

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

WILLIAN FELIPE HADIAK AMALIO DE SOUZA

**MEIO DE TRANSPORTE VIRAL (VTM) SEMISSÓLIDO: UMA ABORDAGEM
AVANÇADA PARA A DETECÇÃO AMBIENTAL DO SARS-COV-2**

CURITIBA

2024

WILLIAN FELIPE HADIAK AMALIO DE SOUZA

**MEIO DE TRANSPORTE VIRAL (VTM) SEMISSÓLIDO: UMA ABORDAGEM
AVANÇADA PARA A DETECÇÃO AMBIENTAL DO SARS-COV-2**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia em Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Tecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama

CURITIBA

2024

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Gisele Alves – CRB 9/1578

S729m Souza, Willian Felipe Hadiak Amalio de
2024 Meio de transporte viral (VTM) semissólido : uma abordagem avançada para a
detecção ambiental do SARS-CoV-2 / Willian Felipe Hadiak Amalio de Souza ;
orientadora : Percy Nohama. – 2024.
134 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2024
Bibliografia: f. 107-134

1. COVID-19 (Doença). 2. SARS-CoV-2. 3. Teste de ácido nucleico para
COVID-19. I. Nohama, Percy. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. III. Título.

CDD. 20. ed. – 610.28



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Politécnica
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

TERMO DE APROVAÇÃO DE TESE Nº 033

A Tese de Doutorado intitulada “MEIO DE TRANSPORTE VIRAL (VTM) SEMISSÓLIDO: UMA ABORDAGEM AVANÇADA PARA A DETECÇÃO AMBIENTAL DO SARS-COV-2”, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Willian Felipe Hadiak Amalio de Souza**, no dia **29 de fevereiro de 2024**, foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia em Saúde, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Percy Nohama – PUCPR

Prof. Dr. Harki Tanaka – ITA

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii – PUCPR

Profa. Dra. Beatriz Luci Fernandes – PUCPR

Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza – UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 13 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Percy Nohama
**Coordenador do Curso de Tecnologia em Saúde
Pós-Graduação Stricto Sensu.**

"Dedico esta tese à minha família (Pais e Avós), cujo amor e apoio foram meu farol, e à minha esposa Daniele, minha inspiração constante na jornada do conhecimento."

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos que tornaram esta jornada de pesquisa e conclusão da tese de doutorado possível. Sem a orientação divina, a minha saúde inabalada durante a pandemia e o esforço incansável dos pesquisadores de todo o mundo, nada disso teria se concretizado.

Primeiramente, quero expressar minha profunda gratidão a Deus, pois sem Sua orientação e bênçãos, esta jornada acadêmica não teria sido possível. Ele me deu força e inspiração para enfrentar os desafios, e sou eternamente grato por isso.

A pandemia que assolou o mundo trouxe incertezas e preocupações, mas também serviu como uma fonte de inspiração. Encontrei no isolamento e na reflexão força para moldar as ideias que formaram a base desta tese. Agradeço por ter passado por esse período com saúde, o que foi um privilégio.

Quero estender meu agradecimento a todos os pesquisadores que, ao redor do mundo, dedicaram tempo e esforço incansáveis na busca por soluções, em especial na luta pelo desenvolvimento das vacinas. O trabalho árduo e dedicação à ciência inspiraram e fortaleceram a minha própria paixão pela pesquisa.

À minha família, meus pais, Sergio Luiz Amalio de Souza e Denise Cristina Hadiak, devo uma gratidão eterna. Seu apoio inabalável e amor incondicional foram meu alicerce. Aos meus avós, Rose Marli Hadiak, Stefano Hadiak (*in memoriam*), Elza Amalio de Souza (*in memoriam*) e Hamilton Amalio de Souza (*in memoriam*). Minha esposa, Daniele Hadiak, merece um agradecimento especial por estar ao meu lado durante todo o meu doutorado, mesmo tendo aberto mão de muitos momentos juntos. Seu apoio inabalável e amor foram fundamentais para minha perseverança.

Também é importante agradecer às entidades financeiras que tornaram esta pesquisa uma realidade. O Grupo Hadiak o qual fomentou todo o trabalho, os Laboratórios Clínicos Associados (LCA) em seu apoio logístico, e o Dr. Carlos Alonso, diretor técnico do DNALAB, local onde grande parte das análises foram realizadas, além da disponibilização do que há de mais atual em tecnologia para detecção de vírus por meio de biologia molecular. Um grande agradecimento a todos esses que desempenharam um papel crucial neste projeto.

Por fim, meu orientador, o Dr. Percy Nohama, merece meu agradecimento especial. Sua calma, paciência e orientação foram fundamentais ao longo do

programa de pós-graduação. Ele entendeu as dificuldades que enfrentei e me guiou com sabedoria e dedicação.

Neste momento de finalização, expresso minha profunda gratidão a todos que fizeram parte dessa jornada. Este trabalho é o resultado de muitos esforços e apoio, e estou verdadeiramente agradecido por cada um de vocês.

"O conhecimento é o alimento da mente;
essa filosofia foi a base da pesquisa que,
por sua vez, é o alicerce do progresso.
Sem ela, o nosso destino não é claro."

(Marie Curie, 1917)

RESUMO

A COVID-19 é uma doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2. A testagem é crucial para identificar casos, conter a disseminação e orientar medidas de saúde pública. Contudo, a testagem ambiental ainda carece de tecnologias eficazes para monitorar a presença do vírus em espaços públicos. O estudo objetivou investigar o meio de coleta e transporte viral (VTM) modificado como tecnologia para detecção do vírus SARS-CoV-2 em ambientes internos. Para isso, o VTM convencional foi modificado, acrescentando 3g/L de ágar base para torná-lo semissólido (VTM-SS). Testes de estabilidade foram realizados para verificar se sua eficácia é equivalente ao meio VTM convencional. A estabilidade foi analisada quanto à temperatura ambiente (TA, 18 °C a 22 °C) e controlada (TC, 2 °C a 8 °C) além do tempo de detecção pós inoculação (basal, 24h, 48h e 72h). Um espirro tem a capacidade de transferir gotículas contaminadas até 2 m de distância, por isso testes de detecção de aerossóis em relação a distância também foram avaliados nas métricas 10, 50, 100, 150 e 200 cm. Nos testes de estabilidade, o VTM manteve-se detectado em todos os tempos (TA e TC), com $X^2=94,5$ e $\varepsilon^2= 0,661$ para TA, e $X^2=143$ e $\varepsilon^2= 0,999$ para TC. A comparação entre os grupos TA e TC obteve diferença estatística com $p < 0,001$. A distância de detecção apresentou sensibilidade de 100% até 150 cm, decaindo para 87,5% a partir de 200 cm, ambas com especificidade de 100%. Conclui-se que o VTM-SS é mais estável em TC e sua distância de detecção ideal para o vírus da COVID-19 é de até 150 cm. Assim, essa tecnologia demonstrou potencial como sensor ambiental para o SARS-CoV-2, podendo contribuir no monitoramento e vigilância da COVID-19, delineando estratégias de saúde pública. A inovação também traz dados capazes de permitir futura implantação de detecção para outros vírus respiratórios.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; RT-PCR; Meio de Transporte Viral; VTM; Sensor ambiental.

ABSTRACT

COVID-19 is a respiratory disease caused by the SARS-CoV-2 virus. Testing is crucial to identify cases, contain the spread and guide public health measures. However, environmental testing still lacks effective technologies to monitor the presence of the virus in public spaces. The study aimed to investigate the modified viral collection and transport medium (VTM) as a technology for detecting the SARS-CoV-2 virus in indoor environments. For this, the conventional VTM was modified, adding 3g/L of agar base to make it semisolid (VTM-SS). Stability tests were carried out to verify if its effectiveness is equivalent to conventional VTM media. Stability was analyzed at room temperature (RT, 18 °C to 22 °C) and controlled temperature (TC, 2 °C to 8 °C) in addition to the post-inoculation detection time (basal, 24h, 48h and 72h). A sneeze has the ability to transfer contaminated droplets up to 2 m away, which is why aerosol detection tests in relation to distance were also evaluated in metrics 10, 50, 100, 150 and 200cm. In stability tests, the VTM remained detected at all times (TA and TC), with $X^2=94.5$ and $\epsilon^2= 0.661$ for TA, and $X^2=143$ and $\epsilon^2= 0.999$ for TC. The comparison between the TA and TC groups obtained a statistical difference with $p<0,001$. The detection distance presented a sensitivity of 100% up to 150 cm, decreasing to 87.5% from 200 cm onwards, both with a specificity of 100%. It is concluded that the VTM-SS is more stable in CT and its ideal detection distance for the COVID-19 virus is up to 150 cm, thus this technology has demonstrated potential as an environmental sensor for SARS-CoV-2, and may contribute in monitoring and surveillance of COVID-19, outlining public health strategies. The innovation also brings data capable of allowing future implementation of detection for other respiratory viruses.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; RT-PCR; Viral Transport Medium; VTM; Environmental sensor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura e genoma do vírus do SARS-CoV-2	15
Figura 2 – Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2.	16
Figura 3 – Ciclo de replicação viral de SARS-CoV-2	22
Figura 4 – Mutações na proteína <i>Spike</i> (S)	27
Figura 5 – Processo pré-inflamatório da COVID-19.	29
Figura 6 – Tempestade de citocinas na infecção por COVID-19.	30
Figura 7 – Processo de fusão do SARS-CoV-2.	33
Figura 8 – Ciclo intracelular do SARS-CoV-2.	35
Figura 9 – Modelo representativo das etapas da RT-qPCR para diagnóstico da COVID-19.	41
Figura 10 – Investigação laboratorial do coronavírus com testes moleculares e sorológicos	45
Figura 11 – Projeto apresentado ao registro de patentes de um dispositivo de detecção do ar exalado de pacientes com COVID-19	50
Figura 12 – Dispositivo adaptado com VTM-SS para captação de vírus do ambiente.	54
Figura 13 – Esquema ilustrativo validação do VTM-SS	56
Figura 14 - Esquema ilustrativo do protocolo de extração da amostra do VTM-SS	57
Figura 15 - Espirro humano captado em vídeo de alta velocidade	58
Figura 16 - Ilustração dos processos de simulação de distribuição de material biológico pelo espirro.	59
Figura 17 – Dimensões e esquemática da câmara de fluxo laminar horizontal.	60
Figura 18 - <i>Setup</i> do protocolo de preparação da amostra e fases de transcrição	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais proteínas estruturais e não estruturais do SARS-CoV-2 e suas características funcionais	19
Tabela 2 – Frequência de sinais e sintomas apresentados por pacientes com COVID-19.....	34
Tabela 3 - Estatística descritiva da relação Tempo x CT (em TA).....	68
Tabela 4 - ANOVA a um fator (não paramétrica) - Kruskal-Wallis	69
Tabela 5 - Comparações múltiplas Tempo x Tempo (em TA) – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	70
Tabela 6 – Estatística descritiva da relação Amostra x CT (em TA)	73
Tabela 7 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis	75
Tabela 8 – Comparações múltiplas Amostra x Amostra – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	76
Tabela 9 - Estatística descritiva da relação Tempo x CT (em TC).....	80
Tabela 10 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis	81
Tabela 11 – Comparações múltiplas Tempo x Tempo (em TC) – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	82
Tabela 12 – Estatística descritiva da relação da relação Amostra x CT (em TC)	84
Tabela 13 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis	87
Tabela 14 – Comparações múltiplas Amostra x Amostra – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	88
Tabela 15 – Estatística descritiva comparação TA x TC	91
Tabela 16 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis	92
Tabela 17 – Comparações múltiplas TA x TC – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.....	92
Tabela 18 – Estatística descritiva da relação Distância x CT	95
Tabela 19 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis	97
Tabela 20 – Comparações múltiplas Distância x Distância – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critério de classificação de variantes	23
Quadro 2 - Variantes de preocupação (VOCs) da COVID-19	24

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1 – Fluxo dos processos metodológicos da pesquisa e suas conclusões.....	52
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Relação CT x Tempo (em TA)	71
Gráfico 2 – Relação Amostra x CT (em TA).....	78
Gráfico 3 – Relação CT x Tempo (em TC)	83
Gráfico 4 – Relação Amostra x Amostra (em TC).....	90
Gráfico 5 – Relação Temperatura Ambiente (TA) x Temperatura Controlada (TC)	94
Gráfico 6 – Distância x CT	99

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Sensibilidade	100
Equação 2 - Especificidade	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2 (do inglês <i>Angiotensin Converting Enzyme-2</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	do inglês, <i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenisona Trifosfato (do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>)
CC5	do inglês <i>Disseminated Clonal Complex 5</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	DNA complementar
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019 (do inglês <i>Coronavirus disease 2019</i>)
CT	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
CIVD	<i>Coagulação Intravascular Disseminada</i> (do inglês <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>)
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMVs	do inglês <i>Double-membrane Vesicles</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DPP4	Receptor Dipeptidil Peptidase-4 (do inglês <i>Receptor Dipeptidil Peptidase-4</i>)
E	Proteína do envelope do SARS-CoV-2
eCDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças Europeu (do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
FET	do inglês <i>Field-effect Transistor</i>
FP	do inglês <i>Fusion Peptide</i>
HBSS	Solução salina balanceada de Hank (do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HCoV	Coronavírus humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HR1	do inglês <i>Heptad Repeat Region-1</i>

HR2	do inglês <i>Heptad Repeat Region-2</i>
HRP	do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>
HRS	do inglês <i>Heptapeptide Repeat Sequence</i>
ICAM-1	Molécula De Adesão Intercelular-1
IGG	Imunoglobulina G
IGM	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IP10	Interferon- γ -induzível 10
IFN- γ	Interferon-Gamma
IRA	Infecção Respiratória Aguda
M	Proteína de Membrana do SARS-CoV-2
MCP1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MIP	do inglês <i>Molecularly imprinted polymers</i>
MIP1 α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 α
MIP1 β	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 β (do inglês <i>Molecularly imprinted polymers</i>)
MTM	do inglês <i>Molecular Transport Medium</i>
N	Proteína do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês <i>Next-generation sequencing</i>)
NLRP3	do inglês <i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
NSPs	Proteínas Não Estruturais (do inglês <i>Nonstructural proteins</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONT	Oxford Nanopore Technologies
ORFs	do inglês <i>Open Reading Frames</i>
PADs	do inglês <i>Paper-based Devices</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês <i>Phosphate-buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PALS1	do inglês <i>Protein Associated With LIN7 1, MAGUK P55 Family Member</i>
PNI	Programa Nacional de Imunização
RNA	Ácido Ribonucleico

RBD	Domínio de Ligação do Receptor (do inglês <i>Receptor Binding Domain</i>)
RdRp	do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RT	Transcrição reversa (do inglês <i>Reverse Transcription</i>)
RTC	Complexo de Replicação-Transcrição
RT-LAMP	A amplificação Isotérmica Mediada por Alça com Transcrição Reversa (do inglês <i>Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>)
RT-qPCR	Reação De Cadeia Da Polimerase Quantitativo Com Transcriptase Reversa (do inglês <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
S	Proteína <i>Spike</i> do SARS-CoV-2
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SOP	do inglês <i>Standard Operating Procedure</i>
TM	Domínio Transmembrânico
TMPRSS2	Enzima Protease Serina Transmembranar 2 (do inglês <i>Type-2 Transmembrane Serine Proteases</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAP-1	Proteína de Adesão Vascular-1
VCAM-1	Molécula e Adesão de Células Vasculares-1
VOC	Variantes de preocupação (do inglês <i>Variants of Concern</i>)
VOI	Variantes de Interesse (do inglês <i>Variants of Interest</i>)
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
VTM	Meio de Transporte Viral (do inglês <i>Viral Transport Medium</i>)
VTM-SS	Meio de Transporte Viral semissólido (do inglês <i>Semisolid Viral Transport Medium</i>)
VUM	Variantes Sobre Monitoramento (do inglês <i>Variants Under Monitoring</i>)
ZO1	Zônula de Oclusão-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	7
1.2	OBJETIVOS	8
1.2.1	Objetivo Geral	8
1.2.2	Objetivos Específicos	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1	INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS.....	10
2.2	SARS-COV-2.....	11
2.2.1	Classificação taxonômica do SARS-CoV-2	12
2.2.2	Estrutura do SARS-CoV-2.....	14
2.2.3	Ciclo de replicação do SARS-CoV-2	20
2.2.4	Variantes do SARS-CoV-2.....	22
2.3	PATOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19	28
2.4	SINTOMAS DA COVID-19	32
2.5	TRANSMISSÃO DA COVID-19	37
2.6	PRESENÇA DO SARS-COV-2 EM SUPERFÍCIES E MATRIZES AMBIENTAIS.....	37
2.7	DIAGNÓSTICO DA COVID-19	39
2.7.1	Testes moleculares	39
2.7.2	Testes sorológicos.....	43
2.8	MEIO DE TRANSPORTE VIRAL (VTM).....	45
2.8.1	VTM – Coleta e extração	47
2.8.2	Extração e transcrição	48
2.9	PATENTES E NOVAS TECNOLOGIAS.....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MEIO DE COLETA E TRANSPORTE PARA O VÍRUS SARS-COV-2.....	51
3.1.1	Preparo do Meio de Transporte Viral (VTM) e suas modificações	53
3.1.1.1	Preparação dos ingredientes para o Meio de Transporte Viral (VTM).....	53
3.1.1.2	Preparação do Meio de Transporte Viral (VTM).....	53
3.1.1.3	Preparação do Meio de Transporte Viral Semissólido (VTM-SS).....	53
3.1.1.4	Controle de qualidade do VTM base	55

3.1.1.5	Controle de qualidade do VTM semissólido.	55
3.1.2	Avaliação do VTM semissólido	55
3.1.3	Protocolo de coleta da amostra no VTM semissólido.....	56
3.1.4	Exposição ambiental com VTM Semissólido	58
3.2	ANÁLISE POR REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)	61
3.2.1	RNA viral e preparação da amostra	61
3.2.2	PCR e one-step RT-PCR.....	61
3.2.3	Componentes do Master Mix.....	61
3.2.4	HotStaRT-Script Transcriptase Reversa.....	61
3.2.5	Controle interno de RNA.....	62
3.2.6	Controle interno Humano	62
3.2.7	Novo mecanismo mediado por anticorpos <i>Hot-start</i>	62
3.2.8	RT-PCR (<i>real time</i>).....	63
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	TESTES DE ESTABILIDADE VTM SEMISSÓLIDO EM TEMPERATURA AMBIENTE – 18 °C A 22 °C	67
4.2	TESTES DE ESTABILIDADE VTM SEMISSÓLIDO EM TEMPERATURA CONTROLADA – 2 °C A 8 °C	79
4.3	COMPARATIVO ENTRE ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE E TEMPERATURA CONTROLADA.....	91
4.4	TESTES DE DETECÇÃO EM DIFERENTES DISTÂNCIAS	95
4.5	SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO VTM SEMISSÓLIDO	100
4.6	SUGESTÕES DE FUTUROS TRABALHOS	102
5	CONCLUSÕES	104
5.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
5.1.1	Contribuições do trabalho	105
5.1.2	Perspectivas futuras	105
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A saúde pública global sofreu com a disseminação do coronavírus (2019-nCoV) ou síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2) (1). Um surto global foi estabelecido desde a identificação do novo vírus em dezembro de 2019, em Wuhan, uma província de Hubei na China. Casos de pneumonia de etiologia desconhecida foram identificadas por autoridades de saúde locais e associadas à exposição no mercado de frutos do mar da cidade (2,3). Rotineiramente, animais vivos e abatidos são vendidos no mercado de frutos do mar de Wuhan, como morcegos, sapos, cobras, pássaros e coelhos. Isso levou a suspeitas sobre uma possível origem zoonótica do vírus. Apesar das associações iniciais, a origem exata do SARS-CoV-2 ainda é objeto de investigação científica intensa e debates na comunidade (4).

A transmissão zoonótica, onde patógenos saltam de animais para humanos, é um fenômeno bem conhecido e documentado na história das doenças infecciosas. Vários patógenos que afetam os humanos têm origens zoonóticas, destacando a complexa interação entre saúde humana, animal e ambiental (5).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), é um dos exemplos mais notáveis de zoonose. Acredita-se que o HIV tenha se originado de chimpanzés e gorilas na África Central. A transmissão para humanos ocorreu provavelmente através do contato com sangue infectado durante a caça e o consumo de carne de animais selvagens. Estudos genéticos têm traçado as origens das cepas HIV-1 e HIV-2, sendo a primeira a mais comum do vírus, a uma linhagem de vírus de imunodeficiência Símea dos chimpanzés, o SIVcpz (6).

As cepas H5N1 e H7N9 do vírus da gripe de aves são outros exemplos de zoonoses. Essas cepas foram transmitidas de aves para humanos, causando surtos de gripe aviária. O contato direto ou indireto com aves infectadas, particularmente em mercados de aves vivas, tem sido um fator chave na transmissão desses vírus para humanos. Ambas as cepas têm provocado preocupação global devido ao seu potencial pandêmico e alta taxa de mortalidade em humanos (7,8).

O vírus Ebola, causador de surtos graves e frequentemente fatais de febre hemorrágica, é um exemplo clássico de zoonose. O Ebola é transmitido para humanos a partir de morcegos frutíferos ou primatas não humanos, com surtos iniciados geralmente após o contato humano com animais selvagens infectados. Morcegos

frugívoros são considerados os hospedeiros naturais do vírus Ebola, embora o mecanismo exato de transmissão ainda esteja sendo estudado (9).

O coronavírus SARS-CoV, responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), é outro exemplo de patógeno com origem zoonótica. Acredita-se que este vírus tenha se originado de morcegos e sido transmitido para humanos possivelmente através de civetas, grupo de pequenos mamíferos carnívoros que pertencem à família *Viverridae*. O surto de SARS em 2003 destacou a importância de monitorar a saúde animal para prevenir infecções em humanos, especialmente em mercados de animais vivos onde diferentes espécies são mantidas em proximidade e com armazenamento impróprio (10).

O coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), causador da MERS, foi transmitido de camelos para humanos. Estudos epidemiológicos e virológicos indicam que os camelos são um importante reservatório animal para o MERS-CoV e uma fonte de infecção para humanos. A transmissão ocorre através do contato direto ou indireto com camelos infectados, sendo uma doença predominantemente encontrada na Península Arábica (11).

O coronavírus humano (HCoV) foi identificado pela primeira vez no ano de 1962 como causador de infecção respiratória aguda do trato superior (12). Surto por coronavírus vem marcando o século XXI: o primeiro ocorreu no ano de 2002 pelo coronavírus da SARS-CoV, na China e em Hong Kong. Dez anos depois, outro coronavírus foi identificado como causador da MERS-CoV. O SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, marca a terceira pandemia, que foi altamente virulenta e patogênica alcançando nível global em poucos meses (13).

O SARS-CoV-2 é um coronavírus que, como outros, tem sua origem em morcegos, que são considerados o reservatório natural. Os coronavírus em morcegos apresentam uma alta taxa de recombinação genética, o que facilita a emergência de novos vírus capazes de infectar outras espécies (14). A análise genômica do SARS-CoV-2 revela uma semelhança significativa com coronavírus de morcegos, particularmente com o RaTG13, um coronavírus de morcego identificado na China (5). A transmissão do vírus de morcegos para humanos pode ter envolvido um hospedeiro intermediário, onde mutações adicionais ou recombinações genéticas ocorreram, permitindo a adaptação do vírus a novos hospedeiros. Pangolins foram propostos como possíveis hospedeiros intermediários, uma vez que coronavírus semelhantes ao SARS-CoV-2 foram encontrados nessas espécies (15).

O salto interespécies do SARS-CoV-2 foi facilitado por suas características moleculares específicas, particularmente a proteína *Spike* (S), que media a entrada do vírus nas células humanas. A proteína *Spike* do SARS-CoV-2 possui um domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor Binding Domain*) que se liga de maneira eficiente ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2, do inglês *Angiotensin-Converting Enzyme-2*) humana, uma característica crucial para a infecção de células humanas (16). Além disso, a presença de um sítio de clivagem polibásico na proteína *Spike* aumenta a capacidade do vírus de ser processado pelas proteases da célula hospedeira, facilitando a fusão viral e a entrada celular (17).

A rapidez do contágio e da propagação viral é a principal característica dos coronavírus. Até o momento, foram identificados sete tipos com capacidade de infectar os seres humanos: HCoV-229E e HCoV-NL63, do tipo α -coronavírus, 11 HCoV-HKU1 e HCoV-OC43 do tipo β -coronavírus, com baixa virulência e infectividade, causando sintomas respiratórios leves, como o de um resfriado comum. Em contrapartida, os coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV do tipo β -coronavírus, levam a infecções graves do sistema respiratório, podendo evoluir para óbito. O SARS-CoV-2, pertence também ao grupo β -coronavírus com compatibilidade genômica de 79,5% em relação ao SARS-CoV e de 96,2% com o CoV RaTG13, caracterizando o morcego como o hospedeiro da doença COVID-19 (14,18,19).

A progressão da doença ocorre em várias etapas, e parece estar correlacionada à ligação de proteínas virais *Spike* com co-receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), no organismo humano, localizados principalmente nos pulmões, cérebro, coração, rins e trato gastrointestinal (20,21). Alguns fatores parecem estar relacionados à morbimortalidade de pacientes acometidos com COVID-19. Nesse contexto, destacam-se as predisposições genéticas, onde em estudos recentes têm identificado variantes genéticas que podem influenciar a suscetibilidade à infecção e a gravidade da doença. O gene ECA-2, que codifica o receptor principal para a entrada do SARS-CoV-2 nas células, é um ponto crítico. Variações neste gene podem afetar a suscetibilidade à infecção e a gravidade da COVID-19 (16). O gene TMPRSS2 (do inglês *Type-2 Transmembrane Serine Proteases*) codifica uma protease crucial para a entrada do vírus nas células. Variantes neste gene podem influenciar a eficiência da infecção viral (22). As diferenças nos genes do sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA) podem afetar a capacidade do corpo de reconhecer e combater o vírus. O gene CCR5 (do inglês

Disseminated Clonal Complex 5) desempenha um papel na resposta imunológica e inflamatória. Algumas variantes podem influenciar a gravidade da doença (23). Genes que codificam citocinas, como a Interleucina 6 (IL-6), são fundamentais na resposta inflamatória do corpo. Variações nesses genes podem levar a uma resposta inflamatória exagerada, agravando a COVID-19 (24).

Estudos sugerem que indivíduos com certos tipos sanguíneos, principalmente o tipo A, podem ter um risco aumentado de infecção e de desenvolver formas mais graves da doença (25). Regiões cromossômicas específicas foram identificadas onde variantes genéticas estão associadas a um risco aumentado de infecção grave por SARS-CoV-2 e morte (26).

Além dessas características, as diferenças fisiopatológicas na suscetibilidade ou resposta à infecção, desigualdades sociais, condições e estilo de vida, circunstâncias de trabalho e condições de saúde subjacentes aparecem no ranking do que leva ao aumento de morbimortalidade (12,27). O vírus causador do COVID-19 é transmitido, principalmente, por gotículas de saliva ou secreção nasal, através de tosse, espirro ou fala de pessoas contaminadas, fator esse que possibilitou a disseminação em poucos meses (12).

Os órgãos internacionais de saúde sugerem que a transmissão direta por gotículas é provável e que a transmissão aérea ocorre pela geração de aerossóis. Mecanismos de formação de aerossóis foram descritos e todos os mecanismos exigem que a tensão superficial do fluido do revestimento do trato respiratório seja superada pelas forças de cisalhamento. Espirros e tosse são geradores eficazes de aerossol, mas todas as formas de expiração produzem partículas em vários tamanhos com potencial para contágio (1,28). Estudos sobre o monitoramento do SARS-CoV-2 em água, esgoto, lodo, ar e em superfícies, vem crescendo frente a esse cenário, com o intuito de avaliar o risco de contração e infecção viral. A transmissão do vírus pode ser contida de forma eficaz aplicando medidas preventivas indicadas pelas autoridades nacionais e internacionais da saúde (29). A utilização de sensores para a detecção do SARS-CoV-2 no ambiente representará um avanço significativo no controle da pandemia de COVID-19 (e, por extensão, de outros vírus). Esses dispositivos, se capazes de captar a presença do vírus no ar, serão cruciais para identificar espaços com alta carga viral e, conseqüentemente, para prevenir a propagação da doença. Em 2022, estudos mostraram que a detecção ambiental do vírus pode ser um complemento eficaz às medidas de saúde pública, como testagem

individual e rastreamento de contatos (30). Nesse panorama, constatou-se a necessidade de desenvolver uma tecnologia eficaz de captação, presença e identificação do vírus SARS-CoV-2 no ambiente.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

A pandemia de COVID-19 enfatizou a importância de inovar na detecção e monitoramento do SARS-CoV-2. Os esforços para desenvolver métodos eficazes de teste têm sido fundamentais na luta contra a pandemia. Estudos recentes demonstram o progresso em tecnologias de diagnóstico, incluindo testes rápidos e métodos baseados em reação de cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que oferecem resultados rápidos e precisos, essenciais para o controle efetivo da doença (30). Além disso, o monitoramento ambiental do vírus, como a análise de amostras de ar em locais públicos, emergiu como uma estratégia valiosa para identificar áreas de alto risco de transmissão (31).

A sensibilidade e a especificidade das tecnologias dos dispositivos de captação ambiental na detecção do SARS-CoV-2 variam significativamente, dependendo de uma série de fatores, incluindo o tipo de dispositivo, o método de coleta e as condições ambientais (32). A tecnologia para a detecção de vírus no ar, crucial para o monitoramento de doenças como influenza e tuberculose, que são patologias onde os seus ciclos são bem estabelecidos e robustos na literatura, envolve o uso de dispositivos inovadores. Estes coletam amostras do ar e as analisam para detectar patógenos, utilizando sensores avançados e técnicas de bioanálise como PCR na maioria dos casos (30). Sua portabilidade e facilidade de uso são essenciais para permitir monitoramento eficaz em locais de alto risco, como hospitais e espaços públicos (33).

A correlação entre a presença do vírus no ambiente e o risco real de transmissão para os seres humanos ainda não é completamente compreendida, gerando incertezas na interpretação dos dados obtidos (34). Porém, já se encontra na literatura dados animadores. Um exemplo notável é o dispositivo criado por pesquisadores da Universidade de Washington, que emprega sensores inicialmente projetados para detectar a proteína Beta-amiloide presentes na doença de Alzheimer, agora adaptados para identificar a proteína *Spike* do SARS-CoV-2. Este dispositivo cria um corredor de ar úmido, melhorando a detecção do vírus no ar. Além da COVID-

19, sua aplicação pode se estender para identificar outros patógenos como Influenza e vírus sincicial respiratório (VSR). A sensibilidade de detecção desse dispositivo varia entre 77% e 83%, e ele já foi testado em ambientes internos, incluindo apartamentos de pacientes infectados (35). Outra inovação é o CoronaTrap, desenvolvido pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Este dispositivo consegue capturar o coronavírus em uma câmera escura sob condições controladas, permitindo monitoramento mais preciso. O CoronaTrap é uma evolução do anterior CoronaTrack, com maior capacidade de coleta ambiental. Sua versatilidade inclui a coleta de outros vírus, bactérias e fungos, essencial para monitorar a qualidade microbiológica do ar em diferentes ambientes, como escolas públicas e hospitais (36). Diante desse cenário, neste trabalho, propôs-se investigar a aplicação de uma tecnologia de captação ambiental baseados em um Meio de Transporte Viral (VTM) modificado, para a detecção do SARS-CoV-2, com o intuito de elucidar as principais barreiras técnicas e operacionais existentes, com dados de estabilidade e detecção, indicando futuras aplicações e levando em consideração a relação custo-benefício como principal diferencial para sua implementação. Essas tecnologias são essenciais não apenas para combater a COVID-19, mas também para prevenir futuras pandemias, possibilitando monitoramento mais eficaz de patógenos no ar. Sua aplicação transcende o contexto atual da COVID-19, abrindo caminhos para o controle de uma ampla variedade de doenças respiratórias e impactando significativamente a saúde pública global.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa é investigar o meio de coleta e transporte viral (VTM) modificado (semissólido) como tecnologia para detecção do vírus SARS-CoV-2 em ambientes internos.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver um meio de coleta com características semissólidas baseado na formulação do Meio de Transporte Viral (VTM), que possa coletar de forma passiva o vírus do SARS-CoV-2 em ambiente interno;

2. Avaliar a estabilidade do VTM semissólido como meio de coleta e transporte em relação à temperatura e ao longo do tempo;
3. Avaliar a detecção do VTM semissólido baseado na aderência viral proveniente do ambiente em diferentes distâncias da fonte propagadora;
4. Avaliar sensibilidade e especificidade do VTM semissólido na detecção do vírus SARS-CoV-2 em amostras provenientes do ambiente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

As doenças infecciosas mais comuns entre os seres humanos são as infecções respiratórias agudas (IRA), que se destacam como a principal fonte de morbidade associada a patologias infecciosas, internações hospitalares e óbitos em crianças, especialmente em nações em desenvolvimento e naquelas com menos de cinco anos de idade (37). A IRA, em sua definição mais ampla, engloba todas as infecções que afetam o trato respiratório.

As infecções do trato respiratório constituem a maior parte das enfermidades em escala global, superando o número de casos de HIV, malária, câncer e doenças cardíacas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta essas infecções como a principal causa de morte em países menos desenvolvidos (38), sendo os vírus respiratórios os principais agentes patogênicos nesses casos (39).

De acordo com a OMS, as IRA são responsáveis por aproximadamente 4 milhões de mortes anuais, o que representa uma significativa parcela das doenças infecciosas (40). Entre 2000 e 2018, observou-se uma tendência de leve redução nas taxas de mortalidade por IRA globalmente. Esse decréscimo pode ser atribuído a melhorias nas intervenções de saúde pública, vacinação e tratamento médico e prevenção (41). No entanto, as disparidades entre países de alta e baixa renda permanecem evidentes, com as nações mais pobres apresentando taxas de mortalidade significativamente mais altas.

No Brasil, as IRA também constituem uma causa de morte, principalmente entre os grupos populacionais mais vulneráveis. De acordo com o Ministério da Saúde, houve uma redução de aproximadamente 20% nas mortes por IRA entre 2000 e 2018 (41). Essa melhora pode ser atribuída a programas de vacinação, como o Programa Nacional de Imunizações (PNI), e ao aumento no acesso aos serviços de saúde. Apesar desses avanços, as IRA continuam sendo uma preocupação de saúde pública no país, necessitando de atenção contínua e fortalecimento das estratégias de prevenção e tratamento. O período entre 2019 e 2023 foi marcado por significativas mudanças nos padrões de morbidade e mortalidade relacionados às IRA, especialmente devido à pandemia de COVID-19 causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. A pandemia de COVID-19, declarada pela OMS em 11 de março de

2020, levou a um aumento sem precedentes nas mortes por IRA em todo o mundo (42). Até o final de 2022, a COVID-19 havia causado mais de 6 milhões de mortes oficialmente registradas, embora estimativas sugiram que o número real poderia ser significativamente maior (43). Esses números refletem o impacto devastador da pandemia na população global, sobrecarregando sistemas de saúde e expondo vulnerabilidades em preparação e resposta a emergências de saúde pública. No Brasil, a pandemia de COVID-19 também teve impactos profundos. O país enfrentou desafios significativos em termos de capacidade de resposta, levando a altas taxas de mortalidade. Até o final de 2023, o Brasil registrava uma das maiores contagens de mortes por COVID-19 no mundo, com mais de 708 mil vidas perdidas (44). Essa situação ressaltou a necessidade crítica de investimentos em infraestrutura de saúde, bem como a importância da adesão a medidas preventivas e campanhas de vacinação e métodos de prevenção. As lições aprendidas durante esse tempo são cruciais para fortalecer os sistemas de saúde, melhorar a preparação para futuras pandemias e garantir a resiliência diante de desafios de saúde pública.

2.2 SARS-COV-2

Em 2019, o mundo foi afetado pelo aparecimento de uma nova doença respiratória chamada de COVID-19 (do inglês *Corona Virus Disease*, 2019), cujo agente causador é o SARS-CoV-2, levando a uma patologia respiratória que pode ser assintomática, com desenvolvimento de sintomas leves ou com desenvolvimento de quadros mais graves ligados à síndrome respiratória aguda grave (SARS) (42). A epidemia foi declarada em dezembro de 2019, identificando a cidade de Wuhan na China, onde no dia 12 de dezembro de 2019 foi registrado o primeiro caso, vindo a ser o epicentro da infecção (45). Em poucos meses, o vírus propagou-se com extrema rapidez em diferentes continentes adquirindo a proporção de pandemia com um aumento exponencial de novos casos de contágio (42). As autoridades chinesas alertaram a OMS no dia 7 de janeiro de 2020 a respeito da descoberta de um novo tipo de coronavírus, capaz de causar SARS, chamado inicialmente de nCoV2019 e, sucessivamente renomeado no dia 11 de janeiro de SARS-CoV-2 (46). Segundo os dados da OMS, as áreas mais atingidas foram inicialmente localizadas no continente asiático, (24% dos casos confirmados), devido ao fato que o patógeno surgiu na China, disseminando-se pelo resto do globo, sucessivamente a área europeia se

posicionou em primeiro lugar sendo, Itália (18%) e EUA (9%) confirmando a sua propagação em vários continentes (45), sendo declarado pandemia no dia 11 de março de 2020 pela OMS. A taxa de mortalidade variou entre países e regiões, sendo influenciada por vários fatores, incluindo sistemas de saúde, medidas de saúde pública adotadas, taxas de vacinação e características demográficas da população (14).

Os dados sobre a pandemia de COVID-19 têm sido coletados e analisados por várias organizações e instituições de saúde, incluindo a OMS, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), o Centro de Controle e Prevenção de Doenças Europeu (eCDC) e a Universidade Johns Hopkins. Essas instituições fornecem atualizações regulares sobre o número de casos confirmados, mortes e recuperações (30,47). A pandemia da COVID-19, além de causar mortes diretas, trouxe consigo impactos indiretos substanciais na saúde global, como o agravamento de condições de saúde preexistentes, um aumento significativo nos problemas de saúde mental e interrupções nos serviços de saúde (48). Estes efeitos indiretos têm contribuído para o aumento da carga global de doenças, desafiando ainda mais os sistemas de saúde já sobrecarregados. O agravamento de condições de saúde preexistentes foi observado devido à redução no acesso aos serviços de saúde, especialmente para pacientes com doenças crônicas que enfrentaram dificuldades no gerenciamento de suas condições (30). Interrupções nos serviços de saúde, incluindo adiamentos e cancelamentos de procedimentos eletivos e exames de rotina, também foram amplamente relatados, afetando o diagnóstico e tratamento oportuno de várias condições (31). Além disso, a pandemia impactou significativamente a saúde mental da população, com um aumento nos casos de ansiedade, depressão e estresse, causados por fatores como isolamento social, incertezas econômicas e medo da doença (49). Estes problemas de saúde mental evidenciam a necessidade de intervenções psicossociais e de suporte durante e após a pandemia.

2.2.1 Classificação taxonômica do SARS-CoV-2

A classificação taxonômica é realizada com base nas características moleculares e filogenéticas dos vírus, e é uma ferramenta importante do estudo de vírus patogênicos, pois possibilita avaliar aspectos biológicos e evolutivos e compará-los outros vírus próximos (50).

A taxonomia do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, é uma área de estudo vital para compreender a natureza e o impacto desta pandemia. O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, subdividida em quatro gêneros principais: Alpha, Beta, Gamma, e Delta coronavírus. O SARS-CoV-2 é classificado como um Beta coronavírus (51,52). Dentro desse gênero, mais especificamente agrupado na subfamília *Orthocoronavirinae*, e está classificado no subgênero *Sarbecovirus*, que compreende coronavírus de origem animal, principalmente morcegos, que têm potencial zoonótico (53). O SARS-CoV-2 é particularmente notável pela sua capacidade de infecção em humanos, diferenciando-se de outros coronavírus que geralmente têm um espectro limitado de hospedeiros. A origem zoonótica do SARS-CoV-2 é um tópico de intenso debate e pesquisa. Estudos genômicos sugerem que o vírus pode ter se originado em morcegos e posteriormente transmitido para humanos, possivelmente com um hospedeiro intermediário envolvido, como o pangolim (54). Além disso, a evolução do SARS-CoV-2 tem sido um aspecto crítico de estudo. Variantes do vírus, como Alpha, Beta, Gamma, Delta, e Ômicron, surgiram e se espalharam globalmente, demonstrando mudanças significativas na transmissibilidade e, em alguns casos, na gravidade da doença (55).

Além do SARS-CoV-2, o gênero Beta coronavírus inclui ainda os vírus SARS-CoV e MERS-CoV (56). Ambos os vírus são conhecidos por causarem epidemias que afetaram os seres humanos nas últimas décadas. No ano de 2002, o SARS-CoV foi o agente responsável pela epidemia de SARS na China (57). Anos mais tarde, o MERS-CoV foi o causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), outra epidemia que ocorreu em 2012 na Arábia Saudita (dados de mortes) e se espalhou pela região do Oriente Médio e outros países (58).

Além disso, representa o terceiro tipo de coronavírus patogênico para os seres humanos junto com o SARS-CoV e o MERS-CoV capaz de levar o hospedeiro a sofrer de uma condição clínica mais grave (14). Vários estudos conduzidos anos antes do começo da pandemia, alertaram sobre a possibilidade do surgimento de uma mutação dos coronavírus de morcegos resultante em um novo agente viral patogênico para os seres humanos, capaz de provocar a SARS (59,60).

Análises filogenéticas demonstraram que o genoma do SARS-CoV-2 possui homologia em cerca de 79% com o genoma do SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV (61). O SARS-CoV-2 tem ainda aproximadamente 88% de homologia com dois

coronavírus encontrados em morcegos, o bat-SL-CoVZC45 e o bat-SL-CoVZXC21 (61).

Estudos sucessivos conseguiram identificar o ciclo completo do SARS-CoV-2. Morcegos são considerados o reservatório natural do SARS-CoV-2. Estudos genômicos indicam uma alta semelhança entre o SARS-CoV-2 e coronavírus encontrados em morcegos, sugerindo uma origem zoonótica. Morcegos, devido à sua diversidade e ampla distribuição geográfica, são hospedeiros ideais para muitos coronavírus, incluindo outros Beta coronavírus como o SARS-CoV e o MERS-CoV (14). Pangolins foram inicialmente suspeitos de serem o hospedeiro intermediário entre morcegos e humanos, principalmente devido à descoberta de coronavírus relacionados ao SARS-CoV-2 em pangolins contrabandeados. Estes vírus compartilham uma região crítica na proteína *Spike* com o SARS-CoV-2, essencial para a ligação ao receptor ECA-2 humano (62).

A transmissão do SARS-CoV-2 para humanos é provavelmente resultado de contato direto ou indireto com animais infectados. Uma vez introduzido na população humana, o SARS-CoV-2 espalha-se, principalmente, por meio de gotículas respiratórias. A transmissão assintomática e pré-sintomática tem sido um fator-chave na rápida disseminação do vírus (13). Desde a sua emergência, o SARS-CoV-2 sofreu várias mutações, levando ao surgimento de variantes. Algumas dessas variantes, como a Delta e a Ômicron, mostraram maior transmissibilidade e alterações na eficácia da vacina. Essa evolução contínua destaca a capacidade do vírus de se adaptar ao seu novo hospedeiro humano (55).

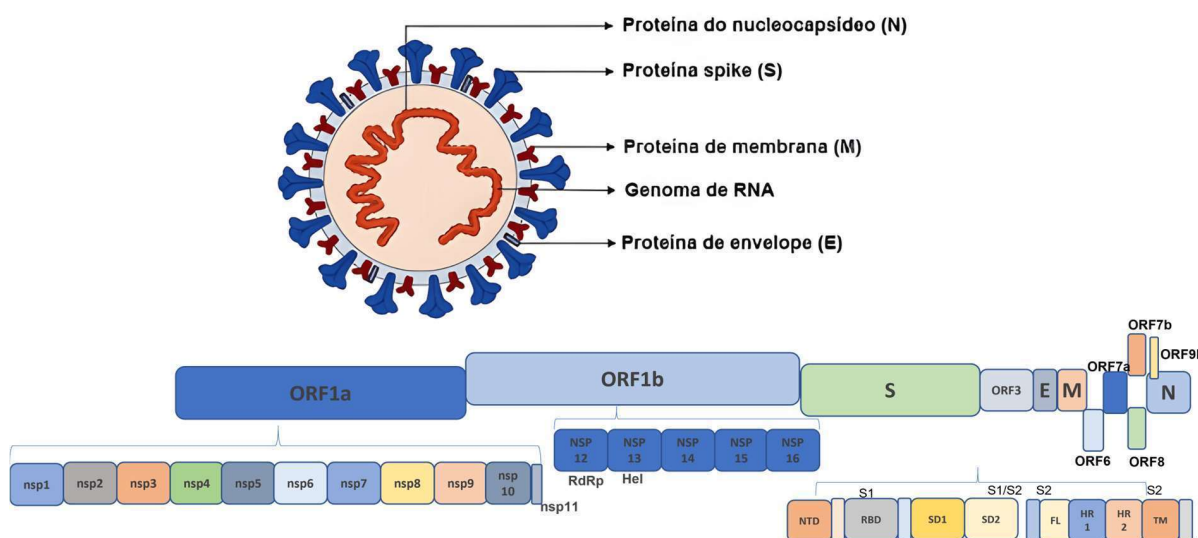
2.2.2 Estrutura do SARS-CoV-2

Estruturalmente, o SARS-CoV-2 é caracterizado pela presença de envelope e genoma de RNA, com um diâmetro aproximadamente de 0,1 μm e formato esférico. O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica e proteínas estruturais, sendo responsável por envolver o nucleocapsídeo que contém o genoma do vírus (63–65).

O genoma do SARS-CoV-2 é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo (+ssRNA), linear, não segmentado e de tamanho equivalente a 29,9 kb (61). Ele se organiza em fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Reading Frames*), que codificam quatro proteínas estruturais e outras dezesseis proteínas não estruturais, Nsp1–16 (NSPs, do inglês *nonstructural proteins*), além de proteínas

acessórias, como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10. Estas proteínas são menos caracterizadas, mas acredita-se que elas desempenhem funções importantes na modulação da resposta imune do hospedeiro, na patogênese viral e possivelmente na transmissão do vírus (65–68). A Figura 1 ilustra um modelo esquemático da estrutura e do genoma do SARS-CoV-2.

Figura 1 – Estrutura e genoma do vírus do SARS-CoV-2



Nota: O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, com genoma composto por RNA e quatro proteínas estruturais (nucleocapsídeo, N; *Spike*, S; membrana, M; e envelope, E). O genoma do SARS-CoV-2 possui cerca de 30 kb, organizado em ORFs que codificam as quatro proteínas estruturais, outras dezesseis proteínas não-estruturais (Nsp1–16) e proteínas acessórias. A linha pontilhada indica os sítios no qual as proteínas TMPRSS2 e a furina fazem a clivagem na entrada do vírus na célula hospedeira.

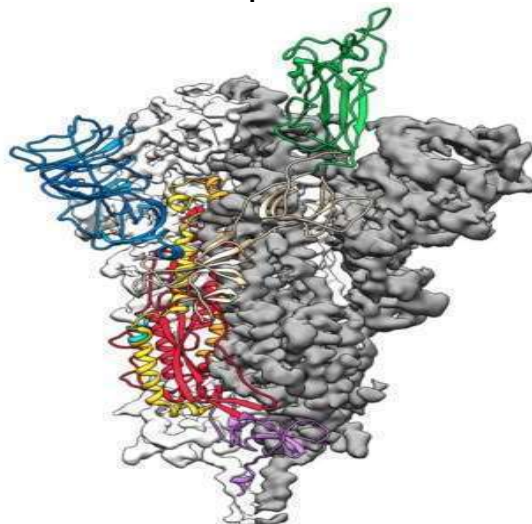
Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2021) (54).

As quatro proteínas estruturais são: a *Spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), que fazem parte da composição da estrutura da partícula viral (64,69). Dentre elas, a proteína S é a mais estudada (70). As proteínas estruturais também são importantes alvos no desenvolvimento de vacinas baseadas em proteínas/peptídeos contra o vírus do SARS-CoV-2 (71).

As proteínas S (do inglês *Spike proteins*), são encontradas na superfície externa do vírion e operam na interação entre o vírus e a célula hospedeira (17). Estas proteínas reconhecem a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) presente nas células do tecido humano, permitindo a fusão entre o vírion e a célula (17). O vírus SARS-CoV-2 possui o mesmo mecanismo de interação entre proteínas S e receptor ECA-2 observado no vírus SARS-CoV, embora a afinidade entre proteína S e receptor ECA-2 seja mais forte no caso do SARS-CoV-2 o que indica uma maior virulência se

comparado com o SARS-CoV (72). A proteína S apresenta-se com uma estrutura quaternária trimérica, e cada unidade, por sua vez, possui duas subunidades chamadas respectivamente S1 e S2 como mostrado na Figura 2 (73).

Figura 2 – Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2.



Nota: Estrutura tridimensional detalhada da Proteína *Spike* (S) do SARS-CoV-2. Uma representação molecular da chave para a transmissão viral e alvo de terapias antivirais. Descrição de cada porção; Azul: Indica o N-terminal, início da sequência da proteína. Vermelho/Amarelo: Região central, domínio de ligação ao receptor, que o vírus usa para se ligar e entrar nas células humanas. Verde: Subunidade específica, hélice Alfa. Roxo: C-terminal, fim da sequência da proteína. Cinza: Superfície da proteína. Autor: Zhao et al. (2022) (73)

A estrutura da proteína *Spike* (S) do SARS-CoV-2, crucial para a infecção viral, é composta por duas subunidades funcionais principais: S1 e S2. A subunidade S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), que é essencial para o acoplamento do vírus à célula hospedeira (74).

O RBD liga-se diretamente ao receptor ECA-2 na superfície das células humanas, um passo crítico para a infecção viral. Esta interação é facilitada por uma configuração específica de estruturas β -folhas e α -hélices no RBD, que se encaixam no ECA-2 como uma chave em uma fechadura, permitindo a adesão do vírus à célula (74). A subunidade S2, por sua vez, é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Este processo é complexo e envolve uma série de etapas estruturais e moleculares. Inicialmente, após a ligação do RBD ao ECA-2, ocorre uma série de rearranjos conformacionais na proteína *Spike* (S), que permitem a exposição de dois domínios proteicos na subunidade S2, conhecidos como região de repetição do heptal 1 e 2 (HR1 e HR2, do inglês *heptad repeat region*). Estes domínios formam um complexo hexamérico chamado 6-HB, essencial para aproximar

fisicamente o vírus da célula. O 6-HB é formado por três hélices em cada uma das estruturas HR1 e HR2, que se entrelaçam para formar uma estrutura altamente estável. Este arranjo facilita a fusão do envelope viral com a membrana celular, um processo mediado também pela interação da subunidade S2 com a proteína transmembrana serina 2 (TMPRSS2) na superfície da célula hospedeira (75).

A TMPRSS2 é uma protease que atua clivando a proteína *Spike* (S), ativando-a para mediar a fusão da membrana viral com a celular (16). A compreensão destes mecanismos moleculares não só é fundamental para o entendimento da patogênese do SARS-CoV-2, mas também abre caminho para o desenvolvimento de terapias antivirais. Inibidores que se ligam ao RBD ou bloqueiam a ação da TMPRSS2 têm potencial para impedir infecção viral, representando alvos promissores para o tratamento da COVID-19 (54).

A proteína E está presente na membrana viral do SARS-CoV-2 e contribui para a morfologia do vírus (62). Estruturalmente, a proteína E possui 75 aminoácidos, que estão organizados em domínio transmembrânico N-terminal seguido por um domínio C-terminal, sendo considerada uma proteína conservada (76,77). Essa proteína ainda forma um canal catiônico homopentamérico (78). Além de auxiliar na morfologia do SARS-CoV-2, estudos demonstraram que a proteína E é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro por meio da formação de poros com a ativação do inflamassoma NLRP3 (do inglês, *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein-3*), complexo proteico intracelular envolvido no processo inflamatório (77). Dados da literatura sugerem que a proteína E interage com a zônula de oclusão 1 (ZO1) das células epiteliais infectadas, proteína envolvida na formação da junção de oclusão intercelular (79). Outro estudo demonstrou que a proteína E interage também com a proteína PALS1 (do inglês *Protein Associated With LIN7 1, MAGUK P55 Family Member*), que faz parte do complexo responsável pela polaridade celular (77). Esses dados sugerem que a proteína E pode estar relacionada, ao menos em parte, com o comprometimento da barreira epitelial induzido pela infecção do SARS-CoV-2 (77,79).

A proteína M, por sua vez, apresenta 222 aminoácidos e encontra-se na membrana viral com três domínios transmembrânicos (TMI, TMII e TMIII) (80,81).

O domínio N-terminal é relativamente curto, do aminoácido 1 ao 19, enquanto o domínio C-terminal se encontra no interior da partícula viral e é mais longo, abrangendo os aminoácidos da posição 101 ao 222 (81). Assim como a proteína E, a proteína M também participa da definição da morfologia viral (80). Além disso, dados

da literatura indicam que a proteína M é capaz de realizar complexos proteicos ao interagir com a proteína S e N do SARS-CoV-2 (80).

A proteína estrutural N possui 419 aminoácidos, com domínio N-terminal (N1b), domínio C-terminal (N2b) e três regiões ou domínios menores que são N1a, N2a e N3 (69,82). O domínio N-terminal interage com o RNA e o domínio C-terminal está relacionado com a dimerização (83). A proteína N é responsável por auxiliar na organização e preservação do genoma viral, formando um complexo de ribonucleoproteína (62,70,82,84,85). Dados da literatura sugerem que a Nsp3 faz o recrutamento da proteína N para o complexo de replicação-transcrição, sendo importante também para o processo de replicação do SARS-CoV-2 (86).

As proteínas Nsps estão relacionadas principalmente com o processo de replicação viral. São codificadas a partir da ORF1a e ORF1b, no qual são produzidas poliproteínas que são clivadas em dezesseis Nsps (87). Essas proteínas são consideradas alvos terapêuticos promissores devido ao seu papel importante na replicação viral e na modulação da célula hospedeira.

A Nsp1, especificamente, participa do processamento e da replicação do RNA. Essa proteína é capaz de interagir com a subunidade 40S do ribossomo das células humanas infectadas e de inibir a tradução de RNAs mensageiros do hospedeiro (87,88). Dessa forma, a Nsp1 é considerada um importante fator de virulência do SARS-CoV-2, interferindo no mecanismo de tradução da célula hospedeira (88). A Nsp2, por sua vez, faz a modulação de vias de sinalização na célula hospedeira; porém, seu exato mecanismo de ação é ainda desconhecido (89).

A Nsp3 e a Nsp5 são proteases que fazem a clivagem de proteínas virais (90–92). Já a Nsp4 atua na membrana do retículo endoplasmático (93). Estudos com coronavírus demonstraram que Nsp3, Nsp4 e Nsp6 se encontram no retículo endoplasmático e contribuem para a formação de vesículas de membrana dupla (DMVs, do inglês *double-membrane vesicles*) (70,94,95).

A Nsp12, Nsp8 e Nsp7 estão relacionadas com o processo de replicação e transcrição do RNA viral, formando a enzima polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp, do inglês *RNA-dependent RNA-polymerase*) (96,97). Dessa forma, a Nsp12 possui um domínio catalítico enquanto a Nsp8 e Nsp7 são proteínas acessórias (96,97). Além disso, a Nsp13 possui atividade de RNA helicase que auxilia no processo de replicação viral (98,99).

A Nsp10 e a Nsp16 participam do processamento do RNA viral. A Nsp16 é uma metiltransferase que adiciona um grupo metílico a 5' extremidade do RNA viral, o que contribui para a tradução e evita que o RNA viral seja reconhecido como de origem patogênica pelos mecanismos de defesa da célula hospedeira (100). Nesse panorama, a Nsp10 tem a capacidade de modular a Nsp16 (70). A Nsp14 possui atividade de exonuclease e participa do processamento do RNA viral (96,97,101). Já a Nsp15, por sua vez, possui atividade de endonuclease (64).

Em síntese, a Tabela 1 apresenta as principais proteínas do SARS-CoV-2 e suas respectivas características funcionais.

Tabela 1 – Principais proteínas estruturais e não estruturais do SARS-CoV-2 e suas características funcionais

Proteína do SARS-CoV-2	Característica Funcional
Proteínas estruturais	
<i>Spike</i> (S)	Entrada do vírus na célula hospedeira
Membrana (M)	Morfologia Viral
Envelope (E)	Morfologia Viral, modula resposta imune
Nucleocapsídeo (N)	Organização e preservação do genoma viral
Proteínas não estruturais	
Nsp1	Inibe a tradução da célula hospedeira
Nsp2	Modulação de vias de sinalização
Nsp3	Protease, formação de DMV's
Nsp4	Formação de DMV's
Nsp5	Protease
Nsp6	Formação de DMV's
Nsp7	Formação do complexo de replicação e transcrição do RNA viral (RdRp)
Nsp8	Formação do complexo de replicação e transcrição do RNA viral (RdRp)
Nsp9	Desconhecido
Nsp10	Processamento do RNA viral, modula a atividade de NSP16
Nsp11	Desconhecido
Nsp12	Formação do complexo de replicação e transcrição do RNA viral (RdRp)
Nsp13	Atividade de RNA helicase
Nsp14	Atividade de exonuclease e processamento do RNA viral ¹

¹ Tabela 1 continua na próxima página

Nsp15	Endoribonuclease
Nsp16	Metiltransferase, processamento do RNA viral

Nota: DMVs, *Double-Membrane Vesicle*; RdRp, *RNA-Dependent RNA Polymerase*.
Fonte: O autor (2024).

2.2.3 Ciclo de replicação do SARS-CoV-2

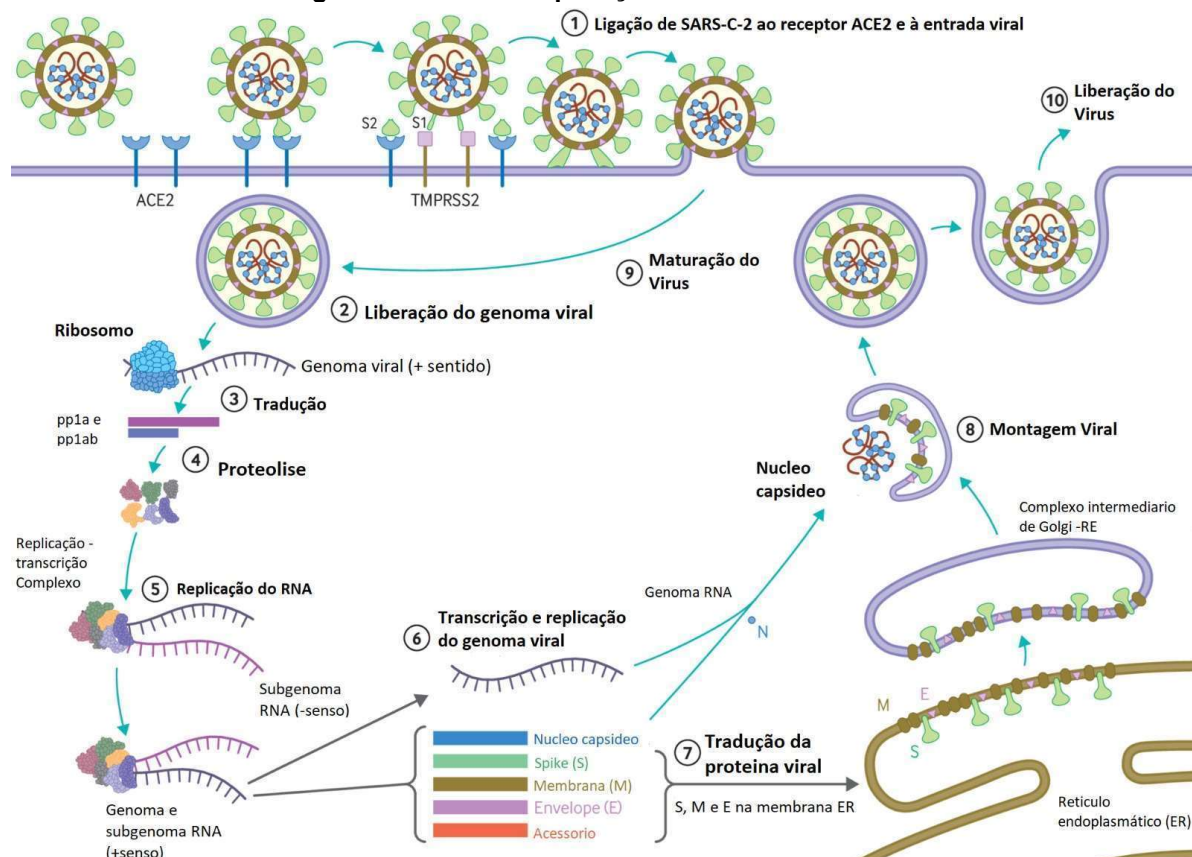
O SARS-CoV-2 tem capacidade de infectar uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais pulmonares, cardiomiócitos e células endoteliais. A primeira etapa da infecção viral é a adsorção, na qual ocorre a interação entre o vírus e a célula hospedeira. No caso da COVID-19, a entrada do SARS-CoV-2 nas células é mediada pela ligação da proteína viral S, especificamente a região RBD da proteína, ao receptor de superfície celular ECA-2 presentes nas células do hospedeiro (16,102). Por ser uma proteína crucial para a entrada do SARS-CoV-2 na célula, a expressão e a distribuição tecidual do ECA-2 podem estar relacionadas com o tropismo e patogenicidade do vírus (103). Comparativamente, o vírus SARS-CoV também utiliza a proteína ECA-2 das células hospedeira para a sua entrada na célula, enquanto o vírus do MERS-CoV utiliza a proteína DPP4 (do inglês *Receptor Dipeptidil Peptidase-4*) (72).

O processo de entrada do vírus SARS-CoV-2 na célula também depende de proteases da célula hospedeira, tais como a protease TMPRSS2 (102,104). A TMPRSS2 é uma proteína presente na membrana celular, com um domínio extracelular proteolítico, que pode ser encontrada em diversos tecidos, incluindo o pulmão, células epiteliais nasais, trato gastrointestinal, rins e fígado (22,105–107). Na COVID-19, a TMRSS2 realiza a clivagem proteolítica das proteínas da superfície viral do SARS-CoV-2, propiciando a fusão entre as membranas do vírus e da célula hospedeira (16,22,108).

Outra proteína que participa do processo de entrada do vírus SARS CoV-2 na célula hospedeira é a furina, uma proteína de membrana que pertence à família proproteína convertase do tipo subtilisina. Dados da literatura indicam que a furina realiza a clivagem no sítio S1/S2 da proteína S do SARS-CoV-2 (104,109). Curiosamente, Peacock TP, et al. (2021) demonstraram que o SARS-CoV-2 modificado, sem o sítio de clivagem da furina, apresentou menor transmissão em modelo animal (furões) comparado com o vírus selvagem (110). Em modelo *in vitro*, a inibição tanto da TMPRSS2 como da furina inibem, consequentemente, a replicação do SARS-CoV-2 em células epiteliais (104).

Com a entrada do vírus na célula, ocorre a liberação e o desencapsulamento do RNA genômico viral que é sujeito a transcrição direta no citoplasma da célula hospedeira (108). Primeiramente, na terminação 5', a ORF1ab/1^a produz as poliproteínas PP1a e PP1ab, que são importantes para o processo de replicação viral (71). Essas poliproteínas são, na sequência, submetidas à proteólise e formam as Nsps. A Nsp3 e a Nsp5 possuem atividade proteolítica e são importantes nesse processo (103,111).

As Nsp's, por sua vez, dão origem ao complexo de replicação-transcrição (RTC, do inglês *replication and transcription complex*) que é fundamental para a replicação do vírus. Os principais componentes do RTC são o RdRp (Nsp12 e as acessórias Nsp7 e Nsp8), a helicase (Nsp13) e as enzimas que realizam o processamento do RNA (Nsp14, Nsp16, Nsp9 e Nsp10) (88,96,112). Basicamente, o RNA genômico viral é submetido a uma transcrição reversa, sintetizando uma fita de RNA de sentido negativo, que serve de molde para a síntese do RNA genômico e dos RNAs subgenômicos pela RTC (103). O RNA genômico, proveniente do processo de replicação, é incorporado nas novas partículas virais que estão sendo formadas. Já os RNAs subgenômicos são traduzidos em proteínas estruturais virais, dentre as quais a S, E e M são encontradas na membrana do retículo endoplasmático e a N interage com o RNA genômico. Entretanto, o processo de montagem do vírion ainda não foi totalmente elucidado. A partir do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, as novas partículas virais são formadas e, por exocitose, são liberadas da célula hospedeira (103,111). A Figura 3 apresenta o ciclo de replicação do SARS-CoV-2.

Figura 3 – Ciclo de replicação viral de SARS-CoV-2

Nota: O SARS-CoV-2 interage com a proteína ECA-2 da célula hospedeira. Após a ligação entre a proteína *Spike* e o ECA-2, a proteína TMPRSS2 faz a clivagem proteolítica, auxiliando a entrada do vírus na célula. Na sequência o RNA viral é liberado no citoplasma e é traduzido. Primeiramente, são traduzidas as poliproteínas pp1a/ab que são submetidas a proteólise, formando as Nsps. Algumas Nsps formam o complexo de replicação-transcrição (RTC), que realiza a síntese do RNA genômico para replicação e de RNAs sub-genômicos para transcrição. As proteínas estruturais são traduzidas e translocadas no retículo endoplasmático que seguem para a montagem do vírion (partícula viral). Os vírions recém-sintetizados são liberados da célula por exocitose. As principais estratégias antivirais contra o SARS-CoV-2 compreendem a inibição da entrada do vírus na célula, da atividade de proteases virais e da replicação viral.

Fonte: Adaptado de Jeong et al. (2020) (111).

2.2.4 Variantes do SARS-CoV-2

As variantes virais são provenientes de mutações no material genético dos vírus. A taxa de mutação do SARS-CoV-2 é relativamente baixa, apesar dos vírus com genoma de RNA, de forma geral, apresentarem alta taxa de mutação (113,114). Essas alterações genéticas podem ser deleções ou inserções de nucleotídeos, ou mesmo substituições de um nucleotídeo por outro. As substituições podem ser divididas em sinônimas, quando há pouca ou nenhuma alteração, ou não-sinônimas, quando há alteração na sequência de aminoácidos (114). As mutações devem-se, portanto, a erros que ocorrem durante a replicação viral. Não obstante, essas alterações genéticas estão sujeitas ao processo de seleção natural (114).

As mutações que alteram a sequência de aminoácidos podem afetar a transmissibilidade, o tropismo celular e a patogenicidade do vírus (115,116). Consequentemente, essas características podem elevar a taxa de hospitalização e causar impactos nos sistemas de saúde. Além disso, alterações no genoma do vírus pode afetar a sensibilidade de técnicas de diagnóstico de COVID-19, pois essas alterações podem ter ocorrido na região que é alvo da reação, tais como deleções e substituição de nucleotídeos (117,118). Outro dado importante em relação às variantes do SARS-CoV-2 é sua capacidade de escapar da imunidade induzida pelas vacinas, afetando a sua eficácia (119–121). As informações sobre as mutações e o surgimento de variantes são importantes pois ressaltam a importância da vigilância genômica e podem orientar políticas de saúde e de vacinação (119).

No decorrer da pandemia do COVID-19, foram identificadas diversas variantes, dentre as quais algumas se destacam por apresentarem características preocupantes, como a maior capacidade de transmissão. Uma das primeiras variantes do SARS-CoV-2 a se destacar foi a variante D614G que surgiu na China no início da pandemia (122). Essa variante consiste em uma mutação pontual em um único nucleotídeo, o aminoácido 614, que substitui o aspartato (D) por uma glicina (G) na proteína S (123). Análises in vitro demonstraram que a mutação altera a conformação da proteína S (124,125). Alguns estudos verificaram maior infectividade da variante D614G ao ter alta prevalência na pandemia (126,127).

Hoje a OMS classifica as variantes em três categorias, sendo elas: Variantes sobre monitoramento (do inglês *Variants Under Monitoring* – VUM), Variantes de interesse (do inglês *Variant of Interest* - VOI) e Variantes de preocupação (do inglês *Variant of Concern* - VOC). Os critérios de classificação podem ser encontrados no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1 - Critério de classificação de variantes

ECDC critério em 29/06/2023	VUM	VOI	VOC
Alterações genéticas previstas/conhecidas por afetarem as características do vírus: transmissibilidade, virulência, evasão imunológica, terapêutica, detectabilidade. Força da evidência	SIM Pouco	SIM Fraco	SIM Alto
Vantagem de crescimento prevista na UE/EEE	Sim	Sim	Sim ²

² Quadro 1 continua na próxima página

Impacto epidemiológico previsto na UE/EEE (aumentos de casos ou outras medidas)	Não Claro	Possível	Provável
Avaliação de risco do ECDC a realizar	Não	Sim	Sim
A avaliação de risco: confirma com certeza moderada/alta qualquer um dos - Aumento da gravidade - Risco de comprometimento do sistema de saúde - Redução da eficácia da vacina	N/A	Não	Sim

Fonte: eCDC, (2023) (128).

As variantes do SARS-CoV-2 que causam preocupação são conhecidas como VOC, que podem estar associadas a maior transmissibilidade, severidade da doença e/ou evasão imunológica (129). Conhecer as variantes do SARS-CoV-2 em circulação por meio de monitoramento é importante para o controle da pandemia, rápida detecção de variantes e estratégias de vacinação (130). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Centro de Controle e Prevenção de Doenças Europeu (eCDC, do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), destacam que as principais VOCs são as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529) (121,131,132), conforme demonstrado no Quadro 2 abaixo.

Quadro 2 - Variantes de preocupação (VOCs) da COVID-19

Nomenclatura	Linhagem Pango	Linhagem GISAID/clade	Nextstrains clade	Primeira aparição	Data
Alpha	B.1.1.7	GRY (GR/501Y.V1)	20I/S:501Y.V1	Reino Unido 09/20	12/20
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H/S:501Y.V2	África do Sul 05/20	12/20
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J/S:501Y.V3	Brasil 11/20	01/21
Delta	B.1.617.2	G/452R.V3	21A/S:478K	Índia 10/20	VOI: 04/21 VOC: 05/21
Ômicron	B.1.1.529	B.1.1.529+BA	21k	África do Sul 11/21	11/21

Nota: GISAID, plataforma mundial de monitoramento de variantes do SARS-CoV-2. Nextstrain, projeto de código aberto para auxílio de produção científica, visa rastreamento em tempo real de patógenos.

Fonte: O autor (2024).

A variante Alfa foi detectada primeiramente no Reino Unido em setembro de 2020 e se tornou a variante dominante no país em poucos meses (133,134). A variante Alfa possui 23 mutações, dentre os quais está a substituição da asparagina (N) pela

tirosina (Y) no aminoácido 501 da região RBD da proteína S, sendo essa mutação denominada como N501Y (134). A mutação N501Y na região RBD aumenta a afinidade pelo da proteína S ao receptor ECA-2 das células hospedeiras (135). Além dessa mutação N501Y, a variante Alfa possui as alterações genéticas A570D, S982A, D1118H e deleções dos aminoácidos 69-70 e 144 na proteína S (119,134). Essa variante também se destaca pela maior transmissibilidade do vírus (133,134,136,137).

A variante Beta foi detectada originalmente na África do Sul (138,139) Assim como a variante Alfa, a variante Beta também apresenta a mutação N501Y. Além dessa alteração, a variante Beta possui as mutações K417N e E484K na proteína S (138). *In vitro*, foi demonstrado que a variante Beta apresenta alta estabilidade do complexo da proteína S com o ECA-2 (140).

A primeira vez que foi detectada a variante Delta do SARS-CoV-2 foi na Índia em outubro de 2020 (141). As principais mutações da variante Delta em relação à proteína S são L452R, T478K, D614G e P681R. A rápida disseminação da variante Delta do SARS-CoV-2 foi reportada em diversas regiões do mundo, incluindo Índia, França e Reino Unido (142–145). Em um estudo conduzido em 2021 por Campbell F, et al. (2021) estimou que a variante Delta se tornaria a variante dominante em circulação no próximo ano (121). Sheikh A, et al. (2021) também relataram que o risco de internação hospitalar por COVID-19 foi aproximadamente o dobro naqueles com a variante Delta em comparação com a variante Alfa (144). Além disso, alguns estudos recentes sugerem que a variante Delta pode escapar da proteção das vacinas existentes contra o SARS-CoV-2 (144,146,147). Sobre isso, Lopez B, et al. (2021) verificaram que a eficácia é menor nos grupos que receberam apenas uma dose da vacina em relação a infecções com a variante Delta em comparação com a variante Alfa (147). Entretanto, no grupo que recebeu as duas doses da vacina a diferença foi modesta, o que indica a importância de se aplicar as duas doses da vacina (147).

A variante Gamma do SARS-CoV-2 foi detectada primeiramente no Brasil, especificamente na cidade de Manaus em novembro de 2020 (148). Essa variante possui 17 alterações genéticas, incluindo as mutações K417T, E484K e N501Y na proteína S (130,148). Em um estudo realizado em Manaus, estimaram que a variante Gamma pode ser 1,7 a 2,4 vezes mais transmissível do que a linhagem local não-Gamma, além de ser capaz de evadir a resposta imune naqueles que já tinham sido infectados por outras linhagens do SARS-CoV-2 (148). No Brasil, a variante predominante era a Gamma até o final de 2021, passando para a Ômicron atualmente

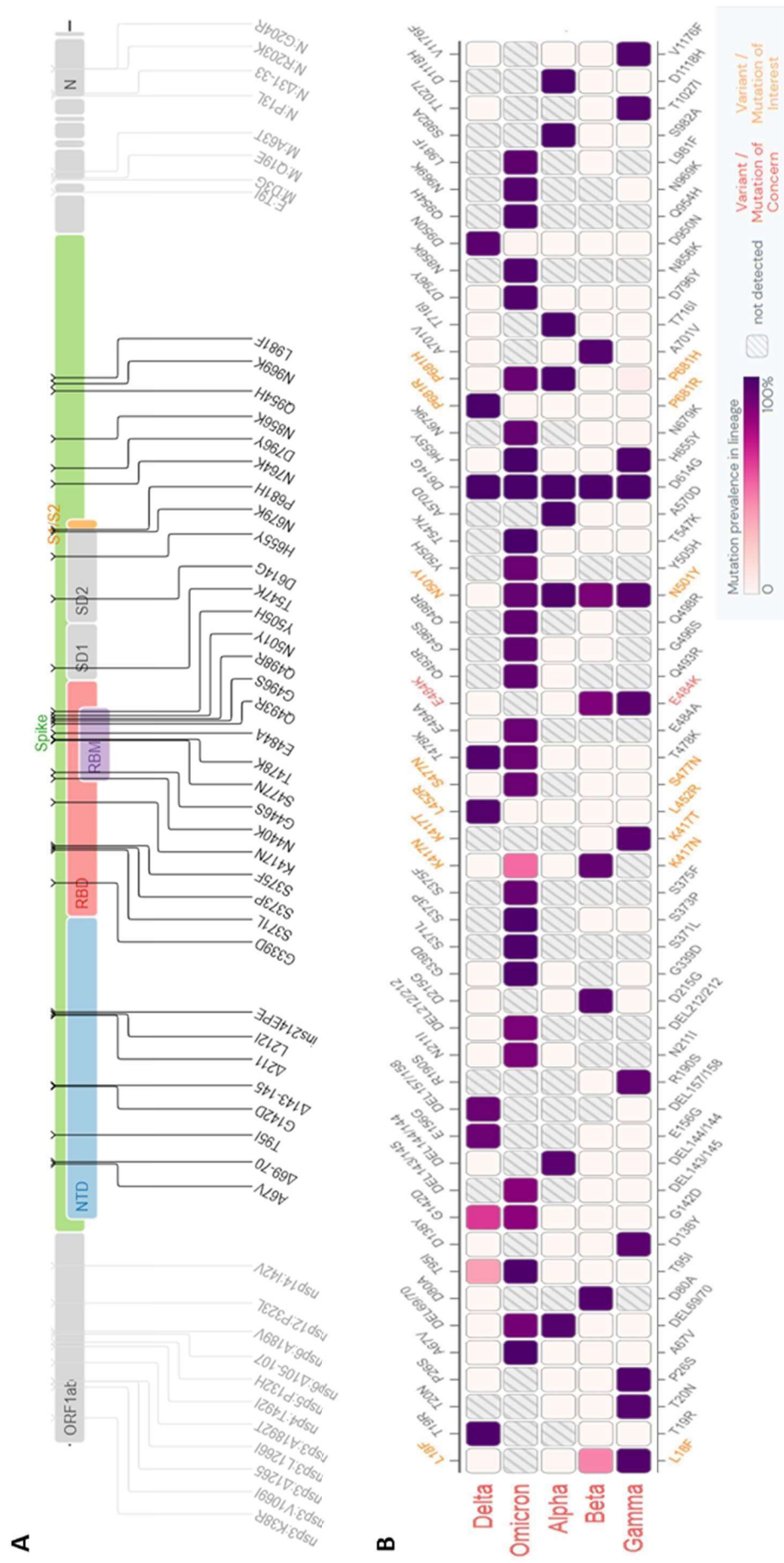
(130). De acordo com o eCDC, hoje a Ômicron representa mais de 98% das sequências publicamente disponíveis desde fevereiro de 2022, sendo que a estrutura genética da Ômicron é a base mais provável a partir da qual novas variações do vírus podem surgir (149).

A variante Ômicron do SARS-CoV-2, identificada inicialmente na África do Sul em novembro de 2021, representa uma evolução significativa na pandemia de COVID-19 (150). Esta variante se distingue por um número substancial de mutações, especialmente na proteína *Spike*, incluindo mais de 30 alterações, algumas das quais são inéditas em outras variantes preocupantes (150).

A Ômicron rapidamente tornou-se dominante em várias regiões do mundo, superando outras variantes, incluindo a Delta. Estudos iniciais indicaram que a Ômicron pode ser mais transmissível do que variantes anteriores, embora possa estar associada a uma menor gravidade dos sintomas em comparação com variantes anteriores, como a Delta (151). Contudo, a capacidade da Ômicron de causar infecções em pessoas previamente infectadas ou vacinadas sugere uma habilidade substancial de evasão imune (152).

Um aspecto particularmente desafiador da Ômicron é sua capacidade de evadir a imunidade induzida pelas vacinas existentes. Embora as vacinas continuem a oferecer proteção significativa contra doenças graves, sua eficácia contra a infecção e transmissão da variante Ômicron é reduzida (153). Isso levou a um esforço global para adaptar as vacinas COVID-19 às características únicas desta variante. A Figura 4 apresenta as principais mutações identificadas na proteína S nas variantes Alfa, Beta, Gamma, Delta e Ômicron do SARS-CoV-2.

Figura 4 – Mutações na proteína Spike (S)



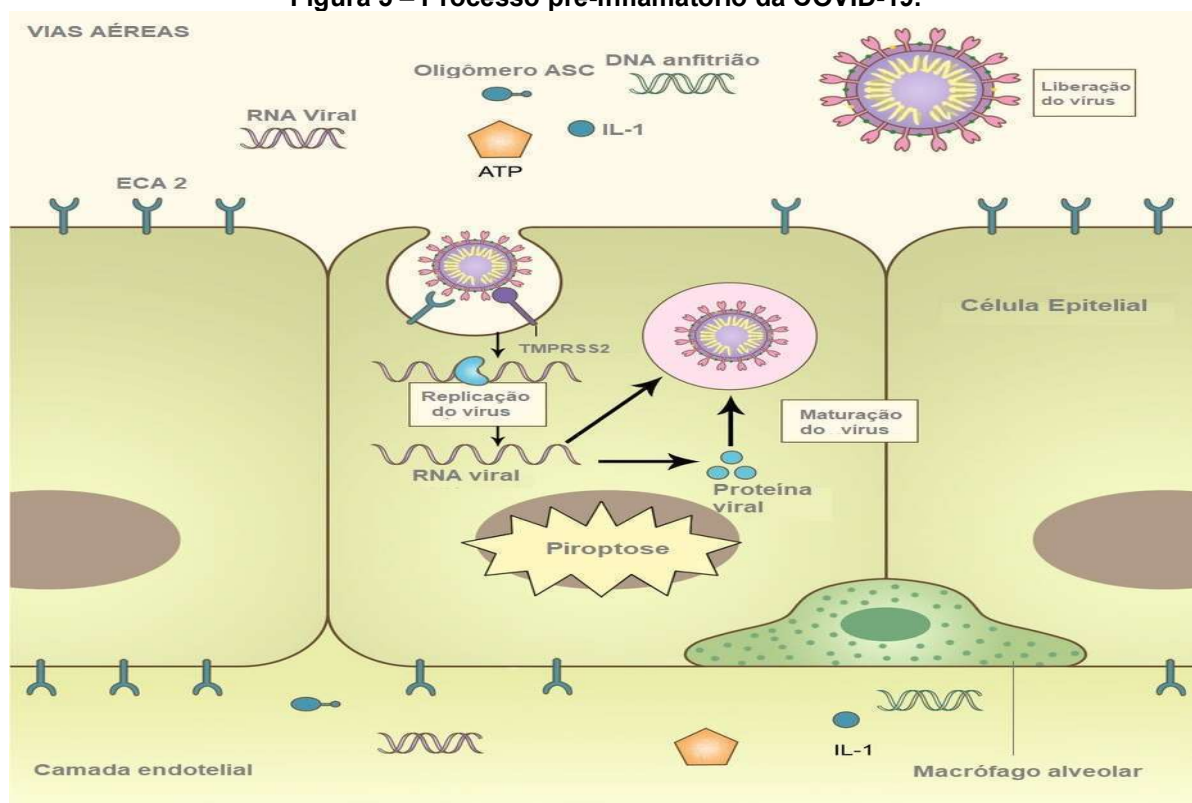
Nota: Modelo representativo das mutações que foram detectadas nas variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529) em relação à proteína S do vírus SARS-CoV-2. NTD, domínio N-terminal; RBD, receptor binding domain; RBM, receptor binding motif; FP, peptídeo de fusão; HR1 e HR2, repetição de heptapeptídeo 1 e 2; TM, domínio transmembrânico.

Fonte: Adaptado de COVID 19 *Data Portal Italy* (2021) (154).

2.3 PATOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19

Durante a piroptose, várias vias intracelulares são ativadas em resposta à infecção viral. Uma dessas vias envolve a ativação de caspases inflamatórias, como a caspase-1, que desempenham um papel central na mediação da morte celular. A ativação da caspase-1 leva à clivagem do gasdermin D, uma proteína que forma poros na membrana celular, resultando em rompimento celular e liberação de conteúdos citoplasmáticos (155). Os fatores inflamatórios liberados durante a piroptose incluem ATP, ácidos nucleicos e oligômeros do complexo de adaptação associado a apoptose de *speck-like* contendo CARD (ASC, do inglês *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*). Esses componentes são capazes de desencadear uma resposta imune robusta, recrutando células imunes para o local da infecção e potencializando a inflamação (156). A piroptose induzida por SARS-CoV-2 contribui significativamente para a patologia da COVID-19. A liberação massiva de mediadores inflamatórios pode levar à hiperinflamação, que está associada a casos graves da doença. Esta resposta hiperinflamatória é uma característica da tempestade de citocinas observada em alguns pacientes com COVID-19, que pode resultar em danos teciduais extensos e falência de órgãos (157). No processo de piroptose, a célula morre liberando fatores inflamatórios como ATP, ácidos nucleicos e oligômeros de ASC como evidenciado na Figura 5.

Figura 5 – Processo pré-inflamatório da COVID-19.



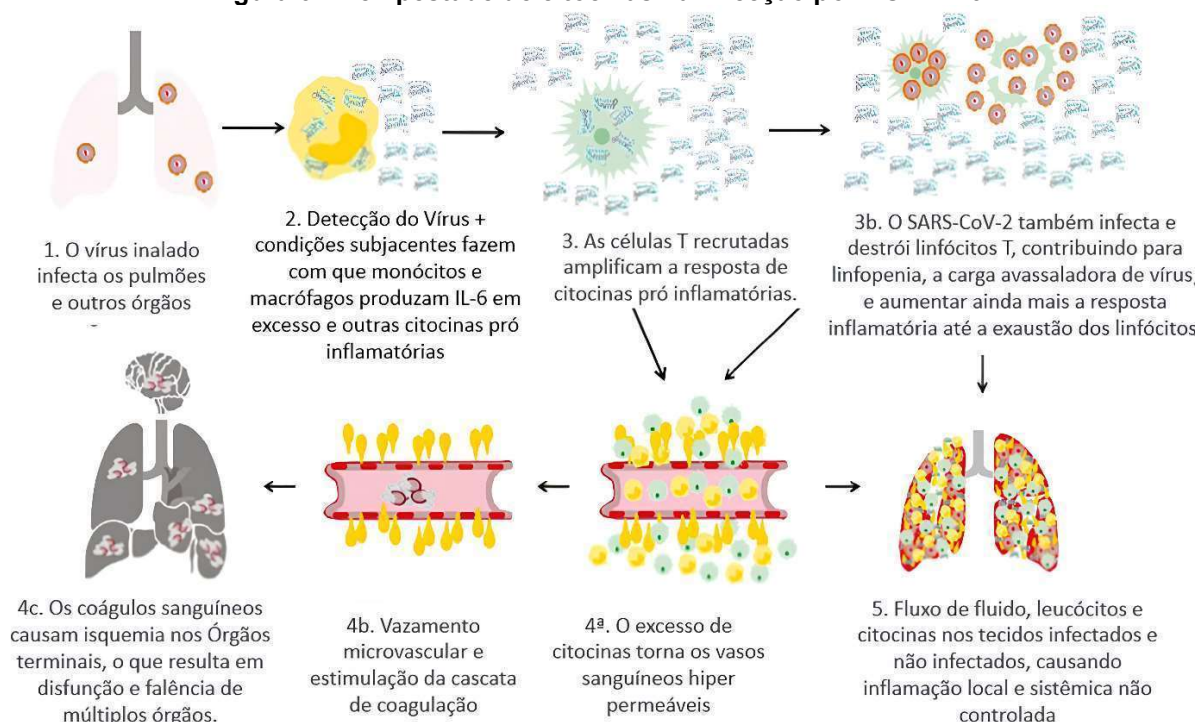
Nota: Representação esquemática do processo pré-inflamatório da COVID-19. Esta figura ilustra as etapas iniciais da resposta inflamatória desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2, incluindo a ativação de vias imunológicas, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o subsequente recrutamento de células imunes ao local da infecção.

Autor: Adaptado de Tay et al. (2020) (158).

A hiperinflamação resultante da tempestade de citocinas é um dos aspectos mais críticos e potencialmente letais da COVID-19. Esta resposta inflamatória exacerbada é caracterizada por uma elevação descontrolada de citocinas, que aumenta significativamente o risco de complicações graves, incluindo hiperpermeabilidade intravascular. Esta condição pode levar à falha de múltiplos órgãos e, em casos extremos, à morte do paciente (159). A tempestade de citocinas desencadeada pela COVID-19 não apenas causa uma resposta inflamatória intensa, mas também perturba a homeostase intravascular. Isso resulta em eventos de coagulação intravascular disseminada (CIVD, do inglês *Disseminated Intravascular Coagulation*), um grave distúrbio de coagulação caracterizado pela formação de coágulos sanguíneos em pequenos vasos em todo o corpo. Além disso, a ruptura dos capilares sanguíneos contribui para uma condição de lesão multiorgânica potencialmente fatal. Esta condição é especialmente perigosa porque pode levar a um ciclo vicioso de inflamação, dano tecidual e mais coagulação, exacerbando ainda mais

a gravidade da doença (160). A resposta imune à infecção pelo SARS-CoV-2 envolve a liberação de uma Gamma de moléculas pró-inflamatórias que desempenham um papel central na patogênese da COVID-19. As células epiteliais e endoteliais, juntamente com os macrófagos alveolares, desempenham um papel crucial nesse processo. Essas células respondem à presença do vírus reconhecendo as moléculas pró-inflamatórias e, em resposta, liberam uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo interleucina-6 (IL-6), interferon- γ -induzível 10 (IP10), proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP1 α), proteína inflamatória de macrófagos 1 β (MIP1 β) e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) (161). A acumulação excessiva e a ativação dessas células imunes podem resultar em uma resposta inflamatória sistêmica descontrolada, frequentemente referida como “tempestade de citocinas”. Esta tempestade de citocinas, pode ser evidenciada na Figura 6, sendo um fator chave no desenvolvimento de manifestações graves da COVID-19, levando a complicações como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e falência multiorgânica (162).

Figura 6 – Tempestade de citocinas na infecção por COVID-19.



Nota: A imagem ilustra a complexa rede de interações imunológicas desencadeadas pela infecção pelo SARS-CoV-2, enfatizando a progressiva liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células epiteliais, endoteliais e macrófagos alveolares. Destaca-se o papel das citocinas como IL-6, IP10, MIP1 α , MIP1 β e MCP1 no recrutamento de leucócitos para o local da infecção e na intensificação da resposta inflamatória, culminando na tempestade de citocinas, um estado de hiperinflamação crítica associado a complicações graves em pacientes com COVID-19.

Autor: Adaptado de Laes&Haes (2020) (163).

O trato respiratório é um dos principais sistemas afetados pela infecção pelo SARS-CoV-2. Dados da literatura demonstram a expressão de proteínas importantes para a infecção do SARS-CoV-2, como o ECA-2 e a TMPRSS2, em células epiteliais pulmonares, evidenciando o tropismo do vírus pelo trato respiratório (53,106). Nos casos graves da COVID-19, a infecção pelo SARS-CoV-2 pode levar ao estado de pneumonia e progredir para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS). Na COVID-19, pode ocorrer a insuficiência respiratória acompanhada por hipoxemia silenciosa, no qual os níveis de saturação de oxigênio estão criticamente baixos, porém, o paciente apresenta apenas leve desconforto respiratório e dispneia (164,165). A infecção por SARS-CoV-2 pode causar ainda uma intensa resposta inflamatória, também conhecida por hipercitocinemia ou tempestade de citocinas (164).

Outro efeito da COVID-19 é o dano endotelial acentuado, caracterizado pela perda da integridade da barreira endotelial e pela indução do estado pró-inflamatório, pró-coagulativo e da infiltração leucocitária (166). De fato, Tong M, et al. (2020) reportaram que os níveis de moléculas de adesão de células endoteliais (fractalcina; molécula de adesão de células vasculares-1, VCAM-1; molécula de adesão intercelular 1, ICAM-1; e proteína de adesão vascular-1, VAP-1) estavam elevados em pacientes com COVID-19 em casos moderados e mais ainda em casos severos (167). Esses dados indicam que a COVID-19 provoca inflamação no endotélio vascular.

Geralmente, os pacientes com COVID-19 com dano alveolar apresentam microangiopatia trombótica, que também é associada a disfunção endotelial (168). Não só isso, como pacientes com COVID-19 possuem maior risco de desenvolver coagulopatias e, conseqüentemente, tromboembolismos (169). Nesse panorama, esses pacientes geralmente apresentam estado de hipercoagulabilidade (170,171). Estudos clínicos demonstraram que pacientes com COVID-19 possuem níveis plasmáticos de dímero-D elevados (172,173). Além disso, o SARS-CoV-2 tem capacidade de se ligar ao receptor ECA-2 das plaquetas e promover a ativação plaquetária, o que pode contribuir para a formação de trombos (54).

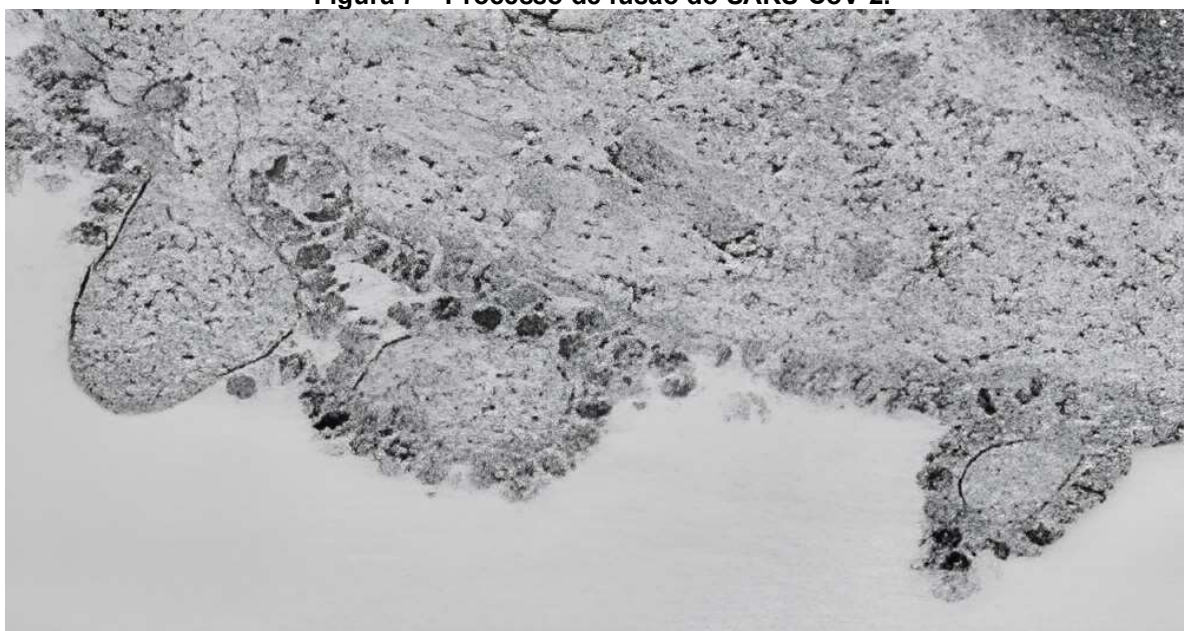
A COVID-19 pode estar relacionada a danos cardiovasculares. Estudos clínicos reportaram a presença de complicações cardíacas em pacientes com COVID-19, relacionadas também com o maior risco de mortalidade nesse grupo (174,175). Goyal et al. (2020), observaram que 18,5% entre os pacientes com COVID-19 que receberam ventilação mecânica invasiva apresentaram arritmias, enquanto foi apenas 1,9% entre os pacientes que utilizaram ventilação mecânica não-invasiva (176). Ao

analisar autópsias, Lindner et al. (2020), reportaram a detecção de SARS-CoV-2 no tecido cardíaco de 24 pacientes (61,5%), de uma coorte de 39 pacientes que faleceram com COVID-19 (177). Similarmente, outro estudo que avaliou autópsias, também encontrou a presença do vírus no coração de pacientes com COVID-19 (178). Esses dados sugerem que complicações cardíacas podem estar relacionadas ao estado grave de pacientes com COVID-19 (48).

2.4 SINTOMAS DA COVID-19

O contágio por COVID-19 ocorre principalmente por meio do contato entre o patógeno SARS-CoV-2 e as mucosas do trato respiratório. A transmissão do vírus pode acontecer de forma direta, de pessoa para pessoa, geralmente via gotículas respiratórias expelidas ao falar, tossir ou espirrar. A transmissão indireta também é possível, ocorrendo quando uma pessoa entra em contato com superfícies contaminadas pelo vírus e, em seguida, toca suas mucosas faciais. O SARS-CoV-2 tem demonstrado a capacidade de permanecer infectante em diferentes superfícies por vários dias, com a duração variando conforme o tipo de superfície (179). Após a infecção, há um período de incubação, que é o tempo entre a exposição ao vírus e o surgimento dos primeiros sintomas. Durante esta fase pré-sintomática, que dura em média de 2 a 5 dias, mas pode se estender até 14 dias, a patologia não apresenta manifestações clínicas evidentes. No entanto, o vírus está ativamente se multiplicando nos tecidos do hospedeiro, especialmente nas células do trato respiratório superior e inferior (180). Durante a fase de incubação e multiplicação viral, o SARS-CoV-2 penetra nas células hospedeiras por meio de um processo de fusão complexo, que é mediado pela interação da proteína *Spike* do vírus com o receptor ECA-2 na superfície das células. Este processo de fusão é crucial para a entrada do vírus nas células e início da replicação viral, conforme ilustrado na Figura 7 (181).

Figura 7 – Processo de fusão do SARS-CoV-2.



Nota: Etapas moleculares chave envolvidas na entrada do SARS-CoV-2 nas células humanas. Destaca-se a interação da proteína *Spike* do vírus com o receptor ECA-2 na superfície celular, seguida pela clivagem da proteína *Spike* e subsequente fusão do envelope viral com a membrana celular. Este processo permite a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira, iniciando a replicação viral.

Autor: Chhikara et al. (2020) (182).

Após a infecção pelo SARS-CoV-2, a apresentação clínica em indivíduos pode variar consideravelmente. Muitos indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos, enquanto outros desenvolvem sintomas que variam em gravidade. A fase assintomática da infecção é particularmente significativa do ponto de vista epidemiológico. Estudos recentes sugerem que, mesmo na ausência de sintomas, indivíduos infectados podem ser capazes de transmitir o vírus, embora a eficácia da transmissão possa ser menor em comparação com os indivíduos sintomáticos (183). Um fator crítico no desenvolvimento de casos graves de COVID-19, incluindo a síndrome respiratória aguda grave (SARS), é a idade. Dados mostram que a letalidade da COVID-19 aumenta significativamente com a idade. Em pacientes com menos de 50 anos, a taxa de letalidade é relativamente baixa, mas aumenta substancialmente em idades mais avançadas, especialmente em indivíduos com mais de 80 anos (184).

Além da idade, a presença de comorbidades é um importante fator de risco para o desenvolvimento de formas graves da doença. Doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias crônicas, hipertensão e câncer são algumas das condições que aumentam o risco de complicações graves da COVID-19. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) também identifica indivíduos com

mais de 65 anos e aqueles com certas condições de saúde subjacentes como parte do grupo de risco para a COVID-19 (131). Um estudo conduzido com 138 pacientes hospitalizados com COVID-19 revelou que os sintomas mais comuns incluem febre, fadiga, tosse seca, anorexia, mialgia e dispneia, como pode ser evidenciado na Tabela 2. Estes sintomas, embora frequentes, não são exclusivos da COVID-19, tornando o diagnóstico clínico desafiador, pois eles se sobrepõem aos de outras doenças respiratórias, como pneumonia e resfriado comum (3).

Tabela 2 – Frequência de sinais e sintomas apresentados por pacientes com COVID-19.

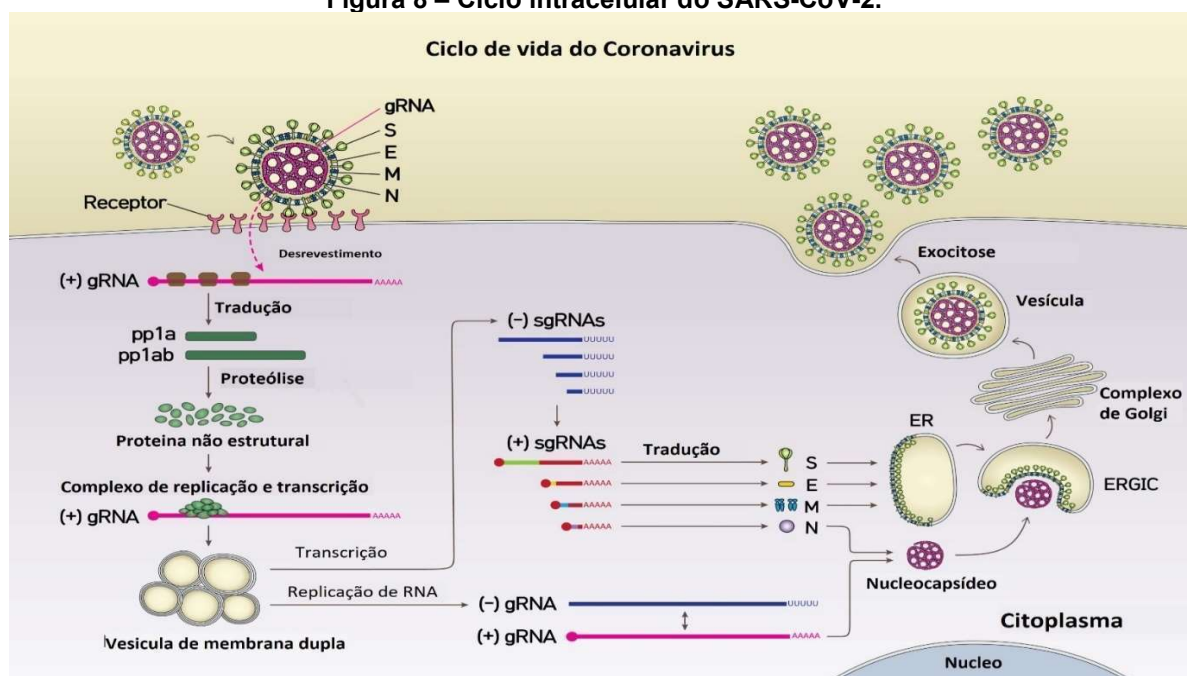
Sinais e sintomas	Total = 138 (%)	Internados em UTI (%)	Não internados em UTI (%)
Febre	136 (98.6)	36 (100.0)	100 (98.0)
Fadiga	96 (69.6)	29 (80.6)	67 (65.7)
Tosse seca	82 (59.4)	21 (58.3)	61 (59.8)
Anorexia	55 (39.9)	24 (66.7)	31 (30.4)
Mialgia	48 (34.8)	12 (33.3)	36 (35.3)
Dispneia	43 (31.2)	23 (63.9)	20 (19.9)
Expectoração	37 (26.8)	8 (22.2)	29 (28.4)
Faringalgia	24 (17.4)	12 (33.3)	12 (11.8)
Diarreia	14 (10.1)	6 (16.7)	8 (7.8)
Náusea	14 (10.1)	4 (11.1)	10 (9.8)
Tontura	13 (9.4)	8 (22.2)	5 (4.9)
Enxaqueca	9 (6.5)	3 (8.3)	6 (5.9)
Vômito	5 (3.6)	3 (8.3)	2 (2.0)
Dor abdominal	3 (2.2)	3 (8.3)	0 (0)

Nota: Esta tabela fornece uma representação visual da prevalência dos diversos sintomas clínicos observados em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Os dados são baseados em um estudo abrangente e incluem sintomas comuns como febre, tosse seca, fadiga, anorexia, mialgia e dispneia. A tabela destaca a variação nos sintomas apresentados, refletindo a diversidade clínica da COVID-19. Autor: Wang et al. (2020) (3).

Os sinais e sintomas mais característicos da forma grave de COVID-19, particularmente aqueles que necessitam de internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), incluem fadiga, dispneia, faringalgia, tontura e dor abdominal. Estes sintomas são indicativos de uma progressão mais séria da doença e exigem atenção médica imediata (162). No Brasil, o diagnóstico de COVID-19 é inicialmente baseado na avaliação clínica, mas deve ser confirmado por testes laboratoriais. A biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), é o padrão-ouro para o diagnóstico, enquanto os testes imunológicos, como os testes rápidos, são utilizados para detecção rápida de anticorpos (185).

Estudos recentes estão focados nas características anatomopatológicas da COVID-19 para identificar padrões nas lesões pulmonares. A identificação desses padrões pode permitir o uso da tomografia computadorizada como uma ferramenta diagnóstica eficaz para a COVID-19, especialmente em casos em que o teste RT-PCR não se encontra imediatamente disponível (186). O mecanismo de fusão do SARS-CoV-2 com as células hospedeiras é mediado pela interação entre a proteína *Spike* (S) do vírus e o receptor celular enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2). Esta enzima, que é uma proteína de membrana expressa em vários órgãos do corpo humano, identifica os tecidos que a expressam como vulneráveis à infecção pelo vírus, o ciclo intracelular pode ser visualizado na Figura 8. Além dos tecidos pulmonares, a ECA-2 também é expressa em tecidos cardíacos, renais e intestinais (187). A ECA-2 desempenha uma função fisiológica de proteção dos pulmões e do coração, ajudando a prevenir condições como a síndrome respiratória aguda grave, miocardites agudas e arritmias. No entanto, a fusão do SARS-CoV-2 com as células via ECA-2 pode inibir a ação fisiológica da enzima, aumentando os riscos de desenvolver complicações respiratórias e cardiovasculares graves (188).

Figura 8 – Ciclo intracelular do SARS-CoV-2.



Nota: Etapas do ciclo de vida do SARS-CoV-2 dentro de uma célula hospedeira, começando pela ligação da proteína *Spike* do vírus ao receptor ECA-2 na superfície celular. O diagrama ilustra a subsequente entrada do vírus na célula, a liberação e replicação do genoma viral, a montagem de novos virions e, finalmente, a liberação desses virions para infectar outras células. Este ciclo é fundamental para entender a replicação e a propagação do vírus, além de ser crucial para o desenvolvimento de terapêuticas antivirais.

Autor: Adaptado de Samaddar & Nag (2021) (189).

Uma complicação crítica da COVID-19, especialmente em pacientes com formas mais graves da doença, é a tempestade de citocinas, também conhecida como hipercitocinemias. Essa condição é definida como uma produção excessiva e descontrolada de citocinas inflamatórias. A tempestade de citocinas resulta de uma resposta imune hiperativa, onde há uma liberação massiva de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-Alfa (TNF- α) e interferon-Gamma (IFN- γ). Esta resposta exagerada pode levar a uma inflamação sistêmica severa e a danos em tecidos e órgãos (190). Além disso, pacientes com COVID-19 grave, frequentemente apresentam linfocitopenia, que é a diminuição no número de linfócitos no sangue. A linfocitopenia está associada com uma ativação maciça dos linfócitos, o que contribui para a patogênese da tempestade de citocinas. A perda de linfócitos efetores pode comprometer a capacidade do organismo de combater o vírus, enquanto a ativação excessiva de linfócitos pode contribuir para a resposta inflamatória descontrolada observada na tempestade de citocinas (162).

Os sintomas clínicos da COVID-19 são variáveis, podendo apresentar diferentes graus de severidade (191). Dessa forma, a COVID-19 pode variar de assintomática até causar casos graves de pneumonia, choque e disfunção orgânica (131,171,191). Os sintomas mais comuns da COVID-19 relatados são: febre, tosse e falta de ar. Também podem ocorrer perda do paladar ou olfato, dores musculares, dor de garganta, diarreia e dores de cabeça (131,171). Dentre as infecções de COVID-19, estima-se que 15% dos infectados precisam de suporte de oxigênio e 5% desenvolvem a forma mais grave da doença, com complicações que incluem falência respiratória, sepse, choque e disfunção orgânica (185). De acordo com Protocolo de Manejo Clínico da COVID-19 na Atenção Especializada, elaborado pelo Ministério da Saúde, a COVID-19 pode se manifestar como uma doença branda, com quadro compatível com infecção de vias aéreas superiores (192). Nesses casos, pode-se observar febre, tosse, dificuldade para respirar, dor na garganta, congestão nasal, cefaleia, mal-estar e mialgia (192). Entretanto, a COVID-19 pode apresentar pneumonia severa, na qual o protocolo de manejo clínico cita a observação das seguintes manifestações clínicas: presença de frequência respiratória de mais de 30 incursões por minuto, esforço respiratório severo, saturação periférica de oxigênio (SpO₂) menor que 93% em ar ambiente, cianose e até disfunção orgânica (192). O protocolo ainda cita que se pode apresentar a síndrome da angústia respiratória aguda

(SARA), no qual se pode também verificar a presença de edema pulmonar e alterações radiológicas, inclusive infiltrados, opacidades bilaterais, atelectasia lobar/pulmonar e nódulos (192). Fu et al. (2020), mostraram que os principais achados pulmonares em pacientes com COVID-19 por meio da tomografia computadorizada são opacidades do tipo vidro fosco e pneumonia bilateral (193).

A COVID-19 também pode levar ao quadro de sepse. Nesses casos, protocolo de manejo clínico cita a observação de sintomas relacionados à disfunção orgânica, tais como alteração do nível de consciência, oligúria, dispneia, baixa saturação de oxigênio, taquicardia, pulso débil, extremidades frias, coagulopatia, trombocitopenia, acidose, elevação do lactato sérico ou da bilirrubina (192). O quadro pode evoluir ainda para o choque séptico (192,194). A sepse em pacientes com COVID-19 pode levar à insuficiência renal aguda (194).

2.5 TRANSMISSÃO DA COVID-19

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre, principalmente, pela via respiratória (195). Dados da literatura indicam que partículas de SARS-CoV-2 podem ser encontradas em aerossóis e em amostras de ar exalado (196,197). Pacientes altamente infecciosos podem espalhar milhares de partículas virais por meio de gotículas e aerossóis liberados durante a respiração e a fala (198). Estudos demonstraram que é possível isolar o SARS-CoV-2 em amostras de ar provenientes de hospitais que tratavam pacientes com COVID-19 (197,199,200). Em contrapartida, medidas de distanciamento social e de uso de máscaras para a face têm se mostrado eficientes na prevenção da transmissão do SARS-CoV-2 (201–205).

2.6 PRESENÇA DO SARS-COV-2 EM SUPERFÍCIES E MATRIZES AMBIENTAIS

Os coronavírus, de forma geral, podem apresentar estabilidade no ambiente por longos períodos (179,206,207). A presença ambiental prolongada dos coronavírus pode ser um fator que aumenta a transmissibilidade. Porém, sua capacidade de infectar novos hospedeiros a partir do contato com essas superfícies ainda não está totalmente elucidada. Isso ressalta a importância de se conhecer a estabilidade do vírus SARS-CoV-2 em diferentes condições ambientais. Diversos fatores podem afetar a viabilidade do vírus no ambiente, como a temperatura, o que pode reduzir o risco de transmissão do SARS-CoV-2 em superfícies (208,209).

A estabilidade dos vírus em superfícies pode variar de algumas horas até dias. Assim como outros coronavírus, dados da literatura indicam que o SARS-CoV-2 tem estabilidade que depende do tipo de superfície no qual se encontra (179,206,207). O SARS-CoV, por exemplo, pode se manter estável por até 9 dias sobre o plástico (210). Além do tipo do material da superfície, a temperatura do ambiente pode influenciar o tempo de permanência do vírus. Van Doremalen et al. (2013), reportaram que o MERS-CoV permanece na superfície de plástico por 24 h na temperatura de 30 °C enquanto pode chegar até 48 h na temperatura de 20 °C (179).

Sobre o SARS-CoV-2, especificamente, Van Doremalen et al. (2020), demonstraram que o vírus se encontra viável e estável em superfícies de plástico e aço inoxidável por mais tempo do que em cobre e papelão. Nesse estudo, os autores verificaram que o SARS-CoV-2 pode permanecer estável por até 4 h no cobre, 24 h no papelão e 48 h no aço inoxidável. Dessa forma, é possível observar que a taxa de decaimento viral varia conforme a superfície analisada. O experimento foi conduzido por sete dias em temperatura entre 21 e 23 °C e umidade relativa de 40 %. Já em aerossóis, os autores observaram que as partículas virais permaneciam viáveis por 3 h, o tempo do experimento avaliado (211).

Outro estudo com o SARS-CoV-2 verificou que o vírus permaneceu viável por até um dia em material de tecido e de madeira. Já no vidro e nas cédulas de dinheiro, o vírus deixou de ser viável no quarto dia, enquanto no aço inoxidável e no plástico esse efeito ocorre só no sétimo dia. Além disso, os autores também verificaram a presença de SARS-CoV-2 viável na superfície externa de máscaras cirúrgicas por até sete dias. Não só isso, como o vírus apresentou estabilidade em condições de variação de pH (entre pH 3 e 10) na temperatura ambiente. Além disso, os autores reportaram que a temperatura afeta o tempo de viabilidade do SARS-CoV-2. Porém, o vírus foi susceptível aos métodos de desinfecção (212).

Para a remoção dos vírus em superfícies, é possível realizar a sua higienização com o uso de desinfetantes que levam a destruição de microrganismos (206). A limpeza é essencial para reduzir a carga viral ou mesmo eliminar a presença de patógenos. Dados da literatura indicam que a desinfecção de superfícies com hipoclorito de sódio a 0,1% ou etanol entre 62 e 71% por tempo de exposição equivalente a 1 min reduz de forma significativa a infectividade do coronavírus em superfícies (207). Esses dados reforçam a necessidade de limpeza frequente dos ambientes, tais como hospitais, consultórios, clínicas, restaurantes, entre outros. Além

disso, é importante evitar tocar nos olhos, boca ou nariz, especialmente após o contato com superfícies contaminadas. Portanto, a higienização de superfícies acompanhado do uso de máscaras, da higiene das mãos e do distanciamento social auxiliam na prevenção e disseminação de COVID-19, especialmente em ambientes fechados (131).

2.7 DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Para a controle da pandemia do COVID-19, é importante evitar que ocorra a transmissão do vírus SARS-CoV-2 (213). Dessa forma, torna-se essencial que o diagnóstico do COVID-19 seja rápido e preciso (214). Isso permite que sejam implementadas medidas de isolamento para evitar o espalhamento da doença e de se otimizar as medidas terapêuticas em relação ao paciente (215). Portanto, as ferramentas de diagnósticos são fundamentais para a vigilância do COVID-19.

No Brasil, as técnicas de diagnóstico de COVID-19 devem obter o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o seu uso comercial. Para se obter o registro, solicitam-se documentos da empresa e do produto que comprovem dados referentes à segurança, à qualidade e à eficácia. O registro de produtos para diagnóstico *in vitro* de COVID-19 regularizados pode ser consultado no site da ANVISA (216).

Atualmente, os principais métodos de diagnósticos aplicados a COVID-19 são os testes moleculares, os testes sorológicos e para detectar a evolução do quadro do paciente os exames de imagem são os de escolha, normalmente solicitados para casos mais graves da doença. Um desafio no diagnóstico da COVID-19 é a presença de pacientes assintomáticos ou com sintomas leves, que podem não ser detectados por métodos de triagem convencionais, mas ainda são capazes de transmitir o vírus (217).

2.7.1 Testes moleculares

O diagnóstico da COVID-19 pode ser determinado por testes moleculares. O teste molecular mais utilizado é a RT-qPCR (do inglês *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction*), também conhecido como RT-PCR em tempo real, que detecta a presença de sequências específicas do genoma viral em amostras (218).

A RT-qPCR é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de COVID-19, com alta sensibilidade e especificidade (218,219). A realização dos testes moleculares requer laboratórios adaptados para esse fim, equipamentos específicos e profissionais capacitados a sua realização (214). As análises de testes moleculares devem ser realizadas em laboratório de Biologia Molecular, com de nível de biossegurança II (NB2) (220). Além da COVID-19, os testes moleculares são utilizados para o diagnóstico de inúmeras doenças causadas por patógenos bacterianos, fúngicos, virais e parasitas (218).

A RT-qPCR utiliza amostras coletadas principalmente da nasofaringe com *swab*, que se assemelha a um cotonete longo. O *swab* é estéril e adequado para coletar amostra biológica da região nasal e faríngea. Além disso, pode-se coletar amostras da região orofaríngea e do trato respiratório inferior (214,221). As amostras coletadas devem ser identificadas, armazenadas e transportadas de forma correta e adequada para evitar a problemas que prejudiquem a realização e a interpretação do teste, tais como erro de identificação, degradação da amostra e contaminações externas (218).

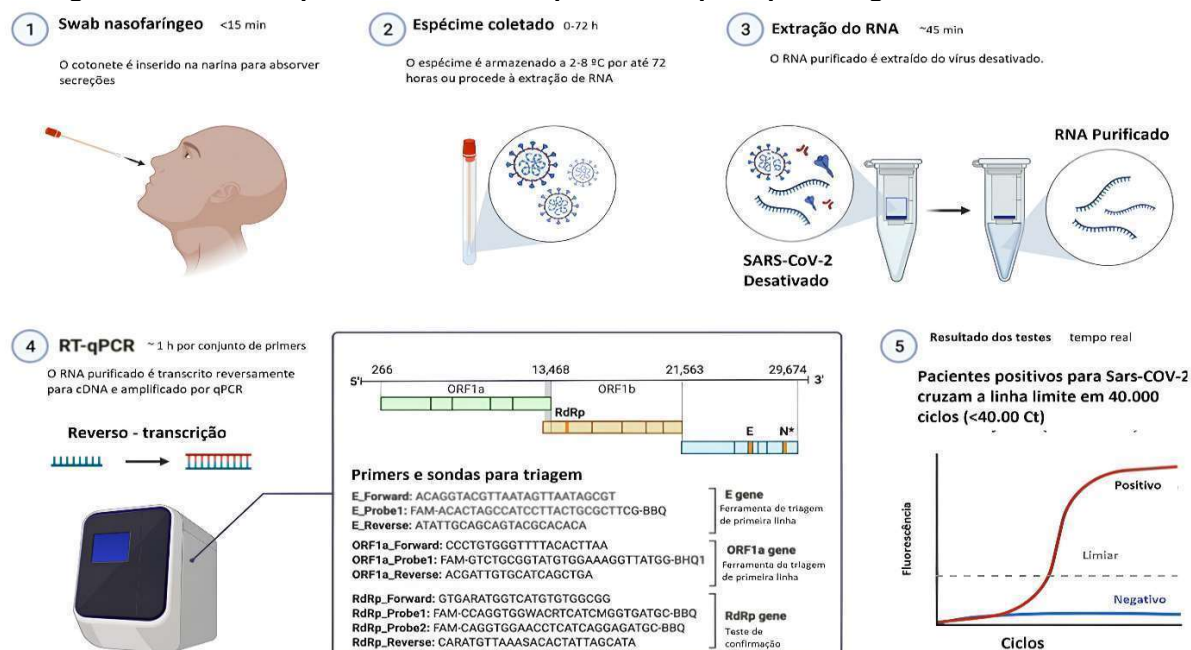
As amostras biológicas são submetidas à extração do RNA, ácido nucleico que compõe o genoma do SARS-CoV-2. Na sequência, aplica-se o método da RT-qPCR que basicamente consiste em duas etapas: a transcrição reversa (RT) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (218). A transcrição reversa compreende a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir da fita de RNA molde. Esse processo é mediado pela enzima transcriptase reversa. Em seguida, as amostras são submetidas à reação de cadeia de polimerase em tempo real, no qual ocorre a amplificação de fragmentos alvo a partir da atividade da enzima Taq DNA polimerase (218). Essas reações são realizadas em equipamentos denominados termocicladores.

A PCR em tempo real é realizada em ciclos, sendo que cada ciclo é composto em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, ocorre o aumento da temperatura para cerca de 95 °C que leva à separação da fita dupla de DNA. Em seguida, a temperatura é reduzida para o anelamento dos *primers*, também conhecidos como iniciadores. Geralmente, essa temperatura é de 60°C ou valores próximos. Nessa reação, utiliza-se *primers* específicos, desenhados para se anelar a uma região de interesse do cDNA que, no caso do diagnóstico da COVID-19, são regiões do genoma do SARS-CoV-2. Com o anelamento do *primer* a essas regiões de interesse, ocorre a etapa de extensão no qual a enzima Taq DNA polimerase

realiza a síntese de uma nova fita de DNA a partir do *primer* e da fita molde. Os ciclos se repetem por até quarenta vezes, resultando na amplificação do fragmento de interesse, caso esteja presente na amostra. Uma reação típica de RT-qPCR pode ter duração entre 45 e 90 min (218,222).

Na PCR em tempo real, a detecção da amplificação é realizada por meio de compostos fluorescentes intercalantes ao DNA dupla fita, como o SYBR *green*, ou com a utilização de sondas de hidrólise, como é o caso da sonda TaqMan. A Figura 9 exemplifica as etapas do teste molecular utilizando sondas de hidrólise. O uso de sondas permite identificar mais de uma região alvo ao mesmo tempo, em ensaios multiplex. Isso é possível porque pode-se aplicar diferentes fluoróforos para cada região analisada de forma concomitante. Os resultados são considerados positivos quando ocorre a amplificação de regiões do genoma do SARS-CoV-2, caso contrário, considera-se o resultado negativo (218). Também é necessário utilizar controles positivos e negativos nas reações de RT-qPCR para identificar possíveis problemas, como contaminações e reagentes não funcionais.

Figura 9 – Modelo representativo das etapas da RT-qPCR para diagnóstico da COVID-19



Nota: A primeira etapa consiste na coleta do material para análise, que geralmente é uma amostra da região da nasofaringe de casos suspeitos de COVID-19. Essa amostra é então submetida a extração de RNA que, na sequência, passa pelo processo de transcrição reversa (RT), formando cDNA. As regiões de interesse do genoma do SARS-CoV-2 são amplificadas a partir do cDNA da amostra com o uso de *primers* e sondas específicas. A amplificação pela RT-qPCR resulta na emissão de fluorescência que é detectada pelo equipamento de PCR em tempo real. Caso ocorra amplificação, considera-se o resultado positivo; caso contrário, considera-se negativo.

Fonte: Adaptado de Alanagreh (2020) (223).

Os testes moleculares por RT-qPCR são eficazes no período em que a carga viral é detectável, aproximadamente entre o terceiro e o décimo dia da infecção. Por isso, a RT-qPCR é o teste mais indicado a ser aplicado na fase aguda da doença (219). Dessa forma, um caso suspeito de COVID-19 pode apresentar resultados negativos por RT-qPCR devido à baixa carga viral, porém, não se descarta a possibilidade de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (219). Por essa razão, o diagnóstico baseia-se também na evolução clínica do paciente e em dados epidemiológicos (219,224). Além da baixa carga viral, falsos negativos podem ser decorrentes da degradação da amostra, de coleta inadequada e do incorreto armazenamento, transporte e manuseio das amostras (219,225).

O RT-LAMP (do inglês *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*), em português, é conhecido como “Amplificação Isotérmica Mediada por Alça de Transcrição Reversa” é outro teste molecular aplicado ao diagnóstico de COVID-19. Comparado ao RT-qPCR, o RT-LAMP também se baseia na amplificação do DNA; porém, utiliza um tempo menor e a temperatura é constante, o que permite o uso de equipamentos mais simples (226–228). O método do RT-LAMP apresenta alta sensibilidade e os resultados podem ser observados por leitura colorimétrica. O custo do RT-LAMP também é menor se comparado ao custo da RT-qPCR (227,228). Além disso, a técnica de LAMP ou RT-LAMP já foi desenvolvida para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, tais como o vírus da Dengue, Chikungunya, Zika, entre outros (229–231).

O RT-LAMP é formado por duas etapas: a RT, que faz a síntese do cDNA a partir do RNA presente na amostra, e a reação LAMP, que realiza a amplificação de regiões específicas do DNA em loop (227,228). O diferencial do LAMP é a amplificação do DNA em temperatura constante, também denominado como ambiente isotérmico, que geralmente ocorre na faixa entre 60 °C e 65 °C (232). Assim como outros testes moleculares, controles internos são necessários para identificar possíveis problemas e evitar que ocorram falsos positivos e falsos negativos (227).

A reação de LAMP utiliza uma DNA polimerase para a síntese de uma nova fita de DNA durante a amplificação, sendo comumente utilizada a enzima Bst DNA polimerase, que é termoestável e com alta atividade de replicação e de deslocamento de fita (233). Os *primers* utilizados na reação de LAMP são específicos e se anelam a região de interesse do DNA. Esses primers são desenhados para formar estruturas secundárias de grampios, conhecidos como *loops*. Geralmente, são desenhados

quatro ou seis *primers* para uma região de interesse. Dessa forma, são desenhados dois *primers* externos (*primer* externo *forward*, F3; e *primer* externo *reverse*, B3), dois *primers* internos (*primer* interno *forward*, FIP; e *primer* interno *reverse*, BIP), e de forma facultativa pode ter mais dois *primers* de *loop* (*primer* de *loop forward*, FLP; e *primer* de *loop reverse*, BLP) (232). Os *primers loops* ligam-se entre as regiões dos *primers* internos e externos e auxiliam a intensificar a reação e a reduzir o tempo de reação (232). Isso possibilita que novos pontos de iniciação sejam utilizados para a amplificação do DNA nos loops, acarretando aumento exponencial dos produtos de DNA formados. Com isso, a coloração que é dependente do pH e se altera. Assim, a leitura colorimétrica do resultado do teste é relativamente fácil, sem apresentar necessidade de instrumentos sofisticados (227). Além disso, alguns testes podem ainda combinar a extração do RNA, o RT e o LAMP em uma mesma reação (227). Lu R, et al. (2020), por exemplo, desenvolveram uma técnica de RT-LAMP para COVID-19 que utiliza *primers* que tem como alvo o gene que codifica a proteína N do SARS-CoV-2(215). Essa técnica permite avaliar os resultados por fluorescência em 30 min, sendo realizada em um equipamento de PCR real time, ou por método colorimétrico em 40 min, com a cor mudando de vermelho para amarelo. O limite de detecção, nesse caso, é de 118,6 cópias de RNA viral por 25 µL de reação (215).

Já o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*) permite conhecer o genoma completo do SARS-CoV-2. Em dezembro de 2019, o genoma do SARS-CoV-2 foi sequenciado pela primeira vez (14,234). O sequenciamento pode ser realizado por intermédio de diversos instrumentos disponíveis no mercado, tais como *Illumina*, *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) e *Ion Torrent* (235). Dessa forma, com o uso das técnicas de NGS é possível a identificação de mutações e de variantes do SARS-CoV-2, auxiliando a compreender aspectos evolutivos e epidemiológicos, além desses dados serem úteis no combate a pandemia (99,234–236). Entretanto, o NGS é uma técnica que utiliza equipamentos sofisticados e possui custo alto (234).

2.7.2 Testes sorológicos

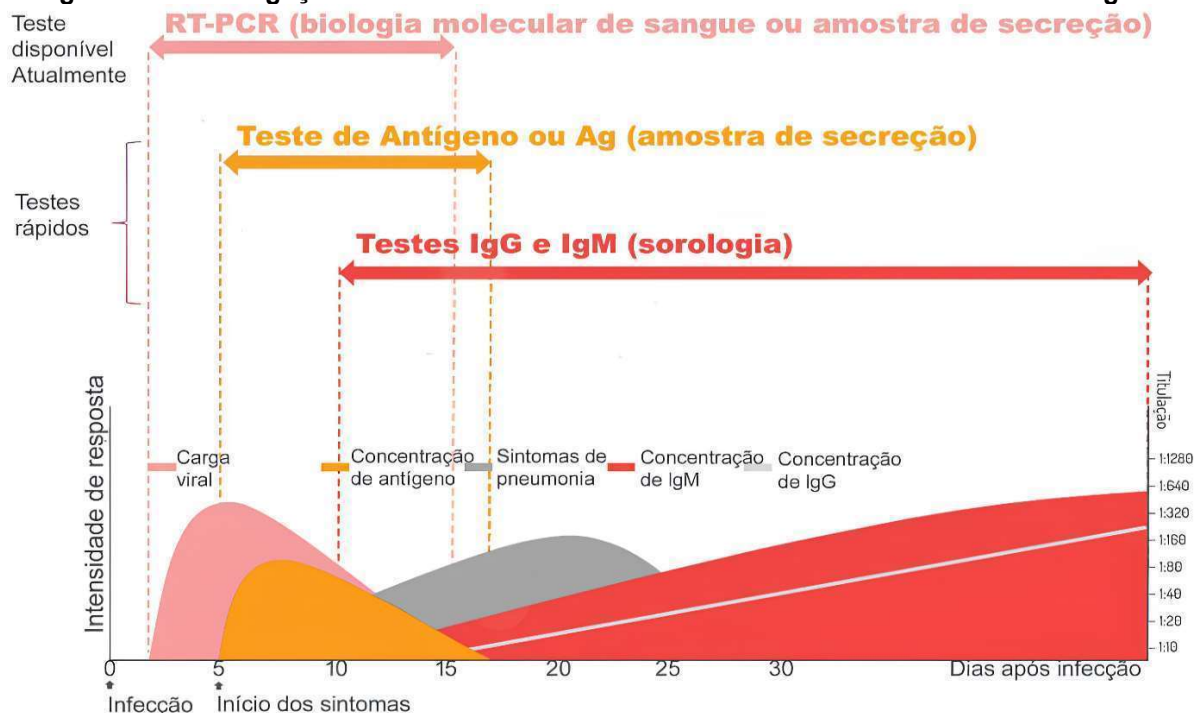
O diagnóstico da COVID-19 também pode ser realizado por testes sorológicos que tem como objetivo detectar a produção de anticorpos anti imunoglobulina G e anti imunoglobulina M (IgG e IgM) pelo organismo contra o agente infeccioso, o SARS-

CoV-2 (219). Basicamente, a resposta imunológica adaptativa do organismo frente à infecção do SARS-CoV-2 leva à produção de anticorpos do tipo IgM e, posteriormente, o IgG (237). Por isso, os testes sorológicos podem indicar se o indivíduo já teve contato com o vírus anteriormente. Os testes sorológicos podem ser realizados por meio do ELISA “Ensaio de Imunoabsorção Enzimática” (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) e ensaios imunocromatográficos (219).

A técnica de ELISA para a detecção dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 pode utilizar diversas abordagens. Uma das mais comuns é a imobilização de proteínas do SARS-CoV-2 em uma placa de ELISA, que interagem com os anticorpos IgG e IgM que foram produzidas pelo organismo contra essas proteínas. Dessa forma, segue-se para a detecção, com etapas de lavagens entre os passos para a remoção de materiais que não se ligaram. Geralmente, a técnica de ELISA utiliza revelação por métodos de sinalização enzimática ou quimioluminescente (238). Um exemplo de revelação por método colorimétrico é o uso da enzima HRP, peroxidase de raiz-forte (do inglês, *horseradish peroxidase*) que altera a cor da tetrametilbenzidina de azul para amarelo e pode ser submetido à leitura à 450 nm. Também pode-se utilizar técnicas que utilizam *beads* (esferas ou partículas) magnéticas. A análise do ELISA é realizada em ambiente laboratorial (238).

Já os testes imunocromatográficos, também conhecidos como testes rápidos, são relativamente simples de se aplicar e podem levar cerca de 15 min para se ter o resultado (196). Esses testes devem ser validados e proporcionar informações sobre a sensibilidade e especificidade, o que pode variar de fabricante para fabricante (219). Li et al. (2020), por exemplo, desenvolveram um teste imunocromatográfico que apresentou sensibilidade de 88,66% e especificidade de 90,63% (196). É importante verificar que a aplicação dos testes de diagnóstico, tanto os moleculares quanto os imunológicos, deve considerar o período da infecção, como se pode observar na Figura 10.

Figura 10 – Investigação laboratorial do coronavírus com testes moleculares e sorológicos



Nota: As técnicas moleculares que buscam identificar o material genético do SARS-CoV-2 são adequadas de serem aplicadas durante a fase aguda da COVID-19. Já os testes sorológicos que têm como objetivo identificar a presença de anticorpos IgM e IgG são recomendados de serem aplicados após o oitavo dia da infecção.

Autor: Brasil (2021) (239).

2.8 MEIO DE TRANSPORTE VIRAL (VTM)

O Meio de Transporte Viral (VTM, do inglês *Viral Transport Medium*) é um avanço essencial na virologia, desempenhando um papel crítico na coleta, no transporte e na conservação de amostras virais para fins de diagnóstico e pesquisa. A invenção do VTM superou um desafio central na virologia: como manter os vírus viáveis fora de seus hospedeiros naturais, humanos ou animais, assegurando a preservação das amostras para análises futuras (240).

Com o progresso da virologia clínica e da epidemiologia viral, tornou-se evidente a necessidade de um meio eficaz para o transporte de vírus. Antes da introdução do VTM, a coleta e a análise de amostras virais sofriam com a rápida degradação viral, levando frequentemente a diagnósticos errôneos e à perda de informações cruciais (241).

O VTM foi projetado para superar esses desafios, proporcionando um ambiente adequado para manter a integridade física e a infectividade dos vírus. Ele geralmente contém uma solução salina balanceada, substâncias tampão para estabilizar o pH. Agentes crioprotetores e nutrientes também podem ser adicionados para suportar a

viabilidade viral (242). O uso do VTM se mostrou crucial durante a pandemia de influenza H1N1 em 2009, desempenhando um papel vital na coleta e análise das amostras virais e auxiliando no monitoramento e controle do vírus. Na recente pandemia de COVID-19, a importância do VTM foi novamente destacada, facilitando a coleta eficaz de amostras do SARS-CoV-2 para testes de PCR e outros métodos diagnósticos (243).

A evolução e o aprimoramento contínuos do VTM refletem os avanços na virologia e no diagnóstico clínico. A capacidade de transportar amostras virais de forma eficiente e segura é essencial no controle de surtos de doenças infecciosas e no avanço da pesquisa virológica (244). A relevância do Meio de Transporte Viral (VTM) na virologia e na medicina diagnóstica é inquestionável. Essencial na coleta, transporte e armazenamento de amostras virais, o VTM desempenha um papel crucial na vigilância epidemiológica, no diagnóstico clínico e na pesquisa virológica, conforme destacado por (245). O VTM facilita a coleta eficiente de amostras virais, mantendo sua integridade e viabilidade. Essa preservação é vital para assegurar que os vírus se mantenham em condições apropriadas para análise laboratorial, permitindo diagnósticos precisos e viabilizando estudos epidemiológicos e virológicos significativos, como ressaltado por (241).

A formulação do VTM é estrategicamente desenvolvida para manter o equilíbrio osmótico e o pH, protegendo as amostras de contaminação bacteriana e fúngica. Esse aspecto é crucial, pois o manuseio e armazenamento inadequados das amostras virais podem resultar na degradação do material e em resultados de testes imprecisos (242). Durante a pandemia de COVID-19, a importância do VTM tornou-se ainda mais evidente devido à necessidade de testar muitas amostras para o SARS-CoV-2. O VTM permitiu a coleta segura e eficaz de amostras nasais e da garganta, facilitando seu transporte para laboratórios onde testes de PCR eram realizados, como indicado por (245).

Além disso, o VTM desempenha um papel importante na pesquisa, possibilitando o cultivo de vírus coletados em laboratório para estudos mais aprofundados. Isso é essencial para entender a biologia dos vírus, desenvolver vacinas e terapias antivirais, e preparar-se para responder a futuros surtos virais (243).

2.8.1 VTM – Coleta e extração

Durante a pandemia de COVID-19, a coleta de amostras em VTM tornou-se extremamente importante, dada a necessidade de testagem em massa para o rastreamento e controle da disseminação do vírus. O uso do VTM possibilitou a coleta segura e eficaz de muitas amostras, desempenhando um papel vital na resposta global à pandemia (246).

A coleta de amostras virais usando o Meio de Transporte Viral (VTM) no contexto da COVID-19 é um procedimento altamente especializado e crítico, com implicações diretas no diagnóstico, monitoramento e compreensão da pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Este procedimento assegura a coleta e o transporte adequados de amostras do vírus, mantendo sua integridade para análises posteriores, um aspecto essencial para a confiabilidade dos resultados dos testes (221). A técnica de coleta é um fator determinante para a eficácia do diagnóstico. A coleta inadequada pode levar a amostras insuficientes ou contaminadas, resultando em resultados falso-negativos, um desafio significativo na luta contra a pandemia. Por isso, a formação adequada dos profissionais de saúde na técnica correta de coleta é de suma importância (245). Para a COVID-19, as amostras são comumente coletadas do trato respiratório superior, usando *swabs* nasofaríngeos ou orofaríngeos. Esses *swabs* são inseridos nas cavidades nasais ou na garganta do paciente para coletar secreções potencialmente infectadas pelo vírus. Uma vez coletadas, as amostras são imediatamente colocadas em um tubo contendo VTM, que é formulado para preservar a viabilidade do vírus, mantendo o material genético viral para a realização de testes diagnósticos como o RT-PCR, uma prática que se provou crucial para o diagnóstico preciso da COVID-19 (247).

A extração do RNA viral a partir do Meio de Transporte Viral (VTM) é um procedimento crítico e detalhado na virologia molecular, desempenhando um papel essencial no contexto de doenças infecciosas como a COVID-19. Este processo é indispensável para a detecção e caracterização de vírus de RNA, como o SARS-CoV-2, e é fundamental no diagnóstico clínico, na vigilância epidemiológica e na pesquisa virológica (248). A extração de RNA envolve várias etapas técnicas que separam o RNA viral de outros componentes da amostra, como proteínas, lipídios e possíveis inibidores de PCR. O procedimento inicia-se com a lise das células e vírus presentes na amostra, um processo que libera o RNA viral. Após a lise, segue-se a etapa de

purificação, que inclui a remoção de contaminantes e a concentração do RNA. O RNA purificado é crucial para ensaios subsequentes, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético, que são fundamentais para o diagnóstico e a pesquisa virológica (249).

A eficiência e a integridade da extração de RNA são vitais para a precisão dos testes diagnósticos. Métodos de extração inadequados podem levar à degradação do RNA ou à presença de inibidores no processo de PCR, resultando em diagnósticos imprecisos, como resultados falso-negativos ou ambíguos, afetando assim a confiabilidade dos testes (250). Durante a pandemia de COVID-19, a extração eficiente de RNA do SARS-CoV-2 a partir de amostras em VTM mostrou-se crucial para o diagnóstico rápido e preciso da doença. Esta eficiência foi essencial para implementar medidas de controle e prevenção, além de auxiliar na identificação de mutações e variantes do vírus, contribuindo para o entendimento da evolução e disseminação do SARS-CoV-2 (243).

2.8.2 Extração e transcrição

A Transcrição Reversa seguida de PCR em Tempo Real (RT-PCR) tem sido essencial no diagnóstico e monitoramento da COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2. Essa técnica avançada envolve a conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), seguida por uma amplificação específica desse DNA por meio da PCR em tempo real, facilitando a detecção quantitativa e altamente sensível do vírus. Este processo tornou-se a base para o diagnóstico confiável e oportuno da COVID-19 (248).

No processo de RT-PCR em tempo real para COVID-19, a extração do RNA viral de amostras coletadas, geralmente por intermédio de *swabs* nasais ou da garganta, é o primeiro passo crítico. Uma vez extraído, o RNA é convertido em cDNA. A técnica de PCR em tempo real, então, amplifica seletivamente sequências específicas do cDNA, permitindo a identificação precisa do material genético do SARS-CoV-2. A utilização de sondas fluorescentes específicas é um aspecto crucial dessa técnica, pois permite a quantificação em tempo real da amplificação do DNA, fornecendo dados valiosos sobre a carga viral na amostra (221). A sensibilidade e especificidade do RT-PCR em tempo real são fundamentais para um diagnóstico preciso da COVID-19. Capaz de detectar quantidades mínimas de RNA viral, esta

técnica é extremamente eficaz nas fases iniciais da infecção, mesmo quando a carga viral é baixa. Além disso, a especificidade das sondas e *primers* utilizados assegura alta especificidade para o SARS-CoV-2, minimizando o risco de resultados falso-positivos e melhorando a confiabilidade do diagnóstico (222).

Durante a pandemia de COVID-19, o RT-PCR em tempo real emergiu como a pedra angular dos esforços de testagem, permitindo o diagnóstico rápido e preciso de casos. Esta técnica tem sido crucial não apenas para o diagnóstico individual, mas também para o monitoramento da disseminação do vírus, identificação de variantes e para informar estratégias de contenção e tratamento. A capacidade de rastrear a evolução do vírus por meio do RT-PCR tem sido vital na resposta global à pandemia (243).

2.9 PATENTES E NOVAS TECNOLOGIAS.

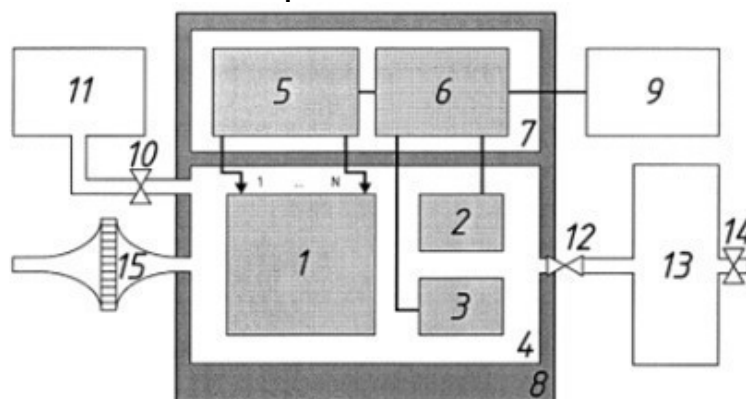
Um dos diferenciais da utilização do VTM modificado é sua possibilidade de detecção de forma ambiental de locais com provável contaminação pelo vírus da COVID-19. Desde o início da pandemia, diversos pesquisadores buscam, por meio de diferentes tecnologias, meios de se detectar o vírus do SARS-CoV-2 nos ambientes. Em uma pesquisa realizada em 07/12/2023, no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), e na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO), com a finalidade de levantar dados a respeito de dispositivos que possam realizar a detecção de vírus, revelou um panorama extenso de inovação no contexto da pandemia de COVID-19.

Foram catalogadas 187 patentes, abrangendo mais de 193 países. Utilizando descritores como “COVID-19”, “DETECÇÃO” e “DISPOSITIVOS”, em português e inglês, a pesquisa identificou registros em 11 países diferentes, com 29 patentes classificadas como patrimônio mundial. Durante o período pandêmico, observou-se um aumento significativo de mais de 18% no registro de patentes, destacando-se o continente asiático, particularmente a China. O país asiático registrou quase 3,6 milhões de solicitações de patentes, ultrapassando os Estados Unidos pela primeira vez, ilustrando a rápida mobilização da inovação em resposta à pandemia (251). Cerca de 70% das patentes identificadas relacionam-se a dispositivos eletrônicos, mas a pesquisa também destacou inovações em áreas como *softwares*, *kits* de diagnóstico, inteligência artificial e hardware. Interessantemente, apenas quatro dessas patentes referem-se a tecnologias para detecção de COVID-19 por meio da

análise do ar exalado pelos pacientes, e a que mais se assemelha com nossa corrente pesquisa utiliza sensores para medir alterações metabólicas como oxigênio, temperatura e CO₂, o que faz com que a sensibilidade e especificidade sejam questionadas, além do preço do dispositivo que, pelos projetos apresentados, deverá ser considerado um equipamento de médio preço em valores atualizados, conforme evidenciado na Figura 11.

Esses dispositivos representam uma abordagem inovadora e única no campo da detecção de COVID-19. Diferentemente das tecnologias existentes e patenteadas, um sistema que opere de forma passiva tende ser muito mais econômico, e a utilização concomitante com equipamentos de RT-PCR, amplamente disponível em todo o mundo, além de apresentar sensibilidade e especificidade superior aos mecanismos eletrônicos de detecção passiva, o torna particularmente promissor para aplicações futuras em diagnóstico e monitoramento das doenças respiratórias causadas por patógenos virais.

Figura 11 – Projeto apresentado ao registro de patentes de um dispositivo de detecção do ar exalado de pacientes com COVID-19



Nota: A invenção refere-se à detecção não invasiva de COVID-19 medindo parâmetros do meio gasoso exalado por uma pessoa submetida a exame. O presente método é realizado utilizando um dispositivo (8) contendo uma célula sensor de gás (4) para análise do ar exalado. A célula compreende um conjunto (1) de sensores de gases com diferentes mecanismos de resposta, um sensor de temperatura do ar (2), um sensor de umidade do ar (3), uma unidade de medição (5), um microprocessador (6) e um meio de coleta e alimentando ar na célula. O ar exalado é alimentado na célula. A temperatura e a umidade do ar são medidas. A temperatura dos sensores é alterada. Um pulso de tensão é aplicado aos eletrodos dos sensores de gás. Os parâmetros de resposta de cada sensor são medidos. A probabilidade de a pessoa submetida ao exame ter doença por coronavírus é determinada pela análise dos valores médios de resposta do sensor de acordo com um classificador produzido usando medições de resposta do sensor de amostras saudáveis e pessoas infectadas. O resultado é a rápida detecção de COVID-19, que pode ser usado em sistemas de teste para triagem diária de indivíduos em locais lotados com resultados de medição altamente precisos devido a uma resposta não correlacionada de sensores individuais em uma matriz, proporcionando assim máxima eficácia em um tempo mínimo de análise.

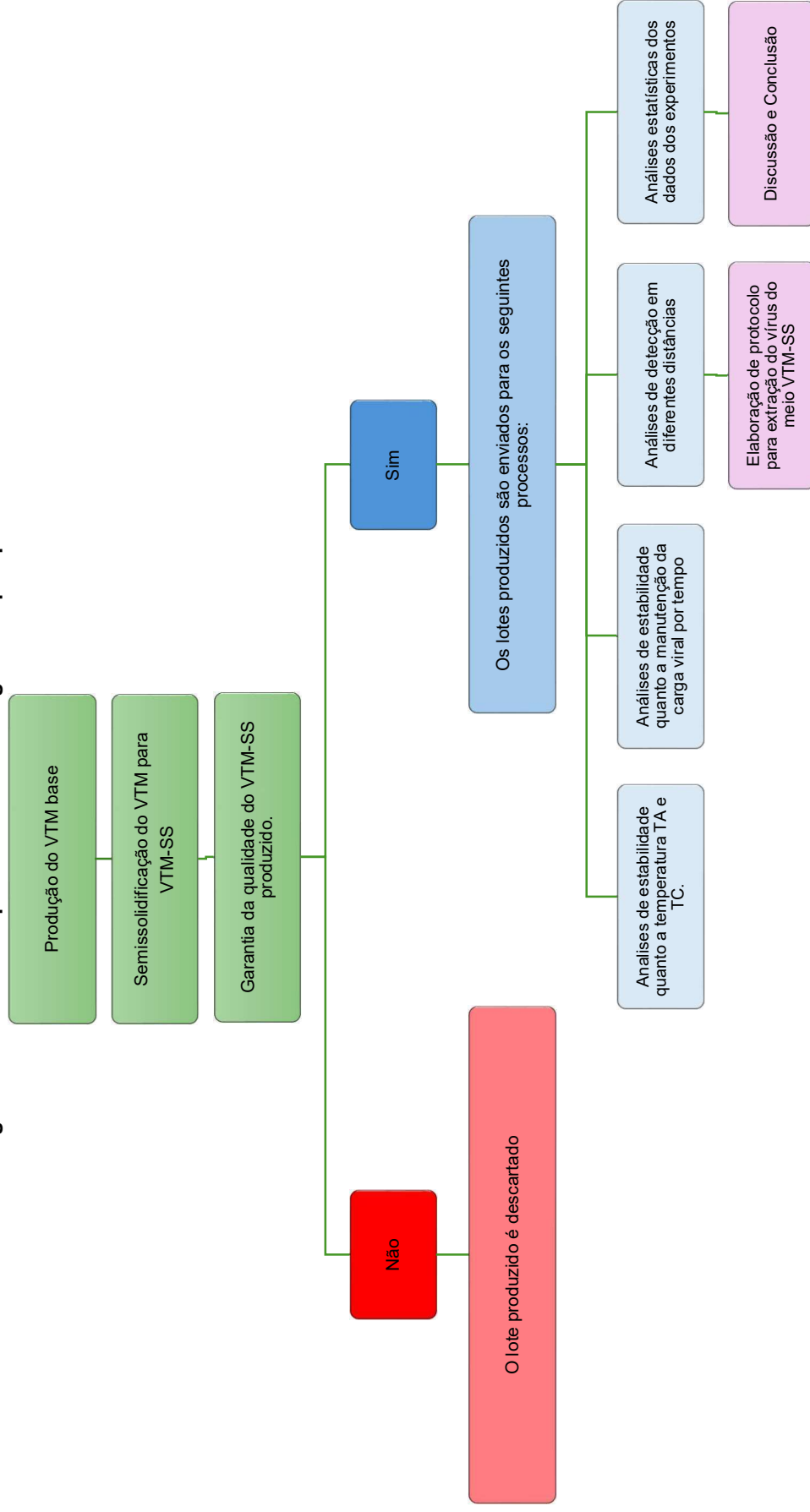
Autor: Anisimov (2023) (252).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MEIO DE COLETA E TRANSPORTE PARA O VÍRUS SARS-COV-2.

O desenvolvimento e validação de um meio de coleta e transporte viral (VTM) para o SARS-CoV-2 é fundamental para garantir a eficácia na detecção e manejo do vírus. A estabilidade do vírus durante o transporte é crucial para a precisão dos testes diagnósticos. Smith et al. (2020), demonstraram que a escolha do meio de transporte pode afetar significativamente a estabilidade viral. Eles sugerem que meios com tampão de fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered Saline*) mantêm a integridade viral melhor do que aqueles baseados em solução salina (253). Além disso, a validação do meio de transporte requer a verificação da inativação viral sem comprometer a integridade do material genético viral. Welch et al. (2021), desenvolveram um meio que utiliza agentes inativantes virais, mantendo a integridade do RNA para posterior PCR. Este estudo destacou a importância de equilibrar a segurança na manipulação das amostras com a eficácia na detecção do vírus (254). Em síntese, o desenvolvimento de um meio de coleta e transporte eficaz para o SARS-CoV-2 é um processo multifacetado que exige consideração da composição do meio, inativação viral, integridade do RNA e logística de transporte. Tais avanços são essenciais para aprimorar as estratégias de diagnóstico e contenção da COVID-19. A produção do Meio de Transporte Viral Semissólido (aqui denominado como VTM-SS) é o primeiro passo para a elaboração de novas tecnologias adaptáveis para sensoriamento ambiental. O Diagrama 1 ilustra o fluxo de processos dos experimentos e análises realizados.

Diagrama 1 – Fluxo dos processos metodológicos da pesquisa e suas conclusões



Nota: Fase I (verde) procedimentos de produção do VTM e semissolidificação. Nesta fase, realizou-se os testes de Controle de Qualidade (CQ), o que leva à Fase Ia (vermelho) em caso da avaliação da presença de contaminantes no material produzido (descarte) ou Fase Ib (azul) aceitação do material produzido. Na Fase II (azul claro), ocorreu realização dos experimentos objetivos. Na Fase II (roxa), aproveitou-se os dados obtidos para elaboração de protocolos e análise final dos resultados.
 Fonte: O autor (2024).

3.1.1 Preparo do Meio de Transporte Viral (VTM) e suas modificações

O VTM é um meio destinado ao transporte e manutenção de amostras virais. É composto por tubos cônicos livres de RNase e DNase, sais de fosfato e sódio (para a manutenção do pH), açúcares (ajudam a manter a viabilidade das células presentes na amostra), espessante (crioprotetor), indicador de pH visual.

Para a produção do VTM, utilizamos uma formulação modificada do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) (255), procedendo da seguinte forma:

3.1.1.1 Preparação dos ingredientes para o Meio de Transporte Viral (VTM)

Inativação do Soro Fetal Bovino - SFB: Uma garrafa de 500 ml de soro fetal bovino (SFB) foi descongelada, seguindo as recomendações do fabricante para descongelamento e armazenamento. O SFB foi inativado termicamente a 56 °C por 30 min em um banho-maria a $56,0 \pm 1,0$ °C. As informações de lote e preparação foram registradas em um caderno controlado.

3.1.1.2 Preparação do Meio de Transporte Viral (VTM)

Limpeza e desinfecção das superfícies de trabalho: A superfície de trabalho (câmara de fluxo laminar) foi limpa com desinfetante apropriado, submetida a radiação UV por no mínimo 15 min, e os frascos de reagentes foram desinfetados antes de serem colocados na superfície de trabalho.

Preparação do reagente: Em uma garrafa de 500 ml de Solução Salina Balanceada de *Hank* (HBSS) estéril, o lacre plástico foi removido e a tampa afrouxada. Usando pipetas estéreis, foi adicionado 10 ml do SFB inativado. O meio preparado foi devidamente rotulado, e armazenado de 2 a 8 °C até a sua utilização. Alíquotas de 3 ml em tubos cônicos foram feitas para fins de controle de qualidade. O pH foi ajustado para $7,3 \pm 0,2$ a 25°C.

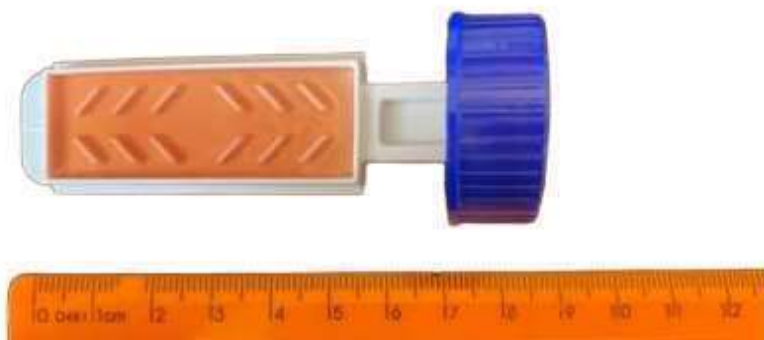
3.1.1.3 Preparação do Meio de Transporte Viral Semissólido (VTM-SS)

A preparação das placas de Petri e dos dispositivos para exposição ambiente (baseados no projeto das placas de Uritest® plate) com o Meio de Transporte Viral (VTM) semissólido ocorreu da seguinte forma: A solução de VTM previamente

produzida foi aliquoteada em um Erlenmeyer dentro de uma câmara de fluxo laminar, previamente higienizada com solução de álcool 70% e exposição à radiação UV por no mínimo 15 min, sendo adicionada de 3 g/L de ágar base (calculado conforme a quantidade de placas/dispositivos a serem produzidos). O ágar foi aquecido até sua dissolução completa, obedecendo o menor tempo possível até o ponto de ebulição (aproximadamente 88 °C). Após, aguardou-se o resfriamento até por volta de 50 °C, neste ponto o volume também foi avaliado e se necessário a solução final corrigida com adição de mais reagentes.

Após, procedeu-se com a autoclavagem a 121 °C por 20 min, tomando cuidado para não fechar completamente o Erlenmeyer (vedação). Após o resfriamento passivo da autoclave, o Meio de Transporte Viral (VTM) com sua formulação original modificada, foi distribuído em placas de Petri (20 ml por placa) ou dispositivos plásticos baseados em Uritest® Plate na proporção de 4 ml cada lado com uma pipeta volumétrica de vidro (20 ml) limpa e esterilizada por autoclavagem. A denominação semissólida deu-se por conta da adição de até 0,35% de ágar base na solução final (256). A Figura 12 ilustra um exemplo de um dispositivo baseado em uma carcaça amplamente utilizada no meio laboratorial (Uritest® Plate), que confere ao meio nele armazenado, esterilidade do local de produção até o local de utilização, bastando ao operador abri-lo no local de interesse, por um simples procedimento de desrosquear sua tampa. Porém, suas aplicações são muito mais amplas do que isso, podendo ser desenvolvidos outros projetos capazes a se adaptar a diferentes modelos de interesse.

Figura 12 – Dispositivo adaptado com VTM-SS para captação de vírus do ambiente



Nota: Foram utilizados dispositivos plásticos para acoplamento do meio VTM-SS provenientes de tecnologias já existentes em outros meios de cultura. Muito comumente encontrado em kits de identificação bacteriana em amostras de urina Uritest® Plate.

Fonte: O autor (2024).

3.1.1.4 Controle de qualidade do VTM base

Verificação de esterilidade das alíquotas de VTM: Os tubos foram examinados no dia seguinte para verificação do crescimento de contaminantes. A norma CLSI M40-A2 foi consultada para procedimentos de controle de qualidade para avaliar a mídia para integridade de recuperação viral, conforme requisitos dos sistemas de qualidade de laboratório (257). Um controle de contaminação também foi realizado adicionando-se 100 µL do meio preparado a um ágar sangue que foi incubado por 48 horas a 37°C ±2°C. Ao final, avaliado crescimento bacteriano.

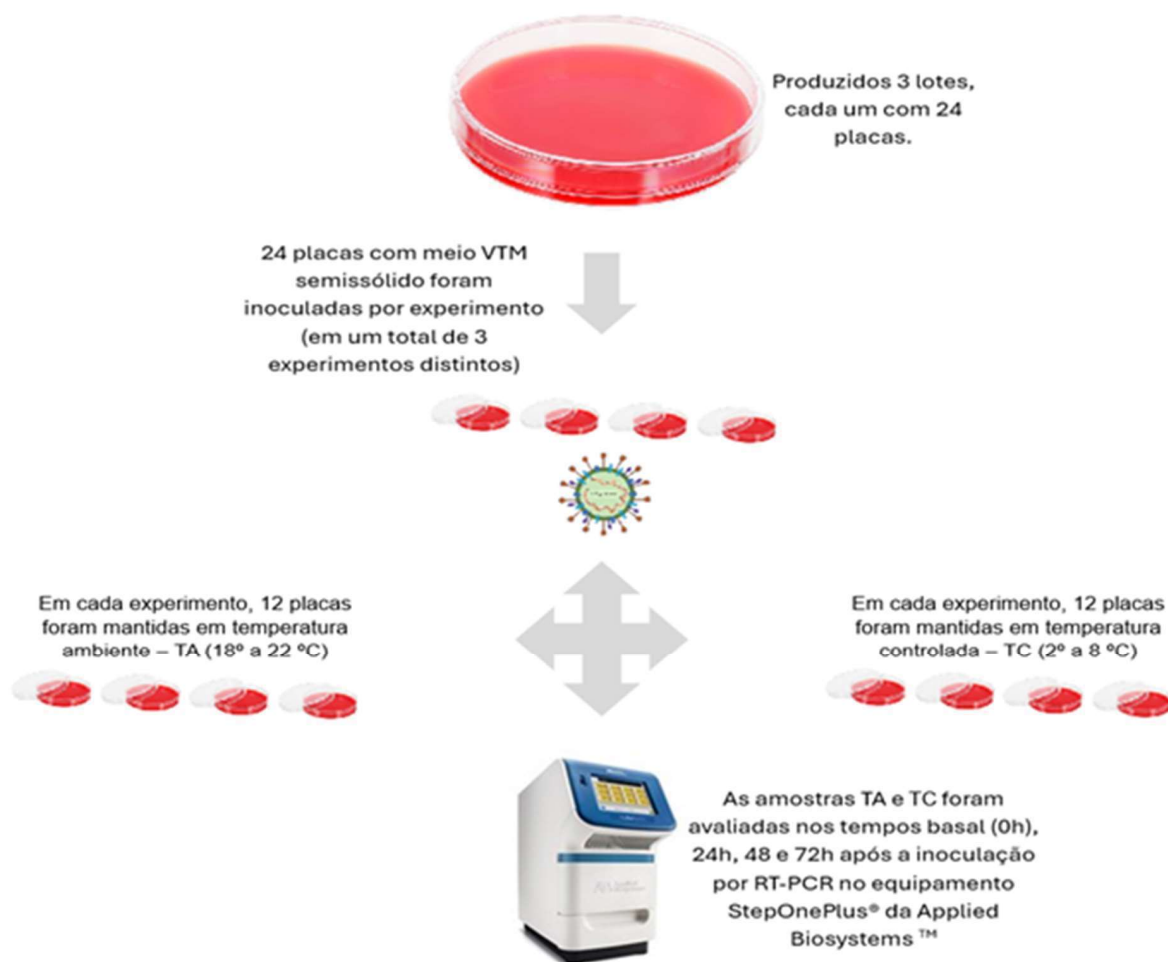
3.1.1.5 Controle de qualidade do VTM semissólido.

Verificação de esterilidade do VTM semissólido: Uma das placas de Petri semissólidas produzidas foi incubada por 48 h a 37 ± 2 °C, com verificações diárias do crescimento. Os resultados da verificação de esterilidade (crescimento ou não crescimento) foram anotados em documentos internos do laboratório para registro da qualidade. Em caso de crescimento bacteriano observado ou mudança na coloração, ações apropriadas de acompanhamento foram tomadas para remover a garrafa do meio e todas as alíquotas do serviço, e o meio foi descartado apropriadamente em lixo biológico.

3.1.2 Avaliação do VTM semissólido

Após a produção do VTM-SS, o mesmo foi disposto em 24 placas de Petri, as quais foram divididas da seguinte maneira: 12 placas para testagem em temperatura ambiente (2 a 8 °C), e 12 placas para testagem em temperatura controlada (18 a 22 °C). Este procedimento foi realizado 3 vezes em momentos distintos, produzindo assim 3 lotes. A produção total foi de 72 placas, excluindo-se os controles negativos. Após, os VTM-SS foram intencionalmente inoculados com controles positivos fornecidos pelo kit diagnóstico do RT-PCR da QIAprep&® (QIAGEN™) a partir de fricção por um *swab* contaminado. Posteriormente, foram mantidas a temperatura ambiente (18 °C a 22 °C) (12 placas por lote) e em temperatura controlada (2 °C a 8 °C) (12 placas por lote), sendo analisados nos tempos basal (0 h), 24 h, 48 h e 72 h. Foram performados três experimentos em momentos diferentes (3 lotes de produção distintas). A realização dos testes em temperatura ambiente e controlada ocorreu simultaneamente, conforme processo ilustrativo da Figura 13.

Figura 13 – Esquema ilustrativo validação do VTM-SS



Nota: Foram realizados três experimentos distintos, cada um com avaliação de temperatura (ambiente e controlada) e tempo (basal 0h, 24h, 48h e 72h após). Cada experimento contou com 12 amostras testadas em cada grupo de temperatura juntamente com seu controle negativo. Os controles positivos inoculados através de fricção do swab/salina foram retirados diretamente do kit diagnóstico QIAprep&® e calibrados através de diluições para uma positividade de CT 18 (*Cycle Threshold*).
Fonte: O autor (2024).

3.1.3 Protocolo de coleta da amostra no VTM semissólido

A coleta do material para análise proveniente do VTM-SS, foi realizada através da fricção de um *swab* estéril não vegetal (Rayon) umedecido em salina para facilitar a coleta do material, sob a área escolhida da placa de Petri e colocado em um tubo do tipo *Eppendorf*® com 1 ml da mesma solução, que foi agitado por 1 min em um agitador de bancada. O esquema ilustrativo da Figura 14 representa como foi realizado o processo.

Figura 14 - Esquema ilustrativo do protocolo de extração da amostra do VTM-SS



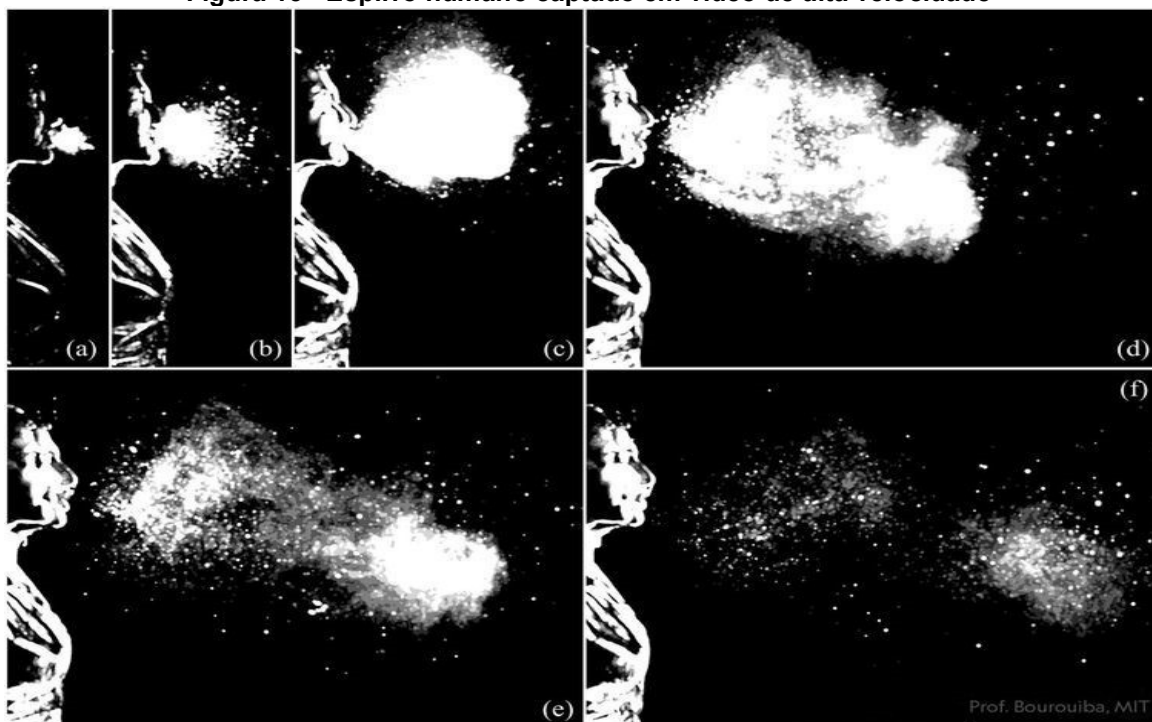
Nota: A utilização da solução salina 0,9 % para o pré-preparo da amostra antes da pipetagem com o kit de diagnóstico, leva em conta os protocolos internos do laboratório validados e aprovados. A substituição por HBSS ou até mesmo o meio VTM líquido possivelmente não implicará na qualidade dos resultados, visto que são protocolos utilizados por outros laboratórios e validados.
Fonte: O autor (2024).

Após este período, foi realizada a extração do meio seguindo a bula do *kit* QIAprep&®. Essa metodologia auxiliou a realizar uma extração rápida diretamente do tubo de ensaio. Após essa etapa, ocorreu a verificação do RNA viral por meio da análise por reação de cadeia de polimerase em tempo real de RT-PCR pelo equipamento *StepOnePlus®* da *Applied Biosystems™*. É importante ressaltar que o VTM-SS tem a capacidade de capturar os diversos vírus presentes no ambiente, não sendo seletivo apenas ao SARS-CoV-2. A partir das amostras coletadas e mantidas no VTM-SS, foi realizado o RT-PCR com *primers* específicos para as regiões de interesse do genoma do vírus do SARS-CoV-2.

3.1.4 Exposição ambiental com VTM Semissólido

As amostras foram inoculadas no VTM-SS em um ambiente controlado, replicando a dispersão de gotículas através de um aerógrafo, para simular um espirro humano em condições laboratoriais. A experimentação foi conduzida em uma capela de fluxo laminar, onde o aerógrafo foi carregado com 1 ml de solução salina 0,9% acrescida de controle positivo para SARS-CoV-2 e calibrada para o CT (do inglês *Cycle Threshold*) 18. A distância de dispersão das gotículas foi variada em intervalos de 10, 50, 100, 150 e 200 cm. Para simular a dinâmica de um espirro humano em relação ao COVID-19, a velocidade de expulsão das gotículas foi ajustada para cerca de 180 km/h (258,259) e pode ser visualizada na Figura 15.

Figura 15 - Espirro humano captado em vídeo de alta velocidade



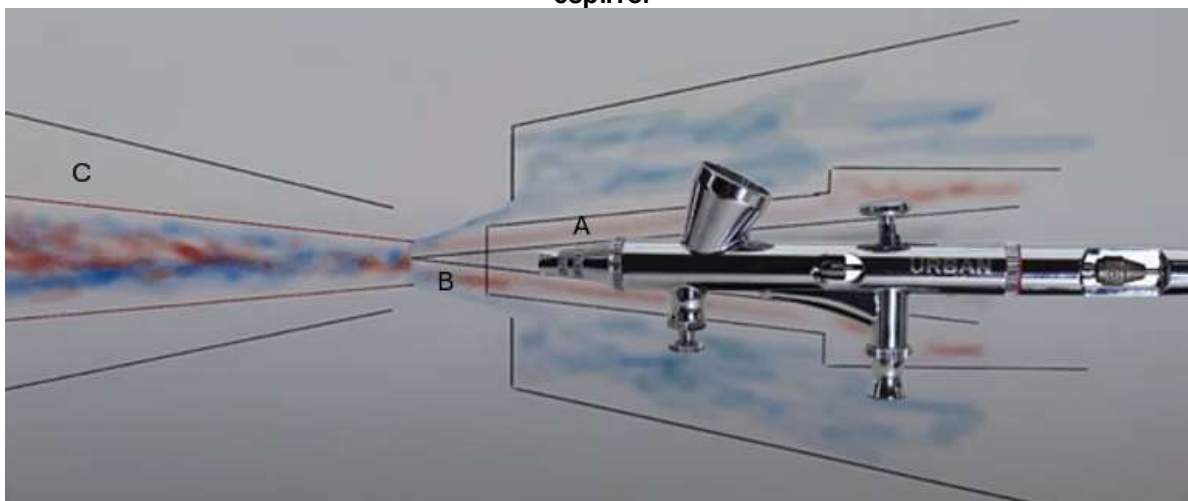
Nota: Um espirro humano pode variar de 140 a 180km/h dependendo do autor e estudo. Bourouiba et al. (2014) e Han et al. (2013) identificaram em seus estudos que a velocidade média é de 180 km/h (258, 259). A dispersão também não segue um leque uniforme, mas sabe-se que aumenta conforme se distancia do corpo humano. O tempo das imagens: (a) 0,006 s, (b) 0,029 s, (c) 0,161 s, (d) 0,341 s, (e) 0,222 s e (f) 0,341 s.

Fonte: Gibbens (2020) (260).

A configuração do aerógrafo, que possui uma potência de 18 W, funcionamento do compressor em 20 psi e bico 0,6 mm, e uma taxa de fluxo de 2 ml/min visou simular a potência e leque de disseminação de um espirro (mesmo diversos autores considerando a disseminação não uniforme) encontra-se ilustrada na Figura 16. Considerando que um espirro humano típico pode liberar aproximadamente 40.000

gotículas, equivalentes a 0,04 ml aproximadamente, a quantidade de solução utilizada no reservatório do aerógrafo foi estabelecida em 1 ml. Para assegurar uma simulação precisa, a solução foi expelida do aerógrafo por aproximadamente 1,2 s, um tempo calculado para replicar a força e a quantidade de um espirro humano.

Figura 16 - Ilustração dos processos de simulação de distribuição de material biológico pelo espirro.

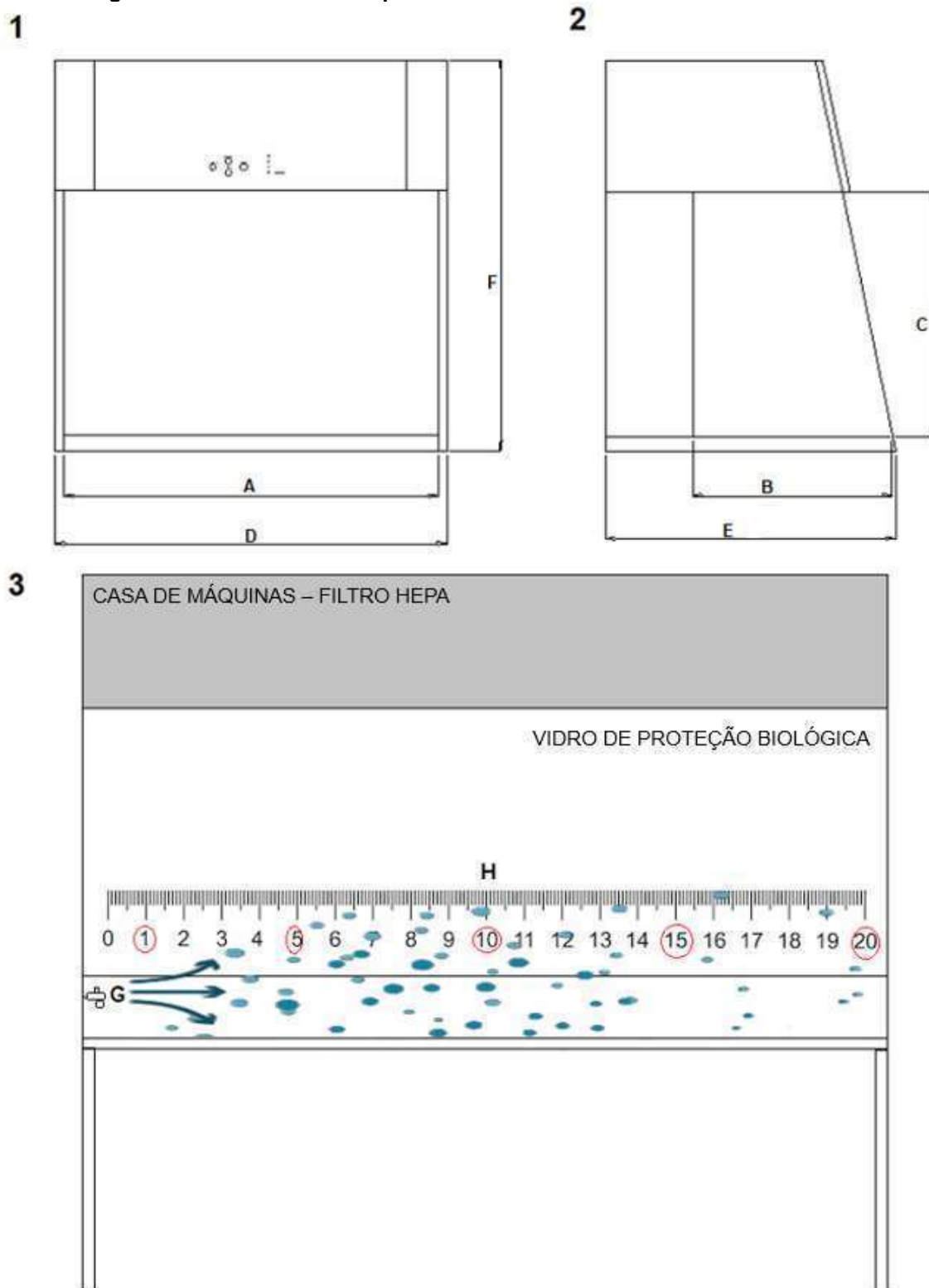


Nota: A letra A é o bico do aerógrafo, no qual utilizou-se 0,6 mm; a letra B refere-se ao ângulo (α) de saída do líquido expelido pelo aerógrafo, no caso 0,17 rad, e a letra C ao ângulo de abertura intermediário. Para o cálculo do leque atingido pelo aerógrafo, aplicou-se o teorema de Pitágoras onde $c^2 = a^2 + b^2$, sendo A o cateto oposto (que se busca), C a hipotenusa e o B o cateto adjacente (neste caso, 2 m – distância máxima utilizada nos testes). Para o cálculo da hipotenusa empregou-se a equação: $C = B / \cos \alpha$. Assim sendo, tem-se uma hipotenusa de 201,01 cm e consequentemente, após aplicar os dados na equação, o cateto oposto (igual a metade de um leque) de 20,12cm, ou seja, a abertura simulada pelo aerógrafo é de 40,24cm a uma distância de 2 m.

Fonte: O autor (2024).

Após realizados os procedimentos de cálculos e preparação dos reagentes e equipamentos a serem utilizados, todos foram dispostos conforme a Figura 17 dentro da câmara de fluxo laminar. Marcações na câmara foram feitas para indicar as distâncias da ponta do bico do aerógrafo e assim proceder com os experimentos de inoculação no VTM-SS. As cinco distâncias (grupos) foram testadas por 8 replicatas de VTM-SS produzidos em um único lote (40 placas), juntamente com seu controle negativo.

Figura 17 – Dimensões e esquemática da câmara de fluxo laminar horizontal.



Nota: Modelo SP-2390. Medidas A 2390 mm, B 504 mm, C 655 mm, D 2445 mm, E 765 mm, F 1861 com base. As letras A, B, e C referem-se às medidas internas. As letras C, D e E referem-se às medidas externas. A letra G representa posição do aerógrafo. A letra H sugere graficamente a escala de distância dentro dos limites da câmara.
Fonte: Adaptado de SPLABOR (2024).

3.2 ANÁLISE POR REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

3.2.1 RNA viral e preparação da amostra

O tampão contido no kit QIAprep&® possui um reagente líquido para a extração do RNA viral de amostras contidas em UTM, VTM, salina, PBS ESswabs, e Virocult. A preparação da amostra, prepara o RNA genômico para a detecção por RT-qPCR, protegendo a molécula de RNA de degradação e prevenindo sua inibição. Em uma placa de 96 poços, livre de DNase e RNase, foi adicionado o 8 µl de amostra primária em solução salina proveniente do protocolo de coleta do VTM-SS, mais 2 µl do tampão de preparação. A incubação demorou apenas 2 min e foi realizada em temperatura ambiente.

3.2.2 PCR e one-step RT-PCR

Após a incubação, a amostra com o tampão de extração recebeu 10 µl do mix de reação de RT-PCR 4x, qual permite o uso de volumes maiores de modelo para aumentar a sensibilidade do ensaio. O uso do QIAprep&® Viral RNA UM Master Mix permite que a transcrição reversa e a PCR ocorram em um único tubo (ou placa). Todos os reagentes necessários para ambas as reações estão contidos no Master Mix, para que não haja necessidade de abrir o tubo, uma vez que a reação de transcrição reversa tenha sido iniciada. A configuração do ensaio foi feita em temperatura ambiente e processada imediatamente após a adição da amostra.

3.2.3 Componentes do Master Mix

Os componentes do Master Mix incluem HotStaRT-Script Reverse Transcriptase, QuantiNova DNA Polymerase, tampão e dNTPs. Esta formulação otimizada permite a amplificação rápida por RT-PCR com alta especificidade e sensibilidade.

3.2.4 HotStaRT-Script Transcriptase Reversa

O HotStaRT-Script serve para ativação mediada por calor da etapa de transcrição reversa. O HotStaRT-Script está associada a um bloqueador de RT,

tornando a enzima quase inativa em temperatura ambiente. Isto permite que a reação de RT-PCR seja estabelecida à temperatura ambiente sem o risco de formação de dímeros de primer pela transcriptase reversa. Ao iniciar o protocolo de RT-PCR com etapa a 50 °C, o bloqueador de RT é liberado da transcriptase reversa e a síntese de cDNA é iniciada, como pode ser evidenciado na Figura 18.

3.2.5 Controle interno de RNA

Para aumentar a segurança do processo, utilizamos um controle positivo interno, o qual foi detectado no mesmo tubo que os alvos de RNA do SARS-CoV-2. O controle interno de RNA, é um reagente sintético com uma sequência única e artificial que foi usada para monitorar amplificação. As sequências de primer e sonda para a detecção do controle interno de RNA foram validadas por bioinformática para não conter homologia contra centenas de organismos eucarióticos e procarióticos.

3.2.6 Controle interno Humano

Para aumentar a confiança na interpretação de amostras negativas (sem amplificação do alvo), utilizamos um controle interno para amostras humanas, o qual tem como alvo duas transcrições humanas do B2M e Genes RNase P, detectados no mesmo canal. O controle interno humano destinou-se a informar que o tubo de amostra humano e que os materiais de RNA não foram degradados. Nos experimentos realizados, por se tratar de testes realizados com controles positivos, utilizou-se o controle interno humano validação do teste (comercial).

3.2.7 Novo mecanismo mediado por anticorpos *Hot-start*

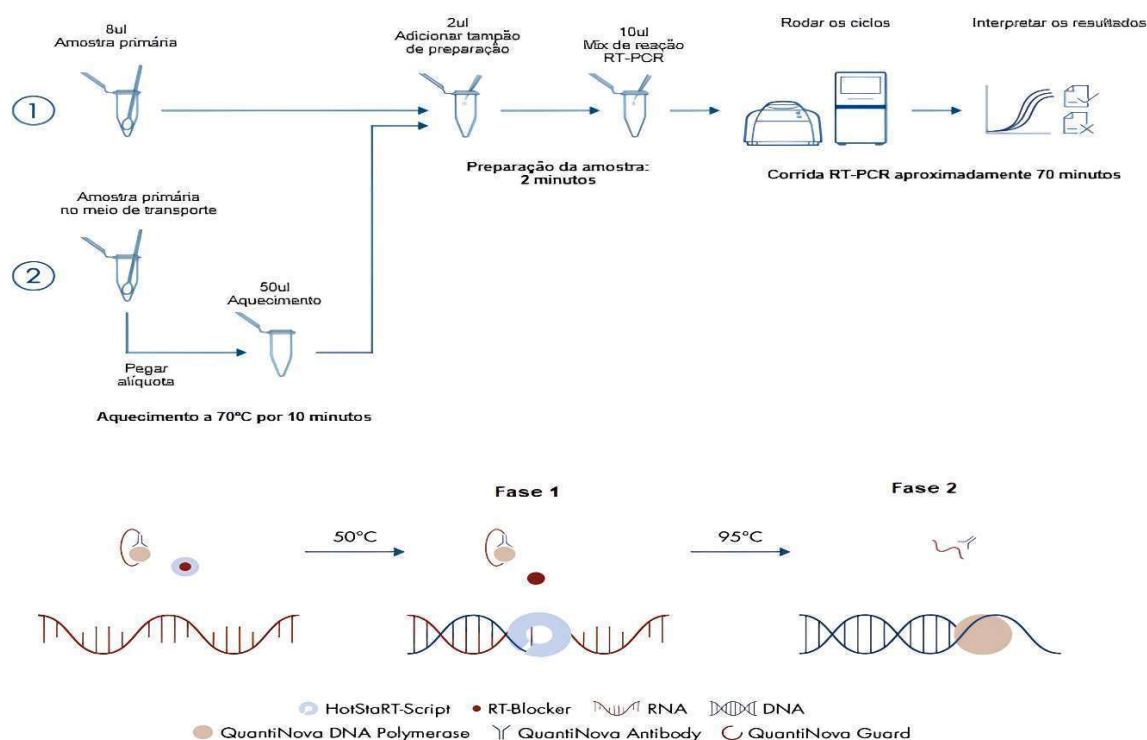
A DNA Polimerase QuantiNova é fornecida em estado inativo e não possui atividade enzimática em temperaturas ambientes ou mais altas. A enzima permanece completamente inativa durante a reação de transcrição reversa e não interfere nela. O mecanismo *Hot-start* mediado por anticorpos impede a formação e extensão de produtos inespecíficos de RT-PCR dímeros de *primers* durante a reação, transcrição reversa e durante a primeira etapa de desnaturação. Portanto, este mecanismo permite maior especificidade de PCR além de uma quantificação precisa. Depois da transcrição reversa e dentro de 2 min após o aumento da temperatura para 95°C, o

anticorpo QuantiNova são desnaturados e a QuantiNova DNA Polimerase é ativada, permitindo a amplificação por PCR (Figura 18). Este *hot-start* de duas fases permite uma reação rápida e conveniente em temperatura ambiente além de permitir que todas as ambas as etapas sejam realizadas sequencialmente em um único tubo.

3.2.8 RT-PCR (*real time*)

A reação preparada com tampão, amostra e Master Mix foi adicionada a uma placa de 96 poços e levados ao equipamento StepOnePlus® da Applied Biosystems™. Foram realizados 40 ciclos de alternância de temperatura (conforme protocolos da OMS), onde na primeira fase elevou-se a temperatura para 50 °C por 10 min para promover a transcrição reversa, seguido de nova elevação para 95 °C por 3 min. Depois mais 39 ciclos de 95 °C por 15 s, 50 °C por 30 s foram realizados para totalizar 40 ciclos. A Figura 18 ilustra o *setup* de preparação da amostra e funcionamento bioquímico do processo de RT-PCR.

Figura 18 - Setup do protocolo de preparação da amostra e fases de transcrição



Nota: *Kit* utilizado nos experimentos QIAprep&® da QIAGEN™. Equipamento utilizado nos experimentos StepOnePlus®, Applied Biosystems™.
Fonte: Adaptado de QIAGEN (2020) (261).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram tabulados no programa Microsoft Excel® 2010, e posteriormente suas comparações estatísticas realizadas com o *software* “R” versão *R core Team* 2014 de código livre, *The R Foundation for Statistical Computing*, iniciativa de *The R Journal*. *R* é uma linguagem de programação e um ambiente destinado à realização de análises estatísticas e elaboração de gráficos. Configurado como um projeto GNU, *R* compartilha semelhanças com a linguagem e o ambiente *S*, desenvolvidos anteriormente no Bell Laboratories (anteriormente *AT&T*, agora *Lucent Technologies*) por John Chambers e seus colegas. Embora *R* seja considerado uma implementação distinta de *S*, muitos códigos escritos para *S* podem ser executados em *R* sem modificações significativas. No âmbito das capacidades estatísticas, *R* oferece uma ampla gama de técnicas, abrangendo modelagem linear e não linear, testes estatísticos clássicos, análise de séries temporais, classificação, agrupamento, entre outras. Além disso, destaca-se por sua alta extensibilidade. A linguagem *S* é frequentemente adotada como o meio preferencial para pesquisas em metodologia estatística, e *R* proporciona uma via de código aberto para engajamento nessas atividades. Uma característica distintiva do *R* reside na facilidade com que gráficos de qualidade editorial, incluindo símbolos matemáticos e fórmulas quando necessários, podem ser gerados. Cuidado meticuloso é aplicado aos padrões relativos às opções de design em gráficos, garantindo que o usuário mantenha controle total sobre o processo. *R* está disponível como *software* livre, regido pelos termos da Licença Pública Geral GNU da *Free Software Foundation*, na forma de código-fonte. Sua capacidade de compilação e execução estende-se a uma variedade abrangente de plataformas, incluindo sistemas UNIX e similares (como FreeBSD® e Linux®), Windows® e MacOS® (262).

Para as análises estatísticas dos experimentos realizados, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA – *Analysis of Variance*) a um fator não-paramétrico. Esta técnica permite a comparação considerando grupos, tempos ou combinações, inclusive com outras variáveis (263). Ela é útil especialmente ao se comparar ao menos três conjuntos. Uma vez que os dados apresentaram uma não homogeneidade das variâncias (podendo ser verificada pela presença de relevância estatística em pelo menos um dos grupos analisados pelo teste de Shapiro-Wilk), foi aplicado um *post hoc* para análises dos grupos, neste caso, o teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

O teste de de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner é uma adaptação dos conhecimentos de seus criadores, sendo:

Dwass (Harold W. Dwass), conhecido por seu trabalho em métodos não paramétricos e testes de comparações múltiplas, particularmente o teste de Dwass-Steel, que é uma extensão do teste de Kruskal-Wallis;

Steel (Robert G. D. Steel), contribuiu para métodos estatísticos e é frequentemente associado ao teste de Dwass-Steel;

Critchlow (Richard Critchlow), também contribuiu para a estatística não paramétrica; no entanto, não há uma associação direta com um teste específico com seu nome na literatura padrão;

Fligner (Jerome L. Fligner), conhecido por suas contribuições para métodos estatísticos, incluindo o teste de Fligner-Killeen, é usado para verificar a homogeneidade de variâncias em grupos.

Este teste é um dos dois métodos utilizados para conduzir múltiplas comparações sem distribuição. O método baseia-se num ranqueamento de pares, possuindo diversas propriedades desejáveis que são investigadas (264).

A referência adotada para que se verifique evidência estatística de diferença é o valor mínimo de $p < 0,05$. São considerados significativos os resultados com $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na atual pesquisa, focou-se na avaliação da eficácia na coleta do vírus SARS-CoV-2 no ambiente, utilizando dispositivos baseados no Meio de Transporte Viral (VTM) semissólido. A análise estatística aqui apresentada é crucial para compreender as nuances e a efetividade dessas técnicas de coleta em diferentes condições ambientais e operacionais. Neste contexto, abordou-se variáveis como temperatura ambiente (TA), considerada de 18 °C a 22 °C *versus* temperatura controlada (TC) considerada de 2 °C a 8 °C, e também a relação entre a distância de coleta e a capacidade de detecção assim como sua sensibilidade e especificidade.

A estabilidade do SARS-CoV-2 em diferentes temperaturas é um aspecto fundamental para a coleta e análise do vírus. Estudos anteriores, como os de Chin et al. (2020), mostraram que o SARS-CoV-2 tem estabilidade variada em diferentes temperaturas, afetando diretamente a viabilidade do vírus coletado (212), dados estes que corroboram com os encontrados nesta pesquisa. A comparação direta entre amostras mantidas à temperatura ambiente e controlada oferece *insights* sobre as melhores práticas para a coleta e armazenamento de vírus aéreos, que podem ser empregados ao vírus SARS-CoV-2 ou outros vírus aéreos. Pesquisas como a de Maroto et al. (2017) destacaram que a temperatura de armazenamento pode afetar significativamente a integridade do RNA viral e, portanto, a detecção subsequente do vírus (265).

Já relação entre a distância de coleta emitida pelo aerógrafo e a quantidade de ciclos necessários para detectar o vírus em testes de RT-PCR é um indicador chave da eficácia do VTM-SS. Conforme indicado por Setti et al. (2020), a distância da fonte do vírus pode influenciar a carga viral coletada e, consequentemente, o número de ciclos de PCR necessários para detecção, que é de suma importância para determinar a quantidade de dispositivos seriam necessários por metro quadrado a fim de garantir a reprodutibilidade do teste, além disso, pequenas partículas podem cobrir uma grande área indoor, chegando até 10 metros (34).

As análises estatísticas fornecem uma compreensão aprofundada da eficácia dos dispositivos de coleta de VTM-SS no ar/ambiente, fundamentais para estratégias de monitoramento e controle da COVID-19 em ambientes diversos.

4.1 TESTES DE ESTABILIDADE VTM SEMISSÓLIDO EM TEMPERATURA AMBIENTE – 18 °C A 22 °C

A relação entre o tempo e a temperatura ambiente listada na Tabela 3 para valores CT em uma análise de SARS-CoV-2, mostra o número de amostras (N), a mediana de CT, os valores do teste de normalidade W de Shapiro-Wilk, e os valores-p correspondentes, bem como o 25º e o 75º percentis para os tempos de 0, 24, 48 e 72 h. Os percentis 25º e 75º mostram uma variação no CT ao longo do tempo, com o 75º percentil aumentando, o que pode indicar uma distribuição à direita e leve instabilidade quando comparado com valores de temperatura controlada, enquanto o teste de Shapiro-Wilk sugere distribuição não normal dos dados, como indicado pelos valores-p baixos em todos os pontos temporais.

A estabilidade do CT em temperatura ambiente é uma medida importante na avaliação da integridade do RNA viral em amostras de SARS-CoV-2 coletadas ao longo do tempo. Os dados demonstram que não há uma degradação significativa do RNA viral em nenhum dos tempos. O que é consistente com as descobertas de Chia et al. (2020), que relataram uma relativa estabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies a temperatura ambiente e umidade entre 53 e 59% (199).

A variação observada nos percentis 25 e 75 pode refletir a heterogeneidade nas amostras coletadas ou variações na eficiência da coleta e/ou do processo de RT-PCR. Estudos anteriores, como o de Huang et al. (2021), observaram que a carga viral e a eficiência de detecção podem variar significativamente com a metodologia de coleta (266).

A rejeição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,001^{***}$) indica que métodos estatísticos não paramétricos devem ser usados para análise subsequente desses dados.

A leve variação dos CT nos dois percentis analisados, juntamente com a média ligeiramente mais elevada (quando comparada com temperatura controlada) reafirma que o RNA viral possui menos estabilidade em tais condições, o que é corroborado por estudos como o de Aboubakr et al. (2021) que indicam uma diminuição na degradação do RNA viral em temperaturas mais baixas (267).

Tabela 3 - Estatística descritiva da relação Tempo x CT (em TA)

Parâmetro	Tempo (h)	CT
N	0	36
	24	36
	48	36
	72	36 ³
Mediana	0	23,5
	24	23,5
	48	23,5
	72	23,5
W de Shapiro-Wilk	0	0,766
	24	0,512
	48	0,817
	72	0,844
p de Shapiro-Wilk	0	<0,001 ***
	24	<0,001 ***
	48	<0,001 ***
	72	<0,001 ***
25º Percentil	0	22,5
	24	22,5
	48	22,0
	72	23,0
75º Percentil	0	26,0
	24	24,3
	48	24,3
	72	25,0

Nota: Dados descritivos tabulados fornecidos pelo programa estatístico R (R Core Team, 2022. R: *A Language and environment for statistical computing*. Versão 4.1), referente a análise de quatro grupos (temperatura ambiente) denominados T0, T24, T48 e T72, cada um contando com 36 replicatas e um controle, feitos em 3 experimentos distintos (12 por lote). A tabulação nos mostra que devido aos valores-*p* de um dos grupos pelo teste de Shapiro-Wilk terem dado <0,001*** a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos, sendo assim um teste não paramétrico (ANOVA) deve ser empregado.

Fonte: O autor (2024).

A Tabela 4 apresenta resultados de uma análise de variância de Kruskal-Wallis, que é usada quando os dados não seguem uma distribuição normal. A significância estatística (valor-*p* <0,009**) indica que há diferenças estatisticamente relevantes

entre os grupos analisados em diferentes tempos. O valor- p sugere que a variável de tempo tem um efeito moderado na variável dependente.

O uso do teste de Kruskal-Wallis é justificado pela não normalidade dos dados, como confirmado pelo teste de Shapiro-Wilk da Tabela 3. O valor- p indica que, embora haja um efeito, outras variáveis não medidas também podem estar contribuindo para as diferenças observadas.

Os resultados da Tabela 4, em especial o valor- p (0,009**), indicam que existem diferenças estatisticamente significativas na variável dependente provavelmente a carga viral detectada em diferentes momentos de coleta (T0, T24, T48, T72). Isso pode sugerir que a estabilidade ou a degradação do SARS-CoV-2 em amostras coletadas no ar varia com o tempo, o que é consistente com os estudos de Van Doremalen et al. (2020) sobre estabilidade do SARS-CoV-2 em diferentes ambientes e superfícies (211).

O fato de que há diferenças significativas entre os grupos ao longo do tempo reforça a importância da coleta e análise rápida de amostras para evitar a degradação do material genético viral. Afzal et al. (2020), em seus estudos demonstraram como essas variáveis podem afetar a sensibilidade dos testes de diagnóstico (268).

Tabela 4 - ANOVA a um fator (não paramétrica) - Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ϵ^2
CT	11,5	3	0,009**	0,0804

Nota: Teste de Shapiro-Wilk $p < 0,001$ ** hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante disso, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados indicam que existem diferenças entre os grupos analisados, sendo eles T0, T24, T48 e T72. Fonte: O autor (2024).

Relacionado a Tabela 5 as comparações entre 0 e 48 h ($p < 0,033^*$), bem como 48 e 72 h ($p < 0,033^*$), mostram diferenças significativas, o que estatisticamente sugere alterações na variável de interesse ao longo do tempo em temperatura ambiente. Não há diferenças significativas nos outros pares de tempo comparados. Os resultados apresentados na Tabela 5 sugerem uma mudança na estabilidade do SARS-CoV-2 ao longo do tempo em temperatura ambiente. A diferença entre 0 h e 48 h pode ser potencialmente explicada pela maior dispersão dos dados e T0 indicando que talvez tenha havido algum problema de ordem técnica que tenha afetado a reprodutibilidade dos dados nesse tempo. Já a diferença entre 48 h e 72 h potencialmente pode apontar uma diferença real entre os CTs dos dois grupos. Entretanto, fosse essa diferença resultante da perda da estabilidade ao longo do tempo, ela também deveria ser

detectada entre os tempos 0h/72h e 24/72h. Sendo assim, é razoável concluir que o tempo não afeta os resultados e que as diferenças observadas são resultantes de questões técnicas. Porém mais estudos, com maior número de amostras são necessários para elucidar definitivamente a questão. Além disso, Afzal et al. (2020), descrevem como o controle do ambiente é um fator essencial para resultados com confiabilidade (268).

Tabela 5 - Comparações múltiplas Tempo x Tempo (em TA) – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Tempo (h)	Tempo (h)	W	p
0	24	-2,520	0,282
0	48	-3,849	0,033 *
0	72	-0,171	0,999
24	48	-1,252	0,813
24	72	2,911	0,167
48	72	3,845	0,033 *

Nota: O valor-*p* aponta que existe diferença entre os grupos (tempos). Entretanto, as comparações B2B revelam uma diferença marginalmente significativa ($p=0,033^*$) entre os tempos 0h e 48h, e dos tempos 48h e 72h.

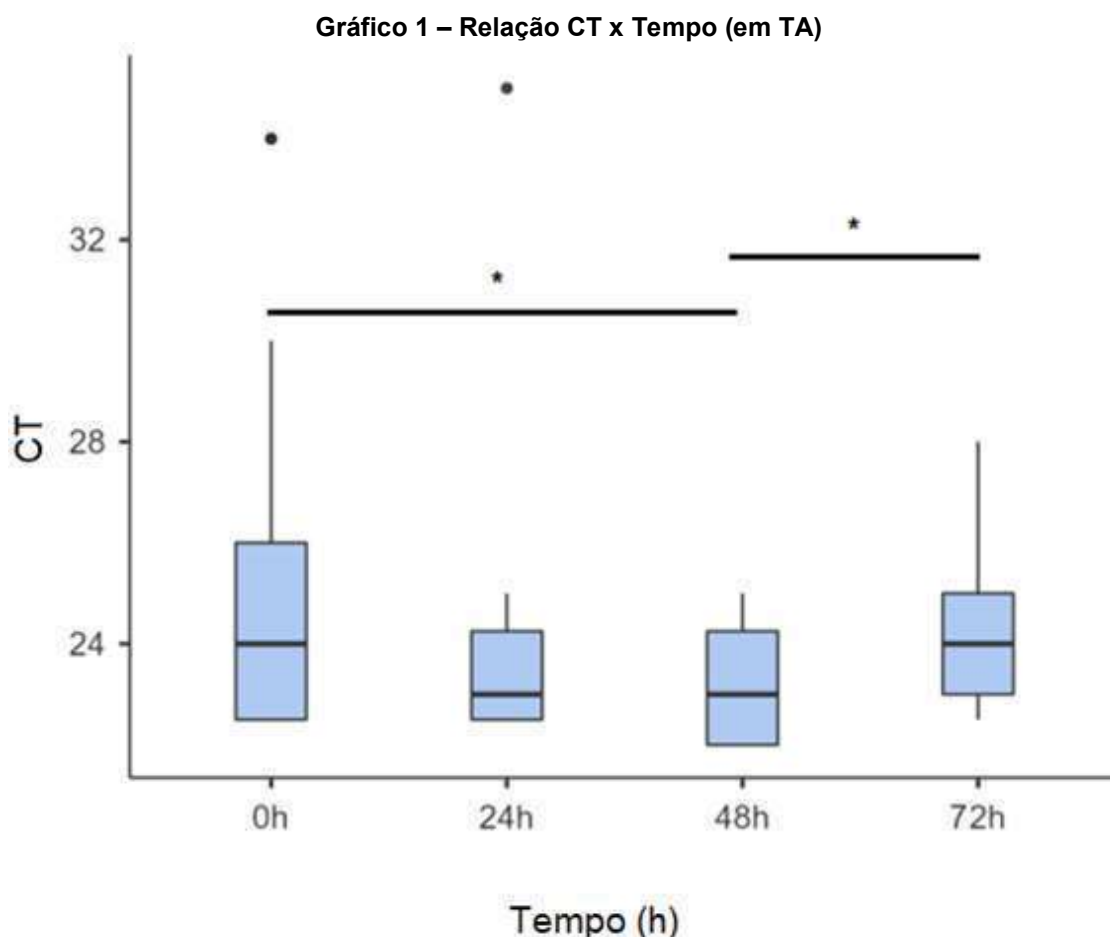
Fonte: O autor (2024).

O Gráfico 1 apresenta a distribuição de valores de CT para o SARS-CoV-2 em amostras armazenadas em temperatura ambiente ao longo de quatro pontos temporais: 0, 24, 48 e 72 h. Há diferenças estatísticas significativas detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis (0h e 48h / 48h e 72h).

Juntamente com os dados da Tabela 5, o Gráfico 1 corrobora indicando que a mediana do CT (indicador semiquantitativo de carga viral), difere-se entre os grupos ao longo do tempo, e parece aumentar ligeiramente a partir de 24 h sugerindo uma possível degradação do RNA viral ou diminuição da carga viral nas amostras ao longo do tempo em temperatura ambiente. A presença de *outliers* nos tempos 0 e 24 h indica variações na quantidade de RNA detectável nessas amostras. As linhas horizontais representam comparações entre os grupos, onde as linhas conectam os grupos entre os quais diferenças estatísticas significativas foram observadas.

A elevação gradual do CT mediano (de 24 h até 72h), observada no Gráfico 1, pode ser indicativa de uma degradação do RNA viral ao longo do tempo quando exposto a condições ambientes, o que está alinhado com as descobertas de Chin et al. (2020), que relatam uma diminuição na estabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies a temperatura ambiente ao longo do tempo (212). A variabilidade expressa

pelos *outliers* pode ser atribuída a variações na eficiência de coleta ou na técnica de RT-PCR, como discutido por Haberhausen et al. (1998). Isso ressalta a importância de padronizar os procedimentos de coleta e análise para garantir a confiabilidade dos resultados (270).



Nota: Testes realizados em três experimentos distintos. Divididos em quatro grupos denominados T0 (basal), T24, T48 e T72, com 36 replicatas. Foi utilizado um controle negativo por grupo. As diferenças estatísticas podem ser evidenciadas entre o T0/T48 e T48/T72 com baixa relevância.

Fonte: O autor (2024).

Estudos realizados em 2022 ampliaram a compreensão da estabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies diversas e em diferentes condições térmicas, reforçando e detalhando as observações feitas por Chia et al. (2020) (199). Foi relatado que, a uma temperatura ambiente de 20 °C, o vírus SARS-CoV-2 permaneceu detectável em superfícies não porosas por até 28 dias após inoculação. No entanto, a recuperação do vírus em materiais porosos, como descrito por Baker et al. (2022) como tecidos de algodão, foi significativamente menor, não sendo recuperável após 14 dias. Isso indica que, em ambientes mais frios, superfícies não porosas podem atuar como vetores de transmissão por períodos extensos (271).

Baker et al. (2022) também descreve que quando a temperatura aumentou para 30 °C e 40 °C, observou-se uma redução notável no tempo de sobrevivência do vírus nas superfícies. Em 30 °C, o SARS-CoV-2 infeccioso pôde ser recuperado de superfícies como aço inoxidável e vidro por até 7 dias, e em notas de papel por até 21 dias, embora com cargas virais significativamente menores após 14 dias. A 40°C, o vírus não foi recuperável após 48 h em todas as superfícies testadas, com uma redução superior a 99,99 % da carga viral em menos de 24 h, destacando o impacto da temperatura na viabilidade do vírus (271), o que comprova a facilidade da propagação de patologias virais que atingem principalmente as vias aéreas em específica sazonalidade, como ocorreu na pandemia, onde o maior número de óbitos ocorreu no inverno.

Além disso, Port et al. (2022) em seus experimentos, fez uma análise comparativa da estabilidade em aerossóis e em superfícies de diferentes Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 mostrou que as primeiras VOCs apresentaram maior estabilidade do que a cepa WA1 inicial (cepa de referência para estudo do SARS-CoV-2 nos Estados Unidos da América). Contudo, variantes mais recentes como Delta e Ômicron, não demonstraram essa maior estabilidade, sugerindo que as alterações na estabilidade não explicam o aumento da transmissibilidade dessas variantes (272).

Estes resultados reforçam a necessidade de práticas de higiene estritas, especialmente em ambientes mais frios e em superfícies não porosas, e ressaltam a importância de considerar fatores ambientais ao desenvolver diretrizes de saúde pública e estratégias para prevenir a transmissão do SARS-CoV-2.

A Tabela 6 apresenta dos dados descritivos de um comparativo entre todas as amostras entre si analisados em temperatura ambiente. A mediana do CT tem uma maior variação entre a constante amostra (quando comparado com os resultados da Tabela 12). Os testes W de Shapiro-Wilk, utilizados para avaliar a normalidade dos dados, mostram que há rejeição significativa da hipótese de normalidade nos lotes 3,5-6,8-12, pois os valores-*p* são muito baixos. Os percentis 25 e 75 fornecem uma ideia da distribuição dos dados dentro de cada amostra.

Na literatura, Sule et al. (2020) já observaram que a estabilidade do RNA viral e a consistência dos valores de CT, em diferentes métodos (com sensibilidade/especificidade diferentes) são essenciais para garantir a precisão dos diagnósticos de COVID-19, pois podem gerar resultados discutíveis, ressaltando a

validação do método no local (273). A variação entre os lotes pode afetar a sensibilidade do teste, o que ressalta a importância de manter condições de produção, coleta e processamento de amostras uniformes e controladas.

Tabela 6 – Estatística descritiva da relação Amostra x CT (em TA)

Parâmetro	Identificação (amostra)	CT
N	1	12
	2	12
	3	12
	4	12
	5	12
	6	12
	7	12
	8	12
	9	12
	10	12
	11	12
	12	12
Mediana	1	22,5
	2	26,0
	3	24,0
	4	22,5
	5	24,0
	6	24,0
	7	22,0
	8	24,0
	9	24,0
	10	22,5
	11	24,0
	12	25,0
W de Shapiro-Wilk	1	NaN
	2	0,871
	3	0,452
	4	NaN
	5	0,516
	6	0,650
	7	NaN
	8	0,802
	9	0,650
	10	0,608
	11	0,742
	12	0,764
p de Shapiro-Wilk	1	NaN
	2	0,066
	3	<0,001***
	4	NaN
	5	<0,001***
	6	<0,001***
	7	NaN
	8	0,010*
	9	<0,001***
	10	<0,001***
	11	0,002**4

⁴ Tabela 6 continua na próxima página

	12	0,004**
25° Percentil	1	22,5
	2	22,8
	3	24,0
	4	22,5
	5	23,0
	6	23,0
	7	22,0
	8	23,0
	9	23,0
	10	22,5
	11	23,0
	12	24,0
75° Percentil	1	22,5
	2	30,0
	3	25,0
	4	22,5
	5	24,3
	6	25,0
	7	22,0
	8	24,3
	9	25,0
	10	28,0
	11	24,3
	12	25,5

Nota: Dados descritivos tabulados fornecidos pelo programa estatístico R (R Core Team, 2022. R: A Language and environment for statistical computing. Versão 4.1). A tabulação nos mostra que devido aos valores- p de ao menos um dos grupos pelo teste de Shapiro-Wilk terem dado $<0,001^{**}$, a ANOVA (não paramétrico) deve ser empregado.

Fonte: O autor (2024).

A constância da mediana dos valores de CT (mesmo que com variação, porém biologicamente considerada) em diferentes amostras sugere que não há degradação significativa do RNA viral nas condições estudadas, o que é importante para a confiabilidade dos testes diagnósticos de RT-PCR para SARS-CoV-2. A rejeição da normalidade dos dados, indicada pelos valores- p muito baixos no teste de Shapiro-Wilk, pode sugerir que a distribuição dos valores de CT não é uniforme, possivelmente devido aos efeitos da temperatura sobre o RNA viral.

Estudos de Sule et al. (2020), também discutem a importância da estabilidade do RNA viral e a consistência dos valores de CT na precisão dos diagnósticos de COVID-19, indicando que os testes de diagnóstico para COVID-19 podem possuir diferentes indicadores de positividade, ou seja, valor de corte do CT (273). Variações nos valores de CT podem afetar a sensibilidade dos testes diagnósticos, o que destaca a importância de manter condições de coleta e processamento de amostras uniformes e controladas.

A Tabela 7 apresentada abaixo é um exemplo de uma análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, que foi utilizada para avaliar a diferença entre os valores

de CT de 12 amostras diferentes. Os resultados indicam uma diferença estatisticamente significativa com um valor- p ($<0,001^{***}$). O valor de chi-quadrado (χ^2), usado principalmente em estatísticas inferencial, foi usado para avaliar quantitativamente a relação do resultado do experimento e a distribuição esperada dos fenômenos, obtendo o resultado de 94,5. O valor de épsilon-quadrado (ϵ^2), que habitualmente apresenta-se como número inteiro não positivo zero, quando não, é considerado uma estimativa não-enviesada ou corrigida (274). A diferença entre medidas corrigidas e não corrigidas é referida como *contração* (275).

A *contração* tende a diminuir à medida que o tamanho das amostras aumenta e o número de preditores no modelo cai. No entanto, a *contração* tende a ser muito pequena se os efeitos forem grandes, independentemente do tamanho da amostra (276). No caso, o valor de ϵ^2 foi de 0,661, indicando que quase metade dos lotes apresentaram diferenças entre si.

Tabela 7 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ϵ^2
CT	94,5	11	$<0,001^{***}$	0,661

Nota: Teste de Shapiro-Wilk $p<0,001^{***}$ hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante disso, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados demonstram que existem diferenças entre os grupos analisados, sendo eles os grupos denominados amostra de 01 a 12.

Fonte: O autor (2024).

Comparando com outros estudos, a variabilidade significativa nos valores de CT entre as amostras, podem ser comparadas com a heterogeneidade encontrada em estudos de carga viral de SARS-CoV-2. Por exemplo, em um estudo realizado por La Scola et al. (2020), observou-se que a carga viral pode variar significativamente entre pacientes e ao longo do tempo, afetando assim os valores de CT (277) Essas variações podem ser atribuídas a diferenças na resposta imunológica dos indivíduos, na fase da infecção em que a amostra foi coletada, na técnica de coleta e processamento de amostra o que explicaria os resultados deste experimento.

A variabilidade significativa nos valores de CT entre as amostras, podem ser influenciadas por inúmeras variáveis, incluindo a técnica de coleta, a manipulação, o armazenamento e o processamento das amostras. Estudos como os de Lieberman et al. (2020), podem explicar a variabilidade encontrada, onde a probabilidade da variabilidade entre os lotes pode ser influenciada por vários fatores, como os conjuntos de primers utilizados, a concentração inicial do vírus, a eficiência da coleta e da

extração do RNA e a presença de inibidores (278). Um estudo de Smyraki et al. (2020), investigou a eficácia de diferentes tampões genéricos como meio de transporte encontrou variações significativas na carga viral detectada, dependendo da técnica utilizada (249).

A Tabela 8 apresenta um conjunto de comparações par a par entre diferentes amostras de testes realizados para detectar a presença do SARS-CoV-2. Estes resultados nos ajudam a trazer um panorama biológico quanto a estabilidade das amostras. As estatísticas de teste W indicam a magnitude da diferença entre as amostras, enquanto os valores-*p* significativos (indicados por asteriscos) confirmam se essas diferenças são estatisticamente significativas, enquanto a nomenclatura NaN, indica que não há diferença entre as comparações. A nota sugere que, apesar das diferenças estatísticas, a correlação com a estabilidade do vírus quando comparado com um grupo de temperatura controlada não é clara, pois a detecção se manteve em uma avaliação semiquantitativa.

Tabela 8 – Comparações múltiplas Amostra x Amostra – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Amostra	Amostra	W	p
1	2	6,3153	<0,001***
1	3	6,3879	<0,001***
1	4	NaN	NaN
1	5	6,3312	<0,001***
1	6	6,3944	<0,001***
1	7	-6,7823	<0,001***
1	8	6,3360	<0,001***
1	9	6,3944	<0,001***
1	10	3,0332	0,591
1	11	6,3312	<0,001***
1	12	6,3360	<0,001***
2	3	3,6830	0,277
2	4	-6,3153	<0,001***
2	5	-4,2375	0,109
2	6	-4,7717	0,036*
2	7	-6,3153	<0,001***
2	8	-5,0337	0,019*
2	9	4,7717	0,036*
2	10	-3,6859	0,276
2	11	-4,6530	0,047*
2	12	-3,0054	0,605
3	4	-6,3879	<0,001***
3	5	-2,4365	0,858
3	6	-1,5590	0,995
3	7	-6,3879	<0,001***
3	8	-2,7116	0,749
3	9	-1,5590	0,995
3	10	-2,3701	0,880 ⁵

⁵ Tabela 8 continua na próxima página

3	11	-2,5235	0,827
3	12	1,2938	0,999
4	5	6,3312	<0,001***
4	6	6,3944	<0,001***
4	7	-6,7823	<0,001***
4	8	6,3360	<0,001***
4	9	6,3944	<0,001***
4	10	3,0332	0,591
4	11	6,3312	<0,001***
4	12	6,3360	<0,001***
5	6	0,2636	1,000
5	7	-6,3312	<0,001***
5	8	-0,1303	1,000
5	9	0,2636	1,000
5	10	-2,3510	0,885
5	11	-0,0433	1,000
5	12	3,0609	0,576
6	7	-6,3944	<0,001***
6	8	-0,5320	1,000
6	9	0,0000	1,000
6	10	-2,0344	0,956
6	11	-0,2636	1,000
6	12	2,5783	0,806
7	8	6,3360	<0,001***
7	9	6,3944	<0,001***
7	10	6,4343	<0,001***
7	11	6,3312	<0,001***
7	12	6,3360	<0,001***
8	9	0,5320	1,000
8	10	-2,0165	0,959
8	11	0,1303	1,000
8	12	3,5034	0,355
9	10	-2,0334	0,956
9	11	-0,2636	1,000
9	12	2,5783	0,806
10	11	2,1881	0,927
10	12	2,0165	0,959
11	12	3,0609	0,576

Nota: A comparação par a par mostra diversos grupos com diferenças estatísticas (sinalizados com *). O valor de W é calculado com uma estatística de teste de soma dos postos de Wilcoxon em cada par de grupos. O valor-p indica se há diferença estatística entre os pares. A presença desta diferença não explica correlação com estabilidade quando se compara com o grupo de temperatura controlada, pois em uma avaliação semiquantitativa todos os grupos mantiveram-se detectados. O que se pode evidenciar é que os desvios padrão são maiores quando comparados com o grupo de temperatura controlada.

Fonte: O autor (2024).

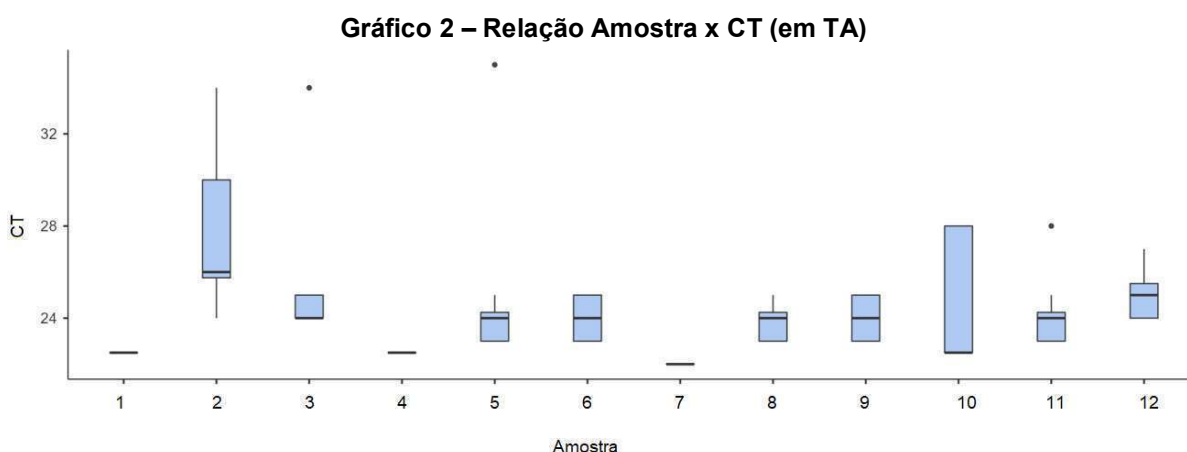
A análise de comparações múltiplas, é essencial para entender a variabilidade entre amostras. Esta variabilidade pode ser influenciada por diversos fatores biológicos, como descrito por Haberhausen et al. (1998), como a carga viral nos espécimes, uma vez que são diluídas na fase de preparação e a eficiência do processo de RT-PCR (270). Magnitudes maiores em comparação com um grupo de temperatura controlada, como mencionado na nota, podem apontar para a influência da temperatura na integridade das amostras, o que está alinhado com a literatura que,

segundo Aboubakr et al. (2021), sugere que baixas temperaturas podem ajudar a preservar o material genético viral (267).

A detecção consistente do vírus em diferentes amostras, mesmo com variações estatísticas significativas, pode indicar que o processo de RT-PCR é robusto em detectar o vírus mesmo com uma possível degradação do material genético viral. No entanto, como relatado por Yilmaz et al. (2021), isso reforça a necessidade de controle rigoroso das condições de armazenamento e processamento para garantir a exatidão dos testes (279),

O Gráfico 2 mostra a relação entre diferentes amostras e os respectivos valores CT em temperatura ambiente. Os dados ilustram a mediana, os quartis e possíveis valores atípicos (*outliers*) para cada amostra. O gráfico indica que, apesar das diferenças estatísticas entre alguns pares de amostras, existe uma grande variabilidade de desvios padrões e *outliers*, sugerindo que a estabilidade em temperatura ambiente não é tão eficaz quanto em um VTM-SS em temperatura controlada.

A presença de desvios padrão maiores em amostras com temperatura não controlada pode sugerir uma degradação mais rápida do RNA viral, o que corrobora com a importância do armazenamento apropriado das amostras para a preservação da integridade viral, conforme recomendado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC em seu manual de diretrizes provisórias para coleta e manuseio de amostras clínicas para testes de COVID-19 (280).



Nota: Neste gráfico de comparação lote a lote, mesmo havendo diferenças estatísticas entre alguns pares, evidencia-se uma grande variedade de desvios padrões entre grupos (inclusive apresentando alguns *outliers*), o que traz a perspectiva de a temperatura ambiente não manter tanta estabilidade quanto no processo com temperatura controlada do meio de transporte vital semissólido (VTM).

Fonte: O autor (2024).

À luz da literatura que investiga a estabilidade do RNA viral e a eficácia do transporte de amostras para testes de RT-PCR, a variabilidade nos valores de CT entre as amostras pode ser influenciada por fatores biológicos e técnicos, como a eficiência da coleta, a variação na carga viral inicial ou a degradação do RNA viral em condições não ideais de armazenamento como destacado em seus estudos por Aboubakr et al. (2021) (267).

A estabilidade do RNA viral em temperatura ambiente é uma consideração crucial para a confiabilidade dos testes diagnósticos. Estudos como os de Van Doremalen et al. (2020) destacaram que o SARS-CoV-2 pode permanecer viável em superfícies por períodos prolongados em temperaturas mais baixas (281). Kampf et al. (2020), já discorreu sobre a persistência do coronavírus em diferentes superfícies e variáveis. Podemos considerar que o VTM-SS é uma superfície e que os resultados indicam a importância de manter as amostras em ambientes frios para preservar a integridade do RNA viral (207).

4.2 TESTES DE ESTABILIDADE VTM SEMISSÓLIDO EM TEMPERATURA CONTROLADA – 2 °C A 8 °C

A relação entre o tempo e a temperatura controlada listada na Tabela 9 para valores CT em uma análise de SARS-CoV-2, mostra o número de amostras (N), a mediana de CT, os valores do teste de normalidade W de Shapiro-Wilk, e os valores-*p* correspondentes, bem como o 25º e o 75º percentis para os tempos de 0, 24, 48 e 72 h. O 25º percentil mostra uma estabilidade ao longo do tempo, enquanto o 75º percentil mostra uma variação no CT aumentado, explicado posteriormente por uma variação de um lote, o teste de Shapiro-Wilk sugere distribuição não normal dos dados, como indicado pelos valores-*p* baixos em todos os pontos temporais.

A estabilidade do CT em temperatura controlada é uma medida importante na avaliação da integridade do RNA viral em amostras de SARS-CoV-2 coletadas ao longo do tempo. Os dados demonstram que não há uma degradação significativa do RNA viral em nenhum dos tempos, o que é consistente com as descobertas de Chia et al. (2020), que relataram uma relativa estabilidade do SARS-CoV-2 em superfícies a temperatura ambiente e umidade entre 53 – 59% (199).

A variação observada nos percentis 25 e 75 pode refletir a heterogeneidade nas amostras coletadas ou variações na eficiência da coleta e/ou do processo de RT-

PCR. Estudos anteriores, como o de Huang et al. (2021), observaram que a carga viral e a eficiência de detecção podem variar significativamente com a metodologia e local de coleta (266)

A rejeição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,001^{***}$) indica que métodos estatísticos não paramétricos devem ser usados para análise subsequente desses dados.

Tabela 9 - Estatística descritiva da relação Tempo x CT (em TC)

Parâmetro	Tempo (h)	CT
N	0	36
	24	36
	48	36
	72	36
Mediana	0	22,0
	24	22,0
	48	22,0
	72	22,0
W de Shapiro-Wilk	0	0,596
	24	0,596
	48	0,680
	72	0,598
p de Shapiro-Wilk	0	<0,001 ***
	24	<0,001 ***
	48	<0,001 ***
	72	<0,001 ***
25º Percentil	0	22,0
	24	22,0
	48	22,0
	72	22,0
75º Percentil	0	22,5
	24	22,5
	48	31,0
	72	22,5

Nota: Dados descritivos tabulados fornecidos pelo programa estatístico R (R Core Team, 2022. R: A Language and environment for statistical computing. Versão 4.1), referente a análise de quatro grupos (temperatura controlada) denominados T0, T24, T48 e T72, cada um contando com 36 replicatas e um controle, feitos em 3 experimentos distintos (12 por lote). A tabulação mostra que devido aos valores- p de um dos grupos no teste de Shapiro-Wilk terem dado $<0,001^{***}$ a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos; assim sendo, um teste não paramétrico (ANOVA) deve ser empregado.

Fonte: O autor (2024).

A constância da variação dos CT nos dois percentis analisados, juntamente com a média ligeiramente menor (quando comparada com temperatura ambiente) reafirma que o RNA viral possui maior estabilidade em tais condições, o que é corroborado por estudos como o de Aboubakr et al. (2021) que indicam uma diminuição na degradação do RNA viral em temperaturas mais baixas (267).

A Tabela 10 apresenta resultados de uma análise de variância de Kruskal-Wallis, que é usada quando os dados não seguem uma distribuição normal. A

ausência de significância estatística ($p < 0,0695$) indica que não há diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos analisados em diferentes tempos. O valor- p sugere que a variável de tempo não tem um efeito moderado na variável dependente.

O uso do teste de Kruskal-Wallis é justificado pela não normalidade dos dados, como confirmado pelo teste de Shapiro-Wilk da Tabela 9. O valor- p indica que, embora não haja um efeito, as variáveis não medidas não contribuem possíveis diferenças não observadas.

Os resultados da Tabela 10 indicam que não existem diferenças estatisticamente significativas na variável dependente, em diferentes momentos de coleta (T0, T24, T48, T72). Isso indica que a estabilidade ou a degradação do SARS-CoV-2 em amostras coletadas no VTM-SS são mais estáveis quando mantidas sob temperatura controlada. Van Doremalen et al. (2020), em seus estudos sobre estabilidade do SARS-CoV-2 em diferentes ambientes e superfícies não indicou temperaturas controladas (211).

O fato que não há diferenças estatística entre os grupos ao longo do tempo o que reforça a importância da rápida refrigeração do material viral após a coleta. O que vem de encontro com os resultados publicados por Marchionatti et al. (2021), que houve uma ínfima flutuação nos valores dos CTs em todas as amostras e tempos analisados quando não refrigeradas (282).

Tabela 10 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ξ^2
CT	1,44	3	0,695	0,0101

Nota: Teste de Shapiro-Wilk $p < 0,001^{***}$ hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados indicam que não existem diferenças entre os grupos analisados, sendo eles T0, T24, T48 e T72.

Fonte: O autor (2024).

Relacionado a Tabela 11 as comparações entre todos os tempos, não mostram diferenças estatísticas. Os resultados na Tabela 11 sugerem que não há mudança na estabilidade do SARS-CoV-2 ao longo do tempo em temperatura controlada. Além disso, Agaoglu et al. (2022), descrevem como o controle do ambiente é um fator essencial para resultados com confiabilidade, uma vez que em seus estudos, amostras armazenadas em $+4^\circ \text{C}$ mantiveram-se viáveis por pelo menos cinco dias (283).

Tabela 11 – Comparações múltiplas Tempo x Tempo (em TC) – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Tempo (h)	Tempo (h)	W	p
0	24	0,00	1,000
0	48	1,37	0,767
0	72	0,00	1,000
24	48	1,37	0,767
24	72	0,00	1,000
48	72	-1,37	0,767

Nota: Não foram evidenciadas diferenças entre os tempos. Entretanto é possível notar uma maior dispersão nos dados no tempo de 48h, possivelmente resultante de questões técnicas.

Fonte: O autor (2024).

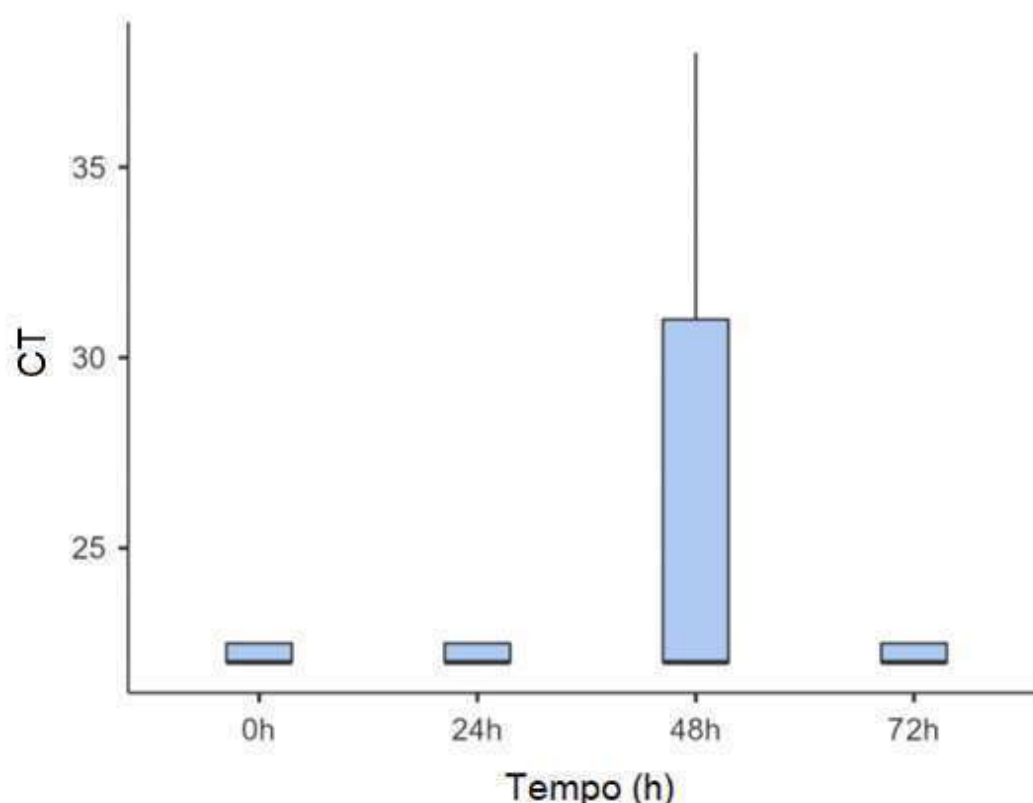
Juntamente com esses dados, o Gráfico 3 corrobora indicando que no CT mediano (indicador semiquantitativo de carga viral) se mantém estável com o tempo. Apresentando a distribuição de valores de CT para o SARS-CoV-2 em amostras armazenadas em temperatura refrigerada ao longo de quatro pontos temporais: 0, 24, 48 e 72 h. Nota-se um pico nos valores de CT em 48 h, indicando uma maior variação ou um desvio nessa marca temporal específica, apesar de não haver diferenças estatísticas significativas detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Estudos têm demonstrado que o SARS-CoV-2 pode se manter estável por períodos extensos em temperaturas controladas. Por exemplo, Van Doremalen et al. (2020), mostraram que o vírus pode permanecer viável em superfícies por dias sob condições controladas (281). Isto é consistente com os dados da Tabela 11 e do Gráfico 3, onde os valores de CT mantêm-se constantes, indicando que não há degradação estatística do RNA viral.

A presença de variação nos valores de CT (desvio padrão), no tempo de 48 h, podem sugerir maior atenção nas práticas de armazenamento ou condução dos experimentos, neste último caso devendo aceitar sempre os resultados validados pelos controles internos do kit e do equipamento. Em uma situação como a descrita por último, conduzir estudos com um número de amostras maior, traria os resultados a normalidade do ponto de vista estatístico. A ausência de diferenças estatísticas significativas reforça a ideia de que a refrigeração é eficaz na manutenção da integridade do RNA viral. No entanto, a dispersão dos dados em 48h poderia ser explorada em relação às práticas de manuseio de amostras e possíveis desafios técnicos, como o próprio método ou execução, mau funcionamento dos reagentes e equipamentos, extração imprópria do RNA viral, ausência de quantidade de material

controle suficiente conforme discutido na literatura e mencionada pelo CDC em seu manual para RT-PCR em tempo real para o novo (284).

Gráfico 3 – Relação CT x Tempo (em TC)



Nota: Testes realizados em três experimentos distintos. Divididos em quatro grupos denominados T0 (basal), T24, T48 e T72 com 36 replicatas. Utilizado um controle negativo por grupo. Mesmo com um desvio padrão mais acentuado no grupo T48 não foram encontradas diferenças estatísticas.
Fonte: O autor (2024).

Outros estudos reforçam a importância do armazenamento apropriado das amostras. Por exemplo, estudos de Agaoglu et al. (2022), e de Yilmaz et al. (2021), enfatizam que o armazenamento inadequado pode levar a uma redução na sensibilidade dos testes (279,283).

Além disso, pesquisas conduzidas por Aboubakr et al. (2021), avaliaram a estabilidade de diferentes coronavírus em várias superfícies e condições ambientais, concluindo que a estabilidade pode variar significativamente com a temperatura e a umidade (267). Isso pode ajudar a entender as variações observadas nos desvios padrão e *outliers* indicados na análise de comparações múltiplas.

A Tabela 12 apresenta os dados descritivos de um comparativo entre todas as amostras entre si analisados em temperatura controlada. A mediana do CT tem uma menor variação entre a constante amostra (quando comparado com os resultados da

Tabela 6). Os testes W de Shapiro-Wilk, utilizados para avaliar a normalidade dos dados, mostram que não há rejeição para a hipótese de normalidade, pois os valores- p são iguais ou no caso da amostra 7, próximo a uma variável significativa. Dado as circunstâncias das análises estatísticas, a proximidade da amostra 7 com a significância, e outrora os dados da Tabela 6 necessitarem de testes complementares para fatores não paramétrico (ANOVA), o teste de Kruskal-Wallis também foi empregado. Os percentis 25 e 75 fornecem uma ideia da distribuição dos dados dentro de cada lote.

A variação entre os lotes pode afetar a sensibilidade do teste, o que ressalta a importância de manter condições de produção, coleta e processamento de amostras uniformes e controladas.

Tabela 12 – Estatística descritiva da relação da relação Amostra x CT (em TC)

Parâmetro	Identificação (amostra)	CT
N	1	12
	2	12
	3	12
	4	12
	5	12
	6	12
	7	12
	8	12
	9	12
	10	12
	11	12
	12	12
Mediana	1	22,5
	2	22,0
	3	22,0
	4	22,5
	5	22,0
	6	22,0
	7	31,3
	8	22,0
	9	22,0
	10	22,5
	11	22,0
	12	22,0
W de Shapiro-Wilk	1	NaN
	2	NaN
	3	NaN
	4	NaN
	5	NaN
	6	NaN
	7	0,874
	8	NaN
	9	NaN ⁶

⁶ Tabela 12 continua na próxima página

	10	NaN
	11	NaN
	12	NaN
P de Shapiro-Wilk	1	NaN
	2	NaN
	3	NaN
	4	NaN
	5	NaN
	6	NaN
	7	0,073
	8	NaN
	9	NaN
	10	NaN
	11	NaN
	12	NaN
25° Percentil	1	22,5
	2	22,0
	3	22,0
	4	22,5
	5	22,0
	6	22,0
	7	31,0
	8	22,0
	9	22,0
	10	22,5
	11	22,0
	12	22,0
75° Percentil	1	22,5
	2	22,0
	3	22,0
	4	22,5
	5	22,0
	6	22,0
	7	33,8
	8	22,0
	9	22,0
	10	22,5
	11	22,0
	12	22,0

Nota: Dados descritivos tabulados fornecidos pelo programa estatístico R (R Core Team, 2022. R: A Language and environment for statistical computing. Versão 4.1). A tabulação mostra que devido aos valores-*p* pelo teste de Shapiro-Wilk se mostrar próximo a relevância, em contraste com os demais grupos onde são todos absolutamente iguais, a ANOVA (não paramétrico) deve ser empregada.

Fonte: O autor (2024).

A constância da mediana dos valores de CT (mesmo que com variação, porém biologicamente considerada) em diferentes amostras sugere que não há degradação significativa do RNA viral nas condições estudadas, o que é importante para a confiabilidade dos testes diagnósticos de RT-PCR para SARS-CoV-2. A manutenção da normalidade dos dados, indicada pelos valores-*p* iguais ou não significativos no teste de Shapiro-Wilk, sugere que a distribuição dos valores de CT é muito próxima do uniforme, possivelmente devido as características de estabilidade ao RNA viral causadas pela refrigeração.

Os resultados listados na tabela 12 indicam uma homogeneidade nos valores de CT entre as amostras 1 a 6 e 8 a 12, enquanto a amostra 7 destaca-se com um valor de CT mediano mais elevado e uma distribuição que sugere não normalidade. Esta discrepância na amostra 7 chama atenção e poderia ser um indicativo de variação na qualidade das amostras, na eficácia do processo de inativação, na detecção do RNA viral, ou mais provavelmente na produção do meio. Variações nos valores de CT podem afetar a sensibilidade dos testes diagnósticos, o que destaca a importância de manter condições de coleta e processamento de amostras uniformes e controladas como destacado em seus estudos por Haberhausen et al. (1998), que evidencia a importância de padronizar os procedimentos de coleta e análise para garantir a confiabilidade dos resultados como a carga viral nos espécimes (270)

Na literatura, a estabilidade do RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras armazenadas tem sido amplamente estudada, especialmente em contextos em que a logística de armazenamento e transporte é um desafio. Por exemplo, um estudo realizado por Munne et al. (2021) demonstrou que a estabilidade do RNA viral pode ser afetada por vários fatores, incluindo variações no processo de extração do RNA, coleta da amostra, transporte, padronização do laboratório, controle de qualidade e kits com primers adequados (285).

A não normalidade dos valores de CT observados na amostra 7 também é um tópico de interesse, conforme discutido por Murphy et al. (2009), que ressalta a importância de considerar a qualidade da amostra e o manuseio cuidadoso no processamento para evitar variações que possam levar a erros na quantificação do RNA viral (286).

A Tabela 7 apresentada abaixo é um exemplo de uma análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis, que foi utilizada para avaliar a diferença entre os valores de CT de 12 amostras diferentes. Os resultados indicam uma diferença estatisticamente significativa com um valor- $p < 0,001^{***}$. O valor de chi-quadrado (χ^2), usado principalmente em estatísticas inferencial, foi usado para avaliar quantitativamente a relação do resultado do experimento e a distribuição esperada dos fenômenos, obtendo o resultado de 143. O valor de épsilon-quadrado (ϵ^2), que habitualmente apresenta-se como número inteiro não positivo zero, quando não, é considerado uma estimativa não-enviesada ou corrigida (274). A diferença entre medidas corrigidas e não corrigidas é referida como *contração* (275) A *contração* tende a diminuir à medida que o tamanho das amostras aumenta

e o número de preditores no modelo cai. No entanto, a *contração* tende a ser muito pequena se os efeitos forem grandes, independentemente do tamanho da amostra (276). No caso, o valor de ϵ^2 foi de 0,999, indicando que a grande maioria das amostras apresentam diferenças entre si, o que pode ser explicado devido a sua baixa dispersão dos dados uma vez que a temperatura controlada foi mais estável.

Tabela 13 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ϵ^2
CT	143	11	<0,001***	0,999

Nota: Teste de Shapiro-Wilk $p < 0,001$ *** hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante disso, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados indicam que existem diferenças entre os grupos analisados, sendo eles os grupos denominados amostras de 01 a 12.

Fonte: O autor (2024).

A variabilidade significativa nos valores de CT entre as amostras, podem ser influenciadas por inúmeras variáveis, incluindo a técnica de coleta, a manipulação, o armazenamento e o processamento das amostras. Estudos como os de Lieberman et al. (2020), podem explicar a variabilidade encontrada, onde a probabilidade da variabilidade entre as amostras, podem ser influenciadas por vários fatores, como os conjuntos de primers utilizados, a concentração inicial do vírus, a eficiência da coleta e da extração do RNA e a presença de inibidores (278). Um estudo de Smyrlaki et al. (2020), investigou a eficácia de diferentes métodos de extração de RNA e encontrou variações significativas na carga viral detectada, dependendo da técnica utilizada (249).

A Tabela 14 apresenta um conjunto de comparações par a par entre diferentes amostras testadas para a presença do SARS-CoV-2. Estes resultados nos ajudam a trazer um panorama biológico quanto a estabilidade das amostras. As estatísticas de teste W indicam a magnitude da diferença entre as amostras, enquanto os valores-p significativos (indicados por asteriscos) confirmam se essas diferenças são estatisticamente significativas, enquanto a nomenclatura NaN, indica que não há diferença entre as amostras comparadas. A nota sugere que, apesar das diferenças estatísticas, a correlação com a estabilidade do vírus quando comparado com um grupo ambiente não é clara, pois a detecção se manteve em uma avaliação semiquantitativa.

Tabela 14 – Comparações múltiplas Amostra x Amostra – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Amostra	Amostra	W	p
1	2	-6,78	<0,001***
1	3	-6,78	<0,001***
1	4	NaN	NaN
1	5	-6,78	<0,001***
1	6	-6,78	<0,001***
1	7	6,30	<0,001***
1	8	-6,78	<0,001***
1	9	-6,78	<0,001***
1	10	NaN	NaN
1	11	-6,78	<0,001***
1	12	-6,78	<0,001***
2	3	NaN	NaN
2	4	6,78	<0,001***
2	5	NaN	NaN
2	6	NaN	NaN
2	7	6,30	<0,001***
2	8	NaN	NaN
2	9	NaN	NaN
2	10	6,78	<0,001***
2	11	NaN	NaN
2	12	NaN	NaN
3	4	6,78	<0,001***
3	5	NaN	NaN
3	6	NaN	NaN
3	7	6,30	<0,001***
3	8	NaN	NaN
3	9	NaN	NaN
3	10	6,78	<0,001***
3	11	NaN	NaN
3	12	NaN	NaN
4	5	-6,78	<0,001***
4	6	-6,78	<0,001***
4	7	6,30	<0,001***
4	8	-6,78	<0,001***
4	9	-6,78	<0,001***
4	10	NaN	NaN
4	11	-6,78	<0,001***
4	12	-6,78	<0,001***
5	6	NaN	NaN
5	7	6,30	<0,001***
5	8	NaN	NaN
5	9	NaN	NaN
5	10	6,78	<0,001***
5	11	NaN	NaN
5	12	NaN	NaN
6	7	6,30	<0,001***
6	8	NaN	NaN
6	9	NaN	NaN
6	10	6,78	<0,001***
6	11	NaN	NaN
6	12	NaN	NaN
7	8	-6,30	<0,001***
7	9	-6,30	<0,001***
7	10	-6,30	<0,001*** ⁷

⁷ Tabela 14 continua na próxima página

7	11	-6,30	<0,001***
7	12	-6,30	<0,001***
8	9	NaN	NaN
8	10	6,78	<0,001***
8	11	NaN	NaN
8	12	NaN	NaN
9	10	6,78	<0,001***
9	11	NaN	NaN
9	12	NaN	NaN
10	11	-6,78	<0,001***
10	12	-6,78	<0,001***
11	12	NaN	NaN

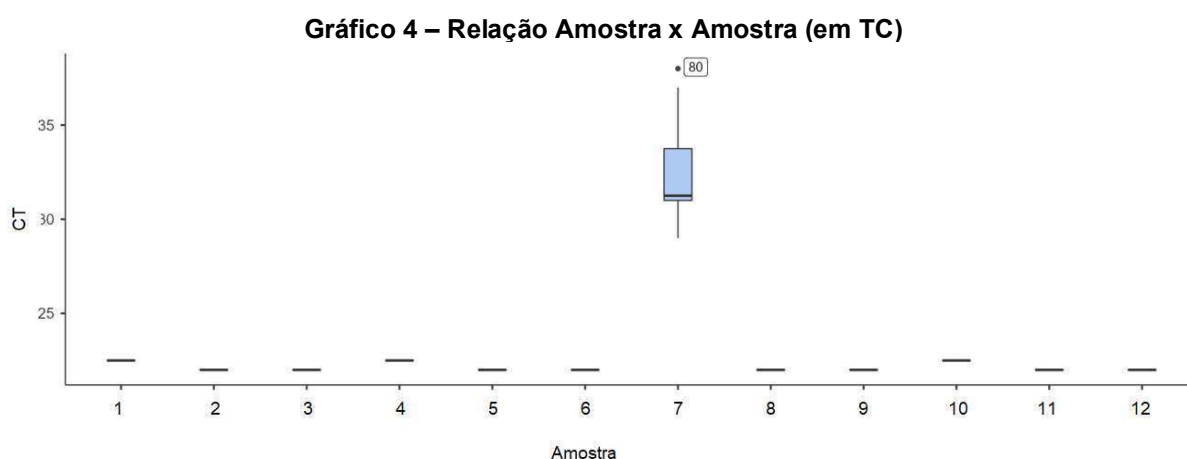
Nota: A comparação par a par mostra diversos grupos com diferenças estatísticas (sinalizados com *). O valor de W é calculado com uma estatística de teste de soma dos postos de Wilcoxon em cada par de grupos. O valor-p indica se há diferença estatística entre os pares. A presença dessa diferença não explica correlação com estabilidade quando se compara com o grupo temperatura ambiente, pois em uma avaliação semiquantitativa todos os grupos mantiveram-se detectados. O que se pode evidenciar é que os desvios padrão são menores quando comparados com o grupo temperatura ambiente.

Fonte: O autor (2024).

A análise de comparações múltiplas, é essencial para entender a variabilidade entre amostras. Esta variabilidade pode ser influenciada por diversos fatores biológicos, como descrito por Lieberman et al. (2020), como os conjuntos de primers utilizados, a concentração inicial do vírus, a eficiência da coleta e da extração do RNA e a presença de inibidores (278). Magnitudes menores em comparação com um grupo de temperatura ambiente, como mencionado na nota, podem apontar para a influência da temperatura na integridade das amostras, o que está alinhado com a literatura que, segundo Aboubakr et al. (2021), sugere que baixas temperaturas podem ajudar a preservar o material genético viral (267).

Na literatura científica, a variabilidade entre amostras testadas para SARS-CoV-2 é um tema recorrente. Estudos conduzidos por Aboubakr et al. (2021), e Van Doremalen et al. (2020), demonstram que a estabilidade do vírus e a eficiência da detecção podem variar devido a fatores como a técnica de coleta, o tipo de amostra, o armazenamento e o transporte (267,281). Diferenças significativas nos valores de CT, como evidenciado na amostra 7, podem refletir essas variações e impactar a interpretação dos resultados de testes diagnósticos. A significância estatística entre as amostras chama atenção para a qualidade do processo de RT-PCR, onde variações podem surgir devido à produção ou armazenamento de algumas amostras, tal como indicado por estudos como o de Smyrlaki et al. (2020), que discutem a influência da qualidade da extração do RNA e da presença de inibidores na eficiência do RT-PCR (249).

O gráfico 4 representa uma análise dos valores CT para diferentes amostras inoculadas com amostras de SARS-CoV-2 armazenadas em temperatura controlada. Observa-se que a maioria das amostras mantém um CT consistente e baixa variabilidade, exceto a amostra 7, que exibe um CT significativamente mais alto e maior dispersão (além de um *outlier*), o que sugere variabilidade ou uma possível anomalia técnica, provavelmente da amostra, durante o teste. Apesar da diferença pontual, existe uma mínima variabilidade de desvios padrões nas demais amostras sugerindo que a estabilidade do VTM semissólido em temperatura controlada é muito mais eficaz que em temperatura ambiente.



Nota: Neste gráfico de comparação entre as amostras, mesmo havendo diferenças estatísticas entre alguns pares, evidencia-se o pequeno desvio padrão (ou nulo) da grande maioria dos grupos, o que traz a perspectiva que a refrigeração manteve maior estabilidade do meio de transporte viral semissólido (VTM-SS). Na amostra 7, ao analisar os dados brutos, verifica-se que o resultado obteve um CT superior aos demais e com desvio padrão maior entre si. A corrida só foi aceita pois os parâmetros essenciais de controle foram completamente executados.
Fonte: O autor (2024).

A estabilidade do RNA viral é fundamental para garantir a confiabilidade dos testes de RT-PCR, que são a pedra angular do diagnóstico da COVID-19. As condições de armazenamento das amostras, especialmente em ambiente refrigerado, são conhecidas por preservar a integridade do RNA e minimizar a degradação. Isso é corroborado por Van Doremalen et al. (2020), que mostraram que o SARS-CoV-2 mantém a sua estabilidade em superfícies por um período estendido em temperaturas mais baixas (211)

No entanto, a variabilidade observada na amostra 7 do gráfico sugere que podem existir outros fatores em jogo, como a qualidade do meio, da amostra ou o procedimento de realização do RT-PCR. Murphy et al. (2009), destacam a importância

de seguir diretrizes estritas para a realização de testes de RT-PCR para assegurar a precisão dos resultados (286). Além disso, variabilidades técnicas no processo de RT-PCR, incluindo a manipulação da amostra e a calibração do equipamento, podem levar a resultados inconsistentes, como discutido por La Scola et al. (2020), Sule et al. (2020), Ren et al. (2020) (269,273,277). Isso reforça a necessidade de procedimentos padronizados e medidas rigorosas de controle de qualidade, que são essenciais para a detecção precisa do SARS-CoV-2, conforme recomendado por Munne et al. 2021 (285).

4.3 COMPARATIVO ENTRE ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE E TEMPERATURA CONTROLADA

A tabela 15 apresenta uma estatística descritiva comparativa dos valores de CT para testes de SARS-CoV-2 em todas as amostras armazenadas em temperatura ambiente (TA) e controlada (TC). Observa-se que as medianas dos valores de CT em TC são consistentemente mais baixas do que em TA, sugerindo uma menor degradação do RNA viral sob refrigeração. Os testes de Shapiro-Wilk indicam que os dados de CT em TA e TC não estão normalmente distribuídos, como demonstrado pelos valores-*p* significativos.

Tabela 15 – Estatística descritiva comparação TA x TC

Parâmetro	Temperatura	CT	Tempo
N	TA	144	144
	TC	144	144
Mediana	TA	24,0	36,0
	TC	22,0	36,0
W de Shapiro-Wilk	TA	0,745	0,856
	TC	0,366	0,856
<i>p</i> de Shapiro-Wilk	TA	<0,001 ***	<0,001 ***
	TC	<0,001 ***	<0,001 ***
25º Percentil	TA	22,5	18,0
	TC	22,0	18,0
75º Percentil	TA	25,0	54,0
	TC	22,5	54,0

Nota: Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados onde H_0 = a população está normalmente distribuída. $p < 0,001$ hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Considerando a ausência de normalidade dos dados de ambos os grupos (TA e TC), foi utilizado o teste ANOVA a um fator não-paramétrica (Kruskal-Wallis).

Fonte: O autor (2024).

Esses resultados são consistentes com os dados da literatura, que indicam que a temperatura é um fator importante que influencia na replicação ou estabilidade no

ambiente do vírus SARS-CoV-2, o agente causador da COVID-19. Estudos anteriores, como os de Mu et al. (2020) e Yin et al. (2020) mostraram que o SARS-CoV-2 cresce mais rapidamente em temperaturas mais altas, com uma temperatura ótima de replicação de 37 °C (287,288). Além disso, Yin et al. (2020) descreveu que o tempo de crescimento do SARS-CoV-2 é inversamente proporcional à temperatura, de modo que o vírus cresce mais lentamente em temperaturas mais baixas (288).

Os resultados da Tabela 15 sugerem que o resfriamento das amostras de COVID-19 pode ser uma estratégia eficaz para retardar a degradação do vírus. Essa estratégia pode ser útil para o transporte e armazenamento de amostras de COVID-19, bem como para o manejo clínico de ambientes infectados como relatado por Munne et al. (2021) (285).

A Tabela 16 apresenta os resultados da análise descritiva de dados dos CTs de ambos os grupos analisados. Os resultados da tabela indicam que existe diferença estatística entre os CTs de amostras condicionadas em TA e TC ($p < 0,001^{***}$).

Tabela 16 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ϵ^2
CT	108	1	<0,001 ***	0,376

Nota: Teste de Shapiro-Wilk, com $p < 0,001^{***}$ hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante disso, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados indicam que existe diferença entre os CTs dos grupos analisados, sendo eles TA e TC, o que nas tabelas anteriores fica evidente a superior estabilidade da TC.

Fonte: O autor (2024).

O mesmo pensamento pode ser aplicado a Tabela 17 que mostra os resultados da análise estatística comparando os grupos TA e TR como um todo. O teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner foi aplicado para realizar comparações múltiplas, e os resultados indicam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001^{***}$) entre os dois grupos.

Tabela 17 – Comparações múltiplas TA x TC – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Temperatura	Temperatura	W	p
TA	TC	-14,7	<0,001 ***

Nota: Comparando majoritariamente os grupos TA e TC evidencia-se a diferença estatística entre eles.

Fonte: O autor (2024).

Já se conseguiu identificar que a estabilidade do RNA viral pode ser comprometida à temperatura ambiente, resultando em degradação e consequente

aumento do CT, como discutido por Krüger et al. (2020), que destacou que o armazenamento inadequado de amostras pode levar a variações significativas nos resultados dos testes de PCR para SARS-CoV-2 (289).

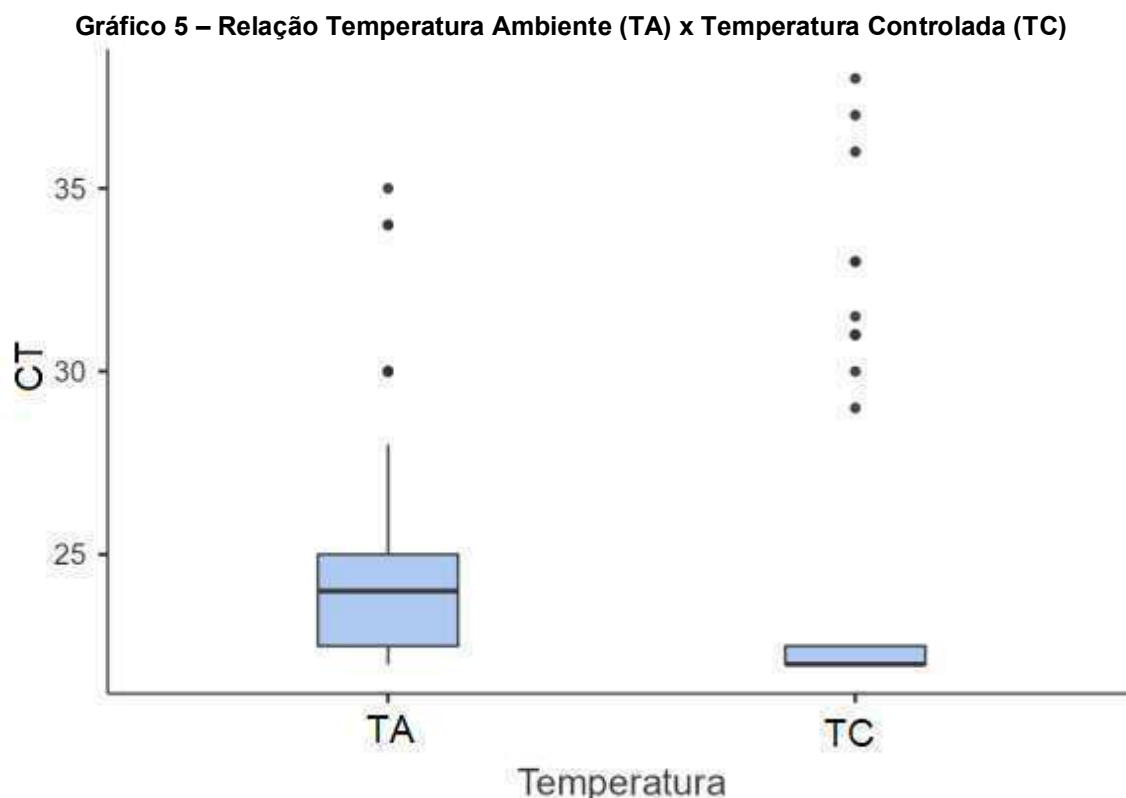
A alta estabilidade observada nas amostras refrigeradas é corroborada por estudos como o Chin et al. (2020), Maroto et al. (2017), Aboubakr et al. (2021) e Baker et al. (2022) (212,265,267,271), que relataram (de forma direta ou não) menor degradação do RNA viral e melhor detecção do vírus em amostras armazenadas em condições frias.

Essa estabilidade é crítica para garantir que os testes de PCR reflitam com precisão a carga viral, especialmente quando as amostras precisam ser transportadas ou armazenadas por períodos prolongados antes do teste, como no caso de centros de teste remotos ou durante surtos em regiões com recursos limitados, como descrito por Munne et al. (2021) e Patkar et al. (2021) (285,290).

Além disso, o menor desvio padrão observado no grupo com temperatura controlada implica uma maior consistência nos resultados, o que é essencial para o monitoramento da evolução da pandemia e para estudos epidemiológicos longitudinais, onde medidas precisas e repetíveis de CT são necessárias. Isso é sustentado pelos achados de Sule et al. (2020), e Murphy et al. (2009), que enfatizou a necessidade de práticas de manuseio de amostras padronizadas para garantir a validade dos dados de CT ao longo do tempo (273,286).

A significância estatística obtida ($p < 0,001^{***}$) reforça a robustez dos resultados e a necessidade de diretrizes claras para o armazenamento de amostras, como descrito nas diretrizes para coleta e manuseio de amostras clínicas para testes de COVID-19 do CDC (280).

O Gráfico 5 mostra a relação entre a temperatura de armazenamento e os valores de ciclo de limiar (CT) para testes de PCR em tempo real. Os pontos no gráfico representam valores individuais de CT para amostras armazenadas à TA e em TC. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado e indicou que os dados não estão normalmente distribuídos ($p < 0,001^{***}$), o que levou ao uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as medianas dos valores de CT entre os dois grupos.



Nota: Evidencia-se menor desvio padrão no grupo TC quando comparado ao grupo TA, indicando melhor estabilidade do VTM semissólido quando armazenado entre 2 a 8 °C.

Fonte: O autor (2024).

A menor dispersão dos valores de CT no grupo TC sugere que a refrigeração pode contribuir para a estabilidade do RNA viral, limitando a degradação e proporcionando resultados de teste mais consistentes. Isso é consistente com estudos como o de Chia et al. (2020), Chin et al. (2020), Maroto et al. (2017), Aboubakr et al. (2021), Van Doremalen et al. (2020), Baker et al. (2022), Yilmaz et al. (2021) e Agaoglu et al. (2022) (199,212,265,267,271,279,281,283).

Maroto et al. (2017), Huang et al. (2021), e Lieberman et al. (2020), em seus estudos discursaram em algum momento sobre estabilidade do RNA viral ser um componente crucial para a precisão diagnóstica, especialmente para a detecção de SARS-CoV-2, onde a carga viral pode ser um fator preditivo para a gravidade da doença (265,266,278). Portanto, os achados do experimento reforçam as práticas recomendadas de armazenamento de amostras, que podem ser críticas para testes de larga escala e estudos epidemiológicos.

A análise estatística robusta que identifica diferenças significativas entre os grupos de armazenamento fornece um suporte empírico para a otimização dos protocolos de coleta e armazenamento de amostras em pesquisa e diagnóstico de

COVID-19. A importância de manter a integridade das amostras de RNA para testes confiáveis de PCR é bem estabelecida, e estudos adicionais podem ser direcionados para determinar as melhores práticas de armazenamento para diferentes tipos de amostras e contextos de teste.

4.4 TESTES DE DETECÇÃO EM DIFERENTES DISTÂNCIAS

A tabela 18 apresenta a estatística descritiva que relaciona a distância com o parâmetro CT. Os dados estão distribuídos em grupos correspondentes a distâncias (10 cm, 50 cm, 100 cm, 150 cm, 200 cm), com métricas como a mediana, teste de Shapiro-Wilk (para normalidade) e percentis (25º e 75º) reportados.

Tabela 18 – Estatística descritiva da relação Distância x CT

Parâmetro	Distância (cm)	CT
N	10	8
	50	8
	100	8
	150	8
	200	8
Mediana	10	18,5
	50	19,5
	100	23,0
	150	23,5
	200	36,0
W de Shapiro-Wilk	10	0,665
	50	0,798
	100	0,849
	150	0,767
	200	0,966
p de Shapiro-Wilk	10	<0,001***
	50	0,027*
	100	0,093
	150	0,013**
	200	0,861
25º Percentil	10	18,0
	50	19,0
	100	22,8
	150	23,0
	200	31,8
75º Percentil	10	19,0
	50	20,0
	100	23,3
	150	29,8
	200	37,3

Nota: Dados descritivos tabulados fornecidos pelo programa estatístico R (R Core Team, 2022. R: A Language and environment for statistical computing. Versão 4.1), referente a cinco experimentos distintos, com oito replicatas por grupo e distribuídos nos grupos denominados 10, 50, 100, 150, e 200 cm. A tabulação mostra que devido aos valores-p de um dos grupos pelo teste de Shapiro-Wilk terem dado <0,001***, a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos assim sendo, um teste não paramétrico (ANOVA) deve ser aplicado.

Fonte: O autor (2024).

Observando a mediana dos valores de CT em diferentes distâncias, nota-se um aumento dos valores de CT conforme há o distanciamento da fonte disseminadora, o que sugere uma menor aderência da carga viral. Dados estes, consistentes com a literatura produzida por Setti et al. (2020), onde descreve a redução da carga viral com o aumento da distância dos pacientes infectados (34). Por exemplo, se CT representa valores de ciclos para detecção de testes de RT-PCR para SARS-CoV-2, estudos anteriores mostraram que o valor de CT pode estar associado com a carga viral e a infectividade. Um estudo de La Scola et al. (2020) indicou que pacientes com CT acima de 33-34 têm pouca probabilidade de serem infecciosos (277). A mediana dos valores de CT observados na tabela para distâncias maiores poderia ser discutida em relação à possível diminuição da carga viral com o aumento da distância, um achado que está em consonância com a pesquisa de Van Doremalen et al. (2020), que destacou a diminuição da viabilidade do vírus com a distância aumentada (281).

É importante notar que os valores- p de Shapiro-Wilk abaixo de 0,05 indicam uma distribuição não normal, o que é particularmente evidente nos grupos de distâncias maiores (150 e 200 cm). Isso pode ser comparado com estudos de Puthussery et al. (2023), Chen et al. (2021), Jayaweera et al. (2020), Tang et al. (2020), Guo et al. (2020) e Morawska et al. (2009), que analisaram a dispersão de aerossóis, onde a variabilidade na dispersão poderia contribuir para uma distribuição não uniforme da carga viral (35,198,200,291–293). Além disso, a aplicação do teste de Shapiro-Wilk e a subsequente rejeição da hipótese de normalidade dos dados reforça a importância de aplicar métodos estatísticos adequados ao analisar dados de PCR em tempo real, como discutido por Feng et al. (2020), que ressaltam a variação substancial que pode ocorrer em amostras biológicas (294).

Vale ressaltar que estudos sobre a transmissão do vírus em diferentes distâncias, como os realizados por Bourouiba et al. (2014), enfatizam o papel de gotículas de aerossol em transmissões de longa distância em relação à quantidade de carga viral (258).

Por intermédio da Tabela 19, pode-se visualizar os resultados do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados mostram diferenças significativas entre os grupos como um todo, o que corrobora a ideia de que a vírus do SARS-CoV-2 infecta os VTM-SS de maneira heterogênea, algo que é espelhado nos resultados da tabela apresentada.

Tabela 19 – ANOVA a um fator (não paramétrica) – Kruskal-Wallis

	χ^2	gl	p	ε^2
CT	34,9	4	<0,001***	0,0894

Nota: Teste de Shapiro-Wilk: com $p < 0,001$ *** hipótese nula é rejeitada, ou seja, os dados testados não são normalmente distribuídos. Diante disso, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os resultados indicam que existem diferenças entre os grupos analisados, sendo eles 10, 50, 100, 150 e 200 cm.

Fonte: O autor (2024).

A análise não paramétrica é particularmente útil em dados de COVID-19 devido à natureza não normal de muitos parâmetros clínicos e laboratoriais relatados conforme descrito por Martin et al. (2020). Esta metodologia permite uma análise mais robusta em situações em que os pressupostos de normalidade não são atendidos, o que é frequentemente o caso em dados complexos como os gerados durante a pandemia (295).

A tabela 20 apresenta um conjunto de comparações múltiplas entre diferentes distâncias e seus respectivos valores estatísticos W de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, acompanhados pelos valores- p . A nota abaixo da tabela destaca que valores- p abaixo de 0,05 indicam uma diferença marginalmente significativa entre grupos temporais.

Tabela 20 – Comparações múltiplas Distância x Distância – Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

Distância (cm)	Distância (cm)	W	p
10	50	3,85	0,050*
10	100	4,87	0,005**
10	150	4,86	0,005**
10	200	4,83	0,006**
50	100	4,85	0,006**
50	150	4,84	0,006**
50	200	4,81	0,006**
100	150	2,39	0,440
100	200	4,80	0,006**
150	200	3,75	0,062

Nota: Os valores- p apontam que existem diferenças estatísticas entre as distâncias em diferentes grupos comparados. Chama-se atenção para os grupos comparativos 100 e 150 cm, e 150 e 200 cm os quais não apresentam diferenças. Isto possivelmente se dá a maior dispersão dos dados devido ao distanciamento da fonte propagadora e consequentemente perda da capacidade de detecção eficiente. Fonte: O autor (2024).

Os dados da Tabela 20 sugerem que, com um valor de W significativamente maior nas comparações entre algumas distâncias maiores, pode haver uma

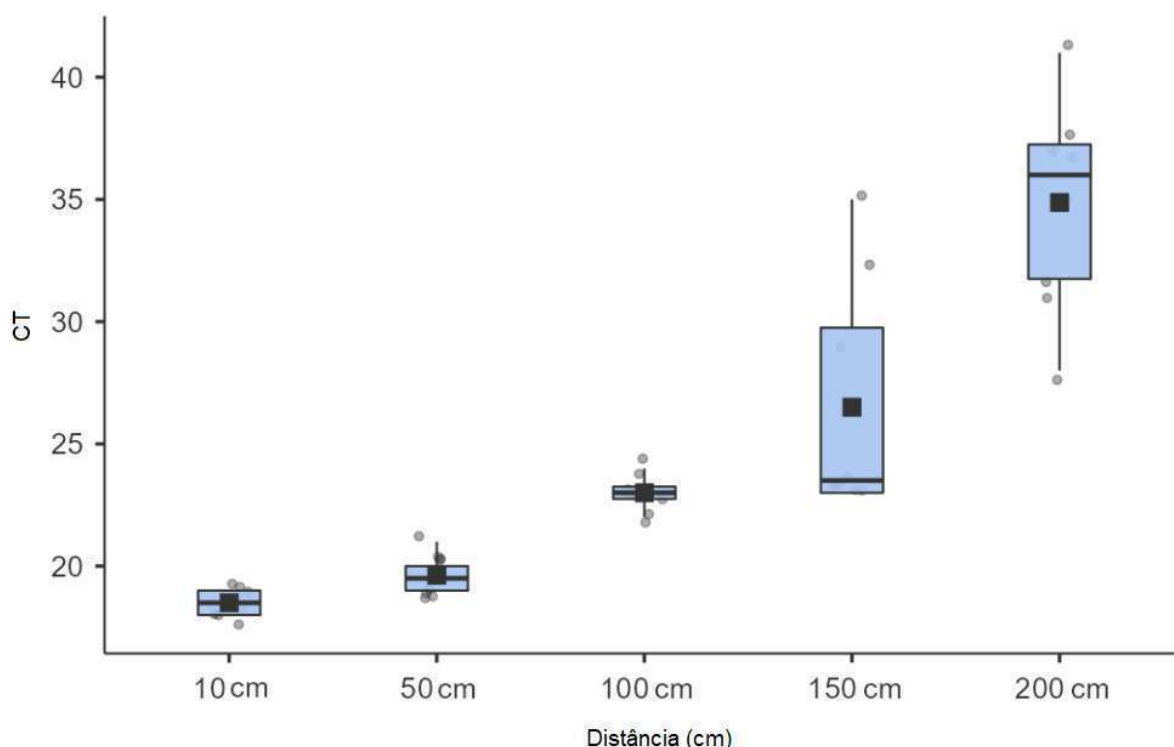
diminuição na concentração ou viabilidade do vírus com o aumento da distância. Isso se alinha com as descobertas de Liu et al. (2020), que detectaram o RNA viral em aerossóis a diferentes distâncias de pacientes, com uma tendência de diminuição na detecção com o aumento da distância (296). Entretanto, a significância marginal indicada pelo valor-*p* relevante, sugere que outros fatores como a circulação de ar e a umidade, também desempenham um papel importante na dispersão do vírus, conforme discutido por Aboubakr et al. (2021) (267).

É fundamental considerar que a estabilidade do SARS-CoV-2 em suspensões de aerossóis pode variar com a distância o que poderia explicar a diferença marginal entre os grupos. Estudos como o de Puthussery et al. (2023), demonstraram que a estabilidade viral em aerossóis é influenciada por vários fatores ambientais, o que poderia potencialmente impactar a reprodutibilidade dos dados ao longo prazo (35).

A discussão científica deve ser rigorosa e baseada em evidências, ressaltando a importância de um número maior de amostras para confirmar as observações e a necessidade de considerar variáveis ambientais e técnicas nos resultados. O estudo atual reforça a necessidade de diretrizes de segurança baseadas em evidências para minimizar a transmissão aérea do COVID-19, como sugerido por organizações de saúde pública (131).

No Gráfico 6 apresenta no eixo y, o CT, que é uma medida semiquantitativa usada em RT-PCR para determinar a quantidade de material genético, como o RNA viral em uma amostra. No eixo x, a distância variando de 10 a 200 cm. O gráfico indica que o CT aumenta com a distância, sugerindo uma diminuição na detecção do material genético do vírus conforme aumenta a distância da fonte disseminadora.

Gráfico 6 – Distância x CT



Nota: Neste experimento comparou-se as distâncias com o CT, verificando que há uma queda na detecção (evidenciado pelo aumento do CT e desvio padrão) conforme se afasta o dispositivo da fonte disseminadora.

Fonte: O autor (2024).

Estudos que sugerem que a transmissão de partículas virais, como o SARS-CoV-2, diminui com o aumento da distância entre a fonte e o receptor. Por exemplo, em trabalhos como o de Tang et al. (2020), observou-se que a probabilidade de transmissão é significativamente reduzida onde as distâncias são superiores a 2 m (292), redução também observada no CT à medida que a distância da fonte aumenta, isto é consistente com estudos que demonstram a diminuição da concentração de partículas virais com o aumento da distância de uma fonte disseminadora (34). Este padrão de dispersão de partículas pode ser explicado pelas dinâmicas de fluxo de ar e sedimentação gravitacional (293). Além disso, a variabilidade do CT entre as distâncias pode ser discutida em relação ao tamanho e à massa das partículas virais, influenciando sua capacidade de permanecer em suspensão e, consequentemente, seu potencial de infecção.

4.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO VTM SEMISSÓLIDO

O diagnóstico de uma enfermidade é estabelecido por meio da anamnese e de exames complementares, tais como os testes laboratoriais. Estes podem conduzir a resultados falsos-positivos (quando o teste indica positivo, mas o indivíduo não está acometido pela doença) ou falsos-negativos (quando o teste é negativo, mas a pessoa apresenta a doença). Logo, a interpretação apropriada de um teste laboratorial transcende a mera verificação do resultado obtido, demandando competência do executor/pesquisador para avaliar as características do teste solicitado.

Ao desenvolver um novo exame diagnóstico, como no contexto do diagnóstico da COVID-19, o pesquisador estipula um limiar, a partir do qual decide se o resultado será positivo ou negativo. Nesse ponto, entram em cena a sensibilidade e a especificidade, duas variáveis cruciais para mensurar e identificar a exatidão diagnóstica de um teste, sendo assim, pode-se definir *Sensibilidade* como a capacidade de um teste ou modelo em identificar corretamente os casos positivos entre todos os casos verdadeiramente positivos. Ou seja, capacidade de detectar o vírus quando o vírus está presente. Pode ser determinada pela equação 1. E *Especificidade* como a capacidade de um teste ou modelo em identificar corretamente os casos negativos entre todos os casos verdadeiramente negativos. Ou seja, capacidade de detectar um resultado negativo, quando o vírus não está presente. Pode ser calculada pela equação 2.

Equação 1 – Sensibilidade

$$Sensibilidade = \frac{Verdadeiros\ Positivos}{Verdadeiros\ Positivos + Falsos\ Negativos}$$

Equação 2 - Especificidade

$$Especificidade = \frac{Verdadeiros\ Negativos}{Verdadeiros\ Negativos + Falsos\ Positivos}$$

Nos testes realizados, a sensibilidade foi de 100% para as distâncias de 10 , 50 , 100 e 150 cm (pois considerou-se todas as replicatas, de todos os grupos como positivas) e de 87,5% para distância de 200 cm (pois uma replicata do grupo se apresentou negativa). Considerando o controle negativo como única amostra verdadeira negativa, a especificidade foi de 100% em todas as distâncias. Os dados

brutos utilizados para os cálculos, podem ser encontrados no APÊNDICE A desde documento.

A sensibilidade e a especificidade são medidas cruciais para a avaliação de testes diagnósticos, incluindo aqueles para COVID-19. Por exemplo, um estudo de Arevalo-Rodriguez et al. (2020), avaliou a precisão de testes de antígeno rápido para COVID-19 e encontrou uma ampla variação na sensibilidade, destacando a importância de selecionar testes com alta sensibilidade para evitar falsos negativos, que poderiam resultar em não isolamento de casos infectados (297). A especificidade, é igualmente importante e se refere à capacidade de um teste em identificar corretamente dispositivos não infectados; testes com alta especificidade geram menos falsos positivos.

Esses conceitos têm sido aplicados na prática clínica e na saúde pública para a tomada de decisões durante a pandemia de COVID-19. Testes com alta sensibilidade são preferenciais para rastreamento em populações de alto risco, como foi discutido por Zhang et al. (2021), que enfatizou a importância de testes sensíveis em ambientes de cuidados de saúde para prevenir surtos em hospitais (298). Por outro lado, a especificidade é particularmente crítica em cenários de baixa prevalência da doença, onde o risco de falsos positivos é mais prejudicial, como observado por Sutton et al. (2020) (299).

É importante notar que há um *trade-off* entre sensibilidade e especificidade, como explorado por Lippi et al. (2020), que analisou como a escolha de um teste pode afetar o manejo dos pacientes e as estratégias de saúde pública (300). A escolha entre um teste com maior sensibilidade ou especificidade pode depender do contexto clínico e dos objetivos do rastreamento ou diagnóstico.

Comparando com outras modalidades de testes, os testes moleculares, como o RT-PCR, tendem a ter uma alta sensibilidade e são considerados o padrão-ouro para o diagnóstico da COVID-19 (301). No entanto, sua sensibilidade pode ser afetada por fatores pré-analíticos, como a qualidade da amostra e as condições de armazenamento, como demonstrado pela diferença nos valores de CT entre amostras armazenadas em temperatura ambiente e controladas.

Testes de antígeno, por sua vez, oferecem a vantagem da rapidez e praticidade, embora geralmente apresentem menor sensibilidade quando comparados ao RT-PCR, o que pode levar a um aumento nos falsos negativos, especialmente em indivíduos assintomáticos ou com carga viral baixa (297). Este fato sublinha a

necessidade de selecionar cuidadosamente os testes com base no contexto de aplicação e na prevalência da doença.

O equilíbrio entre sensibilidade e especificidade deve ser cuidadosamente considerado quando se escolhe uma estratégia de testagem. Em um ambiente com alta prevalência de infecção, um teste com alta sensibilidade pode ser mais valioso do que um com alta especificidade, pois o objetivo é identificar e isolar o maior número possível de casos verdadeiros positivos. Por outro lado, em ambientes com baixa prevalência, um teste altamente específico é preferível para evitar o impacto negativo dos falsos positivos (300).

Os dados discutidos ressaltam a importância de selecionar testes diagnósticos com base nas suas propriedades de sensibilidade e especificidade, considerando o contexto clínico e epidemiológico. A escolha do teste adequado deve ser informada por dados empíricos e adaptada às necessidades específicas da população alvo, a fim de otimizar os recursos e estratégias de saúde pública durante a pandemia de COVID-19.

4.6 SUGESTÕES DE FUTUROS TRABALHOS

Primeiramente, é crucial abordar as limitações e lacunas identificadas no estudo. Testes complementares são demasiadamente importantes para responder às perguntas não contempladas na pesquisa. Assim, sugere-se:

- (1) Avaliar o desempenho do VTM-SS na manutenção da carga viral, por meio de exames RT-PCR quantitativos;
- (2) Segmentar os parâmetros avaliados com menores distribuições nas variáveis ou inserção de novos pontos (temperaturas mais baixas e mais altas, avaliação da relação tempo de detecção e carga viral, detecção em maiores distâncias da fonte contaminante;
- (3) Realização de estudos com maior número de amostras (N) para melhor delineamento das análises estatísticas;
- (4) Validação da técnica de forma individual com diferentes patógenos de interesse, tais como: Influenza A, Influenza B, sincicial respiratório e adenovírus, além, evidentemente, de eventuais cepas que venham a se desenvolver ao longo dos anos;
- (5) Exposição do VTM-SS em ambientes reais de contaminação (hospitais, UTIs, laboratórios, casas de pacientes contaminados) para validação biológica;

(6) Validação da técnica baseada em protocolos de painel viral, com detecção simultânea de vários patógenos.

Esta linha complementar levaria a melhorias significativas na prática de testagem e monitoramento da doença em dispositivos baseados em VTM-SS. Em um segundo plano, mas não menos importante, é essencial explorar como as descobertas atuais podem ser aplicadas em diferentes contextos. Isso inclui por exemplo:

(1) Investigar a estabilidade de diferentes formulações de VTM-SS para garantir sua constante melhoria com o avanço da tecnologia e dos patógenos de interesse;

(2) Investigar a influência de diferentes materiais de base (cobre, aço, polímeros) na construção dos dispositivos de sensoriamento;

(3) Desenvolver técnicas baseadas em bioatração, a partir de processos de eletrização para assegurar e potencializar a captação do vírus pelo meio VTM-SS;

(4) Desenvolver estudos baseados na detecção de ambientes condicionados, com tráfego de ar ativo e, conseqüentemente, máquinas de captação forçada do ar atmosférico;

(5) Desenvolver tecnologia em formato de refil de VTM-SS para aparatos de uso comum baseados na distribuição de gases (redes de oxigenação hospitalar, sucção, atmosfera negativa).

5 CONCLUSÕES

Nesta investigação, focou-se no desenvolvimento e avaliação de um novo meio VTM semissólido, o qual mostrou-se altamente eficaz na detecção do vírus causador da COVID-19 em distâncias de até 100 cm da fonte disseminadora.

As principais conclusões advindas do estudo realizado podem ser sintetizadas em:

(1) A adição de 0,3% de ágar base (ou 3g/L) na formulação do Meio de Transporte Viral (VTM), baseada nos protocolos do CDC (255) é capaz de produzir uma base homogênea e com características semissólidas conforme os manuais de Microbiologia Clínica (256), resultando no VTM-SS;

(2) A estabilidade do VTM-SS é confirmada com seus resultados detectados quanto às variáveis temperatura ambiente (TA 18 °C a 22 °C) e temperatura controlada (TC 2 °C a 8 °C), assim como os pontos temporais (basal, 24h, 48h e 72h), não havendo diferença quando considerada uma análise semiquantitativa. Adicionalmente, estudos estatísticos inferenciais demonstraram que o VTM-SS quando mantido em TC possui maior estabilidade ao longo do tempo;

(3) Na avaliação por distância, os resultados obtidos indicam eficiência na detecção do vírus em todos os testes realizados em até 150 cm, ressaltando que até a distância de 100 cm o desvio padrão foi muito baixo. Na distância de 200 cm, uma das amostras analisadas mostrou-se não detectada, corroborando com o aumento do desvio padrão a partir de 150 cm;

(4) Os cálculos baseados nos resultados obtidos mostram sensibilidade de 100% até a distância de 150 cm e 87,5% até 200 cm. A especificidade ficou com 100% em todas as distâncias testadas. Resultados baseados na capacidade de detecção do meio VTM-SS. Portanto, o VTM-SS aplicado como dispositivo para exposição ambiental, é capaz de detectar o vírus do SARS-CoV-2 até 1,5 m de distância, podendo ser usado em conjunto com outros para cobertura total das áreas de interesse.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1.1 Contribuições do trabalho

A partir das conclusões apresentadas, o trabalho realizado poderá contribuir significativamente para o campo de controle de infecções, demonstrando eficácia dos dispositivos de Meio de Transporte Viral (VTM) Semissólido na coleta do SARS-CoV-2 do ambiente. Como contribuições deste trabalho, destaca-se em quatro eixos principais:

(1) No âmbito científico, as descobertas realçam a importância das condições de armazenamento para a integridade do RNA viral, afetando diretamente a detecção e quantificação do vírus, um fator crítico para o diagnóstico preciso da COVID-19. Essas contribuições auxiliam a comunidade científica na manutenção adequada de suas amostras, trazendo mais um resultado para corroborar com outros trabalhos existentes. Além disso, de forma inédita, descreve com seus dados a sobrevivência do vírus do SARS-CoV-2 em superfícies como meios de transporte viral em estados da matéria semissólido;

(2) No âmbito industrial, este estudo resultará numa patente de invenção que poderá ser usada como base para o uso de dispositivos baseados em VTM semissólido como uma solução com maior sensibilidade e especificidade quando comparado às tecnologias atuais, para o monitoramento em tempo real da presença do vírus;

(3) Tecnicamente, destaca a aplicabilidade de dispositivos VTM semissólidos na vigilância de ambientes, oferecendo uma solução inovadora para detecção do vírus em espaços públicos;

5.1.2 Perspectivas futuras

A partir do desenvolvimento deste trabalho vislumbra-se um novo horizonte para o futuro, no qual ocorrerá o aprimoramento constante dos métodos de detecção do SARS-CoV-2 no ambiente. Isso inclui a validação do método de coleta e transporte de monitorização ambiental juntamente com testes moleculares rápidos ou de fácil logística como, por exemplo, o PCR-LAMP desenvolvido para diagnóstico do SARS-CoV-2 da Hilab[®], um dispositivo pequeno e portátil, que pode ser carregado para qualquer lugar de interesse, mudando assim a perspectiva de logística das amostras,

onde não mais os VTM-SS serão enviados aos laboratórios de referência, mas sim os laboratórios de referência vão até os lugares de interesse.

Por fim, é importante considerar o impacto a longo prazo dessas pesquisas. Estudos futuros deverão visar não apenas a compreensão imediata da doença, mas também como se pode melhor preparar para pandemias futuras, tanto em termos de prevenção quanto de resposta. Este é um campo de pesquisa em constante evolução, e permanecer na vanguarda da ciência é crucial para proteger a saúde global.

REFERÊNCIAS

1. Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *The indian journal of pediatrics*. 2020;87(4):281–6.
2. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The lancet*. 2020;395(10223):507–13.
3. Wang L, Duan Y, Zhang W, Liang J, Xu J, Zhang Y, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of 26 cases of COVID-19 arising from patient-to-patient transmission in Liaocheng, China. *Clin Epidemiol*. 2020;387–91.
4. Khinchi MP, Khan MS, Saluja SS. Coronavirus Pandemic: Emergence, Transmission, Preventive Measures and Management. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2020;8(2):45–9.
5. Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B. 1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*. 2021;184(9):2348–61.
6. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1).
7. Peiris JSM, De Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):243–67.
8. Peiris M. Pathogenesis of avian flu H5N1 and SARS. In: *Innate Immunity to Pulmonary Infection: Novartis Foundation Symposium 279*. Wiley Online Library; 2006. p. 56–65.
9. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017 Jun 29;546(7660):646–50.
10. Ge XY, Li JL, Yang X Lou, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013;503(7477):535–8.
11. Azhar EI, Velavan TP, Rungsung I, Traore T, Hui DS, McCloskey B, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus—a 10-year (2012-2022) global analysis of human and camel infections, genomic sequences, lineages, and geographical origins. *International Journal of Infectious Diseases*. 2023;131:87–94.

12. Habas K, Nganwuchu C, Shahzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020;18(12):1201–11.
13. Zhang L, Jiang Y, He J, Chen J, Qi R, Yuan L, et al. Intranasal influenza-vectored COVID-19 vaccine restrains the SARS-CoV-2 inflammatory response in hamsters. *Nat Commun.* 2023 Dec 1;14(1).
14. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3.
15. Han GZ. Pangolins Harbor SARS-CoV-2-Related Coronaviruses. Vol. 28, *Trends in Microbiology.* Elsevier Ltd; 2020. p. 515–7.
16. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–80.
17. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281–92.
18. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Mil Med Res.* 2020;7:1–10.
19. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine & International Health.* 2020 Mar 16;25(3):278–80.
20. Heffernan DS, Evans HL, Huston JM, Claridge JA, Blake DP, May AK, et al. Surgical infection society guidance for operative and peri-operative care of adult patients infected by the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Surg Infect (Larchmt).* 2020;21(4):301–8.
21. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581(7807):221–4.
22. Hoffmann M, Hofmann-Winkler H, Smith JC, Krüger N, Arora P, Sørensen LK, et al. Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. *EBioMedicine.* 2021;65.

23. Yan Z, Zhang H, Cao J, Zhang C, Liu H, Huang H, et al. Characteristics and Risk Factors of Cytokine Release Syndrome in Chimeric Antigen Receptor T Cell Treatment. *Front Immunol*. 2021 Feb 23;12.
24. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020 Oct 1;26(10):1636–43.
25. Fernández Botrán R. Asociación del grupo sanguíneo ABO con susceptibilidad al COVID-19. 2020;
26. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature* [Internet]. 2021 Mar 4;591(7848):92–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-03065-y>
27. Khunti K, Singh AK, Pareek M, Hanif W. Is ethnicity linked to incidence or outcomes of covid-19? Vol. 369, *Bmj*. British Medical Journal Publishing Group; 2020.
28. Wilson NM, Norton A, Young FP, Collins DW. Airborne transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 to healthcare workers: a narrative review. *Anaesthesia*. 2020;75(8):1086–95.
29. Carraturo F, Del Giudice C, Morelli M, Cerullo V, Libralato G, Galdiero E, et al. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environmental pollution*. 2020;265:115010.
30. Smith DJ, Hakim AJ, Leung GM, Xu W, Schluter ; W William, Novak RT, et al. COVID-19 Mortality and Vaccine Coverage — Hong Kong Special Administrative Region [Internet]. China ; 2022 Jan. Available from: <https://www.ceo.gov>.
31. Tenforde MW, Self WH, Gaglani M, Ginde AA, David ;, Douin J, et al. Effectiveness of mRNA Vaccination in Preventing COVID-19–Associated Invasive Mechanical Ventilation and Death [Internet]. United States; 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr>
32. Siddique RF, Ahmed O, Hossain KN. Relationship between the fear of COVID-19 disease and sleep quality: the mediating role of stress. *Heliyon*. 2021 May 1;7(5).

33. Wrenn JO, Pakala SB, Vestal G, Shilts MH, Brown HM, Bowen SM, et al. COVID-19 severity from Omicron and Delta SARS-CoV-2 variants. *Influenza Other Respir Viruses*. 2022 Sep 1;16(5):832–6.
34. Setti L, Passarini F, De Gennaro G, Barbieri P, Perrone MG, Borelli M, et al. Airborne transmission route of covid-19: Why 2 meters/6 feet of inter-personal distance could not be enough. Vol. 17, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2020.
35. Puthussery J V., Ghumra DP, McBrearty KR, Doherty BM, Sumlin BJ, Sarabandi A, et al. Real-time environmental surveillance of SARS-CoV-2 aerosols. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).
36. Kähkönen AK, Evangelista P, Hallikas J, Immonen M, Lintukangas K. COVID-19 as a trigger for dynamic capability development and supply chain resilience improvement. *Int J Prod Res*. 2023;61(8):2696–715.
37. Talbot HKB, Crowe JE, Edwards KM, Griffin MR, Zhu Y, Weinberg GA, et al. Coronavirus infection and hospitalizations for acute respiratory illness in young children. *J Med Virol*. 2009 May;81(5):853–6.
38. Soares RM, Domingues M, Maria De Araújo Hartz Z, Do M, Leal C. An evaluation of action taken to control syphilis and HIV in public-sector prenatal care in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. Vol. 12, *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2012.
39. Osterhaus ADME. New respiratory viruses of humans. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(10):S71–4.
40. OMS. WHO Mortality Database. Deaths by sex and age group for a selected country or area and year. 2022.
41. Brasil. Ministério da Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil 2021-2030. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. MS; 2021. p. 1–118.
42. Roche N, Crichton ML, Goeminne PC, Cao B, Humbert M, Shteinberg M, et al. Update June 2022: management of hospitalised adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a European Respiratory Society living guideline. Vol. 60, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2022.
43. WHO. The true death toll of COVID-19 - Estimating global excess mortality [Internet]. 2020 [cited 2024 Jan 25]. Available from:

- <https://www.who.int/data/stories/the-true-death-toll-of-covid-19-estimating-global-excess-mortality>
44. Brasil - Ministério da Saúde. COVID-19 no Brasil. Nota informativa [Internet] [Internet]. 2024 [cited 2024 Jan 25]; Available from: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html
 45. WHO. WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part. 2021 Jan 14 [cited 2024 Jan 25];1–120. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>
 46. Etienne CF. COVID-19 has revealed a pandemic of inequality. Vol. 28, *Nature Medicine*. Nature Research; 2022. p. 17.
 47. Dong Y, Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. Vol. 145, *Pediatrics*. American Academy of Pediatrics; 2020.
 48. Wu L, O’Kane AM, Peng H, Bi Y, Motriuk-Smith D, Ren J. SARS-CoV-2 and cardiovascular complications: From molecular mechanisms to pharmaceutical management. *Biochem Pharmacol*. 2020;178:114114.
 49. Su Y, Yuan D, Chen DG, Ng RH, Wang K, Choi J, et al. Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae. *Cell*. 2022 Mar 3;185(5):881-895.e20.
 50. ICTV. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat Microbiol*. 2020;5(5):668–74.
 51. Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res*. 2020 Aug 1;285.
 52. Matuozzo D, Talouarn E, Marchal A, Zhang P, Manry J, Seeleuthner Y, et al. Rare predicted loss-of-function variants of type I IFN immunity genes are associated with life-threatening COVID-19. *Genome Med*. 2023 Dec 1;15(1).
 53. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020;14:185–92.
 54. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):233.

55. Matuozzo D, Talouarn E, Marchal A, Zhang P, Manry J, Seeleuthner Y, et al. Rare predicted loss-of-function variants of type I IFN immunity genes are associated with life-threatening COVID-19. *Genome Med.* 2023 Dec 1;15(1).
56. ICTV. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536–44.
57. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet.* 2003;362(9393):1353–8.
58. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine.* 2012;367(19):1814–20.
59. De Wit E, Rasmussen AL, Falzarano D, Bushmaker T, Feldmann F, Brining DL, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8;110(41):16598–603.
60. Wong PWC. Potential changes to the hikikomori phenomenon in the wake of the Covid-19 pandemic. Vol. 54, *Asian Journal of Psychiatry.* Elsevier B.V.; 2020.
61. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet.* 2020;395(10224):565–74.
62. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:587269.
63. Bianchi M, Benvenuto D, Giovanetti M, Angeletti S, Ciccozzi M, Pascarella S. Sars-CoV-2 envelope and membrane proteins: structural differences linked to virus characteristics? *Biomed Res Int.* 2020;2020.
64. Kim Y, Jedrzejczak R, Maltseva NI, Wilamowski M, Endres M, Godzik A, et al. Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. *Protein Science.* 2020;29(7):1596–605.
65. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 2020;19:100682.

66. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221–36.
67. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;589(7840):125–30.
68. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell.* 2020;181(4):914–21.
69. Zhu G, Zhu C, Zhu Y, Sun F. Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins. *Curr Res Microb Sci.* 2020;1:53–61.
70. Mariano G, Farthing RJ, Lale-Farjat SLM, Bergeron JRC. Structural characterization of SARS-CoV-2: where we are, and where we need to be. *Front Mol Biosci.* 2020;344.
71. Kumar A, Kumar P, Saumya KU, Kapuganti SK, Bhardwaj T, Giri R. Exploring the SARS-CoV-2 structural proteins for multi-epitope vaccine development: an in-silico approach. *Expert Rev Vaccines.* 2020;19(9):887–98.
72. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (1979).* 2020;367(6483):1260–3.
73. Zhao Z, Zhou J, Tian M, Huang M, Liu S, Xie Y, et al. Omicron SARS-CoV-2 mutations stabilize spike up-RBD conformation and lead to a non-RBM-binding monoclonal antibody escape. *Nat Commun.* 2022;13(1):4958.
74. Xiang J, Su J, Lan Q, Zhao W, Zhou Y, Xu Y, et al. Antigenic mapping reveals sites of vulnerability on α -HCoV spike protein. *Commun Biol.* 2022;5(1):1179.
75. Xia X. Domains and functions of spike protein in SARS-CoV-2 in the context of vaccine design. *Viruses* 2021, 13, 109. s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in ...; 2021.
76. Rahman MS, Hoque MN, Islam MR, Islam I, Mishu ID, Rahaman MM, et al. Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 2021;22:100997.
77. Chai J, Cai Y, Pang C, Wang L, McSweeney S, Shanklin J, et al. Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1. *Nat Commun.* 2021;12(1):3433.

78. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(12):1202–8.
79. Shepley-McTaggart A, Sagum CA, Oliva I, Rybakovsky E, DiGuilio K, Liang J, et al. SARS-CoV-2 Envelope (E) protein interacts with PDZ-domain-2 of host tight junction protein ZO1. *PLoS One.* 2021;16(6):e0251955.
80. Mahtarin R, Islam S, Islam MJ, Ullah MO, Ali MA, Halim MA. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn.* 2022;40(10):4725–38.
81. Thomas S. The structure of the membrane protein of SARS-CoV-2 resembles the sugar transporter SemiSWEET. *Pathog Immun.* 2020;5(1):342.
82. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(7):1228–38.
83. Ye Q, West AM V, Silletti S, Corbett KD. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science.* 2020;29(9):1890–901.
84. Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun.* 2020;11(1):5885.
85. Khan MT, Irfan M, Ahsan H, Ahmed A, Kaushik AC, Khan AS, et al. Structures of SARS-CoV-2 RNA-binding proteins and therapeutic targets. *Intervirology.* 2021;64(2):55–68.
86. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. *J Virol.* 2013;87(16):9159–72.
87. Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(10):959–66.
88. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M, Koepke L, Denk T, Hirschenberger M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science (1979).* 2020;369(6508):1249–55.
89. Zheng YX, Wang L, Kong WS, Chen H, Wang XN, Meng Q, et al. Nsp2 has the potential to be a drug target revealed by global identification of SARS-CoV-2

- Nsp2-interacting proteins. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). 2021;53(9):1134–41.
90. Armstrong LA, Lange SM, Dee Cesare V, Matthews SP, Nirujogi RS, Cole I, et al. Biochemical characterization of protease activity of Nsp3 from SARS-CoV-2 and its inhibition by nanobodies. *PLoS One*. 2021;16(7):e0253364.
 91. Ma C, Sacco MD, Hurst B, Townsend JA, Hu Y, Szeto T, et al. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Res*. 2020;30(8):678–92.
 92. Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, Jedrzejczak R, Stols L, Langan P, et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. *Nat Commun*. 2020;11(1):3202.
 93. Davies JP, Almasy KM, McDonald EF, Plate L. Comparative multiplexed interactomics of SARS-CoV-2 and homologous coronavirus nonstructural proteins identifies unique and shared host-cell dependencies. *ACS Infect Dis*. 2020;6(12):3174–89.
 94. Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*. 2013;4(4):10–1128.
 95. Maryline S, Arjona SP, NS AC, Natalia S, Sawaya BE. Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? *J Neurol*. 2021;268(6):2013–22.
 96. Hillen HS. Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase. *Curr Opin Virol*. 2021;48:82–90.
 97. Hillen HS, Kokic G, Farnung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*. 2020;584(7819):154–6.
 98. Shu T, Huang M, Wu D, Ren Y, Zhang X, Han Y, et al. SARS-coronavirus-2 Nsp13 possesses NTPase and RNA helicase activities that can be inhibited by bismuth salts. *Virol Sin*. 2020;35:321–9.
 99. Chen X, Kang Y, Luo J, Pang K, Xu X, Wu J, et al. Next-generation sequencing reveals the progression of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:632490.
 100. Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, Novak B, Borowsky JH, Singh S, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. *Biophys J*. 2021;120(14):2880–9.

101. Chen Y, Cai H, Pan J, Xiang N, Tien P, Ahola T, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(9):3484–9.
102. Wruck W, Adjaye J. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is co-expressed with genes related to transmembrane serine proteases, viral entry, immunity and cellular stress. *Sci Rep*. 2020;10(1):21415.
103. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):155–70.
104. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Pilgram O, Moulton H, Stein DA, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance*. 2020;3(9).
105. Piva F, Sabanovic B, Cecati M, Giulietti M. Expression and co-expression analyses of TMPRSS2, a key element in COVID-19. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021;40:451–5.
106. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020;26(5):681–7.
107. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(11):1555–62.
108. Koch J, Uckelely ZM, Doldan P, Stanifer M, Boulant S, Lozach P. TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. *EMBO J*. 2021;40(16):e107821.
109. Benton DJ, Wrobel AG, Xu P, Roustan C, Martin SR, Rosenthal PB, et al. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*. 2020;588(7837):327–30.
110. Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol*. 2021;6(7):899–909.

111. Jeong GU, Song H, Yoon GY, Kim D, Kwon YC. Therapeutic strategies against COVID-19 and structural characterization of SARS-CoV-2: a review. *Front Microbiol.* 2020;11:1723.
112. Slanina H, Madhugiri R, Bylapudi G, Schultheiß K, Karl N, Gulyaeva A, et al. Coronavirus replication–transcription complex: Vital and selective NMPylation of a conserved site in nsp9 by the NiRAN-RdRp subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2021;118(6):e2022310118.
113. Nie Q, Li X, Chen W, Liu D, Chen Y, Li H, et al. Phylogenetic and phylodynamic analyses of SARS-CoV-2. *Virus Res.* 2020;287:198098.
114. Boehm E, Kronig I, Neher RA, Eckerle I, Vetter P, Kaiser L. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical Microbiology and Infection.* 2021;27(8):1109–17.
115. Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;538:88–91.
116. Castonguay N, Zhang W, Langlois MA. Meta-analysis and structural dynamics of the emergence of genetic variants of SARS-CoV-2. *Front Microbiol.* 2021;12:676314.
117. Artesi M, Bontems S, Göbbels P, Franckh M, Maes P, Boreux R, et al. A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual-target diagnostic assay. *J Clin Microbiol.* 2020;58(10):10–1128.
118. Rana DR, Pokhrel N. Sequence mismatch in PCR probes may mask the COVID-19 detection in Nepal. *Mol Cell Probes.* 2020;53:101599.
119. Bian L, Gao F, Zhang J, He Q, Mao Q, Xu M, et al. Effects of SARS-CoV-2 variants on vaccine efficacy and response strategies. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(4):365–73.
120. Garcia-Beltran WF, Lam EC, Denis KS, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell.* 2021;184(9):2372–83.
121. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance.* 2021;26(24):2100509.

122. Koyama T, Platt D. L. Parida Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes Bull. World Health Organ. 2020;98:495–504.
123. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, Wang Y, et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. Cell. 2020;183(3):739–51.
124. Gobeil SMC, Janowska K, McDowell S, Mansouri K, Parks R, Manne K, et al. D614G mutation alters SARS-CoV-2 spike conformation and enhances protease cleavage at the S1/S2 junction. Cell Rep. 2021;34(2).
125. Mohammad A, Alshawaf E, Marafie SK, Abu-Farha M, Abubaker J, Al-Mulla F. Higher binding affinity of furin for SARS-CoV-2 spike (S) protein D614G mutant could be associated with higher SARS-CoV-2 infectivity. International journal of infectious diseases. 2021;103:611–6.
126. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell. 2020;182(4):812–27.
127. Li Q, Wu J, Nie J, Zhang L, Hao H, Liu S, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. Cell. 2020;182(5):1284–94.
128. eCDC - European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC SARS-CoV-2 variant classification criteria and recommended EU/EEA Member State actions. 2023.
129. Lazarevic I, Pravica V, Miljanovic D, Cupic M. Immune evasion of SARS-CoV-2 emerging variants: what have we learnt so far? Viruses. 2021;13(7):1192.
130. Slavov SN, Patané JSL, Bezerra R dos S, Giovanetti M, Fonseca V, Martins AJ, et al. Genomic monitoring unveil the early detection of the SARS-CoV-2 B. 1.351 (Beta) variant (20H/501Y. V2) in Brazil. J Med Virol. 2021;93(12):6782–7.
131. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. 2022. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) – Symptoms.
132. eCDC. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 15 July 2021. 2021.
133. Chand M, Hopkins S, Dabrera G, Achison C, Barclay W, Ferguson N, et al. Investigation of novel SARS-COV-2 variant: Variant of Concern 202012/01. Public Health England. 2020;21.

134. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARSCoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. COVID-19 Genomics Consortium UK (CoG-UK). CoG-UK; 2020.
135. Zhu X, Mannar D, Srivastava SS, Berezuk AM, Demers JP, Saville JW, et al. Cryo-electron microscopy structures of the N501Y SARS-CoV-2 spike protein in complex with ACE2 and 2 potent neutralizing antibodies. PLoS Biol. 2021;19(4):e3001237.
136. Washington NL, Gangavarapu K, Zeller M, Bolze A, Cirulli ET, Barrett KMS, et al. Emergence and rapid transmission of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 in the United States. Cell. 2021;184(10):2587–94.
137. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B. 1.1. 7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. MedRxiv. 2021;2012–20.
138. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. medrxiv. 2020;2012–20.
139. Hoffmann M, Arora P, Groß R, Seidel A, Hörnich BF, Hahn AS, et al. SARS-CoV-2 variants B. 1.351 and P. 1 escape from neutralizing antibodies. Cell. 2021;184(9):2384–93.
140. Bhattarai N, Baral P, Gerstman BS, Chapagain PP. Structural and dynamical differences in the spike protein RBD in the SARS-CoV-2 variants B. 1.1. 7 and B. 1.351. J Phys Chem B. 2021;125(26):7101–7.
141. Pascarella S, Ciccozzi M, Zella D, Bianchi M, Benedetti F, Benvenuto D, et al. SARS-CoV-2 B. 1.617 Indian variants: Are electrostatic potential changes responsible for a higher transmission rate? J Med Virol. 2021;93(12):6551–6.
142. Alizon S, Haim-Boukobza S, Foulongne V, Verdurme L, Trombert-Paolantoni S, Lecorche E, et al. Rapid spread of the SARS-CoV-2 Delta variant in some French regions, June 2021. Eurosurveillance. 2021;26(28):2100573.
143. England PH. SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation in England. Technical briefing. 2021;23.

144. Sheikh A, McMenamin J, Taylor B, Robertson C. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *The Lancet*. 2021;397(10293):2461–2.
145. Novelli G, Colona VL, Pandolfi PP. A focus on the spread of the Delta variant of SARS-CoV-2 in India. *Indian J Med Res*. 2021;153(5–6):537.
146. Farinholt T, Doddapaneni H, Qin X, Menon V, Meng Q, Metcalf G, et al. Transmission event of SARS-CoV-2 Delta variant reveals multiple vaccine breakthrough infections. *BMC Med*. 2021;19:1–6.
147. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, Gallagher E, Simmons R, Thelwall S, et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(7):585–94.
148. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P. 1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science (1979)*. 2021;372(6544):815–21.
149. eCDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Internet. 2024 [cited 2024 Jan 25]. SARS-CoV-2 variants of concern as of 19 January 2024. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
150. Davies MA, Morden E, Rousseau P, Arendse J, Bam JL, Boloko L, et al. Outcomes of laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection during resurgence driven by Omicron lineages BA. 4 and BA. 5 compared with previous waves in the Western Cape Province, South Africa. *International Journal of Infectious Diseases*. 2023;127:63–8.
151. Mitchell OD, Gilliam K, Del Gaudio D, McNeely KE, Smith S, Acevedo M, et al. Germline variants incidentally detected via tumor-only genomic profiling of patients with mesothelioma. *JAMA Netw Open*. 2023;6(8):e2327351–e2327351.
152. Triggiano F, De Giglio O, Apollonio F, Brigida S, Fasano F, Mancini P, et al. Wastewater-based Epidemiology and SARS-CoV-2: Variant Trends in the Apulia Region (Southern Italy) and Effect of Some Environmental Parameters. *Food Environ Virol*. 2023;15(4):331–41.
153. Pritam M, Dutta S, Medicherla KM, Kumar R, Singh SP. Computational analysis of spike protein of SARS-CoV-2 (Omicron variant) for development of peptide-based therapeutics and diagnostics. *J Biomol Struct Dyn*. 2023;1–19.
154. COVID-19 Data Portal Italy. Omicron variant (B.1.1.529). 2021. Salient features of the new Omicron variant (B.1.1.529).

155. Zhang S, Cooper-Knock J, Weimer AK, Shi M, Kozhaya L, Unutmaz D, et al. Multiomic analysis reveals cell-type-specific molecular determinants of COVID-19 severity. *Cell Syst.* 2022;13(8):598–614.
156. Karki R, Lee S, Mall R, Pandian N, Wang Y, Sharma BR, et al. ZBP1-dependent inflammatory cell death, PANoptosis, and cytokine storm disrupt IFN therapeutic efficacy during coronavirus infection. *Sci Immunol.* 2022;7(74):eabo6294.
157. Gao T, Zhu L, Liu H, Zhang X, Wang T, Fu Y, et al. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):318.
158. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363–74.
159. Tang X, Sun R, Ge W, Mao T, Qian L, Huang C, et al. Enhanced inflammation and suppressed adaptive immunity in COVID-19 with prolonged RNA shedding. *Cell Discov.* 2022;8(1):70.
160. Bishop CR, Dumenil T, Rawle DJ, Le TT, Yan K, Tang B, et al. Mouse models of COVID-19 recapitulate inflammatory pathways rather than gene expression. *PLoS Pathog.* 2022;18(9):e1010867.
161. Yadav CK, Shah BP, Mishra MK, Jha D, Mehta B, Yadav PS. Immunomodulation in COVID-19: A Review of Literature. *Sch J Med Case Rep.* 2022;9:872–8.
162. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of Leucocyte Biology.* 2020;108(1):17–41.
163. LAES&HAES. Síndrome de Tempestade de Citocinas na Covid-19 – O Papel da IL-6. *Compêndio da Literatura.* 2020;5(247):76–90.
164. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med.* 2021;9(6):622–42.
165. Dhont S, Derom E, Van Braeckel E, Depuydt P, Lambrecht BN. The pathophysiology of ‘happy’ hypoxemia in COVID-19. *Respir Res.* 2020;21(1):1–9.
166. Jin Y, Ji W, Yang H, Chen S, Zhang W, Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):293.

167. Tong M, Jiang Y, Xia D, Xiong Y, Zheng Q, Chen F, et al. Elevated expression of serum endothelial cell adhesion molecules in COVID-19 patients. *J Infect Dis.* 2020;222(6):894–8.
168. Beigee FS, Toutkaboni MP, Khalili N, Nadji SA, Dorudinia A, Rezaei M, et al. Diffuse alveolar damage and thrombotic microangiopathy are the main histopathological findings in lung tissue biopsy samples of COVID-19 patients. *Pathology-Research and Practice.* 2020;216(10):153228.
169. Obi AT, Barnes GD, Napolitano LM, Henke PK, Wakefield TW. Venous thrombosis epidemiology, pathophysiology, and anticoagulant therapies and trials in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2021;9(1):23–35.
170. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2020;18(5):1023–6.
171. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine.* 2020;382(18):1708–20.
172. Rueda-Camino JA, Sendín-Martín V, Joya-Seijo MD, Angelina-García M, Zamarro-García C, Gimena-Rodríguez FJ, et al. Plasma D-dimer value corrected by inflammatory markers in patients with SARS-CoV-2 infection: Its prognostic value in the diagnosis of venous thromboembolism. *Med Clin (Barc).* 2022;158(6):265–9.
173. Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashash D, Fateh F, Abolghasemi H. Laboratory findings in COVID-19 diagnosis and prognosis. *Clinica chimica acta.* 2020;510:475–82.
174. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802–10.
175. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811–8.
176. Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, Schenck EJ, Chen R, Jabri A, et al. Clinical characteristics of Covid-19 in New York city. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(24):2372–4.

177. Lindner D, Fitzek A, Bräuninger H, Aleshcheva G, Edler C, Meissner K, et al. Association of cardiac infection with SARS-CoV-2 in confirmed COVID-19 autopsy cases. *JAMA Cardiol.* 2020;5(11):1281–5.
178. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2020;173(4):268–77.
179. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine.* 2020;382(16):1564–7.
180. Endres D, Lungen E, Hasan A, Kluge M, Fröhlich S, Lewerenz J, et al. Clinical manifestations and immunomodulatory treatment experiences in psychiatric patients with suspected autoimmune encephalitis: a case series of 91 patients from Germany. *Mol Psychiatry.* 2022;27(3):1479–89.
181. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–80.
182. Chhikara BS, Rath B, Singh J, Poonam FNU. Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics: Array. *Chemical Biology Letters.* 2020;7(1):63–72.
183. Du Z, Liu C, Wang C, Xu L, Xu M, Wang L, et al. Reproduction numbers of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases.* 2022;75(1):e293–5.
184. Zhang Y, Luo W, Li Q, Wang X, Chen J, Song Q, et al. Risk factors for death among the first 80 543 coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases in China: relationships between age, underlying disease, case severity, and region. *Clinical Infectious Diseases.* 2022;74(4):630–8.
185. Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica Covid-19: Emergência da Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença pelo Coronavírus 2019 - Covid-19. https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/coronavirus/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19_2021.pdf/view. 2021.
186. Jiang XW, Huang TS, Xie L, Chen SZ, Wang SD, Huang ZW, et al. Development of a diagnostic assay by three-tube multiplex real-time PCR for simultaneous

- detection of nine microorganisms causing acute respiratory infections. *Sci Rep*. 2022;12(1):13306.
187. Zhang L, Zhang Y, Qin X, Jiang X, Zhang J, Mao L, et al. Recombinant ACE2 protein protects against acute lung injury induced by SARS-CoV-2 spike RBD protein. *Crit Care*. 2022;26(1):1–22.
 188. Angeli F, Reboldi G, Trapasso M, Zappa M, Spanevello A, Verdecchia P. COVID-19, vaccines and deficiency of ACE2 and other angiotensinases. Closing the loop on the "Spike effect". *Eur J Intern Med*. 2022;103:23–8.
 189. Samaddar A, Nag VL. The coronavirus pandemic and the future. 2021. Structure, lifecycle and replication machinery of SARS-CoV-2.
 190. Henderson LA, Canna SW, Friedman KG, Gorelik M, Lapidus SK, Bassiri H, et al. American College of Rheumatology clinical guidance for multisystem inflammatory syndrome in children associated with SARS-CoV-2 and hyperinflammation in pediatric COVID-19: Version 3. *Arthritis & Rheumatology*. 2022;74(4):e1–20.
 191. Tsatsakis A, Calina D, Falzone L, Petrakis D, Mitrut R, Siokas V, et al. SARS-CoV-2 pathophysiology and its clinical implications: An integrative overview of the pharmacotherapeutic management of COVID-19. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;146:111769.
 192. Fiocruz. Protocolo de Manejo Clínico da Covid-19 na Atenção Especializada . <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/protocolo-de-manejo-clinico-da-covid-19-na-atencao-especializada/>. 2020.
 193. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2020;80(6):656–65.
 194. Dallan C, Romano F, Siebert J, Politi S, Lacroix L, Sahyoun C. Septic shock presentation in adolescents with COVID-19. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4(7):e21–3.
 195. Lu J, Gu J, Li K, Xu C, Su W, Lai Z, et al. COVID-19 outbreak associated with air conditioning in restaurant, Guangzhou, China, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1628.
 196. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020;92(9):1518–24.

197. Lednicky JA, Lauzardo M, Fan ZH, Jutla A, Tilly TB, Gangwar M, et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;100:476–82.
198. Chen PZ, Bobrovitz N, Premji Z, Koopmans M, Fisman DN, Gu FX. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. *Elife*. 2021;10:e65774.
199. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, Ong SWX, Gum M, Lau SK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun*. 2020;11(1):2800.
200. Guo ZD, Wang ZY, Zhang SF, Li X, Li L, Li C, et al. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1586.
201. Chou R, Dana T, Jungbauer R, Weeks C, McDonagh MS. Masks for prevention of respiratory virus infections, including SARS-CoV-2, in health care and community settings: a living rapid review. *Ann Intern Med*. 2020;173(7):542–55.
202. Chu DK, Akl EA, Duda S, Solo K, Yaacoub S, Schünemann HJ, et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The lancet*. 2020;395(10242):1973–87.
203. Courtemanche C, Garuccio J, Le A, Pinkston J, Yelowitz A. Strong Social Distancing Measures In The United States Reduced The COVID-19 Growth Rate: Study evaluates the impact of social distancing measures on the growth rate of confirmed COVID-19 cases across the United States. *Health Aff*. 2020;39(7):1237–46.
204. Fletcher JJ, Feucht EC, Hahn PY, McGoff TN, Dehart DJ, El Mortada ME, et al. Healthcare-acquired coronavirus disease 2019 (COVID-19) is less symptomatic than community-acquired disease among healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022;43(4):490–6.
205. Wellenius GA, Vispute S, Espinosa V, Fabrikant A, Tsai TC, Hennessy J, et al. Impacts of social distancing policies on mobility and COVID-19 case growth in the US. *Nat Commun*. 2021;12(1):3118.
206. Suman R, Javaid M, Haleem A, Vaishya R, Bahl S, Nandan D. Sustainability of coronavirus on different surfaces. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(4):386–90.

207. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of hospital infection*. 2020;104(3):246–51.
208. Coil DA, Albertson T, Banerjee S, Brennan G, Campbell AJ, Cohen SH, et al. SARS-CoV-2 detection and genomic sequencing from hospital surface samples collected at UC Davis. *PLoS One*. 2021;16(6):e0253578.
209. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: a review of viral, host, and environmental factors. *Ann Intern Med*. 2021;174(1):69–79.
210. Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Preiser W, Doerr HW. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med Microbiol Immunol*. 2005;194:1–6.
211. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine*. 2020;382(16):1564–7.
212. Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, et al. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe*. 2020;1(1):e10.
213. Joynt GM, Wu WKK. Understanding COVID-19: what does viral RNA load really mean? *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):635–6.
214. Pizzol JLD, Hora VP da, Reis AJ, Vianna J, Ramis I, Groll A von, et al. Laboratory diagnosis for Covid-19: A mini-review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53.
215. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2826.
216. ANVISA. Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeTecnico=coronav%C3%ADrus> ; 2024.
217. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2020;173(5):362–7.
218. Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR testing of SARS-CoV-2: a primer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):3004.
219. Pavão AL et al. Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. Vol. 1. Rio de Janeiro; 2020. p. 1–20.

220. Brasil. Estratégia Nacional de vigilância epidemiológica e laboratorial .
<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/diagnosticar-para-cuidar-estrategia-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-e-laboratorial.pdf>. 2021.
221. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*. 2020;323(18):1843–4.
222. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT–qPCR primer–probe sets. *Nat Microbiol*. 2020;5(10):1299–305.
223. Alanagreh L. COVID-19 Diagnostic Test through RT-PCR. 2020.
224. Tahmasebi S, Khosh E, Esmailzadeh A. The outlook for diagnostic purposes of the 2019-novel coronavirus disease. *J Cell Physiol*. 2020;235(12):9211–29.
225. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92(6):538.
226. Hu X, Deng Q, Li J, Chen J, Wang Z, Zhang X, et al. Development and clinical application of a rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for SARS-CoV-2 infection. *mSphere*. 2020;5(4):e00808-20.
227. Huang WE, Lim B, Hsu C, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol*. 2020;13(4):950–61.
228. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877–82.
229. Silva SJR da, Pardee K, Pena L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: a review. *Viruses*. 2019;12(1):19.
230. Sahni AK, Grover N, Sharma A, Khan ID, Kishore J. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Med J Armed Forces India*. 2013;69(3):246–53.
231. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):351–7.
232. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective

- point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*. 2020;9(8):182.
233. Maranhao A, Bhadra S, Paik I, Walker D, Ellington AD. An improved and readily available version of Bst DNA Polymerase for LAMP, and applications to COVID-19 diagnostics. *MedRxiv*. 2020;2010–20.
 234. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform*. 2021;22(2):616–30.
 235. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol*. 2020;6(2):veaa075.
 236. Page AJ, Mather AE, Le-Viet T, Meader EJ, Alikhan NF, Kay GL, et al. Large-scale sequencing of SARS-CoV-2 genomes from one region allows detailed epidemiology and enables local outbreak management. *Microb Genom*. 2021;7(6):000589.
 237. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(8):1930–4.
 238. Ernst E, Wolfe P, Stahura C, Edwards KA. Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2. *Talanta*. 2021;224:121883.
 239. Brasil. Ministério da Saúde. 2021. Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença Coronavírus 2019 - Vigilância Integrada de Síndromes Respiratórias Agudas Doença pelo Coronavírus 2019, Influenza e outros vírus respiratórios. .
 240. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):49–78.
 241. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, et al. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* (1979). 2007;317(5836):376–81.
 242. Hewitt J. Human adenoviruses as indicators of faecal contamination and pathogen indices in the environment and shellfish. [Auckland]: The University of Auckland; 2015.

243. Perchetti GA, Nalla AK, Huang ML, Zhu H, Wei Y, Stensland L, et al. Validation of SARS-CoV-2 detection across multiple specimen types. *Journal of clinical virology*. 2020;128:104438.
244. Fowler VL, Armson B, Gonzales JL, Wise EL, Howson ELA, Vincent-Mistiaen Z, et al. A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection. *Journal of infection*. 2021;82(1):117–25.
245. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St. George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: value of diagnostic testing for SARS–CoV-2/COVID-19. Vol. 11, *MBio. Am Soc Microbiol*; 2020. p. 10–1128.
246. Ríos E, Medrano S, Alvarez M, Valderrama MJ, Vallejo L, Delgado-Iribarren A, et al. High performance of the automated ADVIA Centaur Systems SARS-CoV-2 Antigen Assay in nasopharyngeal samples with high viral load. *International Microbiology*. 2023;26(3):471–4.
247. Sharma A, Tiwari S, Deb MK, Marty JL. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(2):106054.
248. Ehmann KZ, Drosten C, Wendtner C, Zange M, Vollmar P, Rosina Ehmann D, et al. Virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019. *Nature*. 2020;581:465–9.
249. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, Rufino de Sousa N, Papanicolaou N, Vondracek M, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun*. 2020;11(1):4812.
250. Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, Petros BA, Boehm CK, Siddiqui S, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2020;11(1):5921.
251. Zhao Y, Huang J, Zhang L, Chen S, Gao J, Jiao H. The global transmission of new coronavirus variants. *Environ Res*. 2022;206:112240.
252. Anisimov DS. Method of detecting COVID-19 by analysis of exhaled air. *World*; 2023.
253. Smith KP, Cheng A, Chopelas A, DuBois-Coyne S, Mezghani I, Rodriguez S, et al. Large-scale, in-house production of viral transport media to support SARS-

- CoV-2 PCR testing in a multihospital health care network during the COVID-19 pandemic. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):10–1128.
254. Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, et al. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *J Clin Microbiol.* 2020;58(11):10–1128.
 255. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>. 2020. Preparation of viral transport medium.
 256. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology: Volume 2.* ASM press; 2006.
 257. CLSI. *Quality Control of Microbiological Transport Systems: Approved Standard - Second Edition.* Vol. 34, CLSI document M40-A2. United States; 2014.
 258. Bourouiba L, Dehandschoewercker E, Bush JWM. Violent expiratory events: on coughing and sneezing. *J Fluid Mech.* 2014;745:537–63.
 259. Han ZY, Weng WG, Huang QY. Characterizations of particle size distribution of the droplets exhaled by sneeze. *J R Soc Interface.* 2013;10(88):20130560.
 260. Gibbens S. Como um espirro pode lancar germes a uma distância de quase dois metros. *Estados Unidos: National Geographic;* 2020.
 261. Qiagen. *QIAprep& Viral RNA UM Kit Handbook.* Vol. 1. Nova Zelândia; 2020.
 262. Bretz, F.; Hothorn, T.; Westfall P. *Multiple comparisons using R.* 2010.
 263. Chambers JM, Freeny AE, Heiberger RM. *Compstat [Internet].* Momirović K, Mildner V, editors. Heidelberg: Physica-Verlag HD; 1990. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-50096-1>
 264. Critchlow DE, Fligner MA. Paired comparison, triple comparison, and ranking experiments as generalized linear models, and their implementation on GLIM. *Psychometrika.* 1991;56(3):517–33.
 265. Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, Popov VL, Wang H, Kalubowilage M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1):1359478.
 266. Huang Z, Ning B, Yang HS, Youngquist BM, Niu A, Lyon CJ, et al. Sensitive tracking of circulating viral RNA through all stages of SARS-CoV-2 infection. *J Clin Invest.* 2021;131(7).

267. Aboubakr HA, Sharafeldin TA, Goyal SM. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: a review. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(2):296–312.
268. Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res.* 2020;26:149–59.
269. Ren X, Liu Y, Chen H, Liu W, Guo Z, Zhang Y, et al. Application and optimization of RT-PCR in diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *MedRxiv.* 2020;2020–2.
270. Haberhausen G, Pinsl J, Kuhn CC, Markert-Hahn C. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol.* 1998;36(3):628–33.
271. Baker CA, Gibson KE. Persistence of SARS-CoV-2 on surfaces and relevance to the food industry. *Curr Opin Food Sci.* 2022;47:100875.
272. Port JR, Morris DH, Yinda CK, Riopelle JC, Avanzato VA, Holbrook MG, et al. Host and viral determinants of airborne transmission of SARS-CoV-2 in the Syrian hamster. *bioRxiv.* 2022;2022–8.
273. Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *Pan Afr Med J.* 2020;35(Suppl 2).
274. Snyder P, Lawson S. Evaluating results using corrected and uncorrected effect size estimates. *The Journal of Experimental Education.* 1993;61(4):334–49.
275. Vacha-Haase T, Thompson B. How to estimate and interpret various effect sizes. *J Couns Psychol.* 2004;51(4):473.
276. Ellis PD. The essential guide to effect sizes: Statistical power, meta-analysis, and the interpretation of research results. Cambridge university press; 2010.
277. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2020;39(6):1059–61.
278. Lieberman JA, Pepper G, Naccache SN, Huang ML, Jerome KR, Greninger AL. Comparison of commercially available and laboratory-developed assays for in vitro detection of SARS-CoV-2 in clinical laboratories. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):10–1128.

279. Yilmaz Gulec E, Cesur NP, Yesilyurt Fazlioğlu G, Kazezoğlu C. Effect of different storage conditions on COVID-19 RT-PCR results. *J Med Virol.* 2021;93(12):6575–81.
280. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. COVID19. 2022. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing.
281. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine.* 2020;382(16):1564–7.
282. Marchionatt A, Rodrigues FVF, Damasceno APK, de Oliveir FJV, Plentz I, Zanirati GG, et al. Parâmetros para transporte e armazenamento de amostras para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR. *Revista da AMRIGS.* 2021;
283. Agaoglu NB, Yildiz J, Dogan OA, Kose B, Alkurt G, Demirkol YK, et al. COVID-19 PCR test performance on samples stored at ambient temperature. *J Virol Methods.* 2022;301:114404.
284. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus. Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases. 2020 Jan 24;11–11.
285. Munne K, Bhanothu V, Bhor V, Patel V, Mahale SD, Pande S. Detection of SARS-CoV-2 infection by RT-PCR test: factors influencing interpretation of results. *Virusdisease.* 2021;32(2):187–9.
286. Murphy J, Bustin SA. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(2):187–97.
287. Mu J, Xu J, Zhang L, Shu T, Wu D, Huang M, et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci China Life Sci.* 2020;63:1413–6.
288. Yin W, Mao C, Luan X, Shen DD, Shen Q, Su H, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science (1979).* 2020;368(6498):1499–504.
289. Krueger LJ, Gaeddert M, Koepfel L, Brümmer LE, Gottschalk C, Miranda IB, et al. Evaluation of the accuracy, ease of use and limit of detection of novel, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostics for SARS-CoV-2. *medRxiv.* 2020;2010–20.

290. Patkar N, Rajpal S, Shetty N, Gokarn A, Mirgh S, Munipally S, et al. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is influenced by the type of transport medium: Implications for diagnosis and monitoring. *Int J Clin Pract.* 2021;75(8):e14311.
291. Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environ Res.* 2020;188:109819.
292. Tang S, Mao Y, Jones RM, Tan Q, Ji JS, Li N, et al. Aerosol transmission of SARS-CoV-2? Evidence, prevention and control. *Environ Int.* 2020;144:106039.
293. Morawska L, Johnson GR, Ristovski ZD, Hargreaves M, Mengersen K, Corbett S, et al. Size distribution and sites of origin of droplets expelled from the human respiratory tract during expiratory activities. *J Aerosol Sci.* 2009;40(3):256–69.
294. Feng H, Liu Y, Lv M, Zhong J. A case report of COVID-19 with false negative RT-PCR test: necessity of chest CT. *Jpn J Radiol.* 2020;38(5):409–10.
295. Martin CA, Jenkins DR, Minhas JS, Gray LJ, Tang J, Williams C, et al. Socio-demographic heterogeneity in the prevalence of COVID-19 during lockdown is associated with ethnicity and household size: Results from an observational cohort study. *EClinicalMedicine.* 2020 Aug;25:100466.
296. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica chimica acta.* 2020;505:172–5.
297. Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, Zambrano-Achig P, Del Campo R, Ciapponi A, et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: a systematic review. *PLoS One.* 2020;15(12):e0242958.
298. Zhang Z, Hou Y, Li D, Li F. Diagnostic efficacy of anti-SARS-CoV-2 IgG/IgM test for COVID-19: a meta-analysis. *J Med Virol.* 2021;93(1):366–74.
299. Sutton D, Bertozzi-Villa C, Lasky J, Fuchs K, Friedman A. Outcomes and epidemiology of COVID-19 infection in the obstetric population. In: *Seminars in Perinatology.* Elsevier; 2020. p. 151283.
300. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2020;58(7):1070–6.
301. Procop GW, Shrestha NK, Vogel S, Van Sickle K, Harrington S, Rhoads DD, et al. A direct comparison of enhanced saliva to nasopharyngeal swab for the

detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients. *J Clin Microbiol.* 2020;58(11):10–1128.