

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Ciências
ULisboa

COVID-19 na região sul de Portugal: Estudo da aplicação da metodologia NGS na caracterização de variantes genéticas de SARS-CoV-2 isoladas em cadáveres

Joana Rita Martins Rodrigues

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada por:
Prof. Doutor António Amorim

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, ao meu namorado e à minha avó por todo apoio incondicional, paciência e compreensão, pois sem eles nada disto seria possível.

Ao meu orientador, o Professor Doutor António Amorim, por tudo o que me ensinou, não só durante esta dissertação, como também em todo o percurso em que me acompanhou.

Por fim, aos meus amigos, colegas e familiares que me acompanharam e apoiaram durante esta jornada.

RESUMO

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2 espalhou-se rapidamente pelo mundo inteiro, desde a sua origem na cidade de Wuhan, na China, em dezembro de 2019, persistindo até então. A maioria dos pacientes apresenta sintomas semelhantes aos da gripe. No entanto, em determinados casos pode levar à pneumonia e insuficiência respiratória graves.

O diagnóstico pode ser realizado através de análises imunoserológicas e análises moleculares, estas últimas, pela sua sensibilidade, são mais eficazes na deteção precoce da infecção, detetando o RNA viral recorrendo a técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR). Para a sua realização é, por norma, utilizada uma amostra de exsudado nasofaríngeo colhido em zaragatoa.

As tecnologias de sequenciação genética de nova geração (NGS) tornaram-se, rapidamente, o método de escolha para várias aplicações em virologia. No caso do vírus SARS-CoV-2, estas tecnologias estão a ser desenvolvidas e aplicadas com sucesso na identificação e controlo de variantes, que resultam de constantes mutações que podem conferir ao vírus uma vantagem seletiva, tornando muito importante a sua caracterização.

Estabelecemos como objetivo principal, o estudo da aplicação do método de NGS *Oxford Nanopore* na determinação de variantes em estirpes de SARS-CoV-2 isoladas de cadáveres.

As variantes foram caracterizadas de acordo com as suas mutações para determinar as respetivas linhagens, tendo sido possível identificar vários SNVs (*single nucleotide variants*) característicos das mesmas e respetivas substituições de aminoácidos, bem como algumas deleções. Analisando a distribuição das variantes das amostras em estudo, nos semestres de 2021, em ambos os grupos, constatou-se que no primeiro semestre houve uma predominância das variantes 20A (EU1) e 20I (Alfa) que, no segundo semestre, foram substituídas, essencialmente, pela variante 21J (Delta), estando os nossos dados de acordo com a bibliografia científica disponível.

Palavras-chave:

Coronavírus, Covid-19, *Oxford Nanopore* NGS, SARS-CoV-2, Variantes

ABSTRACT

SARS-CoV-2 virus infection has spread rapidly around the world since its origin in Wuhan, China, in December 2019, persisting until then. Most patients have flu-like symptoms. However, in certain cases it can lead to pneumonia and severe respiratory failure.

The diagnosis can be made through immunoserological analyses and molecular analyses, the latter, due to their sensitivity, are more effective in early detection of the infection, detecting the viral RNA using *polymerase chain reaction* (PCR) techniques. A nasopharyngeal swab sample is usually used for its performance.

Next-generation genetic sequencing (NGS) technologies have quickly become the method of choice for various applications in virology. In the case of the SARS-CoV-2 virus, these technologies are being successfully developed and applied in the identification and control of variants, which result from constant mutations that can give the virus a selective advantage, making its characterization very important.

We established as main objective the study of the application of the NGS *Oxford Nanopore* method in the determination of variants in SARS-CoV-2 strains isolated from cadavers.

The variants were characterized according to their mutations to determine their strains, and it was possible to identify several SNVs (*single nucleotide variants*) characteristic of them and their amino acid substitutions, as well as some additions. Analyzing the distribution of the variants of the samples under study, in the semesters of 2021, in both groups, it was found that in the first semester there was a predominance of variants 20A (EU1) and 20I (Alpha) which, in the second semester, were essentially replaced by variant 21J (Delta). Our data were according to the available scientific bibliography.

Keywords:

Coronavirus, Covid-19, Oxford Nanopore NGS, SARS-CoV-2, Variants

ÍNDICE

1.	LISTA DE QUADROS	VI
2.	LISTA DE FIGURAS	VII
3.	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
4.	INTRODUÇÃO.....	1
4.1.	Caracterização	1
4.2.	Diagnóstico.....	3
4.3.	Sequenciação de Nova Geração	5
4.4.	Variantes.....	7
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
5.1.	– Inativação e extração de RNA.....	11
5.2.	- Detecção de SARS-CoV2 por RT-PCR.....	12
5.3.	- Sequenciação.....	12
5.3.1.	Síntese de cDNA	12
5.3.2.	Amplificação de cDNA	12
5.3.3.	Limpeza dos amplicões de cDNA	13
5.3.4.	NEBNext <i>End Prep</i>	13
5.3.5.	Ligação dos <i>barcodes</i>	14
5.3.6.	Limpeza do DNA marcado.....	14
5.3.7.	Ligação de adaptadores	14
5.3.8.	Limpeza dos adaptadores ligados ao DNA	14
5.3.9.	Sequenciação no MinION	15
5.3.10.	Tratamento dos dados.....	16
5.4.	– Comparação dos resultados com método de referência.....	16
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6.1.	Grupo de indivíduos cadáver.....	20
6.1.1.	Amostras LX 83, LX 384, BRR 228 e TV 53	20
6.1.2.	Amostras LX 84, LX 270, LX 273, LX 320 e LX 869	20
6.1.3.	Amostras LX 126, LX 197, LX 380, LX 461, LX 821, LX 1082 e CC 148.....	21
6.1.4.	Amostras LX 142, LX 145 e LX 271	21
6.1.5.	Amostras LX 147, LX 1035, LX 1119, LX 1155, LX 1229 e CC 213	21
6.1.6.	Amostras LX 181, LX 1053 e TV 37	21
6.1.7.	Amostra LX 200.....	22
6.1.8.	Amostra LX 508.....	22

6.1.9. Amostra LX 918.....	22
6.1.10. Amostras LX 958, LX 1170 e CC 260.....	22
6.1.11. Amostra LX 1039.....	22
6.1.12. Amostra LX 1062.....	23
6.1.13. Amostras LX 1144, CC 180 e CC 212.....	23
6.1.14. Amostra BRR 411.....	23
6.2. Grupo de indivíduos vivos.....	23
6.2.1. Amostras CF1824, CV10172, LGM179, LX2992 e LX3313.....	23
6.2.2. Amostras CF1830, CV8039, CV9575, CV10191, CV10192, LX2993 e LX3155.....	24
6.2.3. Amostra CF2025.....	24
6.2.4. Amostras CV3965, CV4997, CV6546, CV6561, CV6864, CV6900, LX196 e LX3147 ...	24
6.2.5. Amostras CV3969, CV3971 e CV8074.....	24
6.2.6. Amostras CV6595 e CV6825.....	25
6.2.7. Amostra CV6609.....	25
6.2.8. Amostras CV9704 e CF2018.....	25
6.2.9. Amostra CV10200.....	25
6.2.10. Amostras CV10205 e LX3028.....	26
6.2.11. Amostra LX206.....	26
6.2.12. Amostra LX3009.....	26
6.2.13. Amostra LX3010.....	26
6.2.14. Amostra LX3162.....	26
6.3. Geral.....	27
7. CONCLUSÃO.....	28
8. REFERÊNCIAS.....	31
9. ANEXOS.....	39

1. LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 – Programa de temperaturas do termociclador CFX96TM Real Time System.	13
Quadro 5.2 – Parâmetros a selecionar no software MinKNOW.	15
Quadro 6.1 - Informação relativa aos indivíduos cadáver incluídos no estudo, juntamente com os Cts obtidos no RT-PCR, os clades/variantes e linhagens determinadas na sequenciação NGS-MinION, e os resultados obtidos com o método de referência NGS-Sanger Based.	18
Quadro 6.2 - Informação relativa aos indivíduos vivos incluídos no estudo, juntamente com os Cts obtidos no RT-PCR, os clades/variantes e linhagens determinadas na sequenciação NGS-MinION, e os resultados obtidos com o método de referência NGS-Sanger Based.	19
Quadro 9.1 – Mutações nos nucleótidos características da variante Alfa (linhagem B.1.1.7) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos cadáveres.	39
Quadro 9.2 – Mutações nos nucleótidos características da variante Delta (linhagem B.1.617.2) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos cadáveres.	39
Quadro 9.3 – Mutações nos nucleótidos características da variante Alfa (linhagem B.1.1.7) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos vivos.	40
Quadro 9.4 – Mutações nos nucleótidos características da variante Delta (linhagem B.1.617.2) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos vivos.	40
Quadro 9.5 – Representação do número total de deleções, inserções e substituições de nucleótidos e do número de deleções, inserções e substituições dos respectivos aminoácidos, bem como as deleções que ocorreram em todo o genoma, no grupo de indivíduos cadáver.	41
Quadro 9.6 – Representação do número total de deleções, inserções e substituições de nucleótidos e do número de deleções, inserções e substituições dos respectivos aminoácidos, bem como as deleções que ocorreram em todo o genoma, no grupo de indivíduos vivos.	43

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Organização genómica do vírus SARS-CoV-2.....	2
Figura 4.2 – Diagrama da estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	2
Figura 4.3 – Períodos de diagnóstico para detetar a infeção por SARS-CoV-2 e a resposta imunitária que indica exposição prévia ao vírus SARS-CoV-2.....	3
Figura 4.4 – Dispositivo de sequenciação MinION	6
Figura 4.5 – Relações filogenéticas dos clades do vírus SARS-CoV-2, conforme definido pelo Nextstrain.	8
Figura 5.1 – Definições a seleccionar no software MinKNOW	15
Figura 6.1 - Exemplo de uma amplificação por RT-PCR de uma amostra positiva	17
Figura 6.2 - Exemplo de uma amplificação por RT-PCR de uma amostra negativa	17
Figura 6.3 - Distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos cadáver (2021).	28
Figura 6.4 - Distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos vivos (2021).	28

3. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABI/SOLiD - Applied Biosystems/Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection

ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2

ASIC - Application-specific integrated circuit

BRR - Barreiro

CC - Cascais

cDNA- Complementary desoxiribonucleic acid

COVID-19 - Doença do coronavírus 2019

Ct - Cycle threshold

DNA - Desoxiribonucleic acid

E - Envelope

EB - Elution Buffer

FLB - Flush Buffer

FLT - Flush Tether

GISAID - Global Initiative on Sharing All Influenza Data

HCoV-229E - Human Coronavirus 229E

HCoV-HKU1 - Human Coronavirus HKU1

HCoV-NL63 - Human Coronavirus NL63

HCoV-OC43 - Human Coronavirus OC43

IgG - Imunoglobulinas G

IgM - Imunoglobulinas M

INMLCF-DS - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses – Delegação Sul

LB - Loading beads

LX - Lisboa

M - Membrana

MERS-CoV - Middle East respiratory Syndrome Coronavirus

N - Nucleocápside

NGS- New Generation Sequencing

NPS - Non-structural proteins

NTD - N-terminal domain

OMS - Organização Mundial de Saúde

ONT - *Oxford Nanopore Technologies*

ORFs - *Open-reading frames*

PANGO - *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak*

PANGOLIN - *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages*

PCR - *Polymerase chain reaction*

RBD - *Receptor-binding domain*

RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase*

RNA - Ribonucleic acid

RT-PCR - *Reverse transcription-polymerase chain reaction*

S – *Spike*

SARS-CoV - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

SARS-CoV-2 - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SDRA - Síndrome de dificuldade respiratória aguda

SFB - *Short Fragment Buffer*

SMRT – *Single-molecule real-time sequencing*

SNS - Sistema Nacional de Saúde

SNVs - *Single nucleotide variants*

SQB - *Sequencing Buffer*

TV - Torres vedras

USB - *Universal Serial Bus*

UV - Ultravioleta

VOCs - *Variants of Concern*

VOIs - *Variants of Interest*

4. INTRODUÇÃO

4.1. Caracterização

Os **coronavírus** são um grupo diversificado de vírus que pertencem à **subfamília** *Coronavirinae* da **família** *Coronaviridae*, da **ordem** *Nidovirales*, que infetam humanos e outros animais, incluindo morcegos, camelos, porcos, gatos e ratos, podendo causar doenças do trato respiratório superior, doenças gastrointestinais, bem como doenças neurológicas (1–4). Dividem-se em quatro grupos: **alphaCoV** (α), **betaCoV** (β), **deltaCoV** (γ) e **gamaCoV** (δ). Enquanto os vírus α - e β - **infetam mamíferos**, os vírus γ - e δ - tendem a **infetar aves** (5,6). Em 2002 e 2012, respetivamente, dois coronavírus altamente patogénicos, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) e *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), que se pensava que causavam principalmente infeções enzoóticas em aves e mamíferos, **surgiram em humanos** e causaram **doenças respiratórias fatais** (1,6,7). Até hoje, foram identificados sete coronavírus humanos que causam problemas respiratórios, o HCoV-229E (*Human Coronavirus 229E*), o HCoV-OC43 (*Human Coronavirus OC43*), o HCoV-NL63 (*Human Coronavirus NL63*), o HCoV-HKU1 (*Human Coronavirus HKU1*), o SARS-CoV, o MERS-CoV e o SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (8,9).

Em **dezembro de 2019**, um novo coronavírus designado como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) emergiu num mercado de frutos do mar, na cidade de Wuhan, na China, e causou um surto de **pneumonia viral** incomum, a **doença do coronavírus 2019** (COVID-19), propagando-se por todo o mundo (1,2,10). Em março de 2020 foi declarado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma pandemia global, espalhando-se rapidamente da região inicial do surto para mais de 200 países (4,11). O SARS-CoV-2 é **mais contagioso** e **mortal** em comparação a coronavírus anteriormente conhecidos, e, portanto, tornou-se um desafio global para a saúde pública (12).

Os sintomas podem aparecer **2 a 14 dias** após a exposição, e a maioria dos pacientes com COVID-19 desenvolve **pneumonia** com sintomas como **febre, fadiga, anosmia, hipogeusia e tosse**, enquanto dores de cabeça, diarreia e vômitos são menos frequentes (2,4,6,13). Outras manifestações da COVID-19 incluem dores de garganta, falta de ar, síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA) e sepsia, porém, estas **manifestações clínicas diferem com a idade do infetado** (1,14,15). Além disso, **idosos** e pessoas com **doenças crónicas**, incluindo diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares, com COVID-19, geralmente têm **piores prognósticos**, e a maioria deles acaba por falecer de pneumonia e insuficiência respiratória grave, bem como de falência de múltiplos órgãos (2,14). No entanto, e apesar de toda esta variedade de sintomas existem muitas pessoas que podem ser **assintomáticas**.

O tempo estimado para a **incubação** é de cerca de **2 a 14 dias**, e é quando existe uma **maior probabilidade de transmissão** para outras pessoas. Essa transmissão é feita através de **gotículas respiratórias** expelidas durante a **fala, tosse e/ou espirros** de **indivíduos infetados** (3,8,14). Estas pequenas gotículas podem **transportar grandes cargas virais** e conseguem permanecer no ar por um longo período de tempo, funcionando, assim, como veículo da infeção (12). Com o **uso da máscara**, quando amplamente adotada e devidamente utilizada, a transmissão do vírus é reduzida, limitando a **dispersão das gotículas respiratórias** (3). A lavagem e a desinfeção frequente das mãos, revelou-se um hábito bastante importante a adotar, uma vez que, os coronavírus são sensíveis à exposição a solventes como o éter, etanol a 75%, desinfetantes que contenham cloro, ácido peroxiacético e clorofórmio (2). A **aplicação da radiação ultravioleta (UV)** durante 60 minutos também resulta numa completa inativação do vírus (16). Atualmente, já existem vacinas que estão a ser utilizadas para

prevenir a COVID-19, no entanto, continua a ser necessário e bastante essencial o **diagnóstico precoce** e o **isolamento das pessoas infetadas** da população saudável **para conter surtos** (4,11,17).

Após o seu aparecimento, o vírus SARS-CoV-2 foi **identificado e sequenciado** no início de janeiro de 2020, sendo a sequência do seu genoma disponibilizada num site de acesso livre, virological.org (18). Caracteriza-se como sendo um **vírus com um invólucro** (envelope) e um genoma de RNA (*ribonucleic acid*) de sentido positivo, não segmentado, com um comprimento de cerca de **30.000 nucleótidos** e um **diâmetro de 80-220 nm** (3,5,7,19). O genoma do SARS-CoV-2 foi posteriormente **partilhado em várias bases de dados online** de genomas virais, a fim de auxiliar todos os investigadores, das várias partes do mundo, no *design* de *primers* e sondas para a realização do diagnóstico laboratorial ou descoberta de uma vacina eficaz (15,20,21). Apresenta **80% de semelhança com o genoma do vírus SARS-CoV** e **50% com o do MERS-CoV**. Tal como noutros Beta-coronavírus, é complexo e altamente compactado com **2 open-reading frames (ORFs)**, ORF1a e ORF1b, que codificam para **proteínas não estruturais** (NSP - *non-structural proteins*), **quatro proteínas estruturais**, incluindo a **glicoproteína de superfície spike (S)**, a **proteína do envelope (E)**, a da **membrana (M)**, e a da **nucleocápside (N)**, bem como **reguladores virais, fatores de transcrição** e outras **ORFs** (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9a, ORF9b e ORF10). Na [figura 4.1](#) podemos observar a organização genómica do SARS-CoV-2, com as **duas ORFs** (ORF1a e ORF1b) e as **proteínas de superfície spike (S)**, do **envelope (E)**, da **membrana (M)** e da **nucleocápside (N)**, e as suas respetivas posições no genoma (3,10,22,23).

Podemos visualizar na [figura 4.2](#) que a **membrana** e o **envelope** formam uma esfera protetora do genoma de RNA, que é posteriormente envolvido pela **proteína da nucleocápside** (24). A **glicoproteína de superfície spike** desempenha um papel essencial na **ligação aos recetores na célula hospedeira** (o recetor humano é designado ACE2 – do inglês *Angiotensin-converting enzyme 2*) e é responsável por **facilitar a entrada do SARS-CoV-2 na célula alvo**. São formadas saliências que se ligam a esses recetores para infeção, dando ao vírus uma forma semelhante a uma coroa, de onde provém o nome **coronavírus** (2,24,25). Os **recetores ACE2** são geralmente encontrados, não só em células epiteliais pulmonares, mas também nas pequenas células dos enterócitos intestinais, células cardíacas e células endoteliais dos rins (5).

O SARS-CoV-2 apresenta, ainda, uma **alta suscetibilidade para mutações** (15).

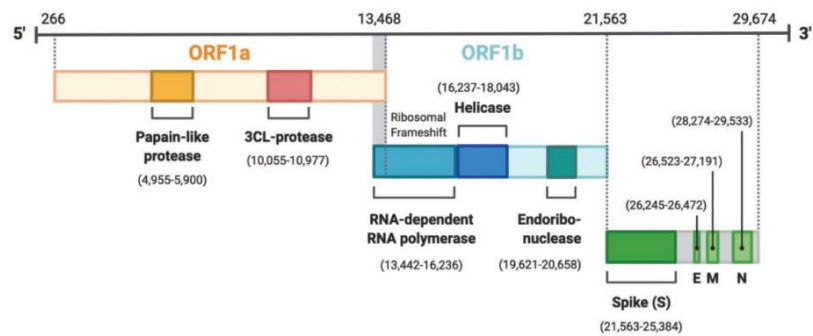


Figura 4.1 – Organização genómica do vírus SARS-CoV-2. (Adaptado de Jogalekar MP, Veerabathini A, Gangadaran P. Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions. *Experimental Biology and Medicine*).

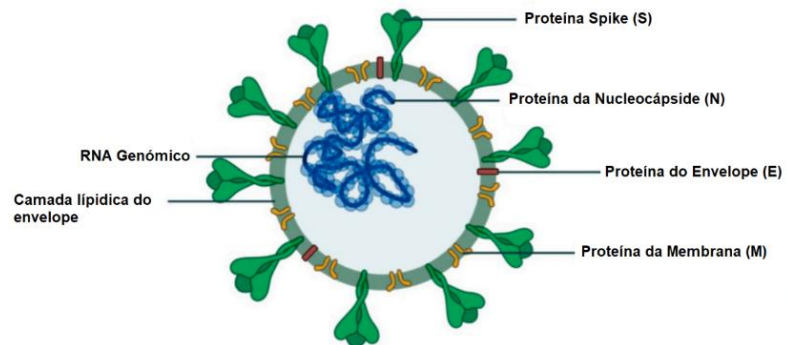


Figura 4.2 – Diagrama da estrutura do vírus SARS-CoV-2. Estão representadas várias proteínas estruturais tais como a glicoproteína da superfície spike (S), a proteína do envelope (E), a proteína da membrana (M) e a proteína da nucleocápside (N) que envolve o núcleo genético de RNA. (Adaptado de Bakhshandeh B, Sorboni SG, Javanmard AR, Mottaghi SS, Mehrabi M reza, Sorouri F, et al. Variants in ACE2; potential influences on virus infection and COVID-19 severity. *Infection*).

4.2. Diagnóstico

O **diagnóstico** é um aspeto de especial relevância, uma vez que se trata de uma doença de elevada contágiosidade e, em certos casos, mortal. A maioria dos procedimentos de diagnóstico em utilização, atualmente, enquadram-se em duas categorias principais: os **testes ou análises imunoserológicas**, que detetam os anticorpos produzidos pelos indivíduos como resultado da exposição ao vírus (imunoglobulinas M – IgM e imunoglobulinas G - IgG); e os **testes ou análises moleculares**, que detetam o RNA viral utilizando técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR) e/ou estratégias relacionadas com a hibridação de ácidos nucleicos (2,20,26,27). Estes últimos são utilizados para **identificar os portadores de SARS-CoV-2**, sintomáticos ou assintomáticos, enquanto, que os testes **serológicos e imunológicos** identificam indivíduos com uma resposta imune ativa ao mesmo. Permitem, ainda, monitorizar o estado imunológico destes indivíduos ao longo do tempo (17,27,28). Estes testes utilizam principalmente **soro** ou **plasma** para deteção de **anticorpos específicos IgM**, que são geralmente produzidos primeiro e após a infeção inicial, ou **IgG**, que predominam passadas algumas semanas de infeção (29).

O **tempo de deteção do RNA viral, antígeno, e dos anticorpos** depende de vários parâmetros, tais como as características virais, a variabilidade individual do paciente e o teste aplicado, pelo que, é vital seleccionar o teste de diagnóstico mais adequado dentro do tempo indicado para um diagnóstico preciso. Tal como podemos observar na **figura 4.3**, foi demonstrado um elevado

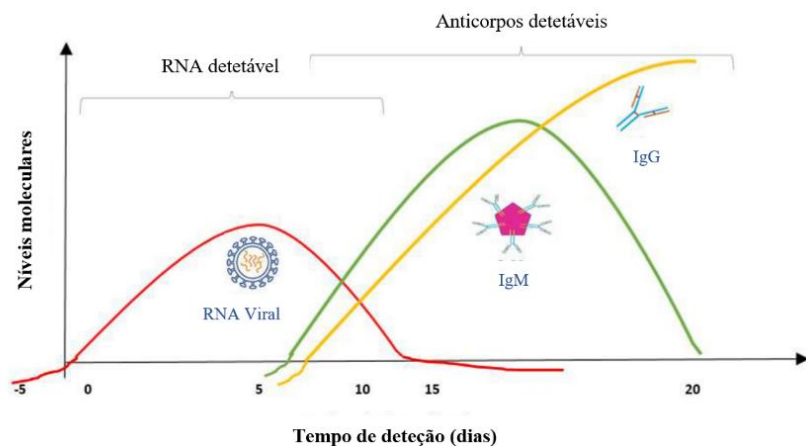


Figura 4.3 – Períodos de diagnóstico para detetar a infeção por SARS-CoV-2 e a resposta imunitária que indica exposição prévia ao vírus SARS-CoV-2. Está representada uma elevada carga viral entre 5-6 dias após a infeção e um alto nível de anticorpos entre 15-20 dias após a infeção (adaptada de Alpdagtas S, Ilhan E, Uysal E, Sengor M, Ustundag CB, Gunduz O. Evaluation of current diagnostic methods for COVID-19).

nível de carga viral em pacientes positivos para COVID-19, **entre 5 a 6 dias após a infeção**, sendo, esse período o mais favorável para a utilização de testes moleculares (5,20). Estes são especialmente valiosos na **fase inicial da infeção** quando a **carga viral é mais baixa**, pois fornece informações mais assertivas, detetando o agente patogénico diretamente através do seu RNA, ao contrário da serologia, que deteta os anticorpos que, após a exposição ao vírus, demoram vários dias a ser produzidos (30,31).

O RNA de SARS-CoV-2 pode ser detetado em fluido de lavagem bronco alveolar, expetoração, saliva, aspirados brônquicos, soro, sangue e **amostras de exsudado nasofaríngeo colhido em zaragatoa**. Estas últimas estão associadas a **resultados mais precisos** do que outros tipos de amostras, pois a **carga viral é significativamente maior** (2,10,15). Para obter uma amostra de **exsudado nasofaríngeo** adequada, a zaragatoa deve entrar profundamente na cavidade nasal causando lágrimas ao paciente (20).

No **diagnóstico molecular**, os métodos de PCR baseiam-se na amplificação dos genes e dos seus transcritos de RNA, isolados em amostras biológicas (32). O **RT-PCR** (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*) é o **método padrão** para o diagnóstico molecular do SARS-CoV-2, sendo bastante sensível, específico e permitindo uma **deteção viral precoce** (19,24,33). O RT-PCR baseia-se na **deteção do ácido nucleico viral e na amplificação do material genómico**, mesmo quando as amostras biológicas colhidas apresentam uma baixa quantidade de RNA viral, e pode, ainda, ser conduzido em **estratégias de single-step** ou **double-step** (13,24). No **procedimento de single-step**, que

é o método considerado para a detecção do SARS-CoV-2 devido à **rapidez** e à **redução da possibilidade de contaminação** e de **erros técnicos de pipetagem**, é utilizado um único tubo para toda a reação RT-PCR (10,13).

Numa primeira fase, o RNA é **transcrito reversamente para DNA complementar** (cDNA - *complementary desoxiribonucleic acid*) pela ação da enzima transcriptase reversa. **Regiões específicas** desse cDNA são amplificadas usando *primers* de DNA (*desoxiribonucleic acid*) de pequena sequência, desenhados para reconhecer especificamente **sequências complementares do genoma viral do RNA**. Em seguida, uma segunda enzima chamada **Taq DNA polimerase**, estende a cadeia para produzir uma cópia de DNA em cadeia dupla da região alvo do RNA viral (13,14,27). Este processo ocorre num **termociclador PCR** que é programado com as temperaturas adequadas à reação, sendo, posteriormente, carregado com uma placa de 96 poços, com o **RNA extraído** e uma **mastermix** previamente preparada e com todos os componentes necessários à reação (20). No **RT-PCR em tempo real**, a amplificação do DNA pode ser monitorizada à medida que a reação progride. São precisos cerca de 30 a 45 ciclos de PCR para produzir a quantidade necessária de cópias para identificar o vírus (8,13,27,32). Os **controles positivos** e **negativos** devem ser incluídos sempre que se executa qualquer reação RT-PCR, o que torna a interpretação dos resultados mais fácil e rigorosa (15,20). O resultado é considerado positivo se o **valor de Cycle threshold (Ct) para os genes detetados for inferior a 40** e, normalmente, quanto menores forem os valores de Ct, maior será a carga viral presente na amostra (8).

Apesar dos bons resultados dos ensaios validados de amplificação do ácido nucleico, ainda existe um risco de **resultados falsos negativos**. Tal pode ocorrer devido a um possível **mismatch entre o primer e o RNA viral** causado pela variabilidade genética. Pode também acontecer devido à **degradação da amostra**, ao **tempo e qualidade da colheita**, bem como à **baixa eficiência de alguns kits de ensaio**, e à presença de **inibidores de amplificação** (6,8,10,34). Os resultados falsos negativos podem comprometer o diagnóstico atempado, o tratamento precoce e a prevenção da transmissão. No entanto, também podem ser observados **resultados falsos positivos**, mesmo que menos frequentes, devido à **contaminação cruzada** das amostras durante a colheita, pipetagem ou processamento, a **contaminações** dos conjuntos comerciais de *primers* e sondas, ou à **má especificidade do kit utilizado** (8,34). Este resultado pode causar graves consequências para o paciente, podendo ser submetido a tratamentos desnecessários ou ser hospitalizado com outros pacientes, verdadeiramente positivos, e contraindo nesse momento a infeção (17)

Diferentes genes do SARS-CoV-2 foram propostos como alvo para fins de diagnóstico como o **gene RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)** da sequência ORF1ab, o **gene E**, o **gene N**, e o **gene S**, sendo que cada um deles apresenta uma **sensibilidade de deteção diferente** (2,10). A sensibilidade e a especificidade variam de acordo com o fabricante, o protocolo e o conjunto de *primer*/sonda utilizados (6). Por exemplo, o **gene S tem mutações mais frequentes** devido à alta pressão de seleção, pelo que a utilização única deste gene não é recomendada, porém pode ser usado em conjunto com outros genes com sequências conservadas, tais como o gene RdRp, o gene N ou o gene E, uma vez que devem ser amplificados pelo menos **dois genes virais alvo** para uma deteção robusta (32,35). Normalmente, é ainda amplificado o **gene da RNase P humana**, que funciona como controlo para avaliar a qualidade da amostra colhida e demonstrar que a extração do ácido nucleico foi bem-sucedida (11).

A humanidade viveu tempos catastróficos com milhões de infetados em todo o mundo, levando a milhares de mortes todos os dias devido a esta **pandemia global**. Tornou-se, assim, essencial estudar todos os métodos **possíveis e mais eficazes para detetar a presença de SARS-CoV-2** no corpo humano. O RT-PCR é utilizado para o diagnóstico de confirmação de doentes **sintomáticos**, bem como para o rastreio de **contactos assintomáticos**, uma vez que a carga viral em amostras respiratórias de doentes assintomáticos parece ser semelhante à dos doentes sintomáticos (36,37). Como já vimos, a

taxa de transmissão deste vírus é extremamente elevada e os doentes infetados podem apresentar sintomas não específicos ou ser assintomáticos, o que acelera a propagação da doença (37). A taxa de propagação do vírus é geralmente avaliada com base no **parâmetro R_0** (número básico de reprodução) que está relacionado com a transmissibilidade viral, e é definido como o número médio de pessoas infetadas devido ao contacto com uma pessoa doente numa população inteiramente exposta (8,38). Quando o valor **R_0 ultrapassa 1**, significa que os **casos de infetados aumentaram exponencialmente** levando a uma **epidemia**. Uma estimativa inicial feita pela OMS a 23 de janeiro de 2020 mostrou **valores R_0 de 1,4 - 2,5** para o SARS-CoV-2, no entanto, na fase inicial do surto os intervalos obtidos chegaram a valores entre **3,3 - 5,5** (8).

4.3. Sequenciação de Nova Geração

A **sequenciação de ácidos nucleicos** é um método usado para determinar a **ordem exata dos nucleótidos** presentes numa determinada molécula de DNA ou RNA, e apresenta uma ampla gama de aplicações, como a clonagem molecular, a descoberta de genes patogénicos e estudos comparativos e evolutivos (39,40). Nos últimos trinta anos, as tecnologias e aplicações da **sequenciação de DNA** passaram por um enorme desenvolvimento e, com a introdução de **tecnologias de nova geração** (NGS- *New Generation Sequencing*), que são capazes de gerar milhões de leituras de uma sequência num período de tempo relativamente curto, a pesquisa genómica encontra-se a avançar mais rápido do que nunca (40,41). Uma das vantagens mais relevantes das abordagens baseadas em NGS é a **reconstrução de genomas virais de comprimento inteiro** mesmo para vírus desconhecidos ou pouco caracterizados, diretamente a partir de amostras clínicas (29,42).

As tecnologias de NGS como Roche/454, *Ion Torrent*, *Illumina/Solexa*, *ABI/SOLiD* (*Applied Biosystems/Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*), *Pacific biosciences SMRT* (*Single-molecule real-time sequencing*) e *Oxford Nanopore* tornaram-se rapidamente o método de escolha para **várias aplicações em virologia**, incluindo a **identificação de novos vírus** a partir de amostras metagenómicas, a **reconstrução de sequências completas ou quase completas do genoma viral** e a **análise da evolução viral** (42). Os dados obtidos por sequenciação são informações vitais para os profissionais envolvidos na luta contra doenças infecciosas, uma vez que auxiliam o **desenvolvimento de vacinas** e de **antivirais**, a **análise filogenética**, o **rastreio de propagação viral**, a **monitorização da evolução do agente patogénico**, o **desenvolvimento de outros testes de diagnóstico** e, ainda, a **identificação de quaisquer hospedeiros zoonóticos** primários e intermediários (29). Neste sentido, os métodos baseados em NGS têm sido, assim, uma boa alternativa para a deteção do SARS-CoV-2, pois permitem obter informações sobre a **natureza do vírus**, a sua **composição genética** e os seus **padrões de evolução** (43). A monitorização dos **padrões evolutivos**, com mutações altamente frequentes, do SARS-CoV-2 e da **dinâmica de propagação** através da sequenciação do genoma é essencial para **controlar e prevenir a COVID-19** (43,44).

A **tecnologia de sequenciação Oxford Nanopore** baseia-se na utilização de um **sequenciador MinION**, que é um dispositivo portátil, com cerca de 90g e que no seu interior contém uma *flow cell* com mais de 2048 nanoporos, que podem ser controlados em grupos de 512 através de um circuito integrado específico de aplicação (ASIC – *Application-specific integrated circuit*), tal como pode ser observado na **figura 4.4** (45,46). Pode ligar-se diretamente a uma porta USB 3.0 (*Universal Serial Bus 3.0*) padrão num computador com baixo requisito de hardware e configuração simples, utilizando os *Windows* mais recentes (47). Utiliza ainda um software especializado denominado **MinKNOW** que funciona no computador ao qual o MinION se encontra ligado e que permite executar várias tarefas fundamentais, como, por exemplo, a **aquisição de dados**, a **análise em tempo real**, o **streaming de dados** ao mesmo tempo que permite o controlo do dispositivo, e a **identificação das amostras** (46).

A **sequenciação em nanoporos** permite discriminar os nucleótidos individuais medindo a mudança na **condutividade elétrica** através de um sensor, à medida que as moléculas de DNA passam pelo poro, enquanto uma **corrente iônica** é aplicada continuamente (43,47).

Contrariamente à sequenciação de *Sanger*, os fragmentos a sequenciar podem ter comprimentos muito superiores, e são obtidos utilizando métodos de **extração e limpeza padrão**,

sendo que, antes da sequenciação, é necessário a **preparação da biblioteca genómica** (46). O atual processo de construção da biblioteca consiste numa série de etapas que passa pela **ligação de adaptadores** a ambas as extremidades dos fragmentos de DNA genómico ou de cDNA e termina na **purificação** pela utilização de *beads* magnéticas (45,47). Os **adaptadores** facilitam a **captura da cadeia** pelo poro e o carregamento de uma enzima na extremidade 5', que é necessária para assegurar a deslocação unidirecional de um único nucleótido ao longo da cadeia (45). O MinION pode gerar **três tipos diferentes de leituras** para cada fragmento de DNA que passa por um poro: uma leitura da **cadeia modelo**, uma leitura da **cadeia complementar** e uma leitura das **duas direções**. Inicialmente, a cadeia *forward* é sequenciada gerando a leitura da **cadeia modelo**, depois é lido o adaptador *hairpin*, seguido da cadeia reversa e gerando a leitura da **cadeia complementar**. Finalmente, o software *Base Calling* da ONT (*Oxford Nanopore Technologies*) tenta encontrar uma **sequência consensual** das leituras da cadeia modelo e da cadeia complementar, sendo esta resultante referida como uma **leitura de duas direções (2D)** (47,48). Após a sequenciação, uma análise *pipeline*, separa as leituras sequenciadas em dois grupos: o grupo *pass* e o grupo *failed*, sendo as leituras em ambos os grupos, categorizadas como leituras de alta e baixa qualidade, respetivamente. O grupo *pass* contém leituras 2D de alta qualidade com as sequências de leitura da cadeia modelo e da cadeia complementar (48).

Para além das tarefas, anteriormente mencionadas, o **programa MinKNOW** também é utilizado para a produção de **ficheiros FAST5**. Isto é, cada leitura é produzida por um dos 512 canais do MinION, e os metadados associados a cada uma delas são armazenados num único ficheiro FAST5 (49,50). A análise NGS gera **milhões de leituras** e é fortemente dependente de **ferramentas bioinformáticas** para o tratamento desses dados. O fluxo de trabalho da análise de dados obtidos por NGS consiste em várias etapas essenciais, incluindo o controlo de qualidade dos dados, o *assembly* das leituras, a classificação taxonómica e a verificação do genoma do vírus. Existem várias bases de dados relacionadas com o vírus SARS-CoV-2 que desempenham papéis importantes no arquivo de sequências, pesquisa de homologia, identificação de variações e análise genómica. A **identificação de variações**, ou *variant calling*, consiste na identificação de regiões onde a amostra e a sequência de referência divergem. O exemplo mais básico é a identificação de **single nucleotide variant (SNV)**, que consiste na variação de um nucleótido relativamente à sequência de referência. Outras variações incluem pequenas **inserções e deleções (INDELs)**, ou alterações estruturais maiores, tais como **inversões** ou **translocações**. A **plataforma de análise Nextstrain** analisa os dados mais recentes do vírus SARS-CoV-2 e visualiza a propagação e evolução de todas as estirpes disponíveis em tempo real, tendo desenvolvido um sistema de nomenclatura que iremos abordar mais adiante (51,52). O software **PANGOLIN** (*Phylogenetic*

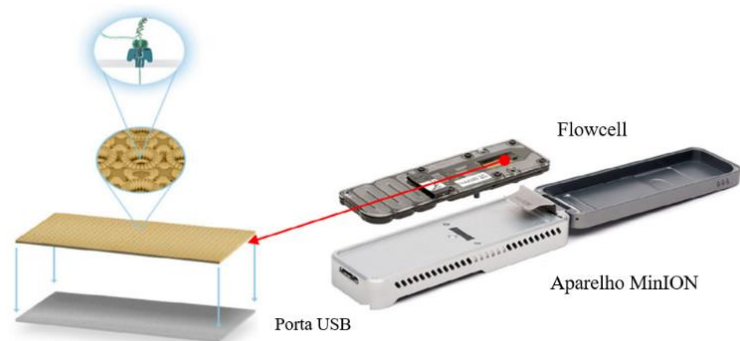


Figura 4.4 – Dispositivo de sequenciação MinION. A sequenciação é realizada adicionando a amostra à *flow cell*. Quando as moléculas de DNA passam pelo nanoporo, dá-se uma mudança na magnitude da corrente que é medida por um sensor. Os dados são posteriormente transmitidos para o circuito integrado específico de aplicação (ASIC) e para o MinKNOW, o software que gera os dados do nível de sinal. (Adaptado de Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics, Proteomics & Bioinformatics).

Assignment of Named Global Outbreak LINEages) foi também desenvolvido com o objetivo de implementar uma nomenclatura dinâmica das linhagens SARS-CoV-2 conhecida por **nomenclatura PANGO** permitindo atribuir a sequências genômicas de SARS-CoV-2 as **linhagens mais prováveis** quando **comparadas com sequências SARS-CoV-2 de referência**. Em alguns casos, as linhagens específicas de interesse são igualmente atribuídas com base num conjunto de regras que verificam explicitamente a **presença de determinados SNVs**. Por exemplo, no caso da variante **B.1.1.7 (Alfa)** têm de ser detetadas **5 das 17 mutações características** da mesma, sendo o mesmo critério aplicado no caso da variante **B.1.617.2 (Delta)**, ou seja, é necessário no mínimo 5 mutações características (53,54)

Esta tecnologia permite obter comprimentos de leitura de dezenas de quilobases, com, teoricamente, nenhuma limitação. O **MinION** usa nanoporos para sequenciar uma **única molécula de DNA por poro**, tendo vantagens potencialmente significativas sobre as tecnologias de sequenciação amplamente utilizadas (*Ion Torrent, Illumina*), que dependem de *clusters* de moléculas de DNA amplificadas (47). Assim, devido ao seu **reduzido tamanho** e **baixo custo**, quando comparado com outras tecnologias de sequenciação, o MinION apresenta um considerável interesse para a comunidade científica, particularmente no que toca a vigilância de patógenos e aplicações em diagnóstico clínico (46).

Um **estudo de validação analítica da sequenciação por nanopore**, por comparação com sequenciação por *Illumina*, defende que, apesar da elevada taxa de erro, observada nas *reads* sequenciadas por ONT, foi possível determinar uma sequência altamente assertiva (*consensus-level*). Os SNVs foram detetados a uma sensibilidade >99% e precisão >99% assegurando a **eficiência da análise do genoma do vírus SARS-CoV-2** (55).

4.4. Variantes

É também importante referir as **novas variantes SARS-CoV-2** que foram sendo identificadas através da sequenciação e reportadas globalmente durante a pandemia. Estas variantes são **mais eficazes no que diz respeito à propagação** devido às constantes **mutações** que vão conferindo ao vírus uma **vantagem seletiva** (56). Uma **mutação** é uma **mudança na sequência genética**, e uma **variante** é um genoma viral distinto que contém **uma ou mais mutações** em relação a outros genomas virais (57,58). As mutações do vírus SARS-CoV-2 são causadas por erros, como **substituição, inserção** ou **eliminação de uma base azotada**, durante a replicação do genoma e ocorrem maioritariamente no **gene da proteína spike**. Estas mutações causam alterações nas características virais, na patogenicidade e na transmissibilidade (59,60).

Algumas dessas **variantes genéticas** atraíram, até hoje, especial atenção desde o início da propagação da pandemia, devido ao seu **rápido aumento em algumas áreas**, à **acumulação de mutações anormalmente alta** em todo o genoma, ao facto de a **maioria das alterações de aminoácidos afetarem a proteína spike**, e à evidência crescente de **tentativa de “fuga” do vírus à imunidade mediada por anticorpos** (61). O aparecimento e propagação destas novas variantes levou a **OMS**, juntamente com **autoridades nacionais, instituições e investigadores**, que têm vindo a monitorizar e avaliar a evolução da SARS-CoV-2 desde o início da pandemia, a caracterizá-las em **VOIs** (*Variants of Interest*) e **VOCs** (*Variants of Concern*). Uma **VOI** é uma variante do vírus associada a um aumento dos parâmetros relacionados com a saúde pública, tais como transmissibilidade, patogenicidade, gravidade da apresentação clínica, bem como a diminuição da eficácia dos tratamentos. Por outro lado, uma **VOC** está associada a alterações mais drásticas nestes parâmetros, com uma transmissibilidade elevada da doença, maior gravidade, incluindo hospitalizações e mortes, diminuição notável da neutralização de anticorpos e da eficácia dos tratamentos, e a falha na deteção e diagnóstico (57,62,63). Até finais de

julho de 2021 já tinham sido reconhecidos pela OMS quatro VOIs (**eta** [η], **iota** [ι], **kappa** [κ], e **lambda** [λ]) e quatro VOCs (**alfa** [α], **beta** [β], **gama** [γ], e **delta** [δ]) (62).

Três sistemas de nomenclatura científica foram criados e utilizados para identificar e rastrear genótipos SARS-CoV-2, o **GISAID** (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*), o **Nextstrain** e o **Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak** (PANGO) (64).

O sistema **GISAID** é simples e identifica grandes *clades* caracterizados por mutações mais recorrentes, em relação ao genoma de referência. O **Nextstrain** desenvolveu um sistema que utiliza a análise filogenética e filodinâmica para identificar *clades* e *subclades* estáveis. Uma vez identificados, esses *clades* são nomeados com o ano de aparecimento como prefixo, seguido por uma letra que significa a ordem em que esta foi identificada (por exemplo, **19A** refere-se à 1ª linhagem identificada a partir de 2019). Assim, podemos definir *clade* como um agrupamento monofilético numa árvore filogenética (58,60). O mais comum e utilizado é o sistema de **nomenclatura PANGO**, que se trata de um sistema dinâmico baseado não só nas relações evolutivas, mas também tendo em conta a relevância epidemiológica da linhagem. Este visa definir um **cluster filogenético epidemiologicamente relevante**, por exemplo, uma introdução numa área geográfica distinta com evidência de transmissão contínua, sendo particularmente adequados para investigações de surtos à escala nacional ou regional (58,65,66). De acordo com este sistema, cada nome de linhagem (grupo de vírus intimamente relacionados com um ancestral comum) consiste num prefixo alfabético e sufixos numéricos separados por um ponto. O prefixo alfabético denota a linhagem parental, enquanto o sufixo numérico representa a ordem em que os descendentes dessa linhagem foram identificados. Considera-se, ainda, que cada ponto significa “descendente de” e é usado quando um novo descendente da linhagem é claramente identificado (60).

Na [figura 4.5](#) podemos observar as **relações filogenéticas dos clades do vírus SARS-CoV-2**, conforme foi definido pelo sistema de nomenclatura **Nextstrain**. Os *clades* **19A** e **19B** foram as primeiras linhagens SARS-CoV-2 descobertas em humanos, mas foram substituídas globalmente pelo *clade* **20A** nos primeiros meses de 2020. Este *clade* e todos os procedentes, contêm a **substituição de aminoácidos**

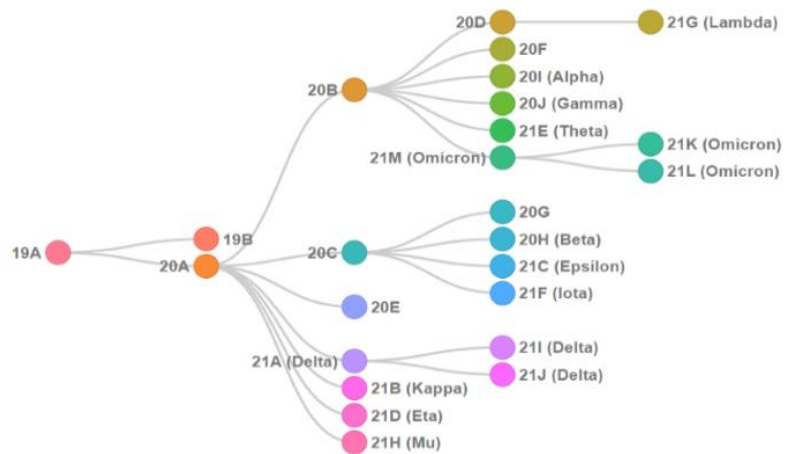


Figura 4.5 – Relações filogenéticas dos clades do vírus SARS-CoV-2, conforme definido pelo Nextstrain. (Fonte: <https://clades.nextstrain.org/>).

D614G (mutação no nucleótido A23403G), na proteína spike, para além de outras mutações específicas que vão permitir diferenciar cada um deles (59,67). Podemos, por exemplo, observar o *clade* **20E** que é caracterizado pela **substituição de aminoácidos A222V** (mutação no nucleótido C22227T) também na proteína spike e que surgiu, presumivelmente, em Espanha no Verão de 2020, espalhando-se posteriormente pelo resto da Europa (68).

O vírus SARS-CoV-2 tem sofrido uma evolução considerável desde a sua propagação inicial, incluindo o aparecimento de variantes com a **substituição de aminoácidos D614G** (mutação no nucleótido A23403G) no gene viral S, e que se tornou dominante. Esta mutação no gene da proteína spike é responsável pelo aumento da infecciosidade (69,70). Entretanto, novas variantes apareceram em vários países, com **combinações de substituições e deleções** no **receptor-binding domain (RBD)** e no **N-**

terminal domain (NTD) da proteína S, sendo as mais prevalentes e recorrentes, bem como em outras proteínas (71).

No final de setembro de 2020, surgiu no **Reino Unido** uma nova linhagem chamada **B.1.1.7.**, também designada de **VOC Alfa** ou **20I**, que inclui **dezassete mutações** ao longo de todo o genoma, sendo a maioria **substituições não-sinónimas** de importância imunológica (72,73) Esta variante apresenta substituições e deleções de aminoácidos, algumas das quais localizadas no gene da proteína *spike*, incluindo: as **deleções dos aminoácidos ΔH69/ΔV70** (deleções dos nucleótidos 21765 a 21770) e do **aminoácido ΔY144** (deleções dos nucleótidos 21992 a 21994) no NTD; uma **substituição de aminoácidos P681H** (mutação no nucleótido C23604A), e uma outra **substituição de aminoácidos N501Y** (mutação no nucleótido A23063T) no RBD (69,74–76). A **deleção dos aminoácidos ΔH69/ΔV70** pode levar a alterações conformacionais da proteína *spike* conduzindo a alterações estruturais que permitem ao vírus escapar à resposta imune do hospedeiro. A **substituição de aminoácidos P681H** ocorre no local adjacente ao de clivagem da furina, o que pode fazer com que a proteína *spike* seja mais facilmente clivada pela protease, aumentando assim a sua afinidade com o recetor ACE2 e promovendo a entrada do vírus nas células epiteliais respiratórias. A **substituição de aminoácidos N501Y** foi identificada, também, como potenciadora da afinidade do vírus para o recetor ACE2 (77). Existem outras **substituições de aminoácidos** características desta variante, como a **S982A** (mutação no nucleótido T24506G), a **D1118H** (mutação no nucleótido G24914C), a **A570D** (mutação no nucleótido C23271A) e a **T716I** (mutação no nucleótido C23709T) todas elas localizadas também no **gene da proteína spike** (78,79)

A variante Alfa possui ainda outras mutações localizadas noutras regiões do genoma e que também a caracterizam, sendo elas: as **substituições de aminoácidos T1001I** (mutação no nucleótido C3267T), **A1708D** (mutação no nucleótido C5388A) e **I2230T** (mutação no nucleótido T6954C), e as deleções dos aminoácidos **ΔS3675/ΔG3676/ΔF3677** (deleções dos nucleótidos 11288 a 11296) na **ORF1a**; as **substituições de aminoácidos Q27*** (mutação no nucleótido C27972T e que causa a introdução de um codão *stop* prematuro), **R52I** (mutação no nucleótido G28048T) e **Y73C** (mutação no nucleótido A28111G) na **ORF8**; e ainda as **substituições de aminoácidos D3L** (mutação no nucleótido A28281T) e **S235F** (mutação no nucleótido C28977T) no **gene que codifica para a proteína da nucleocápside** (60,76,80).

A **variante Beta** (20H), linhagem B.1.351, originária da **África do Sul** surgiu em dezembro de 2020 (74). Apresenta **nove mutações no gene da proteína S**, além da mutação que causa a **substituição de aminoácidos D614G**, incluindo **três substituições de aminoácidos: K417N** (mutação no nucleótido G22813T), **E484K** (mutação no nucleótido G23012A) e **N501Y** (mutação no nucleótido A23063T) no RBD e uma outra **substituição de aminoácidos A701V** (mutação no nucleótido C23664T) perto do local de clivagem da furina (69,76,77,81).

A **variante Gama** (20J), linhagem P.1 foi reportada pela primeira vez em viajantes do Brasil que chegaram ao Japão em janeiro de 2021. Contém dezassete substituições de aminoácidos, três deleções, quatro mutações sinónimas e uma inserção de 4 nucleótidos, incluindo **três mutações no RBD da proteína S: a substituição de aminoácidos K417T** (mutação no nucleótido A22812C), a **substituição de aminoácidos E484K** (mutação no nucleótido G23012A) e **substituição de aminoácidos N501Y** (mutação no nucleótido A23063T). Apresenta, também, uma **substituição de aminoácidos H655Y** (mutação no nucleótido C23525T) (76,77,81,82). De notar que, a mutação específica que consiste na **substituição de aminoácidos N501Y**, surgiu independentemente nas **três variantes** (Alfa, Beta e Gamma). Uma vez que a proteína *spike* é a chave que permite a entrada do vírus nas células do hospedeiro, esta mutação pode melhorar a capacidade desta proteína se ligar à ACE2, aumentando assim a capacidade do vírus de infetar os hospedeiros (72).

A **variante Delta** (21A), linhagem B.1.617.2, originária da **Índia** em dezembro de 2020, para além da **mutação comum com as outras variantes** (D614G), apresenta um conjunto específico de **substituições de aminoácidos**, no gene da proteína *spike*: a **substituição L452R** (mutação no nucleótido T22917G); a **substituição T478K** (mutação no nucleótido C22995A); e a **substituição P681R** (mutação no nucleótido C23604G), que a torna exponencialmente infecciosa e imune à neutralização por anticorpos em pessoas previamente infetadas ou vacinadas (83). A **substituição de aminoácidos L452R** substitui o aminoácido 452, uma leucina, por uma arginina, havendo alguns estudos que sugerem que essa substituição permite que a proteína *spike* se ligue ao recetor ACE2 com uma maior afinidade e outros que demonstraram que também evita que esta variante seja atacada por células CD8+T, que são as responsáveis pela erradicação do vírus. A **substituição de aminoácidos P681R** (mutação no nucleótido C23604G), em que a arginina substitui a prolina (aminoácido 681), uma vez que ajuda a clivar a proteína *spike* precursora, permite uma superior fusão e integração do vírus na célula hospedeira em comparação com variantes sem esta mutação. Esta variante apresenta, também no **gene da proteína spike**, outras mutações que a caracterizam, como a **substituição de aminoácidos T19R** (mutação no nucleótido C21618G) e a **substituição de aminoácidos D950N** (mutação no nucleótido G24410A) (74,84).

Para além das mutações anteriores, esta variante possui ainda outras mutações localizadas noutras locais do genoma e que também a caracterizam, a saber: a **substituição de aminoácidos S26L** (mutação no nucleótido C25469T) na **ORF3a**; a **substituição de aminoácidos I82T** (mutação no nucleótido T26767C) no **gene da proteína da membrana**; as **substituições de aminoácidos V82A** (mutação no nucleótido T27638C) e **T120I** (mutação no nucleótido C27752T) na **ORF7a**; as **deleções dos nucleótidos 28248 a 28253** que correspondem aos **aminoácidos ΔD119/ΔF120** localizados na **ORF8**; e, ainda, as **substituições de aminoácidos D63G** (mutação no nucleótido A28461G), **R203M** (mutação no nucleótido G28881T) e **D377Y** (mutação no nucleótido G29402T) no **gene da proteína da nucleocápside** (76,84,85). A **variante Delta** progrediu eficazmente, expandindo a sua ascendência em vários subgrupos, tais como AY.1, AY.2, AY.3, AY.33, AY.34 (sendo a AY.1 correspondente à B.1.617.2.1), entre muito outros, mantendo as mutações ancestrais (83). Após o seu aparecimento, esta variante começou a sobrepor se a todas as outras, substituindo-as, em vários países do mundo (86).

A 24 de novembro de 2021, foi identificada uma nova variante na **África do Sul**, a variante **Ómicron**, linhagem B.1.1.529, mais tarde classificada como VOC pela OMS. Esta variante é altamente mutada, apresentando mais de **cinquenta mutações** (trinta das quais apenas na proteína *spike*), **conservando a substituição de aminoácidos D614G**, comum às restantes variantes e apresentando 24 mutações características. A Ómicron partilha mutações que eram exclusivas da variante **Alfa** (deleções dos aminoácidos ΔH69/ΔV70 e substituição de aminoácidos P681H), e tem em comum com a variante **Gamma** a substituição de aminoácidos H655Y (mutação no nucleótido C23525T). Com a variante **Delta**, a Ómicron tem em comum as substituições de aminoácidos T95I (mutação no nucleótido C21846T), G142D (mutação no nucleótido G21987A) e T478K (mutação no nucleótido C22995A), sendo que ainda partilha a substituição N501Y com as **variantes Alfa, Beta e Gamma**. Adicionalmente, sabe-se que a Ómicron partilha também a substituição K417N com as variantes **Beta, Gamma e Delta**.

A **variante Ómicron** é a estirpe mais divergente observada até agora durante a pandemia, levantando preocupações de que esteja ligada a uma **maior transmissibilidade, menor eficiência da vacina** e um **risco acrescido de reinfeção** (63,76,81,87). A **caracterização biológica** destas **mutações** pode fornecer informações preciosas para avaliar a resistência do vírus a substâncias terapêuticas e os mecanismos relacionados com a patogénese. Além disso, os estudos das mutações virais podem ser cruciais para a conceção de novas vacinas, de novos fármacos antivirais e novos ensaios de diagnóstico (88).

Estas variantes representam uma grande preocupação para a saúde, uma vez que a sua fácil e rápida capacidade de propagação aumenta, por sua vez, o número de internamentos e mortes (56). Um dos problemas que teve origem nesta pandemia está relacionado com o facto de a maioria **dos recursos hospitalares e das urgências médicas** serem direcionados para **doentes com COVID-19**, acabando, por vezes, por se negligenciar outras doenças. Quanto **mais cedo e mais assertivo for o diagnóstico**, mais rápido podemos detetar a presença do vírus num dado paciente, evitando a sua propagação e criação de potenciais surtos que acabam por sobrecarregar o Sistema Nacional de Saúde (SNS). Para ajudar os profissionais de saúde a **prevenir a propagação do vírus** e a **gerir adequadamente os casos de COVID-19**, foram desenvolvidas várias medidas e recomendações, aconselhando sobre eventuais riscos e medidas preventivas (89).

Estabelecemos como objetivo principal, o **estudo da aplicação do método de NGS Oxford Nanopore na determinação de variantes em estirpes de SARS-CoV-2 isoladas de cadáveres**.

Objetivos específicos:

1. Caracterização das variantes detetadas em cada um dos grupos, com as mutações específicas de cada uma das linhagens obtidas;
2. Comparação dos resultados obtidos em cada um dos grupos que nos foi possível estudar, indivíduos cadáver e indivíduos vivos;
3. Análise, por semestre, das variantes detetadas em cada um dos grupos de forma a ter uma perceção temporal da evolução das mesmas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os dias são **recebidas amostras de cadáveres** para serem testadas, consistindo em zaragatoas nasofaríngeas colhidas dos mesmos e armazenadas em *ependorfs* DNA *LoBind* de 1,5mL com uma solução de NaCl a 0,9%. São essas amostras que compõem o nosso **grupo de indivíduos cadáver (40)**, com as devidas autorizações da comissão de ética, bem como da Direção do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses – Delegação Sul (INMLCF-DS). Uma vez que o *n* em estudo é relativamente reduzido, *n*=40, acrescentámos ao estudo um **grupo de 36 indivíduos vivos**, com sintomatologia respiratória, cujas amostras foram colhidas no mesmo período temporal que as amostras de cadáver, todas elas com o respetivo consentimento informado.

Os **procedimentos de inativação e extração** que se seguem foram realizados numa **câmara segurança biológica nível II**, destinada à inativação de microrganismos e extração de amostras clínicas, tendo o técnico de estar equipado com bata, luvas descartáveis, touca, máscara e viseira, as quais devem ser substituídas quando necessário.

5.1. – Inativação e extração de RNA

Para **inativação do vírus**, as amostras recebidas foram colocadas num banho seco a 56°C durante cerca de 30 minutos, uma vez que os coronavírus são sensíveis à exposição ao calor. Depois agitámos as amostras no vórtex para libertar o material genético preso nas zaragatoas.

A **extração do RNA** das amostras nasofaríngeas foi realizada utilizando o **Kit de extração EZ1 DSP Vírus (QIAGEN)** de acordo com o protocolo do fabricante, sendo obtido no final 60 µL de RNA extraído, por cada amostra.

5.2.- Detecção de SARS-CoV2 por RT-PCR

Depois de efetuada a extração, preparámos a **placa RT-PCR** numa **câmara de fluxo laminar**. Para tal, adicionámos num tubo eppendorf DNA *LoBind*, por cada uma das amostras, **12,5µL de NZYSpeedy One-step RT qPCR Probe Master Mix (2x)**, **6µL de RNase free water** e **1,5µL de uma mistura com os primers** dos genes que pretendíamos estudar. Neste caso, usámos *primers* para os genes N e E, bem como para o gene da **RNase P humana**, que é usado para demonstrar a recuperação bem-sucedida do ácido nucleico. Distribuímos **20µL em cada poço** da placa e depois, no respetivo poço, adicionámos **5µL do RNA** extraído no passo 5.1, não esquecendo o **controlo negativo da extração**, o **controlo negativo do PCR**, bem como o **controlo positivo**. Esta aplicação das amostras na placa foi realizada numa **câmara segurança biológica nível II**.

O volume total da reação foi de **25µL por amostra**. O ensaio de RT-PCR foi realizado num aparelho de **Real-Time PCR CFX96TM Real Time System**, nas seguintes condições: **reação da transcriptase reversa** a 50°C por 20 minutos; **pré-desnaturação** a 95°C por 4 minutos; e 46 ciclos de **desnaturação** a 95°C por 5 segundos e **extensão/medição do sinal de fluorescência** a 60°C por 50 segundos. Foram usados os fluorocromos FAM, CalRed 610 e HEX para a deteção do **gene N**, do **gene E** e do **gene RNase P humana**, respetivamente.

5.3. - Sequenciação

Para sequenciação, utilizamos o *NEBNext® ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit*, e seguimos o respetivo protocolo padrão com *PCR Bead Cleanup*. Este protocolo foi também realizado numa **câmara de segurança biológica nível II**.

Em primeiro lugar, foi necessário diluir 10x as amostras com CTs entre 15 e 18 em *nuclease free water* para reduzir a probabilidade de inibição da PCR.

5.3.1. Síntese de cDNA

Para a reação de **síntese do cDNA**, adicionámos, numa placa de 96 poços, **2µL de LunaScript RT SuperMix** e **8 µL da respetiva amostra de RNA** em cada poço. Para o **controlo negativo** em vez da amostra de RNA, adicionámos *nuclease free water*. Em seguida, incubámos a placa num **termociclador** com temperatura da tampa a 105°C e com os seguintes passos: **Primer Annealing** a 25°C durante 2 minutos; **Síntese de cDNA** a 55°C durante 20 minutos e **Inativação por Calor** a 95°C durante 1 minuto.

5.3.2. Amplificação de cDNA

Para este passo foi necessário preparar **duas pools**:

- ❁ Para a **pool A** preparámos, para cada amostra, uma *mix* com **6,25 µL de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix** e **1,75 µL de NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 1** (preparado anteriormente adicionando **2,8 µL do NEBNext ARTIC Human Control Primer Mix 1** a **168 µL de NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 1**). Em seguida, distribuímos **8 µL da mix** preparada numa placa de 96 poços e adicionámos **4,5 µL do cDNA sintetizado** no passo anterior, pipetando diretamente da outra placa para o respetivo poço.
- ❁ Para a **pool B** preparámos, para cada amostra, outra *mix* com **6,25 µL de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix** e **1,75 µL de NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 2** (preparado anteriormente adicionando **2,8 µL do NEBNext ARTIC Human Control Primer Mix 2** a **168 µL de NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Primer Mix 2**). Em seguida, distribuímos **8 µL da mix**

preparada numa placa de 96 poços e adicionámos **4,5 µL do cDNA sintetizado** no passo anterior, pipetando diretamente da outra placa para o respetivo poço.

As placas foram de seguida incubadas num termociclador com temperatura da tampa a 105°C e seguindo os passos do quadro 5.1.

Quadro 5.1 – Programa de temperaturas do termociclador CFX96TM Real Time System.

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Desnaturação inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturação	95°C	15 segundos	35
Annealing e extensão	63°C	5 minutos	
Hold	4°C	∞	1

5.3.3. Limpeza dos amplicões de cDNA

Para cada amostra **combinámos a pool A e a pool B** em tubos eppendorf DNA *LoBind* de 200 µL e adicionámos **20 µL de NEBNext Sample Purification Beads**, misturando muito bem. Incubámos as amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos e colocámos os tubos num **suporte magnético** apropriado para separar as *beads* do sobrenadante durante cerca de 2 minutos, removendo e descartando o sobrenadante depois disso. Tivemos de ter muito cuidado para **não perturbar e descartar as beads** que continham o DNA.

O passo seguinte foi adicionar **500 µL de etanol a 80%** a cada tubo, enquanto se encontravam no suporte magnético, incubar à temperatura ambiente durante 30 segundos e, em seguida, cuidadosamente, remover e descartar o sobrenadante. Repetimos este passo mais uma vez para perfazer um total de duas lavagens, removendo todo o líquido visível após a segunda lavagem.

Deixámos as *beads* secarem durante 30 segundos enquanto os tubos estavam no suporte magnético com a tampa aberta e com muito **cuidado para não secarem excessivamente**, pois poderia resultar numa menor recuperação de DNA. Posteriormente, removemos os tubos do suporte magnético e eluímos o DNA das *beads* adicionando **21 µL de nuclease free water**.

As amostras ficaram a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente, colocando-as de volta no suporte magnético depois disso. Em seguida, esperámos cerca de 2 minutos e **transferimos 20 µL do sobrenadante** para novos tubos eppendorf DNA *LoBind* de 200 µL.

No final deste passo de limpeza, avaliámos a concentração das amostras purificadas utilizando um *NanoDrop Spectrophotometer*.

5.3.4. NEBNext End Prep

Utilizando as leituras obtidas no *NanoDrop Spectrophotometer*, diluímos **50 ng de cada amostra de amplicões de cDNA** em *nuclease free water* para um volume final de 12,5 µL (4 ng/µL). De seguida, preparámos uma *mix* com **1,75 µL de NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer** e **0,75 µL de NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix**, para cada amostra. Distribuímos **3,5 µL da mix** preparada numa placa de 96 poços e adicionámos **12,5 µL dos amplicões de cDNA diluídos**.

Para finalizar este passo colocámos a placa num termociclador com temperatura da tampa regulada para $\geq 75^{\circ}\text{C}$ e com o seguinte programa: 10 minutos a 20°C ; 10 minutos a 65°C ; e manter a 4°C até se retirar a placa.

5.3.5. Ligação dos *barcodes*

Para o passo de **ligação dos *barcodes*** distribuímos em cada poço da placa de 96, **6 μL de *nuclease free water*, 1,5 μL do *DNA End Prep*, 10 μL de *Blunt/TA Ligase Master Mix* e 2,5 μL do respetivo **barcode**, do kit *Oxford Nanopore Technologies Native Barcoding Expansion (EXP-NBD196)*. Depois deixámos as amostras incubarem à temperatura ambiente durante 20 minutos e a 65°C durante 10 minutos antes de as colocarmos em gelo durante 1 minuto.**

Por fim, juntámos todas as amostras num tubo eppendorf DNA *LoBind*.

5.3.6. Limpeza do DNA marcado

No tubo onde juntámos as amostras, adicionámos **200 μL de *NEBNext Sample Purification Beads***, e deixámos incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Colocámos o tubo num **suporte magnético de 1,5 mL** para separar as *beads* do sobrenadante e após 2 minutos removemos e descartámos cuidadosamente o sobrenadante.

Lavámos as *beads* adicionando **250 μL de *Short Fragment buffer (SFB)*** e colocámos o tubo no suporte magnético durante 2 minutos para separar as *beads* do sobrenadante. Depois de removermos o sobrenadante repetimos a lavagem mais uma vez para perfazer um total de **duas lavagens**. Adicionámos **200 μL de 80% de etanol recém-preparado** ao tubo enquanto estava no suporte magnético, deixámo-lo incubar à temperatura ambiente durante 30 segundos, e depois removemos e descartámos o sobrenadante.

Deixámos as *beads* secarem por 30 segundos enquanto o tubo estava no suporte magnético com a tampa aberta e com muito **cuidado para não secarem excessivamente**. Removemos o tubo do suporte magnético, eluímos o DNA alvo das *beads* adicionando **33 μL de *nuclease free water*** e deixámos incubar pelo menos 2 minutos à temperatura ambiente, colocando-o de volta no suporte magnético depois disso. Em seguida, esperámos cerca de 2 minutos e transferimos **32 μL do sobrenadante** para um novo tubo Eppendorf DNA *LoBind* de 1,5 mL.

Tal como anteriormente, no final deste passo de limpeza avaliámos a concentração da amostra purificada utilizando um *NanoDrop Spectrophotometer*.

5.3.7. Ligação de adaptadores

Utilizando as leituras obtidas no *NanoDrop Spectrophotometer*, diluímos **60 ng da pool de DNA marcado em *nuclease free water*** para um **volume final de 30 μL** (2 ng/ μL). Depois adicionámos num tubo eppendorf **30 μL de DNA marcado, 5 μL de *Adapter Mix II* do kit *Oxford Nanopore Technologies Adapter Mix II Expansion (EXP-AMII001)*, 10 μL de *NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer* e 5 μL de *NEBNext Quick T4 Ligase*, e deixámos incubar a 25°C durante 20 minutos.**

5.3.8. Limpeza dos adaptadores ligados ao DNA

Adicionámos **50 μL de *NEBNext Sample Purification Beads*** à amostra obtida no passo anterior. Incubámos à temperatura ambiente por 10 minutos e colocámos o tubo num **suporte magnético** apropriado para separar as *beads* do sobrenadante durante cerca de 2 minutos, removendo e descartando

o sobrenadante depois disso. Como nos passos anteriormente de limpeza, tivemos muito cuidado para **não perturbar e descartar as beads** que continham o DNA alvo.

Lavámos as *beads* adicionando **250 µL de Short Fragment buffer (SFB)** e colocámos o tubo no suporte magnético durante 2 minutos para separar as *beads* do sobrenadante. Depois de removermos o sobrenadante e repetimos novamente a lavagem perfazendo um total de **duas lavagens**. Retirámos o tubo do suporte magnético e eluímos o DNA alvo das *beads* adicionando **15 µL de Elution Buffer (EB)** fornecido no kit *Oxford Nanopore Technologies SFB Expansion (SQK-LSK109)*.

Depois deixámos as amostras incubarem durante 10 minutos à temperatura ambiente, colocando-as de volta no suporte magnético, após esse tempo. Esperámos cerca de 2 minutos e transferimos **15 µL do sobrenadante** para um novo tubo eppendorf.

5.3.9. Sequenciação no MinION

Findo todo o procedimento de preparação das amostras pudemos iniciar a **sequenciação no MinION**. Para tal adicionámos **30 µL de Flush tether (FLT)** ao tubo de *Flush buffer (FLB)* e homogeneizámos bem, levando a solução ao vórtex.

Colocámos a *flowcell* no MinION e rodámos a *inlet port* 90° no sentido dos ponteiros do relógio. Definimos o volume da pipeta P1000 para 800 µL, colocámos a ponta P1000 na *inlet port* e aumentámos progressivamente o volume da pipeta até **retirar a pequena bolha de ar presente na flowcell**. Posteriormente, carregámos lentamente **800 µL de FLB** (ao qual foi adicionado FLT) pelo mesmo local e deixámos incubar 5 minutos. Com muito cuidado, **levantámos a tampa SpotON** e **carregámos mais 200 µL da solução anterior** pela *inlet port*.

Num novo tubo eppendorf preparámos uma mix com **37,5 µL de Sequencing buffer (SQB)**, **25,5 µL de Loading beads (LB)** e **12 µL da amostra final** (obtida no passo 5.3.8.) e **adicionámos 75 µL dessa solução**, gota a gota pela porta *SpotON*, fechando posteriormente a tampa da mesma.

Depois de preparado o MinION, ligámo-lo ao computador e iniciámos o **programa MinKNOW**. Utilizando o software verificámos a *flowcell*, escolhemos no menu **“FLO-MIN106”** e seleccionamos **“New Experiment”**. Na janela que abriu definimos os parâmetros indicados no quadro 5.2.

Quadro 5.2 – Parâmetros a seleccionar no software MinKNOW.

Experiment	Nome da experiência (deixar o nome da amostra em branco).
Kit Selection	LSK109.
Run Options	Entre 6-12h (a corrida pode ser interrompida caso já se tenha obtido leituras suficientes).
Basecalling	<i>Fast basecalling</i> .
Output	Deixar o <i>default</i> .

Por fim, seleccionámos as definições de acordo com a figura 5.1, e **iniciámos a sequenciação**.

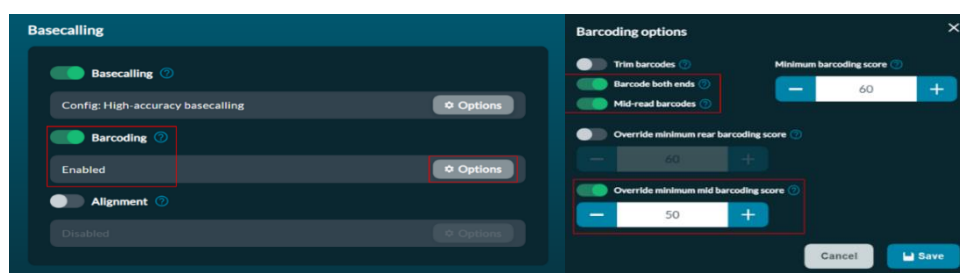


Figura 5.1 – Definições a seleccionar no software MinKNOW.

5.3.10. Tratamento dos dados

Os ficheiros “raw” da sequenciação foram identificados em cada *barcode* utilizado o **software guppy** (*Oxford nanopore technologies*) com o comando:

- `for file in /home/MinKNOW_sequence_output/SARS-CoV-2/20210916/fastq_pass/*; do guppy_barcode--require_barcodes_both_ends -i $file -s output_directory --arrangements_files "barcode_arrs_nb12.cfg barcode_arrs_nb24.cfg barcode_arrs_nb96.cfg"; done`

Os limites de qualidade foram impostos com o comando:

- `artic guppyplex--skip-quality-check --min-length 400 --max-length 700 --directory sequencing_output_directory/ --prefix date_of_sequencing`

Os ficheiros resultantes do comando anterior foram comprimidos em **formato .gz** e submetidos à **plataforma INSaFLU** para análise e caracterização de variantes do vírus SARS-CoV-2. Foi também submetido um **ficheiro de *metadata***, com informação correspondente a cada uma das amostras, detalhadamente, o nome da amostra, data de colheita, data de análise laboratorial, local de colheita e o nome correspondente de cada ficheiro .gz.

A **plataforma INSaFLU** faz todo o tratamento dos dados bioinformáticos a partir deste passo, nomeadamente em cada amostra, é feita: uma **análise de qualidade das *reads*** e exclusão das que não passam o controlo de qualidade; o **mapeamento das *reads*** contra o genoma de referência (de SARS-CoV-2); o **tratamento e determinação de um genoma viral de consenso** para a amostra, tendo em consideração a cobertura da sequenciação para cada região do genoma; a **identificação das mutações relativamente ao genoma de referência** e classificação das mesmas (deleção, inserção ou substituição); e a **caracterização da variante viral** com base nas mutações detetadas e em alinhamentos com genomas de variantes conhecidas. Para todas as amostras é feito um alinhamento da sequência de DNA e da sequência peptídica correspondente de forma a conseguir analisar por comparação as amostras em estudo.

Na **plataforma INSaFLU**, foi criado um projeto com as definições *por defeito* para dados de *Oxford Nanopore*, para o qual foram importadas todas as amostras em estudo. A análise é feita automaticamente e os resultados podem ser retirados da plataforma em formato de texto ou tabular (*excel*), podendo ainda ser enviados para a *webapp* **NEXTCLADE** para análise de variantes de SARS-CoV-2. Esta *webapp* encontra-se associada à **plataforma de análise *Nextstrain***, e utiliza o sistema de **nomenclatura PANGO** para a caracterização das variantes e respetivas linhagens.

5.4. – Comparação dos resultados com método de referência

Após a caracterização das variantes presentes nas nossas amostras, foi realizada uma comparação dos resultados obtidos pela nossa **sequenciação NGS-MinION** com o **método de referência NGS-Sanger Based** realizado em laboratório de referência.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas figuras 6.1 e 6.2, apresentadas abaixo, podemos ver um exemplo de um dos **resultados positivos** obtidos, bem como de um **resultado negativo**, para o vírus SARS-CoV-2, respetivamente. Na **amostra positiva** podemos observar que os **três genes que se pretendia detetar estão presentes**, dois genes virais e o gene humano que indica a presença de RNA humano. Na **amostra negativa**, só podemos observar a **presença do gene da RNase P humana**, o que significa que a extração foi realizada com

sucesso e que esta amostra não continha o vírus. Caso não fosse obtida nenhuma curva como resultado, significaria que não havia **material genético na amostra analisada** ou que a extração não tinha sido bem-sucedida. O estudo do gene da RNase P humana é muito útil para detetar um **resultado falso negativo** que pode surgir devido à colheita inadequada de amostras, ao mau tratamento laboratorial, ou a algum problema ocorrido durante a extração (4,34).

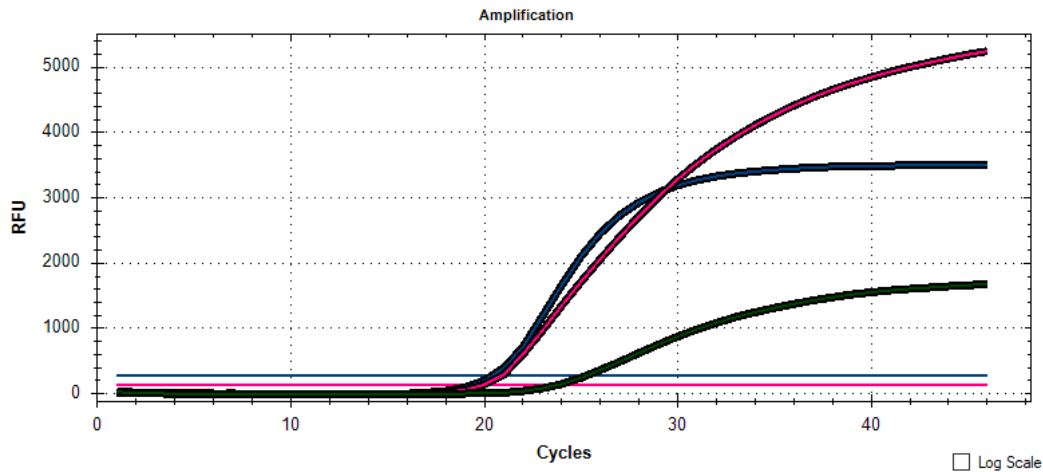


Figura 6.1 - Exemplo de uma amplificação por RT-PCR de uma amostra positiva: a curva azul representa o fluorocromo FAM que deteta o gene N, a curva rosa representa o fluorocromo Cal Red 610 que deteta o gene E e a curva verde representa o fluorocromo HEX que deteta o gene da RNase P humana.

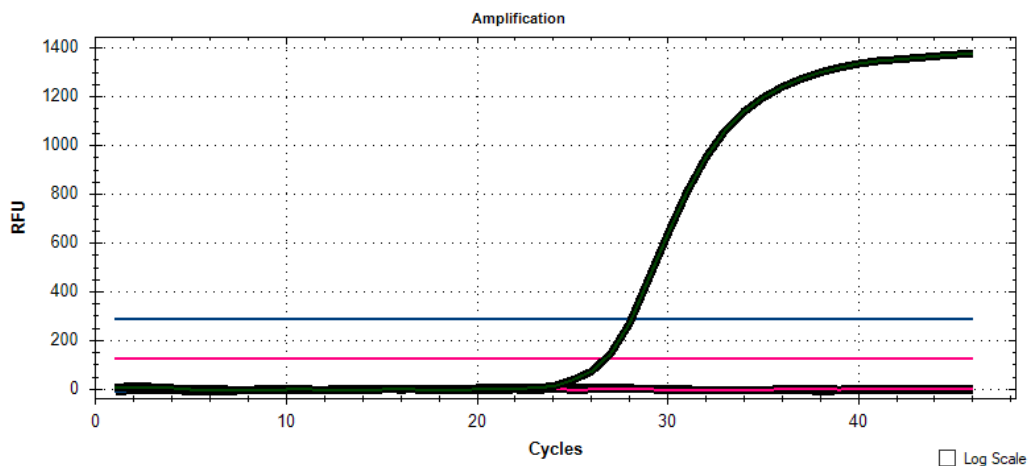


Figura 6.2 - Exemplo de uma amplificação por RT-PCR de uma amostra negativa: apenas se obteve uma curva verde que representa o fluorocromo HEX, responsável pela deteção do gene da RNase P humana.

No quadro 6.1 podemos observar uma listagem de todas as amostras analisadas, do **grupo de indivíduos cadáver**. Foram recolhidas informações como a **idade**, o **sexo** e a **data em que a colheita foi realizada**. Este grupo contém amostras de cadáveres provenientes da **Unidade Funcional de Patologia da Delegação Sul** do INMLCF (LX), dos **Gabinetes Médico Legais de Cascais e Torres Vedras** (CC e TV, respetivamente) e do **Tribunal do Barreiro** (BRR). Estão também indicados os **Cts dos genes N e E**, obtidos na análise RT-PCR, para cada uma das amostras, assim como o **clade/variante** e a correspondente **linhagem**, de acordo com o sistema de nomenclatura **Nexstrain** e **PANGO**, respetivamente, determinados pela sequenciação, bem como os resultados obtidos com o método de referência **NGS-Sanger Based**. No quadro 6.2 consta exatamente o mesmo tipo de informação, mas referente ao grupo de indivíduos vivos.

Quadro 6.1 - Informação relativa aos indivíduos cadáver incluídos no estudo, juntamente com os Cts obtidos no RT-PCR, os clades/variantes e linhagens determinadas na sequenciação NGS-MinION, e os resultados obtidos com o método de referência NGS-Sanger Based.

Amostra	Idade	Sexo	Data da Colheita	Ct gene N	Ct gene E	Clade/Variante	Linhagem	NGS-REF
LX 83	93	Feminino	12-01-2021	25,22	25,55	20E (EU1)	B.1.177	S/R
LX 84	81	Feminino	12-01-2021	34,92	42,46	20E (EU1)	B.1.177.52	S/R
LX 126	77	Feminino	18-01-2021	22,45	22,93	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 142	70	Feminino	18-01-2021	38,35	36,05	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX 145	84	Feminino	19-01-2021	28,52	29,48	20I (Alfa)	B.1.1.7	B.1.1.7
LX 181	88	Feminino	22-01-2021	32,32	32,65	20I (Alfa)	B.1.1.7	B.1.1.7
LX 197	47	Feminino	25-01-2021	33,78	37,91	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
TV 37	74	Feminino	26-01-2021	20,18	20,92	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX 200	56	Masculino	26-01-2021	24,14	24,56	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
BRR 228	51	Masculino	26-01-2021	32,59	32,91	20E (EU1)	B.1.177	S/R
LX 271	77	Feminino	01-02-2021	26,77	25,27	20I (Alfa)	B.1.1.7	B.1.1.7
LX 270	47	Masculino	01-02-2021	27,69	28,4	20E (EU1)	B.1.177.52	S/R
LX 273	74	Masculino	01-02-2021	29,68	30,88	20E (EU1)	B.1.177.52	S/R
LX 320	65	Masculino	08-02-2021	31,42	32,6	20E (EU1)	B.1.177.52	S/R
TV 53	88	Masculino	12-02-2021	34,48	35,12	20E (EU1)	B.1.177	S/R
LX 380	62	Masculino	16-02-2021	33,41	35,42	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 384	78	Feminino	16-02-2021	28,09	29,15	20E (EU1)	B.1.177	S/R
BRR 411	57	Feminino	18-02-2021	31,56	31,88	20I (Alfa)	B.1.1.7	B.1.1.7
LX 461	55	Feminino	04-03-2021	40,76	N/A	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 508	60	Masculino	11-03-2021	33,41	35,42	20A	B.1	B.1.1.7
CC 148	63	Feminino	31-05-2021	38,49	37,21	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 821	64	Masculino	02-06-2021	38,12	N/A	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 869	61	Feminino	15-06-2021	28,26	29,58	20E (EU1)	B.1.177.52	S/R
LX 918	21	Masculino	28-06-2021	23,13	23,5	21J (Delta)	AY.98.1	S/R
CC 180	89	Feminino	29-06-2021	23,01	23,95	21J (Delta)	AY.5	S/R
LX 958	53	Masculino	05-07-2021	24,11	25,16	21J (Delta)	AY.125	S/R
LX 147	58	Masculino	21-07-2021	27,02	28,69	21J (Delta)	AY.124	S/R
LX 1035	79	Feminino	23-07-2021	22,97	23,04	21J (Delta)	AY.124	B.1.617.2
LX 1039	80	Masculino	26-07-2021	25,95	27,21	21J (Delta)	AY.5.1	S/R
LX 1053	86	Masculino	28-07-2021	27,67	28,26	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX 1062	7	Feminino	29-07-2021	32,72	43,41	21J (Delta)	AY.98	S/R
LX 1082	40	Feminino	03-08-2021	23,09	24,1	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
LX 1119	55	Feminino	12-08-2021	19,55	20,24	21J (Delta)	AY.124	B.1.617.2
CC 212	59	Feminino	12-08-2021	13,23	14,1	21J (Delta)	AY.5	B.1.617.2
CC 213	77	Masculino	16-08-2021	33,25	33,74	21J (Delta)	AY.124	S/R
LX 1144	69	Feminino	19-08-2021	17,22	17,63	21J (Delta)	AY.5	B.1.617.2
LX 1155	68	Masculino	23-08-2021	30,02	30,78	21J (Delta)	AY.124	S/R
LX 1170	22	Feminino	25-08-2021	23,55	24,57	21J (Delta)	AY.125	S/R
LX 1229	73	Masculino	13-09-2021	33,41	29,68	21J (Delta)	AY.124	S/R
CC 260	79	Feminino	19-10-2021	24,07	24,3	21J (Delta)	AY.125	S/R

Quadro 6.2 - Informação relativa aos indivíduos vivos incluídos no estudo, juntamente com os Cts obtidos no RT-PCR, os *clades*/variantes e linhagens determinadas na sequenciação NGS-MinION, e os resultados obtidos com o método de referência NGS-Sanger Based.

Amostra	Idade	Sexo	Data da colheita	Ct gene N	Ct gene E	Clade/Variante	Linhagem	NGS-REF
CV3971	81	Masculino	03-01-2021	27,72	27,95	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
CV3969	37	Masculino	03-01-2021	32,2	31,97	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
CV3965	48	Masculino	03-01-2021	19,46	18,58	20E (EU1)	B.1.177	S/R
LX206	29	Feminino	11-01-2021	29,39	28,94	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX196	73	Masculino	25-01-2021	30,41	30,86	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CV4997	3	Masculino	25-01-2021	27,05	27,49	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CV6546	53	Feminino	03-05-2021	20,58	20,05	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CV6561	24	Masculino	03-05-2021	22,59	22,25	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CV6595	34	Masculino	03-05-2021	18,54	19,24	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
CV6609	59	Feminino	03-05-2021	20,87	20,61	20A	B.1.160	S/R
CV6825	9	Feminino	10-05-2021	26,1	25,93	20E (EU1)	B.1.177.32	S/R
CV6864	10	Masculino	12-05-2021	26,03	26,49	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CV6900	29	Feminino	14-05-2021	20,33	20,72	20E (EU1)	B.1.177	S/R
CF1824	43	Feminino	01-07-2021	19,53	20,24	21J (Delta)	AY.43	B.1.617.2
CF1830	29	Feminino	01-07-2021	32,52	34,06	21J (Delta)	AY.5	S/R
CV8039	2	Masculino	01-07-2021	38,59	N/A	21J (Delta)	AY.5	S/R
CV8074	15	Masculino	02-07-2021	24,69	25,01	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX2993	28	Masculino	12-08-2021	27,09	28,12	21J (Delta)	AY.5	S/R
CV9704	8	Feminino	12-08-2021	28,9	29,19	21J (Delta)	AY.122	S/R
LX2992	24	Feminino	12-08-2021	27,2	28,04	21J (Delta)	AY.43	S/R
LX3009	32	Feminino	12-08-2021	21,92	22,52	21J (Delta)	AY.124	B.1.617.2
LX3010	34	Masculino	12-08-2021	22,12	23,16	20I (Alfa)	B.1.1.7	S/R
LX3028	21	Feminino	14-08-2021	35,36	40,27	21J (Delta)	AY.125	S/R
CV9575	86	Feminino	14-08-2021	26,22	27,17	21J (Delta)	AY.5	S/R
LGM179	21	Feminino	14-08-2021	24,92	25,09	21J (Delta)	AY.43	B.1.617.2
LX3147	19	Masculino	01-09-2021	24,33	24,75	20E (EU1)	B.1.177	S/R
LX3155	15	Masculino	02-09-2021	17,77	18,11	21J (Delta)	AY.5	S/R
CF2018	23	Masculino	02-09-2021	20,13	20,57	21J (Delta)	AY.122	B.1.617.2
CV10172	9	Feminino	02-09-2021	28,83	29,43	21J (Delta)	AY.43	S/R
CV10191	13	Feminino	02-09-2021	18,46	19,21	21J (Delta)	AY.5	B.1.617.2
CV10192	2	Feminino	02-09-2021	22,3	22,69	21J (Delta)	AY.5	B.1.617.2
LX3162	38	Masculino	03-09-2021	28,27	28,74	21J (Delta)	AY.22	B.1.617.2
CV10205	3	Masculino	03-09-2021	27,3	27,54	21J (Delta)	AY.125	S/R
CF2025	15	Feminino	04-09-2021	25,45	26,23	21J (Delta)	AY.4.7	B.1.617.2
CV10200	29	Masculino	04-09-2021	34,76	34,59	21J (Delta)	AY.124	S/R
LX3313	19	Masculino	23-10-2021	15,29	15,51	21J (Delta)	AY.43	S/R

O **grupo de indivíduos cadáver** é composto por 23 (57,50%) indivíduos do sexo feminino e 17 (42,50%) do sexo masculino, perfazendo um **n de 40**. Relativamente às faixas etárias constatou-se que 1 indivíduo encontrava-se na faixa etária dos 0 aos 14 anos (2,50%), 18 indivíduos entre os 15 e 64 anos (45%) e 21 indivíduos com 65 ou mais anos (52,50%). Tal como foi mencionando anteriormente, uma vez que o *n* do grupo de indivíduos cadáver é relativamente reduzido, foi acrescentado ao estudo um **grupo de 36 indivíduos vivos**. Este grupo é composto por 17 (47,22%) indivíduos do sexo feminino e 19 (52,78%) do sexo masculino. Relativamente às faixas etárias constatou-se que 9 indivíduos se encontravam na faixa etária dos 0 aos 14 anos (25%), 24 indivíduos entre os 15 e 64 anos (66,67%) e 3 indivíduos com 65 ou mais anos (8,33%).

Os **Cts** apresentados em ambos os quadros (6.1 e 6.2) obtidos pela **análise por RT-PCR** permitiram determinar quais as amostras que necessitavam de ser diluídas antes de se iniciar o procedimento de preparação das bibliotecas para sequenciação. Sendo que, as amostras com Cts entre 15 e 18 foram diluídas 10x em *nuclease free water* para **reduzir a probabilidade de inibição do PCR**, aquando da preparação das bibliotecas de cDNA. Tanto no **grupo de indivíduos cadáver** como no **grupo de indivíduos vivos** foram analisadas amostras cujo Ct do **gene E** não foi determinado (amostra LX461 e LX821 no grupo de indivíduos cadáver e amostra CV8039 no grupo de indivíduos vivos), sendo classificadas como **indetermináveis** e não como positivas. No entanto, quisemos testá-las e em todas elas foi possível detetar uma variante. Essa falha na deteção do gene E pode ter ocorrido devido à **baixa carga viral presente nessas amostras**, uma vez que, para o gene N, todas possuíam Cts muito elevados (superiores a 38), o que demonstra a sensibilidade de deteção do **método de sequenciação NGS-MinION**.

Conforme apresentado no quadro 6.1 que foram detetadas 4 variantes, no **grupo de indivíduos cadáver**: **20A** (1 amostra), **20E (EU1)** (16 amostras), **20I (Alfa)** (8 amostras) e **21J (Delta)** (15 amostras), com as respetivas linhagens. No **grupo de indivíduos vivos** (quadro 6.2) foram detetadas as mesmas 4 variantes, no entanto, com frequências diferentes: **20A** (1 amostra), **20E (EU1)** (10 amostras), **20I (Alfa)** (5 amostras) e **21J (Delta)** (20 amostras), juntamente com as respetivas linhagens.

6.1. Grupo de indivíduos cadáver

6.1.1. Amostras LX 83, LX 384, BRR 228 e TV 53

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foi detetada a mutação no nucleótido **C22227T** (substituição de aminoácidos A222V).
- Esta mutação detetada permitiu-nos concluir que nas amostras LX 83, LX 384, BRR 228 e TV 53 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20E (EU1)**, linhagem **B.1.177**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.1.2. Amostras LX 84, LX 270, LX 273, LX 320 e LX 869

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foram detetadas as mutações nos nucleótidos **C22227T** e **C25047** (substituições de aminoácidos A222V e P1162R, respetivamente).
- O conjunto de mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 84, LX 270, LX 273, LX 320 e LX 869 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20E (EU1)**, linhagem **B.1.177.52**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.1.3. Amostras LX 126, LX 197, LX 380, LX 461, LX 821, LX 1082 e CC 148

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foi detetada a mutação no nucleótido **C22227T** (substituição de aminoácidos A222V). Na ORF1a foi detetada a mutação no nucleótido **C5700T** (substituição de aminoácidos A1812V).
- O conjunto de mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 126, LX 197, LX 380, LX 461, LX 821 e LX 1082 e CC 148 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20E (EU1)**, linhagem **B.1.177.32**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.1.4. Amostras LX 142, LX 145 e LX 271

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.1 dos anexos.
- O conjunto das 10 mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 142, LX 145 e LX 271 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para amostra LX 142.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, nas amostras LX 145 e LX 271, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION.

6.1.5. Amostras LX 147, LX 1035, LX 1119, LX 1155, LX 1229 e CC 213

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Na ORF1a foram ainda detetadas as mutações nos nucleótidos **C1593T** e **A10323G** (substituições de aminoácidos S443F e K3353R, respetivamente) e na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **C21301A** (substituição de aminoácidos P2612T).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 147, LX 1035, LX 1119, LX 1155, LX 1229 e CC 213 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.124**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para as amostras LX 147, LX 1155, LX 1229 e CC 213.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, nas amostras LX1035 e LX 1119, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.124**.

6.1.6. Amostras LX 181, LX 1053 e TV 37

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.1 dos anexos.
- O conjunto das 13 mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 181, LX 1053 e TV 37 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, na amostra LX 181, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para as amostras LX 1053 e TV 37.

6.1.7. Amostra LX 200

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.1 dos anexos.
- O conjunto das 12 mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX 200 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.1.8. Amostra LX 508

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foram detetadas as mutações nos nucleótidos **A23403G** (substituições de aminoácidos D614G). Na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **C14408T** (substituição de aminoácidos P314L).
- O conjunto de mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX 508 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20A**, linhagem **B.1**.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetado foi a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, sendo mais discriminante na linhagem do que os nossos resultados de sequenciação NGS MinION.

6.1.9. Amostra LX 918

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Foi ainda detetada, no gene *S*, a mutação no nucleótido **C22314T** (substituição de aminoácidos P251L) e na ORF1a foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G526T** e **G5437T** (substituição de aminoácidos E87D e E1724D, respetivamente).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX 918 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.98.1**.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetado foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.98.1**.

6.1.10. Amostras LX 958, LX 1170 e CC 260

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Na ORF1a foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G15906T** e **G18905A** (substituições de aminoácidos Q813H e R1813H respetivamente) e na ORF3a foi detetada a mutação no nucleótido **G25471T** (substituição de aminoácidos D27Y).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 958, LX 1170 e CC 260 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.125**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.1.11. Amostra LX 1039

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Foi ainda detetada, no gene *N*, a mutação no nucleótido **C29253T** (substituição de aminoácidos S327L), e no gene *M* foi detetada a mutação no nucleótido **C27143A** (substituição de aminoácidos N207K).

- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX 1039 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.5.1**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.1.12. Amostra LX 1062

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Na ORF1a foi detetada a mutação no nucleótido **G526T** (substituição de aminoácidos E87D).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX 1062 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.98**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.1.13. Amostras LX 1144, CC 180 e CC 212

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.2 dos anexos.
- Foi ainda detetada, no gene N, a mutação no nucleótido **C29253T** (substituição de aminoácidos S327L).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras LX 1144, CC 180 e CC 212 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.5**.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, nas amostras LX 1144 e CC 212, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.5**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para a amostra CC 180.

6.1.14. Amostra BRR 411

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.1 dos anexos.
- O conjunto das 8 mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra BRR 411 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetado foi a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION.

6.2. Grupo de indivíduos vivos

6.2.1. Amostras CF1824, CV10172, LGM179, LX2992 e LX3313

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **C15952A** (substituição de aminoácidos L829I). Foi ainda detetada, no gene N, a mutação no nucleótido **A28299T** (substituição de aminoácidos Q9L).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras CF1824, CV10172, LGM179, LX2992 e LX3313 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.43**.

- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, nas amostras CF1824 e LGM179, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.43**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para as amostras CV10172, LX2992 e LX3313.

6.2.2. Amostras CF1830, CV8039, CV9575, CV10191, CV10192, LX2993 e LX3155

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Foi ainda detetada, no gene N, a mutação no nucleótido **C29253T** (substituição de aminoácidos S327L).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras CF1830, CV8039, CV9575, CV10191, CV10192, LX2993 e LX3155 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY5**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para as amostras CF1830, CV8039, CV9575, LX2993 e LX3155.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, nas amostras CV10191 e CV10192, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.5**.

6.2.3. Amostra CF2025

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1b foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G14829T** e **G17193T** (substituições de aminoácidos M454I e E1242D).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra CF2025 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.4.7**.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.4.7**.

6.2.4. Amostras CV3965, CV4997, CV6546, CV6561, CV6864, CV6900, LX196 e LX3147

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foi detetada a mutação no nucleótido **C22227T** (substituição de aminoácidos A222V).
- Esta mutação detetada permitiu-nos concluir que nas amostras CV3965, CV4997, CV6546, CV6561, CV6864, CV6900, LX196 e LX3147 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20E (EU1)**, linhagem **B.1.177**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.2.5. Amostras CV3969, CV3971 e CV8074

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.3 dos anexos.

- O conjunto das 13 mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras CV3969, CV3971 e CV8074 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.2.6. Amostras CV6595 e CV6825

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foi detetada a mutação no nucleótido **C22227T** (substituições de aminoácidos A222V). Na ORF1a foi detetada a mutação no nucleótido **C5700T** (substituição de aminoácidos A1812V).
- O conjunto de mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra CV6595 e CV6825 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20E (EU1)**, linhagem **B.1.177.32**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.2.7. Amostra CV6609

- Com a sequenciação NGS-MinION, no gene da proteína *spike* foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G22992A** e **A23403G** (substituições de aminoácidos S477N e D614G, respetivamente). Na ORF1a foi detetada a mutação no nucleótido **G9526T** (substituição de aminoácidos M3087I). Na ORF1b foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G13993T**, **C14408T** e **G15766T** (substituições de aminoácidos A176S, P314L e V767L, respetivamente). Na ORF3a foi detetada a mutação no nucleótido **G25563T** (substituição de aminoácidos Q57H).
- O conjunto de mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra CV6595 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20A**, linhagem **B.1.160**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.2.8. Amostras CV9704 e CF2018

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1a foi ainda detetada a mutação no nucleótido **G1048T** (substituição de aminoácidos K261N).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que nas amostras CV9704 e CF2018 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.122**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para a amostra CV9704.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência, na amostra CF2018, a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.122**.

6.2.9. Amostra CV10200

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1a foram detetadas as mutações nos nucleótidos **C1593T** e **A10323G** (substituições de aminoácidos S443F e K3353R, respetivamente) e na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **C21301A** (substituição de aminoácidos P2612T).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra CV10200 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.124**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.2.10. Amostras CV10205 e LX3028

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1a foram detetadas as mutações nos nucleótidos **G15906T** e **G18905A** (substituições de aminoácidos Q813H e R1813H respetivamente). Foi ainda detetada, na ORF3a, a mutação no nucleótido **G25471T** (substituição de aminoácidos D27Y).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra CV10205 e LX3028 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.125**.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para estas amostras.

6.2.11. Amostra LX206

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.3 dos anexos.
- O conjunto das 12 mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX206 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.2.12. Amostra LX3009

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Na ORF1a foi detetada a mutação no nucleótido **A10323G** (substituição de aminoácidos K3353R) e na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **C21301A** (substituição de aminoácidos P2612T).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX3009 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.124**.
- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.124**.

6.2.13. Amostra LX3010

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.3 dos anexos.
- O conjunto das 10 mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX3010 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **20I (Alfa)**, linhagem **B.1.1.7**, apesar de apenas serem necessárias 5 mutações características da mesma para a sua caracterização.
- Não foi possível obter resultados de sequenciação NGS-SB para esta amostra.

6.2.14. Amostra LX3162

- Com a sequenciação NGS-MinION foram detetadas as mutações nos nucleótidos apresentadas no quadro 9.4 dos anexos.
- Foi ainda detetada, no gene S, a mutação no nucleótido **G24872T** (substituição de aminoácidos V1104L) e na ORF1b foi detetada a mutação no nucleótido **G14209T** (substituição de aminoácidos **V248F**).
- O conjunto das mutações detetadas permitiu-nos concluir que na amostra LX3162 a variante de SARS-CoV-2 presente é a **21J (Delta)**, sub-linhagem **AY.22**.

- Com a sequenciação NGS-SB realizada por laboratório de referência a variante de SARS-CoV-2 detetada foi a **21J (Delta)**, linhagem **B.1.617.2** coincidente com os nossos resultados de sequenciação NGS MinION. No entanto, os nossos resultados permitiram discriminar uma sub-linhagem **AY.22**.

6.3. Geral

- Em todas as amostras, tanto no **grupo de indivíduos cadáver** como no **grupo de indivíduos vivos** podemos verificar a presença da **mutação no nucleótido A23403G**. Como foi anteriormente mencionado, a presença desta mutação tornou-se dominante em todas as variantes e leva à **substituição de aminoácidos D614G**, que consiste numa **substituição do aminoácido 614, ácido aspártico**, por uma **glicina** na proteína *spike*.
- Foi também detetada em todas as amostras do nosso estudo a **substituição de aminoácidos P314L** (mutação no nucleótido C14408T) na ORF1b, característica das linhagens B.1.
- Tanto no **grupo de indivíduos cadáver** como no **grupo de indivíduos vivos** é possível observar mutação no nucleótido C23604G que corresponde à substituição de aminoácidos **P681R**, em algumas das amostras detetadas como variante Delta (13 amostras e 18 amostras, respetivamente). Esta mutação no **nucleótido 23604** é semelhante à que acontece na variante Alfa, no entanto, neste caso a citosina é substituída por uma guanina (C23604G), dando origem à substituição do aminoácido **prolina** por uma **arginina**. Enquanto na anterior (variante Alfa), a citosina é substituída por uma adenina (C23604A), substituindo a **prolina** por uma **histidina** (P681H). Tal como podemos constatar no capítulo da introdução, ambas as substituições de aminoácidos favorecem a clivagem da proteína *spike* pela protéase, aumentando assim a sua afinidade com o recetor ACE2 e promovendo a integração do vírus na célula hospedeira.

Nos quadros 9.5 e 9.6 apresentados nos anexos encontramos informação relativamente ao número total de **deleções, inserções e substituições dos nucleótidos**, bem como o número total de **deleções, inserções e substituições dos respetivos aminoácidos**, relativamente ao **grupo de indivíduos cadáver** e o **grupo de indivíduos vivos**, respetivamente. O tipo de mutação predominante em ambos os grupos é a **substituição**, sendo que, não foram detetadas inserções, nem de nucleótidos nem de aminoácidos.

Nos quadros anteriormente mencionados, estão também representadas as **deleções** que ocorreram em todo o genoma. No **grupo de indivíduos cadáver** podemos observar a ocorrência das deleções de nucleótidos 21765 a 21770 e 21992 a 21994, que correspondem às deleções **dos aminoácidos ΔH69/ΔV70 e ΔY144**, no gene da proteína *spike*, respetivamente. Estas deleções surgem associadas a algumas das amostras detetadas como **variante Alfa** (LX181, LX200, LX1053 e TV37), pois, como foi anteriormente destacado na introdução, são muito comuns nesta variante, no entanto, podem aparecer associadas a outras, não sendo específicas da mesma.

No **grupo de indivíduos vivos** estas deleções também surgiram associadas a amostras detetadas como **variante Alfa**. A **deleção de nucleótidos 21765 a 21770 (ΔH69/ΔV70)**, foi detetada nas amostras CV3969, CV3971, CV8074 e LX206, enquanto a deleção de nucleótidos 21992 a 21994 (ΔY144) foi detetada nas amostras CV3971, CV8074, LX206 e LX3010.

Ainda relativamente aos quadros 9.5 e 9.6 apresentados nos anexos, podemos observar tanto no **grupo de indivíduos cadáver** como no **grupo de indivíduos vivos** a ocorrência das **deleções dos nucleótidos 28248 a 28253** (deleções dos aminoácidos ΔD119/ΔF120) associadas a todas as amostras detetadas como **variante Delta**. Esta deleção é característica desta variante.

Todas as mutações de nucleótidos na proteína *spike* e nas outras regiões do genoma, mencionadas anteriormente, podem observadas no seguinte link, onde foi submetido um documento *excel* com todos os dados obtidos na sequenciação:

- https://osf.io/ghz75/?view_only=596799d9d39c4706a09552cff3ab6f5b

Os resultados obtidos em cada um dos grupos, **indivíduos cadáver** e **indivíduos vivos**, foram separados por semestre, de forma a ter uma percepção temporal da evolução das variantes. Na **figura 6.3** podemos observar a **distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos cadáver**. Nesta figura percebemos que no primeiro semestre do ano de 2021, no grupo de indivíduos vivos havia uma prevalência das variantes 20E (EU1) e 20I (Alfa), sendo a variante 21J (Delta) pouco predominante. No entanto, no segundo semestre do mesmo ano, é possível observar uma inversão destes resultados, passando a variante 21J (Delta) a ser dominante. O mesmo padrão pode ser observado na **figura 6.4**, que representa a **distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos vivos**, com a diferença de não ter sido detetada a variante 21J (Delta) no primeiro semestre, tendo aparecido posteriormente e de forma dominante.

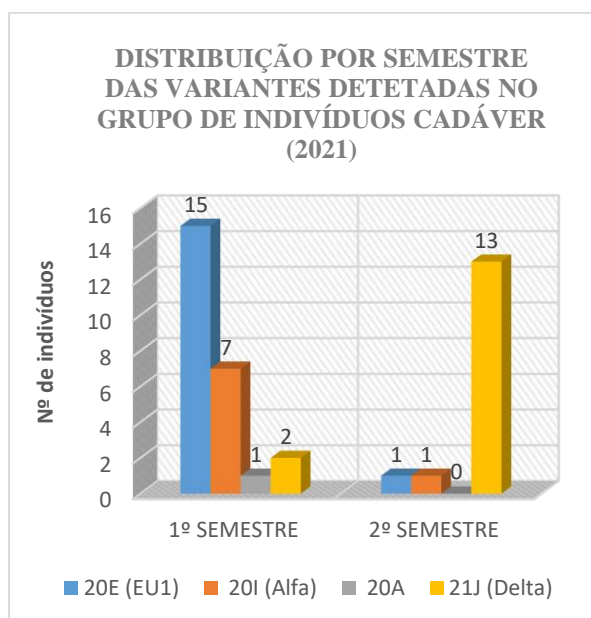


Figura 6.3 - Distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos cadáver (2021).

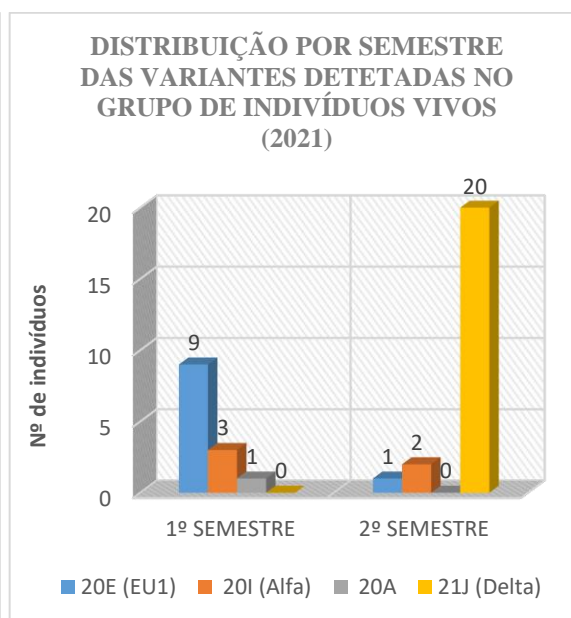


Figura 6.4 - Distribuição por semestre das variantes detetadas no grupo de indivíduos vivos (2021).

Nos cerca de **30.000 pares de bases** que constituem o genoma do SARS-CoV-2, em média, não foi possível sequenciar entre cerca de 700 a 8000, o que **não teve qualquer influência para a definição de variantes**, uma vez que, na sua maioria, os segmentos não sequenciados, não correspondiam a zonas do genoma associadas a mutações específicas de variantes.

7. CONCLUSÃO

A **propagação de novas variantes SARS-CoV-2** representa uma ameaça séria em todo o mundo, pelo que são necessários métodos credíveis, robustos e de execução tão simples quanto possível para a sua identificação. Estas variantes surgem através de mutações essencialmente durante o processo de replicação do vírus, conferindo ao mesmo uma **vantagem evolutiva** e eventualmente comprometendo a eficácia das vacinas desenvolvidas. Assim, a **constante vigilância de novas variantes** é de extrema

importância, tanto em indivíduos vivos como em cadáveres, sendo este estudo um contributo para o **panorama epidemiológico na região de Lisboa**. Testar amostras de cadáveres para a presença do vírus SARS-CoV-2 leva a um **melhor rastreamento da presença do mesmo na população** durante toda a epidemia.

Com este estudo conseguimos detetar **variantes SARS-CoV-2** tanto no **grupo de indivíduos cadáveres** como no **grupo de indivíduos vivos**. Estas variantes foram, posteriormente, caracterizadas de acordo com as suas mutações de forma a determinar as respetivas linhagens. Em ambos os grupos foi possível identificar vários **SNVs característicos das várias linhagens** e as respetivas substituições de aminoácidos, bem como algumas deleções. Foram detetadas substituições de aminoácidos características das linhagens mais antigas e presentes em todas as linhagens identificadas. Por exemplo, a **substituição de aminoácidos D614G** (mutação no nucleótido A23403G), no **gene da proteína spike**, foi das primeiras mutações a surgir, tornando-se dominante em todas as variantes. Outro exemplo é a **substituição de aminoácidos P314L** (mutação no nucleótido C14408T) na **ORF1b**, característica da **linhagem B.1** e de todas as linhagens procedentes desta.

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados, comparativamente a ambos os grupos, levando-nos a concluir que o facto de as amostras de um dos grupos serem colhidas em cadáver **não influencia a deteção de variantes** e a sua posterior caracterização.

As **mutações no gene da proteína spike** são de grande interesse, uma vez que, esta proteína é responsável pela interação com o recetor da célula hospedeira humana, o ACE2. Como se tem vindo a constatar, a maioria das mutações neste gene levam a um aumento da afinidade da proteína S com recetor ACE2, sendo um fator determinante no aumento da transmissibilidade e infecciosidade. Algumas mutações neste gene levam, ainda, à redução da eficácia das vacinas, da imunidade mediada por anticorpos, bem como, do diagnóstico, favorecendo a obtenção de resultados falsos negativos.

Em Portugal, segundo os dados da *PORDATA*, consultados a 23 de agosto de 2022, na **população portuguesa**, no ano de 2021, relativamente às faixas etárias constatou-se que: 12,90% dos indivíduos encontravam-se na faixa etária dos 0 aos 14 anos; 63,60% dos indivíduos entre os 15 e 64 anos; e 23,50% dos indivíduos apresentavam 65 ou mais anos.

Neste estudo, o **grupo de indivíduos vivos** apresenta distribuição aproximada nos indivíduos entre os 15 e 64 anos (66,67%). No entanto, a **faixa etária da idade dos 0 aos 14 anos** apresenta um **valor superior** (25%) e a **faixa etária das idades superiores a 64 anos** apresenta um **valor bastante inferior** (8,33%), o que nos pode levar a deduzir que a nossa amostra de indivíduos vivos não será uma representação de uma realidade da população de Lisboa.

Relativamente ao **grupo de indivíduos cadáver** observou-se uma predominância (52,50%) dos indivíduos com mais de 64 anos, o que se poderá justificar pelo facto de a maioria dos óbitos ocorrer nesta faixa etária.

Após a comparação dos resultados obtidos pela nossa **sequenciação NGS-MinION** com o **método de referência NGS-Sanger Based** realizado em laboratório de referência foi possível concluir que em todas as amostras a variante obtida foi concordante, sendo que, nos casos específicos da variante delta, a sequenciação **NGS-MinION** permitiu ainda a discriminação de uma sub-linhagem.

Há, no entanto, o caso específico da **amostra LX 508**, pertencente ao grupo de indivíduos cadáver, em que a variante obtida pela nossa sequenciação **NGS-MinION** foi menos discriminante (variante 20A, linhagem B.1) do que a que foi obtida pela sequenciação com o **método de referência NGS-Sanger Based** (variante 20I/alfa, linhagem B.1.1.7). Não tendo, a nossa sequenciação **NGS-MinION**, detetado mutações suficientes para a caracterizar como variante alfa.

Como mencionado anteriormente, após o aparecimento da **variante delta**, em meados de 2021, esta foi-se tornando prevalente, sobrepondo-se a todas as outras e acabando mesmo por substituí-las ao fim de alguns meses. Analisando a **distribuição das variantes das amostras em estudo**, ao longo dos semestres de 2021, em ambos os grupos podemos constatar esse facto. Isto é, no primeiro semestre havia uma predominância das variantes 20E (EU1) e 20I (Alfa), sendo, no segundo semestre, substituídas essencialmente pela variante 21J (Delta).

A **variante ómicron** não foi detetada em nenhuma das amostras sequenciadas. As amostras em estudo foram colhidas no período entre janeiro e outubro, e esta variante surgiu apenas em novembro. Um possível estudo futuro poderá ter em conta este facto e basear-se na colheita de amostras a partir dessa data até aos dias de hoje, de forma a tentar perceber se esta variante também se vai sobrepor à variante Delta, como muitos estudos o indicam.

8. REFERÊNCIAS

1. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 6;19(3):141–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
2. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Sep 24;39(9):1629–35. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10096-020-03899-4>
3. Varghese PM, Tsolaki AG, Yasmin H, Shastri A, Ferluga J, Vatish M, et al. Host-pathogen interaction in COVID-19: Pathogenesis, potential therapeutics and vaccination strategies. *Immunobiology* [Internet]. 2020 Nov;225(6):152008. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298520303478>
4. Lee JH, Choi M, Jung Y, Lee SK, Lee CS, Kim J, et al. A novel rapid detection for SARS-CoV-2 spike 1 antigens using human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2021 Jan;171(January):112715. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656632030703X>
5. Alpdagtas S, Ilhan E, Uysal E, Sengor M, Ustundag CB, Gunduz O. Evaluation of current diagnostic methods for COVID-19. *APL Bioeng* [Internet]. 2020 Dec 1;4(4):041506. Available from: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/5.0021554>
6. Ghosh A, Colling R. An overview of COVID-19 for diagnostic pathologists: clinicopathological correlation and diagnostic techniques. *Diagn Histopathol* [Internet]. 2020 Nov 1;26(11):529–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S175623172030102X>
7. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* [Internet]. 2020 May;181(4):914–921.e10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420304062>
8. Sheikhzadeh E, Eissa S, Ismail A, Zourob M. Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. *Talanta* [Internet]. 2020 Dec;220(January):121392. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914020306834>
9. Lv D feng, Ying Q ming, Weng Y song, Shen C bin, Chu J guo, Kong J ping, et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2020 Jul 1;506:172–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898120301340>
10. 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* [Internet]. 2021 Jan;113(1):1221–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754320308764>
11. Petrillo S, Carrà G, Bottino P, Zanotto E, de Santis MC, Margaria JP, et al. A Novel Multiplex qRT-PCR Assay to Detect SARS-CoV-2 Infection: High Sensitivity and Increased Testing Capacity. *Microorganisms* [Internet]. 2020 Jul 17;8(7):1064. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/7/1064>

12. Kumari P, Singh A, Ngasainao MR, Shakeel I, Kumar S, Lal S, et al. Potential diagnostics and therapeutic approaches in COVID-19. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2020 Nov;510:488–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898120303958>
13. Farasani A. Genetic analysis of the 2019 coronavirus pandemic with from real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2021 Jan;28(1):911–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X20305994>
14. Ezhilan M, Suresh I, Nesakumar N. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2: A Diagnostic Challenge. *Measurement* [Internet]. 2021 Jan;168(August 2020):108335. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263224120308721>
15. Kaul D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – Molecular biology, epidemiology and clinical implications. *Curr Med Res Pract* [Internet]. 2020 Mar;10(2):54–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352081720300398>
16. Basso C, Calabrese F, Sbaraglia M, del Vecchio C, Carretta G, Saieva A, et al. Feasibility of postmortem examination in the era of COVID-19 pandemic: the experience of a Northeast Italy University Hospital. *Virchows Archiv* [Internet]. 2020 Sep 9;477(3):341–7. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00428-020-02861-1>
17. Sessa F, Bertozzi G, Cipolloni L, Baldari B, Cantatore S, D’Errico S, et al. Clinical-Forensic Autopsy Findings to Defeat COVID-19 Disease: A Literature Review. *J Clin Med* [Internet]. 2020 Jun 28;9(7):2026. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/7/2026>
18. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2021 Jul 30;43(2):845–67. Available from: <https://www.mdpi.com/1467-3045/43/2/61>
19. Axell-House DB, Lavingia R, Rafferty M, Clark E, Amirian ES, Chiao EY. The estimation of diagnostic accuracy of tests for COVID-19: A scoping review. *Journal of Infection* [Internet]. 2020 Nov;81(5):681–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445320305776>
20. Islam KU, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Nov 10;10(November):1–11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.560616/full>
21. Safari I, Elahi E. Evolution of the SARS-CoV-2 genome and emergence of variants of concern. *Arch Virol* [Internet]. 2022 Feb 30;167(2):293–305. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-021-05295-5>
22. Bakhshandeh B, Sorboni SG, Javanmard AR, Mottaghi SS, Mehrabi M reza, Sorouri F, et al. Variants in ACE2; potential influences on virus infection and COVID-19 severity. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2021 Jun 1;90:104773. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821000708>
23. Jogalekar MP, Veerabathini A, Gangadaran P. Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions. *Exp Biol Med* [Internet]. 2020 Jun 19;245(11):964–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370220920540>

24. Zhang L, Guo H. Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2. *Adv Biomark Sci Technol* [Internet]. 2020;2(January):1–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2543106420300016>
25. Priya P, Shanker A. Coevolutionary forces shaping the fitness of SARS-CoV-2 spike glycoprotein against human receptor ACE2. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2021 Jan 1;87:104646. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33249264>
26. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2020 Jul 1;370:m2516. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.m2516>
27. Carter LJ, Garner L v., Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci* [Internet]. 2020 May 27;6(5):591–605. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.0c00501>
28. Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res* [Internet]. 2020 Nov;26:149–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123220301788>
29. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2021 Jul 30;43(2):845–67. Available from: <https://www.mdpi.com/1467-3045/43/2/61>
30. Younes N, Al-Sadeq DW, AL-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses* [Internet]. 2020 May 26;12(6):582. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/6/582>
31. Lee CYP, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Apr 24;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00879/full>
32. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano* [Internet]. 2020 Apr 28;14(4):3822–35. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.0c02624>
33. Velay A, Gallais F, Benotmane I, Wendling MJ, Danion F, Collange O, et al. Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 serological tools and their positioning in COVID-19 diagnostic strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 Dec;98(4):115181. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889320305587>
34. Falasca F, Sciandra I, di Carlo D, Gentile M, Deales A, Antonelli G, et al. Detection of SARS-COV N2 Gene: Very low amounts of viral RNA or false positive? *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2020 Dec;133(October):104660. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653220304029>
35. von Stillfried S, Boor P. Detection methods for SARS-CoV-2 in tissue. *Pathologie* [Internet]. 2021 Nov 26;42(S1):81–8. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00292-021-00920-1>

36. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao SN, Juanola-Falgarona M, Manissero D, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Aug;97(January):225–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S120197122030463X>
37. Han D, Li R, Han Y, Zhang R, Li J. COVID-19: Insight into the asymptomatic SARS-COV-2 infection and transmission. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2020;16(15):2803–11. Available from: <https://www.ijbs.com/v16p2803.htm>
38. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect* [Internet]. 2020 Mar;22(2):69–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457920300265>
39. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2013 Aug;133(8):1–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15363831>
40. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2012;2012:1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/>
41. Loreille O, Koshinsky H, Fofanov VY, Irwin JA. Application of next generation sequencing technologies to the identification of highly degraded unknown soldiers' remains. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2011 Dec;3(1):e540–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176811002691>
42. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform* [Internet]. 2021 Mar 22;22(2):616–30. Available from: <https://academic.oup.com/bib/article/22/2/616/6024978>
43. Bhojar RC, Jain A, Sehgal P, Divakar MK, Sharma D, Imran M, et al. High throughput detection and genetic epidemiology of SARS-CoV-2 using COVIDSeq next-generation sequencing. Bandapalli OR, editor. *PLoS One* [Internet]. 2021 Feb 17;16(2):e0247115. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0247115>
44. Chen X, Kang Y, Luo J, Pang K, Xu X, Wu J, et al. Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 11;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.632490/full>
45. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Dec 25;17(1):239. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-1103-0>
46. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2016 Oct 1;14(5):265–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672022916301309>
47. Laver T, Harrison J, O'Neill PA, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, et al. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2015 Mar 1;3:1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214753515000224>

48. Oikonomopoulos S, Wang YC, Djambazian H, Badescu D, Ragoussis J. Benchmarking of the Oxford Nanopore MinION sequencing for quantitative and qualitative assessment of cDNA populations. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Oct 24;6(1):31602. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep31602>
49. Petersen LM, Martin IW, Moschetti WE, Kershaw CM, Tsongalis GJ. Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing [Internet]. 2019. Available from: <https://doi.org/10>
50. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2016 Oct 1;14(5):265–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672022916301309>
51. Hu T, Li J, Zhou H, Li C, Holmes EC, Shi W. Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. *Brief Bioinform* [Internet]. 2021 Mar 22;22(2):631–41. Available from: <https://academic.oup.com/bib/article/22/2/631/6067880>
52. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2021 Jul 30;43(2):845–67. Available from: <https://www.mdpi.com/1467-3045/43/2/61>
53. Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, Colquhoun R, et al. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. Available from: <https://academic.oup.com/ve/advance-article/doi/10.1093/ve/veab064/6315289>
54. O'Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evol* [Internet]. 2021 Jul 5;7(2). Available from: <https://academic.oup.com/ve/advance-article/doi/10.1093/ve/veab064/6315289>
55. Bull RA, Adikari TN, Ferguson JM, Hammond JM, Stevanovski I, Beukers AG, et al. Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 9;11(1):6272. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-20075-6>
56. Ibba G, Sau R, Angioj F, Abbondio M, Rubino S, Uzzau S. A straightforward molecular strategy to retrospectively investigate the spread of SARS-CoV-2 VOC202012/01 B.1.1.7 variant. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2021 Mar 7;15(02):242–6.
57. Vasireddy D, Vanaparthy R, Mohan G, Malayala SV, Atluri P. Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know? *J Clin Med Res* [Internet]. 2021 Jun 1;13(6):317–25. Available from: <http://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/4518>
58. Telenti A, Hodcroft EB, Robertson DL. The Evolution and Biology of SARS-CoV-2 Variants. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2022 May 1;12(5):a041390. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a041390>
59. Murugan C, Ramamoorthy S, Kuppaswamy G, Murugan RK, Sivalingam Y, Sundaramurthy A. COVID-19: A review of newly formed viral clades, pathophysiology, therapeutic strategies and current vaccination tasks. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021 Dec 15;193:1165–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021023011>

60. Dubey A, Choudhary S, Kumar P, Tomar S. Emerging SARS-CoV-2 Variants: Genetic Variability and Clinical Implications. *Curr Microbiol* [Internet]. 2022 Jan 14;79(1):20. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00284-021-02724-1>
61. Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Franco-Muñoz C, Álvarez-Díaz DA, Ruiz-Moreno HA, Reales-González J, et al. Novel Highly Divergent SARS-CoV-2 Lineage With the Spike Substitutions L249S and E484K. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2021 Jun 28;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.697605/full>
62. Safari I, Elahi E. Evolution of the SARS-CoV-2 genome and emergence of variants of concern. *Arch Virol* [Internet]. 2022 Feb 30;167(2):293–305. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-021-05295-5>
63. Petersen E, Ntoumi F, Hui DS, Abubakar A, Kramer LD, Obiero C, et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B.1.1.529) - highlights Africa's research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2022 Jan 1;114:268–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221008882>
64. Flores-Vega VR, Monroy-Molina JV, Jiménez-Hernández LE, Torres AG, Santos-Preciado JI, Rosales-Reyes R. SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. *Viruses* [Internet]. 2022 Mar 22;14(4):653. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/653>
65. O'Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evol* [Internet]. 2021 Jul 5;7(2). Available from: <https://academic.oup.com/ve/advance-article/doi/10.1093/ve/veab064/6315289>
66. Parums D v. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2. *Medical Science Monitor* [Internet]. 2021 Jun 21;27. Available from: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/933622>
67. Cheng YW, Chao TL, Li CL, Wang SH, Kao HC, Tsai YM, et al. D614G Substitution of SARS-CoV-2 Spike Protein Increases Syncytium Formation and Virus Titer via Enhanced Furin-Mediated Spike Cleavage. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1128/mBio>
68. Hodcroft EB, Zuber M, Nadeau S, Crawford KHD, Bloom JD, Veessler D, et al. Emergence and spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. *medRxiv* [Internet]. 2020 Nov 27; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33269368>
69. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature* [Internet]. 2021 May 6;593(7857):130–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03398-2>
70. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* [Internet]. 2021 Apr 1;184(7):1671–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286742100218X>
71. Planas D, Bruel T, Grzelak L, Guivel-Benhassine F, Staropoli I, Porrot F, et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat Med* [Internet]. 2021 May 26;27(5):917–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-021-01318-5>

72. Ibba G, Sau R, Angioj F, Abbondio M, Rubino S, Uzzau S. A straightforward molecular strategy to retrospectively investigate the spread of SARS-CoV-2 VOC202012/01 B.1.1.7 variant. *The Journal of Infection in Developing Countries* [Internet]. 2021 Mar 7;15(02):242–6. Available from: <https://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/14972>
73. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature* [Internet]. 2021 May 13;593(7858):266–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03470-x>
74. Brinkkemper M, Brouwer PJM, Maisonnasse P, Grobben M, Caniels TG, Poniman M, et al. A third SARS-CoV-2 spike vaccination improves neutralization of variants-of-concern. *NPJ Vaccines* [Internet]. 2021 Dec 3;6(1):146. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41541-021-00411-7>
75. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* (1979) [Internet]. 2021 Apr 9;372(6538). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abg3055>
76. Abdullaev A, Abdurakhimov A, Mirakbarova Z, Ibragimova S, Tsoy V, Nuriddinov S, et al. Genome sequence diversity of SARS-CoV-2 obtained from clinical samples in Uzbekistan. Makarenkov V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2022 Jun 27;17(6):e0270314. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0270314>
77. Yi H, Wang J, Wang J, Lu Y, Zhang Y, Peng R, et al. The Emergence and Spread of Novel SARS-CoV-2 Variants. *Front Public Health* [Internet]. 2021 Aug 2;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.696664/full>
78. Musso N, Bonacci PG, Bongiorno D, Stracquadanio S, Bivona DA, Palermo CI, et al. Discriminatory Weight of SNPs in Spike SARS-CoV-2 Variants: A Technically Rapid, Unambiguous, and Bioinformatically Validated Laboratory Approach. *Viruses* [Internet]. 2022 Jan 11;14(1):123. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/1/123>
79. Eslami S, Glassy MC, Ghafouri-Fard S. A comprehensive overview of identified mutations in SARS CoV-2 spike glycoprotein among Iranian patients. *Gene* [Internet]. 2022 Mar 1;813:146113. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111921007083>
80. Ahmad W, Ahmad S, Basha R. Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 genome in the samples from Georgia State of the United States. *Gene* [Internet]. 2022 Oct;841:146774. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111922005935>
81. Ferrareze PAG, Franceschi VB, Mayer A de M, Caldana GD, Zimmerman RA, Thompson CE. E484K as an innovative phylogenetic event for viral evolution: Genomic analysis of the E484K spike mutation in SARS-CoV-2 lineages from Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2021 Sep 1;93:104941. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821002380>
82. Mahase E. Covid-19: What new variants are emerging and how are they being investigated? *BMJ* [Internet]. 2021 Jan 18;372:n158. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.n158>

83. Dhawan M, Sharma A, Priyanka, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2022 May 4; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2022.2068883>
84. Shiehzadegan S, Alaghemand N, Fox M, Venketaraman V. Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. *Clin Pract* [Internet]. 2021 Oct 21;11(4):778–84. Available from: <https://www.mdpi.com/2039-7283/11/4/93>
85. Hoan NX, Quoc Hoan P, Dang Manh N, Song LH. SARS-CoV-2 variants circulating in Vietnam [Internet]. Vol. 16, *JOURNAL OF 108-CLINICAL MEDICINE AND PHARMACY*. 2021. Available from: <https://www.>
86. Stern A, Fleishon S, Kustin T, Mandelboim M, Erster O, Mendelson E, et al. The unique evolutionary dynamics of the SARS-CoV-2 Delta variant. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.08.05.21261642>
87. Souza PFN, Mesquita FP, Amaral JL, Landim PGC, Lima KRP, Costa MB, et al. The spike glycoprotein of SARS-CoV-2: A review of how mutations of spike glycoproteins have driven the emergence of variants with high transmissibility and immune escape. Vol. 208, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2022. p. 105–25.
88. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* [Internet]. 2020 Dec 22;18(1):179. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02344-6>
89. Santurro A, Scopetti M, D'Errico S, Fineschi V. A technical report from the Italian SARS-CoV-2 outbreak. Postmortem sampling and autopsy investigation in cases of suspected or probable COVID-19. *Forensic Sci Med Pathol*. 2020 Dec 26;16(4):746–746.

9. ANEXOS

Quadro 9.1 – Mutações nos nucleótidos características da variante Alfa (linhagem B.1.1.7) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos cadáveres.

LOCAL NO GENOMA	ORF1a			GENE S						ORF8			GENE N	
SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS	CT1001I	A1708D	I2230T	N501Y	A570D	P681H	T716I	S982A	D1118H	Q27*	R52I	Y73C	D3L	S235F
Mutações nos nucleótidos	C3267T	C5388A	T6954C	A23063T	C23271A	C23604A	C23709T	T24506G	G24914C	C27972T	G28048T	A28111G	A28281T	C28977T
Amostras														
LX 142	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	
LX 145	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	
LX 181	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LX 200	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
LX 271	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	
LX 1053	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
BRR 411	✓	✓			✓			✓	✓			✓	✓	✓
TV 37	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Quadro 9.2 – Mutações nos nucleótidos características da variante Delta (linhagem B.1.617.2) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos cadáveres.

LOCAL NO GENOMA	GENE S					ORF3a	GENE M	ORF7a		GENE N		
SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS	T19R	L452R	T478K	P618R	D950N	S26L	I82T	V82A	T120I	D63G	R203M	D377Y
Mutações nos nucleótidos	C21618G	T22917G	C22995A	C23604G	G24410A	C25469T	T26767C	T27638C	C27752T	A28461G	G2881T	G29402T
Amostras												
LX 147		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 918	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 958	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1035	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1039		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1062		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1119		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1144		✓	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓
LX 1155	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1170	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 1229		✓	✓			✓	✓					✓
CC 180	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CC 212		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓
CC 213	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CC 260	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓

Quadro 9.3 – Mutações nos nucleótidos características da variante Alfa (linhagem B.1.1.7) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos vivos.

LOCAL NO GENOMA	ORF1a			GENE S						ORF8			GENE N	
SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS	CT1001I	A1708D	I2230T	N501Y	A570D	P681H	T7161I	S982A	D1118H	Q27*	R52I	Y73C	D3L	S235F
Mutações nos nucleótidos	C3267T	C5388A	T6954C	A23063T	C23271A	C23604A	C23709T	T24506G	G24914C	C27972T	G28048T	A28111G	A28281T	C28977T
Amostras														
CV3969	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CV3971	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CV 8074	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LX206	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LX 3010	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓

Quadro 9.4 – Mutações nos nucleótidos características da variante Delta (linhagem B.1.617.2) e respectivas substituições de aminoácidos, no grupo de indivíduos vivos.

LOCAL NO GENOMA	GENE S					ORF3a	GENE M	ORF7a		GENE N		
SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS	T19R	L452R	T478K	P618R	D950N	S26L	I82T	V82A	T120I	D63G	R203M	D377Y
Mutações nos nucleótidos	C21618G	T22917G	C22995A	C23604G	G24410A	C25469T	T26767C	T27638C	C27752T	A28461G	G2881T	G29402T
Amostras												
CF 1824	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CF 1830	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CF 2018		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CF 2025	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 8039	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓
CV 9575	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 9704		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 10172		✓				✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 10191		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	
CV 10192	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 10200	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
CV 10205		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LGM 179	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 2992		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 2993		✓	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓
LX 3009		✓	✓	✓		✓	✓					
LX 3028		✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	✓
LX 3313	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓
LX 3155	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
LX 3162		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓

Quadro 9.5 – Representação do número total de deleções, inserções e substituições de nucleótidos e do número de deleções, inserções e substituições dos respectivos aminoácidos, bem como as deleções que ocorreram em todo o genoma, no grupo de indivíduos cadáver.

Amostra	Nucleótidos			Aminoácidos			Deleções
	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	
LX 83	15	1	0	3	2	0	11075
LX 84	15	0	0	6	0	0	
LX 126	14	0	0	5	0	0	
LX 142	23	10	0	12	3	0	11288-11296, 28271
LX 145	21	11	0	13	4	0	11288-11296, 28254, 28271
LX 181	28	20	0	19	7	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28254, 28271
LX 197	13	0	0	5	0	0	
TV 37	32	19	0	21	6	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28271
LX 200	24	10	0	15	3	0	21765-21770, 21992-21994, 28271
BRR 228	14	3	0	5	0	0	29749-29751
LX 271	25	10	0	14	3	0	11288-11296, 28271
LX 270	15	0	0	6	0	0	
LX 273	12	0	0	5	0	0	
LX 320	18	0	0	9	0	0	
TV 53	13	0	0	4	0	0	
LX 380	16	0	0	7	0	0	
LX 384	13	0	0	8	0	0	
BRR 411	23	1	0	13	0	0	28271
LX 461	15	0	0	5	0	0	
LX 508	12	6	0	6	2	0	515-520
CC 148	13	0	0	4	0	0	
LX 821	14	0	0	6	0	0	

Quadro 9.5 (continuação)

Amostra	Nucleótidos			Aminoácidos			Deleções
	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	
LX 869	16	0	0	7	0	0	
LX 918	39	7	0	29	2	0	28248-28253, 28271
CC 180	32	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
LX 958	40	7	0	28	2	0	28248-28253, 28271
LX 147	32	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
LX 1035	37	7	0	29	2	0	28248-28253, 28271
LX 1039	33	7	0	25	2	0	28248-28253, 28271
LX 1053	33	19	0	19	6	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28271
LX 1062	39	7	0	31	2	0	28248-28253, 28271
LX 1082	15	2	0	5	1	0	27792-27793
LX 1119	36	7	0	29	2	0	28248-28253, 28271
CC 212	32	7	0	22	2	0	28248-28253, 28271
CC 213	38	7	0	28	2	0	28248-28253, 28271
LX 1144	34	7	0	26	2	0	28248-28253, 28271
LX 1155	39	7	0	30	2	0	28248-28253, 28271
LX 1170	40	7	0	28	2	0	28248-28253, 28271
LX 1229	28	7	0	21	2	0	28248-28253, 28271
CC 260	36	7	0	26	2	0	28248-28253, 28271

Quadro 9.6 – Representação do número total de deleções, inserções e substituições de nucleótidos e do número de deleções, inserções e substituições dos respectivos aminoácidos, bem como as deleções que ocorreram em todo o genoma, no grupo de indivíduos vivos.

Amostra	Nucleótidos			Aminoácidos			Deleções
	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	
CV3971	28	20	0	19	7	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28254, 28271
CV3969	30	16	0	19	5	0	11288-11296, 21765-21770, 28271
CV3965	17	0	0	4	0	0	
LX206	43	19	0	22	6	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28271
LX196	21	0	0	6	0	0	
CV4997	13	0	0	4	0	0	
CV6546	15	0	0	6	0	0	
CV6561	11	0	0	5	0	0	
CV6595	14	0	0	5	0	0	
CV6609	18	0	0	8	0	0	
CV6825	15	2	0	5	1	0	27792-27793
CV6864	16	0	0	7	0	0	
CV6900	13	0	0	6	0	0	
CF1824	37	7	0	31	2	0	28248-28253, 28271
CF1830	38	7	0	26	2	0	28248-28253, 28271
CV8039	34	7	0	23	2	0	28248-28253, 28271
CV8074	36	19	0	22	6	0	11288-11296, 21765-21770, 21992-21994, 28271
LX2993	28	7	0	20	2	0	28248-28253, 28271
CV9704	31	7	0	25	2	0	28248-28253, 28271
LX2992	32	7	0	25	2	0	28248-28253, 28271
LX3009	24	7	0	20	2	0	28248-28253, 28271
LX3010	28	13	0	17	4	0	11288-11296, 21992-21994, 28271
LX3028	36	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
CV 9575	38	7	0	29	2	0	28248-28253, 28271

Quadro 9.6 (continuação)

Amostra	Nucleótidos			Aminoácidos			Deleções
	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	Total de substituições	Total de deleções	Total de inserções	
LGM179	33	7	0	26	2	0	28248-28253, 28271
LX3147	19	0	0	5	0	0	
LX3155	36	7	0	27	2	0	28248-28253, 28271
CF2018	34	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
CV10172	28	15	0	20	5	0	515-520, 27580-27581, 28248-28253, 28271
CV10191	33	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
CV10192	33	7	0	24	2	0	28248-28253, 28271
LX3162	34	8	0	26	3	0	11083, 28248-28253, 28271
CV10205	37	7	0	27	2	0	28248-28253, 28271
CF2025	28	7	0	23	2	0	28248-28253, 28271
CV10200	37	7	0	28	2	0	28248-28253, 28271
LX3313	34	7	0	27	2	0	28248-28253, 28271

