



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Dayane Azevedo Padilha

Vigilância genômica do SARS-CoV-2 na pandemia da COVID-19 no estado de Santa Catarina: da dispersão de variantes a compreensão de coinfeções

Florianópolis

2024

Dayane Azevedo Padilha

Vigilância genômica do SARS-CoV-2 na pandemia da COVID-19 no estado de Santa Catarina: da dispersão de variantes a compreensão de coinfeções

Tese de doutorado submetida à comissão julgadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador:
Prof., Dr. Glauber Wagner

Coorientadora:
Prof.(a), Dr.(a) Gislaine Fongaro

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Azevedo Padilha, Dayane

Vigilância genômica do SARS-CoV-2 na pandemia da COVID-19 no estado de Santa Catarina: da dispersão de variantes a compreensão de coinfeções / Dayane Azevedo Padilha ; orientador, Glauber Wagner, coorientadora, Gislaine Fongaro, 2024.

130 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Vigilância genômica. 3. SARS-CoV-2. 4. Pandemia da COVID-19. 5. Coinfeções. I. Wagner, Glauber. II. Fongaro, Gislaine. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Dayane Azevedo Padilha

Vigilância genômica do SARS-CoV-2 na pandemia da COVID-19 no estado de Santa Catarina: da dispersão de variantes a compreensão de coinfeções

O presente trabalho em nível de tese de doutorado foi avaliado em 10 de maio de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Camila Malta Romano, Dr^a.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Prof^a Izabella Thaís, Dr^a.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Fernanda Rosene Melo, Dr^a.

Instituição Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina

Prof^a Ingra Morales Claro, Dr^a.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Prof. Aguinaldo Roberto Pinto, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof Orientador Glauber Wagner, Dr.

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho a todos que precisaram ressignificar suas vidas de alguma forma após a pandemia da COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, minha mãe Valéria, meu avô e figura paterna Jorvanil, minhas tias Sônia e Cristina e minha avó Marlene (*in memorian*), que mesmo diante de circunstâncias desfavoráveis, me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e objetivos. Ao meu marido e amado companheiro Ícaro que há mais de 14 anos acredita e me fez acreditar em minhas qualificações profissionais, muito obrigada por sempre ser fiel e paciente, além de estar ao meu lado mesmo nos momentos mais desafiadores, você me dá forças e me faz querer ser melhor todos os dias. À minha sogra Maria Salete que me acolheu em sua casa e em sua “asa” se tornando minha figura materna aqui em Florianópolis, desde o momento em que minha história na Universidade Federal de Santa Catarina ainda era um sonho.

Aos meus amigos e padrinhos de casamento Karina, Bernardo e Cris, vocês são meu aconchego nos sábados à noite e na vida. Às minhas amigas Amanda e Eluana, amigas que eu trouxe do ensino médio para a vida, e que por isso conhecem toda a evolução pessoal e profissional pela qual passei. Às minhas amigas de formação, Thaís, Mauren, Malu, Elba, Mari, Ina e Paulina, ninguém sabe mais do que nós o como foi difícil alcançar o que cada uma de nós está alcançando. Aos meus amigos “Ébrios” Kaique, Tathy, Carol, Jean, Jobi, Klaus, Teshy, Luiza, Alexandre, Aline, Henrique, Sophia, Leandra, Laís, Carine, Schuster, dentre outros tantos, que nos vários momentos que temos a oportunidade do encontro, deixam minha vida mais leve. À equipe P&D da Caldic pela parceria do dia a dia. Aos meus amigos de laboratório “imbatíveis e tristes”, Bea, Carol, Gui, Eric, Fernando, Karin, Renato, Taty e Vilmar, muito obrigada por me acolherem e me fazerem sentir em casa desde o primeiro dia.

Aos integrantes do Laboratório de Bioinformática, do Laboratório de Virologia Aplicada, do Laboratório de Protozoologia e do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, que juntos possibilitaram a realização e enriquecimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Glauber Wagner, exemplo de pesquisador ético, humano e competente, que mantém e transmite calma e cuidado. À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Gislaine Fongaro, inspiração e exemplo de mulher forte e decidida, que mesmo jovem alcançou o que parecia inatingível.

Aos membros da banca que aceitaram dispor de tempo e paciência na avaliação deste trabalho tão importante para minha trajetória profissional.

À Universidade Federal de Santa Catarina, minha casa há 11 anos. Aos servidores da universidade e do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) por toda a ajuda e disponibilidade. À DIVE, LACEN, Secretaria de Saúde, Hospitais e parceiros deste projeto. Às agências de fomento FAPESC e CAPES pelo suporte financeiro.

Ao universo por me permitir conhecer e conviver com tantas pessoas de tão bom coração.

“Estude a si mesmo, observando que o autoconhecimento traz humildade e sem humildade é impossível ser feliz.” (Allan Kardec, 1804 – 1869)

RESUMO

Desde o início de 2020, a pandemia causada pelo Vírus Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) vem gerando impactos sócio-econômicos de magnitudes globais, levando a problemas de saúde pública. Este patógeno é classificado como um Betacoronavirus, da família *Coronaviridae*, e dentre as principais características possui um material genético de RNA de sentido positivo que propicia o acúmulo de modificações genéticas (polimorfismos) que podem alterar a biologia e *fitness* viral, originando novas variantes virais. Estes polimorfismos podem alterar a eficiência da interação patógeno-hospedeiro, aumentar a capacidade infectiva e de transmissibilidade, diminuir eficácia terapêutica e vacinal, podendo impactar no desfecho clínico dos pacientes. Com isto, o acompanhamento da evolução destas mutações e o surgimento de variantes virais por meio da vigilância genômica torna-se fundamental. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo acompanhar a distribuição das variantes de SARS-CoV-2 por meio de sequenciamento nas cinco mesorregiões do Estado de Santa Catarina (Sul do Brasil). Durante o primeiro ano de pandemia (de março de 2020 a abril de 2021), foram sequenciadas 203 amostras de pacientes detectados para SARS-CoV-2, o que representou 26% do total de amostras sequenciadas em todo o estado de Santa Catarina para o mesmo período. Neste primeiro período deste estudo, foi possível observar o surgimento da variante P.1-Like II (uma subvariante da linhagem *Gamma* ou P.1). Esta diferencia-se da variante *Gamma* principalmente pela presença da mutação T20N na proteína estrutural *Spike*. Também foi observado que a subvariante P.1-Like II permaneceu mais localizada na região Oeste do estado de Santa Catarina, sendo possível identificar que concomitante a este período foi observado um aumento da taxa de mortalidade nesta mesma região. Durante o segundo ano pandêmico (de maio de 2021 a abril de 2022), foi possível observar, a partir do sequenciamento de 5.181 amostras, a presença de 55 diferentes linhagens e quatro variantes (*Alpha*, *Delta*, *Gamma*, e 2 subvariantes *Omicron* - BA.1 e BA.2). Com isto, observou-se a ascensão da *Omicron* a partir de novembro de 2021, em substituição a variante *Delta*. Apesar do aumento no número total de casos durante o período de predomínio da variante *Omicron*, foi observado que número de mortes por dia foi maior no período em que a variante *Gamma* foi predominante. Isto reforça a hipótese de que modificações genéticas que elevam a taxa de transmissibilidade viral podem não estar relacionadas com o aumento da taxa de mortalidade. Contudo, não podemos descartar a hipótese de que o aumento da cobertura vacinal e infecções preliminares podem ter contribuído na redução do número de óbitos durante este período. Outro resultado importante observado neste segundo período do estudo foi que a mudança de predomínio da variante *Delta* para *Ômicron* foi observada anteriormente nos profissionais de saúde, indicando que as variantes circulantes nos profissionais de saúde refletem a dispersão das variantes de SARS-CoV-2 circulantes na população geral, o que nos levou a crer que os profissionais de saúde podem ser utilizados como grupo sentinela, não apenas para o número de casos, mas também na identificação precoce das variantes circulantes em uma população. Diante deste cenário, foi possível demonstrar claramente a importância da vigilância genômica do SARS-CoV-2 durante dois anos de pandemia no estado de Santa Catarina. Adicionalmente, estudos já demonstraram a importância no desfecho

clínico de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios. Assim também avaliamos a existência destas coinfeções em 187 amostras, entre novembro de 2021 a abril de 2022. Dentre os pacientes não detectados para SARS-CoV-2, observou-se a presença de metapneumovírus humano (HMPV), vírus sincicial respiratório (RSV), rinovírus humano (HRV) e vírus parainfluenza (PIV). Já nas coinfeções com SARS-CoV-2, houve maior detecção dos vírus HRV, adenovírus humano (HAdV) e influenza A (Gripe A), podendo este diferente padrão diagnóstico modificar a sintomatologia e o desfecho do quadro clínico dos pacientes. Diante do exposto, os resultados encontrados neste trabalho reforçam a importância clínica e epidemiológica da vigilância genômica durante dois anos pandêmicos. Com este trabalho, também foi possível identificar os profissionais de saúde como grupo sentinela representativo das variantes de SARS-CoV-2 circulantes na população, além de monitorarmos a presença de coinfeções de SARS-CoV-2 com outros vírus respiratórios que pudessem agravar o estado clínico dos pacientes.

Palavras-chave: Vigilância genômica; SARS-CoV-2; VOC; VOI; Grupo sentinela. Coinfeção.

ABSTRACT

Since the beginning of 2020, the pandemic caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been generating socio-economic impacts of global magnitude, leading to public health problems. This pathogen is classified as a Betacoronavirus, from the *Coronaviridae* family, and among its main characteristics it has a positive-sense RNA genetic material that allows the accumulation of genetic modifications (polymorphisms) that may be capable of altering viral biology and fitness, which give rise to new viral variants. These polymorphisms can alter the efficiency of the pathogen-host interaction, increase the infective and transmissibility capacity, reduce therapeutic and vaccine efficacy, and may impact the clinical outcome of patients. Therefore, monitoring the evolution of these mutations and the emergence of viral variants through genomic surveillance becomes essential. In view of the above, this work aimed to monitor the distribution of variants of SARS-CoV-2 through sequencing in the five mesoregions of the State of Santa Catarina (Southern Brazil). During the first year of the pandemic (from March 2020 to April 2021), 203 samples from patients detected for SARS-CoV-2 were sequenced, which represented 26% of the total samples sequenced throughout the state of Santa Catarina in this period. In this first period of this study, it was possible to observe the emergence of the P.1-Like II variant (a subvariant of the Gamma variant or P.1 lineage). This subvariant differs from Gamma mainly due to the presence of the T20N variation in the Spike structural protein. It can also be observed that P.1-Like II remained more regionalized in the Western region of the state, making it possible to identify that, concomitantly with this period, an increase in the mortality rate was observed in this same Western region. During the second pandemic year (from May 2021 to April 2022), it was possible to observe, from the sequencing of 2,080, the presence of 55 different lineages and four variants (Alpha, Delta, Gamma, and 2 Omicron - BA sub variants. 1 and BA.2). Because of this, the rise of Omicron was observed from November 2021, replacing the Delta variant. Despite the increase in the total number of cases during the period in which the Omicron variant predominated, it was observed that the number of deaths per day was higher in the period in which the Gamma variant was predominant. This reinforces the hypothesis that genetic modifications that increase the rate of viral transmissibility may not be related to an increase in mortality rates. However, we cannot rule out the hypothesis that increased vaccination coverage and preliminary infections may have contributed to the reduced number of deaths during this period. Another important result observed in this second period of the study was that the change in predominance of Delta to Omicron variant was previously observed in healthcare professionals, indicating that the variants circulating in healthcare professionals reflect the dispersion of SARS-CoV-2 variants circulating in the general population, which led us to believe that health professionals are good sentinel groups, not only for the number of cases, but also for observing the variants circulating in a population. Given this scenario, it was possible to clearly demonstrate the importance of genomic surveillance of SARS-CoV-2 during two years of pandemic in the State of Santa Catarina. Additionally, studies have already demonstrated the importance of clinical findings of patients coinfecting with SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. Therefore, we evaluated the existence of these coinfections in 187 samples, between November 2021 and April 2022. Among

patients not detected for SARS-CoV-2, the presence of human metapneumovirus (HMPV), respiratory syncytial virus (RSV), human rhinovirus (HRV) and parainfluenza virus (PIV) was observed. In coinfections with SARS-CoV-2, there was greater detection of the HRV, human adenovirus (HAdV) and Influenza A (Flu A) viruses, and this different diagnosis pattern may modify the symptoms and clinical outcomes of the patients. In view of the above, the results found in this work reinforce the clinical and epidemiological importance of genomic surveillance.

Keywords: Genomic surveillance; SARS-CoV-2; VOC; VOI; Sentinel group; Coinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição estrutural do HcoVs.....	30
Figura 2. Biossíntese do SARS-CoV-2.....	32
Figura 3. Perfil das variantes do SARS-CoV-2 ao longo de 2 anos de Pandemia da COVID-19.....	37
Figura 4. Organização da tese de doutorado.....	43
Figure 5. Graphycal abstract Emergence of Two Distinct Sars-Cov-2 Gamma Variants And The Rapid Spread Of P.1-Like-li Sars-Cov-2 During The Second Wave Of Covid-19 In Santa Catarina, Southern Brazil.....	46
Figure 6. Distribution of sequenced SARS-CoV-2 genomes in Santa Catarina from 1st March 2020 to 30th April 2021.....	49
Figure 7. SARS-CoV-2 variant profiles in the state of Santa Catarina from March 2020 to April 2022.....	53
Figure 8. Phylogenomic reconstruction analysis of Santa Catarina SARS-CoV-2 sequences from 1st March 2020 to 30th April 2021.....	55
Figure 9. Multidimensional scale (MDS) plot of Jaccard dissimilarity matrix.....	56
Figure 10. The non-synonymous amino acid substitution profile.....	57
Figure 11. Overlay of VOC Gamma spike protein mutations identified in the state of Santa Catarina during the COVID-19 pandemic.....	58
Figure 12. Network analysis of VOC Gamma and related lineages sequenced in the state of Santa Catarina.....	60

Figure 13. Network analysis of VOC Gamma and related lineages sequenced in the state of Santa Catarina, Brazil, from 3rd January 2020 to 30th April 2021 with the other Brazilian states.....	61
Figure 14. Relative frequencies of the SARS-CoV-2 VOC Gamma and related lineages by mesoregions of the state of Santa Catarina during the second wave of the COVID-19 pandemic, January to April 2021.....	62
Figure 15. Number of cases/deaths and variant distribution of SARS-CoV-2 from 1 May 2021 to 30 April 2022.....	83
Figure 16. Comparison of relative frequency for each SARS-CoV-2 lineage in healthcare workers and general population during the variant shift from Delta to Omicron.....	84
Figure 17. Multidimensional scale (MDS) with Jaccard dissimilarity plot of genomes based on amino acids and presence/absence of mutations, deletions, and insertions.....	85
Figure 18. Viral profile in positive and negative SARS-CoV-2 samples.....	99
Figure 19. Summary of viral infection related to SARS-CoV-2 diagnostic.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ACE2: *Angiotensin Converting Enzyme 2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2)

CDC: Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

E: Envelope

ECDC: Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control*)

FISH: Hibridização *in situ* por Fluorescência

GISAID: *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*

H1N1: *Hemagglutinin 1 Neuraminidase 1*

H2N2: *Hemagglutinin 2 Neuraminidase 2*

H3N2: *Hemagglutinin 3 Neuraminidase 2*

HCoVs: Coronavírus Humanos (*Human Coronaviruses*)

HCWs: Trabalhadores de Saúde (*Health Care Workers*)

HCMV: Citomegalovírus Humano (*Human Cytomegalovirus*)

HCV: Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HSV: Vírus do Herpes Simples (*Herpes Simplex Virus*)

JAK/STAT: *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*

Kb: Kilobases

LAMP: Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop*

M: Membrana

MERS-CoV: Síndrome Respiratória do Oriente Médio (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)

MS: Ministério da Saúde

NF- κ B: Fator Nuclear Kappa B (*Nuclear Factor Kappa B*)

NGS: Sequenciamento de Nova Geração

NIH: Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health*)

N: Nucleocapsídeo

NSPs: Proteínas Não Estruturais (*Non-Structural Proteins*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde (*Pan American Health Organization*)

ORF: *Open Reading Frames* (Quadros de Leitura Abertos)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PI3K/AKT/mTOR: Fosfatidilinositol 3-quinase/Proteína Quinase B/Alvo da Rapamicina em Mamíferos (*Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B/Mammalian Target of Rapamycin*)

RAF/MEK/ERK: Quinase de Ativação de Fibroblastos/Mitogênio-Ativado Quinase/Quinase Regulatória de Sinal Extracelular (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

RBD: Domínio de Ligação ao Receptor (*Receptor Binding Domain*)

RE: Retículo Endoplasmático

RNA: Ácido Ribonucleico

RSV: Vírus Sincicial Respiratório (*Respiratory Syncytial Virus*)

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

S: Espícula

SARS-CoV: Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*)

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)

TB: Tuberculose (*Tuberculosis*)

UV: Ultravioleta

VOC: Variantes de Preocupação (*Variants of Concern*)

VOI: Variante de Interesse (*Variants of Interest*)

VUMs: Variantes de Monitoramento (*Variants Under Monitoring*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 CARACTERÍSTICAS DOS VÍRUS E PATOGÊNESE VIRAL.....	23
1.2 PANDEMIAS: UM BREVE HISTÓRICO.....	24
1.3 A PANDEMIA DA COVID-19.....	26
1.4 O VÍRUS SARS-COV-2.....	28
1.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	33
1.6 VIGILÂNCIA GENÔMICA NO CONTEXTO DA COVID-19.....	28
1.7 GRUPO SENTINELA.....	38
1.8 COINFEÇÕES.....	39
1.9 JUSTIFICATIVA.....	32
2 OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 ORGANIZAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO.....	43
4 CAPÍTULO I - EMERGENCE OF TWO DISTINCT SARS-COV-2 GAMMA VARIANTS AND THE RAPID SPREAD OF P.1-LIKE-II SARS-COV-2 DURING THE SECOND WAVE OF COVID-19 IN SANTA CATARINA, SOUTHERN BRAZIL.....	44
4.1 ABSTRACT.....	45
4.2 INTRODUCTION.....	46
4.3 MATERIAL AND METHODS.....	48
4.3.1 STUDIED REGIONS AND SAMPLING.....	48
4.3.2 RNA PURIFICATION AND SEQUENCING.....	50
4.3.3 SARS-COV-2 GENOME ASSEMBLING AND VARIANT ANALYSIS.....	50
4.3.4 MAXIMUM-LIKELIHOOD (ML) PHYLOGENETIC ANALYSIS.....	51
4.3.5 NETWORK ANALYSIS OF SC VOC GAMMA AND RELATED LINEAGES DURING THE SECOND WAVE.....	51

4.3.6 SPIKE (S) GENE SEQUENCE POLYMORPHISM AND PROTEIN STRUCTURE ANALYSIS.....	52
4.4 RESULTS.....	52
4.4.1 PROFILE OF SARS-COV-2 VARIANTS IN STATE OF SANTA CATARINA AFTER ONE YEAR OF COVID-19 PANDEMIC.....	52
4.4.2 VOC GAMMA AND RELATED LINEAGES IN SANTA CATARINA.....	54
4.4.3 THE RAPID SPREAD AND REGIONALIZATION OF P.1-LIKE-II DURING THE SECOND WAVE OF COVID-19 PANDEMIC IN SANTA CATARINA, BRAZIL.....	59
4.5 DISCUSSION.....	63
4.6 CONCLUSION.....	67
ACKNOWLEDGMENTS.....	67
FUNDING.....	68
DISCLAIMERS.....	68
4.7 REFERENCES.....	68
5 CAPÍTULO II - GENOMIC SURVEILLANCE OF SARS-COV-2 IN HEALTHCARE WORKERS: A CRITICAL SENTINEL GROUP FOR MONITORING THE SARS-COV-2 VARIANT SHIFT.....	75
5.1 ABSTRACT.....	76
5.2 INTRODUCTION.....	76
5.3 MATERIAL AND METHODS.....	78
5.3.1 STUDIED REGIONS AND SAMPLING.....	78
5.3.2 SARS-COV-2 GENOME SEQUENCING.....	79
5.3.3 GENOME SAMPLING.....	80
5.3.4 SARS-COV-2 VARIANT ANALYSIS.....	81
5.3.5 MAXIMUM LIKELIHOOD (ML) PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HCW.....	81
5.4 RESULTS.....	82

5.4.1 PROFILE OF SARS-COV-2 VARIANTS IN SANTA CATARINA (BRAZIL) DURING THE SECOND YEAR OF THE COVID-19 PANDEMIC PERIOD (MAY 2021 TO APRIL 2022)	82
5.4.2 VARIANT SHIFT (DELTA TO OMICRON) IN HCW AND GENERAL POPULATION IN SANTA CATARINA (BRAZIL)	84
5.5 DISCUSSION.....	85
5.6 CONCLUSION.....	88
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	89
FUNDING.....	89
INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT.....	90
INFORMED CONSENT STATEMENT.....	90
DATA AVAILABILITY STATEMENT.....	90
ACKNOWLEDGMENTS.....	90
CONFLICTS OF INTEREST.....	91
5.7 REFERENCES.....	91
6 CAPÍTULO III - MONITORING OF RESPIRATORY VIRUS COINFECTION IN SOUTHERN BRAZIL DURING COVID-19 PANDEMIC.....	94
6.1 ABSTRACT.....	95
6.2 INTRODUCTION.....	95
6.3 MATERIALS AND METHODS.....	97
6.3.1 SAMPLES PROCESSING.....	97
6.3.2 RNA PURIFICATION AND PCR.....	97
6.3.3 STATISTICAL ANALYSIS.....	97
6.4 RESULTS.....	98
6.5 DISCUSSION.....	100
6.6 CONCLUSION.....	104
DISCLAIMER.....	104

FUNDING.....	104
INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT.....	104
ACKNOWLEDGMENTS.....	105
6.7 REFERENCES.....	105
7 DISCUSSÃO.....	108
8 CONCLUSÕES.....	113
9 REFERÊNCIAS.....	115
10 GLOSSÁRIO.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DOS VÍRUS E PATOGÊNESE VIRAL

Os vírus são estruturas nanométricas com ciclo replicativo intracelular obrigatório, compostos por material genético de DNA ou RNA, envolto por capa proteica, possuindo em sua superfície ligantes responsáveis pela interação patógeno-hospedeiro a qual possibilita a perfusão viral. Devido ao seu pequeno tamanho, de maneira geral, os vírus não podem ser vistos por microscopia óptica ou serem filtrados por filtros comuns. Como consequência da sua característica de replicação intracelular obrigatória, também não podem ser cultivados em meio artificial, sendo para isto necessário o uso de sistemas celulares (SANTOS; ROMANOS; WIGGS, 2015; PELLET; MITRA; HOLLAND, 2014; HOWLEY; KNIPE; WHELAN, 2021).

De maneira geral os vírus são compostos por: capsídeos (unidade proteica que protege o material genético); Envelope (estrutura que deriva da membrana celular por meio do processo de brotamento); Ácido nucleico viral (estruturas genômicas diversas, que podem ser haploide ou diploide, possuindo fita dupla, simples, circular ou linear, fita única ou segmentada, além de DNA ou RNA de polaridade positiva ou negativa (SANTOS; ROMANOS; WIGGS, 2015; HOWLEY; KNIPE; WHELAN, 2021).

A patogenicidade ou virulência viral são caracterizadas pela capacidade de o patógeno infectar o hospedeiro e causar doença. Esta característica é dependente de diferentes fatores, podendo variar de acordo com a capacidade de resistência do inóculo viral às condições ambientais, tais como temperatura, pH, ultravioleta (UV) e salinidade. Esta patogenicidade é dependente também do acesso físico do patógeno ao hospedeiro, da capacidade replicativa viral, da capacidade de evasão do sistema imune, além de outros fatores como infectividade, infecciosidade, expressão proteica viral e relação patógeno-hospedeiro (SANTOS; ROMANOS; WIGGS, 2015; HOWLEY; KNIPE; WHELAN, 2021).

As características virais estruturais e genômicas, bem como a capacidade viral de gerar doenças (patogenicidade ou virulência), nos leva a entender os motivos de os vírus mais adaptáveis serem os maiores causadores de doenças,

podendo se espalhar com facilidade e gerar epidemias locais ou mesmo pandemias de nível mundial (DORP et al., 2020).

1.2 PANDEMIAS: UM BREVE HISTÓRICO

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2022), a pandemia (do grego *Pandemos* ou “de todas as pessoas”) é caracterizada por uma epidemia espalhada por vários países e continentes, afetando muitas pessoas. Previamente, a definição de pandemia era diversa e nem sempre representava todos os contextos pandêmicos existentes durante a história, e mais recentemente a definição mais aceita foi relatada por Campos, que definiu pandemia como 'surtos graves e de rápida propagação de doenças infecciosas' (CAMPOS, 2020; KHAN et al., 2020).

As pandemias já foram capazes de dizimar populações, e dentre as reconhecidas pandemias existentes podemos citar: pandemia da Cólera (causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, sendo este patógeno causador de sete pandemias, com a primeira originada na Índia em 1817); pandemia conhecida como Peste, podendo ser elas bubônica, pneumônica primária ou secundária e septicêmica (todas provenientes de bactéria *Yersinia pestis*, transmitida pelo rato preto, sendo a primeira Peste datada de 542-546 d.C., causando quase 100 milhões de mortes); Pandemia do HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana), que foi reconhecida como doença nos anos 1980, sendo causada pelos retrovírus que afetam Linfócitos T CD4+ e gerando uma pandemia que contaminou quase 75 milhões de pessoas, levando a 32 milhões de mortes ocasionadas pela AIDS (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome* ou síndrome da imunodeficiência adquirida); adicionalmente, também podemos citar as pandemias ocasionadas pelos vírus respiratórios (KHAN et al., 2020).

Relatos históricos da Grécia antiga já traziam o acometimento populacional causado por viroses respiratórias desde o ano 412 a.C. (SANTOS; ROMANOS; WIGGS, 2015; HOWLEY; KNIPE; WHELAN, 2021). Mais recentemente, a identificação de pandemias causadas por infecções virais respiratórias foi relatada primeiramente pela gripe russa ou gripe asiática de 1889, causada pelo vírus

Influenza H1N1 (**Hemagglutinin 1 Neuraminidase 1**). Posteriormente, no ano de 1918, foi identificada a gripe Espanhola, considerada a causadora da mais fatal pandemia da época, sendo capaz de infectar aproximadamente 50% da população mundial, atingindo um índice máximo de mortalidade de 598 mortes para cada 100.000 habitantes, representando um total de 17-50 milhões de mortes (FERGUSON et al., 2006; KHAN et al., 2020). Em 1957, nos primeiros seis meses, 50% da população mundial foi acometida pela gripe asiática causada pelo vírus *Influenza* (FLUV) H2N2 (**Hemagglutinin 2 Neuraminidase 2**), levando à morte de pelo menos 1 milhão de pessoas (VYNNYCKY, EDMUNDS, 2008).

A gripe de Hong Kong H3N2 - **Hemagglutinin 3 Neuraminidase 2** (identificada em 1968), apesar de ter uma menor taxa de mortalidade, teve como principal característica a alta transmissibilidade e rápida dispersão viral mundial (JACKSON, VYNNYCKY, MANGTANI, 2010). Adicionalmente, a pandemia causada pelo H1N1 (gripe suína), no ano de 2009, espalhou-se para 122 países em menos de seis semanas, diferentemente de outras pandemias que costumavam levar meses para se espalhar. Diante disso, especulou-se que essa transmissibilidade esteja relacionada ao reflexo da globalização mundial, devido ao maior fluxo de pessoas e animais em um curto período de tempo, do que apenas uma maior capacidade infectiva do vírus (HENDERSON et al., 2009).

Diante deste contexto e tendo em vista o padrão temporal das pandemias que causaram as diferentes gripes no século 20 e daquelas que surgiram no início do século 21, era esperado o aparecimento de uma nova pandemia provocada por algum vírus *Influenza*, entretanto, diferente da pandemia causada pelo Coronavírus, como de fato aconteceu. Adicionalmente, e diferentemente das pandemias anteriores, a pandemia causada pela doença da COVID-19 (*do inglês, **Coronavirus Disease 2019***) se espalhou rapidamente e atingiu a população mundial com muito mais velocidade do que as outras pandemias, muito provavelmente em razão do maior fluxo de pessoas entre os continentes (AKIN; GOZEL, 2020).

1.3 A PANDEMIA DA COVID-19

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o surto que levava os pacientes à síndrome respiratória aguda grave como pandemia. A COVID-19 foi mencionada primariamente pela OMS em 31 de dezembro de 2019 (OMS, 2022), porém ainda há controvérsia entre os cientistas com relação à verdadeira data do surgimento desta doença. Alguns estudos relatam que a doença foi identificada primeiramente em Wuhan, China, quando um paciente de 40 anos do sexo masculino começou a apresentar sintomas respiratórios relatados em 31 de dezembro de 2019. Contudo, alguns relatos retrospectivos baseados em análise genômica revelaram a presença do genoma do agente causados da COVID-19 circulante ainda em novembro de 2019 (BRYNER, 2020; DESLANDES et al., 2020; FONGARO et al., 2021; WHO, 2022).

Após o relato dos primeiros casos da COVID-19, o patógeno foi analisado com base em sua estrutura genômica e se identificou que a doença era ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2 da família dos coronavírus, vírus até então não conhecido. Surtos epidêmicos ocasionados por esta família de patógenos já aconteceram em 2003 com o SARS-CoV e em 2012 com o MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*, traduzido como Síndrome Respiratória do Oriente Médio), que juntos levaram à aproximadamente 10.000 casos, com 37% e 10% de mortalidade, respectivamente (GROOT et al., 2013; WHO, 2022).

Até março de 2024, a doença causada pelo SARS-CoV-2, já foi responsável por mais de 770 milhões de casos e aproximadamente 7 milhões de mortes acumuladas mundialmente, sendo as regiões mais notificadas a Europa, seguida das Américas, e a menos notificada a região da África. Vale ressaltar que o que é reportado pela OMS depende da adequada notificação destas doenças que são de notificação compulsória, então, estes dados epidemiológicos podem ser subnotificados tanto pela ineficiência do sistema de saúde quanto pela falta de condições adequadas e necessárias ao diagnóstico preciso e rápido (WHO, 2024).

O Brasil foi, em meados de 2022, o país com o terceiro maior número de casos da COVID-19 registrados no mundo, depois dos Estados Unidos e da Índia,

terceiro e segundo países mais populosos, respectivamente (WHO, 2024; Population Pyramid, 2024).

Entre 2020 e 2024, o Brasil enfrentou uma trajetória complexa durante a pandemia de COVID-19. Em 2020, o país foi impactado por um rápido aumento de casos, refletindo a propagação global do vírus SARS-CoV-2 e levando a medidas emergenciais de saúde pública, como *lockdowns* e restrições de viagens. A falta de estrutura adequada e a sobrecarga dos sistemas de saúde foram desafios significativos nesse período inicial.

Em 2021, variantes como a *Gamma* e a *Delta* foram identificadas, contribuindo para novos picos de infecção e exigindo adaptações contínuas nas estratégias de controle. A campanha de vacinação nacional foi lançada em janeiro de 2021 e, ao longo de 2022 e 2023, avançou para incluir grupos prioritários e a população em geral, embora desigualdades regionais e logísticas tenham influenciado a distribuição das vacinas. Em 2024, apesar dos avanços na imunização, o país enfrentou desafios persistentes com o surgimento de novas variantes e a necessidade contínua de medidas preventivas para controlar a transmissão do vírus (Ministério da Saúde, 2021).

Não foram diferentes os desafios enfrentados pelo estado de Santa Catarina/Brasil, durante a pandemia de COVID-19. Em 2020, o estado experimentou um aumento rápido no número de casos, refletindo a propagação global do vírus SARS-CoV-2. As autoridades implementaram medidas de distanciamento social na tentativa de conter a disseminação viral, acompanhadas de uma mobilização intensiva de diferentes órgãos e instituições para lidar com o aumento do diagnóstico e da demanda hospitalar. Em 2021, com a disseminação de variantes como a *Delta*, novos surtos epidemiológicos surgiram, exigindo ajustes nas estratégias de controle e uma intensificação da campanha de vacinação. A partir de 2022, com o avanço da vacinação e a aplicação de doses de reforço, observou-se uma redução gradual na incidência de novos casos, embora desafios persistentes tenham surgido com a necessidade de enfrentar novas variantes emergentes e garantir a adesão contínua às medidas preventivas (Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, 2021).

1.4 O VÍRUS SARS-COV-2

O SARS-CoV-2, causador da COVID-19, é um vírus de RNA fita simples de sentido positivo não segmentado, da família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* e gênero *Betacoronavirus*, responsável pela codificação de 29 proteínas e com genoma de aproximadamente 29 Kb. Suas proteínas podem ser não-estruturais, estruturais e acessórias, tendo como função a replicação, transcrição ou interação vírus-célula hospedeira (YANG; RAO, 2021).

Os coronavírus são conhecidos por sua capacidade zoonótica ou interação animal-humano, sendo o primeiro coronavírus isolado em 1937 de embriões de galinha, este identificado geneticamente por volta de 1960. Esta característica zoonótica dos coronavírus já foi observada pelos causadores de epidemias como o MERS-CoV (endêmico em 2012 e conhecido pela sua possível origem em morcego e infecção endêmica de camelos), além do SARS-CoV (endêmico em 2002 e conhecidos por ter como hospedeiros intermediários as civetas de palma e os cães-guaxinins, além dos próprios morcegos) (CAVANAGH, 2005; HAMRE; PROCKNOW, 1966).

Existem diferentes teorias sobre o aparecimento e dispersão do SARS-CoV-2 entre os humanos. Uma das teorias foi a transmissão associada ao mercado de frutos do mar localizado em Wuhan (China), onde é cultural a venda para consumo, além dos próprios frutos do mar, de outros animais exóticos, como cobras, pássaros e morcegos. Entretanto, esta transmissão direta de animais para humanos não foi confirmada (WHO, 2022; GRALINSKI; MENACHERY, 2020).

Apesar de a teoria inicial do aparecimento deste vírus ser uma zoonose proveniente do mercado de frutos do mar, alguns estudos têm demonstrado a detecção do genoma de SARS-CoV-2 antes mesmo do primeiro relato da doença. Deslandes e colaboradores (2020), por exemplo, detectaram este patógeno na França em dezembro de 2019 por RT-PCR (DESLANDES et al., 2020). Outro estudo, publicado por Fongaro e colaboradores (2021), revelou a presença de RNA de SARS-CoV-2 no esgoto de Florianópolis (Santa Catarina/ Brasil) em 27 de novembro de 2019. Estes achados reforçam que a circulação deste patógeno

ocorreu antes dos primeiros casos serem relatados, o que desmistifica a teoria da contaminação direta animal-humano em Wuhan (China) (FONGARO et al., 2021).

Em contrapartida, as comparações genotípicas de genoma revelaram que o SARS-CoV-2 possui semelhança genética de 80% quando comparado ao SARS-CoV e de 89% quando comparado ao SARS de morcego, o que demonstra a relação zoonótica do patógeno que começava a ser estudado (GRALINSKI; MENACHERY, 2020).

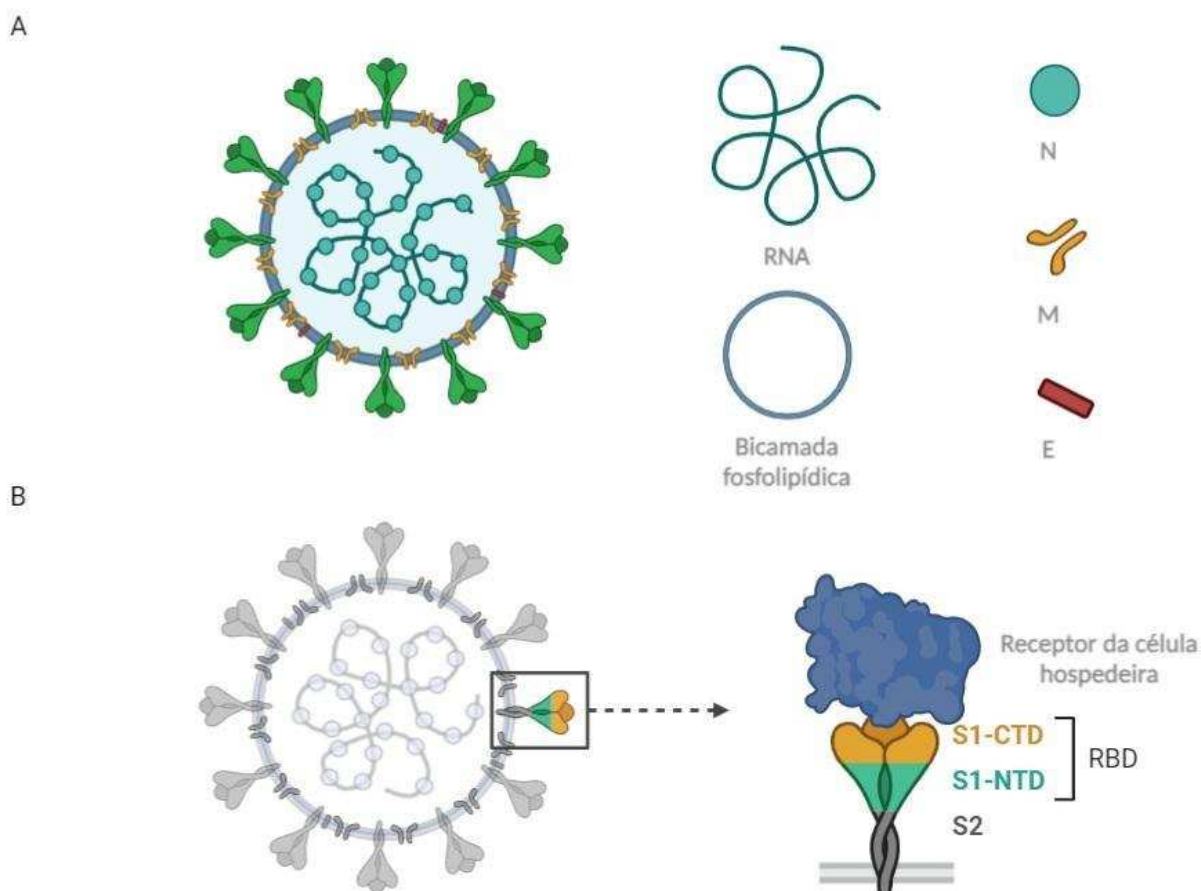
Durante os surtos epidêmicos causados pelo SARS-CoV ou pelo MERS-CoV, os genomas destes patógenos foram sequenciados somente após meses do aparecimento da doença. Em contrapartida, o SARS-CoV-2 teve seu genoma sequenciado menos de 1 mês após o relato do possível primeiro caso da síndrome respiratória, sendo seu primeiro genoma completo identificado por Gralinski e Menachery e disponibilizado no banco de dado GISAID, ainda em 12 de janeiro de 2020 (GRALINSKI; MENACHERY, 2020; NOVEL 2019 CORONAVIRUS GENOME, 2022).

Os coronavírus humanos (HCoVs) são nanopartículas de tamanho diverso, variando entre 80-120 nm, formando-se por meio de uma estrutura composta por nucleocapsídeo (N - protetor do genoma viral, que no caso de HCoVs compõem-se por ácido ribonucleico ou RNA), o RNA genômico, uma bicamada fosfolipídica, a proteína *Spike* (S de espícula), composta pelas subunidades S1 e S2, além do domínio de ligação RBD ou *Receptor Binding Domain*, principais responsáveis pela comunicação viral e entrada do vírus na célula hospedeira, a membrana (M), o envelope (E) e a hemaglutinina (HA) (Figura 1) (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

Cada estrutura do SARS-CoV-2 é responsável por algum aspecto da manutenção ou sobrevivência viral. A proteína S é uma glicoproteína responsável pela fusão da partícula viral à célula hospedeira, sendo uma proteína composta pelas subunidades S1 responsável pela ligação do vírus à ACE2 (do inglês, *Angiotensin Converting Enzyme 2* ou Enzima Conversora de Angiotensina) e S2, responsável por ancorar a proteína S à membrana, incluindo peptídeos necessários à fusão membranar). As proteínas de envelope (E) e de membrana (M) auxiliam na

montagem e no brotamento viral (JACKSON et al., 2022). O processo de maturação viral (Figura 2) é composto por diferentes etapas e inicia-se após a fusão viral à célula hospedeira. Com o vírus no meio intracelular começa a formação de organelas de replicação possivelmente originadas do retículo endoplasmático. As proteínas estruturais (Figura 1) do vírus: S, E, M e N são incorporadas na membrana durante o processo de maturação. Em contrapartida, o RNA genômico, bem como a proteína N, são empacotados no vírion, sendo montados no compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático (RE) e o complexo de Golgi, assim a nova partícula viral é formada para então ser submetida ao processo de brotamento (JACKSON et al., 2022).

Figura 1. Composição estrutural do HCoVs.

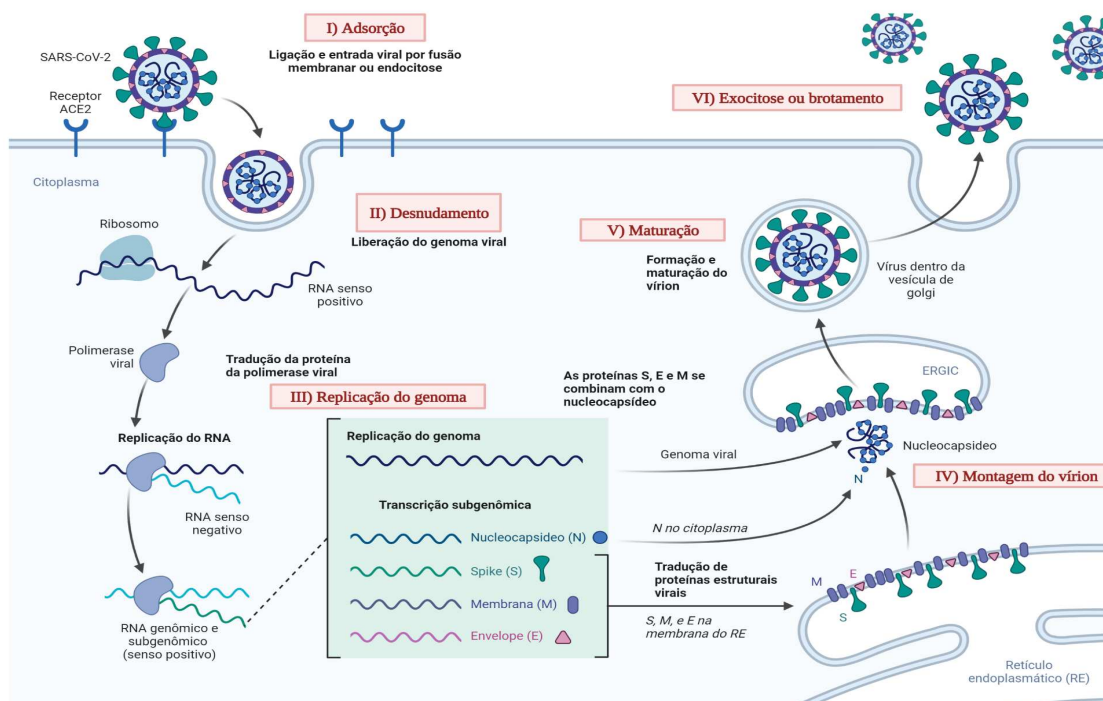


Legenda: Representação esquemática da composição estrutural do HCoVs, incluindo o SARS-CoV-2. (A) Imagens representativas de ácido ribonucleico (RNA), bicamada fosfolipídica, nucleocapsídeo (N), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E); (B) estrutura

representativa da proteína *Spike* (S) e sua subunidade S1 (região onde localiza-se o domínio de ligação RBD), sendo subdividida em S1-CTD e S1-NTD, além da própria região S2. Fonte: autoria própria (imagem gerada no programa Bio Render®).

Adicionalmente à sua composição estrutural, os coronavírus possuem a enzima replicase ou RNA polimerase, além de sequências de leitura aberta (ORF ou *open reading frames*), sendo a ORF1a codificadora de algumas NSPs (proteínas não estruturais ou *Non-Structural Proteins*), tais como NSP3, NSP7, NSP8 e NSP9 e a ORF1b codificadora da enzima RNA polimerase dependente de RNA. Como já bem estabelecido e mencionado anteriormente, a proteína S é a principal responsável pela interação patógeno-hospedeiro, e a partir desta comunicação entre o receptor da célula hospedeira ACE2, cuja expressão se faz em órgão tais como pulmões, coração, rins e intestino, e da proteína S viral, se inicia o que se conhece por biossíntese viral. Este processo é composto por diferentes etapas que objetivam a síntese de *virions* (partículas virais com capacidade infecciosa), podendo ser este processo subdividido em: I) Adsorção; II) Desnudamento; III) Replicação do genoma; IV) Montagem do vírion; V) Maturação e VI) Exocitose ou brotamento (Figura 2) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; HOWLEY; KNIPE; WHELAN, 2021).

Figura 2. Biossíntese do SARS-CoV-2.



Legenda: Representação esquemática das etapas responsáveis pela síntese do SARS-CoV-2: I) Ligação da proteína viral S (verde) ao receptor da célula hospedeira ACE2 (azul) caracterizando o processo de adsorção; II) Liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (processo conhecido como desnudamento); III) Replicação do genoma; IV) Montagem da partícula viral; V) Maturação da partícula viral e VI) Liberação das partículas virais infecciosas por exocitose ou brotamento. Fonte: autoria própria (imagem gerada no programa Bio Render®).

Este processo de biossíntese viral, que inclui a replicação do genoma, gera substituições aminoacídicas, levando a mutações genéticas virais. Este é um processo natural e intrínseco de adaptação contínua, principalmente de vírus de RNA. Desde o início da pandemia tem se estudado a evolução genética do SARS-CoV-2 a fim de monitorar, de forma contínua, as mutações genéticas e os seus impactos na modificação estrutural do vírus, bem como na interação patógeno-hospedeiro. Adicionalmente, estudos já demonstraram que o SARS-CoV-2 tem uma taxa mutacional de aproximadamente duas substituições aminoacídicas por mês ou 10^3 substituições locais por ano (DORP et al., 2020).

Diante dos aspectos genômicos e evolutivos do SARS-CoV-2, bem como das suas características fenotípicas e patogênicas, a vigilância genômica vem se mostrando uma ótima ferramenta no monitoramento das variantes genéticas deste patógeno, bem como seus cenários epidemiológicos e clínicos com a finalidade de controlar e prevenir o agravo da pandemia da COVID-19.

1.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

As técnicas moleculares de diagnóstico e vigilância epidemiológica desempenham um papel crucial na detecção, monitoramento e controle de doenças infecciosas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), especialmente a RT-PCR, emergiu como o padrão ouro para o diagnóstico de infecções agudas, permitindo a detecção sensível e específica do RNA viral do SARS-CoV-2 (CDC, 2021). O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) tem sido instrumental na vigilância genômica, permitindo a identificação de variantes emergentes do vírus e auxiliando na compreensão da sua propagação e evolução genética ao longo do tempo (WHO, 2020). Além disso, técnicas como a Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP) têm sido adotadas em locais com recursos limitados, oferecendo uma alternativa viável para amplificação de material genético viral em condições de laboratório menos sofisticadas (PAHO, 2022).

Essas metodologias não apenas permitem um diagnóstico precoce e preciso, mas também são fundamentais para a vigilância epidemiológica. O uso de testes de antígeno e técnicas de hibridização de ácidos nucleicos, como a Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), complementa essa abordagem, permitindo a detecção direta e rápida do material genético viral em amostras clínicas (*European Centre for Disease Prevention and Control*, 2021). O monitoramento contínuo através dessas técnicas é essencial para identificar surtos precocemente, rastrear cadeias de transmissão e orientar políticas de saúde pública eficazes.

Com isto, a combinação de técnicas moleculares avançadas e vigilância epidemiológica robusta é crucial para enfrentar pandemias e outras emergências de saúde global. A implementação eficaz dessas metodologias não só fortalece a capacidade de resposta rápida a surtos virais, mas também contribui para a

compreensão mais profunda da dinâmica de propagação de doenças infecciosas, permitindo uma intervenção mais direcionada e eficaz (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2023*).

1.6 VIGILÂNCIA GENÔMICA NO CONTEXTO DA COVID-19

Vigilância genômica é o uso de técnicas de genômica para monitorar e compreender a evolução genética e transmissibilidade de um vírus, objetivando avaliar o surgimento das variantes circulantes e seus impactos na disseminação da doença e na saúde populacional. Esta é uma abordagem clássica e não exclusiva para o SARS-CoV-2, mas também para outros patógenos. Esta ferramenta teve grande importância para as tomadas de decisões pública no curso da pandemia da COVID-19, assim como terá um papel crucial em futuras pandemias e epidemias que possam vir a acontecer (ROBISHAW et al., 2021).

Após os relatos dos primeiros casos de SARS-CoV-2, os pesquisadores logo iniciaram a investigação genética do patógeno, objetivando conhecer sua estrutura morfológica e genômica. O primeiro genoma completo de SARS-CoV-2 foi depositado em janeiro de 2020 no GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data* – hoje principal banco de dados para depósito de sequências genômicas de influenza e SARS-CoV-2). Sendo considerado, ainda no final de março de 2024, vírus com maior número de depósitos genômicos em banco de dado, somando um total de 16.632,842 de sequências genômicas de SARS-CoV-2 (WU et al., 2020; GISAID, 2024).

Desde o início da pandemia, a vigilância genômica foi utilizada como ferramenta no monitoramento contínuo das variantes do SARS-CoV-2, que posteriormente foram classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como: variante de preocupação (*Variant of Concern - VOC*), caracterizada por um aumento na transmissibilidade ou alteração expressiva na epidemiologia da COVID-19, aumento da virulência ou alteração clínica da doença e diminuição da eficácia das medidas preventivas ou do diagnóstico, bem como de vacinas e terapêuticas disponíveis; variante de interesse (*Variant of Interest - VOI*), caracterizada pela identificação de alterações genéticas previstas por alterar a

transmissibilidade, gravidade da doença, escape imunológico, escape diagnóstico ou terapêutico, sendo causador de transmissão comunitária significativa ou de múltiplos grupos da COVID-19, em vários países com prevalência relativa crescente e variantes de monitoramento (*Variants Under Monitoring - VUMs*), variantes que são observadas devido ao potencial risco que podem representar, mas ainda não têm impacto significativo confirmado. Até 2022 as VOCs identificadas foram a *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* e *Omicron*, bem como suas sub variantes. Mais recentemente, no ano de 2024, as VOCs atuais incluem principalmente linhagens descendentes da variante *Ômicron*, como XBB.1.16, XBB.1.9.2 e EG.5 (WHO, 2024).

Como mencionado anteriormente, a vigilância genômica de patógenos pode ser feita por meio de diferentes técnicas moleculares, tais como PCR, qPCR ou técnicas de sequenciamento. As mais recentes e inovadoras técnicas de sequenciamento são conhecidas como NGS, que já vem sendo descritas como técnicas capazes de sequenciar de maneira completa o DNA (ácido desoxirribonucleico) ou DNA complementar (cDNA) do genoma de interesse (YOHE, THYAGARAJAN, 2017). As técnicas de NGS são compostas por diversas etapas durante o processo de sequenciamento, sendo necessário em um primeiro momento a fragmentação de DNA, cujos fragmentos serão lidos individualmente de forma a gerar fragmentos de leitura, ou *reads* curtas (*short reads*) ou leituras longas (*long reads*). Após a síntese dos *reads*, os fragmentos gerados são montados e comparados com o genoma referência com a finalidade de avaliar as características (diferenças ou semelhanças) genômicas do microrganismo em estudo (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; ILLUMINA, 2021; NANOPORE, 2022).

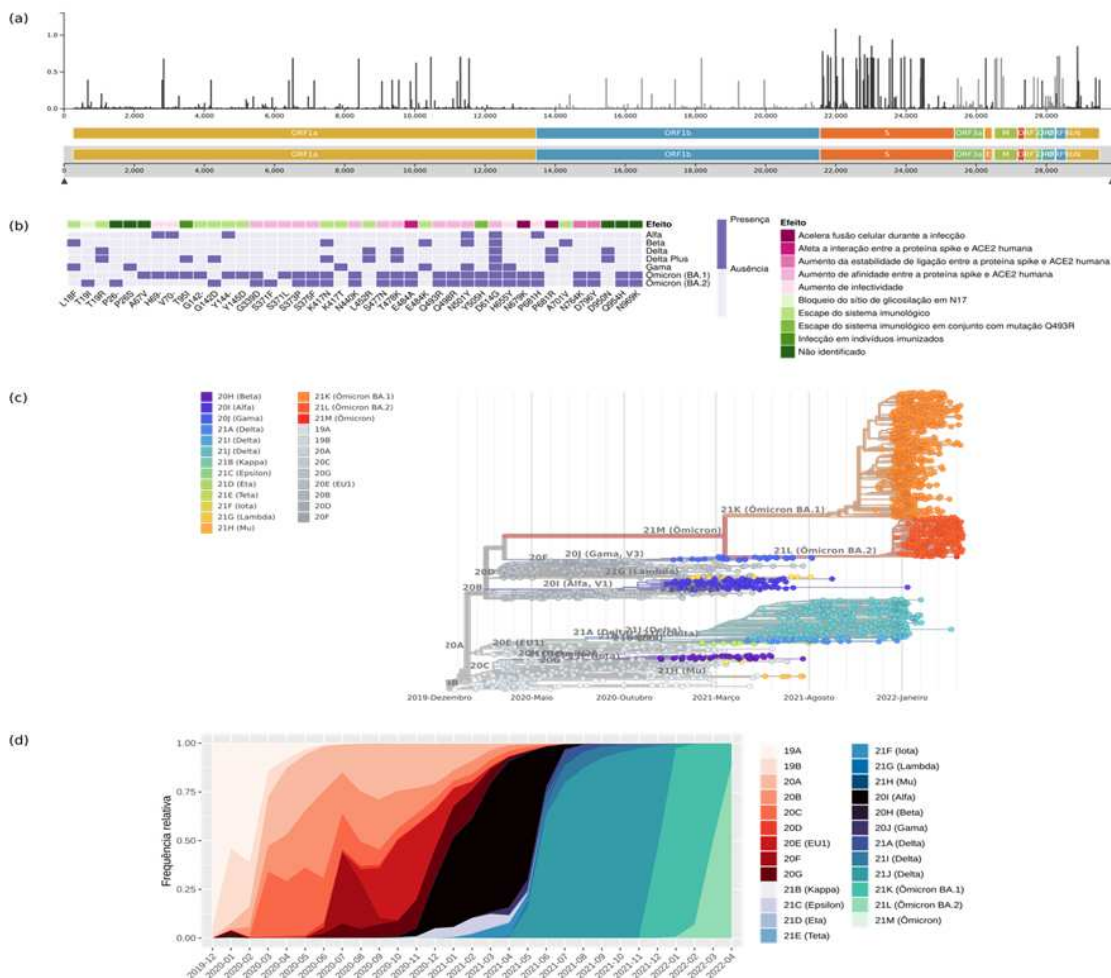
No Brasil, a vigilância genômica teve início em ritmo muito reduzido quando comparada com outros países (KHARE et al., 2021; RITCHIE et al., 2022). Este sequenciamento, mesmo com pouco aporte de recursos em pesquisa, foi possível graças à formação de Redes de Vigilância Genômica, formadas especialmente por centros de pesquisa em saúde (FIOCRUZ, 2022). O primeiro genoma de SARS-CoV-2 sequenciado no Brasil foi reproduzido com base em uma técnica de *long reads*, conhecida como sequenciamento de nanoporos. Com esta técnica, Jesus e colaboradores foram capazes de classificar o genoma deste patógeno em apenas 48 horas, podendo inferir o achado, a direção e os padrões de

transmissibilidade entre os pacientes detectados para SARS-CoV-2 (JESUS et al., 2020). Vale ressaltar que tão importante quanto identificar tais padrões de transmissão é relacioná-los com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes.

A mutação que levou ao primeiro sinal de seleção positiva genética para o SARS-CoV-2 foi a D614G na proteína *Spike* (Linhagem B.1) sendo observado um aumento da sua prevalência para quase 100% em poucos meses (KORBER et al., 2020). Posteriormente, o rastreamento global evidenciou que a variante G614 se espalhou mais rapidamente do que a D614, parecendo essa mutação ser caracterizada por aumentar a afinidade do domínio de ligação ao receptor da proteína *Spike* (RDB) com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) humana, facilitando assim a entrada do vírus nas células (ZHOU et al., 2020).

A partir da mutação D614G, começaram a surgir as Variantes de Preocupação (VOCs) (Figura 3B). Até abril de 2022, de acordo com a OMS, foram classificadas cinco VOCs – (i) *Alfa*, (ii) *Beta*, (iii) *Gama*, (iv) *Delta*, e (v) *Ômicron* – e sete VOIs – (i) *Épsilon*, (ii) *Zeta*, (iii) *Eta*, (iv) *Teta*, (v) *Iota*, (vi) *Kappa*, e (vi) *Lambda* (Figura 3C). Contudo, cabe ressaltar que estas VOIs já foram retiradas da lista da OMS. Cabe ressaltar que tanto VOC quanto VOI apresentam centenas de sub linhagens específicas (Figura 3C) (KHARE et al., 2021). Essas variantes surgiram e se tornaram predominantes ao longo do período pandêmico (Figura 3D), sendo as principais responsáveis pelas diferentes ondas da pandemia da COVID-19 no mundo.

Figura 3. Perfil das variantes do SARS-CoV-2 ao longo de 2 anos de Pandemia da COVID-19



Legenda: Perfil das variantes do SARS-CoV-2 ao longo de 2 anos de Pandemia da COVID-19. (a) Diversidade nucleotídica ao longo de cada gene presente no genoma de SARS-CoV-2. O gráfico apresenta picos que representam o nível de entropia em cada posição, isto significa que quanto mais alto o pico no gráfico, maior é a entropia, e quanto maior for a taxa de entropia em uma posição no genoma viral, maior a probabilidade de ocorrerem mutações nas respectivas regiões do genoma. (b) Mutações não sinônimas presentes na proteína Spike de SARS-CoV-2 e seus potenciais efeitos em variantes de preocupação (VOC, do inglês, *Variants of Concern*). Mutações presentes em apenas uma variante são compartilhadas com variantes de interesse (VOI, do inglês, *Variants of Interest*) que não foram abordadas neste capítulo. ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2. Imagem original disponível em: <https://covariants.org/shared-mutations>. (c) Árvore filogenética com relações evolutivas entre amostras de SARS-CoV-2 identificadas entre dezembro de 2019 e abril de 2022. (d) Perfil global de distribuição e frequência de variantes de SARS-CoV-2 desde o início da COVID-19 até abril de 2022. Fonte: Padilha e colaboradores (2022).

1.7 GRUPO SENTINELA

Grupo sentinela são conjuntos específicos de indivíduos ou locais monitorados para a detecção precoce de surtos de doenças e mudanças na prevalência de patógenos. Estes grupos são escolhidos por sua alta probabilidade de exposição ou sensibilidade a uma determinada condição, permitindo uma vigilância eficaz e representativa da população em geral. A utilização de grupo sentinela é uma estratégia essencial em saúde pública, pois facilita a identificação rápida de novos casos, auxilia no monitoramento da disseminação de doenças e permite uma resposta rápida e coordenada para conter surtos (WHO, 2020; PAHO, 2021).

Utilizar profissionais de saúde como grupo sentinela no diagnóstico precoce de infecções por SARS-CoV-2 é crucial devido à sua posição na linha de frente do combate à pandemia e ao seu alto risco de exposição. Esses profissionais estão em contato constante com pacientes, o que os torna mais suscetíveis à infecção e, portanto, são indicadores precoces de surtos e mudanças nas variantes do vírus. A vigilância genômica em profissionais de saúde permite detectar rapidamente novas variantes e padrões de infecção, facilitando a implementação de medidas de controle e prevenção de maneira mais ágil e eficaz (PADILHA et al., 2023).

A capacidade de monitorar infecções em profissionais de saúde também ajuda a proteger este grupo essencial, garantindo que eles possam continuar a desempenhar suas funções críticas sem interrupções significativas. Detectar rapidamente surtos entre os trabalhadores da saúde pode levar à implementação de intervenções preventivas direcionadas, como isolamento, testes regulares e vacinação reforçada, contribuindo para a redução da transmissão do vírus dentro dos ambientes de saúde e na comunidade em geral (WHO, 2022).

Além disso, a análise dos dados genômicos obtidos de profissionais de saúde pode fornecer respostas valiosas sobre a eficácia das vacinas e tratamentos existentes, assim como sobre a dinâmica de transmissão viral. Isso é particularmente importante para adaptar e melhorar as estratégias de saúde pública, incluindo campanhas de vacinação e desenvolvimento de novas terapias. Assim, o uso estratégico desses grupos traz benefícios nas medidas de vigilância, contribuindo

para um entendimento mais amplo da epidemiologia do SARS-CoV-2, auxiliando nas decisões das políticas de saúde pública em tempos de pandemia (AKIN; GOZEL, 2020; PADILHA et al., 2023).

1.8 COINFECÇÕES

Durante a pandemia da COVID-19, as outras viroses respiratórias de importância clínica foram mais negligenciadas do que antes do período pandêmico, e acredita-se também que, no início da pandemia, vários destes casos foram subnotificados. Assim, não se deu a devida importância para a possibilidade de as coinfeções entre o SARS-CoV-2 e outros vírus, como o vírus sincicial, adenovírus, rinovírus, metapneumovírus e o influenza, agravarem o quadro clínico respiratório dos pacientes, levando-os a um mau prognóstico. Estudar a interação entre patógenos, seja por meio de dados epidemiológicos ou através da identificação de vias de sinalização celular é essencial para entender como a coinfeção pode modificar a dinâmica da doença, além de possibilitar o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas (CHEN, 2020; SWETS, 2022; WHO, 2023).

Os dados epidemiológicos mostram uma clara mudança na detecção de vírus sazonais como a gripe, que parece não ter sido identificada entre os anos de 2020 e 2022, período com maior número de casos e mortes causadas pela COVID-19 (PAHO, 2023). Ainda não está claro se esta menor detecção de vírus respiratórios sazonais se deve à redução na prevalência de outros patógenos, além do SARS-CoV-2, tendo em vista possíveis interações e competição entre patógenos, ou a possíveis subnotificações resultante da sobrecarga dos profissionais de saúde envolvidos na pandemia (DÄHNE, 2021).

O que a literatura tem demonstrado é que, apesar de a sintomatologia ser semelhante entre estes vírus, coinfeções entre SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios foram correlacionadas à maior necessidade de ventilação mecânica e aumento na mortalidade, tornando-se necessário elucidar a influência da presença de coinfeções respiratórias nas variações dos quadros clínicos, bem como nos aspectos epidemiológicos destas doenças infectocontagiosas (SWETS, 2022; MALTEZOU, 2023).

Muitas dessas interações patogênicas podem ser explicadas por vias de sinalização celular que facilitam a replicação e evasão das defesas do hospedeiro. A via RAF/MEK/ERK, por exemplo, é crucial para a replicação do influenza A (Flu A) e outros vírus, como o HCV (hepatite C) e o RSV (vírus sincicial respiratório), pois facilita a transcrição do RNA viral e promove a sobrevivência celular (CHAMBERS et al., 2010; RAMOS & RE, 2021). Da mesma forma, a via PI3K/AKT/mTOR é utilizada por patógenos como o HIV (vírus da imunodeficiência humana), HSV (vírus do herpes simples) e HCMV (citomegalovírus) para regular a transcrição viral e evitar a apoptose (PLATANIAS, 2005; BUCHKOVICH et al., 2008).

Já a via JAK/STAT, importante para a resposta imune, é modulada por vírus como o HBV (hepatite B), dengue e Zika, que a utilizam para suprimir respostas antivirais (LIN et al., 2012; ASHOUR et al., 2009). Com isso, coinfeções em que dois ou mais patógenos infectam simultaneamente um hospedeiro, podem gerar interações complexas que afetam a gravidade e o desfecho da doença. Essas interações podem ser sinérgicas, como no caso do HIV e TB (tuberculose), onde o HIV compromete a imunidade celular facilitando a progressão da TB, ou antagônicas, como entre HIV e HCV, que podem levar a uma resposta imune alterada (KWAN & ERNST, 2011; FELD & MODI, 2022).

Para entender as vias de sinalização comuns entre SARS-CoV-2 e outros patógenos, é essencial explorar as principais vias de transdução de sinal que o SARS-CoV-2 manipula e compará-las com aquelas utilizadas por outros vírus. A via RAF/MEK/ERK, por exemplo, é importante na replicação de diversos vírus, incluindo o SARS-CoV-2. Esta via regula a sobrevivência celular, proliferação e a resposta inflamatória. Estudos indicam que a infecção por SARS-CoV-2 pode ativar a via RAF/MEK/ERK, influenciando a resposta inflamatória e a replicação viral (CHAMBERS et al., 2010; RAMOS & RE, 2021). Outra via crucial é a PI3K/AKT/mTOR, responsável pela regulação do metabolismo celular, sobrevivência e proliferação, onde o SARS-CoV-2 utiliza essa via para regular a replicação viral e modular a resposta imune do hospedeiro (PLATANIAS, 2005; BUCHKOVICH et al., 2008).

Além dessas, a via JAK/STAT, envolvida na transdução de sinais de citocinas e na regulação da resposta imune antiviral, é impactada pelo SARS-CoV-2, afetando

a resposta antiviral e inflamatória, o que pode contribuir para a tempestade de citocinas observada em casos graves de COVID-19 (LIN et al., 2012; ASHOUR et al., 2009). Por fim, a via NF- κ B, um regulador central da resposta imune e inflamatória, é ativada por muitos vírus, incluindo o SARS-CoV-2. A ativação desta via pelo SARS-CoV-2 é um mecanismo importante para a indução da resposta inflamatória e patogênese da COVID-19 (RAMOS & RE, 2021).

Adicionalmente, a competição entre vírus pelo tecido infectado é um fenômeno complexo influenciado por diversos fatores, incluindo replicação viral, resposta imunológica do hospedeiro e adaptação às condições celulares. Estudos têm demonstrado que diferentes variantes virais podem competir pela predominância dentro do hospedeiro, com implicações na dinâmica da infecção e na resposta clínica. Por exemplo, pesquisas sobre a dinâmica evolutiva do HIV mostram como mutações genéticas que conferem vantagens replicativas podem se tornar predominantes em populações virais competindo por recursos celulares e replicativos (BARROSO et al., 2017). Além disso, estudos sobre a evolução do vírus da gripe destacam como a seleção natural dentro do hospedeiro pode levar à emergência de cepas virais mais adaptadas, capazes de evadir a resposta imunológica e se replicar eficientemente (SMITH et al., 2004). Estes achados reforçam a importância da competição viral na dinâmica das doenças infecciosas e na evolução dos vírus ao longo do tempo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar e identificar mutações e variantes do SARS-CoV-2 em pacientes humanos no estado de Santa Catarina ao longo de 24 meses pandêmicos, correlacionando-os com os aspectos epidemiológicos dos pacientes, bem como avaliar a presença de coinfeções entre o SARS-CoV-2 e os vírus respiratórios adenovírus humano, influenza A, influenza B, metapneumovirus humano, vírus sincicial respiratório, rinovírus humano e vírus parainfluenza.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar o SARS-COV-2 presentes em amostras clínicas humanas de diferentes localizações geográficas do estado de Santa Catarina, ao longo de 24 meses;
- Avaliar a formação de grupos de transmissão variante-específicas nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina;
- Correlacionar as variantes e mutações com os dados epidemiológicos dos pacientes analisados;
- Avaliar a existência de correlação das variantes de SARS-CoV-2 circulantes entre os profissionais de saúde e a população geral;
- Avaliar a presença de coinfeção de viroses respiratórias dos pacientes sintomáticos detectados ou não detectados para SARS-CoV-2.

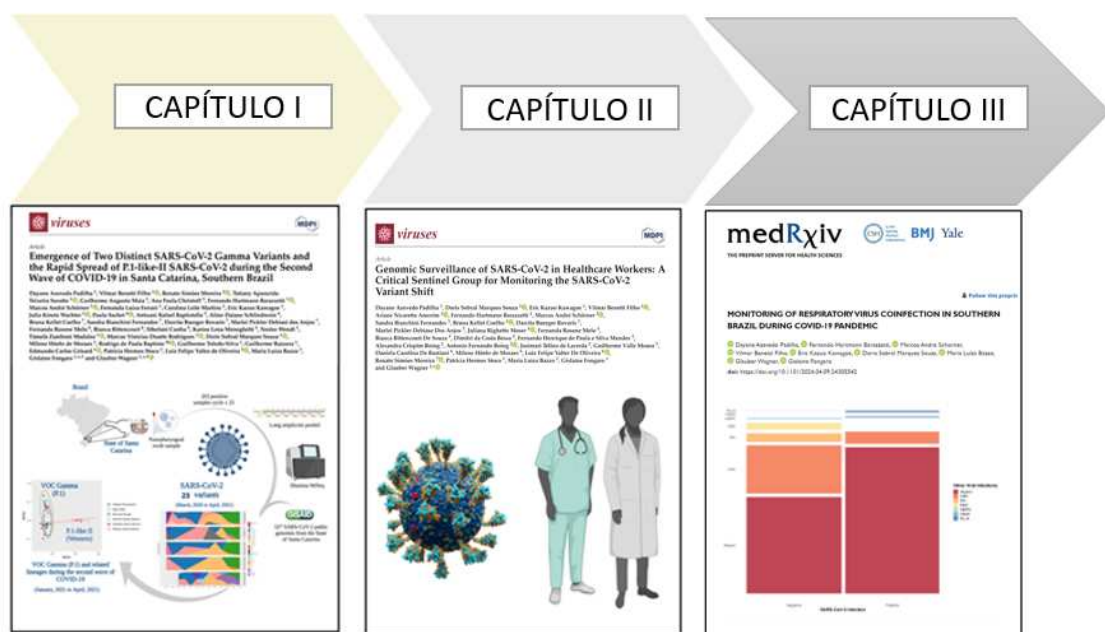
3 ORGANIZAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO

Esta tese de doutorado foi organizada em três diferentes capítulos (Figura 4). O Capítulo I, redigido na língua inglesa, foi intitulado '*Emergence of two distinct SARS-CoV-2 Gamma variants and the rapid spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the second wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil*', sendo aceito para publicação na revista *Viruses* em março de 2022. O Capítulo II, também redigido em língua inglesa e com o título '*Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift*', também foi aceito para publicação na revista *Viruses*, em abril de 2023. Por fim, o capítulo III, intitulado '*Monitoring of Respiratory Virus Coinfection in Southern Brazil during COVID-19 pandemic*', se encontra em processo de submissão.

Adicionalmente, com o objetivo de facilitar o entendimento do leitor, esta tese foi organizada de modo que o material, métodos, análises estatísticas, resultados e discussão foram descritas individualmente em cada um dos capítulos elaborados.

Boa leitura!

Figura 4. Organização da tese de doutorado.



4 CAPÍTULO I - EMERGENCE OF TWO DISTINCT SARS-COV-2 GAMMA VARIANTS AND THE RAPID SPREAD OF P.1-LIKE-II SARS-COV-2 DURING THE SECOND WAVE OF COVID-19 IN SANTA CATARINA, SOUTHERN BRAZIL

Padilha, D.A.; Benetti Filho, V.; Moreira, R.S.; Soratto, T.A.T.; Maia, G.A.; Christoff, A.P.; Barazzetti, F.H.; Schörner, M.A.; Ferrari, F.L.; Martins, C.L.; et al. Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil. Viruses 2022, 14, 695. <https://doi.org/10.3390/v14040695>.

Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). You are free to: Share — copy and redistribute the material in any medium or format for any purpose, even commercially; Adapt — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil

by Dayane Azevedo Padilha ¹ ✉, Vilmar Benetti Filho ¹ ✉, Renato Simões Moreira ² ✉, Tatiany Aparecida Teixeira Soratto ¹ ✉, Guilherme Augusto Maia ¹ ✉, Ana Paula Christoff ³ ✉, Fernando Hartmann Barazzetti ¹ ✉, Marcos André Schörner ¹ ✉, Fernanda Luiza Ferrari ¹ ✉, Carolina Leite Martins ¹ ✉, Eric Kazuo Kawagoe ¹ ✉, Julia Kinetz Wachter ¹ ✉, Paula Sachet ⁴ ✉, Antuani Rafael Baptistella ⁵ ✉, Aline Daiane Schlindwein ⁶ ✉, Bruna Kellet Coelho ⁷ ✉, Sandra Bianchini Fernandes ⁷ ✉, Darcita Buerger Rovaris ⁷ ✉, Marlei Pickler Debiasi dos Anjos ⁷ ✉, Fernanda Rosene Melo ⁸ ✉, + Show full author list

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

² Instituto Federal de Santa Catarina, Lages 88506-400, Brazil

³ Biome-Hub Pesquisa e Desenvolvimento, Florianópolis 88054-700, Brazil

⁴ Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-220, Brazil

⁵ Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba 89600-000, Brazil

⁶ Secretaria de Estado da Saúde, Florianópolis 88015-130, Brazil

⁷ Laboratório Central do Estado da Saúde de Santa Catarina, Florianópolis 88010-001, Brazil

⁸ Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, Florianópolis 88015-130, Brazil

⁹ Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Chapecó 70040-903, Brazil

¹⁰ University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

* Authors to whom correspondence should be addressed.

† These authors were co-principal investigators.

Viruses **2022**, *14*(4), 695; <https://doi.org/10.3390/v14040695>

Submission received: 25 February 2022 / Revised: 18 March 2022 / Accepted: 22 March 2022 /

Published: 27 March 2022

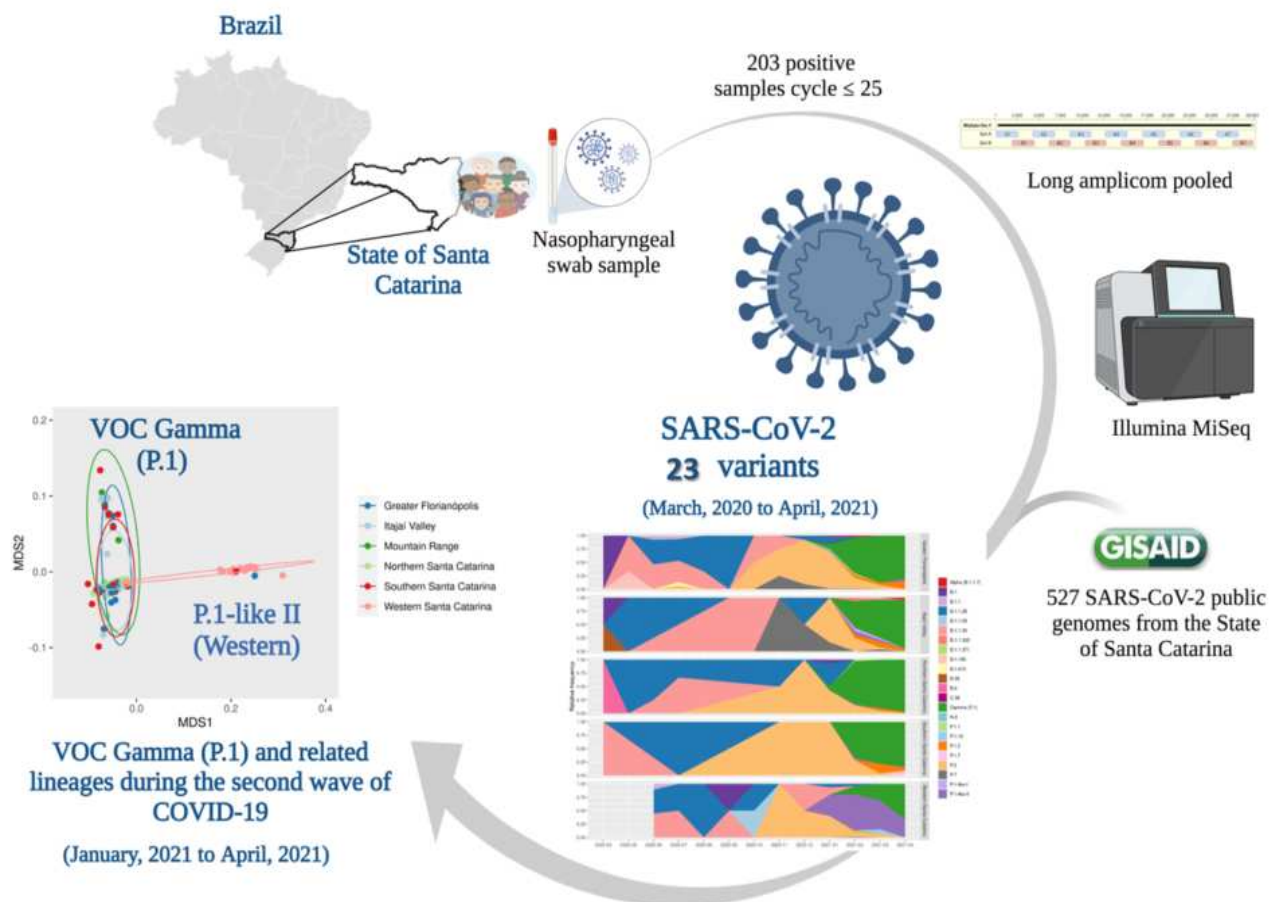
(This article belongs to the Topic Acute Respiratory Viruses Molecular Epidemiology)

4.1 ABSTRACT

The Western mesoregion, the State of Santa Catarina (SC), Southern Brazil, was heavily affected as a whole by the COVID-19 pandemic in early 2021. This study aimed to evaluate the dynamics of the SARS-CoV-2 virus spreading patterns in the SC state through March 2020 to April 2021 using genomic surveillance. During this period, 23 distinct variants, including Beta and Gamma, among which, the Gamma and related lineages were predominant in the second pandemic wave within SC. A regionalization of P.1-like-II in the Western-SC region was observed, concomitant to the increase in cases, mortality, and case fatality rate (CFR) index. This is the first evidence of the regionalization of the SARS-CoV-2 in SC transmission and highlights the importance of tracking variants, dispersion, and impact of SARS-CoV-2 on the public health systems.

Keywords: SARS-CoV-2; Surveillance; Genome; SARS-CoV-2 P.1 variant.

Figure 5. Graphical abstract Emergence of Two Distinct Sars-Cov-2 Gamma Variants And The Rapid Spread Of P.1-Like-li Sars-Cov-2 During The Second Wave Of Covid-19 In Santa Catarina, Southern Brazil.



4.2 INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, is the world's most significant public health challenge of the last 100 years. This virus has infected more than 270 million people, leading to more than 5,3 million deaths worldwide by December 2021 [1]. In the same period, since the first reported case on 12/01/2019, this virus infected around 22.2 million people leading to 617 thousand deaths in Brazil and in the Southern State of Santa Catarina (SC), 1,238,056 cases and 20,101 deaths were reported [2].

With the virus' rapid accumulation of polymorphisms and the advance of the pandemic new variants have emerged [3]. Thus, genomic surveillance has been essential for monitoring this disease and vital for local health agencies to have information to mitigate the effects of the pandemic and adopt strategies to increase population engagement in COVID control policies [4].

Until December 2021, more than 6,1 million SARS-CoV-2 genomes have been sequenced, allowing detection of several variants [5]. Some new variants have distinctive biological characteristics from their predecessors, such as better transmission, immunological escape or distinguishing clinical symptoms [6]. Some variants of SARS-CoV-2 have been defined as Variants of Interest (VOIs) or Variants of Concern (VOCs) with potential impact on public health. The main VOCs described have been B.1.1.7/VOC 202012 (Alpha), December 2020; B.1.351/501Y.V2 (Beta), December 2020; P.1/ B.1.1.248/B1.1.28 (Gamma), January 2021; and B.1.617.2 (Delta), May 2021 [1]. Recently, the B.1.1.529 (Omicron) variant was reported in South Africa in November 2021 [1], evidencing that new VOC of SARS-CoV-2 are still emerging and, thus, genomic surveillance of the virus remains crucial.

In Brazil, the VOC Gamma (P.1) variant was first reported in the city of Manaus, State of Amazonas, in November 2020, being identified in 42% of RT-PCR positive samples collected between December 15th and 23th, 2020 [7]. This VOC has 1.7-2.6 times more transmissible than previous strains circulating in Brazil, showing a 1.2-1.9-fold increase in the mortality risk to adults and 5-8-fold for the young population [8], broadening the susceptible population under risk of infection and hospitalization and the needs of hospitalization and intensive care [9].

Among several mutations for VOC Gamma the E484K mutation occurs in the receptor binding domain (RBD) domain of the S protein and is believed to assist the evasion of the virus from the immune system [10] and, therefore, may lead to lower vaccine efficacy [11]. Also present in the RBD domain, the N501Y mutation is associated with increased binding specificity to the host cell angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor. Subvariants of VOC Gamma and related lineages (P.1-like-I and P.1-like-II), displaying distinct mutations, have also emerged during 2021 [12]. Among these, P.1.1, P.1.2, and P.1-like-II have spread across the border

States of Rio Grande do Sul [13] and Paraná [14] up to April 2021 and, concomitantly detected in SC state [12].

In this context, our study evaluated the dispersion of different variants of SARS-CoV-2 through March 1st, 2020 to April 30th, 2021, in the state of Santa Catarina, especially during the second wave of the pandemic (January to April 2021) when the VOC Gamma variant became predominant in Brazil.

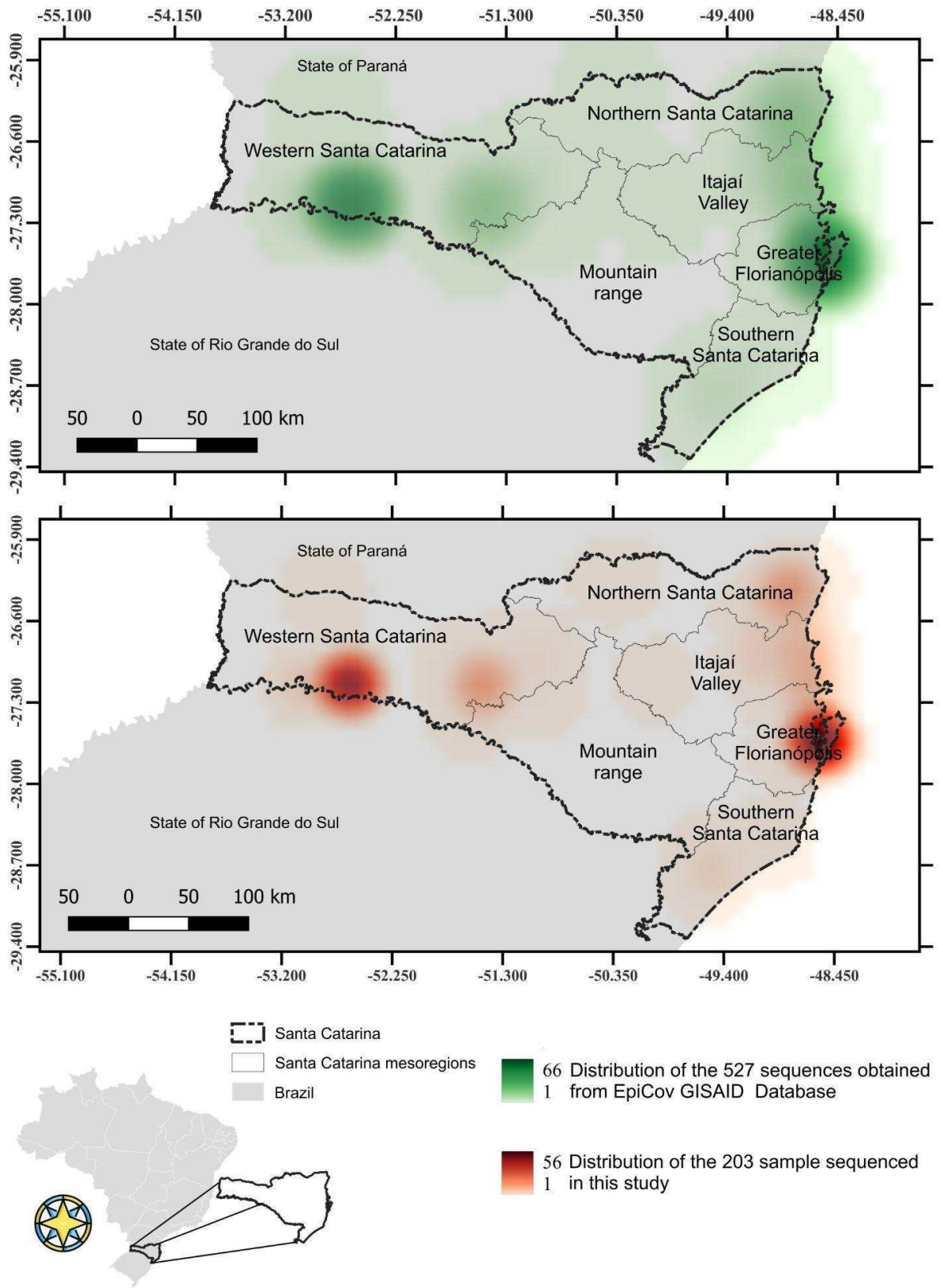
4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 STUDIED REGIONS AND SAMPLING

The State of Santa Catarina (SC) is located in the southern region of Brazil, having borders with the Paraná (North) and Rio Grande do Sul (South) states, and Argentina (West). With an estimated population of 7,333,473 inhabitants, the SC state is geographically divided into six mesoregions: Greater Florianópolis, Itajaí River Valley, Mountain range, Northern, Southern, and Western SC [15].

Genome sequences from 203 SARS-CoV-2 positive samples collected from different mesoregions of the state of Santa Catarina, Brazil through March 1st, 2020 to April 30th, 2021, were generated (Figure 6). Additionally, 527 SARS-CoV-2 genome sequences obtained from samples isolated in SC (Figure 6) and 49 genome sequences from samples isolated worldwide, including the original SARS-CoV-2 sequence (NC_045512.2), were retrieved from the EpiCov database GISAID [5] and included in this study (only genome sequences showing <5% ambiguous nucleotide and > 85% genome sequence coverage). This study was approved by the Federal University of Santa Catarina Ethics Committee (CAAE: 31521920.8.0000.0121).

Figure 6. Distribution of sequenced SARS-CoV-2 genomes in Santa Catarina from 1st March 2020 to 30th April 2021.



Legenda: Distribution of sequenced SARS-CoV-2 genomes in Santa Catarina from 1st March 2020 to 30th April 2021. Map showing the Santa Catarina SARS-CoV-2 sequences obtained from GISAD EpiCov Database (upper map) and samples sequenced in this study (lower map).

4.3.2 RNA PURIFICATION AND SEQUENCING

The study used 203 human nasopharyngeal swab samples from SARS-CoV-2 positive patients diagnosed via RT-qPCR. Inclusion criteria was a positive RT-PCR for gene E with C_t values < 25 . Total viral RNA was extracted using the RNA Viral Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and the long amplicon pooled protocol was used [17]. Briefly, complementary DNA (cDNA) was synthesized from viral RNA using 50 μM random primers and 200 U/ μL Superscript IV reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The obtained cDNA was amplified using 10 μM of 14 primer sets in individual reactions to amplify different regions of the SARS-CoV-2 genome (approximately 2.5 Kb in each fragment) and 40 U/ μL Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Amplicons were visualized on agarose 2% gel electrophoresis.

The amplicons were then pooled, purified using the AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and quantified by Quant-iT Picogreen dsDNA assays (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Pools were then processed using the Illumina DNA Prep (Illumina, San Diego, CA, USA), following manufacturer's protocol. Libraries were quantified using the Colibri Library Quantification kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), adjusted to 11.5 pM and prepared for paired-end sequencing (2x 150 bp) using the MiSeq Reagent Kit V2 (300-cycles) (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

4.3.3 SARS-COV-2 GENOME ASSEMBLING AND VARIANT ANALYSIS

The SARS-CoV-2 genome was assembled according to ARTIC protocol [18]. Briefly, low-quality bases ($Q < 25$) and Illumina adapters were trimmed [19], and mapped to the human reference genome (hg19 - GCF_000001405.13) to remove

contaminants using BWA v. 0.7.17 [20]. Next, human-free reads were aligned to the SARS-CoV-2 reference genome (NC_045512.2) using BWA with default parameters. Ivar v. 1.3 [21] and mpileup function from samtools v. 1.7 [22] were used to perform variant calling and to generate genomes consensus sequences. Assembled genomes were analyzed in the Nextclade [23] and Pangolin [24] platforms to classify the SARS-CoV-2 variants.

Mutations, deletions, and insertions were used to assess the dissimilarity of the genomes using the vegan R package v. 2.5.6 [25] with the Jaccard index method. The multidimensional scaling (MDS) and the distribution of variants in SC were plotted using the ggplot2 R package v. 3.3.0 [26].

4.3.4 MAXIMUM-LIKELIHOOD (ML) PHYLOGENETIC ANALYSIS

The ML phylogeny was performed using all 779 SARS-CoV-2 genome sequences. Sequences were aligned by MAFFT v. 7.310 [27] with default parameters and were manually curated using AliView v.1.26 [28]. A ML tree was constructed using the alignment, with GTR+F+I as the substitution model predicted by ModelFinder [29], 1,000 bootstrap runs using UFBoot tree optimization [30] and SH-like approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) [31], using IQ-TREE v. 2.1.3 [32]. ML tree was visualized and annotated using the ggtree R package v. 2.0.4 [33].

4.3.5 NETWORK ANALYSIS OF SC VOC GAMMA AND RELATED LINEAGES DURING THE SECOND WAVE

The network analysis was performed using 589 Brazilian VOC Gamma and related genomes retrieved from GISAID, of which, 418 were SC SAR-CoV-2 genomes from samples obtained from January 5th, 2021, to April 30th,2021, and 171 genome sequences from other Brazilian states sequenced up to January 5th, 2021. The ML consensus tree as constructed like above, except the substitution model was GTR+F+R2. The network analysis was performed using online service StrainHub with closeness centrality [34], ML consensus tree, and corresponding metadata.

4.3.6 SPIKE (S) GENE SEQUENCE POLYMORPHISM AND PROTEIN STRUCTURE ANALYSIS

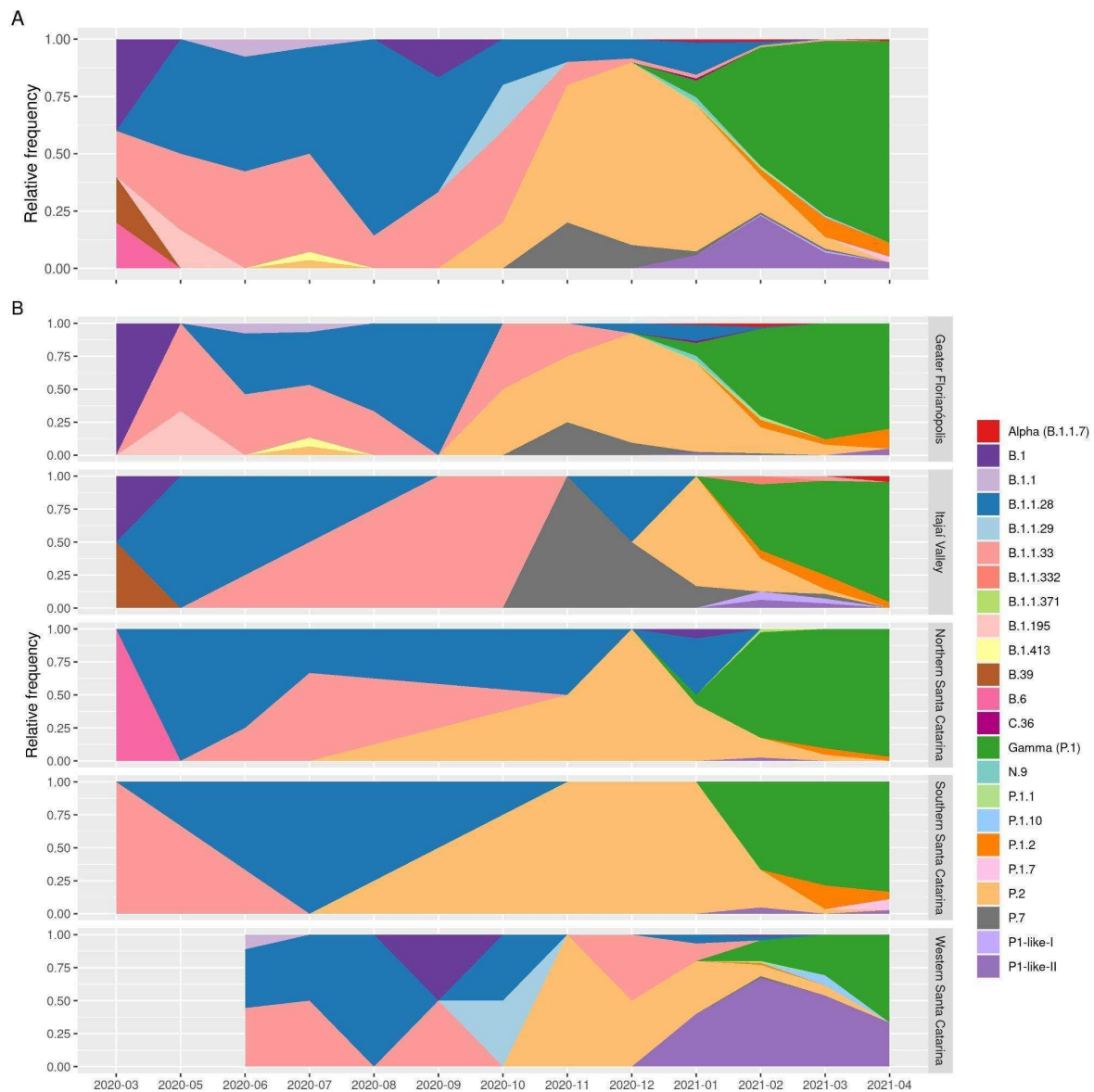
For structural analysis of S protein of VOC Gamma, 57 presented full-length S protein coverage of VOC Gamma sequenced in this study with 722 retrieved from GISAID (December 3rd, 2021), including the reference sequence (NC_045512.2) were aligned using MAFFT [27]. The mutations were represented over the 3D S protein structure PDB 6ZGG (resolution 3.8 Å). The experimental structure presents a representative coverage of the N-terminal domain (NTD) (Gln14 to Asp1146). The mutations were highlighted and colored according to observed frequencies and built with PyMOL version 2.3.3 software [35].

4.4 RESULTS

4.4.1 PROFILE OF SARS-COV-2 VARIANTS IN STATE OF SANTA CATARINA AFTER ONE YEAR OF COVID-19 PANDEMIC

A total of 23 distinct SARS-CoV-2 variants were identified among the studied genomes (Figure 7A). Of these 730 complete genomes, 316 (43.2%) were classified as the VOC Gamma, followed by 175 (23.9%) of the former VOI Zeta variant (P.2) in and 69 (9.4%) of the P1-like II variant. Only four sequences of the VOC Alpha variant (B.1.1.7) were observed among the analyzed samples.

Figure 7. SARS-CoV-2 variant profiles in the state of Santa Catarina from March 2020 to April 2021



Legenda: SARS-CoV-2 variant profiles in the state of Santa Catarina from March 2020 to April 2021. (A) Analysis of the variant profile considering the whole state of Santa Catarina. (B) The variant profile by Santa Catarina mesoregion. From March to September 2020, the variants identified were in the highest proportion of B.1.1.28 (blue) and B.1.1.33 (light red). From September 2020 to January 2021, the highest proportion was of P.2 variant, followed by VOC Gamma and related lineages from February to April 2021.

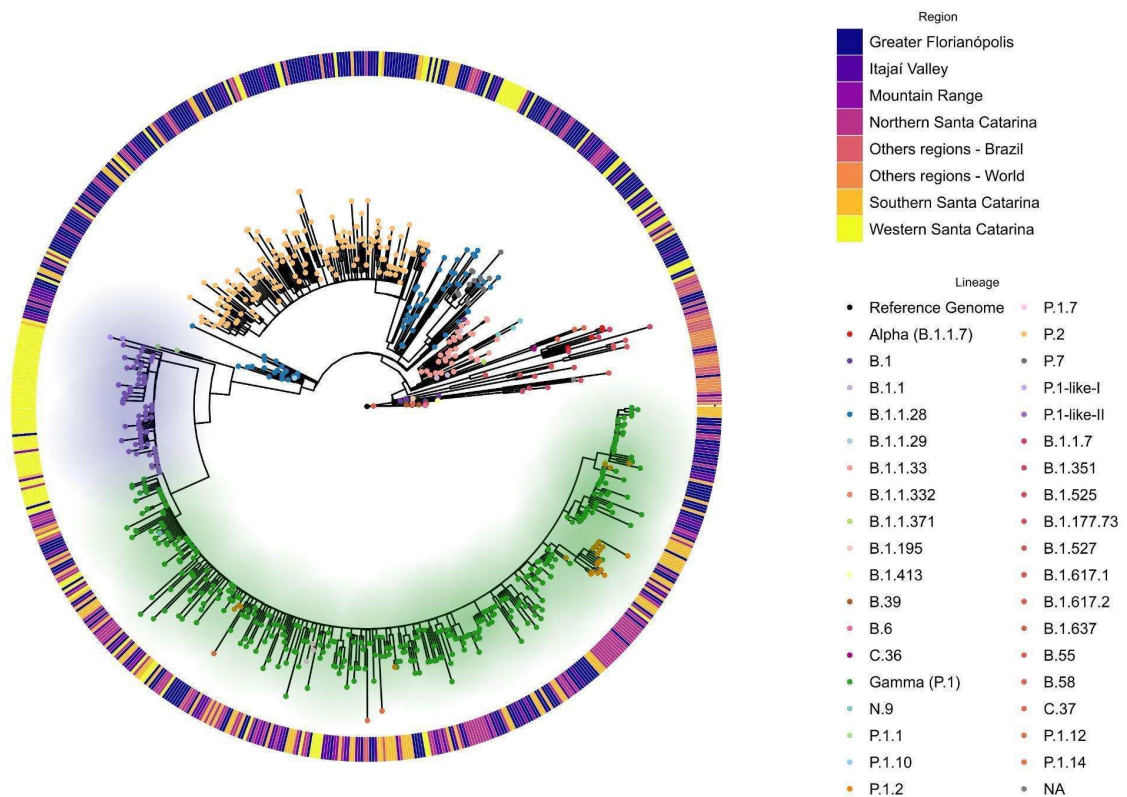
The first sequenced sample was classified as a B.39 variant. Then, the B.1.1.28 and the B.1.1.33 variants prevailed from May - November 2020, when the

P.2 variant gradually became the most prevalent. The P.2 variant peaked in December 2020 and was displaced quickly by the P.1 variant. By January 2021, the VOC Gamma had already taken over most of the samples in Santa Catarina (Figure 7A). Until December 2020 the profile of variants is similar among the mesoregions. However, in the beginning of the second wave (February 2021), the Western mesoregion has a distinct profile, with the highest cases/100,000 inhabitants indices and the P.1-like-II lineage being predominant in that region (Figure 7B). The Mountain Range was sampled only in February 2021, where 10 VOC Gamma and a single P.1-like-II was detected.

4.4.2 VOC GAMMA AND RELATED LINEAGES IN SANTA CATARINA

We inferred phylogenetic relationships between the SARS-CoV-2 genomes from SC and the other known variants (Figure 8). Most of the SC sequences were grouped in the VOC Gamma clade, which includes subvariants P.1.1, P.1.2 and P.1.10, and related lineages (P.1-like I and P.1-like II). However, this parent clade generates two distinct sub-clades, one containing the variant P.1-like-II and P.1-like-I, and the other clustering sequences classified as P.1 and their subvariants. It is noteworthy to mention that the clade formed mainly by P.1-like-I and P.1-like-II variants is composed of samples from the Western SC, pointing out a possible independent introduction and regionalized transmission of such variants in that region.

Figure 8. Phylogenomic reconstruction analysis of Santa Catarina SARS-CoV-2 sequences from 1st March 2020 to 30th April 2021.

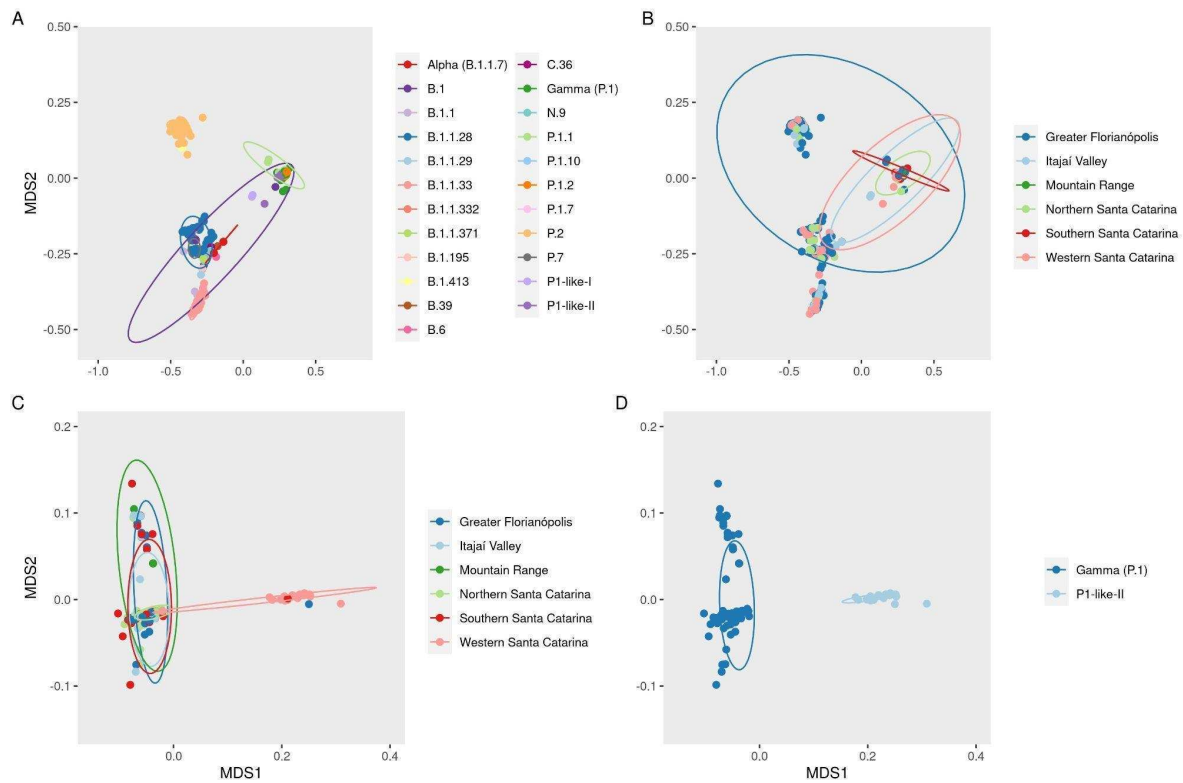


Legenda: Phylogenomic reconstruction analysis of Santa Catarina SARS-CoV-2 sequences from 1st March 2020 to 30th April 2021. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was reconstructed using GTR + F + I substitution model, with 1000 iterations in Ultra-Fast Bootstrap mode with SH-like approximate likelihood ratio test (SH-aLRT). All 779 sequences were aligned with 49 reference sequences of distinct SARS-CoV-2 variants available in GISAID. Dots represent the variants or lineages indicated on the right-bottom legend. According to the right-top legend, the outside bars indicate the sample mesoregion of Santa Catarina or others. The green shadow indicates the VOC Gamma and related lineages (P.1.1, P.1.2, P.1.10, and P.1.7) clade. Lilac shadow indicates the P.1-like-II clade.

A Multidimensional scale (MDS) plot shows the clustering of the SARS-CoV-2 genomes according to the mutations observed (Figure 9A). There was no clear clustering of the studied SARS-CoV-2 variants according to the sampled geographic regions along the sampling period (Figure 9B). However, in a separate analysis of the data from the VOC Gamma and the related lineages, it was possible to observe

a clustering of genomes from Western SC (Figure 9C), mainly composed by the P.1-like-II variant (Figure 9D).

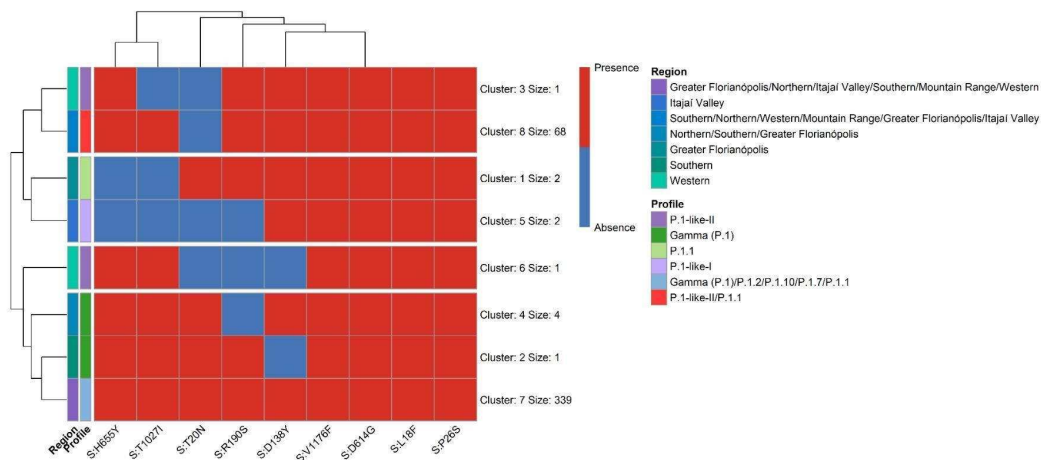
Figure 9. Multidimensional scale (MDS) plot of Jaccard dissimilarity matrix.



Legenda: Multidimensional scale (MDS) plot of Jaccard dissimilarity matrix between genomes based on the presence and absence of mutations, deletions, and insertions labeled by (A) variants and (B) region. MDS analysis of only VOC Gamma and related lineages labeled by (C) region and (D) variant or lineages.

As the ML and the MDS analyses pointed out the evidence of genetic proximity of the cluster of P.1 related lineage (P.1-like-II) in the Western SC, we compared all SC VOC Gamma and related lineages sequences obtained from August 7th, 2020 to April 30th, 2021. These genomes were classified based on the amino acid substitutions described in P.1-like-I [36] and P.1-like-II [13] variants. Mutations that characterize each VOC Gamma related lineage profile were identified and are summarized in Figure 10.

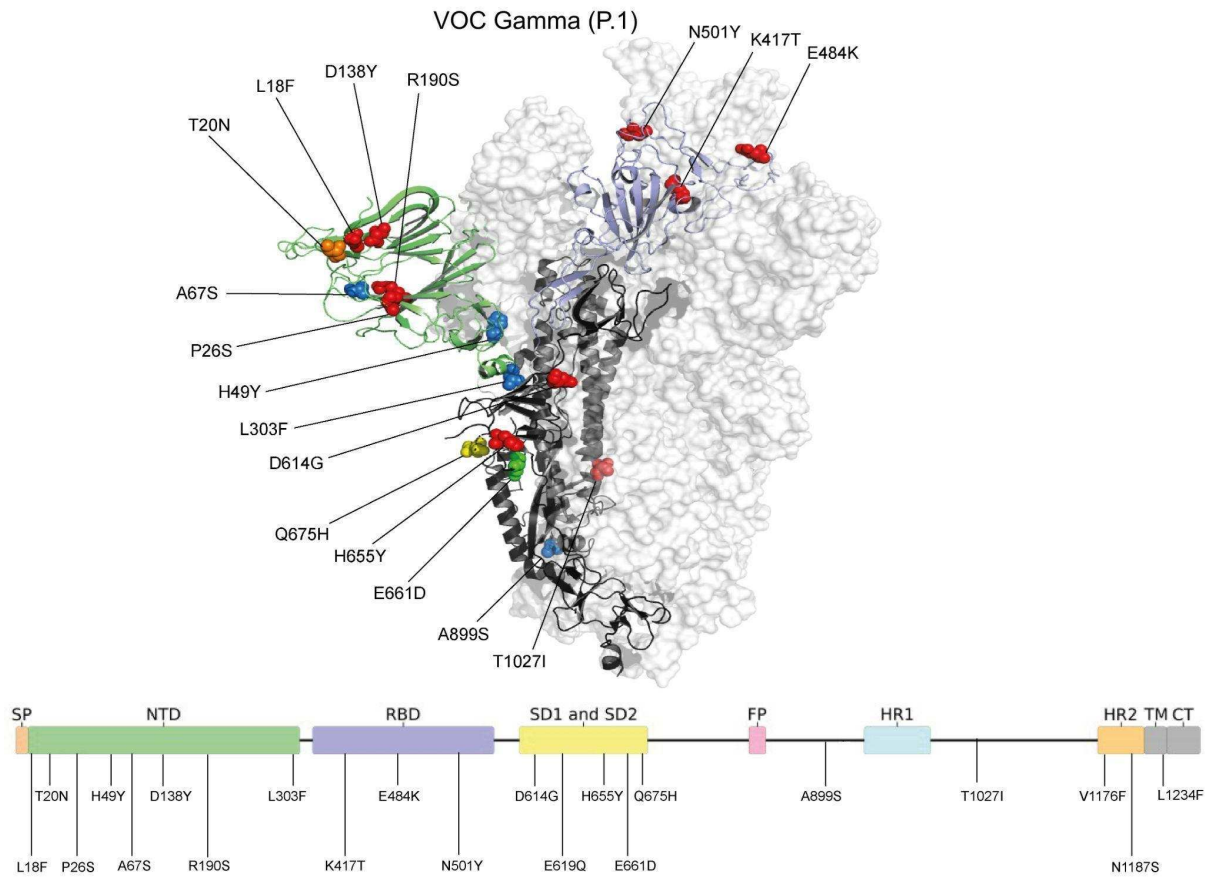
Figure 10. The non-synonymous amino acid substitution profile.



Legenda: The non-synonymous amino acid substitution profile of the VOC Gamma and related lineages genomes in the state of Santa Catarina from 3 January 2020 to 30 April 2021.

More than 90% of the S protein of the VOC Gamma and related lineages presents the mutation L18F, P26S, D138Y, and R190S positions of the NTD region (Figure 10). The typical P.1 mutations were found in the RBD domain (K417T, E484K, and N501Y), SD domain (D614G and H655Y), and overall structure (T1027I, and V1176F). In 20% of sequences conserved the original amino acid T20 in the NTD, being characterized as P.1-like-II lineages.

Figure 11. Overlay of VOC Gamma spike protein mutations identified in the state of Santa Catarina during the COVID-19 pandemic.



Legenda: Overlay of VOC Gamma spike protein mutations identified in the state of Santa Catarina during the COVID-19 pandemic. Residues involved in mutations are presented as spheres, colored from blue to red (low to high mutation frequency). The mutation sites are also indicated in the two-dimensional representation of the spike protein, which is colored according to protein regions. The NTD domain is colored in green and the RBD domain is colored in purple. From the total 778 analyzed sequences of the VOC Gamma variant (50–30), red represents a frequency of 93.6–100%, orange a frequency of 88.8%, yellow a frequency of 3.98%, green a frequency of 1.79%, and blue a frequency of less than 1%. Image generated using PyMOL version 2.3.3 [35].

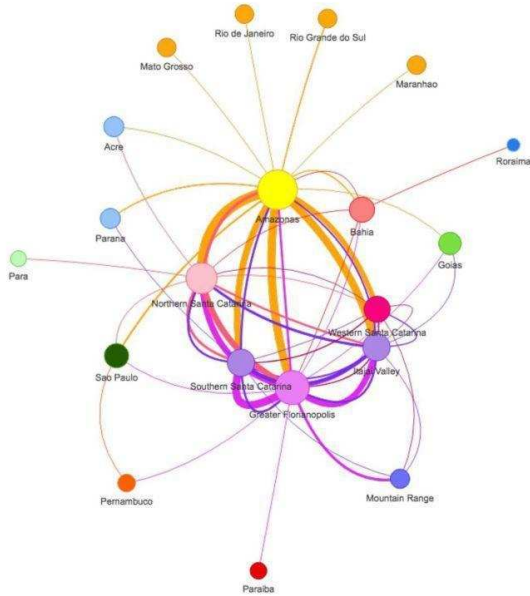
4.4.3 THE RAPID SPREAD AND REGIONALIZATION OF P.1-LIKE-II DURING THE SECOND WAVE OF COVID-19 PANDEMIC IN SANTA CATARINA, BRAZIL

During the second wave of COVID-19 (January - April 2021) the VOC Gamma and subvariants were the most representative SC. However, it does not present a homogeneous variant distribution pattern in the mesoregions (Figure 7B). Network analysis revealed that VOC Gamma and related lineage genomes had a genetic proximity with genomes sequenced in the State of Amazonas (Figure 12A). The VOC Gamma and related lineages from the Western SC had fewer interactions with other SC meso regions than with the State of Amazonas (Figure 12B). The city of Chapecó-SC, the major municipality of the Western Santa Catarina, acted as a point of concentration and dissemination of lineages imported from Manaus to other Western cities (Figure 12C).

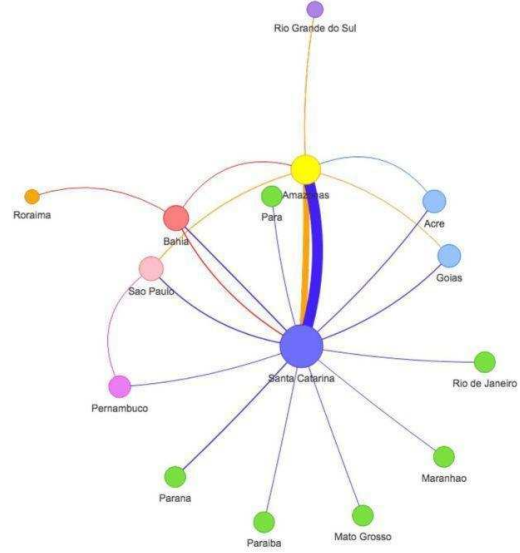
Also, it was observed that in February and March 2021, 75% and 60% of the sequences in the Western SC were classified as P.1-like-II, respectively (Figure 13). Furthermore, in the same period, this mesoregion had the highest Case Fatality Rate (CFR), mortality, and the number of deaths in the state of Santa Catarina (Figure 14), which indicates that rapid dissemination of P.1-like-II variant in the region followed by an increase in deaths.

Figure 12. Network analysis of VOC Gamma and related lineages sequenced in the state of Santa Catarina.

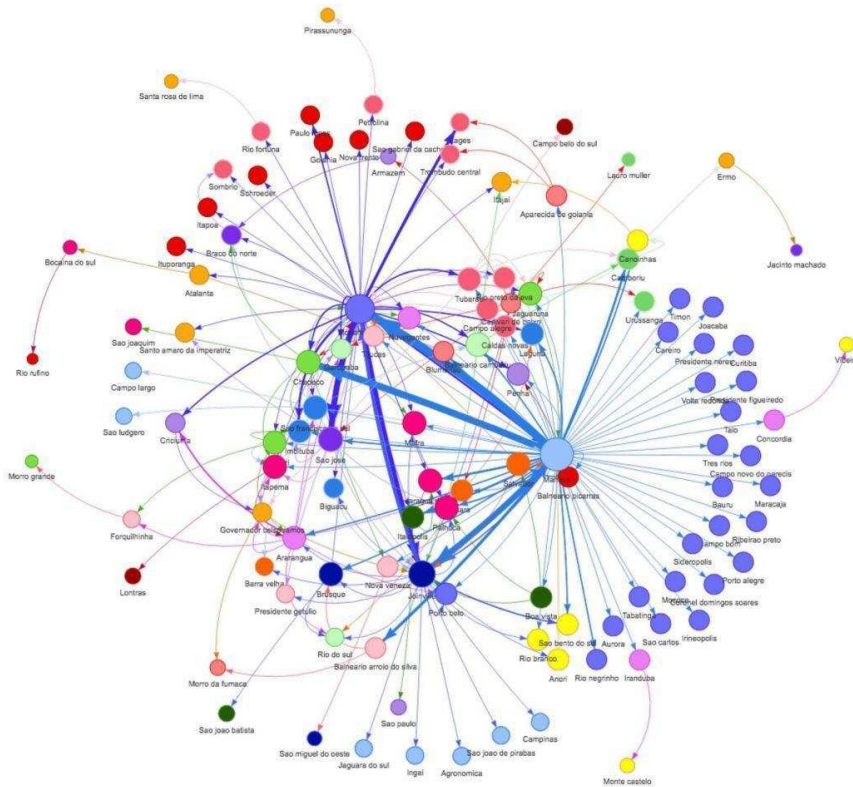
A



B

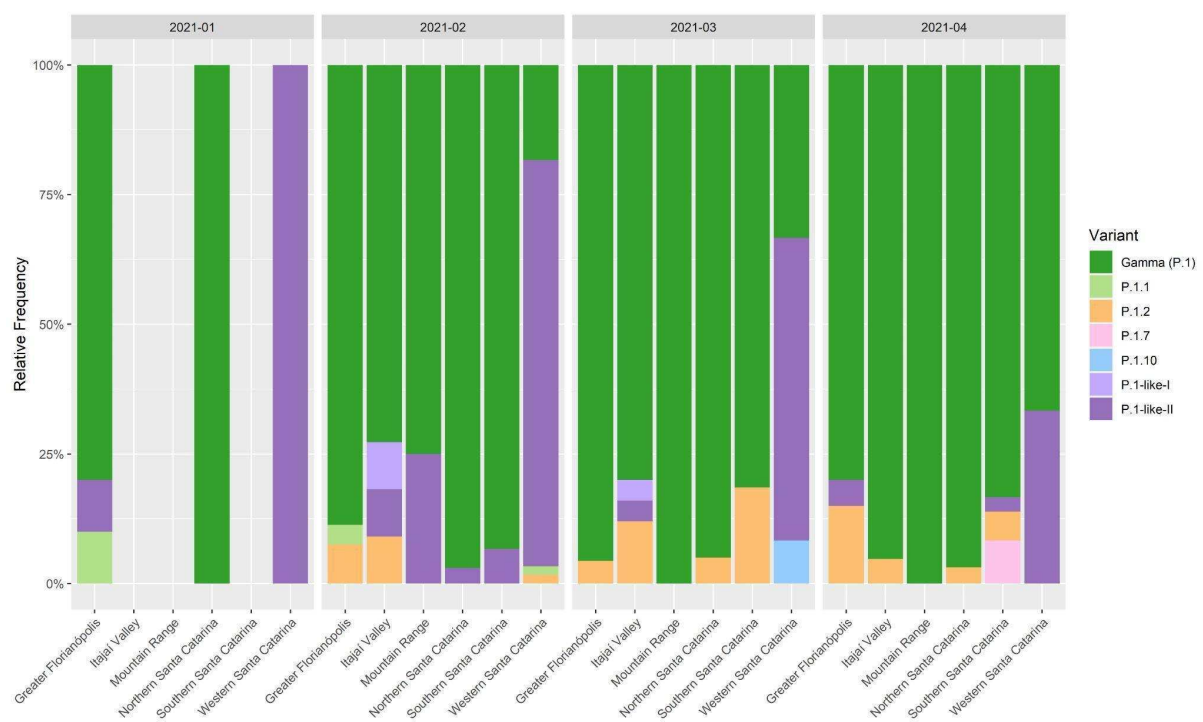


C



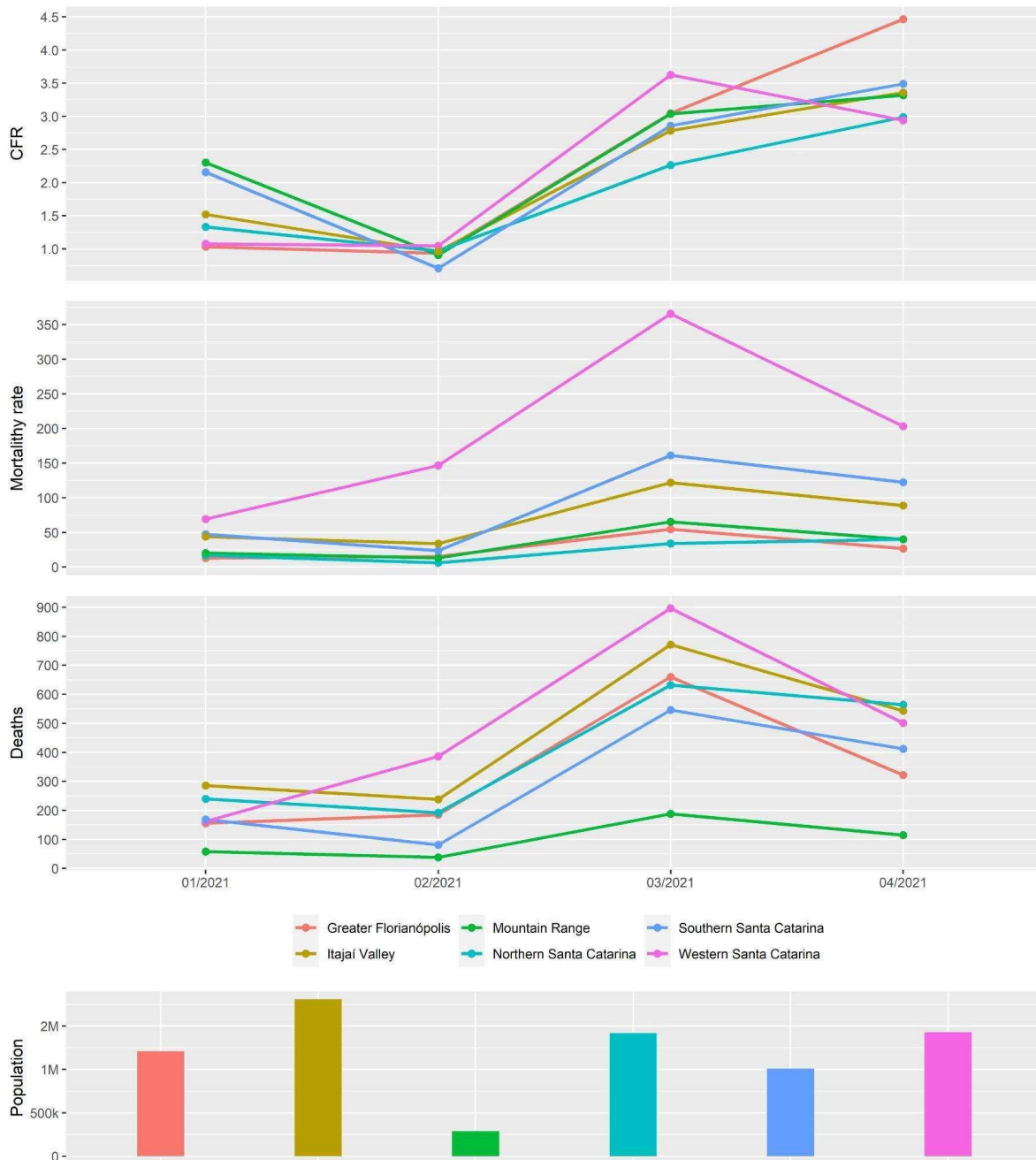
Legenda: Network analysis of VOC Gamma and related lineages sequenced in the state of Santa Catarina, Brazil, from 3rd January 2020 to 30th April 2021 with the other Brazilian states. The ML analysis was performed on 13,018 Brazilian VOC Gamma-related genomes obtained from GISAID until 30th April 2021 and submitted to StrainHub [34] analysis considering the closeness parameter. The sizes of the nodes are scaled by the closeness metric and the arrows reflect the directionality of possible transmissions among the Brazilian states (A), Santa Catarina mesoregions (B), and Santa Catarina cities (C). The thickness of the lines and arrows represents the frequency of putative transmissions.

Figure 13. Network analysis of VOC Gamma and related lineages sequenced in the state of Santa Catarina, Brazil, from 3rd January 2020 to 30th April 2021 with the other Brazilian states.



Legenda: The ML analysis was performed on 13,018 Brazilian VOC Gamma-related genomes obtained from GISAID until 30th April 2021 and submitted to StrainHub [34] analysis considering the closeness parameter. The sizes of the nodes are scaled by the closeness metric and the arrows reflect the directionality of possible transmissions among the Brazilian states (A), Santa Catarina mesoregions (B), and Santa Catarina cities (C). The thickness of the lines and arrows represents the frequency of putative transmissions.

Figure 14. Relative frequencies of the SARS-CoV-2 VOC Gamma and related lineages by mesoregions of the state of Santa Catarina during the second wave of the COVID-19 pandemic, January to April 2021.



Legenda: Epidemiological data from each mesoregion of the state of Santa Catarina during the second COVID-19 pandemic wave (January 2021 to April 2021). Case fatality rate (CFR), mortality rate, number of deaths, and population size. Data source: Santa Catarina Epidemiological Surveillance Directorate [16].

Taken together, these data indicate distinct introductions of VOC Gamma and related lineages in Santa Catarina, followed by a rapid dispersion of the P.1-like-II variant in the western region of SC and a regionalization in the transmission of P.1-like-II in the western region.

4.5 DISCUSSION

In this study carried out between March 2020-April 2021, we sequenced 203 SARS-CoV-2 genomes from human samples collected from different regions of the SC state, representing 27.8% of the virus genomic sequences generated for this region. Assessment of SARS-CoV-2 genetic profiles (Figure 7A) allowed the identification of VOC Alpha (20I/501Y.V1/ B.1.1.7) and especially the Gamma (20J/501Y.V3/P.1) from January 2021 onwards, corresponding to the second wave of the pandemic in SC, as also observed in other Brazilian states [37, 38], indicating the homogeneity of the spreading pattern within Brazil at that time. However, between August 2020-November 2020 we were able to identify the emergence of the formerly VOI P.2 [1] in SC, which rapidly turned out to be more prevalent than the other variants circulating in the region. This variant was originally identified in Brazil in Rio de Janeiro by July 2020, although phylogenetic analyses indicate that the variant may have arisen as early as February 2020 [39]. Similar to our findings in SC, P.2 was reported to have become predominant in several Brazilian states around the same period, especially in Northeastern and Southeastern Brazil, when variant P.1 turned to be more prevalent by beginning 2021 [39], except for the State of Amazonas where P.2 variant was first detected in November 2020 but was overshadowed by P.1 since its early detection and thus never became the main circulating variant [38]. After the emergence of VOC Gamma in Manaus City, State of Amazonas [7], the first case of P.1 SC was reported in Florianópolis City (Greater Florianópolis) (hCoV-19/Brazil/SC-1326/2021) by January 8th, 2021, and the first case of VOC Gamma related lineage (P.1-like-II) in Chapecó City (Western Santa Catarina) on January 22th, 2021, the later also reported by Gräff et al [12]. The genetic variability of SARS-CoV-2 observed in our study is shown by the variants found here (Figure 7), which probably emerged because of the genome replication during the viral infection. Synthesis of RNA virus particles can produce an average of

100,000 viral copies in approximately 10 hours, with one RNA molecule produced every 0.4 seconds, without repair system of this new RNA produced [40,41]. ML analysis of P.1-like-II samples obtained from patients living in the Western mesoregion of SC were clustered in a single, separate clade (Figure 10), while viral samples from the other SC regions due to scarce P.1-like-II were mostly VOC Gamma and subvariants, pointing out that introduction and initial spreading of P.1-like-II variant in SC occurred via Western mesoregion (Figures 9C and 9D). Also, as highlighted in Figure 10, VOC Gamma is characterized by three mutations in the Receptor Binding Domain - RBD (K417T, E484K, and N501Y) that can modulate ACE2/RBD affinity, increasing transmissibility or even the affinity of antibody. In addition to mutations L18F, T20N, P26S, D138Y and R190S in the N-terminus (NTD), D614G and H655Y in the C-terminus of S1, and T1027I and V1176F in S2 are also report to VOC Gamma [42]. All these mutations were identified in SC, however the cluster 3 and 8 containing the P.1-like-II lineage are formed by sequences with the absence of the T20N mutation and are composed specially by samples from Western region (Figure 10). The appearance of P.1-like-II, as well as several of the variants sequenced here, is a phenomenon of cumulative mutations characteristic of RNA viruses. Accumulation of SARS-CoV-2 genome mutations may be related to transmissibility, host cell affinity, and pathogenicity [43]. These characteristics may explain what was observed in Figure 8, in which the fatalities were higher in the western region of the state of Santa Catarina, where the P.1-Like-II variant was in greater proportion.

The evolution of RNA viruses is based on amino acid substitution, the replacement rate of SARS-CoV-2 being very similar to other RNA viruses such as influenza A and Human Enterovirus, and the replacement rate for SARS-CoV-2 is 10–3 replacement per site per year, approximately two replacements per month, for circulating viruses [44,45]. Amino acid insertions are common in Spike protein (S1 and S2), which may be a natural process of viral adaptation. Investigating changes in structural protein S is of paramount importance, given the need for this protein for virus-host cell binding [46].

Thus, in this study, analysis of such markers allowed identification of two main lineages that are distinguished by the presence or absence of the T20N mutation in

the S protein. This SARS-CoV-2 protein is highly glycosylated, being involved in the virus evasion mechanisms of the human immune system through mutations that hinder viral recognition by the immune system. Most of these glycosylation sites are located in Asp residues that contain N-glycosylation sites, or Ser and Thr residues that contain O-glycosylation sites. Among these, the most frequent glycosylation sites were found in N+2, where Asp is followed by a Ser/Thr residue [47]. Remarkably, the herein reported T20N mutation at the NTD is followed by a Thr (N+2) in all analyzed samples (N20X21T22) and introduces a new potential O-glycosylation site within the S protein that may increase the virus capability to evade the immune defenses of viral neutralization by means of antibodies, not altering the potential N-glycosylation site at N17 that is also present in P.1 variants, where a Thr follows an Asp residue at position 19 (N17X18T19).

As shown in Figure 9D, by February 2021 we identified a high frequency of the subvariant P.1-like-II in samples from Western SC if comparing to the other regions of the state, preceding an increase in the CFR index, mortality rate, and deaths (Figure 13) on that mesoregion. Taken together, these data indicate that P.1-like-II had high transmissibility and effect on the lethality in the Western SC. Naveca et al. [38] showed how the second wave of COVID-19 in the state of Amazonas, with a sudden rise in cases and number of deaths during late 2020 and early 2021, directly correlates to the rise in Gamma frequency in the state, which had reached a massive prevalence by January 2021. Faria et al. [7] demonstrated that the infection by VOC Gamma is 1.1-1.8 times more severe than those previously observed by other variants, considering that the results of this variant was related to higher viral loads, greater transmissibility and an increase in the number of deaths.

The relationship between the increase in the number of cases and the appearance of variants was also observed outside of Brazil, such as in India and Europe. In India, the appearance of the Delta variant was observed during the second wave, correlating with the consequent increase in the number of deaths. In Europe, the second wave was also marked by an increase in the number of cases and deaths, which correlated with the appearance of the Alpha variant [48, 49]. However, transmission rate of SARS-CoV-2 may be affected by a variety of factors and the emergence of a given variant could not be considered the unique factor to

increase such rate [50]. Along several virus-inherent factors such as genetic variability, the lack or misuse of non-pharmaceutical interventions (NPI), social difficulties for diagnosis or late diagnosis, uncontrolled population movement [51], the collapse of the public health system [52], lower vaccination [53], the overtime decrease of the immune protection [52], late or miss decisions taken by authorities [61], and the use of scientifically unproven preventive therapies [56-58], are also important factors that might contribute to increase the transmission and case fatality rates. Examples in different countries show that an increase in the movement of people and low widespread adherence to the NPI was observed weeks before the collapse of the public health service, and the consequent increase in the number of cases and deaths [59-60]. Indeed, the SARS-CoV-2 circulation is evidenced by the detection of viral RNA copies in sewage months before being reported in people, as occurred in Santa Catarina state in November 2019 [61]. Thus, we cannot rule out that conjunction of both viral and other biological, environmental and behavioral factors have significant influence on the occurrence of SARS-CoV-2 variants presenting variable infectivity and pathological effects. Such may have contributed to the differentially increased number of cases, hospitalization, and deaths (CRF) in a short period of time in the Western SC as also previously observed in Manaus (Amazon, Brazil) having totally distinct environmental conditions than SC.

With the following report of the VOC Omicron in South Africa in November 2021 [1] this variant was rapidly detected worldwide [1] and reported in SC, beginning of December 2021, evidencing the ongoing viral adaptations and the continuing pandemic spreading pattern. Considering these facts, it is of utmost importance for maintenance of a detailed and standardized genomic surveillance of SARS-CoV-2 variants towards precise and specific identification of VOCs, avoiding erroneous epidemiological inferences and allowing evaluation of vaccine efficacy across viral variants.

Thus, high-throughput sequencing-based genomic surveillance of the SARS-CoV-2 pandemic has been crucial to assess the accumulation of mutations, mostly due to the enormous quantity of viral replication events, and the biological outcomes of the genetic variability of each variant on the epidemiology, transmissibility, infectivity, pathogenesis, and vaccine efficacy and effectiveness.

Since major concerns over the genetic evolution of SARS-CoV-2 are related to an increased spreading capability and to an escape from the immune system, genomic surveillance provides essential data to prevent the current pandemic from lasting even longer.

4.6 CONCLUSION

This study allowed us to observe the distinct patterns of circulation of different SARS-CoV-2 variants within SC regions. Our data suggest distinct introduction, and rapid spreading of the P.1-like-II in the Western regions of SC in the initial months of 2021, where it was responsible for distinct and increased hospitalization and mortality rates. Thus, the continuous real-time genomic surveillance of SARS-CoV-2 in Santa Catarina can offer precise epidemiological support for the implementation and review of policies and actions carried out by public health authorities towards control of COVID-19 transmission and assessment of immunization efficacy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is dedicated to all SC citizens who suffered or passed away due to COVID-19. We are indebted to Hospital Universitário/HU/EBSERH from Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil), Hospital Regional do Oeste (Chapecó, SC, Brazil) and Hospital Regional Santa Terezinha (Joaçaba, SC, Brazil) for granting access to interview patients and perform sample collection. We also are thankful to all institutions that provide access to genome data at EpiCov (GISAID). Finally, we are thankful to SeTIC/UFSC (Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação) for the computational infrastructure support.

FUNDING

This work was supported by Santa Catarina Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação of Santa Catarina, FAPESC, Santa Catarina, Brazil) (grant number COV2020051000065), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) and UFSC (Federal University of Santa Catarina). DAP, VBF, TATP, GAM, CLM, EKK and TZM were recipients of FAPESC, CAPES or CNPq scholarships.

DISCLAIMERS

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Federal University of Santa Catarina, Brazil, or the institutions with which the authors are affiliated. Funders have no role on study design, data analysis or decision to publish.

4.7 REFERENCES

1. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) [Internet]. 2019 Dec 30 [cited 2021 Dec 12] <https://www.who.int>.
2. National Council of Health Secretaries - Covid-19 CONASS Panel [Internet]. 2021 May [cited 2021 Dec 4] <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/>.
3. Singh J, Pandit P, McArthur AG, Banerjee A, Mossman K. Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Virology*. 2021 Aug 13;18(1):166.
4. Meredith LW, Hamilton WL, Warne B, Houldcroft CJ, Hosmillo M, Jahun AS, et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of healthcare associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2021 Mar;21(3):e36. Corrected and republished from *Lancet Infect Dis*. 2020 Nov;20(11):1263-1272.
5. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. [Internet]. 2008 [cited 2021 Nov 27] <https://www.gisaid.org>.

6. Tao, K., Tzou, P.L., Nouhin, J. *et al.* The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* 2021; 22: 757–773.
7. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, *et al.* Genomics and epidemiology of P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science.* 2021 May 21; 372(6544):815-821.
8. Hemmer CJ, Löbermann M, Reisinger EC. COVID-19: epidemiology and mutations: An update [in German]. *Radiologe.* 2021 Oct;61(10):880-887.
9. Nonaka CKV, Gräf T, Barcia CAL, Costa VF, de Oliveira JL, Passos RDH, *et al.* SARS-CoV-2 variant of concern P.1 (Gamma) infection in young and middle-aged patients admitted to the intensive care units of a single hospital in Salvador, Northeast Brazil, February 2021. *Int J Infect Dis.* 2021 Oct;111:47-54.
10. Greaney AJ, Starr TN, Gilchuk P, Zost SJ, Binshtein E, Loes AN, *et al.* Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition. *Cell Host Microbe.* 2021 Jan 13;29(1):44-57.
11. Liu Z, VanBlargan LA, Bloyet LM, Rothlauf PW, Chen RE, Stumpf S, Zhao H, Errico JM, Theel ES, Liebeskind MJ, Alford B, Buchser WJ, *et al.* Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host Microbe.* 2021 Mar 10;29(3):477-488.e4. doi: 10.1016/j.chom.2021.01.014.
12. Gräf T, Bello G, Venas TMM, Pereira EC, Paixão ACD, Appolinario LR, *et al.* Identification of SARS-CoV-2 P.1-related lineages in Brazil provides new insights about the mechanisms of emergence of Variants of Concern. [Internet]. 2021 Jun [cited 2021 Nov 30] <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-580195/v1>.
13. Varela APM, Prichula J, Mayer FQ, Salvatores, Sant'Anna FH, Gregianini TS, Martins LG, Seixas A, Veiga ABGD. SARS-CoV-2 introduction and lineage dynamics across three epidemic peaks in Southern Brazil: massive spread of P.1. *Infect Genet Evol.* 2021 Dec;96:105144.
14. Oliveira MM, Schemberger MO, Suzukawa AA, Riediger IN, do Carmo Debur M, Becker G, *et al.* Re-emergence of Gamma-like-II and emergence of Gamma-S:E661D SARS-CoV-2 lineages in the south of Brazil after the 2021 outbreak. *Virol J.* 2021 Nov 17;18(1):222.

15. Brazilian Institute of Geography and Statistics - Official Territorial Area - Federative Unit Consultation [Internet]. 2010 [cited 2021 Oct 15] <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sc.html>.
16. Santa Catarina Epidemiological Surveillance Directorate [Internet]. 2020 Mar [cited 2021 Nov 7] <https://www.dive.sc.gov.br/>.
17. Eden J-S., Sim E. SARS-CoV-2 Genome Sequencing Using Long Pooled Amplicons on Illumina Platforms. [Internet]. 2020 Apr 04 [cited 2021 Nov 24] <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-genome-sequencing-using-long-pool-ed-amp-befyjbpw?step=81>.
18. Young, E., Oakeson, K. Utah DoH ARTIC/Illumina Bioinformatic Workflow [Internet]. 2021 Jan [cited 2021 Nov 28] https://github.com/CDCgov/SARS-CoV-2_Sequencing/tree/master/protocols/B-FX-UT_ARTIC_Illumina.
19. Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20.
20. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul 15;25(14):1754-60.
21. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol*. 2019 Jan 8;20(1):8.
22. Danecek, P. *et al*. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021 Feb 16;10(2):giab008.
23. Nextclade Web 1.10.0 [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2021 Nov 9]. <https://clades.nextstrain.org/>.
24. Pangolin COVID-19 Lineage Assigner [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 9]. <https://pangolin.cog-uk.io/>.
25. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-2 [Internet]. 2020 Nov 28 [cited 2021 Dec 5] <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
26. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (ed. Springer-Verlag) cheatsheet. New York; 2016.

27. Katoh K, Standley DM. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. 2016 Jul 1;32(13):1933-42.
28. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014 Nov 15;30(22):3276-8.
29. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017 Jun;14(6):587-589.
30. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation, *Molecular Biol. Evol.* 2018 Feb;35(2):518–522.
31. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *System. Biol.* 2010 May;59(3):307–321.
32. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 2020 May 1;37(5):1530-1534.
33. Yu G. Using ggtree to Visualize Data on Tree-Like Structures. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020 Mar;69(1):e96.
34. Schneider AB, Ford CT, Hostager R, Williams J, Cioce M, Çatalyürek ÜV, et al. StrainHub: a phylogenetic tool to construct pathogen transmission networks. *Bioinformatics*. 2020 Feb 1;36(3):945-947.
35. Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 [Internet]. 2017 Sep 20 [cited 2021 Nov 17] <https://pymol.org/2/>.
36. Naveca F, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, Silva G, et al. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein. *Genom. Epidemiol.* [Internet]. 2021 Jan 11 [cited 2021 Nov 12] <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585>.

37. Castro, M. C. *et al.* Spatiotemporal pattern of COVID-19 spread in Brazil. *Science*. 2021 May 21;372(6544):821-826.
38. Naveca FG, Nascimento V, de Souza VC, Corado AL, Nascimento F, Silva G, *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat Med*. 2021 Jul;27(7):1230-1238.
39. Lamarca AP, de Almeida LGP, Francisco RDS Jr, Lima LFA, Scortecci KC, Perez VP, *et al.* Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P.1 lineage and diversification within P.2 clade in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Oct 13;15(10):e0009835.
40. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78.
41. Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13910-3.
42. Dejnirattisai, W *et al.* Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell*. 2021 May 27;184(11):2939-2954.e9.
43. Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, Tambone V, Caruso A, Angeletti S, Zella D, Ciccozzi M. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021; Volume 538, 2021, Pages 88-91.
44. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambau At, Lemey P, Baele G. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evolution*. 2020; Volume 6, Issue 2, veaa061.
45. Van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, Owen CJ, Pang J, Tan CCS, Boshier FAT, Ortiz AT, Balloux F. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020; Volume 83, 104351. ISSN 1567-1348.
46. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579, 270–273.
47. Tian W, Li D, Zhang N, Bai G, Yuan K, Xiao H, *et al.* O-glycosylation pattern of the SARS-CoV-2 spike protein reveals an "O-Follow-N" rule. *Cell Res*. 2021 Oct;31(10):1123-1125.

48. Arnab Sarkar, Alok Kumar Chakrabarti, Shanta Dutta. Pathogens. Covid-19. Infection in India: A Comparative Analysis of the Second Wave with the First Wave. Pathogens. 2021 Sep 21;10(9):1222.
49. Katarzyna J, Samuel A, Pascal A and Mondher T. On the association between SARS-COV-2 variants and COVID-19 mortality during the second wave of the pandemic in Europe. Journal of Market Access & Health Policy. 2021 VOL. 9, 2002008.
50. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA Jr, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. Lancet. 2021 Feb 6;397(10273):452-455.
51. Flaxman S, Mishra S, Gandy A, Unwin HJT, Mellan TA, Coupland H, et al. Estimating the effects of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 in Europe. Nature. 2020 Aug;584(7820):257-261.
52. da Silva SJR, Pena L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. One Health. 2021 Dec;13:100287.
53. Kupek E. Low COVID-19 vaccination coverage and high COVID-19 mortality rates in Brazilian elderly. Rev Bras Epidemiol. 2021 Sep 10;24:e210041.
54. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. N Engl J Med. 2021 Feb 11;384(6):533-540.
55. Malta M, Strathdee SA, Garcia PJ. The Brazilian tragedy: Where patients living at the 'Earth's lungs' die of asphyxia, and the fallacy of herd immunity is killing people. EClinicalMedicine. 2021 Feb 12;32:100757.
56. Furlan L, Caramelli B. The regrettable story of the "Covid Kit" and the "Early Treatment of Covid-19" in Brazil. Lancet Reg Health Am. 2021 Dec;4:100089.
57. Abella BS, Jolkovsky EL, Biney BT, Uspal JE, Hyman MC, Frank I, et al. Efficacy and Safety of Hydroxychloroquine vs Placebo for Pre-exposure SARS-CoV-2 Prophylaxis Among Health Care Workers - A Randomized Clinical Trial. JAMA Intern Med. 2021 Sep 30;181(2):195-202.
58. Popp M, Stegemann M, Metzendorf MI, Gould S, Kranke P, Meybohm P, Skoetz N, Weibel S. Ivermectin for preventing and treating COVID-19. Cochrane Database Syst Rev. 2021 Jul 28;7(7):CD015017.

59. Garcia LP, Duarte E. Nonpharmaceutical interventions for tackling the COVID-19 epidemic in Brazil. *Epidemiol Serv Saude*. 2020 Apr 9;29(2):e2020222.
60. Djin-Ye O, Silke B, Barbara B, Janine R, Frank S, Susanne D, Marianne W, Max VK, MM, Thorsten W, Ralf D. Trends in respiratory virus circulation following COVID-19-targeted nonpharmaceutical interventions in Germany, January - September 2020: Analysis of national surveillance data. *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Jul;6:100112.
61. Fongaro G, Stoco PH, Souza DSM, Grisard EC, Magri ME, Rogovski P, Schörner MA, Barazzetti FH, Christoff AP, de Oliveira LFV, Bazzo ML, Wagner G, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ*. 2021 Jul 15;778:146198.
62. Wang, H.; Miller, J.A.; Verghese, M.; Sibai, M.; Solis, D.; Mfuh, K.O. Multiplex SARS-CoV-2 Genotyping Reverse TranscriptasePCR for Population-Level Variant Screening and Epidemiologic Surveillance. *J. Clin. Microbiol*. 2021,59, e0085921. [CrossRef].
63. Wang, H.; Jean, S.; Eltringham, R.; Madison, J.; Snyder, P.; Tu, H. Mutation-specific SARS-CoV-2 PCR screen: Rapid and accurate detection of variants of concern and the identification of a newly emerging variant with spike L452R mutation. *J. Clin. Microbiol*. 2021,59, e0092621. [CrossRef].
64. Yu, C.Y.; Chan, K.G.; Yean, C.Y.; Ang, G.Y. Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics* 2021,11, 53. [CrossRef]

5 CAPÍTULO II - GENOMIC SURVEILLANCE OF SARS-COV-2 IN HEALTHCARE WORKERS: A CRITICAL SENTINEL GROUP FOR MONITORING THE SARS-COV-2 VARIANT SHIFT

Padilha, D.A.; Souza, D.S.M.; Kawagoe, E.K.; Filho, V.B.; Amorim, A.N.; Barazzetti, F.H.; Schörner, M.A.; Fernandes, S.B.; Coelho, B.K.; Rovaris, D.B.; et al. Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift. *Viruses* 2023, 15, 984. <https://doi.org/10.3390/v15040984>

Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). You are free to: Share — copy and redistribute the material in any medium or format for any purpose, even commercially; Adapt — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Open Access Article

Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift

by Dayane Azevedo Padilha ¹ ✉, Doris Sobral Marques Souza ¹ ✉, Eric Kazuo Kawagoe ¹ ✉, Vilmar Benetti Filho ¹ ✉, Ariane Nicaretta Amorim ¹ ✉, Fernando Hartmann Barazzetti ² ✉, Marcos André Schörner ² ✉, Sandra Bianchini Fernandes ³ ✉, Bruna Kellet Coelho ³ ✉, Darcita Buerger Rovaris ³ ✉, Marlei Pickler Debiase Dos Anjos ³ ✉, Juliana Righetto Moser ⁴ ✉, Fernanda Rosene Melo ⁴ ✉, Bianca Bittencourt De Souza ⁴ ✉, Dimitri da Costa Bessa ⁴ ✉, Fernando Henrique de Paula e Silva Mendes ⁴ ✉, Alexandra Crispim Boing ² ✉, Antonio Fernando Boing ² ✉, Josimari Telino de Lacerda ² ✉, Guilherme Valle Moura ⁵ ✉, + Show full author list

¹ Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-370, Santa Catarina, Brazil

³ Laboratório Central do Estado da Saúde de Santa Catarina, Florianópolis 88010-001, Santa Catarina, Brazil

⁴ Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina, Florianópolis 88015-130, Santa Catarina, Brazil

⁵ Centro de Sócio Econômico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Santa Catarina, Brazil

⁶ Biome-Hub Pesquisa e Desenvolvimento, Florianópolis 88054-700, Santa Catarina, Brazil

⁷ Instituto Federal de Santa Catarina, Gaspar 89111-009, Santa Catarina, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed.

Viruses 2023, 15(4), 984; <https://doi.org/10.3390/v15040984>

Submission received: 28 March 2023 / Revised: 11 April 2023 / Accepted: 13 April 2023 /

Published: 17 April 2023

(This article belongs to the Special Issue SARS-CoV-2 Research in Brazil)

5.1 ABSTRACT

SARS-CoV-2 genome surveillance is important for monitoring risk groups and health workers as well as data on new cases and mortality rate due to COVID-19. We characterized the circulation of SARS-CoV-2 variants from May 2021 to April 2022 in the state of Santa Catarina, southern Brazil, and evaluated the similarity between variants present in the population and healthcare workers (HCW). A total of 5291 sequenced genomes demonstrated the circulation of 55 strains and four variants of concern (Alpha, Delta, Gamma and Omicron—sublineages BA.1 and BA.2). The number of cases was relatively low in May 2021, but the number of deaths was higher with the Gamma variant. There was a significant increase in both numbers between December 2021 and February 2022, peaking in mid-January 2022, when the Omicron variant dominated. After December 2021, two distinct variant groups (Delta and Omicron) were observed, equally distributed among the five Santa Catarina mesoregions. Moreover, from November 2021 to February 2022, similar variant profiles between HCW and the general population were observed, and a quicker shift from Delta to Omicron in HCW than in the general population. This demonstrates the importance of HCW as a sentinel group for monitoring disease trends in the general population.

Keywords: healthcare workers; SARS-CoV-2 variants; Omicron; sentinel groups; COVID-19

5.2 INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), as of March 2023 (37 months after the beginning of the pandemic caused by SARS-CoV-2), COVID-19 was responsible for approximately 759 million confirmed cases and around 6.8 million deaths worldwide. In Brazil, there have been approximately 37.1 million confirmed cases of COVID-19 and more than 699,000 deaths, representing 9.2% of the global death toll [1].

Healthcare workers (HCW) have been the frontline response to the COVID-19 pandemic and have been significantly affected by the disease, mainly during the first epidemic wave [2]. A meta-analysis of prevalence conducted across 97 studies involving HCW infected with SARS-CoV-2 showed that nurses, healthcare

assistants, and physicians were the most affected by working in non-emergency wards, in screening, and with hospitalized patients [2]. During the first wave in Western Sicily and Italy, HCW were more susceptible to infection than the general population, with over 95% working in non-COVID-19 environments [3]. A study conducted in the Puglia region of Italy compared the impact of three waves of COVID-19 on HCW and found that the second wave had a significant effect. This was likely due to the less stringent lockdown measures during that period, which allowed for greater transmission of SARS-CoV-2. However, they observed that the positivity rate among doctors decreased from the first to the third wave (from 59 to 24%), which was attributed to increased adherence to protection measures, such as Personal Protective Equipment (PPEs) and the availability of vaccines [4]. In addition, a seroprevalence study performed among 4987 HCW in São Paulo, Brazil, during the first wave of the COVID-19 pandemic showed a 14% serological positivity for SARS-CoV-2 (symptomatic/asymptomatic). This was higher than the rates reported for HCW in Germany (10.7%) and China (0.2%) [5,6,7].

Despite the lack of SARS-CoV-2 sequencing in HCW, this group represents a significant risk factor for SARS-CoV-2 infection. The HCW are constantly exposed to SARS-CoV-2, making them more susceptible to infection from the various viral variants circulating in the general population. However, they also have greater access to official testing services for monitoring, which helps avoid the underreporting of cases. It is important to notice that certain characteristics of HCW reinforce the importance of establishing sentinel groups. These groups have characteristics that include agility in monitoring, population representation, the possibility of data extrapolation, and access to real-time data. This will enable better decision making in the fight against infectious diseases [8,9]. Therefore, HCW represents a good sentinel group for genomic SARS-CoV-2 surveillance.

A study published by Bromberg et al. (2022) demonstrated the importance of controlling the COVID-19 disease in Israel by monitoring the pandemic and consequently reducing the population's search for medical care [10]. SARS-CoV-2 genomic surveillance has shown a relevant impact since the beginning of the COVID-19 pandemic in 2020, when it was first used to monitor the spread of the pathogen. By February 2020, the first study describing the first likely patient hospitalized due to an unknown virus, later known as SARS-CoV-2, had been

published [11]. Ever since the first genome sequencing, genome surveillance has been used to understand the evolution, genetic diversity, and epidemiology (including transmissibility, mortality, and prognosis) of SARS-CoV-2 [12]. By March 2023, approximately 13.7 million SARS-CoV-2 genomic sequences were available in the GISAID database. The main objective of this monitoring was to track genomic mutations and the dispersion of SARS-CoV-2 variants [13].

During the COVID-19 pandemic, mutations in the SARS-CoV-2 genome have contributed to changes in pandemic dynamics caused by the emergence of variants that have provided new pandemic waves. Garcia-Beltran et al. (2022) compared the infection rates of the main SARS-CoV-2 variants to the wild type and observed that there were few differences between the Gamma and Beta variants compared to the wild type virus rates [14]. However, the Delta and Omicron variants showed significantly higher infection rates, almost double and quadruple the wild type rate, respectively. Another SARS-CoV-2 monitoring study demonstrated its epidemiological importance by identifying a P.1-Like-II subvariant isolated in western Santa Catarina state, correlating it with an increase in the number of deaths in the same region and period [15].

Therefore, this study aimed to evaluate the dispersion of SARS-CoV-2 among the general population in Santa Catarina, Brazil, from May 2021 to April 2022 and compare it to that in HCW during the Omicron wave to understand the role of HCW as sentinels in human viral surveillance.

5.3 MATERIAL AND METHODS

5.3.1 STUDIED REGIONS AND SAMPLING

This study was conducted in the state of Santa Catarina (SC), southern Brazil, between the second and third years of the pandemic, from May 2021 to April 2022. During this period, there were 454,732 confirmed cases and 3875 deaths owing to COVID-19 in Santa Catarina. Out of 5181 sequences deposited in GISAID (dataset available under the EPI_SET ID, EPI_SET_230227qf), our research group sequenced 2080 randomly selected samples (October 2021 to April 2022). In addition, 110 random samples from HCW from 12 cities in Santa Catarina were

sequenced between November 17, 2021 and February 21, 2022 (dataset available under the EPI_SET ID, EPI_SET_230227vt). On a weekly basis, samples were randomly selected from the population of individuals who tested positive for SARS-CoV-2 using RT-qPCR, and weekly sample sizes were defined to estimate the proportions of SARS-CoV-2 variants in the population with a 10% margin of error and 95% confidence.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee on Research Humans Beings of the Federal University of Santa Catarina (Assent number: 5.071.435, CASE:52676721.8.0000.0121, 29 October 2021). Only public data available between May 2021 and September 2021 on the GISAID platform were analyzed.

5.3.2 SARS-COV-2 GENOME SEQUENCING

A total of 2190 nasopharyngeal swab samples, EPI_SET_230321ms, were obtained from SARS-CoV-2 positive patients and HCW diagnosed using RT-qPCR. The inclusion criterion was a positive RT-qPCR for gene E, with Ct values of <25. Sampling took place between May 2021 and April 2022 for the general population (2080 samples), and between November 2021 and February 2022 for HCW (110 samples). Total viral RNA was extracted using the RNA Viral Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and the Illumina COVIDSeq was used [16]. The libraries were prepared using the Illumina COVIDSeq protocol (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). The primer pool also contained primers targeting human RNA, producing 11 amplicons. The PCR-amplified products were later processed for tagmentation and adapter ligation using IDT for Illumina Nextera UD Indexes Set A, B, C, and D (384 indexes, 384 samples).

Further enrichment and cleanup were performed according to the manufacturer's protocols (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). All samples were processed as batches in a 96-well plate that consisted of one COVIDSeq positive control HT (CPC HT) and one no-template control (NTC), and these 96 libraries were pooled together in a tube. Pooled samples were quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen Inc., Waltham, MA, USA) and further using Collibri Library Quantification Kit for

Illumina libraries (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Fragment sizes were analyzed using an Agilent Fragment Analyzer 5200 (Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA). The pooled library was further normalized to 650 pM concentration. For sequencing, pooled libraries were loaded onto the P1-flow cell following the NovaSeq-XP workflow, as per the manufacturer's instructions (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Dual-indexed single-end sequencing with a 150 bp read length was performed on the NextSeq 1000 platform. Amplicon sequencing is a highly targeted approach that enables researchers to analyze genetic variations in specific genomic regions. Ultra-deep sequencing of PCR products (amplicons) allows for efficient identification and characterization of variants. This method uses oligonucleotide probes designed to target and capture regions of interest, followed by next-generation sequencing (NGS) [16].

5.3.3 GENOME SAMPLING

A total of 6058 SARS-CoV-2 genome sequences from Santa Catarina (Brazil), collected between 1 May 2021 and 30 April 2022, with submission dates until 29 June 2022, were downloaded from GISAID. We selected 5181 sequences (EPI_SET_230227qf) based on genome coverage and location. Genomes with coverage below 90% and misplaced cities (erroneously labeled as Santa Catarina) were filtered out.

From these, 2080 (40.15%) were sequenced by our group according to the Illumina COVIDSeq protocol [16], originated and processed as previously described [15,16]. Samples from our group were labeled with the prefix hCoV-19/Brazil/SC-UFSC. Anonymized data on the number of COVID-19 cases and deaths were obtained from Boa Vista, an open data platform maintained by Santa Catarina (<https://dados.sc.gov.br>, accessed on 15 December 2022). In addition, 110 SARS-CoV-2 samples from HCW were processed as previously described [15,16]. These 110 samples (EPI_SET_230227vt) were analyzed in association with 698 genome sequences (EPI_SET_230227ug) generated by our research group that originated from the same cities as the HCW during the same period (November 2021 to February 2022).

The total number of HCW in Santa Catarina was obtained from public data available at the CNES database (<https://elasticsearch.saude.gov.br/profissionais>, accessed on 15 December 2022). The samples were filtered using trade names (hospital, CEPON, LACEN, secretaria de saúde e maternidade), attendant professional (sim), local, and professional (doctor, nurse, nurse assistant, and nursing technician). Redundancy was removed using HCW registration (Professional-CNS). An error rate of 9.31% was obtained at a 95% confidence level. The sample size was 110 and the total number of HCW (N) was 15,382, assuming a homogeneous distribution.

A comparison between HCW and the general population from November 2021 (epi week 47 of 2021) to early February 2022 (epi week 6 of 2022) was performed to determine the potential differences during the variant of concern (VOC) shift.

5.3.4 SARS-COV-2 VARIANT ANALYSIS

Amino acid mutations, deletions, and insertions were used to assess the dissimilarity of the genomes using the vegan R package v. 2.5.6 and the Jaccard index method. Multidimensional scaling (MDS) and the distribution of variants in Santa Catarina were plotted using the ggplot2 R package v. 4.2.0 [17] with samples present in EPI_SET_230227vt and EPI_SET_230227ug. Only one sample was assigned to the BA.2 lineage (EPI_ISL_10077553) and was removed from the Omicron MDS.

5.3.5 MAXIMUM LIKELIHOOD (ML) PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HCW

Maximum likelihood (ML) analysis was performed for 808 samples (EPI_SET_230227vt and EPI_SET_230227ug) from HCW and the general population, in addition to the reference genome (GenBank accession number: NC_045512). Genome sequences were aligned by MAFFT v7.505 [18] using the FFT-NS-2 method, and an ML tree was constructed based on the multiple sequence alignment using IQ-TREE v2.2.0.3 [19]. The most suitable substitution model (GTR + F + R5) was predicted and automatically chosen using ModelFinder [20]. Ultrafast bootstrap [21] and SH-like approximate likelihood ratio tests (SH-aLRT) were

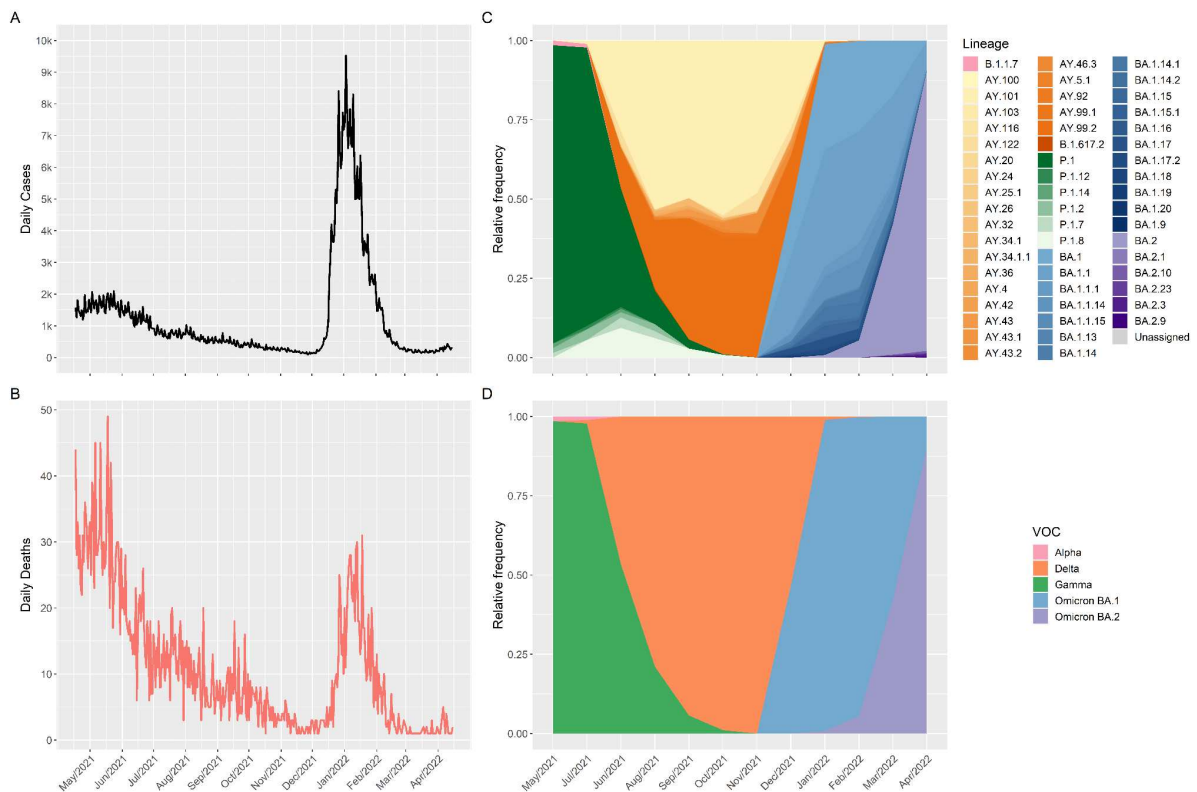
performed with 1000 bootstrap replicates. The ML consensus tree was visualized and annotated using the iTOL web service [22].

5.4 RESULTS

5.4.1 PROFILE OF SARS-COV-2 VARIANTS IN SANTA CATARINA (BRAZIL) DURING THE SECOND YEAR OF THE COVID-19 PANDEMIC PERIOD (MAY 2021 TO APRIL 2022)

The daily peaks of cases and deaths during the period of this study did not occur at the same time. From May 2021 to June 2021, the number of deaths and cases decreased (Figure 15A,B) as the shift in dominance from VOC Gamma to VOC Delta occurred (Figure 15C,D). However, between December 2021 and February 2022, the number of cases per day increased very quickly after the emergence of Omicron BA.1 by the end of November 2021, and the escalation of this variant was followed by the BA.2 sub-lineage in February 2022 (Figure 15C,D). Although the number of cases has significantly increased with the emergence of the Omicron variant around the beginning of 2022, daily deaths have only slightly increased and remain lower than those during the Gamma period (May 2021 to June 2021) (Figure 15A,B).

Figure 15. Number of cases/deaths and variant distribution of SARS-CoV-2 from 1 May 2021 to 30 April 2022.



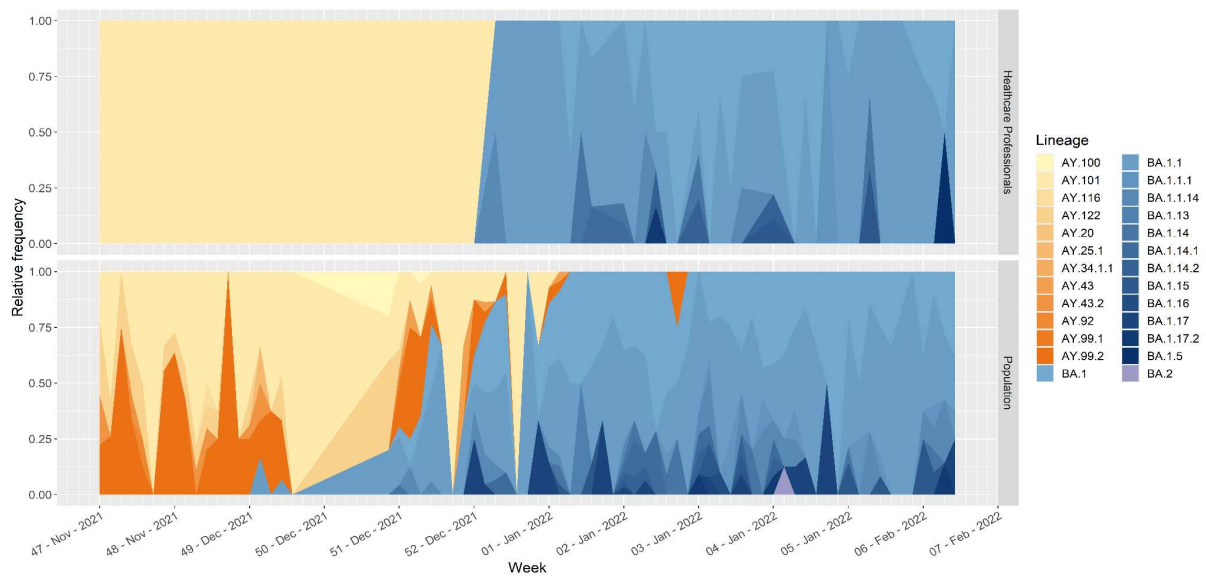
Legenda: Number of cases/deaths and variant distribution of SARS-CoV-2 from 1 May 2021 to 30 April 2022. (A) Daily cases and (B) daily deaths, according to the Boa Vista platform (<https://dados.sc.gov.br>, accessed on 15 December 2022). SARS-CoV-2 variant profile (C) by lineage and (D) by variant of concern (VOC).

During this study, 55 different lineages and four VOCs—Alpha, Delta, Gamma, and Omicron (BA.1 and BA.2)—were identified (Figure 15C). The relative frequencies of the VOCs varied at different points during the study. In May 2021, the presence of the Gamma variant was higher, with the frequency decreasing until October 2021, whereas the presence of the Delta variant increased and persisted from July 2021 to January 2022. In December 2021, the Omicron variant became the dominant VOC in Santa Catarina (Figure 15D).

5.4.2 VARIANT SHIFT (DELTA TO OMICRON) IN HCW AND GENERAL POPULATION IN SANTA CATARINA (BRAZIL)

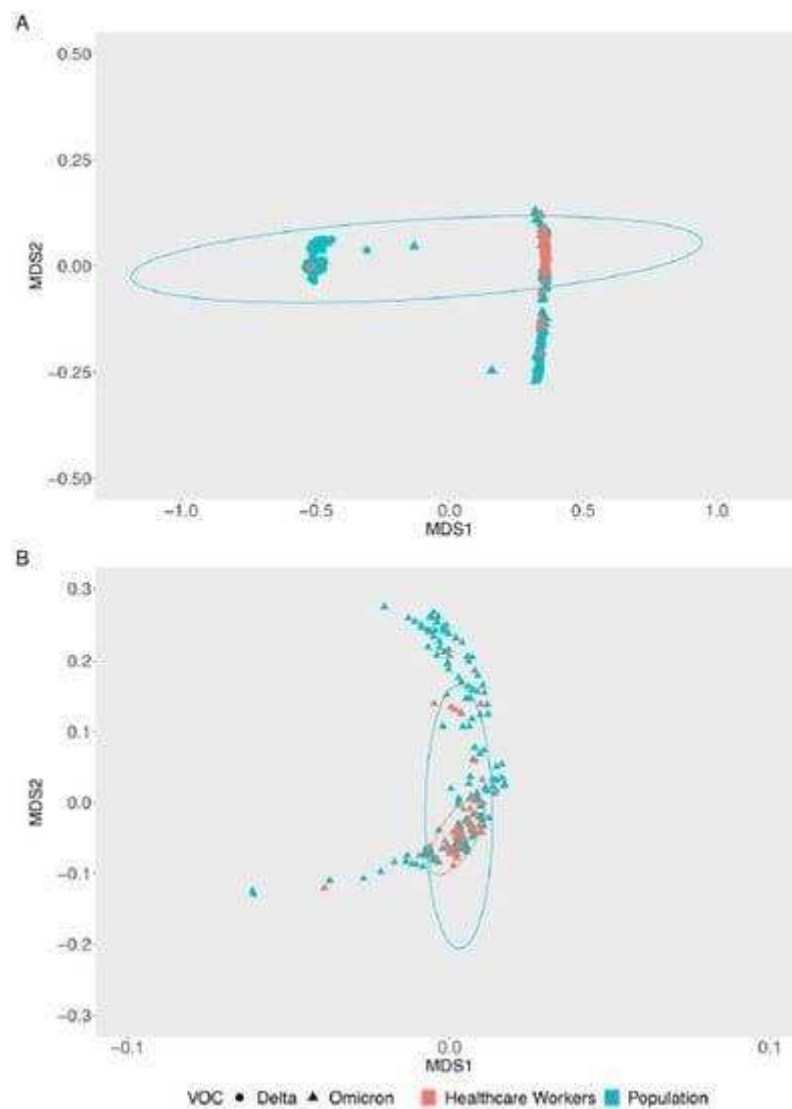
At the end of the VOC Delta dominance and emergence of the VOC Omicron (November 2021 to February 2022), 26 lineages were identified and classified under both VOCs. Interestingly, the variant profiles were very similar when the relative frequencies in HCW and the general population were compared (Figure 16). However, it is worth noting that the shift among HCW occurred quicker than that in the general population, showing that the HCW group reproduced the pattern of the general population. In addition, multidimensional scaling (MDS) (Figure 17) revealed that both the HCW and general population groups present similar SARS-CoV-2 genomes in all states of Santa Catarina (Figure 17A,B), reinforcing the idea that genomic surveillance in the HCW group also reflects the variants and genetic profiles circulating among the general population.

Figure 16. Comparison of relative frequency for each SARS-CoV-2 lineage in healthcare workers and general population during the variant shift from Delta to Omicron.



Legenda: Comparison of relative frequency for each SARS-CoV-2 lineage in healthcare workers and general population during the variant shift from Delta to Omicron.

Figure 17. Multidimensional scale (MDS) with Jaccard dissimilarity plot of genomes based on amino acids and presence/absence of mutations, deletions, and insertions.



Legenda: Multidimensional scale (MDS) with Jaccard dissimilarity plot of genomes based on amino acids and presence/absence of mutations, deletions, and insertions—a comparison between healthcare workers and the general population of Santa Catarina, from November 2021 to February 2022. **(A)** Displaying Delta and Omicron variants **(B)** Omicron BA.1 lineage and sublineages.

5.5 DISCUSSION

Since 2020, SARS-CoV-2 has been responsible for numerous COVID-19 cases and related deaths worldwide. Even more than two years after the start of the pandemic, issues regarding rapid diagnosis, real-time monitoring, dissemination, and surveillance of the virus genome persist. Due to the higher cost of molecular

techniques involved in SARS-CoV-2 diagnostics and sequencing, it is essential to find representative samples that can help reduce the costs associated with genomic surveillance. In September 2022, the coverage rate of SARS-CoV-2 was approximately 150 sequences per 100,000 inhabitants in the world and 60 sequences per 100,000 inhabitants in Brazil, demonstrating the low sequential coverage in Brazil relative to the world average [13,23].

This study aimed to monitor SARS-CoV-2 with the sequencing platform Illumina COVIDSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) in Santa Catarina from May 2021 to April 2022, both in the general population and among HCW, evaluating HCW as possible sentinel groups.

In this study, we observed the presence of different variants in 12 months (May 2021 to April 2022) in Santa Catarina. Our group was responsible for sequencing 40.15% of the sequences submitted to GISAID for the same period and region, and it was also possible to evaluate the dispersion of the four VOCs (Alpha, Gamma, Delta, and Omicron—BA.1 and BA.2) (Figure 15).

In another study conducted by our research group during the first year of the pandemic, we identified the presence of two VOCs (Beta and Gamma) and 23 distinct lineages [15]. In the present study, 55 lineages and four VOCs were found to be equally distributed in Santa Catarina between May 2021 and April 2022. This is in contrast with the findings of Padilha et al. (2022), who also compared different regions of Santa Catarina and showed a relationship between the variant (P.1-like-II) and region (Western), associating this factor with increased propagation of the disease and a higher mortality rate [15].

In Brazil, Scheler et al. (2022) compared the deaths of pregnant and non-pregnant women during the first and second waves of the pandemic [24]. The authors demonstrated that maternal deaths from COVID-19 increased in the second wave compared with the first wave, and this increase was greater in patients with comorbidities. Another study in Brazil compared mortality among different age groups between January 2021 and February 2022. During this study, approximately 400 million deaths were analyzed, and the same findings showed that the second wave had a higher mortality rate than the first wave [25]. de Souza et al. (2021) demonstrated the high prevalence of the Gamma variant in the state of Amazonas (Northern Brazil) [26]. It is possible to correlate the presence of this variant with an

increase in the number of deaths. Several hypotheses exist for these findings, such as the difficulty in enforcing social distancing, incorrect application of nonpharmaceutical interventions, and low or late vaccination, particularly in young populations. The present study corroborates the findings of Scheler and Orellana, considering that during the second pandemic wave, it was also possible to observe an increase in the number of deaths (Figure 15B), with peaks in May 2021 and January 2022, both related to the appearance of Gamma and Omicron variants (Figure 15C,D), respectively. Unlike the Gamma variant, which presented high mortality even with a low number of cases, the Omicron variant was characterized by a greater number of cases than the number of deaths in this study.

Omicron variants are characterized by approximately 30 mutations in the Spike (S) protein alone, while other mutations are spread throughout the rest of the viral genome. These mutations appear to increase the affinity of the S protein for the host angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, which may be related to the higher transmissibility of Omicron compared with other SARS-CoV-2 variants [14,27]. This hypothesis would explain the findings of this study, in which we observed an increase in the number of cases, but not in the number of deaths, during the period in which the Omicron variant was more prevalent (Figure 15A,B). The holidays' celebrations, the flexibility of nonpharmaceutical interventions (NPI) measures and the summer vacation period in Santa Catarina State at the end of 2021 could also contribute to the crowded gatherings in closed spaces and the increase in the number of cases in this period of 2021, as observed previously in other countries [28,29,30] and in other Brazilian states [31,32].

In Italy, during the first wave of COVID-19, HCW were more easily infected with SARS-CoV-2 than the general population, and their infection was independent of whether they were operating in COVID-19 or non-COVID-19 working environments [3]. As soon as vaccination against SARS-CoV-2 became available, governments prioritized the vaccination of HCW. In Southern Brazil, including Santa Catarina, vaccination began in early 2021, and HCW were vaccinated so they may perform their jobs on-site. There is no consensus on adherence to vaccination in the general population in most regions of the country. Differences in vaccination status may have influenced the delay in the initial detection of SARS-CoV-2 in HCW compared with the general population (Figure 16). As a result, fewer samples were

collected from HCW until epiweek 52 compared to the general population, and consequently, fewer varieties in strain lineages (only Delta lineages) were seen. Guijarro et al. (2021) observed that after the first dose of BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccination of HCW, the SARS-CoV-2 incidence decreased by 71% (symptomatic and asymptomatic tested) compared to the 2% in the non-vaccinated general population [33]. The HCW sample collection in our research began in March 2021, after the start of their vaccination. In the following weeks of monitoring, there were no differences between the lineages detected in either group (Figure 16), with Omicron lineages becoming dominant in the epidemiological scenario. This demonstrates that despite the medical professionals being exposed more during patient care, they may be better protected owing to the use of personal protective equipment and the efficacy of vaccine adherence.

The total of HCW, the restricted study period and the regionality are limiting factors of the study. Therefore, to generalize the findings of this work, with an error rate of 9.3 at 95% confidence level, these limit factors must be considered.

5.6 CONCLUSION

Based on the data presented here, it is possible to reinforce the importance of genomic surveillance as a tool for monitoring SARS-CoV-2 infection. Our findings support previous literature demonstrating a surge in COVID-19 cases during the second wave of the pandemic, and that the two notable peaks in deaths were associated with the emergence of the Gamma and Omicron VOCs. However, we should point out that the change from Gamma to Delta variant was slower in Brazil than in other countries, and the daily cases decreased. In addition, we showed that the VOC Omicron became the most predominant VOC in Santa Catarina four weeks after the first case, and it was correlated with the highest number of cases but not the highest number of deaths. Moreover, our data revealed that HCW are a critical sentinel group for the genomic surveillance of SARS-CoV-2, given that the VOC profile is similar to that observed in the general population and the previous VOC shifts in this group. Taken together, our results demonstrate that HCW are critical representatives of the major changes in variant profiles in the general population. This is due to the similar behavior of these two groups in terms of viral genome

dispersion. Few studies have investigated HCW as a sentinel group for determining the current trends in emerging SARS-CoV-2 variants and their pathogenesis. Our study is a pioneering one in Brazil for considering this approach for the genomic surveillance of SARS-CoV-2. Identifying representative sample groups of the population may bring greater accuracy to data in regions with limited investments, making this type of surveillance more feasible.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.A.P., S.B.F., D.B.R., M.P.D.D.A., F.R.M., A.C.B., A.F.B., J.T.d.L., G.V.M., L.F.V.D.O., M.L.B., G.F. and G.W.; Data curation, E.K.K., V.B.F., A.N.A., J.R.M., B.B.D.S., D.d.C.B., F.H.d.P.e.S.M., D.C.D.B. and R.S.M.; Formal analysis, E.K.K., V.B.F., B.B.D.S., F.H.d.P.e.S.M. and D.C.D.B.; Funding acquisition, D.B.R., M.P.D.D.A., F.R.M., Alexandra Boing, L.F.V.D.O., M.L.B., G.F. and G.W.; Investigation, D.A.P., D.S.M.S., E.K.K., V.B.F., A.N.A., F.H.B., M.A.S., S.B.F., B.K.C., J.R.M., D.d.C.B., D.C.D.B. and M.H.d.M.; Methodology, S.B.F., F.R.M., Alexandra Boing, G.V.M., P.H.S., M.L.B., G.F. and G.W.; Project administration, G.W.; Resources, D.B.R., M.P.D.D.A., F.R.M., Luiz Felipe Valer de Oliveira, P.H.S., M.L.B., G.F. and G.W.; Software, E.K.K. and R.S.M.; Supervision, F.R.M., G.F. and G.W.; Visualization, E.K.K., V.B.F. and B.B.D.S.; Writing—original draft, D.A.P., D.S.M.S., E.K.K., A.N.A. and G.F.; Writing—review and editing, A.C.B., A.F.B., J.T.d.L., G.V.M., P.H.S., M.L.B. and G.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Santa Catarina Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação of Santa Catarina, FAPESC, Santa Catarina, Brazil) (grant number COV2020051000099), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil) (grant number 001), UNIEDU (Santa Catarina Program of University Scholarship, Education Santa Catarina Office, Santa Catarina, Brazil) and UFSC (Federal University of Santa Catarina). D.A.P.,

D.S.M.S., E.K.K., V.B.F., A.N.A. and F.H.B. were recipients of FAPESC, CAPES or UNIEDU scholarships.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee on Research Humans Beings of the Federal University of Santa Catarina (Assent number: 5.071.435, CAAE: 52676721.8.0000.0121, 29 October 2021).

INFORMED CONSENT STATEMENT

SARS-CoV-2 positive samples from Central Laboratory of Santa Catarina State (LACEN/SC) and from University Hospital (HU-UFSC/EBSERH) at Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) were made available anonymously.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All DNA sequences generated during the current study are available in the GISAID EpiCoV repository (<https://www.gisaid.org>, accessed on 14 January 2023) under the following EPI_SET IDs: EPI_SET_230321ms (samples sequenced by our research group) and EPI_SET_230321kb (samples originated by other research groups).

ACKNOWLEDGMENTS

This work is dedicated to all SC citizens who suffered or passed away due to COVID-19. We are indebted to Hospital Universitário/HU/EBSERH from Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) for granting access to interview patients and perform sample collection. We also are thankful to all institutions that provide access to genome data at EpiCov (GISAID). We are thankful to SeTIC/UFSC (Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da

Informação e Comunicação) for the computational infrastructure support. Finally, we thank all the team of the Rede Vigilância Genômica de Santa Catarina (<https://genomacovidsc.ufsc.br>, accessed on 27 March 2023).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

5.7 REFERENCES

1. Araf, Y. et al. (2022) 'Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines', *Journal of Medical Virology*, 94(5), pp. 1825–1832. doi: 10.1002/jmv.27588.
2. Costa, S. F. et al. (2021) 'Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Seroprevalence and Risk Factors among Oligo/Asymptomatic Healthcare Workers: Estimating the Impact of Community Transmission', *Clinical Infectious Diseases*, 73(5), pp. E1214–E1218. doi: 10.1093/cid/ciaa1845.
3. Costantino, C. et al. (2021) 'SARS-CoV-2 Infection in Healthcare Professionals and General Population During "First Wave" of COVID-19 Pandemic: A Cross-Sectional Study Conducted in Sicily, Italy', *Frontiers in Public Health*, 9(May). doi: 10.3389/fpubh.2021.644008.
4. Eden, J.-S. (2020) 'SARS-CoV-2 Genome Sequencing Using Long Pooled Amplicons on Illumina Platforms', *Protocols.io*, (March), pp. 1–8. Available at: <https://protocols.io/view/sars-cov-2-genome-sequencing-using-long-pooled-amp-befyjbpw.html>.
5. Garcia-Beltran, W. F. et al. (2022) 'mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant', *Cell*. Elsevier Inc., 185(3), pp. 457-466.e4. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.033.
6. GISAID (2022) Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. Available at: <https://www.gisaid.org>.
7. Gómez-Ochoa, S. A. et al. (2021) 'COVID-19 in Health-Care Workers: A Living Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence, Risk Factors,

- Clinical Characteristics, and Outcomes', *American Journal of Epidemiology*, 190(1), pp. 161–175. doi: 10.1093/aje/kwaa191.
8. Guijarro, C. et al. (2021) 'SARS-CoV-2 new infections among health-care workers after the first dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. A hospital-wide cohort study', *Clinical Microbiology and Infection*, 27(11), pp. 1699.e1-1699.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2021.06.026.
 9. Hadfield, J. et al. (2018) 'NextStrain: Real-time tracking of pathogen evolution', *Bioinformatics*, 34(23), pp. 4121–4123. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407.
 10. Hoang, D. T. et al. (2018) 'UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation', *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), pp. 518–522. doi: 10.1093/molbev/msx281.
 11. Kalyaanamoorthy, S. et al. (2017) 'ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates', *Nature Methods*, 14(6), pp. 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285.
 12. Katoh, K. and Standley, D. M. (2013) 'MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability', *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), pp. 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
 13. Korth, J. et al. (2020) 'SARS-CoV-2-specific antibody detection in healthcare workers in Germany with direct contact to COVID-19 patients', *Journal of Clinical Virology*, 128(May). doi: 10.1016/j.jcv.2020.104437.
 14. Liu, M. et al. (2020) 'Use of personal protective equipment against coronavirus disease 2019 by healthcare professionals in Wuhan, China: Cross sectional study', *The BMJ*, 369, pp. 6–11. doi: 10.1136/bmj.m2195.
 15. De Maria, L. et al. (2022) 'Comparison of Three Different Waves in Healthcare Workers during the COVID-19 Pandemic: A Retrospective Observational Study in an Italian University Hospital', *Journal of Clinical Medicine*, 11(11), p. 3074. doi: 10.3390/jcm11113074.
 16. Minh, B. Q. et al. (2020) 'IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era', *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), pp. 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015.
 17. ONU (2022) *World Population Prospects*, World Population Prospects. doi: 10.18356/cd7acf62-en.

18. Orellana, J. D. Y., Marrero, L. and Horta, B. L. (2022) 'COVID-19 mortality in Brazil in different age groups : differentials between extreme rates in 2021 and 2022', *Reports in Public Health*, 38(7), pp. 1–8. doi: 10.1590/0102-311XPT041922.
19. Padilha, D. A. et al. (2022) 'Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil', *Viruses*, 14(4). doi: 10.3390/v14040695.
20. Rao, V. et al. (2022) 'Omicron sub-lineage BA.2 may have "substantial growth advantage," UKHSA reports', *BMJ (Clinical research ed.)*, 376(December 2020), p. o263. doi: 10.1136/bmj.o263.
21. Scheler, C. A. et al. (2022) 'Maternal Deaths from COVID-19 in Brazil: Increase during the Second Wave of the Pandemic', *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*. doi: 10.1055/s-0042-1748975.
22. de Souza, F. S. H. et al. (2021) 'Second wave of COVID-19 in Brazil: younger at higher risk', *European Journal of Epidemiology*, 36(4), pp. 441–443. doi: 10.1007/s10654-021-00750-8.
23. WHO (2022) World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19). Available at: <https://www.who.int>.
24. Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
25. Wu, F. et al. (2020) 'A new coronavirus associated with human respiratory disease in China', *Nature*, 579(7798), pp. 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
26. Young, E., & Oakeson, K. (2021). Utah DoH ARTIC/Illumina bioinformatic workflow. GitHub. Available at: https://github.com/CDCgov/SARS-CoV-2_Sequencing.
27. Yu, G. et al. (2017) 'Ggtree: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees With Their Covariates and Other Associated Data', *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), pp. 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628.

6 CAPÍTULO III - MONITORING OF RESPIRATORY VIRUS COINFECTION IN SOUTHERN BRAZIL DURING COVID-19 PANDEMIC

Dayane Azevedo Padilha^{1,3}, Fernando Hartmann Barazzetti^{2,3}, Marcos André Schörner², Vilmar Benetti Filho^{1,3}, Eric Kazuo Kawagoe³, Doris Sobral Marques Souza¹, Maria Luiza Bazzo², Glauber Wagner³ and Gislaine Fongaro^{1*}

Copyright ©2024: medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2024.04.09.24305542>; this version posted April 12th, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a [CC-NC 4.0 International license](#).

The screenshot shows the medRxiv preprint interface. At the top left is the medRxiv logo with the tagline 'THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES'. To its right are logos for CSH Cold Spring Harbor Laboratory and BMJ Yale. A navigation bar includes links for HOME, SUBMIT, FAQ, BLOG, ALERTS / RSS, RESOURCES, and ABOUT. A search bar is located on the right. Below the navigation is a 'Follow this preprint' button and a 'Previous' button. The main title of the preprint is 'MONITORING OF RESPIRATORY VIRUS COINFECTION IN SOUTHERN BRAZIL DURING COVID-19 PANDEMIC'. Below the title is a list of authors with ORCID icons: Dayane Azevedo Padilha, Fernando Hartmann Barazzetti, Marcos André Schörner, Vilmar Benetti Filho, Eric Kazuo Kawagoe, Doris Sobral Marques Souza, Maria Luiza Bazzo, Glauber Wagner, and Gislaine Fongaro. The DOI is provided as <https://doi.org/10.1101/2024.04.09.24305542>. A disclaimer states: 'This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should not be used to guide clinical practice.' There are social media sharing icons (0 comments, 0 likes, 0 shares, 0 downloads, 0 citations, 2 tweets). On the right side, there are buttons for 'Download PDF', 'Print/Save Options', 'Author Declarations', and 'Data/Code'. Below these are 'Email', 'Share', and 'Citation Tools' options. At the bottom right, there is a 'Post' button and a 'Like 0' button. A link for 'COVID-19 SARS-CoV-2 preprints from medRxiv and bioRxiv' is also visible.

¹ Laboratório de Virologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

² Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

³ Laboratório de Bioinformática do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

* Corresponding Author: Prof. Gislaine Fongaro

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

E-mail: gislainefongaro@gmail.com

6.1 ABSTRACT

Since December 2019, the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has reached approximately 769 million people, leading to more than 7 million deaths worldwide. Faced with the possible presence of other respiratory pathogens that could coinfect and modify the clinical response of patients detected for SARS-CoV-2, some researchers have explored this line of investigation. The relationship between these coinfections remains unclear, leading to a need to deepen our knowledge about interactions among pathogens, and between pathogens and the host. Thus, the present study used RT-qPCR to evaluate the presence of human adenovirus (HAdV), influenza A (Flu A), influenza B (Flu B), human metapneumovirus (HMPV), respiratory syncytial virus (RSV), human rhinovirus (HRV) and parainfluenza virus (PIV), in addition to SARS-CoV-2 itself.

A total of 187 nasopharyngeal samples from adult patients exhibiting respiratory symptoms were collected between February 2021 and November 2022 at the University Hospital Polydoro Ernani de São Thiago in Florianópolis, SC, Brazil. Our findings revealed that 25.16% of samples tested positive for non-SARS-CoV-2 respiratory viruses (29.8% - HRV, 5.3% - PIV, 4.3% - RSV, and 1.1% - HMPV). From the 74.84% of SARS-CoV-2 positive patients, the presence of coinfection was observed in 9.7% of patients, with 7.5% being HRV, 1.1% HAdV and 1.1% Flu A. Since coinfections can potentially alter patient prognoses and impact local epidemiological dynamics, this study highlights the significance of ongoing monitoring and epidemiological assessment through genomic surveillance of other clinically relevant respiratory pathogens.

Keywords: Coinfection; Respiratory Viruses; RT-qPCR; SARS-CoV-2.

6.2 INTRODUCTION

In August 2023, the pandemic of COVID-19, caused by SARS-CoV-2, reached approximately 769 million cases and almost 7 million deaths worldwide, while in Brazil, the number of cases is approaching 37 million with approximately

700,000 deaths 1. These data reinforce the clinical and epidemiological importance of this pandemic that lasted more than 3 years.

Early reports from China said that coinfection of SARS-CoV-2 with other respiratory viruses is rare. However, studies have shown that the presence of coinfection between SARS-CoV-2 and other respiratory viruses seems to aggravate lung disease in such a way as to increase the need for mechanical ventilation (when coinfecting with influenza, for example), in addition to impacting the circulation of seasonal viral infections and patient morbidity in cases where there is coinfection of SARS-CoV-2 with Respiratory Syncytial Virus (RSV), Human Adenovirus (HAdV), Human Rhinovirus (HRV) and human Metapneumovirus (HMPV) 2, 3.

The coinfection of SARS-CoV-2 and influenza is the most reported in the literature. In addition, the two viruses share similarities in terms of respiratory symptoms. It is believed that at the beginning of the pandemic, several cases may have been misdiagnosed, as at that time there were no well-established diagnostic tests for SARS-CoV-2 4.

During the first cases of severe acute respiratory infections, at a time in which the pathological agent had not been identified, molecular biology techniques for detecting pathogens through respiratory panels were decisive and paved the way for the sequencing and classification of SARS-CoV-2. At the beginning of the SARS-CoV-2 pandemic, the number of studies of coinfection with other respiratory pathogens was very low. Even today, after the WHO declared the end of the pandemic, knowledge about the influences of coinfections of SARS-CoV-2 with other respiratory viruses is unclear with regards to host-pathogen interactions, patterns of infection and transmissibility, and the clinical outcome of patients 5.

Studies have demonstrated the importance of identifying pathogens that cause acute pneumonia even before COVID-19, given the pulmonary predominance of influenza A (Flu A) and influenza B (Flu B), HRV, RSV, HMPV, and Parainfluenza Virus (PIV), which had their epidemiological patterns modified with the insertion of SARS-CoV-2 into the population 6.

The present study evaluated 187 nasopharyngeal samples from patients with non-serious respiratory symptoms, admitted to a screening unit for the diagnosis of COVID-19, to determine coinfections by HAdV; Flu A; Flu B; HMPV; RSV; HRV, and

PIV. Thus, this study aims to report the profile of coinfections of respiratory viruses and SARS-CoV-2 from February 2021 to November 2022 in the state of Santa Catarina, Brazil.

6.3 MATERIALS AND METHODS

6.3.1 SAMPLES PROCESSING

A total of 187 nasopharyngeal samples from adults (men and women), with non-serious respiratory symptoms, were randomly collected between February 2021 and November 2022 – of which 88 were obtained from healthcare professionals – with 93 positive and 94 negative diagnoses for SARS-CoV-2. Samples were collected using a nasopharyngeal swab in an appropriate transport medium, as recommended by health agencies, for the diagnosis of SARS-CoV-2.

6.3.2 RNA PURIFICATION AND PCR

The samples were aliquoted and stored in cryotubes at -80°C . The viral genome was extracted using QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA). Detection of SARS-CoV-2 was performed using the Allplex™ 2019-nCoV Assay Kit or Allplex™ SARS-CoV-2 Assay Kit (Seegene, Korea). SARS-CoV-2 negative and positive samples from symptomatic patients were randomly selected at different periods and tested on the Allplex™ RV Essential Assay (Seegene, Korea), multiplex qPCR, kit used to detect seven other respiratory viruses: HAdV; Flu A; Flu B; HMPV; RSV; HRV and PIV. Amplification was performed according to the manufacturer's instructions on the CFX96™ Real-time PCR System thermal cycler (Bio-Rad®) and the results were visualized using the Seegene View software.

6.3.3 STATISTICAL ANALYSIS

During this study, 187 nasopharyngeal samples from adult patients with respiratory symptoms were collected between February 2021 and November 2022 at the Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago in Florianópolis, SC, Brazil. After PCR testing for the viruses HAdV, Flu A, Flu B, HMPV, RSV, HRV, and PIV,

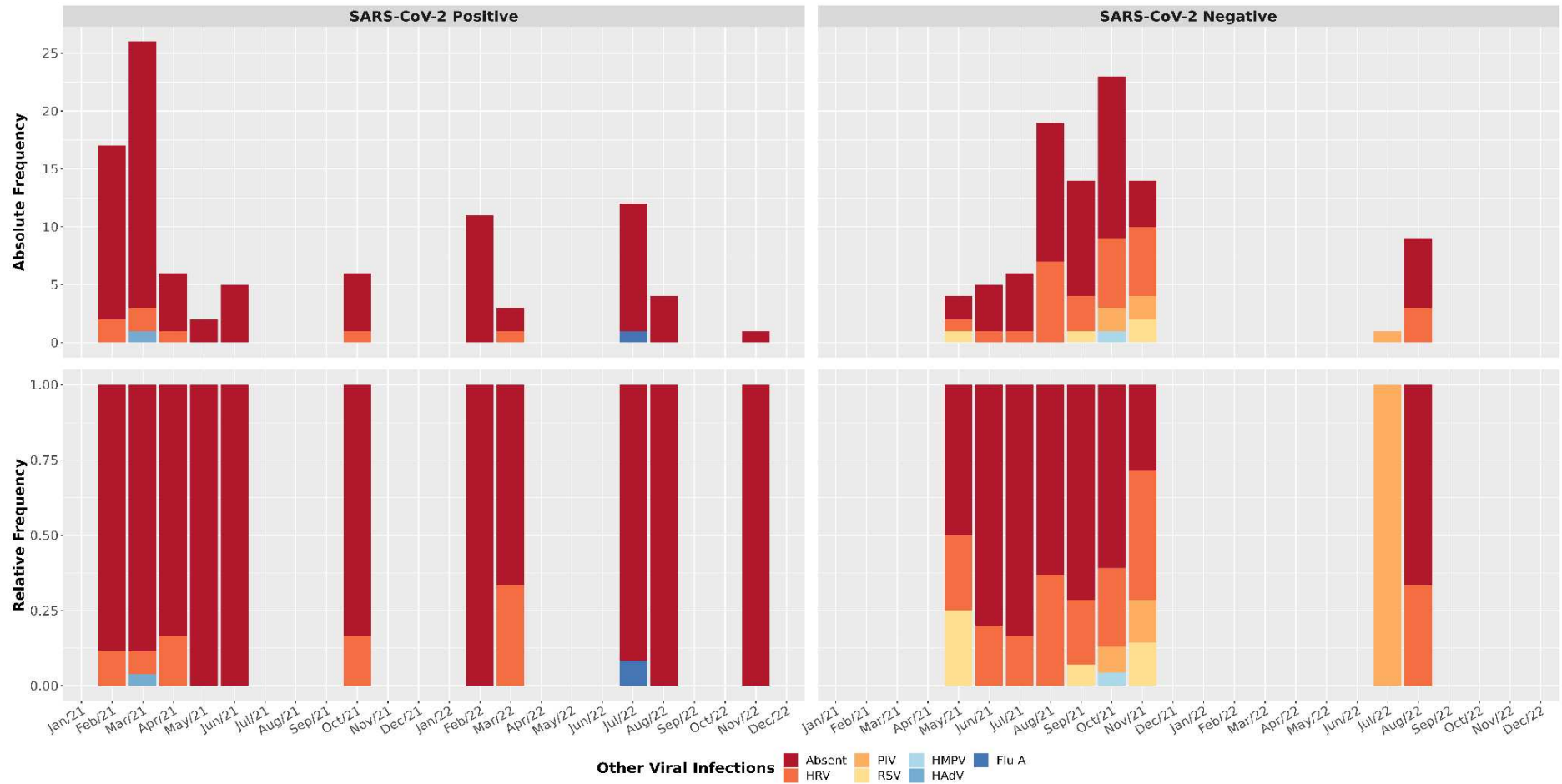
Fisher's exact test was used to examine the association between SARS-CoV-2 and other viral infections.

6.4 RESULTS

From February 2021 to November 2022, 187 samples were randomly selected to determine coinfection of SARS-CoV-2 with HAdV, Flu A, Flu B, HMPV, RSV, HRV, and PIV. None of the 187 samples were positive for Flu B. Between February 2021 and November 2022, one test was positive for HAdV, one for Flu A, one for HMPV, four for RSV, 35 HRV, and five for PIV.

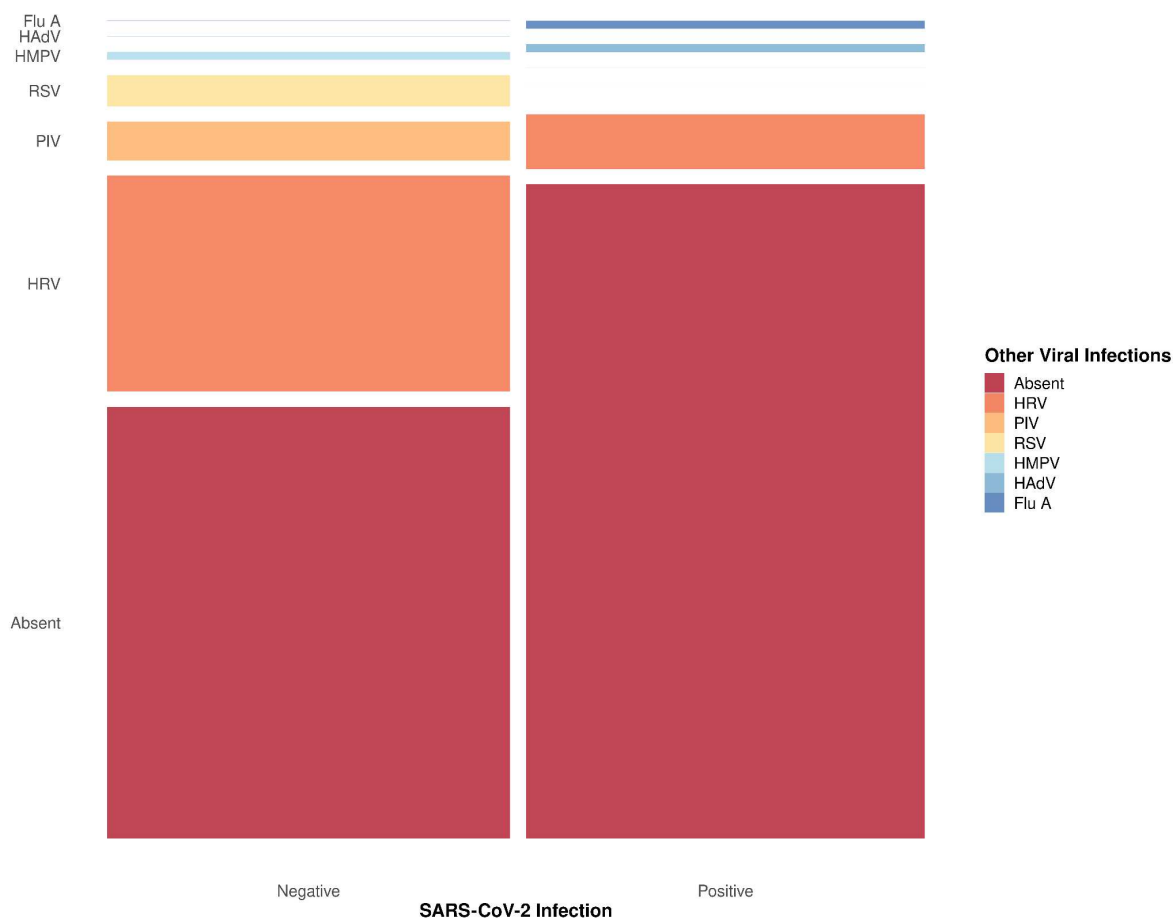
The absolute and relative frequencies for viral infections are shown in Figure 18. HRV was the most frequent infection for patients with negative SARS-CoV-2 qPCR results (Figure 19). Furthermore, it was possible to observe coinfections between HRV, PIV, HMPV and RSV, without the presence of SARS-CoV-2 (Figure 18). SARS-CoV-2-positive patients had more coinfections with HRV than the other tested viruses (Figure 19). Also, Flu A and HAdV were only detected in SARS-CoV-2 positive patients and this result indicates a relationship between SARS-CoV-2 and other viral infections caused by Influenza A and HAdV (Fisher's exact test p-value = 0.000001327).

Figure 18. Viral profile in positive and negative SARS-CoV-2 samples.



Legenda: Absolute and relative frequency for respiratory viral panel tests. Human adenovirus (HAdV); influenza A (Flu A); human metapneumovirus (HMPV); respiratory syncytial virus (RSV); human rhinovirus (HRV) and parainfluenza virus (PIV).

Figure 19. Summary of viral infection related to SARS-CoV-2 diagnostic.



Legenda: The respiratory viral panel tests included human adenovirus (HAdV), influenza A (Flu A), human metapneumovirus (HMPV), respiratory syncytial virus (RSV), human rhinovirus (HRV), and parainfluenza virus (PIV). The thinnest lines represent zero counts, and all viruses are ordered in the same sequence in both columns.

6.5 DISCUSSION

Even after the official WHO declaration 1 on the end of the public health emergency of international concern related to COVID-19, scientific data still needs to be explored in search of answers that can elucidate the variations in the clinical presentation among patients and in the epidemiological aspects of SARS-CoV-2. One of these explorations involves the importance of coinfection with other respiratory pathogens 1.

Respiratory viruses such as influenza (Flu A and Flu B) and RSV were already known in the pre-pandemic periods for affecting the population, generating epidemic outbreaks with cardiorespiratory impairment, which could lead to morbidity in the infected population 7,8. Studies have shown that even early in the pandemic, diagnosis of other respiratory pathogens helped identify the virus that later became known as SARS-CoV-2. Some studies have reported the clinical importance of patients coinfecting with respiratory viruses combined with SARS-CoV-2, identifying an increased need for mechanical ventilation after coinfection 3,9.

The epidemiological data show a clear change in the detection of seasonal viruses such as influenza, which seems not to have been identified between the years 2020 and 2022, the period with the highest number of cases and deaths caused by COVID-19 10. It is not clear if this lower detection of seasonal respiratory viruses is due to the reduction in the prevalence of pathogens other than SARS-CoV-2 owing to interactions and competition between pathogens, to a possible underreporting resulting from the overload of health professionals involved in the pandemic, or both 11.

Of the total of 187 samples (negative or positive for SARS-CoV-2) from adult patients (men and women) with non-severe respiratory symptoms, one test was positive for HAdV, one for influenza A, one for HMPV, four for VSR, 35 for HRV and five for PIV. Among our results, HRV and RSV infections were identified in the group of patients not diagnosed with SARS-CoV-2. These data corroborate Kim and collaborators who, in 2020, had already demonstrated higher notification rates of HRV and RSV infections in patients with respiratory symptoms, but not detected for SARS-CoV-2 11,12.

It is important to highlight that, during their study, Kim and collaborators 12 also evaluated the presence of enterovirus, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*, unlike our study, in which such infections may have been underreported, and which have clinical importance and may worsen the prognosis of patients infected with SARS-CoV-2. In addition, the number of cases of COVID-19 in our study was much higher 12,13.

Another study 14 evaluated, between November 2021 and February 2022, the presence of coinfections among patients detected with SARS-CoV-2 in combination with Flu A (65%), enterovirus-rhinovirus (20%), HAdV (2%), RSV (2%), HMPV (2%),

Human parainfluenza virus type 3 (2%), and Human coronavirus (7%). Unlike our study, in which patients detected for SARS-CoV-2 had a higher prevalence of coinfection with HRV, Eldesouki et al. 14 had the highest prevalence of coinfection between SARS-CoV-2 and Flu A. On the other hand, we must consider that the studies were developed with different sample sizes (41 patients versus 187), in addition to differences in population characteristics 14.

In Brazil, since 2021, data from the Board of Epidemiological Surveillance of the State of Santa Catarina - DIVE (official website for monitoring infectious diseases) have presented RSV, HRV, HAdV, bocavirus, in addition to the unidentified ones, as the main agents causing acute respiratory syndrome after SARS-CoV-2 17. These data are partially different from our results, showing HRV as the main agent detected both in patients detected and undetected for SARS-CoV-2 15.

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) is an aggressive infection that can lead to hospitalizations and deaths. In the surveillance conducted in this study, the largest number of infections identified, aside from SARS-CoV-2, were caused by HRV. Some of the data identified in this study can be explained by both the sample size and the selection of samples that did not cover non-severe cases but only those with classic flu symptoms, a profile different from that monitored by public authorities. Interestingly, even though the profile of the patients diagnosed here showed mild respiratory symptoms, it was possible to observe the presence of a sample of co-infection between SARS-CoV-2 and influenza A. In contrast, epidemiological data from DIVE reported 72 deaths in the state of Santa Catarina due to co-infection between SARS-CoV-2 and influenza A. Our hypothesis is that this difference is due to the study population group, composed of symptomatic adults, without sufficient clinical severity to justify hospitalization characteristics for SARS 17.

Many of these pathogenic interactions can be explained by cellular signaling pathways that facilitate replication and evasion of host defenses. The RAF/MEK/ERK pathway, for example, is crucial for the replication of Influenza A and other viruses like HCV (hepatitis C) and RSV (respiratory syncytial virus), as it facilitates viral RNA transcription and promotes cell survival 18, 19.

Similarly, the PI3K/AKT/mTOR pathway is used by pathogens such as HIV (human immunodeficiency virus), HSV (herpes simplex virus), and HCMV (cytomegalovirus) to regulate viral transcription and prevent apoptosis 20, 21. The

JAK/STAT pathway, important for immune response, is modulated by viruses like HBV (hepatitis B), dengue, and Zika, which use it to suppress antiviral responses 22, 23. Consequently, co-infections where two or more pathogens simultaneously infect a host can generate complex interactions affecting disease severity and outcomes. These interactions can be synergistic, as in the case of HIV and TB (tuberculosis), where HIV compromises cellular immunity facilitating TB progression, or antagonistic, as between HIV and HCV, potentially leading to an altered immune response 24, 25.

To understand the common signaling pathways between SARS-CoV-2 and other pathogens, it is essential to explore the main signal transduction pathways manipulated by SARS-CoV-2 and compare them with those used by other viruses. The RAF/MEK/ERK pathway, for example, is crucial in the replication of various viruses, including SARS-CoV-2. This pathway regulates cell survival, proliferation, and the inflammatory response. Studies indicate that SARS-CoV-2 infection can activate the RAF/MEK/ERK pathway, influencing the inflammatory response and viral replication 18, 19.

Another crucial pathway is the PI3K/AKT/mTOR pathway, responsible for regulating cellular metabolism, survival, and proliferation. SARS-CoV-2 utilizes this pathway to regulate viral replication and modulate the host's immune response 20. Additionally, the JAK/STAT pathway, involved in cytokine signal transduction and the regulation of the antiviral immune response, is impacted by SARS-CoV-2, affecting the antiviral and inflammatory response, which may contribute to the cytokine storm observed in severe COVID-19 cases 21. Finally, the NF- κ B pathway, a central regulator of the immune and inflammatory response, is activated by many viruses, including SARS-CoV-2. Activation of this pathway by SARS-CoV-2 is an important mechanism for inducing the inflammatory response and COVID-19 pathogenesis 22, 23.

6.6 CONCLUSION

Between February 2021 and November 2022, respiratory viruses were diagnosed in 187 adult patients of both sexes, with characteristic symptoms of respiratory infection. During this study, HRV, PIV, RSV, and MPV were detected in patients not detected for SARS-CoV-2, in addition to the detection of HAdV, Flu A, and HRV coinfecting patients detected for SARS-CoV-2. These data demonstrate the importance of the monitoring of contagious infectious pathogens of clinical and epidemiological importance, in addition to SARS-CoV-2, aiming to identify the population epidemiological pattern to improve the tools for preventing transmissibility and making therapeutic approaches as individualized as possible.

DISCLAIMER

The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Federal University of Santa Catarina, Brazil, or the institutions with which the authors are affiliated. The funders had no role in the study design, data analysis, or the decision to publish.

FUNDING

This research was funded by Santa Catarina Research and Innovation Foundation (FAPESC, Santa Catarina, Brazil) (grant number COV2020051000065), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) and UFSC (Federal University of Santa Catarina). DAP, FHB, MAS, VBF, EKK and DSMS were recipients of FAPESC, CAPES, or CNPq scholarships.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee in Research Humans Beings of Federal University of Santa Catarina (Assent number: 4.035.636, CAAE: 31521920.8.0000.0121, 19 May 2020).

ACKNOWLEDGMENTS

This work is dedicated to all SC citizens who suffered or passed away due to COVID-19. We are indebted to Hospital Universitário/HU/EBSERH at the Federal University of Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) for granting access to interview patients and perform sample collection.

6.7 REFERENCES

1. WHO. Corona Virus Dashboard [homepage on the internet]. Cited 2023 sep 19. Available from: <<https://covid19.who.int/>>.
2. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507-513.
3. Swets MC, Russell CD, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. *Lancet* 2022; 399:1463–1464.
4. Scott SJ, Pfothner B, Weiner JJ, et al. Respiratory Pathogen Coinfections in SARS-CoV-2-Positive Patients in Southeastern Wisconsin: A Retrospective Analysis. *Microbiol Spectr*. 2021; 31;9(2):e0083121.
5. Xing QS, Li GJ, Xing YH, et al. Precautions are needed for COVID-19 patients with coinfection of common respiratory pathogens. *medRxiv*, 2020 (PrePrint). doi: 10.1101/2020.02.29.20027698.
6. Burk M, El-Kersh K, Saad M, et al. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev*. 2016;25(140):178–188.
7. Shi T, Denouel A, Tietjen AK, et al. Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Infect. Dis*. 2020;222((Suppl. 7)):S577–S583.
8. Li Y, Wang X, Blau DM, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in

children younger than 5 years in 2019: A systematic analysis. *Lancet*. 2022;399:2047–2064.

9. Maltezou HC, Papanikolopoulou A, Vassiliu S, et al. COVID-19 and Respiratory Virus Co-Infections: A Systematic Review of the Literature. *Viruses*. 2023;15(4):865.

10. PAHO - Alerta epidemiológico - Influenza, vírus sincicial respiratório e SARS-CoV-2 [homepage on the internet]. Cited 2023 jun 6. Available from: <<https://www.paho.org/pt/documentos/alerta-epidemiologico-influenza-virus-sincicial-respiratorio-e-sars-cov-2-6-junho-2023>>.

11. Dähne T, Bauer W, Essig A, et al. The impact of the SARS-CoV-2 pandemic on the prevalence of respiratory tract pathogens in patients with community-acquired pneumonia in Germany. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):1515-1518.

12. Kim D, Quinn J, Pinsky B, et al. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *JAMA*. 2020;323(20):2085–2086.

13. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*, 2020;72(10):2097-2111.

14. Eldesouki RE, Uhteg K, Mostafa HH. The circulation of Non-SARS-CoV-2 respiratory viruses and coinfections with SARS-CoV-2 during the surge of the Omicron variant. *J Clin Virol*. 2022;153:105215.

15. DIVE [homepage on the internet]. Cited 2023 sep 20. Available from: <<https://dive.sc.gov.br/phocadownload/Boletins/Boletim%20Epidemiol%C3%B3gico%20SRAG%20N%C2%BA13.pdf>>.

16. DIVE [homepage on the internet]. Cited 2023 sep 21. Available from: <[https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Gripe%20\(Influenza\)/Boletins/boletim-influenza-12-2022.pdf](https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Gripe%20(Influenza)/Boletins/boletim-influenza-12-2022.pdf)>.

17. DIVE [homepage on the internet]. Cited 2023 sep 21. Available from: <[https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Gripe%20\(Influenza\)/Boletins/boletim-influenza-13-2022.pdf](https://dive.sc.gov.br/phocadownload/doencas-agrivos/Gripe%20(Influenza)/Boletins/boletim-influenza-13-2022.pdf)>.

18. CHAMBERS, R., GILLESPIE, G. M., & LEDGERWOOD, E. C. (2010). A novel approach to identifying host pathways important for virus replication and pathogenesis. *Future Virology*, 5(7), 837-848. DOI: 10.2217/fvl.10.65.

19. RAMOS, H. J., & RE, S. (2021). The role of the MAPK/ERK pathway in the viral life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 382-396. DOI: 10.1038/s41579-021-00511-1.
20. PLATANIAS, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375-386. DOI: 10.1038/nri1604.
21. BUCHKOVICH, N. J., MAGUIRE, T. G., & ALWINE, J. C. (2008). Human cytomegalovirus induces the activity and expression of the 3-phosphoinositide-dependent kinase-1/AKT pathway. *Journal of Virology*, 82(20), 9586-9598. DOI: 10.1128/JVI.00959-08.
22. LIN, W., WU, G., LI, S., WEINBERG, E. M., KUMTHIP, K., PENG, L. F., ... & CHUNG, R. T. (2012). HCV core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *Journal of Virology*, 86(9), 4821-4833. DOI: 10.1128/JVI.06591-11.
23. ASHOUR, J., LAURENT-ROLLE, M., SHI, P. Y., & GARCÍA-SASTRE, A. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *Journal of Virology*, 83(11), 5408-5418. DOI: 10.1128/JVI.02188-08.
24. KWAN, C. K., & ERNST, J. D. (2011). HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(2), 351-376. DOI: 10.1128/CMR.00042-10.
25. FELD, J. J., & MODI, A. A. (2022). Mechanisms of hepatitis C virus interaction with HIV. *Journal of Hepatology*, 76(5), 1033-1045. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.12.006.

7 DISCUSSÃO

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2022), a pandemia é caracterizada por uma epidemia espalhada por vários países e continentes, afetando muitas pessoas. Estudos apontam que as pandemias já foram capazes de dizimar populações, sendo causadas majoritariamente por diferentes gripes, durante o século 20 (CAMPOS, 2020; KHAN et al., 2020). Diante do histórico era esperado que o século 21 fosse acometido por uma pandemia causada pelo vírus influenza, e não pelo Coronavírus como de fato aconteceu. Diferente das pandemias anteriores, a COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) se espalhou rapidamente e atingiu a população mundial com muito mais velocidade do que as outras pandemias, muito provavelmente em razão do maior fluxo de pessoas entre os continentes (AKIN; GOZEL, 2020).

Após os relatos dos primeiros casos de SARS-CoV-2, os pesquisadores logo iniciaram a investigação genética do patógeno, objetivando conhecer sua estrutura morfológica e genômica. O primeiro genoma completo de SARS-CoV-2 foi depositado no GISAID (do inglês, *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*), principal banco de dados para depósito de sequências genômicas de influenza e SARS-CoV-2, em janeiro de 2020. Sendo ainda em meados de março de 2024, considerado o vírus com maior número de depósitos genômicos, somando um total de 16.632,842 sequências genômicas de SARS-CoV-2 depositadas (WU et al., 2020; GISAID, 2024).

Até março de 2024, a doença causada pelo SARS-CoV-2 já foi responsável por mais de 770 milhões de casos e aproximadamente 7 milhões de mortes acumuladas mundialmente, sendo as regiões mais notificadas a Europa, seguida das Américas, e a menos notificada a região da África. Vale ressaltar que o que é reportado pela OMS depende da adequada notificação destas doenças que são de notificação compulsória, então, estes dados epidemiológicos podem ser subnotificados tanto pela ineficiência do sistema de saúde quanto pela falta de condições adequadas e necessárias ao diagnóstico preciso e rápido (WHO, 2022).

O Brasil foi, em meados de 2022, o país com o terceiro maior número de casos da COVID-19 registrados no mundo, depois dos Estados Unidos e da Índia,

terceiro e segundo países mais populosos, respectivamente (WHO, 2022; Population Pyramid, 2022).

Apesar disto, no Brasil a vigilância genômica teve início em ritmo muito reduzido quando comparada com outros países, sendo sequenciado até dezembro de 2020 aproximadamente 0,2% do total de casos no Brasil, obtendo 1,4% do total de sequências depositadas no banco de dados. Vale ressaltar que a obtenção destas sequências foi reflexo de esforços de Redes de Vigilância genômica, formadas especialmente por centros de pesquisa em saúde (FIOCRUZ, 2022), esforços de Universidades em projetos de pesquisa distribuídos pelo Brasil (CORONA-ÔMICA, 2022; GENOMA-COVID-SC, 2022) e participação do setor privado (GENOV-DASA, 2022). Diante do exposto, se via a necessidade de aplicar e enriquecer a vigilância genômica do SARS-CoV-2 no estado de Santa Catarina, objetivo principal deste trabalho.

No primeiro capítulo deste trabalho, o estudo intitulado "*Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil*", investigou o surgimento e a disseminação de duas variantes distintas do SARS-CoV-2 *Gamma*, com foco especial na sub variante P.1-like-II, durante a segunda onda da pandemia de COVID-19 em Santa Catarina, Brasil. Esse trabalho mostrou que essas variantes apresentaram mutações que potencialmente aumentam a transmissibilidade, contribuindo para a rápida disseminação da doença. A análise epidemiológica indica que a sub variante P.1-like-II teve um papel crucial no aumento das taxas de infecção, hospitalização e mortalidade na região oeste do estado de Santa Catarina, durante o período estudado, destacando a importância de monitorar e controlar a propagação de novas variantes para mitigar os impactos da pandemia na saúde pública (PADILHA et al., 2022).

Adicionalmente, além de documentar a evolução genética da variante *Gamma*, o estudo também abordou as implicações do monitoramento genômico para a resposta de saúde pública, incluindo a necessidade de estratégias de vigilância genômica robustas e campanhas de vacinação abrangentes. Os autores sugerem que a rápida disseminação da sub variante P.1-like-II pode estar associada a mudanças na dinâmica epidemiológica da COVID-19, sugerindo adaptações nas

abordagens de contenção e tratamento da doença. Este trabalho confirma a importância de respostas rápidas e coordenadas diante do aparecimento de novas variantes emergentes e a necessidade contínua de pesquisas que possibilitem o entendimento das mutações virais sob a transmissão, a severidade da doença e a eficácia das vacinas (PADILHA et al., 2022).

Já o artigo intitulado "*Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift*", também aceito e publicado na revista *Viruses*, compreendeu o segundo capítulo desta tese e teve como foco a vigilância genômica das variantes do SARS-CoV-2 entre trabalhadores da saúde (HCWs) no estado de Santa Catarina, Brasil. O estudo analisou 5.181 genomas sequenciados entre maio de 2021 a abril de 2022, identificando 55 linhagens e quatro variantes de preocupação (*Alpha*, *Delta*, *Gamma* e *Omicron*). Este estudo destacou o papel significativo dos profissionais de saúde como um grupo sentinela para monitorar tendências da doença, mostrando perfis de variantes semelhantes entre profissionais e a população geral durante o período observado. O estudo enfatiza a rápida mudança das variantes *Delta* para *Omicron*, reforçando a importância da vigilância genômica em profissionais de saúde como grupo para a detecção e identificação precoces de novas variantes de SARS-CoV-2 (PADILHA et al., 2023).

O segundo capítulo desta tese também revelou que, embora o número de casos fosse relativamente baixo em maio de 2021, houve um aumento expressivo tanto no número de casos quanto no número de mortes com o aparecimento da variante *Gamma*. Esse aumento foi observado novamente em meados de janeiro de 2022 com a variante *Omicron*, indicando sua maior transmissibilidade. O estudo também discute o impacto das festas de final de ano e da flexibilização das intervenções não farmacêuticas na disseminação do vírus. Os achados suportam o uso de trabalhadores de saúde para coleta de dados em tempo real e monitoramento, o que é crucial para gerenciar respostas de saúde pública à COVID-19 e outras doenças infecciosas (PADILHA et al., 2023).

Adicionalmente, o terceiro capítulo dessa tese avaliou a presença de diferentes patógenos respiratórios que podem coinfectar e modificar a resposta clínica dos pacientes detectados com SARS-CoV-2. Tendo em vista que a relação

entre essas coinfeções ainda não está clara, identificou-se a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre as interações entre patógenos e a relação patógeno-hospedeiro. Neste capítulo utilizou-se a técnica molecular RT-qPCR para avaliar a presença de adenovírus humano (HAdV), influenza A (Flu A), influenza B (Flu B), metapneumovírus humano (HMPV), vírus sincicial respiratório (RSV), rinovírus humano (HRV) e vírus parainfluenza (PIV). Um total de 187 amostras de nasofaringe de pacientes adultos com sintomas respiratórios foram coletadas entre fevereiro de 2021 e novembro de 2022 no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, em Florianópolis, SC, Brasil.

Os resultados deste trabalho revelaram que 25,16% das amostras testaram positivo para vírus respiratórios exceto SARS-CoV-2 (29,8% - HRV, 5,3% - PIV, 4,3% - RSV e 1,1% - HMPV). Dos 74,84% de pacientes positivos para SARS-CoV-2, a presença de coinfeção foi observada em 9,7% dos pacientes, sendo 7,5% HRV, 1,1% HAdV e 1,1% Flu A. Considerando que as coinfeções podem potencialmente alterar o prognóstico dos pacientes e impactar as dinâmicas epidemiológicas locais, este estudo destaca a importância da monitorização contínua e da avaliação epidemiológica através da vigilância genômica de outros patógenos respiratórios clinicamente relevantes. Essas descobertas sublinham a necessidade de estratégias integradas de vigilância para entender melhor o impacto das coinfeções na saúde pública e nas respostas adequadas às doenças infectocontagiosas.

A rápida disseminação e a alta taxa de transmissão da COVID-19 sublinham a necessidade de uma vigilância genômica robusta e contínua, especialmente em regiões com sistemas de saúde menos eficientes, como algumas partes da África e da América Latina. O Brasil, que foi o terceiro país mais afetado em termos de casos e iniciou a vigilância genômica em um ritmo mais lento do que outros países de mesmo porte, com apenas 0,2% dos casos sequenciados até dezembro de 2020 (WHO, 2022; FIOCRUZ, 2022). No entanto, esforços colaborativos entre centros de pesquisa, universidades e o setor privado têm fortalecido essa rede de vigilância (CORONA-ÔMICA, 2022; GENOMA-COVID-SC, 2022; GENOV-DASA, 2022). A análise e a compreensão das variantes do SARS-CoV-2, como as distintas variantes *Gamma* investigadas no primeiro capítulo desta tese, são cruciais para desenvolver

estratégias de contenção e resposta mais eficazes, mitigando os impactos na saúde pública e prevenindo futuras pandemias (PADILHA et al., 2022).

Além disso, a identificação de coinfeções entre patógenos respiratórios, como HRV, HAdV e Flu A, que afetou 9,7% dos pacientes positivos para SARS-CoV-2, sublinha a complexidade da resposta imunológica e clínica nos pacientes. A vigilância epidemiológica também se mostra vital para detectar e monitorar essas coinfeções, que podem alterar significativamente o prognóstico dos pacientes e influenciar as dinâmicas epidemiológicas locais (PADILHA et al., 2023). Este estudo destaca a importância de estratégias integradas de vigilância para entender melhor o impacto das coinfeções e formular respostas adequadas, ressaltando a necessidade de uma abordagem que inclua a vigilância de múltiplos patógenos respiratórios.

8 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram monitoradas as variantes de SARS-CoV-2, durante dois anos pandêmicos, utilizando como ferramenta de vigilância genômica o sequenciamento de terceira geração. Entre março de 2020 a abril de 2021, foram sequenciadas 203 amostras das diferentes mesorregiões do estado de Santa Catarina, sendo possível identificar 23 diferentes linhagens. Durante este estudo, foi possível observar um padrão distinto no aparecimento da sub variante P.1-like-II, a qual foi identificada no oeste de Santa Catarina de forma isolada e independente das outras mesorregiões. Adicionalmente, com base em análises epidemiológicas, foi possível observar um aumento nas taxas de mortalidade na região oeste durante o mesmo período em que a sub variante P.1-like-II foi identificada. Isso nos leva a acreditar na possibilidade de uma sub variante regionalizada provocar mudanças epidemiológicas significativas no desfecho da doença.

Adicionalmente, grupo sentinela no monitoramento de doenças infectocontagiosas podem possibilitar a mitigação de custos técnicos e a otimização no tempo para a identificação do agente causador. Com isto, durante o segundo ano de monitoramento genômico, este trabalho não somente fez o acompanhamento epidemiológico das variantes do SARS-CoV-2, mas também objetivou a identificação de possíveis grupos sentinela representativos da população. De maio de 2021 a abril de 2022 foram sequenciadas 5.181 amostras, sendo identificadas 55 diferentes linhagens e 4 variantes, às quais mantiveram o mesmo padrão genômico no estado e no Brasil, para o mesmo período avaliado. Curiosamente, quando se comparou a frequência das linhagens identificadas entre os profissionais de saúde e a população geral, foi possível observar semelhança epidemiológica dentre as populações do estudo, isto possibilitou a identificação dos profissionais de saúde como grupos sentinela, que possibilitam um monitoramento mais rápido e barato se comparado ao monitoramento genômico feito em grandes populações.

Por fim, avaliamos a presença de coinfeções de outros vírus respiratórios em pacientes detectados ou não para SARS-CoV-2. Dentre os pacientes não detectados para SARS-CoV-2, observou-se a presença de metapneumovírus humano (HMPV), vírus sincicial respiratório (RSV), rinovírus humano (HRV) e vírus parainfluenza (PIV). Já nas coinfeções com SARS-CoV-2, houve maior detecção dos vírus HRV, adenovírus humano (HAdV) e influenza A (Gripe A), podendo este

diferente padrão no aparecimento modificar a sintomatologia e o desfecho do quadro clínico dos pacientes.

Os anos caracterizados pela pandemia da COVID-19 demonstram a importância das ferramentas de vigilância genômica frente à identificação de variabilidade genética e controle epidemiológico de patógenos infectocontagiosos, tais como o SARS-CoV-2. Estas ferramentas nos permitiu acompanhar e estudar a evolução deste patógeno durante dois anos pandêmicos no estado de Santa Catarina, fomentando os órgãos públicos com evidências científicas para a tomada de decisões e avaliação dos desfechos epidemiológicos causados pelas diferentes variantes circulantes no sul do Brasil.

Os resultados deste estudo reforçam a indispensabilidade de uma abordagem colaborativa e interdisciplinar na gestão de crises de saúde pública. A academia, fornecendo sua expertise técnica e capacidade de inovação, os agentes públicos de saúde, aplicando esses conhecimentos no desenvolvimento de políticas e estratégias de saúde eficazes, e a sociedade, participando ativamente por meio da adesão às medidas preventivas e colaborando com os esforços de monitoramento, formam um triângulo virtuoso. Essa união é fundamental para a detecção e tratamento precoce de uma variedade de doenças infecciosas, com a implementação de ações de controle efetivas e a minimização do impacto de pandemias futuras.

Portanto, este estudo não apenas contribuiu com conhecimentos valiosos sobre a dinâmica do SARS-CoV-2 em Santa Catarina, mas também serviu como um modelo de como a colaboração entre diferentes setores pode levar a avanços significativos no enfrentamento de desafios de saúde pública. A capacidade de adaptar rapidamente às estratégias de saúde pública com base em evidências científicas atualizadas é, sem dúvida, um dos maiores legados da pandemia de COVID-19, reiterando a importância de investir em ciência, tecnologia e inovação como pilares fundamentais para a saúde e o bem-estar da sociedade.

9 REFERÊNCIAS

AKIN, L.; GOZEL, M. G. Understanding dynamics of pandemics. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 21, n. 50, p. 515-19, 2020.

ASHOUR, J., LAURENT-ROLLE, M., SHI, P. Y., & GARCÍA-SASTRE, A. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of Virology**, 83(11), 5408-5418. DOI: 10.1128/JVI.02188-08.

BARROSO, H.; TAVEIRA, N. Competition Between Viral Strains in an Infection. In: Meyers L, editor. **Encyclopedia of Complexity and Systems Science**. New York, NY: Springer. p. 1-17, 2017.

BRYNER, J. **1st known case of coronavirus traced back to November in China**. Acesso em: 14 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.livescience.com/first-case-coronavirus-found.html>

BUCHKOVICH, N. J., MAGUIRE, T. G., & ALWINE, J. C. (2008). Human cytomegalovirus induces the activity and expression of the 3-phosphoinositide-dependent kinase-1/AKT pathway. **Journal of Virology**, 82(20), 9586-9598. DOI: 10.1128/JVI.00959-08.

CAMPOS, T.C. The traditional definition of pandemics, its moral connotations, and its practical implications: a defense of conceptual clarity in global health laws and policies. **Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics**, v 29, n. 2, p. 205-17, 2020.

CAVANAGH, D. **Coronaviruses in poultry and other birds**. *Avian Pathology*, v. 34, n. 6, p. 439–48, 2005.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2021). **COVID-19: PCR**. Testing Overview. Acesso em 29 de junho de 2024 Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2024) **Data and statistics**. Acesso em 11 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tb/statistics.htm>

CHAMBERS, R., GILLESPIE, G. M., & LEDGERWOOD, E. C. (2010). A novel approach to identifying host pathways important for virus replication and pathogenesis. **Future Virology**, 5(7), 837-848. DOI: 10.2217/fvl.10.65.

CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**. 2020; 395(10223):507-513.

DÄHNE, T.; BAUER, W.; ESSIG, A et al. The impact of the SARS-CoV-2 pandemic on the prevalence of respiratory tract pathogens in patients with community-acquired pneumonia in Germany. **Emerg Microbes Infect**. 2021;10(1):1515-1518.

DESLANDES, A.; BERTI, V.; TANDJAOUI-LAMBOTTE, Y.; ALLOUI, C.; CARBONNELLE, E.; ZAHAR, J. R.; et al. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 6, p. 106006, 2020.

DORP, L.; ACMAN, M.; RICHARD, D.; SHAW, L. P.; FORD, C. E.; ORMOND, L.; et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 83, p. 104351, 2020.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2021). **Guidelines for the implementation of non-pharmaceutical interventions against COVID-19 in the EU/EEA and the UK**. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/implementation-measures-limit-spread-covid-19>

FELD, J. J., & MODI, A. A. (2022). Mechanisms of hepatitis C virus interaction with HIV. **Journal of Hepatology**, 76(5), 1033-1045. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.12.006.

FERGUSON, N.M.; CUMMINGS, D. A. T.; FRASER, C.; CAJKA, J. C.; COOLEY, P. C.; BURKE, D. S. Strategies for mitigating an influenza pandemic. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 448–52, 2006.

FIOCRUZ. **A rede genômica FIOCRUZ**. 2022. Disponível em: <http://www.genomahcov.fiocruz.br/a-rede/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

FONGARO, G.; STOCO, P. H.; SOUZA, D. S. M.; GRISARD, E. C.; MAGRI, M. E.; ROGOVSKI, P.; et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. **Science of the Total Environment**, v. 15, p. 778, 2021.

GISAID. **hCoV-19 data sharing**. Acesso em: 22 de novembro de 2022. Disponível em: <https://gisaid.org.html>

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J.D.; MCCOMBIE, W.R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333-51, 2016.

GRALINSKI, L.E.; MENACHERY, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 135, 2020.

GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7790-2, 2013.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J. J. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 121, n. 1, p. 190-3, 1966.

HENDERSON, D. A.; COURTNEY, B.; INGLESBY, T. V.; TONER, E.; NUZZO, J. B. Public health and medical responses to the 1957-58 influenza pandemic. **Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, Science**, v. 7, n. 3, p. 265-73, 2009.

HOWLEY; KNIPE; WHELAN. **Fields virology**. Emerging viruses. v.1, Seventh edition, 2021

ILLUMINA. **Performance specifications for the NextSeq 1000 & 2000 systems. 2021**. Acesso em: 26 mai. 2021. Disponível em: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html>

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHLOE, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, V. 23, N. 1, P. 3-20, 2022.

JACKSON, C.; VYNNYCKY, E.; MANGTANI, P. Estimates of the transmissibility of the 1968 (Hong Kong) influenza pandemic: Evidence of increased transmissibility between successive waves. **American Journal of Epidemiology**, v. 171, n. 4, p. 465-78, 2010.

JESUS, J. G.; SACCHI, C.; CLARO, I.; SALLES, F.; MANULLI, E.; SILVA, D.; et al. First cases of coronavirus disease (COVID-19) in Brazil, South America (2 genomes, 3rd March 2020). Acesso em: 30 de maio de 2022. Disponível em: <https://virological.org/t/first-cases-of-coronavirus-disease-covid-19-in-brazil-south-america-2-genomes-3rd-march-2020/409.html>

KHAN, U.; MEHTA, R.; ARIF, M. A.; LAKHANI, O. J. Pandemics of the past: A narrative review. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 70, n. 3, p. 34-37, 2020.

KHARE, Shruti et al. GISAID's Role in Pandemic Response. **China CDC Weekly**, [S. l.], v. 3, n. 49, p. 1049–1051, 2021. DOI: 10.46234/ccdcw2021.255. Disponível em: <http://weekly.chinacdc.cn/en/article/doi/10.46234/ccdcw2021.255>.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 85, p. 104502, 2020.

KORBER, Bette et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 4, p. 812-827.e19, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420308205>.

KWAN, C. K., & ERNST, J. D. (2011). HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, 24(2), 351-376. DOI: 10.1128/CMR.00042-10.

LIN, W., WU, G., LI, S., WEINBERG, E. M., KUMTHIP, K., PENG, L. F., ... & CHUNG, R. T. (2012). HCV core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. **Journal of Virology**, 86(9), 4821-4833. DOI: 10.1128/JVI.06591-11.

MALTEZOU HC, PAPANIKOLOPOULOU A, VASSILIU S, et al. COVID-19 and Respiratory Virus Co-Infections: A Systematic Review of the Literature. **Viruses**. 2023;15(4):865.

NANOPORE. **MinION**. Acesso em: 29 de maio de 2022. Disponível em: <https://nanoporetech.com/products/minion.html>

NOVEL 2019 CORONAVIRUS GENOME. **SARS-CoV-2 coronavirus**. Acesso em: 21 de novembro de 2022. Disponível em: <https://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319/6.html>

PADILHA, D. A.; et al. Variantes do SARS-CoV-2: conceitos e impactos na pandemia de COVID-19. In: JUNIOR, B. R. S (Ed., Org., Comp.) COVID-19 **A Guerra da Desinformação**. 2022.

PADILHA, D.A. et al. (2023). Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift. **Viruses**, 15(4), 984. DOI: 10.3390/v15040984.

PAN American Health Organization (PAHO). (2021). Sentinel Surveillance. Disponível em: **PAHO**.

PAN American Health Organization (PAHO). (2022). Laboratory guidelines for detection and diagnosis of COVID-19 virus infection. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52458> **PAHO**.

PELLET, P. E.; MITRA, S.; HOLLAND, T. C. Basics of virology. **Handbook of clinical neurology**, v. 123, p. 45-66, 2014.

PLATANIAS, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, 5(5), 375-386. DOI: 10.1038/nri1604.

POPULATION PYRAMID. Aqui estão nossas visualizações atuais. Acesso em: 18 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.populationpyramid.net/pt/visualizations.html>.

RAMOS, H. J., & RE, S. (2021). The role of the MAPK/ERK pathway in the viral life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, 19(6), 382-396. DOI: 10.1038/s41579-021-00511-1.

RITCHIE, Hannah et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19). 2022. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus#citation>. Acesso em: 20 abr. 2022.

ROBISHAW, Janet D.; ALTER, Scott M.; SOLANO, Joshua J.; SHIH, Richard D.; DEMETS, David L.; MAKI, Dennis G.; HENNEKENS, Charles H. Genomic surveillance to combat COVID-19: challenges and opportunities. **The Lancet Microbe**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. e481–e484, 2021. DOI: 10.1016/s2666-5247(21)00121-x.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SMITH, D. J.; LAPEDES A. S.; DE JONG, J. C et al. Mapping the Antigenic and Genetic Evolution of Influenza Virus. **Science**. 305(5682):371-376. doi:10.1126/science.1097211, 2004.

SWETS ,M. C.; RESSELL, C. D.; HARRISON, E. M et al. SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. **Lancet** 2022; 399:1463–1464.

VYNNYCKY, E.; EDMUNDS, W. J. Analyses of the 1957 (Asian) influenza pandemic in the United Kingdom and the impact of school closures. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 2, p. 166-79, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2020). Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2020). Sentinel Surveillance. Disponível em: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2022). COVID-19 Weekly Epidemiological Update. Disponível em: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). CoronaVirus Dashboard [homepage on the internet]. Cited 2023 sep 19. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **European Programme of Work**. Acesso em 14 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/europe/home?v=welcome.htm>

WU, A.; PENG, Y.; HUANG, B.; DING, X.; WANG, X.; NIU, P.; et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 27, 2020.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685-700, 2021.

YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 11, p. 1544-57, 2017.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X.G et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**. 2020; 579, 270–273.

10 GLOSSÁRIO

- ACE2** Enzima conversora de angiotensina 2, do inglês, *angiotensin-converting enzyme 2*. A ACE2 é uma proteína localizada na superfície das células do hospedeiro (humana) e é reconhecida pela proteína *Spike* do SARS-CoV-2 para iniciar o processo de invasão da célula durante o processo de infecção.
- Ácidos nucleicos** Moléculas com extensas cadeias carbônicas, formadas por nucleotídeos: um grupamento fosfórico (fosfato), um glicídio (monossacarídeo com cinco carbonos / pentoses) e uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), constituindo o material genético de todos os seres vivos.
- Amplicon** É chamado o segmento de DNA que se origina a partir de eventos de amplificação ou replicação. São gerados durante o processo de reação em cadeia da polimerase (PCR), onde uma porção do material genético é copiado milhares de vezes para que seja possível a sua visualização e sequenciamento em métodos moleculares.
- Antigênica** Adjetivo Relacionado com antígeno, substância que, quando introduzida no organismo, ocasiona a produção de anticorpos. Que tem a capacidade de ocasionar a formação de um anticorpo.
- Carga viral** Quantificação do número de cópias virais dentro de uma determinada amostra, como, por exemplo, sangue, saliva ou no caso do SARS-CoV-2 na mucosa nasofaríngea.
- Cepa ou estirpe** É uma variante com características fenotípicas únicas e estáveis nos vírus. Atualmente, não há mais de uma cepa de SARS-CoV-2.

Clado	É uma nomenclatura aplicada nas análises evolutivas para determinar um grupo de organismos que tem origem de um único ancestral comum exclusivo.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico é uma molécula presente no núcleo das células de todos os seres vivos e que carrega toda a informação genética de um organismo. É formado por uma fita dupla em forma de espiral (dupla hélice), composta por nucleotídeos.
Expressão gênica	Expressão gênica é o processo que ocorre dentro das células onde a partir de regiões conhecidas como genes são transcritos em RNA e depois traduzidos para proteínas. Os efeitos resultantes desta expressão gênica, em uma célula, em um determinado momento, são responsáveis pelo seu fenótipo.
Fenótipo	São as características observáveis de um indivíduo ou organismo. No caso de vírus os fenótipos podem ser considerados como a capacidade de infectar as células, transmissibilidade, escape do sistema imunológico, entre outras características virais.
Filogenômica	É um conjunto de técnicas computacionais e moleculares aplicadas a análise evolutiva de organismos com base no genoma destes. Normalmente os estudos de filogenômica auxiliam na classificação taxonômica dos organismos e suas relações evolutivas com outros organismos.
Gene	O gene é considerado a unidade básica da hereditariedade. São formados por sequências de DNA que contém as informações necessárias para a transcrição de sequências de RNA e posterior tradução em proteínas.

- Genoma** De forma geral, o genoma contém as informações genéticas de um determinado organismo. No genoma são encontrados os genes, que podem ser transcritos em sequências de RNA e, posteriormente, traduzidos em proteínas.
- Genoma de referência** É o genoma modelo que idealmente apresenta todos os cromossomos e genes de uma determinada espécie. Pode ser utilizado para estudos comparativos dentro da espécie ou auxiliar em estudos de organismos filogeneticamente próximos à referência. No caso do SARS-CoV-2 o genoma de referência é o primeiro genoma sequenciado para este vírus. Normalmente está disponibilizado em bancos de dados públicos.
- Infectividade** Capacidade de um patógeno adentrar, se desenvolver e se multiplicar em um hospedeiro, não necessariamente a infecção levará ao desenvolvimento da doença.
- IT (Cauda intracelular)** Cauda intracelular, do inglês, *intracellular tail*, também conhecida como cauda citoplasmática (CT). É uma sequência de peptídeos de uma proteína transmembrana que permanece dentro da célula. No SARS-CoV-2 esta região é encontrada no final da proteína *Spike*.
- Linhagem** Consiste num grupo de vírus intimamente relacionado com um ancestral comum e normalmente apresentam mutações similares. Diferentes linhagens podem ou não estar associadas a novas características fenotípicas virais. O SARS-CoV-2 por exemplo, tem algumas milhares de linhagens e apesar de nem todas apresentarem características fenotípicas específicas, suas mutações podem ser usadas para monitoramento epidemiológico.

Monofilético/ Um conjunto de organismos que satisfaça a condição de monofilia é um agrupamento monofilético, o que corresponde a um táxon (grupo de organismos) que forma um clado ou ramo, ou seja, que consiste exclusivamente numa espécie ancestral e todos os seus descendentes.

Monofilia/
Monofiletismo Este termo é utilizado nas análises evolutivas (filogenética) para determinar os um grupo formado por organismos que possuem um ancestral em comum, partindo, assim, de um mesmo grupo (clado) e incluindo todos os seus descendentes.

Mutações São alterações de sequências dentro do genoma e podem ser classificadas em três categorias: (i) polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), que são alterações que acontecem em apenas um único nucleotídeo (unidade do DNA/RNA); (ii) inserções/deleções, que acarretam, respectivamente, na adição ou remoção de uma sequência de um ou mais nucleotídeos; e (iii) rearranjos cromossômicos, que envolvem uma mudança na estrutura nativa do cromossomo, como deleções, duplicações, inversões e translocações cromossômicas.

Mutações não-sinônimas São alterações no DNA que resultam em uma alteração de aminoácido. Mutações não-sinônimas decorrentes de substituições aminoacídicas podem ser representadas como: D614G, onde D (ácido aspártico) denota o resíduo/aminoácido do tipo selvagem e G (glicina), o novo aminoácido, na posição 614 da sequência de proteína. Deleções podem ser representadas da seguinte forma: Δ H69 ou H69-, onde o resíduo H (histidina) do tipo selvagem é perdido (-) no sítio 69 da sequência aminoacídica.

Mutações sinônimas São mutações que no DNA que não resultam em uma alteração de aminoácido original. Como estas alterações não geram

alteração de aminoácido, elas são silenciosas, pois não alteram o fenótipo do organismo.

- Mutagênese** Processo biológico que gera mutações genéticas. A mutagênese pode ser natural ou induzida, neste último caso por agentes mutagênicos.
- Nextstrain** Sistema para classificação de linhagens e sublinhagens virais sendo uma plataforma em que os vírus são classificados de acordo com sua posição dentro de grandes grupos chamados de clados.
- NSP** Proteínas não-estruturais, do inglês, *non-structural proteins*. Proteínas codificadas por um genoma viral que não constituem componentes estruturais do vírus. Estas proteínas podem estar relacionadas com o processo de replicação viral após a infecção e regulação de genes do genoma humano.
- NTD** Domínio N-terminal, do inglês, *N-terminal domain*. O NTD está presente na subunidade S1 da proteína *Spike* e está relacionado com a ligação do SARS-CoV-2 às células do hospedeiro.
- Nucleotídeo** Subunidade que forma o DNA e o RNA, ácidos nucleicos relacionados com a hereditariedade e controle da atividade das células. Um nucleotídeo é constituído por um grupo fosfato, uma base nitrogenada e uma pentose.
- ORF** Janela aberta de leitura, do inglês, *open reading frame*. Uma ORF normalmente está contida dentro de um gene e se refere a sequência de nucleotídeos entre os códons de início (incluso) e terminação.

Organela	Estrutura limitada por membrana plasmática, como mitocôndrias e complexo de Golgi, presente em praticamente todas as células com núcleo.
Pango ou Pangolin	Sistemas de nomenclatura dinâmico e hierárquico também para classificação viral. No sistema Pango, os vírus são classificados com base na sua relação filogenética com outros vírus e, em caso de compartilharem um ancestral comum, são então classificados dentro de uma mesma linhagem e sublinhagem a partir de critérios estabelecidos pelo sistema de classificação, sendo então nomeados com uma letra e números.
Patogenicidade	Capacidade de um patógeno gerar sintomas e causar doença em hospedeiros infectados.
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ". Esta reação gera cópias de DNA a partir de elementos básicos que simulam o processo de replicação natural, amplificando, assim, uma sequência alvo específica.
Peptídeo de fusão (FP)	O peptídeo de fusão, do inglês, " <i>fusion peptide</i> ", é uma região da proteína <i>Spike</i> do SARS-CoV-2 que tem como função ligar (fusionar) o vírus na membrana da célula hospedeira, auxiliando assim no processo de invasão celular.
Plataforma GISAID	Plataforma internacional que promove o compartilhamento rápido de dados de todos os vírus da gripe e do coronavírus que causam o COVID-19. Isso inclui sequência genética e dados clínicos e epidemiológicos relacionados associados a vírus humanos e dados geográficos e específicos de espécies associados a vírus de aves e

outros animais, para ajudar os pesquisadores a entender como os vírus evoluem e se espalham durante epidemias e pandemias.

- Polimerase** Enzima responsável por formar polímeros. As polimerases mais conhecidas são a DNA polimerase, que promove a síntese das fitas de DNA dos organismos, e a RNA polimerase, que promove a síntese de fitas de RNA a partir da leitura da molécula de DNA.
- Progênie** A prole ou descendente de um indivíduo, seja um microorganismo, animal ou planta.
- RBD** Domínio de ligação ao receptor, do inglês, "*Receptor Binding Domain*". Componente chave presente no domínio da proteína *Spike* que permite sua ligação com os receptores da ACE2 humana.
- Reads** O termo *Reads* é utilizado em genômica para se referir à fragmentos de sequências nucleotídicas resultantes do processo de sequenciamento genético, ou seja, são as leituras do DNA/RNA realizadas a partir dos métodos de sequenciamento. Usualmente um sequenciamento gera milhares ou milhões de *reads* que depois devem ser agrupados para formar a sequência de DNA do organismo.
- Recombinação** Troca aleatória de material genético durante a meiose. A grande contribuição da meiose para a variabilidade genética é a recombinação, ou seja, combinar de modo diferente os genes herdados.
- RT-PCR** Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), no inglês "*Reverse transcription polymerase chain reaction*", é um método laboratorial usado desde que utiliza a enzima transcriptase reversa, para transformar o RNA do vírus em DNA complementar (cDNA). É usado principalmente para medir a

quantidade de um RNA específico. Isto é conseguido através do monitoramento da reação de amplificação usando fluorescência, uma técnica chamada PCR quantitativo em tempo real. RT-PCR combinado e qPCR são rotineiramente usados para análise da expressão gênica e quantificação do RNA viral em pesquisas e contextos clínicos.

Sequenciament
o genômico Técnica que permite identificar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA.

SNP Sigla que deriva do inglês "*Single Nucleotide Polimorphism*" que significa polimorfismo de um único nucleotídeo, que podem ocorrer tanto nas regiões codificantes (que geram proteínas) quanto nas regiões não codificantes do genoma.

TA (Âncora
transmembran
a) Âncora transmembrana, do inglês, *transmembrane anchor*. Sequência peptídica que compõe uma proteína transmembrana, responsável por manter sua aderência na membrana plasmática.

Transcriptase
reversa Uma enzima presente em alguns tipos de vírus, como o vírus da hepatite B e o vírus HIV, que realiza um processo de transcrição inversa em relação ao padrão celular: a enzima polimeriza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA.

Variante Vírus que em seu genoma contém uma ou mais mutações usadas para descrever subtipos de um microrganismo diferente de uma cepa principal, mas não suficientemente diferentes para serem denominados cepas distintas. No SARS-CoV-2 já foram descritas milhares de diferentes variantes.

Vigilância
genômica É um conceito aplicado para o monitoramento genético de organismos considerando os critérios epidemiológicos e nas características genéticas de determinado patógeno. Esta vigilância

pode ser empregada utilizando o sequenciamento do genoma dos organismos que estão sendo monitorados.