

ONCOVID / ONCOBANK: VIGILÂNCIA GENÔMICA RETROATIVA DA CIRCULAÇÃO DE VARIANTES DO SARS-COV-2

LAURA DE AZEVEDO GRACIANO¹; ISABELA SANTIAGO ROSA PIZANI²; WILLIAM BORGES DOMINGUES³; TATIANA SCHÄFFER GREGIANINI⁴; FABIANA KÖMMLING SEIXAS⁵; TIAGO VEIRAS COLLARES⁶

¹Graduação em Medicina, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – lauraagraciano@hotmail.com

²Graduação em Medicina, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – isapizani1@gmail.com

³Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

⁴Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) – tatiana-gregianini@saude.rs.gov.br

⁵Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

⁶UPPGBiotec/UFPEL e HE UFPEL/EBSERH, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, pertence à família dos Coronavírus, grupo de vírus envelopados que possuem RNA linear de fita simples sentido positivo. O primeiro genoma de SARS-CoV-2 foi sequenciado em janeiro de 2020 e desde então, as análises genéticas do vírus em vários países e em diferentes momentos revelaram que o vírus sofreu diversas mutações. A maior parte das mutações é neutra, entretanto, algumas podem resultar em mudanças na forma como o vírus se comporta nas infecções (MICHELON, 2021).

Diferentes linhagens e variantes têm sido observadas, destacando uma crescente modificação do vírus SARS-CoV-2 ao longo do tempo. A co-circulação de diferentes clados genéticos foi observada em vários países, bem como a migração de linhagens genéticas da Europa para a América do Sul. A OMS, ao acompanhar a evolução do SARS-CoV-2, avaliando diversos fatores incluindo transmissibilidade, virulência, alterações fenotípicas e propagação, classificou as variantes circulantes globalmente em variantes de preocupação (VOC) e variantes de interesse em saúde pública (VOI). Foram classificadas no grupo das VOC as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (B.1.1.28.1) e Delta (B.1.617.2); já no grupo das VOI, as variantes Eta (B.1.525), Epsilon (B.1.427/B.1.429), Zeta (B.1.1.28.2), Teta (B.1.1.28.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1) e Lambda (C.37) (MICHELON, 2021).

As principais características das variantes mais recentes consistem em maior afinidade de ligação ao receptor celular, característica que está relacionada à maior transmissão; resistência aumentada a anticorpos neutralizantes, característica mais significativa nas variantes Beta (B.1.351), Gama (P.1) e Delta (B.1.617.2); aumento da virulência, observado principalmente na variante Alfa (B.1.1.7); e o risco aumentado de reinfecção, principalmente para as variantes Gama (P.1), Zeta (P.2) e Delta (B.1.617.2) (MICHELON, 2021).

Diante do cenário de circulação de variantes de SARS-CoV-2 na população, em especial nos grupos de maior risco de infecção e desenvolvimento de sintomas mais graves de COVID-19, merecendo destaque os pacientes oncológicos (Liang et al., 2020) e os profissionais da saúde atuantes na linha de frente (TEIXEIRA et al., 2020), é imprescindível a utilização de ferramentas moleculares para rastreamento epidemiológico tanto em tempo real quanto de forma retroativa, a fim de entendermos

melhor a dinâmica das variantes ao longo tempo, principalmente suas consequências para a saúde pública, uma vez que, por exemplo, certas variantes podem tornarem-se menos sensíveis à neutralização por soros convalescentes ou à respostas de anticorpos neutralizantes induzidas por vacina (EDARA e colab., 2021).

O presente estudo, um recorte do projeto "Oncovid/Oncobank: rastreamento genômico de SARS-CoV-2 e perfil genético de pacientes oncológicos e de profissionais de saúde na pandemia da COVID-19" aprovado junto ao edital Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) do Ministério da Saúde, teve por objetivo a realização de uma análise epidemiológica de forma retroativa da incidência de variantes SARS-CoV-2 a partir de amostras representativas do biorrepositório da Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19 da Universidade Federal de Pelotas e do biorrepositório central do LACEN/RS.

2. METODOLOGIA

Extração de RNA total a partir de amostras de swab nasofaríngeo:

A extração de RNA total foi realizada a partir de amostras do trato respiratório superior e inferior obtidas com o auxílio de *swab* estéril. O processamento foi realizado na Unidade de Diagnóstico Molecular UFPEL COVID-19 do Hospital Escola da UFPEL. Foi utilizado o kit comercial Biociclin DNA/RNA viral, seguindo as instruções do fabricante.

Diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR:

Para a detecção molecular de SARS-CoV-2 nas amostras do presente estudo, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Para amplificação dos fragmentos N1 e N2 do gene que codifica a nucleoproteína de SARS-CoV-2, foram usados primers e sondas moleculares (Integrated DNA Technologies, EUA) de acordo com as sequências propostas pelo CDC. Um *mix* contendo primers e sondas para amplificação do gene da RNase P humana também foi utilizado, a fim de ser usado como controle da qualidade da amostra e da extração de RNA, conforme recomendado pelo CDC. As reações de RT-qPCR foram preparadas utilizando o kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante, e realizadas no equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, EUA).

Ensaio de genotipagem de SARS-CoV-2:

Foram utilizadas 511 amostras positivas por RT-qPCR para o gene N1/N2 do SARS-CoV-2 com CTs ≤ 30 para identificação da presença de mutações chaves das variantes P2 (Zeta), P1(Gama), B.1.1.7 (Alfa), B.1.351 (Beta), bem como a ausência destas mutações no genoma de referência Wuhan.

As reações de genotipagem foram conduzidas no sistema de PCR em tempo real AriaMx (Agilent Technologies, EUA), utilizando o TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (ThermoFisher, EUA) em conjunto com os primers e sondas do TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

O resultado do genótipo foi alcançado através do conjunto das sondas em cada amostra, resultando em um perfil de mutações característicos de cada variante analisada neste estudo. A análise dos dados da detecção das mutações foi feita no *software* AriaMx (Agilent, EUA), sendo considerada a detecção dos fluoróforos FAM para o alelo mutado e VIC para o alelo de referência (selvagem não mutado).

Todas as reações foram feitas em duplicatas, sendo o resultado de cada amostra aceito somente caso a duplicata produzisse o mesmo dado. Além disso, foram testados controles positivos (amostras previamente sequenciadas das variantes) e controles negativos (ausência de amostras de SARS-CoV-2 nos ensaios de genotipagem).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma análise de outubro de 2020 a julho de 2021, o número total de casos positivos para COVID-19 na cidade de Pelotas foi de 38.336 (Figura 1A), com média mensal de 3.833 casos, sendo dezembro de 2020 (6.685 casos) e março de 2021 (5.589), meses que fogem ao padrão, indicando tratarem-se de meses em que as novas variantes se estabeleceram de modo mais concreto, sendo que, após esse período, o número de casos retorna ao padrão esperado. Ademais, um levantamento realizado através do Painel COVID de Pelotas, demonstrou que houveram 950 óbitos no período analisado (Figura 1B). Nos meses de dezembro e março, (102 e 154 óbitos), nos quais os números de casos aumentaram, também é possível observar uma quebra no padrão de óbitos até então, que aumentaram concomitantemente à introdução de novas variantes (Figura 2) e ao aumento do número de casos (Figura 1A), mesmo com a ampliação da vacinação.

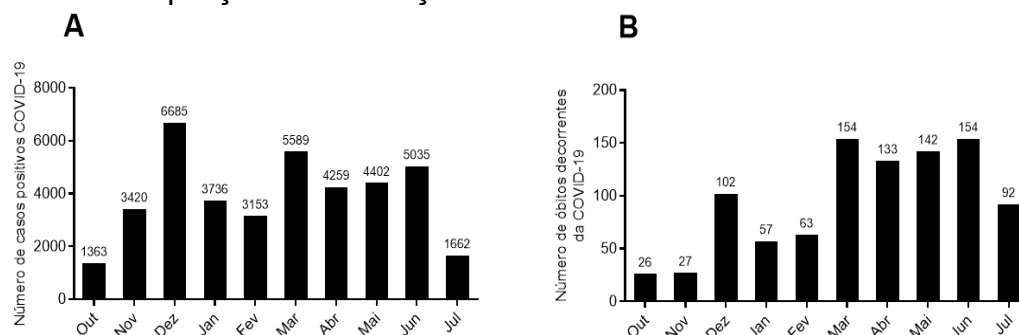


Figura 1. A) Número de casos positivos para SARS-CoV-2 e B) número de óbitos decorrentes da COVID-19 na cidade de Pelotas - RS no período de outubro de 2020 a julho de 2021.

Para a análise epidemiológica da circulação das variantes, um conjunto de amostras representativas de cada mês (de acordo com o número de casos identificados naquele mês) foi utilizado, totalizando 511 amostras positivas para determinação da variante de SARS-CoV-2 em cada caso (Figura 2).

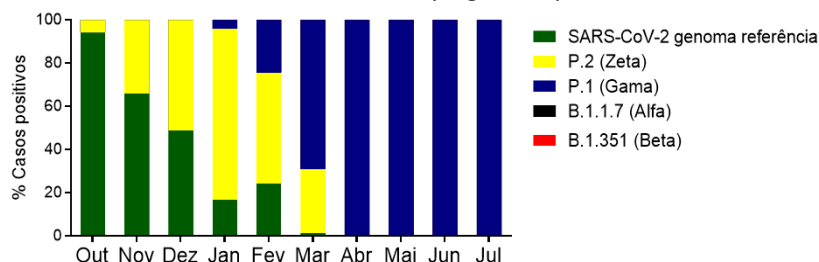


Figura 2. Gráfico da incidência de casos positivos de SARS-CoV-2 de acordo com a variante genética responsável em um conjunto representativo de amostras provenientes da UDM UFPel e LACEN/RS de outubro de 2020 a julho de 2021.

Dessa forma, foi possível constatar que em outubro de 2020 a cidade de Pelotas contava com 94,12% dos casos de COVID-19 sendo provocados pelo SARS-CoV-

2 genoma de referência, sendo o vírus primariamente identificado nos primeiros casos da doença, enquanto apenas 5,88% eram devidos a variante P.2 (Zeta). Em dezembro de 2020 esse cenário foi se alterando e o vírus de referência, agora responsável por 48,84% dos casos, foi perdendo espaço para a P.2 (51,16%), variante de maior taxa de transmissibilidade. Já em janeiro de 2021, embora a variante P.2 ainda fosse a principal em Pelotas (79,17%), iniciaram-se os casos da variante P.1 Gamma (4,16%), que também foi se sobrepondo às variantes pré-identificadas e, já em abril de 2021 passou a determinar 100% dos casos de COVID-19, fato que se manteve até julho do mesmo ano, último período de análise. Situação semelhante foi encontrada de forma geral no Rio Grande do Sul (VARELA, 2021). Ainda, embora outras variantes eram descritas ao redor do mundo, como Alpha (B.1.1.7) e Beta (B.1.351), elas não se faziam presentes na cidade de Pelotas dentro do período de 10 meses estudado.

Todas as amostras previamente genotipadas por sequenciamento genômico cedidas pelo LACEN/RS resultaram no mesmo genótipo de SARS-CoV-2, demonstrando a reprodutibilidade e acurácia dos ensaios de genotipagem aqui utilizados.

4. CONCLUSÕES

O trabalho de rastreamento retroativo das variantes do SARS-CoV-2 relatado aqui foi importante não somente para validar os ensaios de genotipagem a partir da confirmação em amostras previamente genotipadas, mas também analisar temporalmente a incidência destas variantes na população da cidade de Pelotas e possibilitar fazer inferências sobre as consequências de novas variantes na sociedade. Acompanhar essas mudanças nos ajudará a entender e controlar melhor a pandemia, uma vez que já é sabido que variantes podem adquirir mutações que tornem o agente mais letal.

A partir destes resultados, está sendo possível a implementação destes ensaios de genotipagem para o monitoramento em tempo real dos casos nos profissionais da saúde e pacientes oncológicos usuários do SUS no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LIANG, Wenhua et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 3, p. 335-337, 2020.
- MICHELON, Cleonice Maria. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2021. Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/principais-variantes-do-sars-cov-2-notificadas-no-brasil/>>. Acesso em: 15 ago 2022.
- TEIXEIRA, Carmen Fontes de Souza e colab. A saúde dos profissionais de saúde no enfrentamento da pandemia de Covid-19. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 9, p. 3465–3474, Set 2020.
- VARELA, Ana Paula Muterle *et al.* SARS-CoV-2 introduction and lineage dynamics across three epidemic peaks in Southern Brazil: massive spread of P.1. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, p. 105144, 2021.
- EDARA, Venkata-Viswanadh et al. Infection and Vaccine-Induced Neutralizing-Antibody Responses to the SARS-CoV-2 B.1.617 Variants. **New England Journal of Medicine**, 7 Jul 2021. Disponível em: <10.1056/NEJMc2107799>. Acesso em: 15 ago 2022.