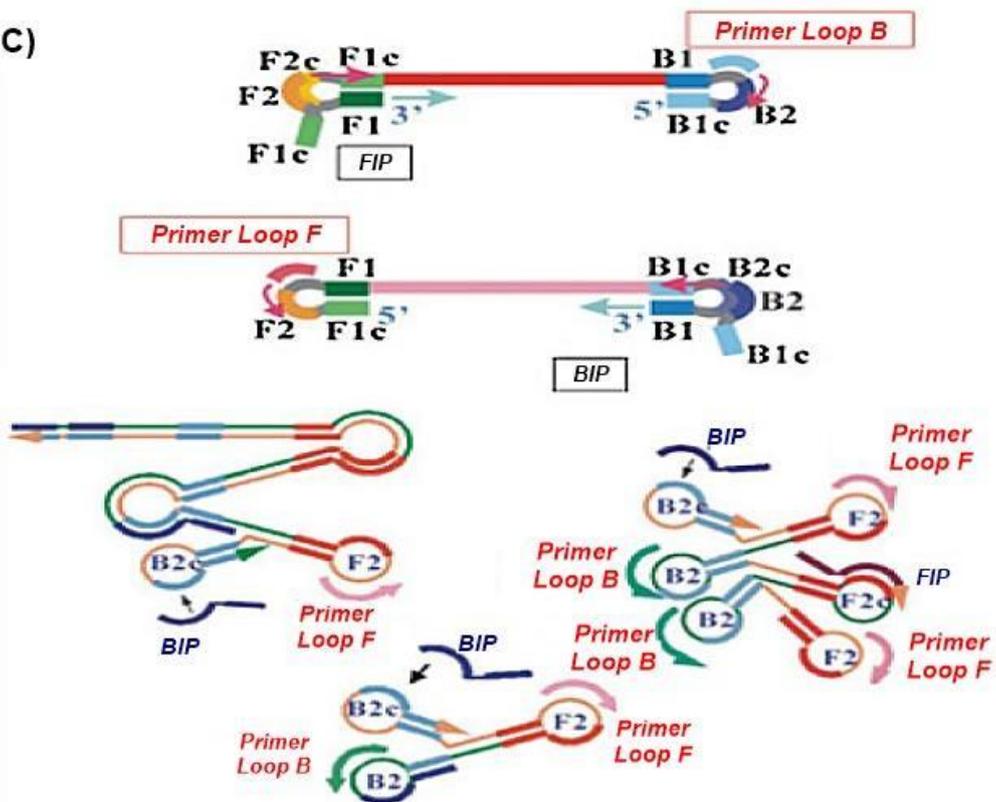
Figura 14 - (A) Princípios de amplificação do LAMP. Etapa não cíclica (1-8): Onde ocorre a formação das alças-hastes de DNA com estrutura em forma de haltere em ambas as extremidades e que está preparada para entrar na etapa de amplificação cíclica. Inicialmente, a atividade de deslocamento de fita da Bst DNA polimerase auxilia na síntese de uma fita complementar de DNA, começando com FIP. O *primer* externo (F3) então desloca a fita complementar ligada a FIP, que forma uma estrutura de haste-alça na extremidade 5', a qual servirá como um molde para a síntese de DNA iniciada por BIP e subsequente síntese de DNA por deslocamento de fita iniciada por B3. O produto final é uma estrutura com alças de haste em cada extremidade. (B) Princípios de amplificação LAMP. Etapa de amplificação cíclica (9-11): amplificação exponencial do DNA original em forma de alça-haste utilizando *primers* internos. O produto são as estruturas de tamanhos diferentes que consistem em repetições alternadamente invertidas da sequência alvo na mesma fita, dando uma estrutura semelhante à couve-flor. (C) Amplificação LAMP acelerada usando *primers* de loop. Os *primers* de loop são complementares à região de loop de fita simples. Eles fornecem locais de partida adicionais para a síntese de DNA e aceleram a amplificação, reduzindo assim o tempo de reação para menos de 30 min.



B)



C)



Fonte: Adaptado de PARIDA et al., (2008).

#### *2.6.5.4.2 Protocolo para os ensaios de amplificação LAMP*

As reações LAMP podem ser realizadas utilizando um protocolo de uma ou duas etapas diretamente de matrizes de amostra, incluindo swab nasarofaríngeo, orofaríngeo, saliva ou gargarejo. Enzimas como a Bst 2.0 polimerase, Bst 3.0 polimerase ou OmniAmp polimerase permitem que o teste seja efetuado com um protocolo de única etapa (GOLDFARB et al., 2021; HUANG et al., 2021; THI et al., 2020). Elas possuem atividade de transcriptase reversa (RT) e DNA polimerase em temperatura isotérmica (50-72°C), permitindo a detecção direta de alvos de RNA ou DNA.

A robustez dessas enzimas as tornam capazes de manter suas atividades mesmo na presença de inibidores de reação, sendo assim os experimentos podem ser realizado em campo e sem a necessidade de extrair o material genético das amostras. Baseado nisso, muitos ensaios RT-LAMP diretos e de única etapa foram desenvolvidos para a detecção do SARS-CoV-2 (FOWLER et al., 2021; HE et al., 2021, p. 2; HOWSON et al., 2021; MAUTNER et al., 2020; RAJH et al., 2021).

Em relação aos aspectos práticos para execução das reações de LAMP, as mesmas devem ser realizadas em microtubos de plástico, com uma mistura de tampão específico para a Bst DNA polimerase, íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ), trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs), além dos primers e da amostra de interesse contendo o genoma alvo. Ao estabelecer um novo ensaio de diagnóstico LAMP, é crucial otimizar o protocolo e incluir os controles adequados para minimizar a liberação de resultados falsos positivos ou falsos negativos ocasionados pela amplificação de região não-alvo (AUGUSTINE et al., 2020; SILVA; PARDEE; PENA, 2020; TOMITA et al., 2008).

#### *2.6.5.4.3 Métodos de detecção dos produtos após reação LAMP*

A grande quantidade de produto de amplificação gerado após as reações LAMP, possibilita a utilização de uma infinidade de métodos para detecta-los (BECHERER et al., 2020). Os mais utilizados são aqueles que geram um sinal óptico (em vez de, por exemplo, um sinal eletroquímico) ou que dependem do sequenciamento dos produtos de amplificação. Duas diferenças importantes entre os métodos de detecção comuns incluem

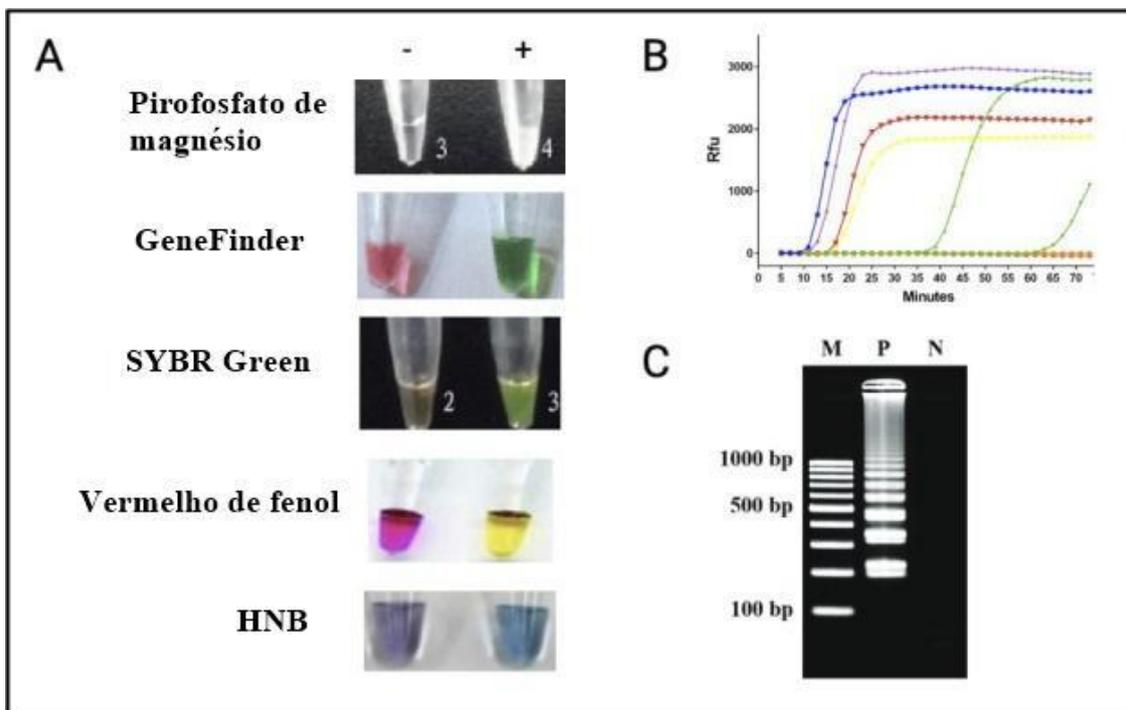
detecção de ponto final ou detecção em tempo real, e métodos dependentes de sequência ou métodos independentes de sequência (BECHERER et al., 2020; ZHANG et al., 2014).

Os testes de ponto final são mensurados em um ponto de tempo determinado, enquanto os testes em tempo real seguem as curvas geradas durante o processo de amplificação, de forma equivalente ao valor de limiar nos ciclos de qPCR. Este último possibilita uma maior riqueza na obtenção das informações, sendo útil quando se busca a semiquantificação do produto, mas tem-se a necessidade de um leitor simples de fluorescência (Figura 15) (MOORE et al., 2021).

Os produtos de amplificação LAMP também podem ser detectados através de eletroforese em gel de agarose junto com um corante de coloração de DNA ou analisador de fragmentos. Um padrão de bandas específico pode ser visualizado caso a amplificação do alvo tenha ocorrido (Figura 15). No entanto, o manuseio rotineiro de produtos LAMP positivos na bancada não é aconselhável devido à quantidade muito considerável de DNA produzido (MORI et al., 2001). Os métodos de detecção que demandam a abertura dos tubos de reação após a amplificação (ZHANG et al., 2021) são raramente utilizados e devem ser evitados, a menos que sejam tomadas medidas necessárias para evitar a contaminação cruzada e, portanto resultados falso-positivos.

Resumidamente, por uma questão de rapidez, a detecção visual (métodos independentes de sequência) é a opção imediata e direta para laboratórios sem equipamentos especializados quando se trata do diagnóstico de COVID-19 (AUGUSTINE et al., 2020). Dentre as principais metodologias utilizadas destacam-se: a análise visual da turbidez, resultante de uma precipitação branca de pirofosfato de magnésio formada como subproduto da reação (MORI et al., 2004; XIE et al., 2012) e que pode ser mensurada com a utilização de um turbidímetro simples; a medição da fluorescência pelo uso de corantes sensíveis a pH (exemplo, vermelho de fenol), corantes independentes de pH (exemplo, azul de hidroxinaftol) ou por agentes intercalantes de DNA que são incorporados a reação (exemplo, SYBR Green I) (Figura 15) (TAO et al., 2011); irradiação de luz ultravioleta (UV) e bioluminescência (AUGUSTINE et al., 2020; MOORE et al., 2021).

Figura 15 - Esquema simplificado com algumas alternativas de métodos para detecção dos produtos LAMP. A) A análise visual ao final da reação ocorre pelo uso de corantes que exibem mudanças simples de cor ou turbidimetria após a amplificação. B) Semelhante ao qPCR, os métodos de detecção em tempo real usam corantes fluorescentes para monitorar o aumento da carga viral à medida que a amplificação avança. O sinal fluorescente pode ser independente de sequência (por exemplo, intercalantes de DNA) ou dependente de sequência (baseado em hibridização). C) Os produtos de amplificação do LAMP podem ser verificados por eletroforese em gel de agarose seguida de coloração de DNA, embora isso exija manipulação pós-amplificação e o risco maior de contaminação cruzada entre experimentos.



Fonte: Adaptado de MOORE et al., (2021).

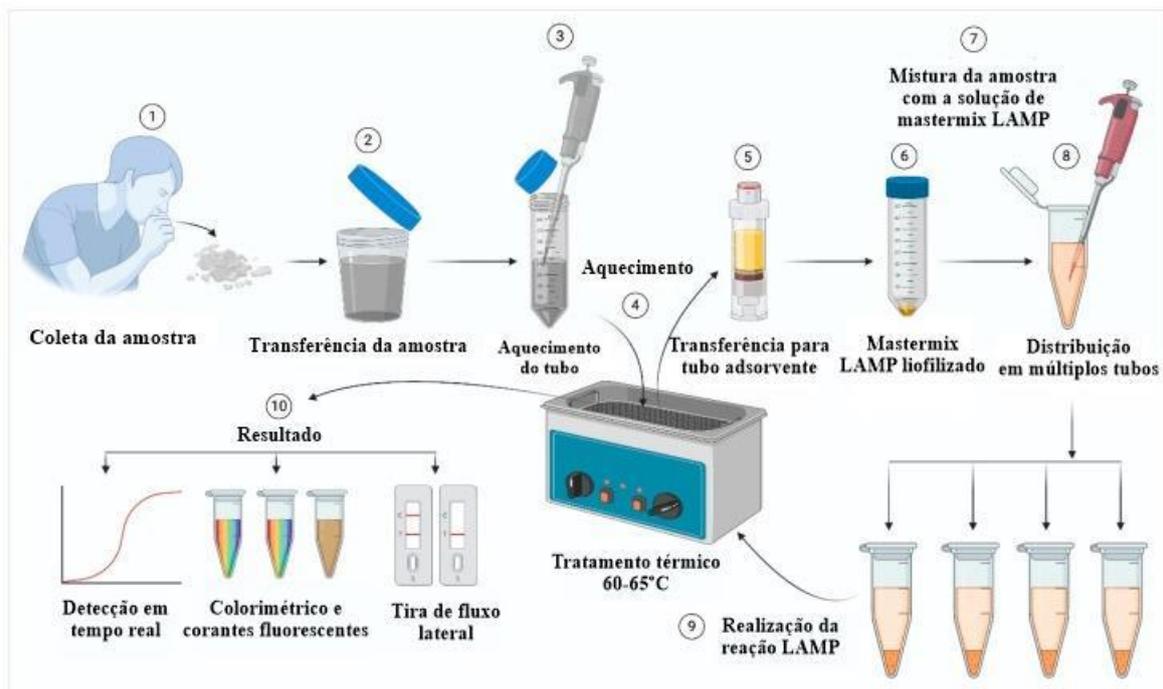
#### 2.6.5.4.4 Aplicações do LAMP no diagnóstico de doenças virais

Os métodos de diagnóstico LAMP têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados para diagnóstico de vários agentes patogênicos virais de DNA e RNA disseminados (BISWAS; SAKAI, 2014; PARIDA et al., 2008), que acometem animais e humanos, como vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HOSAKA et al., 2009), vírus da encefalite japonesa (TORINIWA; KOMIYA, 2006), vírus Chikungunya (PARIDA et al., 2007), vírus Zika (SILVA; PARDEE; PENA, 2020), vírus do papiloma humano (HAGIWARA et al., 2007), vírus

da dengue (PARIDA et al., 2005; TEOH et al., 2013), vírus do Nilo Ocidental (PARIDA et al., 2004) e vírus da caxumba (OKAFUJI et al., 2005). Além destes, patógenos respiratórios como o vírus H5N1 da gripe aviária de alta patogenicidade (HPAI) (IMAI et al., 2006, 2007), vírus SARS (THAI et al., 2004) e vírus MERS (BHADRA et al., 2015) também já foram detectados por essa técnica.

As amostras virais contagiosas devem ser inativas pelo calor antes da realização das etapas seguintes. Em geral, os inibidores presentes nas amostras são removidos a partir do uso de tubos adsorventes. Os ácidos nucleicos virais são então extraídos, misturados aos reagentes LAMP e aquecidos a 60-65°C por aproximadamente 30 minutos até completar a amplificação (Figura 16) (AUGUSTINE et al., 2020).

Figura 16. Etapas no processamento de amostras para a reação LAMP. Reação LAMP em um banho-maria simples e detecção dos produtos de amplificação.



Fonte: Adaptado de AUGUSTINE et al., (2020).

Os relatos divulgados, demonstram o papel crucial do RT-LAMP para aplicação como ferramenta diagnóstica eficaz na atual pandemia da COVID-19 e outras semelhantes

que podem ocorrer futuramente, além do benefícios sobre a PCR convencional como teste “Point-of-care” (PoCT) (AUGUSTINE et al., 2020).

#### 2.6.5.4.5 Aplicações do LAMP no diagnóstico da COVID-19

A ideia de usar a técnica RT-LAMP para a detecção rápida de COVID-19 começou com um estudo de El-Tholoth e colaboradores, realizado no início de fevereiro de 2020. Como os experimentos foram conduzidos antes da disseminação mundial do SARS-CoV-2, os pesquisadores não puderam usar amostras clínicas reais. Sendo assim, foi utilizada uma sequência sintética de DNA do vírus para testar a viabilidade da aplicação do RT-LAMP (EL-THOLOTH; BAU; SONG, 2020).

A partir de fevereiro, março e abril de 2020 outros ensaios LAMP para SARS-CoV-2 foram descritos em pré-impressões (BROUGHTON et al., 2020; BUTLER et al., 2020; LAMB et al., 2020; YU et al., 2020; ZHANG et al., 2020c). Grande parte dos estudos testavam o método LAMP a partir do uso de amostras humanas de saliva, soro, swabs orofaríngeos, swabs nasofaríngeos e amostras de urina, enriquecidas com sequências de ácido nucleico do SARS-CoV-2, simulando amostras de pacientes infectados pela COVID-19 (LAMB et al., 2020). À medida que a demanda por testes aumentou, os laboratórios normalmente dedicados à genômica, biologia do desenvolvimento ou patógenos de plantas mudaram o foco para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para SARS-CoV-2 (MOORE et al., 2021).

Subsequentemente, os estudos passaram a focar em abordagens para melhoria dos parâmetros de sensibilidade e especificidade do ensaio. Um desses estudos, demonstrou que os *primers* desenhados para as regiões da RdRp e da ORF1ab apresentaram maior eficiência de amplificação (BAEK et al., 2020, p. 2). Outros pesquisadores relataram o uso de *primers* direcionados para regiões codificantes de proteínas estruturais variadas, como o gene *S* ou *N*, separadamente ou em combinação, visando o alcance de resultados mais sensíveis, específicos e com o mínimo de reatividade cruzada em um curto período de tempo (BUTT et al., 2020; PARK et al., 2020; YAN et al., 2020b).

Para aplicação da técnica como um PoCT, os pesquisadores utilizam vários métodos de detecção colorimétrica onde ocorre a mudança de cor dos reagentes incorporados na mistura da reação (conforme abordado no tópico “Métodos de detecção dos produtos após reação LAMP). Um dos principais protocolos colorimétricos baseado na detecção visual

rápida de RT-LAMP para COVID-19, utiliza na mistura original corantes indicadores sensíveis ao pH (vermelho de cresol ou fenol) (ANNAMALAI et al., 2020; LU et al., 2020c; BAEK et al., 2020). Este método, oferece uma alteração de cor de rosa para amarelo quando a amplificação ocorre (diminuição do pH, indicando resultado positivo para detecção do patógeno alvo) e pode ser usado como um ensaio de detecção simples em cenários onde tem-se uma limitação de recursos (BAEK et al., 2020; YU et al., 2020).

Recentemente, investigações direcionadas para uma maior simplificação do procedimento estão sendo conduzidas, como a realização de ensaios de única etapa e tubo único a partir da utilização de biossensores baseados em nanopartículas (ZHU et al., 2020b), ou a inclusão de uma etapa de captura de esferas magnéticas durante o processamento de swabs secos para aumentar o rendimento do RNA viral (ÖSTERDAHL et al., 2020; ZHU et al., 2020b).

Finalmente, embora esses avanços sejam bastante propícios, tem-se a necessidade da realização de estudos mais robustos, incluindo um grande número de amostras clínicas, focados na otimização da técnica e melhoria da sensibilidade e especificidade, a fim de demonstrar satisfatoriamente a aplicação clínica consistente das abordagens aqui destacadas (AUGUSTINE et al., 2020).

Atualmente, existem 14 dispositivos de diagnóstico baseados em ensaios RT-LAMP que foram autorizadas para uso emergencial pela FDA (disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostic-seuas-molecular-diagnostic-tests-sars-cov-2>).

#### *2.6.5.4.6 Variações do método LAMP para detecção do SARS-CoV-2*

Além do LAMP acoplado com a transcrição reversa (RT-LAMP), outras variações da técnica foram introduzidas, como a amplificação isotérmica mediada por loop multiplex (M-LAMP) e a observação em tempo real da amplificação do produto, permitindo a análise do RNA e a detecção multiplex (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). O M-LAMP pode ser útil para identificação de muitos patógenos em uma única reação ou tubo de ensaio se forem utilizados mais iniciadores ou iniciadores com sinais de fluorescência

específicos (MAHONY et al., 2013). Vários protocolos M-LAMP já foram implementados para o diagnóstico da COVID-19 (JANG et al., 2021; JUSCAMAYTA-LÓPEZ et al., 2021; SCHERMER et al., 2020).

Recentemente, Broughton e colaboradores reprojeteram uma plataforma para detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 baseada no sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), conhecida como DETECTR (*DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter*). Este aparelho utiliza uma etapa de pré-amplificação isotérmica de *primers* e é capaz de fornecer resultados em 30 minutos (contando com o tempo necessário para coleta das amostras) com elevada sensibilidade (10 cópias de RNA por  $\mu\text{L}$ ). Para aumentar a especificidade além do uso de uma enzima de detecção CRISPR de alta fidelidade, foram desenvolvidos conjuntos de RNAs guias Cas12 (gRNAs) que facilitam na diferenciação entre diferentes cepas virais. Com o formato de tira de fluxo lateral apresenta elevada eficiência até com baixíssimas concentrações de RNA viral por  $\mu\text{L}$  (BROUGHTON et al., 2020).

Outro ensaio é o protocolo RT-LAMP com código de barras, denominado Lamp-Seq, onde o primer FIP é marcado com uma sequência de código de barras pequena (cerca de 10 nucleotídeos), não afetando a eficiência da reação. Após 30 minutos de uma reação RT-LAMP padrão, as amostras são aquecidas individualmente por 10 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , combinadas em misturas de 1000 a 10000 amostras e submetidas a uma PCR de doze etapas com os FIPs de código de barras de modo a determinar quais terão a sequência inserida. Posteriormente, os produtos obtidos são sequenciados e os códigos de barras ligados à sequência viral são analisados *in silico* permitindo a identificação de um indivíduo com infecção ativa. Os pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento desse protocolo informaram que o total de falsos positivos e falsos negativos para o SARS-CoV-2 é inferior a 0,2% se 1,3% de uma população estiver infectada. Além disso, o custo do teste é de 7 dólares por amostras, possibilitando a triagem de um milhão de indivíduos por dia (SCHMID-BURGK et al., 2020).

Em relação ao diagnóstico do SARS-CoV-2, uma combinação de uma reação de amplificação da recombinase polimerase (RPA) seguida pela reação LAMP, também pode ser uma modificação apropriada para aplicação. A primeira etapa ocorre em 20 minutos a uma temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$  na presença de recombinase, facilitando para a localização da sequência alvo pelos *primers* F3 e B3. Em seguida, a mistura é adicionada aos reagentes

LAMP na proporção de 1:9, sendo submetida a uma reação de 40 minutos a 65°C (ELTHOLOTH; BAU; SONG, 2020). Esse protocolo denominado Penn-RAMP, tem sido destacado por apresentar uma sensibilidade superior ao que se observa em outros métodos como RT-LAMP e RT-PCR, com um limite de detecção de sete cópias de RNA viral por reação (BAO et al., 2012; SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Por fim, visando a utilização de ensaios rápidos e que podem ser facilmente realizados em domicílios e centros de atendimento, além dos laboratórios que realizam análises em larga escala, alguns pesquisadores elaboraram o teste rápido habilitado para LAMP (ALERT). O ensaio é barato (custo inferior a cinco dólares), apresenta alta sensibilidade (0,1 a 2 moléculas virais/ $\mu$ L) e especificidade (>97%), e possui um protocolo simples de cinco estágios onde os próprios usuários podem coletar as amostras, realizar a reação RT-LAMP e visualizar os resultados sozinhos em 60 minutos. Além da baixa taxa de resultados falsos positivos, permite análises multiplex e os reagentes não precisam de um armazenamento em baixas temperaturas, favorecendo a testagem a domicílio (BEKTAŞ et al., 2021).

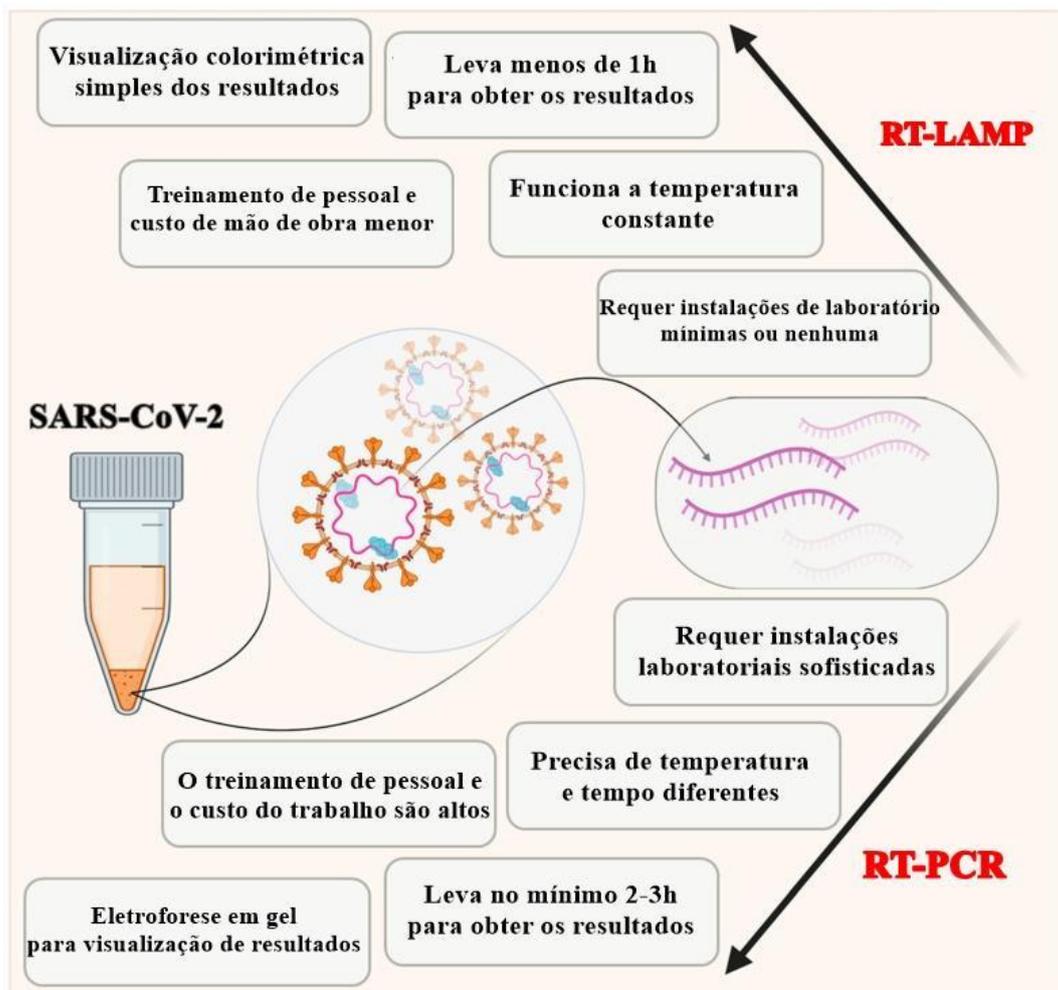
#### *2.6.5.4.7 Limitações e desafios do uso do RT-LAMP no diagnóstico da COVID-19*

Muitos pesquisadores estão investigando a o potencial da técnica RT-LAMP em substituir a RT-qPCR, atualmente padrão ouro para o diagnóstico molecular da COVID-19. Embora a RT-qPCR seja muito sensível e específica, requer equipamentos sofisticados e equipe de laboratório experiente para realizar e interpretar os resultados dos testes. Mesmo com o uso de aparelhos portáteis, o custo e o tempo da análise dificultam a utilização da RT-qPCR para detecção rápida e numerosa do SARS-CoV-2, especialmente nos países com limitações financeiras e em regiões distantes dos laboratórios de diagnóstico (Figura 17) (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

No entanto, apesar das vantagens já destacadas e do estabelecimento do método RT-LAMP após a ocorrência de diversas modificações recentes, para abranger os requisitos específicos da pandemia de COVID-19, alguns desafios precisam ser superados (AUGUSTINE et al., 2020). Dentre as desvantagens da técnica estão a complexidade do desenho de *primers* específicos (JIA et al., 2019), e a possibilidade de geração de

resultados falso-positivos, principalmente quando se utiliza uma plataforma automatizada (WATERFIELD et al., 2019). Devido a essa sensibilidade do RT-LAMP à contaminação cruzada, ou seja, material presente no aerossol, recomenda-se que as salas sejam ventiladas e que diferentes amostras sejam analisadas separadamente. Os profissionais que realizam o teste devem estar cientes do risco de contaminação das amostras e seguir os procedimentos especiais de esterilidade (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Figura 17 - Esquema demonstrando as diferenças entre as técnicas RT-LAMP e RT-PCR para uso diagnóstico.



Fonte: Adaptado de AUGUSTINE et al., (2020)

Além disso, embora o RT-LAMP seja uma ótima ferramenta de diagnóstico, seus produtos nem sempre podem ser usados para outras análises, como clonagem ou sequenciamento (SAHOO et al., 2016).

Embora muitos estudos indiquem a alta sensibilidade e especificidade dos métodos RT-LAMP, dados precisos a respeito desses parâmetros ainda são indeterminados devido ao número insuficiente de estudos realizados com uma grande quantidade de amostras clínicas (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

O Reino Unido demonstrou um bom exemplo do uso de testes RT-LAMP em diagnóstico. A realização de cerca de 50% de testes rápidos RT-LAMP de um fabricante específico, produziu resultado falso negativo em um estudo piloto realizado em Manchester antes da sua introdução no sistema de saúde de Liverpool (IACOBUCCI; COOMBES, 2020). O governo britânico custeou cerca de 358 milhões de euros e o plano inicial envolvia a testagem de 10% da população por semana (IACOBUCCI, 2020). Um mês depois do início do estudo piloto, os testes foram capazes de detectar apenas 46,7% do total de infecções em Salford e Manchester (HALLIDAY; BOSELEY; BOSELEY, 2020). Apesar disso, os pesquisadores envolvidos no estudo apontara uma sensibilidade de 96% do teste para indivíduos nas fases iniciais da infecção (IACOBUCCI; COOMBES, 2020). De acordo com cientistas britânicos, o alto número de falsos positivos durante a testagem em massa, obriga boa parte a população a passar por um período de quarentena desnecessário, resultando no comprometimento econômico de vários setores do país (SMYTH; CALL, 2020; LOVETT, 2020; MENDICK; DONNELLY, 2020).

Em conclusão, as limitações expressivas do método RT-LAMP e sua aplicação no diagnóstico do SARS-CoV-2 não estão relacionadas com a falta de testes desenvolvidos, e sim com os gargalos que dificultam sua empregabilidade (CHAOUCH, 2021). A maior parte dos kits RT-LAMP disponíveis no mercado são desenvolvidos por instituições científicas privadas ou empresas de biotecnologia, por isso os problemas existentes deveriam ser contornados com o direcionamento de recursos para criações de testes nacionais a partir dos fundos estaduais, como no caso de alguns kits RT-qPCR aprovados para diagnóstico comercial e financiados por instituições públicas. Como resultado do desinteresse pelo RT-LAMP, os cientistas desenvolvem novos kits que acabam não atendendo às expectativas das instituições responsáveis pelo controle dos surtos de SARS-CoV-2. Muitas vezes, as próprias entidades privadas que desenvolvem os testes os

utilizam, sendo importante que houvesse uma maior atenção tanto para a melhoria das pesquisas como na consulta política, quanto a expressão das expectativas (SOROKA; WASOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

## 2.7 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA COVID-19

Desde o início da pandemia, a descoberta de potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da COVID-19 tem sido um desafio para os cientistas. Foram feitos muitos esforços para reutilizar medicamentos aprovados durante a pandemia, uma estratégia que oferece inúmeras vantagens quando comparada ao desenvolvimento de medicamentos totalmente novos, visto que os riscos de falha são reduzidos por já terem a segurança avaliada (DA SILVA TORRES et al., 2022).

Agentes virais reaproveitados, os quais originalmente foram desenvolvidos contra vírus influenza, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Ebola (EV), ou vírus SARS-CoV/MERS-CoV, juntamente com outros fármacos como antibióticos, antiprotozoários e anti-helmínticos, estão sendo avaliados como possíveis opções terapêuticas para o tratamento do SARS-CoV-2. No entanto, a utilização desses agentes na prática clínica geraram muitas controvérsias devido ao não conhecimento a respeito das taxas de eficácia e segurança dos mesmos. Atualmente, existem terapias antivirais desenvolvidas para induzir um efeito direto no SARS-CoV-2, tanto por meio do bloqueio da entrada dos vírus nas células hospedeiras, como atuando nas enzimas virais e interferindo na replicação do genoma. Esses agentes favoreceram o avanço no controle dos casos graves e óbitos provocados pela COVID-19 (DA SILVA TORRES et al., 2022).

As drogas desenvolvidas contra o SARS-CoV-2, em geral são direcionadas para algumas das principais proteínas virais, incluindo a RdRp, o complexo helicase e as proteases virais 3-quimotripsina-like protease (3CLpro) e papaína-like protease (PLpro). Inibidores para o receptor celular humano ACE2 e proteases humanas como TMPRSS4, TMPRSS2, furina e CatL também foram desenvolvidos com o intuito de bloquear a infecção por SARS-CoV-2. Uma maneira adicional de tratar os pacientes com COVID-19 é a partir da aplicação de drogas e anticorpos monoclonais/policlonais que atuam modulando a resposta do hospedeiro à infecção. Embora exista uma grande variedade de tratamentos em investigação ao longo desses dois anos de pandemia (TAO et al., 2021), somente um

número limitado de medicamentos chegou à fase de investigação clínica e um número ainda menor foi aprovado para o tratamento da COVID-19 (DA SILVA et al., 2022).

De acordo com os dados da FDA (disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/coronavirus-covid-19-drugs/coronavirus-treatment-acceleration-program-ctap#dashboard>), hoje (26/07/2022) existem mais de 700 medicamentos em desenvolvimento para COVID-19 e aproximadamente 460 em ensaios clínicos em humanos revisados pela FDA, destes apenas 13 foram autorizados para uso emergencial e 2 para uso geral no tratamento da COVID-19.

De acordo com as recomendações dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) – EUA, as drogas imunomoduladoras foram testadas para o tratamento da COVID-19 visando amenizar os efeitos associados à síndrome da tempestade de citocinas. No painel de diretrizes de tratamento para COVID-19 do NIH, os seguintes imunomoduladores são recomendados para pacientes hospitalizados levando em consideração a gravidade da doença: corticosteroides (dexametasona), inibidores da interleucina-6 (tocilizumabe ou sarilumabe) e inibidores da Janus quinase (JAK) (baricitinibe ou tofacitinibe). Além dos agentes recomendados, no painel é possível encontrar os medicamentos que não foram proibidos e são opcionais para a utilização em algumas situações, bem como as restrições para determinados grupos de indivíduos e a depender do quadro infeccioso (disponível em: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/>).

Finalmente, com base em evidências científicas atuais, o painel recomenda cinco opções de tratamento disponíveis como terapias preferenciais ou alternativas: nirmatrelvir combinado com ritonavir (Paxlovid), sotrovimab, remdesivir, bebtelovimab ou molnupiravir (DA SILVA et al., 2022).

## 2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE DA COVID-19

Atualmente, a vacinação representa a estratégia de longo prazo mais eficaz para controlar e prevenir a COVID-19 (HU et al., 2021, p. 19). No entanto, no início da pandemia e em regiões com recursos limitados, intervenções específicas para o controle da disseminação do SARS-CoV-2, como as vacinas e terapêuticos, não estavam/estão prontamente disponíveis. Somado a isso, a constante evolução do vírus e a emergência de novas cepas, tornam essas intervenções farmacêuticas desatualizadas (LEUNG, 2021).

Portanto, as INFs (intervenções não farmacêuticas) são as medidas de saúde pública mais importantes que indivíduos ou comunidades podem adotar para reduzir a transmissão de vírus respiratórios, especialmente durante uma pandemia como é o caso da COVID-19 (LEUNG, 2021).

A redução da possibilidade de transmissão por contato e o distanciamento físico são fatores muito importantes para limitar a propagação da COVID-19. Práticas de prevenção e a implementação de medidas eficazes configuram uma estratégia determinante para conter a acelerada disseminação do SARS-CoV-2. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estabeleceu recomendações para prevenir a infecção por SARS-CoV-2, sendo elas: 1) utilização de máscara, reduzindo a transmissibilidade de partículas respiratórias infectadas pelo ar nos ambientes clínicos e laboratoriais, reduzindo o risco de infecção a nível populacional (CHENG et al., 2021; CHU et al., 2020a; HOWARD et al., 2021); 2) distanciamento social de 2 metros quando estiver fora de casa e evitar contato próximo com pessoas doentes quando residir no mesmo local; 3) evitar aglomerações e áreas sem circulação de ar; 4) higienizar as mãos frequentemente com água e sabão por pelo menos 20 segundos, ou desinfetar com álcool 70% caso não tenha água e sabão disponíveis, especialmente após a permanência em locais públicos, ou ao tocar no nariz, tossir ou espirrar; 5) cobrir boca e nariz ao espirrar ou tossir; 6) limpar e desinfetar frequentemente as superfícies de alto contato, como maçanetas, interruptores de luz, mesas, telefones e celulares, teclados, vasos sanitários, torneiras, bancadas e pias; 7) acompanhar a saúde (SHAH; HALL, 2018).

Para que tais medidas sejam eficientes na redução da disseminação viral, a adesão da população precisa ser elevada (CHENG et al., 2021). Já para os profissionais de saúde que atuam na linha de frente, são necessárias mais precauções, como uso de respiradores N95, aventais, luvas e proteção ocular (UNGARO et al., 2020).

Finalmente, o diagnóstico precoce, isolamento social e tratamentos de suporte são as medidas essenciais para o manejo clínico dos pacientes infectados.

Nos tópicos a seguir serão abordados os aspectos gerais das duas principais medidas de prevenção e controle da pandemia de COVID-19, a utilização das vacinas e a implementação dos testes diagnósticos para o público em geral.

### 2.8.1 Plataformas vacinais

Durante a infecção pelo SARS-CoV-2, as respostas imunes humorais e celulares adaptativas são muito importantes para controlar o processo. A necessidade de assegurar a imunidade da população, acelerou os ensaios clínicos para desenvolvimento das vacinas contra COVID-19. Até o momento, poucos eventos adversos foram relatados e a segurança das que foram testadas é muito promissora (DA SILVA TORRES et al., 2022).

Além disso, a eficácia da vacina é um parâmetro muito importante que precisa ser considerado. A FDA recomendou que as vacinas mostrassem ao menos 50% de eficácia em comparação com o placebo, definida por (1) redução nos casos de COVID-19, (2) redução na gravidade da COVID-19 ou (3) redução na gravidade de infecções por COVID-19 ou por SARS-CoV-2 (FDA, 2020).

Diversas plataformas vacinais foram desenvolvidas desde a emergência do SARS-CoV-2 e, em junho de 2022, 38 vacinas já haviam sido aprovados para utilização em pelo menos um país no mundo. Atualmente, mais de 150 vacinas estão na fase de desenvolvimento clínico e mais de 190 em desenvolvimento pré-clínico. Das vacinas aprovadas, 15 são baseadas em subunidades de proteínas, 11 em vírus inativados, 7 em vetores virais não replicados, 3 em RNA, 1 em DNA e 1 em partículas semelhantes a vírus (VLP) (disponível em: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/>). Destas plataformas, 10 foram consideradas apropriadas para uso emergencial durante a pandemia da COVID-19 pela OMS (FIOLET et al., 2022), as quais serão apresentadas a seguir na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo com as principais plataformas vacinais para COVID-19 disponíveis atualmente.

<b>Plataforma vacinal</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Características</b>	<b>Referências</b>
Nuvaxovid™ (Novavax) e COVOVAX™	Serum Institute of India	Baseadas na nanopartícula recombinante proteína S associada ao adjuvante Matrix-M.	Heinz and Stiasny, 2021
Covaxin™	Bharat Biotech	Baseadas em preparações feitas em células com o vírus inteiro, com posterior inativação química, purificação e mistura a compostos específicos.	Kyriakidis et al. 2021
Covilo™	Sinopharm		
CoronaVac™	Sinovac		
Vaxzevria™ Covishield™	Oxford/AstraZeneca Fabricadas com Oxford e AstraZeneca, formuladas pelo “Serum Institute of India” e Fiocruz-Brasil	São vacinas de vetor viral não replicante, baseadas no adenovírus de chimpanzé que codifica a glicoproteína S do SARS-CoV-2.	Granados-Riveron and Aquino-Jarquín 2021
Ad26.COV2.S™	Janssen/Johnson & Johnson	Baseado em um vetor de adenovírus humano recombinante e não replicante tipo 26, o qual expressa a proteína S em uma conformação estabilizada.	Granados-Riveron and Aquino-Jarquín 2021
Comirnaty™	Pfizer/BioNTech	Formuladas com nanopartículas lipídicas e baseadas em RNA modificado por nucleosídeo, codificando uma proteína S do SARS-CoV-2 de comprimento total e modificada pela adição de duas mutações de prolina, que garante a sua permanência na conformação de pré-fusão	Polack et al. 2020; Baden et al. 2021; Dagan et al. 2021
Spikevax™	Moderna		

Fonte: A autora (2022).

Em uma revisão sistemática e estudo de meta-regressão publicado recentemente, demonstrou-se que 81% das vacinas tiveram eficácia contra as formas graves da COVID-19, se mantendo em uma taxa de 70% após a vacina completa e com uma de apenas 10% 6 meses após a imunização (FEIKIN et al., 2021). É importante destacar que a maioria das vacinas fabricadas foram baseadas na cepa original Wuhan-Hu-1, o que pode reduzir sua eficácia diante da emergência das VOCs, necessitando-se de atualizações em suas composições.

De acordo com os dados da plataforma “*Our World in Data*” da Universidade de Oxford (disponível em: [https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID\\_WRL](https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=OWID_WRL))

do dia de hoje (15/11/2022), 68,2% da população mundial recebeu ao menos uma dose da vacina para COVID-19, 12,94 bilhões de doses foram administradas globalmente e 1,93 milhão são administradas a cada dia, atualmente. No Brasil, mais de 473 milhões de doses foram aplicadas até o momento, onde 80,5% da população encontra-se totalmente vacinada, o que equivale a mais de 172 milhões de pessoas. Já nos países de baixa renda apenas 19,7% das pessoas receberam pelo menos uma dose.

### **2.8.2 Testagem em massa para controle da COVID-19**

No início da pandemia da COVID-19, a OMS incentivou a testagem em massa em todos os países. A aplicação de testes, isolamento e rastreamento dos contatos fazem parte da base necessária para o controle global da pandemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). Diante disso, a resposta da indústria diagnóstica foi muito eficiente, e hoje, de acordo com a plataforma FIND (disponível em: <https://www.finddx.org/covid-19/test-directory/>), tem-se mais de 1900 testes diagnósticos de diferentes marcas disponíveis comercialmente.

Entretanto, a implementação desses testes por muitos países é marcada por vários desafios a serem enfrentados, como capacitação dos profissionais, competição global pelo acesso a kits e suprimentos de diagnóstico (incluindo swabs para a coleta das amostras), escolha do teste apropriado para cada situação e garantia de que os testes tenham validação externa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020c; NKENGASONG, 2020; FDA, 2022). Além da ausência de consenso a respeito de quais seriam as melhores estratégias a serem adotadas levando em consideração os custos dos testes e efetividade, juntamente com o cumprimento de medidas de saúde pública, como quarentena e rastreamento de contatos, controlando as infecções comunitárias e minimizando as interrupções das atividades sociais e dos seus reflexos para a economia global (PEELING et al., 2022).

Adicionalmente, com a emergência das VOCs de alta transmissibilidade, destacou-se ainda mais a necessidade de ampliação dos testes comunitários como medida de saúde pública para retardar a propagação dessas variantes (CDC, 2020c; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2022).

Em resposta a progressão da pandemia de COVID-19, o uso dos testes passou a ser realizado fora dos ambientes de saúde, visando garantir um ambiente seguro nas escolas, locais de trabalho e reuniões para esportes, música, religião e eventos sociais, além da necessidade de realização dos testes para retomada das viagens de acordo com determinação dos governos e companhias aéreas. No entanto, ainda não se tem uma decisão por parte dos formuladores de políticas quanto aos melhores testes a serem implantados nos diferentes ambientes para gerenciamento de pacientes, descoberta de casos e controle de surtos, devido às limitações na cadeia de suprimentos, força de trabalho insuficiente e falta de maiores evidências científicas (BERGER et al., 2021).

Somado a esses desafios apresentados, outros agravantes expostos pela pandemia foram a desigualdade nos sistemas de saúde, principalmente em países de baixa e média renda; e a fragmentação entre a saúde pública e as prioridades políticas e econômicas, ocasionando divergências quanto a tomada de decisões políticas para controle da pandemia, preservação da vida e redução da interrupção das atividades sociais e proteção da economia, levando a divulgação para o público de informações equivocadas ou incoerentes (PEELING et al., 2022).

Finalmente, apesar das deficiências existentes e visando o enfrentamento dos atuais desafios para diagnóstico e controle da COVID-19, a testagem em massa a partir do desenvolvimento e utilização de testes no local de atendimento (PoCTs), demonstra um elevado potencial. Os PoCTs são testes diagnósticos rápidos, que podem ser feitos no local da coleta da amostra, sem necessidade de processo laboratorial demorado (JUNKER; SCHLEBUSCH; LUPPA, 2010; KUBINA; DZIEDZIC, 2020; NELSON et al., 2020; VOS et al., 2019). A agilidade e conveniência dos PoCTs auxilia no rastreamento epidemiológico rápido e reduz o custo financeiro e a pressão sobre o sistema de saúde durante a pandemia (CRADIC et al., 2020; DENG; PENG, 2020; RAVI et al., 2020).

Plataformas diagnósticas moleculares e PoCTs como é o caso da técnica RT-LAMP (características detalhadas no tópico 2.6.7.2 Amplificação isotérmica mediada por loop – LAMP) são ótimas opções a serem consideradas, devido à alta sensibilidade e especificidade, além do custo, rapidez e facilidade de execução dos protocolos. No entanto, são necessários esforços por parte de várias instituições acadêmicas e de pesquisa em todo o mundo, parcerias público-privadas para a produção em massa de equipamentos e

reagentes essenciais para a implementação do RT-LAMP como um PoCT, auxiliando no diagnóstico e na mitigação da COVID-19 (AUGUSTINE et al., 2020).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a distribuição e padrões da contaminação ambiental por SARS-CoV-2 e desenvolver um teste POC para o diagnóstico da COVID-19, estabelecendo estratégias para controle da pandemia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença do RNA de SARS-CoV-2 e seu potencial infeccioso em superfícies de alto toque na cidade do Recife, durante a segunda onda da pandemia de COVID-19;
- Avaliar os parâmetros da técnica RT-LAMP implementada globalmente para diagnóstico de SARS-CoV-2, através de um estudo de revisão sistemática;
- Desenvolver e padronizar ensaio RT-LAMP para detecção do SARS-CoV-2 em amostras biológicas humanas infectadas experimentalmente e naturalmente;
- Comparar a sensibilidade, especificidade e custo entre as técnicas RT-LAMP e RT-qPCR para a detecção do SARS-CoV-2 em amostras humanas;

#### 4 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido à revista *Viruses*, ISSN 1999-4915, Fator de impacto 5.048.



### **SYSTEMATIC REVIEW ON RT-LAMP CLINICAL VALIDATION CRITERIA FOR SARS-CoV-2 DIAGNOSTIC**

<sup>1</sup> Suelen Cristina de Lima\*,<sup>1, 2</sup> Barbara Nazly Rodrigues Santos,<sup>1, 2</sup> Lindomar Pena

<sup>1</sup> Laboratory of Virology and Experimental Therapy - LAVITE, Oswaldo Cruz Pernambuco Foundation (FIOCRUZ-PE), Aggeu Magalhães Institute – IAM, Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-465, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Genetics-Federal, University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil;

\* Correspondence: [suelenlima.lp@gmail.com](mailto:suelenlima.lp@gmail.com); Tel.: +55-81-999325801

## ABSTRACT

Technique of reverse transcription and loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) been utilized in several laboratories around the world with the aim of making molecular diagnosis of COVID-19 faster and more cheaper. However, for your application, parameterizations that validate it in relation to the criteria that establish safety of new diagnostic tests are necessary. In the face of the situation, the present study aimed to investigate the implementation of the RT-LAMP technique for the investigation of SAR-CoV-2 globally through a systematic review. This study was realized from analyzing and comparing published works, involving the evaluation of clinical samples from patients with suspect COVID-19, inside predefined inclusion and exclusion criteria. The searches the works were carried using specific keywords in five scientific databases. Original studies with human samples of SARS-CoV-2, case-control cohort or cross-sectional studies (95% CI), those that applied colorimetric detection methods (pH or fluorescence) of RT-LAMP products and analyzed the sensitivity and specificity of RT-LAMP before clinical validation, were included. A total nine studies published between 2020 and June 2022, with 4,070 SARS-CoV-2 clinical samples validated, were eligible and fit the mentioned criteria. All studies had cumulative sensitivity of 87.5% (CI 95% = 83.98 –90.02%), cumulative specificity of 97.1% (CI 95% = 93.98 –100%) and cumulative accuracy of 97.5% (CI 95% = 94.28 – 100%). In addition, was possible use different types of samples during RT-LAMP tests, different dyes for detection reaction products, primers directed to different targets of SARS-CoV-2 and in some cases, LOD assays less than 1 copy/ $\mu$ l RNA. In conclusion, RT-LAMP presents as a versatile technique with high diagnostic potential for COVID-19.

**Keywords:** SARS-CoV-2. Coronavirus disease 19. RT-LAMP. Clinical validation.

Artigo a ser submetido à revista Scientific Reports, ISSN 2045-2322, Fator de impacto 4.380.

## 5 ARTIGO 2

Artigo a ser submetido à revista Scientific Reports, ISSN 2045-2322, Fator de impacto 4.380.



### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP) ASSAY FOR RAPID DETECTION OF SARS-CoV-2 AT THE POINT-OF-CARE**

<sup>1,2</sup> Bárbara Nazly Rodrigues Santos,<sup>3</sup> Severino Jefferson Ribeiro da Silva,<sup>1</sup> Isabela Oliveira da Mota Florêncio,<sup>1</sup> Renata Pessôa Germano Mendes,<sup>1</sup> Suelen Cristina de Lima,<sup>1, 2</sup> Lindomar Pena\*

<sup>1</sup> Laboratory of Virology and Experimental Therapy - LAVITE, Oswaldo Cruz Pernambuco Foundation (FIOCRUZ-PE), Aggeu Magalhães Institute – IAM, Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-465, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Genetics-Federal, University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil;

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3M2, Canada;

\* Correspondence: [lindomar.pena@fiocruz.br](mailto:lindomar.pena@fiocruz.br); Tel.: +55-81-998964432

## ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) shares a variety of symptoms with other respiratory pathogens, making accurate clinical diagnosis difficult. Currently, the gold standard molecular technique for diagnosis of SARS-CoV-2 is quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), but the technique has several limitations for use in distant and resource-limited areas. Despite the advancement of vaccination, mass testing remains the most efficient way to control the transmission of COVID-19, mainly due to the spread of variants of concern (VOCs). Therefore, the present study aimed to develop and validate a diagnostic platform based on isothermal amplification mediated by reverse transcription loop for detection of SARS-CoV-2 in human samples and point-of-care (POC) application. The developed test detected SARS-CoV-2 from 15 minutes using a single-step protocol, without the need for RNA extraction from biological samples, including samples that can be self-collected reducing the exposure of health professionals. RT-LAMP was highly specific and approximately 100 times more sensitive than RT-qPCR. We validated the assay with 317 nasopharyngeal swab samples from patients with suspected COVID-19 and compared to RT-qPCR, SARS-CoV-2 RT-LAMP had about 95% sensitivity and an overall accuracy of 79%. At a cost lower than RT-qPCR, the RT-LAMP assay offers an affordable, simple and rapid alternative for POC diagnosis of SARS-CoV-2 in human samples, with the potential to accelerate population screening and assist in the control of COVID -19 during the ongoing pandemic.

**Keywords:** SARS-CoV-2; Diagnostic; Point-of-care; RT-LAMP.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

O entendimento da distribuição e dos padrões de contaminação ambiental pelo SARS-CoV-2 oferece dados relevantes para as autoridades de saúde pública, permitindo a identificação de pontos críticos e o estabelecimento de medidas de controle eficazes, além de fornecer dados úteis para estimar a circulação silenciosa do vírus. Adicionalmente, com a flexibilização de muitos países, quanto às medidas de intervenções não farmacêuticas impostas no início da pandemia, e disseminação das VOCs, responsáveis por vários surtos (LUNDBERG et al., 2022), a compreensão dos parâmetros de disseminação do SARS-CoV-2 no meio ambiente torna-se fundamental (SMITH et al., 2021).

A via mais frequente de transmissão do SARS-CoV-2, ocorre a partir do contato direto entre as pessoas, pela exposição a um fluxo contínuo de gotículas ou aerossóis, liberados do trato respiratório de indivíduos infectados, saturados de partículas virais (FENNELLY, 2020). A transmissão respiratória e por contato direto são consideradas as principais rotas para a dispersão do SARS-CoV-2 entre humanos (ZHANG et al., 2020a; SANTARPIA et al., 2020; GREENHALGH et al., 2021). Entretanto, a possibilidade de transmissão do SARS-CoV-2 de forma indireta, através de superfícies contaminadas (fômites), também apresentou papel crucial na disseminação do vírus (XIE et al., 2020; MEYEROWITZ et al., 2021).

Diversos estudos já investigaram a presença do RNA de SARS-CoV-2 no ar e em superfícies ambientais, principalmente em hospitais (CHIA et al., 2020; LIU et al., 2020e; COLANERI et al., 2020). Em ambientes hospitalares, nos setores ocupados por pacientes infectados pela COVID-19, ocorre elevada circulação do SARS-CoV-2 e frequentemente detecta-se o RNA viral em fômites, como vasos sanitários, pias e maçanetas (ONG et al., 2020; ZHOU et al., 2021).

No nosso estudo de avaliação da distribuição e padrões de contaminação ambiental por SARS-CoV-2, detectamos o RNA viral não só nas superfícies de instituições de saúde, mas também nas superfícies de áreas públicas tropicais, com grande movimentação diária de pessoas, como em terminais de ônibus, praias, mercados e parques, onde supostamente se tem maior circulação viral.

O Brasil foi o primeiro país da América Latina a registrar casos de COVID-19 (CASTRO et al., 2021). O SARS-CoV-2 disseminou-se rapidamente por todas as regiões

do país, o qual em 2022 ainda ocupa a terceira posição no ranking global de países com maior número de casos e mortes, de acordo com dados do “Coronavirus Resource Center” da “Johns Hopkins University (JHU)”.

Apesar dos elevados percentuais, poucos estudos avaliando a dispersão ambiental do SARS-CoV-2 foram realizados no território brasileiro. Com finalidade semelhante ao nosso trabalho, encontramos apenas um estudo recente que investigou a presença do RNA do SARS-CoV-2 em superfícies públicas no município de Belo Horizonte, considerada uma das grandes metrópoles brasileiras que apresenta clima tropical de savana no Sudeste do Brasil (ABRAHÃO et al., 2021). Ainda assim, a taxa de positividade foi menor (apenas 5,25%), quando comparada aos nossos dados (24,2%). O que pode ter relação com o aumento no número de casos de COVID-19 no período em que o estudo foi realizado na cidade do Recife, local onde foram feitas as coletas das amostras de superfícies investigadas.

Essas discrepâncias observadas nos estudos realizados em diferentes locais, demonstram como as variáveis regionais e globais podem interferir na disseminação da COVID-19. Além da comprovação da influência de fatores climáticos e meteorológicos (PAHUJA et al., 2021; ISLAM et al., 2021; GUO et al., 2021), fatores socioeconômicos, como a densidade populacional, grande desigualdade social e escolhas equivocadas de políticas públicas e estratégias de gestão de combate à COVID-19, também podem estar associados (SILVA; PENA, 2021b). De acordo com estudo realizado por GUEDES et al., (2021), regiões menos desenvolvidas tiveram maiores números de casos diagnosticados de COVID-19. A precariedade nas condições sociodemográficas e de saúde, como falta de acesso à água encanada nas residências, número elevado de pessoas por domicílio e instabilidade econômica, dificultam a realização de estratégias de prevenção à COVID-19 e conseqüentemente levam a propagação viral desenfreada em comunidades com menos recursos (GUEDES et al., 2021).

Uma revisão sistemática recentemente publicada, demonstrou a possibilidade de contaminação de uma ampla variedade de instalações e superfícies por RNA de SARS-CoV-2, com predominância em ambientes hospitalares (GONÇALVES et al., 2021). Nos achados do nosso estudo, observamos diferenças quanto a esses padrões, visto que 55,9% das amostras positivas foram detectadas no entorno de terminais de transporte público. O que pode ocorrer em consequência do cumprimento rigoroso de medidas, como limpeza e

desinfecção recorrente de superfícies tocadas, além das precauções interpessoais, como uso de máscara facial, distanciamento e higienização das mãos, nas unidades de saúde investigadas.

Os nossos dados indicaram a presença de RNA de SARS-CoV-2 em uma variedade de materiais e ambientes, com alta positividade em superfícies frequentemente tocadas, como em banheiros, caixas eletrônicos, corrimãos, parques infantis e equipamentos de academias ao ar livre, comprovando a diversidade de habitats onde o vírus pode se estabelecer transitoriamente. Já foi demonstrado que o SARS-CoV-2 pode ser identificado e permanecer infeccioso por até três horas no ar, em papelão por até 24 horas e em materiais plásticos ou de aço inoxidável por dois a três dias (VAN DOREMALEN et al., 2020). No entanto, vários agentes estressores podem comprometer a integridade das partículas virais, levando a diminuição da carga viral ao longo do tempo, influenciando diretamente no risco de contaminação para humanos em campo (CHIN et al., 2020; ZHANG et al., 2020a; RIDDELL et al., 2020).

Por isso, para entender as implicações das amostras de superfícies positivas, em termos de potencial infeccioso para o ser humano, análises para determinação da capacidade de cultivo do SARS-CoV-2, a partir de swabs ambientais, devem ser realizadas.

A maioria dos estudos não inclui ensaios de infectividade viral devido a necessidade de propagação do SARS-CoV-2 em cultura de células, a qual só pode ser conduzida em instalações de nível 3 de biossegurança, nem sempre amplamente disponíveis (KAUFER et al., 2020). Na pesquisa descrita ao longo deste trabalho avaliamos o potencial infeccioso de amostras de superfície positivas (valor  $C_q < 34$ ) em células Vero CCL-81, embora o isolamento do SARS-CoV-2 não foi possível. Semelhante aos nossos achados, outros trabalhos recentemente publicados também reportaram a dificuldade de isolar o SARS-CoV-2 a partir de amostras coletadas em superfícies, os poucos estudos onde foram realizadas tentativas para isolamento do vírus, falharam na indução do efeito citopático ou encontraram apenas sinais fracos da presença de vírus competentes para replicação (SANTARPIA et al., 2020; COLANERI et al., 2020).

Uma justificativa para esse problema, é a quantidade mínima de RNA viral detectado em amostras de superfícies. Um conjunto de estudos mostraram altos valores de  $C_q$ s ( $> 30$ ) na amostragem ambiental por RT-qPCR (DARGAHI et al., 2021; ABRAHÃO et al., 2021; ZHOU et al., 2021).

Além disso, a transmissão do SARS-CoV-2 através de superfícies contaminadas pode ser influenciada por múltiplos fatores, como distância da fonte viral, quantidade de vírus a qual a pessoa é submetida e o tempo desde o momento em que o vírus foi depositado na superfície até ser tocada. Fatores ambientais como umidade, temperatura e alto nível de radiação ultravioleta também interferem na viabilidade do SARS-CoV-2 ao longo do tempo (VAN DOREMALEN et al., 2020; CHIN et al., 2020). Por isso, uma solução para aumentar as chances de isolamento viral a partir de amostras de superfícies ambientais, provavelmente seria o aumento na frequência das coletas, em vários momentos ao longo do dia, levando em consideração todos os fatores que podem influenciar na viabilidade do SARS-CoV-2, conforme mencionado.

Apesar das limitações do nosso estudo, os dados obtidos indicaram os locais e objetos com maior risco de contaminação por fômites, direcionando os pontos que devem ser considerados críticos para controle da transmissão do SARS-CoV-2. As informações apresentados destacam a importância da vigilância ambiental e da realização de testes de viabilidade viral, os quais podem ter contribuição na melhoria da avaliação espacial e temporal do risco de transmissão da COVID-19, monitorando superfícies ambientais suspeitas e de alto contato em locais de alto risco.

Adicionalmente, identificamos baixa adesão às políticas de mitigação da COVID-19 por parte da sociedade em relação à adoção de medidas de controle, o que pode refletir na detecção frequente do RNA do SARS-CoV-2 e nos padrões de contaminação ambiental, como já demonstrado (THE LANCET, 2020; JORGE et al., 2021).

As rotas de transmissão alternativas do SARS-CoV-2, apesar de não apresentarem um papel principal na disseminação viral durante a pandemia em curso, contribuem para elevação no número de casos suspeitos e confirmados, com maior probabilidade de surtos e, conseqüentemente, busca desenfreada por testes de diagnóstico.

Desde o surgimento do SARS-CoV-2, autoridades de saúde pública ao redor do mundo iniciaram a busca por plataformas diagnósticas individuais com maior eficiência e aceitação da população. Porém, existem algumas especificações ideais para testes de detecção viral individual que devem ser levadas em consideração. Essas especificações incluem: 1) amostragem simples e indolor, para que a realização de testes com frequência não seja um problema para a população, 2) facilidade, rapidez e baixo custo, tornando-os utilizáveis em larga escala e em qualquer condição, inclusive em laboratórios pouco

especializados, 3) sensibilidade e especificidade para trazer maior segurança e 4) conexão em tempo real, permitindo informações individuais imediatas e monitoramento por autoridades locais ou nacionais. Esses requisitos são essenciais para garantir a retomada das atividades sociais e profissionais (SCHNEIDER et al., 2022).

Apresentando todas as características acima mencionadas, a técnica RT-LAMP têm demonstrado grande potencial na detecção do SARS-CoV-2. O desenvolvimento de ensaios baseados em RT-LAMP para implantação no ponto de atendimento, destaca-se como estratégia eficaz para a reabertura dos setores econômicos com segurança, evitando futuros surtos de COVID-19 e auxiliando no controle da pandemia. Nosso grupo de pesquisa já desenvolveu ensaios RT-LAMP para diversos patógenos, como Vírus Zika (ZIKV) (SILVA et al., 2019; DA SILVA et al., 2021b), Vírus Mayaro (MAYV) e Vírus Chikungunya (CHIKV).

No estudo de desenvolvimento de um teste POC para diagnóstico da COVID-19, otimizamos e validamos um ensaio RT-LAMP com protocolo de tubos fechados e única etapa para detecção do SARS-CoV-2 em amostras humanas. Os resultados demonstraram a alta sensibilidade do teste, assim como a especificidade para detecção do alvo viral, sem reatividade cruzada frente a outros patógenos avaliados. Além disso, nosso teste apresentou robustez para detecção do SARS-CoV-2 em uma variedade de amostras, incluindo nasofaringe, orofaringe, saliva e gargarejo, mesmo na ausência de tratamentos prévios, como métodos de extração de RNA, os quais são demorados e onerosos quando necessários durante as etapas para diagnóstico.

Grande parte dos estudos que utilizam RT-LAMP como teste de índice, com RT-qPCR como teste de referência, encontraram taxas de sensibilidade próximas a 90%, com alguns deles relatando 100% de sensibilidade e especificidade. Poucos estudos demonstraram sensibilidade inferior a 90%, indicando o alto valor diagnóstico do RT-LAMP para COVID-19 (SUBALI; WIYONO, 2021). Revisões sistemáticas e trabalhos de meta-análise para avaliação dos parâmetros do RT-LAMP durante aplicação diagnóstica, estão sendo cada vez mais realizados.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Informação e Tecnologia (IBICT), identificar as informações relevantes e confiáveis diante do volume crescente de dados produzidos pela comunidade científica ao longo da pandemia da COVID-19 é um desafio. Estudos secundários, como revisões sistemáticas, visam o mapeamento das pesquisas que foram

e estão sendo desenvolvidas, as áreas de incertezas dos conhecimentos e os estudos que ainda são necessários. O principal objetivo desse tipo de análise é auxiliar na resposta a um questionamento feito a partir da utilização de critérios que permitem a avaliação da validade, relevância, solidez científica e aplicabilidade de cada estudo inserido na revisão.

A revisão sistemática desenvolvida nesse estudo, foi idealizada com o intuito de verificar a qualidade da validação clínica dos ensaios RT-LAMP para diagnóstico da COVID-19. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia foram utilizados como critérios de análise e comparação entre os trabalhos realizados em várias partes do mundo.

Dados publicados extraídos de 81 artigos para revisão sistemática e 26 artigos para análise de subgrupos na meta-análise, relataram uma sensibilidade combinada de 94% (IC 95%: 90 – 96%) para amostras de RNA purificado, e sensibilidade de 78% (IC 95%: 65 – 87%) para amostras brutas, sem extração (Subsoontorn et al. 2020). No entanto, é importante destacar que esse estudo foi conduzido no primeiro ano da pandemia e não focou apenas em dados referentes a pesquisas com SARS-CoV-2, mas também com outros coronavírus humanos (MERS e SARS-CoV), o que demonstra a importância da realização de trabalhos com dados atuais, como o nosso, abrangendo uma maior variedade de amostras e suas possíveis diferenças, inclusive as novas linhagens do SARS-CoV-2 circulantes no mundo.

A análise conjunta de todos os estudos incluídos na nossa revisão sistemática (Um total de 4.070 amostras clínicas de SARS-CoV-2 validadas) revelou um valor de sensibilidade de 87,5% (IC 95%: 83,98– 90,02%), especificidade de 97,1% (IC 95% = 93,98 –100%) e acurácia de 97,5% (IC 95% = 94,28 – 100%).

Alguns fatores podem influenciar na sensibilidade dos ensaios RT-LAMP, como a carga viral do paciente no momento da testagem e o tempo da reação. Em geral, nos primeiros dias da infecção, quando a viremia está elevada, a detecção é mais rápida e sensível, especialmente ao utilizar-se amostras de swabs nasofaríngeos, as quais são padrão-ouro para o diagnóstico da COVID-19. Já na segunda semana de sintomas, com a queda da viremia, a sensibilidade tende a diminuir e reações por tempos maiores que 30 minutos podem ser necessárias. Essa abordagem não desvaloriza os ensaios RT-LAMP, visto que tempos de reação de 60 a 90 minutos ainda constitui uma detecção rápida, quando se comparada com a RT-qPCR e seu fluxo de trabalho extenso (SOROKA et al.,

2021). No entanto, enfatiza-se a necessidade de utilização de controles negativos durante os experimentos, evitando a liberação de resultados falso-positivos, os quais costumam ser frequentes quando tempos de amplificação muito longos precisam ser aplicados (MOORE et al., 2021).

A sensibilidade dos ensaios também apresenta uma redução ao se omitir a etapa de extração do material genético, conforme já demonstrado por THI et al., (2020). Para contornar essa situação, protocolos RT-LAMP podem ser precedidos de etapas simples de preparação das amostras, diminuindo, inclusive, o risco de infecção. Essa preparação envolve a desintegração dos vírions, liberação do RNA viral e desativação das RNases, a partir da utilização de detergentes apropriados, temperatura de 95°C ou por métodos simples de purificação. Um estudo testou essas etapas de preparação com amostras de nasofaringe e saliva, demonstrando uma melhoria da sensibilidade de 100 para 50 cópias de RNA viral/ $\mu\text{L}$ , ou até mesmo para 1 cópia/ $\mu\text{L}$ , dependendo do método utilizado (RABE; CEPKO, 2020).

Os nosso ensaio RT-LAMP foi capaz de detectar o SARS-CoV-2 a partir de 15 minutos, com tempo de 20 minutos padronizado como ideal até para amostras com cargas virais reduzidas (Cqs entre 30 - 38). No entanto, nos ensaios com amostras brutas, especialmente amostras de nasofaringe e saliva, resultados falso negativos foram observados e uma etapa de pré-tratamento precisou ser incorporada ao protocolo. O que, neste caso, significou a diluição das amostras em água livre de nuclease, reduzindo conseqüentemente os inibidores de reação presentes, sendo suficiente para obtenção de resultados satisfatórios.

Os estudo avaliados durante a revisão sistemática, utilizaram vários tipos de amostras biológicas, os quais não apresentaram influência direta na acurácia do teste, apesar da possibilidade de ser um viés na análise da sensibilidade e especificidade (HUANG et al., 2022; TANG et al., 2022).

Apesar das inúmeras vantagens da técnica RT-LAMP, uma das limitações mais desafiadoras é a escolha do método de detecção dos produtos de amplificação. Para aplicação no ponto de atendimento, o ideal é que métodos simples, como a detecção visual por mudança colorimétrica dos tubos de reação, sejam priorizados. Na revisão sistemática, selecionamos trabalhos que utilizaram especificamente, corantes sensíveis a pH e fluorescentes. A utilização de indicadores de pH é atualmente muito indicada, favorecendo

a especificidade do teste (ANNAMALAI et al., 2020; BAEK et al., 2020), porém os kits com esses corantes incorporados tendem a apresentar maior custo.

No nosso estudo para desenvolvimento de um teste baseado em RT-LAMP, optamos pelo uso do SYBR Green I, intercalante de DNA que emite fluorescência na presença do genoma viral, com uma mudança notável da cor de laranja para amarelo esverdeado, similarmente ao que observamos em um dos trabalhos analisados na revisão sistemática (HUANG et al., 2022). Além disso, em outro estudo incluído na revisão sistemática, os pesquisadores desenvolveram um corante intercalante de dsDNA que emite fluorescência, o que pode ser uma estratégia para reduzir ainda mais o custo do teste (FOWLER et al., 2021).

É importante destacar que algumas variáveis técnicas podem originar cores intermediárias, dificultando a definição dos resultados. Já foi demonstrado que temperaturas acima de 65°C afetam a cor observada até nos controles sem molde (NTC), o que não aconteceu quando a temperatura estava abaixo de 65°C. Esta observação indica uma relação direta entre temperatura e formação de dímero de primer, ressaltando que o RT-LAMP precisa ser realizado em equipamentos capazes de manter uma temperatura constante e precisa (DE OLIVEIRA COELHO et al., 2021). Nossos resultados corroboram com esses achados, visto que a temperatura de 63°C, testada tanto em termociclador como em bloco de aquecimento a seco, demonstrou maior eficiência de amplificação sem visualização de variações colorimétricas. Para evitar o problema da visualização de cores intermediárias, dificultando a interpretação do resultado, optamos por preparar alíquotas de uso do corante fluorescente, o qual era utilizado por no máximo três reações e mantido em tubos opacos.

Diversos estudos demonstram que, durante as análises comparativas dos resultados do ensaio RT-LAMP para detecção do SARS-CoV-2, com os valores de C<sub>q</sub>s obtidos após as reações de RT-qPCR, o estabelecimento de um ponto de corte de C<sub>q</sub> <30 seria o ideal, especialmente para os métodos RT-LAMP colorimétricos, mantendo a sensibilidade do ensaio próxima a 100% (SCHERMER et al., 2020; THI et al., 2020; GARCÍA-BERNALT DIEGO et al., 2021; DE OLIVEIRA COELHO et al., 2021).

Com nossos dados, não foi possível associar a redução da sensibilidade do RT-LAMP com os C<sub>q</sub>s mais elevados das amostras avaliadas. Um percentual de cerca 5% (2/38) das amostras com C<sub>q</sub>s entre 30 e 40, negativaram nos nossos testes RT-LAMP para

detecção do SARS-CoV-2. Resultado similar ao que foi observado para os outros grupos de Cqs, aproximadamente 5% das amostras com Cqs <20 também negativaram (1/17) e o mesmo percentual foi obtido para as amostras com Cqs entre 20 e 30 (5/97 negativaram). Essas divergências podem ter sido motivadas pelos números das amostras avaliadas em cada grupo, os quais não mostraram-se correspondentes devido a obtenção das amostras através da demanda espontânea dos setores de saúde. Aumentar o número amostral dentro dos grupos de Cqs é uma estratégia que potencializa as análises estatísticas e deve ser adotada sempre que possível.

Outro fator que pode ter influenciado as amostras que apresentaram resultados positivos na RT-qPCR e negativos no RT-LAMP, foi a escolha de protocolos direcionados para alvos diferentes do SARS-CoV-2. Dos *primers* para nosso ensaio RT-LAMP, os que apresentaram melhor desempenho foram aqueles direcionados para a sequência codificante da proteína de membrana do SARS-CoV-2 (gene *M*). Já o protocolo RT-qPCR empregado pelo nosso grupo para diagnóstico do SARS-CoV-2, foi estabelecido para amplificação da sequência codificante da proteína do nucleocapsídeo (gene *N*) (CDC, 2020).

ALEXANDERSE et al., (2020) demonstraram que o RNA do nucleocapsídeo está presente em abundância como mRNA subgenômico em amostras de pacientes, levando em muitos casos à superestimação do número de genomas virais reais em ~100 a 1000x. Isso também foi comprovado em estudo que demonstrou a ausência de partículas virais infecciosas em determinadas concentrações de RNA viral, abrangendo a sequência do gene *N* (LARREMORE et al., 2021). Tais dados podem justificar a maior detecção do gene *N* do SARS-CoV-2, quando comparado aos demais alvos nos ensaios diagnósticos.

Apesar do nosso grupo de pesquisa ter desenvolvido ensaios RT-LAMP para outros patógenos, este estudo é o pioneiro utilizando RT-LAMP para SARS-CoV-2, e por isso muitos desafios precisam ser enfrentados. Visando a problemática apresentada quanto aos protocolos para diferentes alvos (RT-LAMP x RT-qPCR), nossa equipe já está desenvolvendo ensaios RT-LAMP direcionados para outras sequências do genoma de SARS-CoV-2 (genes *N* e *3CL*), além da busca por protocolos de RT-qPCR abrangendo distintas regiões.

Uma estratégia que também demonstrou eficiência em outros estudos, é a multiplexação de vários conjuntos de *primers* RT-LAMP (ZHANG et al., 2020d; MAUTNER

et al., 2020), a qual também está sendo avaliada pelo nosso grupo em projetos em elaboração. Dos trabalhos incluídos na revisão sistemática, por exemplo, a maioria utilizou mais de um alvo para os ensaios RT-LAMP (MOHON et al., 2020; ALVES et al., 2021; HE et al., 2021; TANG et al., 2022; JAROENRAM et al., 2022).

A testagem em massa é o passo mais importante para limitar a disseminação do SARS-CoV-2, porém as consequências dessa iniciativa não são bem aceitas pelos líderes governamentais. Isso é visível no número de testes que recebem certificados e entram no mercado (SOROKA et al., 2021). Também é importante enfatizar que o método LAMP é mais novo que a RT-PCR e, por isso, não foi pesquisado tão extensivamente. Muitos ensaios RT-LAMP ainda estão sendo avaliados em ambientes clínicos, faltando informações práticas para ampliação dos testes comercialmente disponíveis, como limites realistas de sensibilidade, confiabilidade do teste e eficácia em amostras de pacientes não tratadas, além da garantia da validade do RT-LAMP no campo (CHAOUCH, 2021).

Atualmente, diversas estratégias para utilização do método em campo vêm sendo aplicadas, como o uso efetivo de reagentes LAMP secos, simplificando o armazenamento e manuseio das amostras sem comprometer a sensibilidade ou especificidade (SONG et al., 2022). Sistemas baseados em papel para uso por qualquer pessoa em quarentena domiciliar ou com acesso limitado a unidades de saúde, também vêm sendo testados (YANG et al., 2020). Além da possibilidade de automatizar o método LAMP para diagnóstico rápido e sem esforço (YONEKAWA et al., 2020), conectando dispositivos eletrônicos como computador ou smartphone para transmissão em tempo real para um centro de monitoramento de pandemia (PRIYE et al., 2017).

Juntamente com os esforços das instituições acadêmicas e de pesquisa em todo o mundo, é aceitável que sejam feitas parcerias público-privadas para produção em massa de equipamentos e reagentes necessários, que possam auxiliar na implementação do RT-LAMP como um PoCT para o rápido diagnóstico e mitigação da pandemia da COVID-19 (AUGUSTINE et al., 2020).

Os resultados aqui apresentados, indicam que nosso ensaio apresenta potencial para utilização como alternativa diagnóstica para detecção do SARS-CoV-2 em amostras humanas. Com uma estratégia baseada em tubos fechados e protocolo de única etapa que não requer extração de RNA das amostras, os ensaios desenvolvidos propõem-se a

elaboração de kits de testagem rápida simples e baratos para aplicação POC e implementação a nível nacional.

O protocolo apresentado nesse estudo, com possibilidade de ser patenteado, mostrou versatilidade para uma ampla de gama de patógenos, de acordo com os dados do grupo (SILVA et al., 2019; DA SILVA et al., 2021b), tornando-o adaptável para outros vírus causadores de surtos e pandemias, além do SARS-CoV-2. Como perspectivas futuras, visamos a validação deste ensaio RT-LAMP com um número maior de amostras para COVID-19, incluindo amostras de diferentes regiões do Brasil e VOCs, bem como a otimização para detecção do SARS-CoV-2 em espécimes de superfícies e animais.

## 7 CONCLUSÕES

- Nossos dados demonstraram a extensa contaminação por RNA viral de superfícies em uma variedade de ambientes urbanos públicos na ausência de isolamento viral, sugerindo baixo risco potencial de contaminação ambiental para a população humana. No entanto, identificamos baixa adesão às políticas de mitigação da COVID-19 por parte da sociedade em relação à adoção de medidas de controle, o que pode refletir na detecção frequente do RNA viral. Estudos como esses podem contribuir para avaliar a prevalência de SARS-CoV-2 em ambientes específicos.
- A revisão sistemática conduzida com os estudos sobre RT-LAMP para detecção do SARS-CoV-2, selecionados a partir de critérios de inclusão e exclusão pré-determinados, demonstrou que a técnica apresenta uma sensibilidade acumulativa de 87,5%, especificidade de 97,1% e acurácia de 97,5%. Além da possibilidade de utilização de diferentes tipos de amostras, corantes para detecção dos produtos de reação e *primers* direcionados para distintos alvos do SARS-CoV-2, indicando que o RT-LAMP é uma técnica versátil e possui grande potencial diagnóstico para COVID-19.
- O ensaio RT-LAMP desenvolvido neste estudo, mostrou-se eficiente na detecção do SARS-CoV-2 em uma variedade de amostras biológicas, inclusive amostras auto coletadas e sem extração de RNA. Essa ferramenta diagnóstica, apresenta-se como uma alternativa molecular rápida, com detecção do SARS-CoV-2 a partir de 15 minutos, simples, com protocolo de única etapa, barata e com a sensibilidade mais elevada que a RT-qPCR. Diante disso, possui grande potencial para aplicação POC, principalmente em países com recursos limitados e infraestrutura laboratorial precária, os mais prejudicados devido a problemas de abastecimento durante a pandemia da COVID-19.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, J. S. et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: A potential tool for monitoring the circulation of infected patients. **Science of The Total Environment**, v. 766, p. 142645, 20 abr. 2021.
- AHIRWAR, R. et al. Biochemical composition, transmission and diagnosis of SARS-CoV-2. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 8, p. BSR20211238, 6 ago. 2021.
- AHMED, S. F.; QUADEER, A. A.; MCKAY, M. R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 254, mar. 2020.
- AI, T. et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. **Radiology**, v. 296, n. 2, p. E32–E40, ago. 2020.
- ALEXANDERSEN, S.; CHAMINGS, A.; BHATTA, T. R. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6059, 27 nov. 2020.
- ALVES, P. A. et al. Optimization and Clinical Validation of Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, a Fast, Highly Sensitive and Specific COVID-19 Molecular Diagnostic Tool That Is Robust to Detect SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- AMALFITANO, E. et al. A glucose meter interface for point-of-care gene circuit-based diagnostics. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 724, 1 fev. 2021.
- AMBROSI, C. et al. SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods. **Journal of Virological Methods**, v. 287, p. 114008, jan. 2021.
- ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, p. 450–452, abr. 2020.
- ANNAMALAI, P. et al. **A Simple Colorimetric Molecular Detection of Novel Coronavirus (COVID-19), an Essential Diagnostic Tool for Pandemic Screening.** medRxiv, , 14 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.10.20060293v1>>. Acesso em: 26 jul. 2022.
- ARNDT, A. L.; LARSON, B. J.; HOGUE, B. G. A Conserved Domain in the Coronavirus Membrane Protein Tail Is Important for Virus Assembly. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11418–11428, nov. 2010.
- AUGUSTINE, R. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. **Biology**, v. 9, n. 8, 22 2020.

- AZHAR, E. I. et al. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 26, p. 2499–2505, 26 jun. 2014.
- AZZI, L. et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e45–e50, 1 jul. 2020.
- BADEN, L. R. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 403–416, 4 fev. 2021.
- BAEK, Y. H. et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 998–1007, 18 maio 2020.
- BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China. Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280–294, fev. 2022.
- BAI, Y. et al. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. **JAMA**, v. 323, n. 14, p. 1406–1407, 14 abr. 2020.
- BAO, H. et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of avian influenza virus subtype H7. **Journal of Virological Methods**, v. 179, n. 1, p. 33–37, 1 jan. 2012.
- BARRERO-CASTILLERO, A. et al. COVID-19: neonatal–perinatal perspectives. **Journal of Perinatology**, v. 41, n. 5, p. 940–951, maio 2021.
- BECHERER, L. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. **Analytical Methods**, v. 12, n. 6, p. 717–746, 13 fev. 2020.
- BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R.; THATOI, H. Recent biotechnological tools for diagnosis of corona virus disease: A review. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 1, p. e3078, 2021.
- BEKTAŞ, A. et al. Accessible LAMP-Enabled Rapid Test (ALERT) for Detecting SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 742, maio 2021.
- BELLOS, I.; PANDITA, A.; PANZA, R. Maternal and perinatal outcomes in pregnant women infected by SARS-CoV-2: A meta-analysis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 256, p. 194–204, 1 jan. 2021.
- BERGER, L. et al. Rational policymaking during a pandemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 4, p. e2012704118, 26 jan. 2021.
- BEZERRA, M. F. et al. A Sanger-based approach for scaling up screening of SARS-CoV-2 variants of interest and concern. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, p. 104910, 1 ago. 2021.

BHADRA, S. et al. Real-Time Sequence-Validated Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123126, 9 abr. 2015.

BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 1–8, 30 jun. 2016.

BHOYAR, R. C. et al. High throughput detection and genetic epidemiology of SARS-CoV-2 using COVIDSeq next-generation sequencing. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247115, 17 fev. 2021.

BISWAS, G.; SAKAI, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 2881–2895, 1 abr. 2014.

BITTAR, C. et al. The Emergence of the New P.4 Lineage of SARS-CoV-2 With Spike L452R Mutation in Brazil. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 745310, 2021.

BLOOM, J. S. et al. Massively scaled-up testing for SARS-CoV-2 RNA via next-generation sequencing of pooled and barcoded nasal and saliva samples. **Nature Biomedical Engineering**, v. 5, n. 7, p. 657–665, jul. 2021.

BORDI, L. et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 8, p. 2000170, 27 fev. 2020.

BOSCH, B. J. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 22, p. 8455–8460, jun. 2004.

BRINKMAN, J. E.; TORO, F.; SHARMA, S. **Physiology, Respiratory Drive**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.

BROUGHTON, J. P. et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 870–874, jul. 2020.

BRUCE, E. A. et al. Direct RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA from patient nasopharyngeal swabs without an RNA extraction step. **PLOS Biology**, v. 18, n. 10, p. e3000896, 2 out. 2020.

BRÜMMER, L. E. et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. **PLOS Medicine**, v. 18, n. 8, p. e1003735, 12 ago. 2021.

BUTLER, D. J. et al. **Shotgun Transcriptome and Isothermal Profiling of SARS-CoV-2 Infection Reveals Unique Host Responses, Viral Diversification, and Drug Interactions**. bioRxiv, , 1 maio 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.20.048066v5>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

BUTT, A. M. et al. **Development of a dual-gene loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection assay for SARS-CoV-2: A preliminary study.**

medRxiv, , 11 abr. 2020. Disponível em:

<<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.08.20056986v1>>. Acesso em: 26 jul. 2022

CALLAWAY, E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. **Nature**, v. 600, n. 7887, p. 21–21, 25 nov. 2021.

CALVERT, A. E. et al. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0185340, 2017.

CANDIDO, D. S. et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6508, p. 1255–1260, 4 set. 2020.

CAPOBIANCO, G. et al. COVID-19 in pregnant women: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 252, p. 543–558, 1 set. 2020.

CARLO, P. D. et al. Air and surface measurements of SARS-CoV-2 inside a bus during normal operation. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0235943, 5 nov. 2020.

CARTER, L. J. et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS central science**, v. 6, n. 5, p. 591–605, 27 maio 2020.

CASCELLA, M. et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

CASTRO, R. R. et al. Spatial dynamics of the COVID-19 pandemic in Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 149, ed 2021.

CDC. **Labs**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>>. Acesso em: 2 ago. 2022a.

CDC. **Healthcare Workers**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/infection-control-recommendations.html>>. Acesso em: 11 ago. 2022b.

CDC. **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>>. Acesso em: 11 ago. 2022c.

CHAMBERS, C. et al. Evaluation for SARS-CoV-2 in Breast Milk From 18 Infected Women. **JAMA**, v. 324, n. 13, p. 1347–1348, 6 out. 2020.

CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020a.

CHAN, K. K. et al. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6508, p. 1261–1265, 4 set. 2020b.

CHANG, C. et al. Recent insights into the development of therapeutics against coronavirus diseases by targeting N protein. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 562–572, abr. 2016.

CHANG, L. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Detected in Blood Donations - Volume 26, Number 7—July 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s.d.].

CHAOUCH, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 6, p. e2215, nov. 2021.

CHEEVER, F. S.; DANIELS, J. B. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 90, n. 3, p. 181–210, set. 1949.

CHEN, H. et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. **The Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 809–815, 7 mar. 2020a.

CHEN, T. et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. **BMJ**, v. 368, p. m1091, 26 mar. 2020b.

CHENG, Y. et al. Face masks effectively limit the probability of SARS-CoV-2 transmission. **Science**, v. 372, n. 6549, p. 1439–1443, 25 jun. 2021.

CHIA, P. Y. et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2800, 29 maio 2020.  
CHIN, A. W. H. et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 1, p. e10, 1 maio 2020.

CHOU, J.; THOMAS, P. G.; RANDOLPH, A. G. Immunology of SARS-CoV-2 infection in children. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 177–185, fev. 2022.

CHU, D. K. et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 395, n. 10242, p. 1973–1987, 27 jun. 2020a.

CHU, D. K. W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 549–555, 1 abr. 2020b.

COLANERI, M. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1094.e1-1094.e5, 1 ago. 2020.

CONSIGLIO, C. R. et al. The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 968- 981.e7, 12 nov. 2020.

COOK, J. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. **Malaria Journal**, v. 14, p. 43, 28 jan. 2015.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro Surveill: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 25, n. 3, jan. 2020.

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**, v. 5, n. 4, p. 536–544, abr. 2020.

COSTELA-RUIZ, V. J. et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 54, p. 62–75, ago. 2020.

**COVID-19 Map**. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

CRADIC, K. et al. Clinical Evaluation and Utilization of Multiple Molecular In Vitro Diagnostic Assays for the Detection of SARS-CoV-2. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 154, n. 2, p. 201–207, 7 jul. 2020.

CROMER, D. et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 1, p. e52–e61, 1 jan. 2022.

DA SILVA, S. J. R. et al. Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1427–1429, 2020a.

DA SILVA, S. J. R. et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2319–2336, 11 set. 2020b.

DA SILVA, S. J. R. et al. Widespread contamination of SARS-CoV-2 on highly touched surfaces in Brazil during the second wave of the COVID-19 pandemic. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 7382–7395, 2021a.

DA SILVA, S. J. R. et al. Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4111, dez. 2021b.

DA SILVA, S. J. R. et al. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. **ACS infectious diseases**, 8 ago. 2022.

DA SILVA TORRES, M. K. et al. The Complexity of SARS-CoV-2 Infection and the COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

DAGAN, N. et al. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 15, p. 1412–1423, 15 abr. 2021.

DARGAHI, A. et al. Investigation of SARS CoV-2 virus in environmental surface. **Environmental Research**, v. 195, p. 110765, abr. 2021.

DASHRAATH, P. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 222, n. 6, p. 521–531, 1 jun. 2020.

DATTA, S. D.; TALWAR, A.; LEE, J. T. A Proposed Framework and Timeline of the Spectrum of Disease Due to SARS-CoV-2 Infection: Illness Beyond Acute Infection and Public Health Implications. **JAMA**, v. 324, n. 22, p. 2251–2252, 8 dez. 2020.

DAVIES, N. G. et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Science**, v. 372, n. 6538, p. eabg3055, 9 abr. 2021.

DAWOOD, F. S. et al. Observations of the global epidemiology of COVID-19 from the pre-pandemic period using web-based surveillance: a cross-sectional analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1255–1262, 1 nov. 2020.

DE GROOT, R. J. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7790–7792, jul. 2013.

DE OLIVEIRA COELHO, B. et al. Essential properties and pitfalls of colorimetric Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification as a point-of-care test for SARS-CoV-2 diagnosis. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 27, n. 1, p. 30, 26 mar. 2021.

DE PUIG, H. et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants. **Science Advances**, v. 7, n. 32, p. eabh2944, 6 ago. 2021.

DENG, S.-Q.; PENG, H.-J. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. E575, 20 fev. 2020.

DHAMA, K. et al. Coronavirus Disease 2019–COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. e00028-20, 24 jun. 2020.

**Diagnostic testing for SARS-CoV-2.** Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

DIEKMANN, O.; HEESTERBEEK, J. A. P.; METZ, J. A. J. On the definition and the computation of the basic reproduction ratio  $R_0$  in models for infectious diseases in

heterogeneous populations. **Journal of Mathematical Biology**, v. 28, n. 4, p. 365–382, 1 jun. 1990.

DOMINGO, E. Mechanisms of viral emergence. **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, p. 38, dez. 2010.

DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 533–534, 1 maio 2020.

DONG, L. et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1846–1848, 12 maio 2020.

DORLASS, E. G. et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 51, n. 3, p. 1117–1123, set. 2020.

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967–1976, 15 maio 2003.

DU, R.-H. et al. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 5, 1 maio 2020.

EDWARDS, S. J. L.; SANTINI, J. M. Anthroponotic risk of SARS-CoV-2, precautionary mitigation, and outbreak management. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 5, p. e187–e188, 1 set. 2020.

EICKMANN, M. et al. Phylogeny of the SARS coronavirus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5650, p. 1504–1505, 28 nov. 2003.

ELMAS, Ö. F. et al. Cutaneous manifestations of COVID-19: A review of the published literature. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, p. e13696, 2020.

EL-THOLOTH, M.; BAU, H. H.; SONG, J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. **ChemRxiv: The Preprint Server for Chemistry**, 19 fev. 2020.

Emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA. p. 12, [s.d.].

ESPEJO, A. P. et al. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 154, n. 3, p. 293–304, 5 ago. 2020.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **SARS-CoV-2 variants of concern as of 4 August 2022**. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

FALAH, S.; KENARKOOHI, A. Transmission routes for SARS-CoV-2 infection: review of evidence. **New Microbes and New Infections**, v. 38, p. 100778, 1 nov. 2020.

FARIA, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science (New York, N.Y.)**, v. 372, n. 6544, p. 815–821, 21 maio 2021.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1282, p. 1–23, 2015.

FEIKIN, D. et al. **Duration of Effectiveness of Vaccines Against SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Disease: Results of a Systematic Review and Meta-Regression.**

Rochester, NY, 18 nov. 2021. Disponível em:

<<https://papers.ssrn.com/abstract=3961378>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

FELDSTEIN, L. R. et al. Characteristics and Outcomes of US Children and Adolescents With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Compared With Severe Acute COVID-19. **JAMA**, v. 325, n. 11, p. 1074–1087, 16 mar. 2021.

FENNELLY, K. P. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 9, p. 914–924, 1 set. 2020.

FIOLET, T. et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 2, p. 202–221, 1 fev. 2022.

FLORES-ALANIS, A. et al. Molecular Epidemiology Surveillance of SARS-CoV-2: Mutations and Genetic Diversity One Year after Emerging. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 184, fev. 2021.

FOMSGAARD, A. S.; ROSENSTIERNE, M. W. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 25, n. 14, abr. 2020.

FOWLER, V. L. et al. A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection. **The Journal of Infection**, v. 82, n. 1, p. 117–125, jan. 2021.

FRANCESCHI, V. B. et al. Predominance of the SARS-CoV-2 Lineage P.1 and Its Sublineage P.1.2 in Patients from the Metropolitan Region of Porto Alegre, Southern Brazil in March 2021. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 8, p. 988, 5 ago. 2021.

FRANCISCO JUNIOR, R. DA S. et al. Turnover of SARS-CoV-2 Lineages Shaped the Pandemic and Enabled the Emergence of New Variants in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2013, 7 out. 2021.

FU, Y.-Z. et al. SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 3, p. 613–620, mar. 2021.

GALLOWAY, S. E. et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 70, n. 3, p. 95–99, 22 jan. 2021.

GAO, S.-J.; GUO, H.; LUO, G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 4, p. 1255–1256, 2022.

GARCÍA-BERNALT DIEGO, J. et al. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 438, 4 mar. 2021.

GARG, S. Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 — COVID-NET, 14 States, March 1–30, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020.

GARIGLIANY, M. et al. SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020 - Volume 26, Number 12—December 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s.d.].

GAYTHORPE, K. A. M. et al. Children's role in the COVID-19 pandemic: a systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13903, 6 jul. 2021.

GOLDFARB, D. M. et al. Self-Collected Saline Gargle Samples as an Alternative to Health Care Worker-Collected Nasopharyngeal Swabs for COVID-19 Diagnosis in Outpatients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 4, p. e02427-20, 19 mar. 2021.

GONÇALVES, D. DA S. et al. Detecting wMel Wolbachia in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 404, 15 ago. 2019.

GONÇALVES, J. et al. Surface contamination with SARS-CoV-2: A systematic review. **Science of The Total Environment**, v. 798, p. 149231, 1 dez. 2021.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Portable and accurate diagnostics for COVID-19: Combined use of the miniPCR thermocycler and a well-plate reader for SARS-CoV-2 virus detection. **PloS One**, v. 15, n. 8, p. e0237418, 2020.

GORBALENYA, A. E.; SNIJDER, E. J.; SPAAN, W. J. M. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, p. 7863–7866, ago. 2004.

GRANADOS-RIVERON, J. T.; AQUINO-JARQUIN, G. Engineering of the current nucleoside-modified mRNA-LNP vaccines against SARS-CoV-2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111953, 1 out. 2021.

GRASSELLI, G. et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1574–1581, 28 abr. 2020.

GREEN, A. A. et al. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 925–939, 6 nov. 2014.

GREENHALGH, T. et al. Management of post-acute covid-19 in primary care. **BMJ**, v. 370, p. m3026, 11 ago. 2020.

GREENHALGH, T. et al. Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. **The Lancet**, v. 397, n. 10285, p. 1603–1605, 1 maio 2021.

GROBBELAAR, L. M. et al. SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 8, p. BSR20210611, 20 ago. 2021.

GROSS, R. et al. Detection of SARS-CoV-2 in human breastmilk. **The Lancet**, v. 395, n. 10239, p. 1757–1758, 6 jun. 2020.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.

GUEDES, M. B. O. G. et al. COVID-19 in Brazilian cities: Impact of social determinants, coverage and quality of primary health care. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0257347, 17 set. 2021.

GUO, C. et al. Meteorological factors and COVID-19 incidence in 190 countries: An observational study. **The Science of the Total Environment**, v. 757, p. 143783, 25 fev. 2021.

HABLI, Z. et al. COVID-19 in-vitro Diagnostics: State-of-the-Art and Challenges for Rapid, Scalable, and High-Accuracy Screening. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2021.

HAGIWARA, M. et al. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 5, p. 605–615, 2007.

HALFMANN, P. J. et al. Transmission of SARS-CoV-2 in Domestic Cats. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 592–594, 6 ago. 2020.

HALLIDAY, J.; BOSELEY, S.; BOSELEY, J. H. E S. Operation Moonshot: rapid Covid test missed over 50% of cases in pilot. **The Guardian**, 5 nov. 2020.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J. J. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 121, n. 1, p. 190–193, jan. 1966.

HANSON, K. E. et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Serologic Testing. **Clinical Infectious Diseases**, p. ciaa1343, 12 set. 2020.

HARCOURT, J. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1266–1273, jun. 2020.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, 11 set. 2020.

HASAN, M. R. et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA by direct RT-qPCR on nasopharyngeal specimens without extraction of viral RNA. **PloS One**, v. 15, n. 7, p. e0236564, 2020.

HASSAN, S. S. et al. Missense mutations in SARS-CoV2 genomes from Indian patients. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4622–4627, nov. 2020.

HE, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 672–675, maio 2020.

HE, Y. et al. All-in-one in situ colorimetric RT-LAMP assay for point-of-care testing of SARS-CoV-2. **The Analyst**, v. 146, n. 19, p. 6026–6034, 27 set. 2021.

HEALTH, C. FOR D. AND R. In Vitro Diagnostics EUAs. **FDA**, 6 out. 2022.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 16 ago. 2021.

HILLE, F. et al. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239–1259, 8 mar. 2018.

HIROTSU, Y.; MOCHIZUKI, H.; OMATA, M. Double-quencher probes improve detection sensitivity toward Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. **Journal of Virological Methods**, v. 284, p. 113926, out. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 16 abr. 2020.

**Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em: <<https://www.fao.org/home/en>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

HOSAKA, N. et al. Rapid detection of human immunodeficiency virus type 1 group M by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Virological Methods**, v. 157, n. 2, p. 195–199, 1 maio 2009.

HOWARD, J. et al. An evidence review of face masks against COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 4, p. e2014564118, 26 jan. 2021.

HOWSON, E. L. A. et al. Preliminary optimisation of a simplified sample preparation method to permit direct detection of SARS-CoV-2 within saliva samples using reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Journal of Virological Methods**, v. 289, p. 114048, mar. 2021.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021.

HU, G.; CHRISTMAN, J. W. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2275, 2019.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020a.

HUANG, W. E. et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 950–961, 25 abr. 2020b.

HUANG, X. et al. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva. **EBioMedicine**, v. 75, p. 103736, 16 dez. 2021.

HUANG, X. et al. Developing RT-LAMP assays for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 in saliva. **EBioMedicine**, v. 75, p. 103736, jan. 2022.

IACOBUCCI, G. Covid-19: Rapid test missed over 50% of positive cases in Manchester pilot. **BMJ**, v. 371, p. m4323, 6 nov. 2020.

IACOBUCCI, G.; COOMBES, R. Covid-19: Government plans to spend £100bn on expanding testing to 10 million a day. **BMJ**, v. 370, p. m3520, 9 set. 2020.

IMAI, M. et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. **Vaccine**, Proceedings of the Second European Influenza Conference. v. 24, n. 44, p. 6679–6682, 10 nov. 2006.

IMAI, M. et al. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. **Journal of Virological Methods**, v. 141, n. 2, p. 173–180, 1 maio 2007.

ISLAM, N. et al. COVID-19 and climatic factors: A global analysis. **Environmental Research**, v. 193, p. 110355, fev. 2021.

IULIANO, A. D. et al. Estimating under-recognized COVID-19 deaths, United States, march 2020-may 2021 using an excess mortality modelling approach. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 1, p. 100019, 1 set. 2021.

JANG, W. S. et al. Development of a multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for on-site diagnosis of SARS CoV-2. **PloS One**, v. 16, n. 3, p. e0248042, 2021.

JAROENRAM, W. et al. One-step colorimetric isothermal detection of COVID-19 with AI-assisted automated result analysis: A platform model for future emerging point-of-care RNA/DNA disease diagnosis. **Talanta**, v. 249, p. 123375, 10 mar. 2022.

JI, W. et al. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 433–440, 2020.

JIA, B. et al. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

JOHANSSON, M. A. et al. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. **JAMA network open**, v. 4, n. 1, p. e2035057, 4 jan. 2021.

JONES, B. A. et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8399–8404, 21 maio 2013.

JORGE, D. C. P. et al. Assessing the nationwide impact of COVID-19 mitigation policies on the transmission rate of SARS-CoV-2 in Brazil. **Epidemics**, v. 35, p. 100465, 1 jun. 2021.

JOUNG, J. et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 15, p. 1492–1494, 8 out. 2020.

JUNKER, R.; SCHLEBUSCH, H.; LUPPA, P. B. Point-of-Care Testing in Hospitals and Primary Care. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 107, n. 33, p. 561–567, ago. 2010.

JUSCAMAYTA-LÓPEZ, E. et al. A Multiplex and Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Sensitive and Rapid Detection of Novel SARS-CoV-2. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 653616, 2021.

KAMINSKI, M. M. et al. CRISPR-based diagnostics. **Nature Biomedical Engineering**, v. 5, n. 7, p. 643–656, jul. 2021.

KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; REFERENCE, C. Published 13 January 202. p. 510, [s.d.].

KANG, S. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 10, n. 7, p. 1228–1238, jul. 2020.

KANWAR, A.; SELVARAJU, S.; ESPER, F. Human Coronavirus-HKU1 Infection Among Adults in Cleveland, Ohio. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. ofx052, 2017.  
KARLIKOW, M. et al. Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples. **Nature Biomedical Engineering**, v. 6, n. 3, p. 246–256, mar. 2022.

KAUFER, A. M. et al. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent. **Pathology**, Focus on SARS-CoV-2 and COVID-19. v. 52, n. 7, p. 790–795, 1 dez. 2020.

KAUR, S. et al. Understanding COVID-19 transmission, health impacts and mitigation: timely social distancing is the key. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, n. 5, p. 6681–6697, 1 maio 2021.

KEVADIYA, B. D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 Infections. **Nature materials**, v. 20, n. 5, p. 593–605, maio 2021.

KHAN, S. et al. Emergence of a Novel Coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Biology and Therapeutic Options. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. e00187-20, 23 abr. 2020.

KHOURY, D. S. et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1205–1211, jul. 2021.

KILIC, T.; WEISSLEDER, R.; LEE, H. Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19: Current Status and Challenges. **iScience**, v. 23, n. 8, 21 ago. 2020.

KIMBERLIN, D. W.; STAGNO, S. Can SARS-CoV-2 Infection Be Acquired In Utero?: More Definitive Evidence Is Needed. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1788–1789, 12 maio 2020.

KING, A. M. Q. et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2601–2631, set. 2018.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, nov. 2020.

KONTOU, P. I. et al. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. **Diagnostics**, v. 10, n. 5, p. 319, maio 2020.

- KUBINA, R.; DZIEDZIC, A. Molecular and Serological Tests for COVID-19 a Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 6, p. E434, 26 jun. 2020.
- KWON, S.-Y. et al. Post-donation COVID-19 identification in blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 115, n. 8, p. 601–602, 2020.
- KYRIAKIDIS, N. C. et al. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 22 fev. 2021.
- LA MAESTRA, S.; ABBONDANDOLO, A.; DE FLORA, S. Epidemiological trends of COVID-19 epidemic in Italy over March 2020: From 1000 to 100 000 cases. **Journal of Medical Virology**, p. 10.1002/jmv.25908, 12 maio 2020.
- LAHA, S. et al. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 85, p. 104445, nov. 2020.
- LAM, T. T.-Y. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282–285, jul. 2020.
- LAMB, L. E. et al. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, 12 jun. 2020.
- LARREMORE, D. B. et al. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. **Science Advances**, v. 7, n. 1, p. eabd5393, 1 jan. 2021.
- LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? **JAMA**, v. 325, n. 6, p. 529–531, 9 fev. 2021.
- LEBLANC, J. J. et al. Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection in Canadian laboratories. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 128, p. 104433, jul. 2020.
- LEUNG, N. H. L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 528–545, ago. 2021.
- LI, D. et al. Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 5, p. e208292, 7 maio 2020a.
- LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020b.
- LIANG, W. et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 3, p. 335–337, 1 mar. 2020a.

LIANG, Y. et al. Highlight of Immune Pathogenic Response and Hematopathologic Effect in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-Cov-2 Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1022, 12 maio 2020b.

LIAO, Y. et al. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 264–275, 5 jun. 2006.

LIN, Q. et al. Microfluidic Immunoassays for Sensitive and Simultaneous Detection of IgG/IgM/Antigen of SARS-CoV-2 within 15 min. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 9454–9458, 21 jul. 2020.

LIU, J. et al. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1171–1180, 15 out. 2010.

LIU, J. et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 5, p. 491–494, maio 2020a.

LIU, P. et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008421, 14 maio 2020b.

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

LIU, R. et al. Viral Load Dynamics in Sputum and Nasopharyngeal Swab in Patients with COVID-19. **Journal of Dental Research**, v. 99, n. 11, p. 1239–1244, 1 out. 2020d.

LIU, Y. et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. **Nature**, v. 582, n. 7813, p. 557–560, jun. 2020e.

LOEFFELHOLZ, M. J.; TANG, Y.-W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 747–756, 1 jan. 2020.

LONG, Q.-X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 845–848, jun. 2020.

LU, H.; STRATTON, C. W.; TANG, Y. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 401–402, abr. 2020.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020a.

LU, R. et al. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, 18 abr. 2020b.

LÜBKE, N. et al. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 130, p. 104579, set. 2020.

LUNDBERG, A. L. et al. Overlapping Delta and Omicron Outbreaks During the COVID-19 Pandemic: Dynamic Panel Data Estimates. **JMIR Public Health and Surveillance**, v. 8, n. 6, p. e37377, 3 jun. 2022.

LUO, L. et al. Air and surface contamination in non-health care settings among 641 environmental specimens of 39 COVID-19 cases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008570, 9 out. 2020.

MA, D. et al. Low-cost detection of norovirus using paper-based cell-free systems and synbody-based viral enrichment. **Synthetic Biology**, v. 3, n. 1, p. ysy018, 1 jan. 2018.

MAGALHÃES, J. J. F. DE et al. Epidemiological and clinical characteristics of the first 557 successive patients with COVID-19 in Pernambuco state, Northeast Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 38, p. 101884, 1 nov. 2020.

MAHONY, J. et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40min with single genome copy sensitivity. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 127–131, 1 set. 2013.

MAK, G. C. et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, p. 104500, 1 ago. 2020.

MANGHWAR, H. et al. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. **Advanced Science**, v. 7, n. 6, p. 1902312, 2020.

MARICIC, T. et al. A direct RT-qPCR approach to test large numbers of individuals for SARS-CoV-2. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0244824, 31 dez. 2020.

MARÍN GABRIEL, M. A. et al. Multicentre Spanish study found no incidences of viral transmission in infants born to mothers with COVID-19. **Acta Paediatrica**, v. 109, n. 11, p. 2302–2308, 2020.

MARSHALL, J. M. Chemoreceptors and cardiovascular control in acute and chronic systemic hypoxia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 31, n. 7, p. 863–888, jul. 1998.

MASTERS, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 193–292, 2006.

MATSON, M. J. et al. Effect of Environmental Conditions on SARS-CoV-2 Stability in Human Nasal Mucus and Sputum - Volume 26, Number 9—September 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s.d.].

MATTIOLI, I. A. et al. On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies. **ACS Sensors**, v. 5, n. 12, p. 3655–3677, 24 dez. 2020.

MAUTNER, L. et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Virology Journal**, v. 17, 21 out. 2020.

MAVRIKOU, S. et al. Development of a Portable, Ultra-Rapid and Ultra-Sensitive Cell-Based Biosensor for the Direct Detection of the SARS-CoV-2 S1 Spike Protein Antigen. **Sensors**, v. 20, n. 11, p. 3121, jan. 2020.

MCALOOSE, D. et al. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. **mBio**, v. 11, n. 5, p. e02220-20, 13 out. 2020.

MCINTOSH, K. et al. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, n. 4, p. 933–940, abr. 1967.

MEMISH, Z. A. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1819–1823, nov. 2013.

MENDICK, R.; DONNELLY, L. Moonshot testing plan “could send 28 million into needless self-isolation”. **The Telegraph**, 10 set. 2020.

MEREDITH, L. W. et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1263–1271, 1 nov. 2020.

MEYEROWITZ, E. A. et al. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 1, p. 69–79, 19 jan. 2021.

MINAMI, K. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR. **Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 27, n. 7, p. 1068–1071, jul. 2021.

MOHON, A. N. et al. Optimization and clinical validation of dual-target RT-LAMP for SARS-CoV-2. **Journal of Virological Methods**, v. 286, p. 113972, dez. 2020.

MOORE, B. B.; KUNKEL, S. L. Attracting Attention: Discovery of IL-8/CXCL8 and the Birth of the Chemokine Field. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 202, n. 1, p. 3–4, 1 jan. 2019.

MOORE, K. J. M. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of SARS-CoV-2 and Myriad Other Applications. **Journal of Biomolecular Techniques : JBT**, v. 32, n. 3, p. 228–275, set. 2021.

MORENO-PÉREZ, O. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Incidence and risk factors: A Mediterranean cohort study. **Journal of Infection**, v. 82, n. 3, p. 378–383, 1 mar. 2021.

MORI, Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 1, p. 150–154, 23 nov. 2001.

MORI, Y. et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 59, n. 2, p. 145–157, 31 maio 2004.

MOTOZONO, C. et al. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1124- 1136.e11, 14 jul. 2021.

MUSTAFA HELLOU, M. et al. Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 341–351, mar. 2021.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 3, p. 223–229, 1 jun. 2002.

NAL, B. et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. **The Journal of General Virology**, v. 86, n. Pt 5, p. 1423–1434, maio 2005.

NALBANDIAN, A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 601–615, abr. 2021.

NASIR, J. A. et al. A Comparison of Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2 Using Amplicon-Based Sequencing, Random Hexamers, and Bait Capture. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 895, ago. 2020.

NAVECA, F. G. et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1238, jul. 2021.

NELSON, P. P. et al. Current and Future Point-of-Care Tests for Emerging and New Respiratory Viruses and Future Perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 181, 29 abr. 2020.

NEUMAN, B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 11–22, abr. 2011.

NEWMAN, A. First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals — New York, March–April 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020.

NIETO-TORRES, J. L. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004077, 1 maio 2014.

NKENGASONG, J. Let Africa into the market for COVID-19 diagnostics. **Nature**, v. 580, n. 7805, p. 565, abr. 2020.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. E63, 15 jun. 2000.

OGANDO, N. S. et al. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

OKAFUJI, T. et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1625–1631, abr. 2005.

OKBA, N. M. A. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients - Volume 26, Number 7—July 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s.d.].

ONG, S. W. X. et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1610–1612, 28 abr. 2020.

ÖRD, M.; FAUSTOVA, I.; LOOG, M. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16944, dez. 2020.

ORESHKOVA, N. et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 23, p. 2001005, 11 jun. 2020.

ÖSTERDAHL, M. F. et al. Detecting SARS-CoV-2 at point of care: preliminary data comparing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to polymerase chain reaction (PCR). **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 783, 20 out. 2020.

OUDE MUNNINK, B. B. et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. **Science**, v. 371, n. 6525, p. 172–177, 8 jan. 2021.

OWUSU, M. et al. Low risk of SARS-CoV-2 in blood transfusion. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0249069, 13 abr. 2021.

PAHUJA, S. et al. Weather Parameters and COVID-19: A Correlational Analysis. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 63, n. 1, p. 69–73, 1 jan. 2021.

PAIVA, M. H. S. et al. Multiple Introductions Followed by Ongoing Community Spread of SARS-CoV-2 at One of the Largest Metropolitan Areas of Northeast Brazil. **Viruses**, v. 12, n. 12, p. E1414, 9 dez. 2020.

PARASKEVIS, D. et al. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 79, p. 104212, 1 abr. 2020.

PARDEE, K. et al. Paper-based synthetic gene networks. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 940–954, 6 nov. 2014.

PARDEE, K. et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255–1266, 19 maio 2016.

PARIDA, M. et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 257–263, jan. 2004.

PARIDA, M. et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2895–2903, jun. 2005.

PARIDA, M. et al. Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 351–357, fev. 2007.

PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 6, p. 407–421, dez. 2008.

PARK, G.-S. et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **The Journal of Molecular Diagnostics : JMD**, v. 22, n. 6, p. 729–735, jun. 2020.

PASTORINO, B. et al. Prolonged Infectivity of SARS-CoV-2 in Fomites - Volume 26, Number 9—September 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s.d.].

PATCHSUNG, M. et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. **Nature Biomedical Engineering**, v. 4, n. 12, p. 1140–1149, dez. 2020.

PEELING, R. W. et al. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10326, p. 757–768, 2022.

PERLMAN, S. Another Decade, Another Coronavirus. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 760–762, 20 fev. 2020.

PETRILLI, C. M. et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. **BMJ**, v. 369, p. m1966, 22 maio 2020.

PHAN, T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 81, p. 104260, jul. 2020.

PICKERING, B. et al. **Highly divergent white-tailed deer SARS-CoV-2 with potential deer-to-human transmission**. bioRxiv, , 25 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.22.481551v1>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

POLACK, F. P. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 31 dez. 2020.

PORTE, L. et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 99, p. 328–333, 1 out. 2020.

PRAZUCK, T. et al. Investigation of a family outbreak of COVID-19 using systematic rapid diagnostic tests raises new questions about transmission. **Journal of Infection**, v. 81, n. 4, p. 647–679, 1 out. 2020.

PREMKUMAR, L. et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science Immunology**, v. 5, n. 48, p. eabc8413, 11 jun. 2020.

PRIYE, A. et al. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44778, 20 mar. 2017.

PUELLES, V. G. et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 590–592, 6 ago. 2020.

QIN, Z. et al. Fighting COVID-19: Integrated Micro- and Nanosystems for Viral Infection Diagnostics. **Matter**, v. 3, n. 3, p. 628–651, 2 set. 2020.

RABE, B. A.; CEPKO, C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 39, p. 24450–24458, 29 set. 2020.

RADIA, T. et al. Multi-system inflammatory syndrome in children & adolescents (MIS-C): A systematic review of clinical features and presentation. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 38, p. 51–57, 1 jun. 2021.

RAHBARI, R.; MORADI, N.; ABDI, M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 516, p. 1–7, maio 2021.

RAHIMI, A.; MIRZAZADEH, A.; TAVAKOLPOUR, S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 1221–1232, jan. 2021.

RAHMAN, M. S. et al. Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 4, p. 2177–2195, abr. 2021.

RAHMAN, S. et al. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, p. 1–21, [s.d.].

RAJH, E. et al. Robust Saliva-Based RNA Extraction-Free One-Step Nucleic Acid Amplification Test for Mass SARS-CoV-2 Monitoring. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 21, p. 6617, 31 out. 2021.

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

RANZANI, O. T. et al. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 4, p. 407–418, 1 abr. 2021.

RAVI, N. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 165, p. 112454, 1 out. 2020.

RE3DATA.ORG. GISAID. 2012.

RECALCATI, S. Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 5, p. e212–e213, 2020.

REDONDO, N. et al. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

REHMAN, S. U. et al. Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. E240, 23 mar. 2020.

RELMAN, D. A. To stop the next pandemic, we need to unravel the origins of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 47, p. 29246–29248, 24 nov. 2020.

REN, X. et al. Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells: surface expression and function as receptor for severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 6, p. 1691–1695, [s.d.].

RESENDE ET AL. **Identification of a new B.1.1.33 SARS-CoV-2 Variant of Interest (VOI) circulating in Brazil with mutation E484K and multiple deletions in the amino (N)-terminal domain of the Spike protein - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology**. Disponível em: <<https://virological.org/t/identification-of-a-new-b-1-1-33-sars-cov-2-variant-of-interest-voi-circulating-in-brazil-with-mutation-e484k-and-multiple-deletions-in-the-amino-n-terminal-domain-of-the-spike-protein/675>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

RESENDE, P. C. et al. Evolutionary Dynamics and Dissemination Pattern of the SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.33 During the Early Pandemic Phase in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 615280, 2020.

RICHARD, M. et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3496, 8 jul. 2020.

RICHARDSON, S. et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. **JAMA**, v. 323, n. 20, p. 2052–2059, 26 maio 2020.

RIDDELL, S. et al. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 145, 7 out. 2020.

ROBB, C. T. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4899–4920, nov. 2020.

ROTA, P. A. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5624, p. 1394–1399, 30 maio 2003.

ROTHER, C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 970–971, 5 mar. 2020.

SAHOO, P. R. et al. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. **Veterinary World**, v. 9, n. 5, p. 465–469, maio 2016.

SANTARPIA, J. L. et al. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12732, 29 jul. 2020.

SCHERMER, B. et al. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. **PloS One**, v. 15, n. 11, p. e0238612, 2020.

- SCHMID-BURGK, J. L. et al. **LAMP-Seq: Population-Scale COVID-19 Diagnostics Using Combinatorial Barcoding**. bioRxiv, , 8 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.06.025635v2>>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- SCHNEIDER, F. S. et al. Performances of rapid and connected salivary RT-LAMP diagnostic test for SARS-CoV-2 infection in ambulatory screening. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2843, 18 fev. 2022.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69, 27 maio 2019.
- SCORZOLINI, L. et al. Comment on the Potential Risks of Sexual and Vertical Transmission of COVID-19. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2298–2298, 19 nov. 2020.
- SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA**, v. 323, n. 22, p. 2249–2251, 9 jun. 2020.
- SHAH, M. P.; HALL, A. J. Norovirus Illnesses in Children and Adolescents. **Infectious Disease Clinics of North America**, Infections in Children. v. 32, n. 1, p. 103–118, 1 mar. 2018.
- SHAH, W. et al. Managing the long term effects of covid-19: summary of NICE, SIGN, and RCGP rapid guideline. **BMJ**, v. 372, p. n136, 22 jan. 2021.
- SHANG, J. et al. Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 1267–1278, 22 mar. 2021.
- SHARUN, K. et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, associated zoonotic concerns, and importance of the One Health approach during the ongoing COVID-19 pandemic. **The Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 50–60, 1 jan. 2021.
- SHI, J. et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 29 maio 2020.
- SIDDELL, S. G. et al. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). **Archives of Virology**, v. 164, n. 3, p. 943–946, mar. 2019.
- SILVA, S. J. R. DA et al. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4494, 14 mar. 2019.
- SILVA, S. J. R. DA et al. Viral Load in COVID-19 Patients: Implications for Prognosis and Vaccine Efficacy in the Context of Emerging SARS-CoV-2 Variants. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2022.

SILVA, S. J. R. DA; PARDEE, K.; PENA, L. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 19, jan. 2020.

SILVA, S. J. R. DA; PENA, L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. **One Health**, v. 13, p. 100287, 1 dez. 2021a.

SILVA, S. J. R. DA; PENA, L. J. A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostics tests. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 717–718, 2021b.

SINGH, D.; YI, S. V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 4, p. 537–547, 16 abr. 2021.

SIT, T. H. C. et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2. **Nature**, v. 586, n. 7831, p. 776–778, out. 2020.

SMITH, T. P. et al. Temperature and population density influence SARS-CoV-2 transmission in the absence of nonpharmaceutical interventions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 25, p. e2019284118, 22 jun. 2021.

SNODGRASS, R. et al. A portable device for nucleic acid quantification powered by sunlight, a flame or electricity. **Nature Biomedical Engineering**, v. 2, n. 9, p. 657–665, set. 2018.

SOHRABI, C. et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **International Journal of Surgery (London, England)**, v. 76, p. 71–76, abr. 2020.

SONG, H.-D. et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2430–2435, 15 fev. 2005.

SONG, X. et al. A lyophilized colorimetric RT-LAMP test kit for rapid, low-cost, at-home molecular testing of SARS-CoV-2 and other pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7043, 29 abr. 2022.

SOROKA, M.; WASOWICZ, B.; RYMASZEWSKA, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1931, 29 jul. 2021.

STADLBAUER, D. et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup. **Current Protocols in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. e100, 2020.

**Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV).** Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news/item/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))>. Acesso em: 15 jul. 2022.

- SUBALI, A. D.; WIYONO, L. Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 5, p. 281–291, [s.d.].
- SUBSOONTORN, P.; LOHITNAVY, M.; KONGKAEW, C. The diagnostic accuracy of isothermal nucleic acid point-of-care tests for human coronaviruses: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 22349, 18 dez. 2020.
- SUN, J. et al. COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 5, p. 483–495, maio 2020.
- TAKEDA, M. et al. Solution structure of the c-terminal dimerization domain of SARS coronavirus nucleocapsid protein solved by the SAIL-NMR method. **Journal of Molecular Biology**, v. 380, n. 4, p. 608–622, 18 jul. 2008.
- TAKI, K. et al. SARS-CoV-2 detection by fluorescence loop-mediated isothermal amplification with and without RNA extraction. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 2, p. 410–412, fev. 2021.
- TALI, S. H. S. et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. **Clinical Microbiology Reviews**, 12 maio 2021.
- TAMMARO, A. et al. Cutaneous manifestations in COVID-19: the experiences of Barcelona and Rome. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 34, n. 7, p. e306–e307, jul. 2020.
- TANG, Y.-W. et al. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. e00512-20, 26 maio 2020.
- TANG, Z. et al. Rapid detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 by RT-LAMP coupled solid-state nanopores. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 197, p. 113759, 1 fev. 2022.
- TAO, K. et al. SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. e0010921, 15 dez. 2021.
- TAO, Z.-Y. et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of Plasmodium vivax infection. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 115, 21 jun. 2011.
- TEGALLY, H. et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, abr. 2021.
- TEOH, B.-T. et al. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 387, 21 ago. 2013.

THAI, H. T. C. et al. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1956–1961, maio 2004.

THE LANCET. COVID-19 in Brazil: “So what?” **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10235, p. 1461, 2020.

THI, V. L. D. et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 556, 12 ago. 2020.

TINAFAR, A.; JAENES, K.; PARDEE, K. Synthetic Biology Goes Cell-Free. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, p. 64, 8 ago. 2019.

TOMITA, N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 877–882, maio 2008.

TORINIWA, H.; KOMIYA, T. Rapid Detection and Quantification of Japanese Encephalitis Virus by Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 5, p. 379–387, 2006.

**Tracking SARS-CoV-2 variants.** Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

UDUGAMA, B. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS Nano**, v. 14, n. 4, p. 3822–3835, 28 abr. 2020.

UNGARO, R. C. et al. What Should Gastroenterologists and Patients Know About COVID-19? **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 7, p. 1409–1411, 1 jun. 2020.

VAN DER HOEK, L. et al. Identification of a new human coronavirus. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 368–373, abr. 2004.

VAN DOREMALEN, N. et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 16, p. 1564–1567, 16 abr. 2020.

VENKATAGOPALAN, P. et al. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. **Virology**, v. 478, p. 75–85, abr. 2015.

VERDIÁ-BÁGUENA, C. et al. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. **Virology**, v. 432, n. 2, p. 485–494, 25 out. 2012.

VERDONI, L. et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10239, p. 1771–1778, 6 jun. 2020.

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

VOLOCH, C. M. et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, p. JVI.00119-21, 1 mar. 2021.

VOS, L. M. et al. Rapid Molecular Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review of Diagnostic Accuracy and Clinical Impact Studies. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 69, n. 7, p. 1243–1253, 13 set. 2019.

WACHARAPLUESADEE, S. et al. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 972, 9 fev. 2021.

WALENSKY, R. P.; WALKE, H. T.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 Variants of Concern in the United States—Challenges and Opportunities. **JAMA**, v. 325, n. 11, p. 1037–1038, 16 mar. 2021.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 abr. 2020.

WALSH, E. E.; SHIN, J. H.; FALSEY, A. R. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 10, p. 1634–1642, 15 nov. 2013.

WANG, B. et al. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. **Ageing (Albany NY)**, v. 12, n. 7, p. 6049–6057, 8 abr. 2020a.

WANG, C. et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 667–674, jun. 2020b.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 17 mar. 2020c.

WANG, K. et al. Imaging manifestations and diagnostic value of chest CT of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the Xiaogan area. **Clinical Radiology**, v. 75, n. 5, p. 341–347, 1 maio 2020d.

WANG, X. W. et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan hospital and the 309th Hospital of the Chinese People’s Liberation Army. **Water Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 213–221, 1 out. 2005.

WATERFIELD, T. et al. A systematic review of the diagnostic accuracy of Loop-mediated-isothermal AMPlification (LAMP) in the diagnosis of invasive meningococcal disease in children. **BMC Pediatrics**, v. 19, n. 1, p. 49, 7 fev. 2019.

WEI, W. E. Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 — Singapore, January 23–March 16, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020.

WELCH, N. L. et al. Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants. **Nature Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1083–1094, maio 2022.

WEN, F. et al. Identification of the hyper-variable genomic hotspot for the novel coronavirus SARS-CoV-2. **The Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 671–693, jun. 2020.

WHITTAKER, E. et al. Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2. **JAMA**, v. 324, n. 3, p. 259–269, 21 jul. 2020.

**WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020.** 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: 15 jul. 2022.

WIBMER, C. K. et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 622–625, abr. 2021.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 25 ago. 2020.

WINICHAKOON, P. et al. Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs Do Not Rule Out COVID-19. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. e00297-20, 23 abr. 2020.

WÖLFEL, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465–469, maio 2020.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005.

WONG, Y.-P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 626–643, 2018.

WOO, P. C. Y. et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 884–895, jan. 2005.

WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804–1820, ago. 2010.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of

alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, abr. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/10665-331501>>. Acesso em: 11 ago. 2022a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emergency use listing procedure for In Vitro diagnostics**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul/in-vitro-emergency-use-listing-procedure>>. Acesso em: 11 ago. 2022b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51**. [s.l.] World Health Organization, 11 mar. 2020c. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): Interim guidance, 28 January 2021**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-WPE-GIH-2021.1>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

WOROBAY, M. et al. The emergence of SARS-CoV-2 in Europe and North America. **Science (New York, N.Y.)**, v. 370, n. 6516, p. 564–570, 30 out. 2020.

WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, 11 mar. 2020a.

WU, Y. et al. Clinical Characteristics and Immune Injury Mechanisms in 71 Patients with COVID-19. **mSphere**, v. 5, n. 4, p. e00362-20, 15 jul. 2020b.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239–1242, 7 abr. 2020.

WYLLIE, A. L. et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 13, p. 1283–1286, 24 set. 2020.

XAVIER, J. et al. The ongoing COVID-19 epidemic in Minas Gerais, Brazil: insights from epidemiological data and SARS-CoV-2 whole genome sequencing. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1824–1834, dez. 2020.

XIAO, K. et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 286–289, jul. 2020.

- XIE, X. et al. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. **Radiology**, v. 296, n. 2, p. E41–E45, ago. 2020.
- XIE, Z. et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Bovine Rotavirus. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 133, 15 ago. 2012.
- XU, Y. Unveiling the Origin and Transmission of 2019-nCoV. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 239–240, 1 abr. 2020.
- YAN, C. et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 6, p. 773–779, jun. 2020a.
- YAN, R. et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6485, p. 1444–1448, 27 mar. 2020b.
- YANG, T. et al. Point-of-Care RNA-Based Diagnostic Device for COVID-19. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, p. 165, mar. 2020.
- YEO, C.; KAUSHAL, S.; YEO, D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal–oral transmission of SARS-CoV-2 possible? **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 335–337, 1 abr. 2020.
- YONEKAWA, T. et al. Fully Automated Molecular Diagnostic System “Simprova” for Simultaneous Testing of Multiple Items. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5409, 25 mar. 2020.
- YU, L. et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 975–977, 1 jul. 2020.
- ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 8 nov. 2012.
- ZENG, H. et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1848–1849, 12 maio 2020a.
- ZENG, L. et al. Neonatal Early-Onset Infection With SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers With COVID-19 in Wuhan, China. **JAMA Pediatrics**, v. 174, n. 7, p. 722–725, 1 jul. 2020b.
- ZHANG, C. et al. Rapid One-Pot Detection of SARS-CoV-2 Based on a Lateral Flow Assay in Clinical Samples. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 7, p. 3325–3330, 23 fev. 2021.
- ZHANG, J. et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1730–1741, 2020a.

ZHANG, R. et al. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 14857–14863, 30 jun. 2020b.

ZHANG, X.-O. et al. Complementary Sequence-Mediated Exon Circularization. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 134–147, 25 set. 2014.

ZHANG, Y. et al. **Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP**. medRxiv, , 29 fev. 2020c. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.26.20028373v1>>. Acesso em: 26 jul. 2022

ZHAO, H. et al. COVID-19: asymptomatic carrier transmission is an underestimated problem. **Epidemiology & Infection**, v. 148, ed 2020a.

ZHAO, J. et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 19 nov. 2020b.

ZHAO, Y. et al. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 5, p. 756–759, 1 set. 2020c.

ZHENG, M.; SONG, L. Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 536–538, maio 2020.

ZHOU, J. et al. Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e1870–e1877, 5 out. 2021.

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

ZHOU, P.; SHI, Z.-L. SARS-CoV-2 spillover events. **Science**, v. 371, n. 6525, p. 120–122, 8 jan. 2021.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020a.

ZHU, X. et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112437, 15 out. 2020b.

ZINZULA, L. et al. High-resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the Covid-19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 54–62, 29 jan. 2021.

ZOU, L. et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1177–1179, 19 mar. 2020.

ZÚÑIGA, S. et al. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 2169–2175, fev. 2010.

**新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列 (Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus)** . Disponível em:

<[https://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.html](https://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html)>. Acesso em: 11 ago. 2022.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – PRIMEIRA PÁGINA DA VERSÃO PUBLICADA DO ARTIGO 1 DA TESE



Environmental Microbiology (2021) 23(12), 7382–7395

doi:10.1111/1462-2920.15855

## Widespread contamination of SARS-CoV-2 on highly touched surfaces in Brazil during the second wave of the COVID-19 pandemic

Severino Jefferson Ribeiro da Silva <sup>1,\*</sup>  
 Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento <sup>1</sup>  
 Wendell Palôma Maria dos Santos Reis <sup>1</sup>  
 Caroline Targino Alves da Silva,<sup>1</sup>  
 Poliana Gomes da Silva,<sup>1</sup>  
 Renata Pessoa Germano Mendes <sup>1</sup>  
 Allyson Andrade Mendonça,<sup>1</sup>  
 Bárbara Nazly Rodrigues Santos,<sup>1</sup>  
 Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães,<sup>1,2,3</sup> Alain Kohl<sup>4</sup>  
 and Lindomar Pena <sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Virology and Experimental Therapy (LAVITE), Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, 50670-420, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Virology, Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup>University of Pernambuco (UPE), Serra Talhada Campus, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

<sup>4</sup>MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, G61 1QH, UK.

### Summary

Although SARS-CoV-2 surface contamination has been investigated in health care settings, little is known about the SARS-CoV-2 surface contamination in public urban areas, particularly in tropical countries. Here, we investigated the presence of SARS-CoV-2 on high-touch surfaces in a large city in Brazil, one of the most affected countries by the COVID-19 pandemic in the world. A total of 400 surface samples were collected in February 2021 in the City of Recife, Northeastern Brazil. A total of 97 samples (24.2%) tested positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR using the CDC-USA protocol. All the collection sites, except one (18/19, 94.7%) had at least one environmental surface sample contaminated. SARS-CoV-2 positivity was higher in public transport terminals (47/84, 55.9%),

followed by health care units (26/84, 30.9%), beach areas (4/21, 19.0%), public parks (14/105, 13.3%), supply centre (2/21, 9.5%), and public markets (4/85, 4.7%). Toilets, ATMs, handrails, playgrounds and outdoor gyms were identified as fomites with the highest rates of SARS-CoV-2 detection. Taken together, our data provide a real-world picture of SARS-CoV-2 dispersion in highly populated tropical areas and identify critical control points that need to be targeted to break SARS-CoV-2 transmission chains.

### Introduction

Coronaviruses (CoVs) are members of the *Coronaviridae* family and represent a diverse group of viruses that cause respiratory and intestinal infections in animals and humans (Fehr and Perlman, 2015). The *Orthocoronavirinae* subfamily is divided into four genera – *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, and *Deltacoronavirus*. Alphacoronaviruses (HCoV-229E and HCoV-NL63) and betacoronaviruses (HCoV-OC43 and HCoV-HKU1) are commonly associated with mild respiratory disease in humans (Cui *et al.*, 2019). However, in the last two decades, three highly pathogenic betacoronaviruses have emerged from animal sources to cause severe respiratory disease in humans: severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) (Zhong *et al.*, 2003), Middle East respiratory syndrome coronavirus (Zaki *et al.*, 2012), and more recently, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Lu *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020b).

SARS-CoV-2 first emerged in the city of Wuhan, Hubei province, China, in December 2019 causing an outbreak of a yet unknown acute pneumonia (Huang *et al.*, 2020). The new coronavirus was found to be highly transmissible among humans and has spread rapidly around the globe prompting the World Health Organization (WHO) to declare a pandemic on March 11, 2020 (Petersen *et al.*, 2020). As of September 30, 2021, there have been approximately 233.6 million confirmed cases of COVID-19 across the world, with over 4.7 million deaths (Dong

Received 4 August, 2021; accepted 18 November, 2021.  
 For correspondence: \*E-mail jeffersonbiotecviro@gmail.com.  
 \*\*E-mail lindomar.pena@fiocruz.br; Tel. (+55) 81 2123 7849.

© 2022 The Authors. *Environmental Microbiology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.  
 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## ANEXOS

### ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento e validação de métodos alternativos para a diagnóstico molecular e sorológico de vírus emergentes e re-emergentes

**Pesquisador:** Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 43877521.4.0000.5195

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PERNAMBUCO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE  
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.570.438

##### Apresentação do Projeto:

Vírus emergentes e re-emergentes têm se espalhado rapidamente pelo globo nos últimos anos, causando surtos, epidemias e até mesmo pandemias ao redor do mundo. Nesse contexto vale a pena destacar e re-emergência de vários arbovírus de grande importância para a saúde pública, bem como a emergência do novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19, que surgiu na China no final de dezembro de 2020 e rapidamente se disseminou por todos os continentes do mundo. Os arbovírus transmitidos por mosquitos, como os vírus chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), mayaro (MAYV) e Zika (ZIKV). DENV e ZIKV são membros do gênero Flavivirus dentro da família Flaviviridae, que também inclui outras espécies como o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus do Nilo Ocidental

(WNV), enquanto que CHIKV e MAYV pertencem à família Togaviridae (KRAEMER; SINKA; DUDA; MYLNE et al., 2015; MUSSO; GUBLER, 2016).

Por outro lado, o SARS-CoV-2 pertence ao gênero Betacoronavirus dentro da subfamília Coronavirinae e família Coronaviridae (LU; ZHAO; LI; NIU et al., 2020; ZHU; ZHANG; WANG; LI et al., 2020). O estabelecimento e fortalecimento dos métodos e mecanismos de diagnóstico e vigilância da infecção de arbovírus e pelo SARS-CoV-2 em pacientes é de extrema relevância para o controle dessas doenças. Atualmente, a RT-PCR e RTqPCR são utilizadas para a detecção direta do agente.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 4.570.438

Porém essas técnicas apresentam como limitação o custo, a necessidade de mão de obra altamente especializada e de equipamentos caros e sofisticados para amplificação do DNA, tais como o termociclador, o que limita de sobremaneira a capacidade de diagnóstico laboratorial em países em desenvolvimento e em laboratórios com infraestrutura básica. Essa é a realidade atual do estado de Pernambuco e do Brasil no enfrentamento do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2. Assim, o desenvolvimento de técnicas e protocolos mais simples que não requerem o uso de termocicladores e equipamentos sofisticados serão muito importantes para a melhoria e ampliação da capacidade diagnóstica do estado e do país. Neste contexto, propomos criar plataformas e métodos alternativos de baixo custo para o diagnóstico e vigilância do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2 usando métodos moleculares e sorológicos. Além disso, iremos validar essas ferramentas para o diagnóstico de arboviroses em amostras clínicas obtidas no epicentro da epidemia brasileira.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar plataformas "point-of-care" e métodos alternativos de extração para a diagnóstico de vírus emergentes e re-emergentes.

Objetivo Secundário:

Desenvolver sistemas de detecção baseado no RT-LAMP e biossensores para o diagnóstico de arboviroses e da COVID-19;

Avaliar métodos alternativos para substituir a extração do material genético das amostras biológicas;•  
Comparar a sensibilidade e especificidade dos métodos desenvolvidos com a RT-qPCR para a detecção de arbovírus e do SARS-CoV-2 em amostras de pacientes;

Determinar a acurácia dos métodos desenvolvidos para a detecção de arbovírus e do SARS-CoV-2 em amostras clínicas;

Demonstrar as diferenças de custos entre as técnicas propostas e RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV, DENV, MAYV, ZIKV e SARS-CoV-2.

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171

**Bairro:** Graças

**CEP:** 52.011-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3182-4771

**Fax:** (81)3182-4660

**E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 4.570.438

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O estudo não apresenta riscos diretos para os indivíduos envolvidos, visto que as amostras biológicas fornecidas já estarão processadas e o diagnóstico já liberado, tendo o paciente e serviço de saúde já tomado ciência desse diagnóstico. O risco de disseminação indevida de informações pessoais coletadas não existe, pois nenhum outro dado além do resultado laboratorial será fornecido para a pesquisa. Em todo processo será assegurada o anonimato dos pacientes. Por fim, vale salientar que as amostras fornecidas seriam descartadas pelo LACEN/PE, visto que não se enquadrariam mais nas normas da instituição.

**Benefícios:**

Quanto aos benefícios, os resultados deste projeto fornecerão dados de impacto direto no controle das doenças causadas por esses patógenos, permitindo o desenvolvimento plataformas de diagnóstico com grande potencial inovador, com possibilidade de obtenção de patentes, transferência e até mesmo comercialização.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de relevância, em que todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Pernambuco), em colaboração com o LACEN/PE e UPE Serra Talhada que farão as análises de custo e estatísticas do projeto. O departamento de Virologia do IAM é capaz de atender integralmente às necessidades físicas e de suporte técnico-científico para a execução deste projeto. Todas as amostras utilizadas no estudo serão fornecidas pelo LACEN/PE, que já apresentou anuência formal ao projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os estudos envolvendo amostras de pacientes seguirão estritamente as normas vigentes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e cumprirão todas as exigências da Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde (CNS).

**Recomendações:**

Lembramos que o pesquisador responsável assume o compromisso de encaminhar ao CEP da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco- HEMOPE- E-mail: cep@hemope.pe.gov.br, o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o dispositivo nas normas vigentes, Resolução nº 510/16 e 466/12. O prazo de entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

<b>Endereço:</b> Rua Joaquim Nabuco, 171	<b>CEP:</b> 52.011-000
<b>Bairro:</b> Graças	
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)3182-4771	<b>Fax:</b> (81)3182-4660
	<b>E-mail:</b> cep@hemope.pe.gov.br

**FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



Continuação do Parecer: 4.570.438

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1706052.pdf	26/02/2021 17:06:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20210224_Projeto_CEP_UPE.pdf	24/02/2021 16:39:17	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_FIOCRUZ.pdf	20/02/2021 17:58:22	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Anuencia_LACEN_assinada.pdf	20/02/2021 17:58:01	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE.pdf	20/02/2021 17:56:26	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Outros	Justificativa_de_dispenza_TCLE.pdf	20/02/2021 17:55:39	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	20/02/2021 17:54:10	Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 03 de Março de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Maria Iraci Buarque Valença**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Joaquim Nabuco, 171  
**Bairro:** Graças **CEP:** 52.011-000  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)3182-4771 **Fax:** (81)3182-4660 **E-mail:** cep@hemope.pe.gov.br