

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA AMARAL LAPINSKI

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA COVID-19 ENTRE MARÇO/2020 E AGOSTO/2021 –  
UM ESTUDO MULTICÊNTRICO

CURITIBA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA AMARAL LAPINSCKI

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA  
COVID-19 ENTRE MARÇO/2020 E AGOSTO/2021 –  
UM ESTUDO MULTICÊNTRICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Drª Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2022

Ficha catalográfica emitida pelo setor de bibliotecas da UFPR.

L313 Lapinski, Bruna Amaral

Epidemiologia molecular e perfil clínico-epidemiológico da covid-19 entre março/2020 e agosto/2021 – um estudo multicêntrico. [recurso eletrônico] / Bruna Amaral Lapinski . – Curitiba, 2022.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Profa. Dra. Sonia Mara Raboni

1. Covid-19. 2. SARS-Cov-2. 3. Fatores de risco. 4. Mutação.  
I. Raboni, Sonia Mara. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO

COSTAJORDÃO CRB 9/991

Termo de Aprovação, fornecido pela Secretaria do Programa após a aprovação da ata de defesa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E  
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BRUNA AMARAL LAPINSCKI** intitulada: "**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DA COVID-19 ENTRE MARÇO/2020 E AGOSTO/2021 UM ESTUDO MULTICÊNTRICO.**", sob orientação da Profa. Dra. SONIA MARA RABONI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica  
27/12/2022 11:57:34.0  
SONIA MARA RABONI  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
21/12/2022 11:13:28.0  
JAQUELINE CARVALHO DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA)

Assinatura Eletrônica  
21/12/2022 07:35:21.0  
MERI BORDIGNON NOGUEIRA  
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA  
UFPR)

Assinatura Eletrônica  
22/12/2022 16:08:35.0  
KARIN REGINA LUHM  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
27/12/2022 20:54:35.0  
DOUGLAS ADAMOSKI MEIRA  
Avaliador Externo (LABORATÓRIO NACIONAL DE BIOCÊNCIAS -  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP))

Assinatura Eletrônica  
27/12/2022 14:45:44.0  
LUINE ROSELE RENAUD VIDAL  
Avaliador Externo (LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UFPR)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - Curitiba - Paraná - Brasil  
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.  
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 243362

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaosignaturas.jsp>  
e insira o código 243362

## AGRADECIMENTOS

Como já dizia John Donne, “nenhum homem é uma ilha isolada”. Logo, este trabalho não poderia ter sido fruto de uma jornada solitária, ao contrário, ter chegado até aqui, literalmente, deveu-se a união de esforços de uma grande base de apoio, que por muitas vezes foi minha força motriz. Desta forma, tenho muito que agradecer e a muitos.

Agradeço a Deus, por ter colocado tantas pessoas maravilhosas no meu caminho e por operar diversos milagres na minha vida. Agradeço à família que, mesmo morando longe, fez o possível para que eu tivesse estabilidade e condições financeiras para concluir o doutorado. Agradeço aos amigos – que segundo Shakespeare é a família que Deus nos possibilitou escolher – pelos rodízios em hospital, pela preocupação, pela motivação, pelos cuidados, pela força, pelo suporte logístico, por sempre estarem disponíveis, pelo amor e carinho. Agradeço à equipe de profissionais da saúde que se mantêm na luta para que eu tenha saúde para tornar meus sonhos realidade. E agradeço a todos os que estiveram diretamente envolvidos com o processo de doutoramento, em especial àqueles que citarei a seguir.

Não poderia começar senão agradecendo à minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Sonia Raboni, que me orienta desde a graduação. Obrigada por me aceitar como aluna, por ter sido presente, disposta a ensinar, exigir nosso melhor, nos permitir discordar e discutir, pelo tempo investido, pelo apoio e por ser uma inspiração.

Ainda no quesito mentoria, agradeço a Dr<sup>a</sup> Meri Nogueira, que também participou ativamente de toda minha formação profissional e acadêmica, que é meu referencial na área laboratorial, que abriu as portas do Laboratório de Virologia do CHC-UFPR. Obrigada pela oportunidade de aprender, pelo apoio, pela ajuda e por sempre acreditar em mim.

Não poderia deixar de agradecer ao Dr<sup>o</sup> Sérgio Monteiro que foi uma peça fundamental, não medindo esforços, para que eu conseguisse concluir o doutorado a tempo.

Quero agradecer também à Dr<sup>a</sup> Indianara Rotta, amiga de todas as horas, e a todas colegas que o Laboratório de Virologia me trouxe. Tenho muito orgulho da profissional e da pessoa que me tornei devido à contribuição de cada uma de vocês.

Agradeço à equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo da Fiocruz/RJ, em especial à Dr<sup>a</sup> Marilda Siqueira e à Dr<sup>a</sup> Paola Resende, por me receberem, treinarem e tornarem possível o sequenciamento de tantas amostras em um curto espaço de tempo.

Agradeço aos profissionais do Hospital Infantil Pequeno Príncipe, integrantes do projeto “Global Influenza Hospital Surveillance Network”, em especial à Dr<sup>a</sup> Heloísa Giamberdino e à coordenadora do Laboratório Genômico, Renata Dourado, pela parceria.

Agradeço à servidora do LACEN-PR, Maria do Carmo Debur, pela contínua colaboração, seja com dados epidemiológicos, protocolos, trâmites, ou através de contribuição científica.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, em especial à Dr<sup>a</sup> Iara Reason, pelo apoio e compreensão dos desafios enfrentados para conseguir dar continuidade ao doutorado em face dos sérios problemas de saúde que enfrentei durante todo esse período.

Gostaria de agradecer às agências fomentadoras da bolsa de doutorado e da bolsa técnica de laboratório concedida após a primeira findar-se.

Sou grata à banca por se prontificarem tão rapidamente para que fosse possível a defesa dentro do prazo e por acrescentarem ao trabalho ao compartilharem sua expertise.

E por último, mas em hipótese alguma menos importante, gostaria de agradecer à Dr<sup>a</sup> Luciane Pereira, minha amiga e colega de laboratório, com quem compartilhei os meus dias nos últimos oito anos. Conheço poucas pessoas no mundo de tamanho caráter, retidão, empatia, disposição e humanidade. Obrigada pelo suporte científico, operacional, humano, religioso, motivacional e até material. Eu não teria concluído sem a sua ajuda. Obrigada por manter viva a ideia de que desistir nunca seria uma opção, mesmo quando eu achei que fosse a única.

## RESUMO

A alta circulação viral do SARS-CoV-2 contribuiu para o frequente surgimento de novas variantes que têm desde o potencial de alterar o *fitness* viral até a diminuição da eficácia da vacina. Nesse cenário, o estudo teve como objetivo genotipar os vírus SARS-CoV-2 de pacientes adultos e pediátricos atendidos em dois hospitais terciários em Curitiba/PR de Mar/20 a Ago/21 a fim de traçar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial da COVID-19 para identificar fatores de risco relacionados à COVID-19 de pacientes hospitalizados. Para o desenvolvimento de um estudo transversal retrospectivo, foram realizados RT-qPCR ou NGS para genotipagem viral de amostras de conveniência com RT-qPCR de SARS-CoV-2 positivo. Dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais foram revisados de prontuários médicos. Ao todo foram genotipadas 1.708 amostras, que se distribuíram em duas ondas. A análise do total de amostras genotipadas mostrou que as taxas de hospitalização e fatalidade foram maiores na primeira onda pandêmica ( $p < 0,0001$ ) e nos idosos. As variantes *Gamma* e as ancestrais foram significativamente maiores nos grupos pediátrico e adulto, respectivamente. Os perfis epidemiológicos entre as idades mostraram que infecções em adultos foram associadas ao sexo feminino (Odds Ratio ajustado (aOR)=2,48; IC95%= 1,96-3,14;  $p < 0,0001$ ), a não-variantes de preocupação (não-VoC) (aOR= 2,68; IC95% 2,13-3,38;  $p < 0,0001$ ), ao aumento da chance de hospitalização (aOR= 5,86; IC95%= 4,22-8,15;  $p < 0,0001$ ) e de óbito (aOR= 8,19; IC95%= 2,91-23,10;  $p < 0,0001$ ). Os clados identificados foram 20B, 20E (EU1), 20J (*Gamma* V3), 20I (*Alpha* V1) e 21J (*Delta*). A regressão logística mostrou que a primeira onda (aOR=2,20; IC95% 1,15- 4,20;  $p = 0,017$ ), adultos (aOR=13,41; IC95%= 8,19-21,96;  $p < 0,0001$ ) e à mutação E484K (aOR=1,93; IC95%=1,16-3,20;  $p < 0,0001$ ) se associaram a hospitalização, enquanto o óbito esteve associado à primeira onda (aOR=3,71; IC95%=1,65 - 8,32,  $p < 0,0001$ ). As análises de Kaplan-meyer mostraram que a sobrevivência em 30 dias em pacientes internados foi de 97,6% em crianças, 48,3% em pacientes entre 17-65 anos e 32,8% naqueles com mais de 65 anos. A regressão logística multivariada da avaliação do perfil dos pacientes hospitalizados observou que a variante *Gamma* está associada à infecção em pacientes caucasianos (aOR= 4,17 IC95%=1,59-10,94;  $p = 0,004$ ), a ter mais fatores de risco (aOR=1,97; IC95%=1,05-3,67;  $p = 0,0001$ ) e ao uso de suporte ventilatório mecânico invasivo (aOR= 2,51; IC95%= 1,07- 5,88;  $p = 0,035$ ). Aumento na mediana de idade foi identificado como risco para internação em UTI em pacientes pediátricos (aOR=1,34; IC95%= 1,03-1,73;  $p = 0,028$ ). Em adultos, os fatores de risco foram infecções em pacientes afrodescendentes (aOR=2,55; IC95%= 1,35-4,80;  $p = 0,004$ ) e obesos (aOR=2,26; IC95%= 1,31-3,93;  $p = 0,004$ ). Os fatores de risco para morte em adultos foram aumento na mediana de idade (aOR= 1,04; IC95%= 1,03-1,06;  $p < 0,0001$ ), doença hepática (aOR= 2,95; IC95%= 1,07-8,11;  $p = 0,036$ ), pacientes com câncer (aOR=3,31; IC95%=1,17-9,37;  $p = 0,024$ ), obesidade (aOR= 2,20; IC95%= 1,12-4,32;  $p = 0,022$ ) e internação em UTI (aOR=8,45; IC95%= 4,86-14,70;  $p < 0,0001$ ). A curva ROC mostrou que procalcitonina, D-dímero, creatinina e LDH são potenciais biomarcadores de admissão na UTI (AUC= 0,721, 0,699, 0,690, 0,680, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ) e morte (AUC= 0,768, 0,701, 0,700 e 0,694, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ) em pacientes adultos internados. O perfil clínico-epidemiológico da COVID-19 difere de acordo com os fatores do hospedeiro, do vírus e do ambiente. Portanto, a vigilância epidemiológica e molecular constante é crucial para a mitigação do impacto da pandemia, seja pela identificação de mutações, seja pelo fornecimento de dados para a proposição de modelos epidemiométricos que auxiliem na tomada de decisões em saúde pública.

Palavras Chave: COVID-19, SARS-CoV-2, variante de preocupação, mutações, fatores de risco, criança, adulto, idoso.

## ABSTRACT

The high viral circulation of SARS-CoV-2 has contributed to the frequent emergence of new variants that can change viral fitness and decrease vaccine efficacy. This study aimed to genotype the SARS-CoV-2 viruses of patients treated at two tertiary hospitals in Curitiba/PR from Mar/20 to Aug/21 to trace the clinical, epidemiological, and COVID-19 laboratory tests to identify COVID-19-related risk factors in hospitalized patients. For the development of a retrospective cross-sectional study, convenience samples with positive RT-qPCR for SARS-COV-2 were genotyped by RT-qPCR or NGS. Patient data were reviewed from medical records. A total of 1,708 samples were genotyped. The analysis of the total genotyped samples showed that hospitalization and fatality rates were higher in the first pandemic wave ( $p < 0.0001$ ) and in the elderly ( $p < 0.0001$ ). Gamma and wild variants were significantly higher in the pediatric and adult groups, respectively. Infection in adults were associated with female gender (adjusted Odds Ratio (aOR)= 2.48; 95%CI=1.96-3.14;  $p < 0.0001$ ), non-Variant of Concern (non-VoC) (aOR=2.68; 95%CI=2.13-3.38;), hospitalization (aOR=5.86; 95%CI=4.22-8.15;  $p < 0.0001$ ) and death (aOR= 8.19; 95%CI=2.91-23.10;  $p < 0.0001$ ). The identified clades were 20B, 20E (EU1), 20J (Gamma V3), 20I (Alpha V1), and 21J (Delta). Logistic regression showed that the first wave (aOR=2.20; 95%CI=1.15-4.20;  $p = 0.017$ ), adults (aOR=13.41; 95%CI= 8.19-21.96;  $p < 0.0001$ ), and the E484K mutation (aOR=1.93; 95%CI= 1.16 - 3.20;  $p < 0.0001$ ) were associated with hospitalization, while death was associated with the first wave (aOR=3.71; 95%CI=1.65-8.32;  $p < 0.0001$ ). Kaplan-meyer analyses showed 30-day survival in inpatients was 97.6% in children, 48.3% in patients between 17-65y, and 32.8% in those older than 65y. Multivariate logistic regression in inpatients showed Gamma variant is associated with infection in caucasian patients (aOR=4.17; 95%CI= 1.59-10.94;  $p = 0.004$ ), presents more risk factors (aOR=1.97; 95%CI= 1.05-3.67;  $p = 0.001$ ) and the use of invasive mechanical ventilatory support (aOR=2.51; 95%CI= 1.07-5.88;  $p = 0.035$ ). The increased median age was identified as a risk for ICU admission in pediatric patients (aOR=1.34; 95%CI= 1.03-1.73;  $p = 0.028$ ). In adults, risk factors were infections in afro-descendant patients (aOR=2.55; 95%CI= 1.35-4.80;  $p = 0.004$ ) and obese patients (aOR= 2.26; 95%CI= 1.31-3.93;  $p = 0.004$ ). Risk factors to death in adults increased in median age (aOR=1.04; 95%CI= 1.03-1.06;  $p < 0.0001$ ), liver disease (aOR= 2.95; 95%CI= 1.07-8.11;  $p = 0.036$ ), patients with cancer (aOR=3.31; 95%CI= 1.17-9.37;  $p = 0.024$ ), obesity (aOR 2.20; 95%CI= 1.12-4.32;  $p = 0.022$ ) and ICU admission (aOR=8.45; 95%CI= 4.86-14.70;  $p < 0.0001$ ). The ROC curve showed that procalcitonin, D-dimer, creatinine, and LDH are potential biomarkers of ICU admission ( $p < 0.0001$ ) and death ( $p < 0.0001$ ) in adult hospitalized patients. The clinical-epidemiological profile of COVID-19 differs according to host, virus, and environmental factors. Therefore, constant epidemiological and molecular surveillance is crucial for mitigating the impact of the pandemic, either by identifying mutations or by providing data for proposing epidemiometric models that help in public health decision-making.

Key-words: COVID-19, SARS-CoV-2, variant of concern, mutation, risk factor, children, adults, elderly.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.....	17
FIGURA 2 - ESTRUTURA DO VÍRUS SARS-COV-2.....	18
FIGURA 3 - ESQUEMA DA ESTRUTURA E DO GENOMA DO VÍRUS SARS-COV-2.....	19
FIGURA 4 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA SPIKE.....	26
FIGURA 5 - EXPRESSÃO DE ECA2 EM MÚLTIPLOS TECIDOS.....	28
FIGURA 6 - ADSORÇÃO DO VÍRUS À MEMBRANA PLASMÁTICA CELULAR.....	29
FIGURA 7 - VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DO SARS-COV-2 NA CÉLULA DO HOSPEDEIRO.....	30
FIGURA 8 - CICLO DE REPLICAÇÃO DO SARS-COV-2 E POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS.....	32
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DO SARS-CoV-2.....	34
FIGURA 10 - FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NA SPIKE DE ACORDO COM A VARIANTE DE PREOCUPAÇÃO.....	36
FIGURA 11 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS DE COVID- 19 NO MUNDO.....	44
FIGURA 12 - DINÂMICA EPIDEMIOLÓGICA DO SARS-COV-2 NO BRASIL ENTRE FEV/20 E FEV/22. ....	46
FIGURA 13 - EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19 NO ESTADO DO PARANÁ.....	47
FIGURA 14 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA COVID-19. ....	51
FIGURA 15 - ESQUEMA DAS DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS.....	60
FIGURA 16 - LINHA DO TEMPO DA VACINAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ.....	62
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GENOTIPAGEM POR RT-qPCR.....	73
FIGURA 18 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO ESTUDO.....	77

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS .....	21
QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES.....	41
QUADRO 3 - CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA COVID-19.....	48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CDC – Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos  
CHC-UFPR – Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná  
CoV – Coronavírus  
COVID-19 – Doença por coronavírus  
CTD1 – domínio C-terminal 1  
ECA 2 – Enzima conversora da angiotensina 2  
HIPP – Hospital Infantil Pequeno Príncipe  
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus  
IFN – interferon  
IL – interleucina  
LDH – lactato desidrogenase  
mAb – anticorpo monoclonal  
mRNA – RNA mensageiro  
NSP – Proteína não estrutural  
NTD – Domínio N-terminal  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ORF – Quadro de leitura aberto  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
RBD - Domínio de ligação ao receptor  
RNA - Ácido Ribonucleico  
RT-qPCR – Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real  
SARS-CoV-2 - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2  
VoC - Variante de preocupação  
Vol – Variante de interesse

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1	SARS-COV-2.....	15
2.1.1	Evolução e Classificação.....	15
2.1.2	Morfologia e Genoma.....	17
2.1.3	Proteoma.....	20
<b>2.1.3.1</b>	<b>Proteína <i>spike</i>.....</b>	<b>24</b>
2.1.4	Replicação Viral.....	27
2.1.5	Mutações.....	32
2.1.6	Variantes do SARS-CoV-2.....	37
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	43
2.3	COVID-19.....	48
2.3.1	Manifestações Clínicas.....	49
2.3.2	Complicações da COVID-19.....	51
2.3.3	Patogênese.....	52
<b>2.3.3.1</b>	<b>Imunopatogênese.....</b>	<b>53</b>
<b>2.3.3.2</b>	<b>Alteração de Coagulação.....</b>	<b>54</b>
2.3.4	Transmissão.....	55
2.3.5	Diagnóstico laboratorial.....	55
2.3.6	Profilaxia.....	57
<b>2.3.6.1</b>	<b>Vacinas inativadas.....</b>	<b>62</b>
<b>2.3.6.2</b>	<b>Vacinas baseadas em RNA mensageiro (RNAm).....</b>	<b>63</b>
<b>2.3.6.3</b>	<b>Vacinas baseadas em vetor viral.....</b>	<b>64</b>
2.3.7	Tratamento.....	66
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	70
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
5.1	DESENHO DO ESTUDO.....	71
5.1.1	Serviços Hospitalares.....	71
5.1.2	Amostras.....	71
5.1.3	Crerios de Inclusão.....	71

5.1.4	Critérios de Exclusão.....	72
5.1.5	Coleta de dados.....	72
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES.....	72
5.2.1	Extração do RNA.....	72
5.2.2	Genotipagem por RT-qPCR.....	72
5.2.3	Genotipagem por WGS.....	73
5.2.4	Classificação das variantes.....	74
5.3	VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	75
5.3.1	Definições.....	75
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
6.1	Artigo 1.....	78
6.2	Artigo 2.....	113
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>145</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>145</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>147</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pandemia de SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, tem um impacto global imensurável (WHO, 2022), atingiu aproximadamente 635 milhões de pessoas em todo o mundo levando a morte de mais de 6 milhões até o segundo semestre de 2022 (DONG *et al.*, 2022).

De acordo com O Ministério da Saúde, no Brasil ocorreram três ondas pandêmicas da pandemia de COVID-19 até novembro de 2022. A primeira onda pandêmica ocorreu de fevereiro de 2020 a outubro de 2020, foi caracterizada pela cocirculação de diferentes genótipos ancestrais. A segunda onda epidêmica ocorreu de novembro de 2020 a dezembro de 2021, em que emergiram as variantes *Zeta*, *Gamma* e *Delta*. E com a emergência da variante *Omicron*, a partir de dezembro deu-se início à terceira onda. Durante a primeira onda foi observado apenas um pico no aumento de casos e óbito de COVID-19 referente à emergência do SARS-CoV-2 na população brasileira. Picos de aumento de casos e óbitos de COVID-19 também foram observados após a emergência de *Zeta*, *Gamma*, *Delta*, *Omicron* e suas subvariantes (MS, 2022).

O Brasil teve uma participação importante para o agravamento da pandemia, sendo classificado como um dos três maiores epicentros da pandemia de SARS-CoV-2, principalmente no primeiro semestre de 2021 (HOLMES *et al.*, 2021). Após cinco meses do primeiro caso de COVID-19, o Brasil tornou-se o segundo país com maior número de casos confirmados (SOUZA *et al.*, 2020) e durante a segunda onda da pandemia atingiu mais de 3.000 mortes diárias (DE SOUZA *et al.*, 2021), apresentando até o atual momento um acúmulo de 35 milhões de casos e quase 689 mil óbitos confirmados (MS, 2022).

Devido à falta de imunidade adquirida, medicamentos e vacina, desde o seu surgimento, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente entre a população, se mantendo até hoje, principalmente pelas diferenças na taxa de cobertura vacinal ao redor do mundo. A falta de controle da disseminação deste vírus e sua alta taxa de replicação são alguns fatores que podem levar ao frequente surgimento de novas variantes, as quais são avaliadas e classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em potenciais variantes de preocupação (VoC), variantes de interesse (VoI) ou variantes sob monitoramento (VuM), de acordo com os riscos que representam para a saúde global em cada estágio da pandemia (WHO, 2022).

Variantes de interesse e de preocupação constituem-se em iminente ameaça ao controle da pandemia, pois suas mutações podem levar ao escape imune, alterações na patogênese e no perfil clínico de internação, aumento do *fitness* e virulência viral, diminuição da eficácia vacinal e resposta terapêutica (LAURING *et al.*,2021).

Em paralelo, nunca antes houve tanta informação sobre um genoma viral em escala global e em tão pouco tempo. Nesse cenário, a epidemiologia molecular tornou-se essencial para entender o ônus da pandemia de SARS-CoV-2, posto que a associação de mutações genéticas com a expressão fenotípica possibilita, não apenas um melhor entendimento da dinâmica viral para a tomada de decisões em saúde pública, mas também a identificação de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de vacinas de 2<sup>a</sup> geração e medicamentos para o combate da COVID-19 (WHO, 2022).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SARS-COV-2

Em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, surgiram relatos de um surto de pneumonia de causa desconhecida. Após análises de amostras respiratórias de alguns desses pacientes, foi identificada a presença de um novo tipo de coronavírus (CoV), não identificado antes em seres humanos. No início, o novo CoV foi temporariamente nomeado de 2019-nCoV e, em fevereiro de 2020, recebeu o nome de CoV da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) e a doença causada pelo SARS-CoV-2 foi nomeada de COVID-19 (WHO, 2020; ICTV, 2020).

Muitos dos primeiros casos de COVID-19 em Wuhan, China, foram associados ao *Huanan Seafood Market*, que – devido à presença de vida selvagem no mercado – foi considerado um candidato óbvio para a localização do evento zoonótico inicial, ou seja, quebra de barreira entre espécies. No entanto, nenhum dos animais do mercado, incluindo coelhos, cobras, gatos vadios, texugos e ratos de bambu, apresentou resultado positivo para SARS-CoV-2. Além disso, alguns dos primeiros casos de COVID-19 em Wuhan não estavam ligados ao mercado. Portanto, embora não tenha sido totalmente resolvido, as atuais evidências sugerem que o mercado pode ter sido o local de um evento inicial de um "superspreading" e não o local do evento zoonótico (HOLMES *et al.*, 2021).

#### 2.1.1 Evolução e Classificação

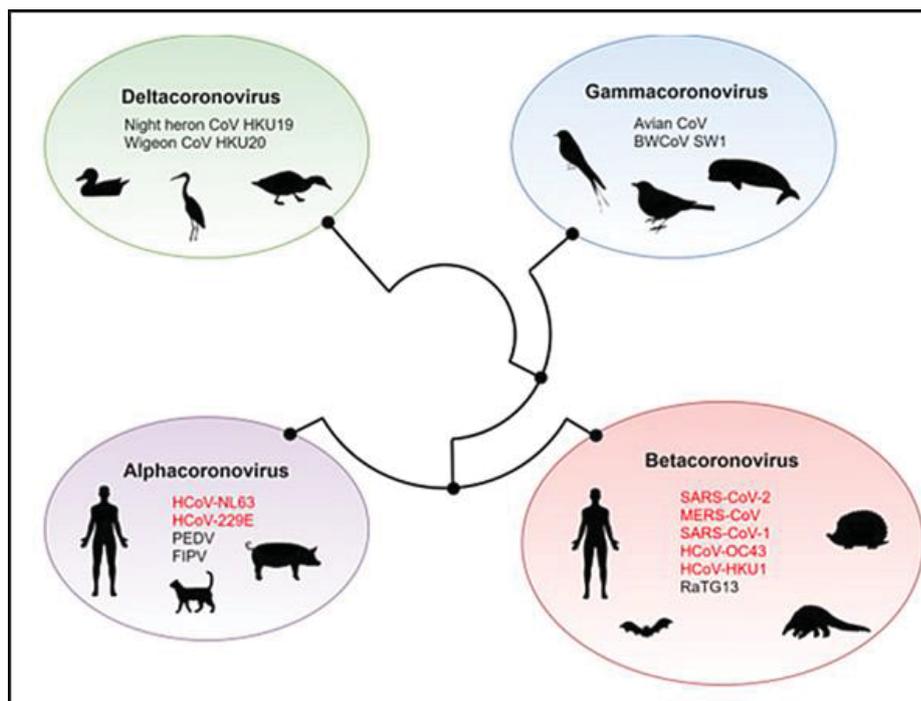
A origem de mais de 75% dos CoV é considerada zoonótica – a espécie primariamente infecta animal e com a quebra da barreira inter-espécies, passa a infectar humanos. Embora os morcegos sejam considerados um reservatório para todos os CoV humanos, o tipo de animal do qual o SARS-CoV-2 se originou ainda não está claro. Dentre as várias hipóteses, três se destacam. A primeira atribuiu o surgimento do SARS-CoV-2 à cepa CoV RaTG13 - morcego-ferradura (*Rhinolophus affinis*) -, uma vez que o genoma dessa espécie possui 94,6% de similaridade com o SARS-CoV-2 (ZHOU, *et al.*, 2020. SINGH, *et al.*, 2021). Já a segunda atribuiu à cepa CoV que infecta pangolins - um mamífero usado ilegalmente na gastronomia e medicina tradicional chinesa -, pois as análises dos aminoácidos da região RBD da

proteína *spike* desse mamífero mostraram uma similaridade de 97,4% com o SARS-CoV-2 e porque foram encontrados seis resíduos de aminoácidos responsáveis pela alta afinidade do vírus ao ECA2 humano nessa região, enquanto no genoma do RaTG13 foi encontrado apenas um resíduo. A terceira sugere que o SARS-CoV-2 pode ser originado por possíveis eventos de recombinação principalmente entre o Pangolin-CoV e Bat-CoV RaTG13. (BANERJEE, *et al.*, 2019; ANDERSEN, *et al.*, 2020; LAM, *et al.*, 2020; BORGES, *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2022).

Os CoV (corona em latim significa coroa, e esse nome foi atribuído devido à presença de projeções espiculadas no envelope do vírus que lhe conferem a forma de uma coroa ao microscópio eletrônico) são um dos maiores grupos de vírus que pertencem à ordem *Nidovirales*, subordem *Cornidovirineae* e família *Coronaviridae*. *Coronaviridae* é classificada em duas subfamílias: *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*. *Letovirinae* inclui o gênero *Alphaletovirus* e *Orthocoronaviridae* que é classificado em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Figura 1) (LAI *et al.*, 2007; ICTV, 2021).

A classificação do SARS-CoV-2 pelo ICTV foi dada, com base na filogenia e taxonomia, como um vírus pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, que também inclui os CoV da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (GORBALENYA, *et al.*, 2020; ICTV, 2021).

Os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* estão associados com doenças respiratórias em humanos. Ao todo, sete CoV humanos (HCoVs) já foram identificados: 4 causadores de síndromes gripais leves, que são resultantes de transmissão zoonótica (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1) e três altamente patogênicos: em 2002, o SARS-CoV, em 2012, o MERS-CoV e em 2019, dando início a uma pandemia, o SARS-CoV-2 (GORBALENYA, *et al.*, 2020; ICTV, 2021).



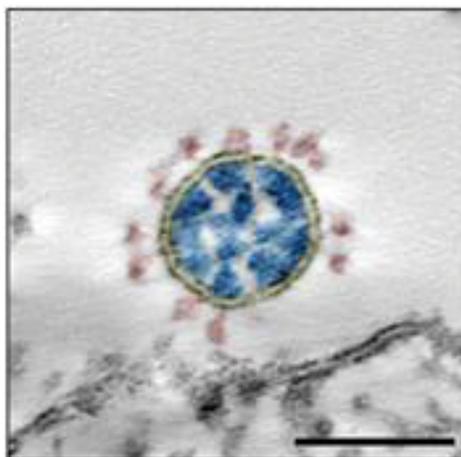
**FIGURA 1** – CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE

LEGENDA: Classificação dos coronavírus de acordo com os gêneros. Em vermelho estão destacados os vírus que infectam humanos.

FONTE: SINGH & YI, 2021.

### 2.1.2 Morfologia e Genoma

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, suas partículas virais são esféricas, pleomórficas e com aproximadamente 80-120 nm (FIGURA 2). É composto por uma molécula de RNA não segmentada, fita simples, de polaridade positiva (CHEN, *et al.*, 2021). O genoma é envolvido por um envelope esférico com projeções em sua superfície e expressa quatro proteínas estruturais principais: a proteína *spike* (S), proteína de membrana (M), proteína do envelope (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (LU, *et al.*, 2020; ICTV, 2021).

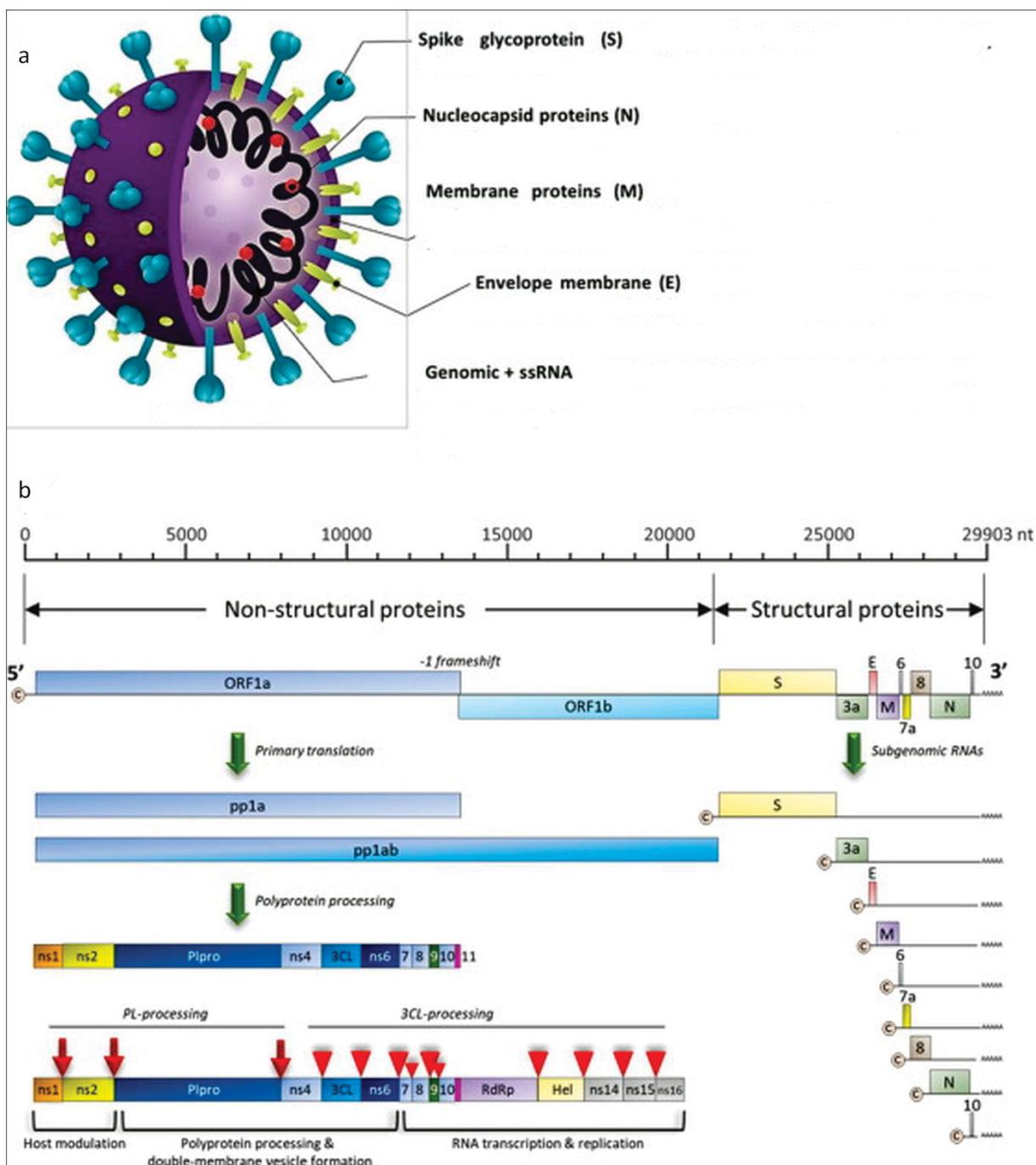


**FIGURA 2** – ESTRUTURA DO VÍRUS SARS-COV-2

LEGENDA: Microscopia eletrônica de transmissão do SARS-CoV-2 na superfície de uma célula Vero. As principais características ultraestruturais do vírus foram destacadas manualmente pelo autor por cores: amarelo = membrana que envolve o vírus, vermelho = proteína S (trimérica), azul = ribonucleoproteína (proteína N e RNA). Barra de escala = 100nm.

FONTE: LAUE *et al.*, 2021.

Seu genoma possui cerca de 29.900 nucleotídeos, 29 genes, que contém quatorze quadros de leitura abertos (*Open Reading Frames* – ORF), que podem ser divididos em duas partes. Os dois primeiros terços do genoma do SARS-CoV-2 consistem nas principais ORF, ORF1a e 1ab, que são traduzidas diretamente nas poliproteínas pp1a e pp1ab, a partir das quais são produzidas dezesseis proteínas não estruturais (NSP), NSP1–NSP16 (BORGES, *et al.*, 2020; HILLEN, *et al.*, 2020). O terço restante do genoma tem ORF sobrepostas, codificando quatro proteínas estruturais, bem como várias proteínas acessórias (FIGURA 3).



**FIGURA 3 - ESQUEMA DA ESTRUTURA E DO GENOMA DO VÍRUS SARS-COV-2**

LEGENDA: a) Estrutura do vírus SARS- CoV-2. b) Genoma SARS- CoV-2 organizado pelas estratégias de expressão gênica. Os dois terços proximais do genoma contêm dois quadros de leitura abertos sobrepostos (ORF1a e ORF1ab) que codificam dois longos precursores de poliproteínas, pp1a e pp1ab.

FONTE: adaptado HASSANIN *et al.*, 2021

### 2.1.3 Proteoma

Ao todo o vírus SARS-CoV-2 expressa 31 proteínas, 16 NSP (NSP1-16), 4 estruturais (*spike* (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N)) e 11 acessórias (MARIANO *et al.*, 2020). As NSP são essenciais na replicação viral, transcrição e produção de proteínas do envelope. Dentre as estruturais, a de maior relevância é a *spike*, responsável pela ligação ao receptor da célula do hospedeiro, possui propriedades antigênicas e por isso é alvo de vacina e medicamentos. (REDONDO *et al.*, 2021). As proteínas acessórias foram menos caracterizadas do que outras e, embora não sejam essenciais para a replicação do vírus, sabe-se que algumas desempenham um papel importante nas interações vírus-hospedeiro. Mutações em proteínas acessórias como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 ou ORF10 foram observadas em variantes de interesse, o que, hipoteticamente, pode ter contribuído para aumentar a patogenicidade e a transmissibilidade nessas variantes. (ROHAIM *et al.*, 2021). O quadro 1 descreve cada proteína.

**QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (continua)**

PROTEÍNAS	DESCRIÇÃO	FONTE
NSP1	liga-se ao RNA ribossômico 18S no canal de entrada de RNA mensageiro (RNAm) para interferir na tradução do mRNA.	NARAYANAN, <i>et al.</i> , 2015
NSP2	modula a via de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira.	CORNILLEZ-TY, <i>et al.</i> , 2009
NSP3	separa a proteína traduzida.	RAJ, 2020
NSP4	contém o domínio transmembranar 2 (TM2) e modifica as membranas do retículo endoplasmático.	OOSTRA, <i>et al.</i> , 2007
NSP5	participa do processo de poliproteína durante a replicação.	MIELECH, <i>et al.</i> , 2014
NSP6	é um domínio transmembranar.	BENVENUTO, <i>et al.</i> , 2020
NSP7	aumenta significativamente a combinação de NSP12 e possui atividade de polimerase de RNA independente de primer.	XIAO, <i>et al.</i> , 2012
NSP8	atividade primase.	TAN, <i>et al.</i> , 2018
NSP9	complexada com a NSP8, está envolvida na replicação do RNA, funcionando como uma proteína de ligação a RNA fita simples e também está envolvida com a virulência viral.	LITTLER, <i>et al.</i> , 2020

**QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (continuação)**

<b>PROTEÍNAS</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>FONTE</b>
NSP10	é crítico para a metilação cap de mRNA virais.	DEMING, <i>et al.</i> , 2007
NSP11	essencial para replicação.	FANG, <i>et al.</i> , 2008
NSP12	contém a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é uma composição crítica de replicação/transcrição do coronavírus.	TE VELTHUIS, <i>et al.</i> , 2010
NSP13	atividade de helicase e RNA TPase.	IVANOV, <i>et al.</i> , 2004
NSP14	é um domínio de exoribonuclease de revisão.	MINSKAIA, <i>et al.</i> , 2006
NSP15	possui atividade de endoribonuclease dependente de Magnésio(2+).	DENG & BAKER, 2018
NSP16	é uma 2'-O-ribose metiltransferase.	RAJ, 2020
S	glicoproteína responsável pelo reconhecimento do receptor do hospedeiro seguido por sua ligação e fusão.	SATARKER & NAMPOOTHIRI, 2020
M	inibição de NFκB por meio de interações com I Kappa B Kinase que reduz os níveis de COX-2, aumentando assim a proliferação do patógeno viral. Pode ser encarada como uma opção terapêutica para inibir a formação do vírion e prevenir reações inflamatórias nas células hospedeiras.	SATARKER & NAMPOOTHIRI, 2020
E	proteína integral de membrana, forma viroporinas que são essenciais para a montagem viral, juntamente com sua liberação. Também medeia processos patogênicos e induz citotoxicidade.	SATARKER & NAMPOOTHIRI, 2020
N	a proteína viral mais abundante, é expressa em amostras do hospedeiro durante os estágios iniciais da infecção. Liga-se ao RNA viral para formar um núcleo de uma ribonucleoproteína que ajuda na entrada da célula hospedeira e na interação com os processos celulares após a fusão do vírus.	SATARKER & NAMPOOTHIRI, 2020

**QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAS (continuação)**

<b>PROTEÍNAS</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>FONTE</b>
ORF3a	uma viroporina que funciona como um canal iônico que pode promover a liberação do vírus e é necessária para replicação e virulência máximas.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF3b	potente antagonista do interferon (IFN), suprimindo a indução do IFN-I com mais eficiência do que seu ortólogo SARS-CoV.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF3c	interações dentro da bicamada lipídica, como atividades de sinalização de membrana ou associadas à membrana.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF3d	possui interação com a proteína mitocondrial STOML2 e apesar de não não haver descrita nenhuma outra característica funcional provoca, juntamente com as proteínas N e ORF8, ORF3d, as respostas de anticorpos mais fortes medidas no soro de pacientes com COVID-19.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF6	potente antagonista de IFN.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF7a	proteína transmembrana tipo I, além de antagonizar a resposta do IFN-I é sugerido que se liga a monócitos CD14+ no sangue periférico humano com alta eficiência, levando à diminuição da capacidade de apresentação de antígenos e induzindo uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias. A interação entre SARS-CoV-2, ORF7a e monócitos sugere que essa proteína pode desempenhar uma função fundamental no recrutamento de monócitos para o pulmão durante a COVID-19.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021

**QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (continuação)**

PROTEÍNAS	DESCRIÇÃO	FONTE
ORF7b	proteína transmembrana localizada no aparelho de golgi. A princípio não se mostra essencial para a replicação viral. Entretanto, como é uma proteína que se agrupa em multímeros, por meio de um zíper de leucina, alguns autores sugerem que possa interferir em alguns processos celulares subjacentes a alguns sintomas comuns na COVID-19 que envolvam a formação do zíper de leucina e adesão célula-célula epitelial, como desregulação da frequência cardíaca.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF8	função exata ainda indefinida. Deleções em ORF8 resultam em doença mais branda, diminuição da hipóxia e diminuição da liberação de citocinas inflamatórias, enquanto que sua ausência completa reduz a capacidade replicativa viral. Algumas funções importantes foram atribuídas a esta proteína, como apoptose e antagonismo à via de sinalização do IFN. Estudos apontam capacidade de escape da imunidade inata do hospedeiro, prejudicando a apresentação do antígeno e a resposta antiviral mediada pelo IFN tipo I, além do poder de ativar a via de sinalização da interleucina (IL) IL-17 e promover a expressão de fatores pró-inflamatórios, contribuindo assim para a tempestade de citocinas.	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF9b	suprime a imunidade inata limitando, portanto, a resposta do interferon do hospedeiro. A superexpressão induz a autofagia em células hospedeiras	REDONDO <i>et al.</i> , 2021
ORF9c	interage com os receptores de remodelação lipídica e na resposta ao estresse do retículo endoplasmático. Estudos experimentais mostraram que o ORF9c SARS-CoV-2 suprime a resposta antiviral	REDONDO <i>et al.</i> , 2021

**QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAS (continuação)**

PROTEÍNAS	DESCRIÇÃO	FONTE
ORF10	não é essencial para infecção por SARS-CoV-2, ainda não foram descritas funções biológicas específicas. Sua exclusão não altera a capacidade de replicação viral, nem de transmissão	REDONDO <i>et al.</i> , 2021

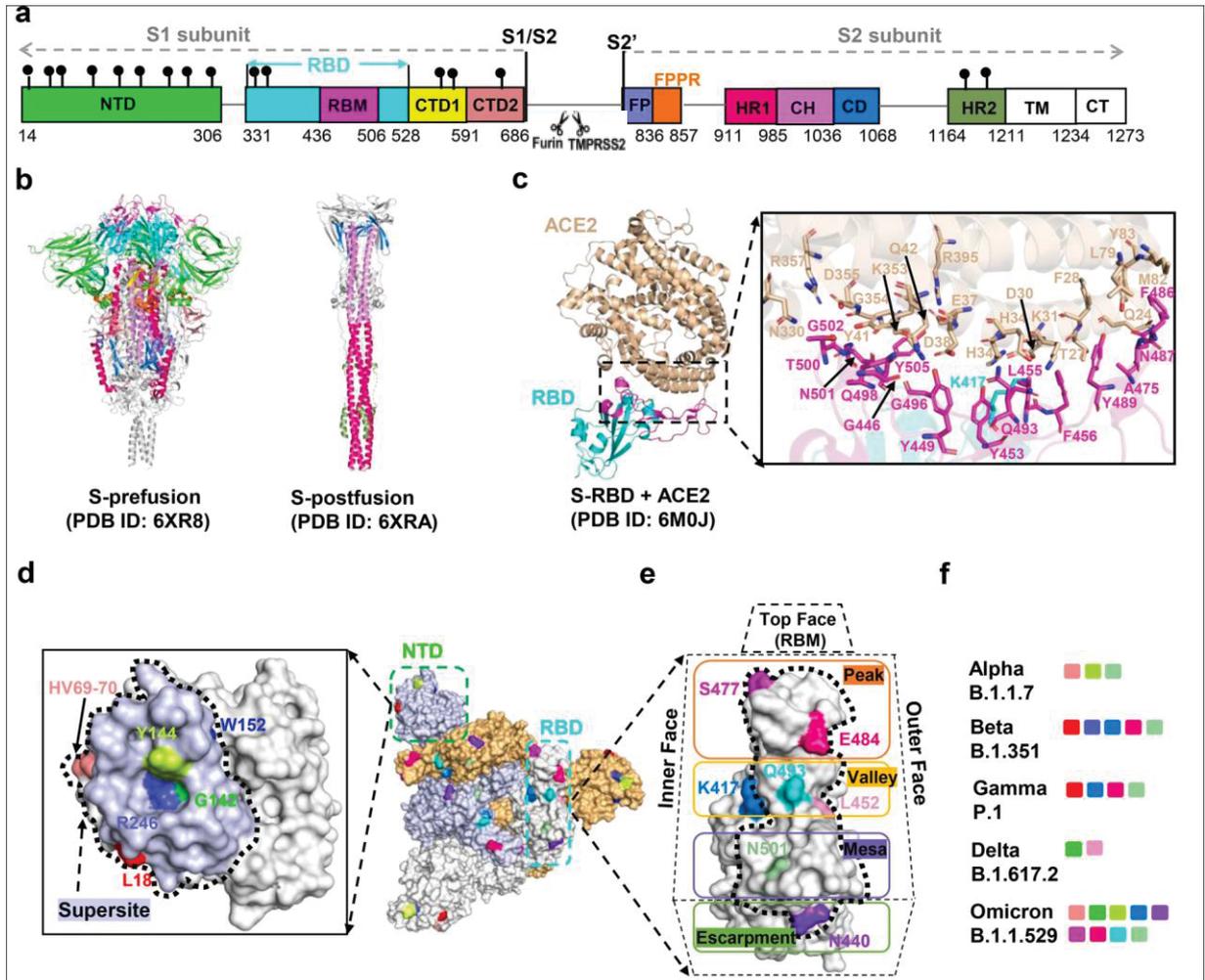
### 2.1.3.1 Proteína *spike*

A *spike* é uma proteína de membrana glicosilada de fusão de classe I, é formada por 1273 aminoácidos (aa) que consiste em um peptídeo sinal (aminoácidos 1–13) localizado no terminal N (1–13aa), a subunidade S1 (14–685aa) e a subunidade S2 (686– 1273 aa). As duas últimas regiões são responsáveis pela ligação ao receptor e fusão da membrana, respectivamente. Na subunidade S1, há um domínio N-terminal (NTD) (14–305 aa) e um domínio de ligação ao receptor (RBD, 319–541 aa). O peptídeo de fusão (FP) (788–806 aa), a sequência de repetição heptapeptídica 1 (HR1) (912–984 aa), a HR2 (1163–1213 aa), o segmento transmembranar (TM) (1213–1237 aa) e o segmento citoplasmático (1237– 1273) compreendem a subunidade S2. A proteína *spike* forma visualmente um halo em forma de coroa ao redor da partícula viral (ZHANG, *et al.*, 2021a).

As extremidades da proteína *spike* são revestidas com moléculas de polissacarídeos que têm desde a função de regular a dinâmica conformacional do RBD a estabilização da proteína. Os resíduos de manose dentro desses glicanos são importantes para interagir com fatores de ligação da superfície celular, como glicosaminoglicanos e oligossacarídeos antes da ligação à ECA2. O complexo spike-ECA2 possui extensa glicosilação, demonstrando o papel dos glicanos na modulação do vírus hospedeiro. Os glicanos também mascaram estericamente os epítomos polipeptídicos subjacentes dos anticorpos neutralizantes e, portanto, também são referidos como um "escudo glicano". Esses glicanos são geralmente considerados uma estratégia para evadir a resposta imune do hospedeiro, pois mascaram a superfície da proteína e, conseqüentemente, limitam o acesso do anticorpo aos epítomos de neutralização de proteínas. Além dessas funções, a

glicosilação também é importante para a virulência do vírus e infecção viral (Wang et al, 2020; WATANABE, *et al.*, 2020; GONG et al., 2021).

Antes da adsorção ao receptor celular, a proteína *spike* está em uma forma trimérica, pois se encontra no estado pré-fusão, em que a subunidade S2 adota uma conformação empacotada em torno de uma espiral de três filamentos formada por região de hélice central. No estado de pós-fusão, HR1 sofre uma transição significativa de redobramento e uma longa espiral central de três filamentos de ~180 Å é montada por uma  $\alpha$ -hélice contínua formada por HR1 e CH. Além disso, HR2 torna-se parcialmente ordenado e empacota contra o sulco de HR1 espiralado com a formação da estrutura de feixe de seis hélices que contribui para a fusão do vírus e da membrana celular. O estado de pós-fusão favorece a disseminação viral e o escape do sistema imune do hospedeiro, sendo este fator relacionado à patogenicidade do SARS-CoV-2 (FIGURA 4) (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; PÖHLMANN, 2020; WANG, *et al.*, 2020; SHANG, *et al.*, 2020; TANG, *et al.*, 2020; BORGES, *et al.*, 2020).



**FIGURA 4 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA SPIKE**

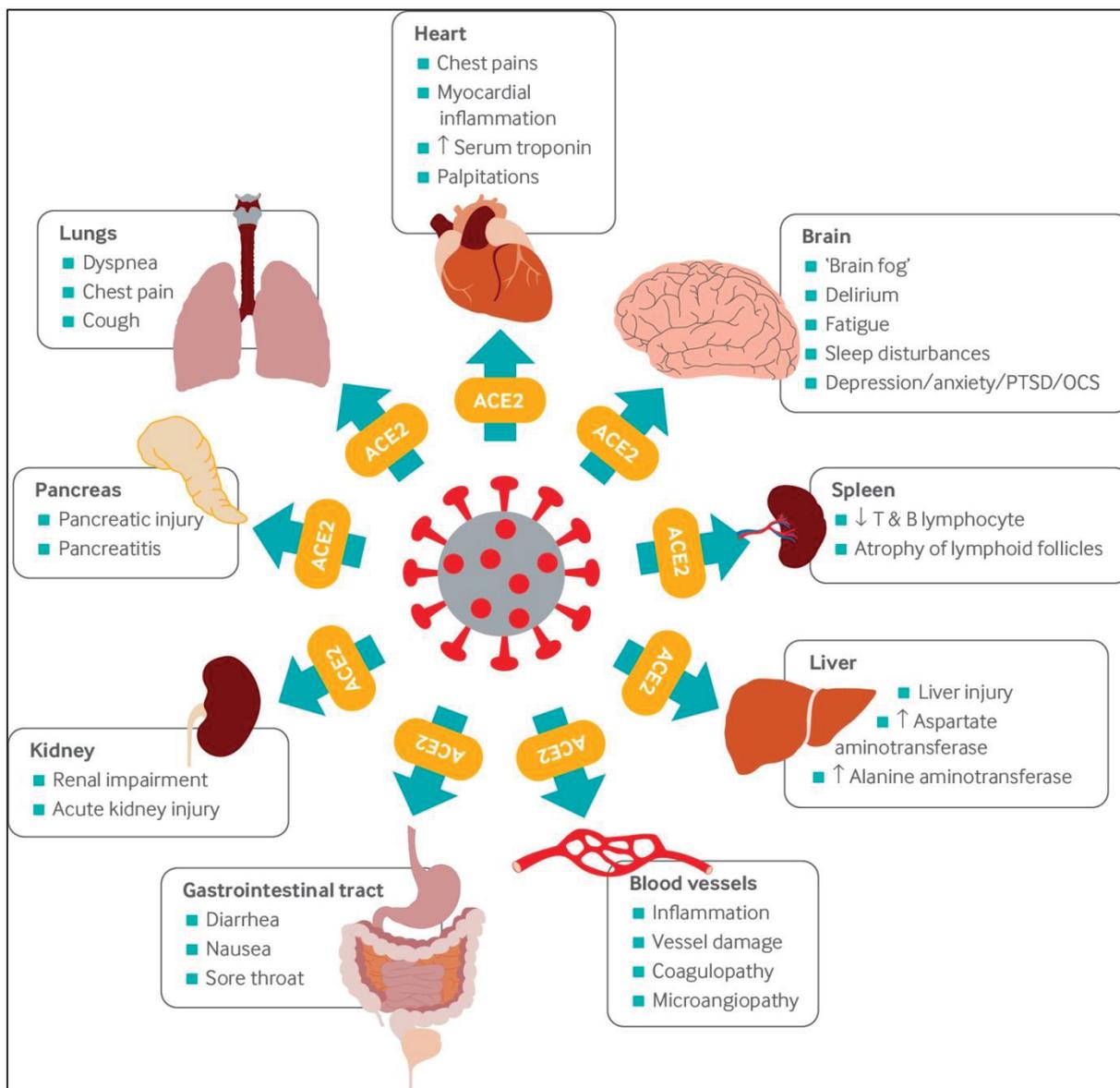
LEGENDA: **a)** Estrutura da proteína *spike* em conformação primária. NTD - domínio N-terminal; RBD - domínio de ligação ao receptor celular, RBM - motivo de ligação ao receptor; CTD1 - domínio C-terminal1; CTD2 domínio C-terminal 2; FP - peptídeo de fusão; FPPR - região proximal de peptídeo de fusão; HR1 - repetição heptad 1; CH - região de hélice central; CD - domínio conector; HR2 - repetição heptad 2, TM segmento transmembranar; CT - cauda citoplasmática. **b)** Estruturas do trímero da *spike* nos estados de pré-fusão e pós-fusão. Cada domínio é marcado com uma cor correspondente à estrutura da proteína esquematizada no **a**. **c)** Estrutura do RBD (azul ciano) em complexo com ECA2 (rosa). Os resíduos envolvidos nas interações entre o RBD e a ECA2 são mostrados como bastões. **d)** Motivos dos anticorpos direcionados a NTD, o tracejado contém o “supersítio” NTD. As posições dos resíduos de mutações e deleções importantes são indicadas no NTD. Ao lado direito estão as mutações representadas em cada variante. **e)** Localização de importantes mutações emergentes no RBD. O RBM pode ser topologicamente dividido em três subseções: o “pico” que inclui os resíduos S477 e E484; o “vale” que inclui K417, Q493 e L452; e a “mesa” inclui N501. **f)** Mutações e resíduos deletados que afetam a atividade dos anticorpos envolvidos em variantes de interesse e de preocupação.

FONTE: adaptado YAN, *et al.*, 2022.

A proteína *spike* apresenta um papel crucial na infecção e transmissão do vírus, sendo o foco para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (mAbs) e produção de vacinas (LI, *et al.*, 2020; WALLS, *et al.*, 2020).

#### 2.1.4 Replicação Viral

A entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, ocorre devido a alta afinidade da *spike* à enzima conversora de angiotensina II (ECA2, ACE2 em inglês), principal receptor celular do SARS-CoV-2. A expressão de ECA2 em vários tecidos contribui para a infecção multitecidual por SARS-CoV-2 em humanos. Apesar da via respiratória ser dominante na infecção por SARS-CoV-2, a ECA2 também é expressa no endotélio, intestino delgado, testículos, rim, músculo cardíaco, cólon e glândula tireoide (FIGURA 5), o que tem sido sugerido como uma explicação para complicações multissistêmicas da COVID-19. Ademais, várias comorbidades, incluindo hipertensão, dislipidemia, diabetes, doenças pulmonares crônicas, idade avançada e tabagismo, são fatores de risco para COVID-19 devido à possível modulação positiva da expressão de ECA2 (DONOGHUE, *et al.*, 2000; HAMMING, *et al.*, 2004; XU, *et al.*, 2020; BORGES, *et al.*, 2020).

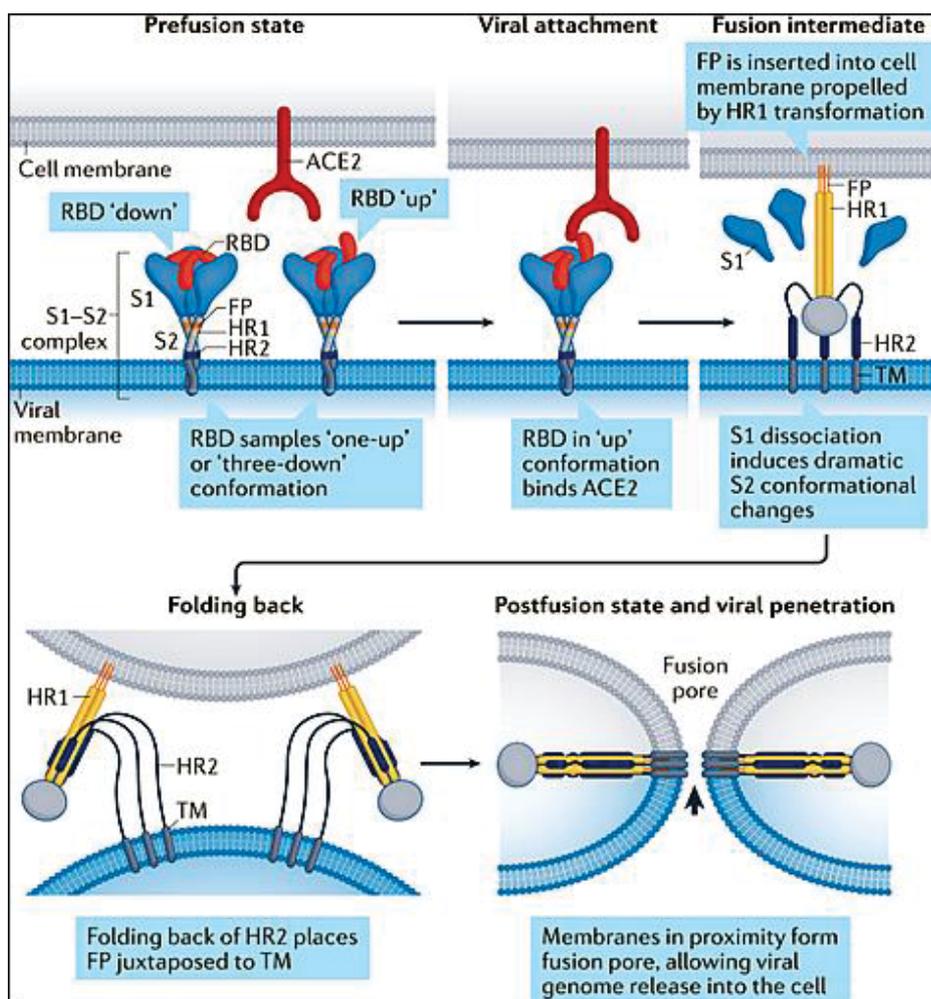


**FIGURA 5 - EXPRESSÃO DE ECA2 EM MÚLTIPLOS TECIDOS.**  
 FONTE – CROOK *et al.*, 2021

A infecção viral ainda requer a clivagem proteolítica da proteína *spike* pela proteína serina transmembrana 2 (TMPRSS2), expressa principalmente em células epiteliais do íleo, fígado, pulmão, mucosa nasal, bexiga, testículo, próstata e rim. Além de também ser expressa em enterócitos, células ductais pancreáticas, células epiteliais luminais da próstata, oligodendrócitos cerebrais, células tubulares proximais renais e células principais do ducto coletor, neurônios inibitórios entéricos, fibroblastos ou pericitos cardíacos e vários tecidos (MUUS *et al.*, 2021). A TMPRSS2 é associada à digestão, remodelação de tecidos, coagulação, fertilidade, respostas inflamatórias, invasão de células tumorais, apoptose e dor. Possui um gene andrógeno-responsivo que é um agente chave no câncer de próstata, conduzindo à

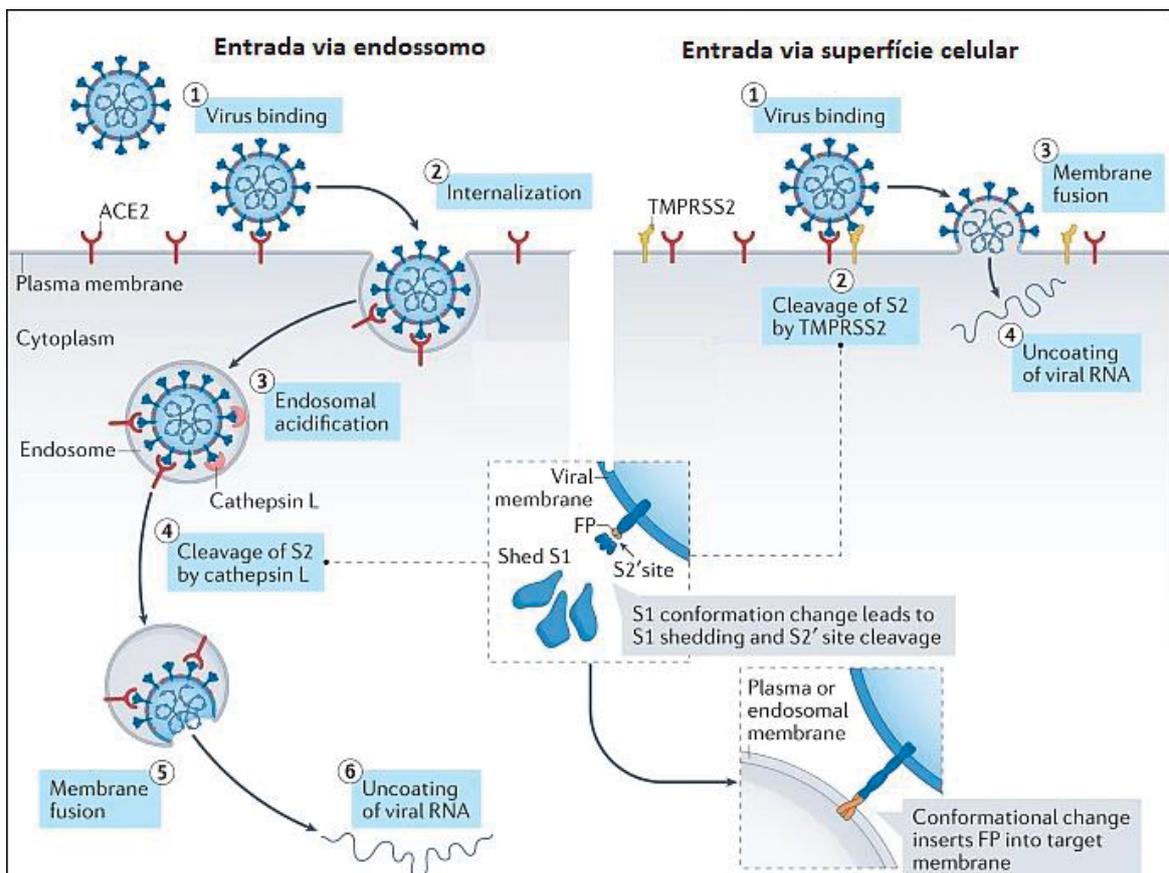
expressão do oncogene da família ETS. Entretanto, apesar de que ser esperado uma maior expressão de TMPRSS2 no sexo masculino, a literatura recente sugere que o estrógeno também pode regulá-la positivamente (ISHAK, et al., 2022).

Conforme ilustrado na figura 6, a transição estrutural da conformação de pré-fusão para a conformação de pós-fusão da *spike* é induzida a partir da ligação da porção RBD do vírus à ECA2, que permite a exposição do local de clivagem S2'. A clivagem no sítio S2' libera as restrições estruturais no peptídeo de fusão (FP) e inicia uma cascata de eventos de redobramento em S2, provavelmente acompanhados pela dissociação completa de S1. A formação da longa espiral central de três fitas e a aproximação de HR1 e HR2 da subunidade S2 levam à estrutura de pós-fusão de S2, formando um feixe de seis hélices, que une as duas membranas, facilitando a formação de poros de fusão e a entrada viral (FAN *et al.*, 2020).



**FIGURA 6** – ADSORÇÃO DO VÍRUS À MEMBRANA PLASMÁTICA CELULAR  
 LEGENDA – ACE2= ECA2; TM= segmento transmembranar; FP= peptídeo de fusão.  
 FONTE - JACKSON *et al.*, 2022.

Dependendo da rota de entrada utilizada pelo SARS-CoV-2, o sítio S2' é clivado por diferentes proteases. Se a célula-alvo expressa TMPRSS2 insuficiente, ou se um complexo vírus-ECA2 não encontra TMPRSS2, o complexo vírus-ECA2 é internalizado via endocitose mediada por clatrina em endolisossomos, onde a clivagem de S2' é realizada por catepsinas, que requerem um ambiente ácido para sua atividade. Na presença de TMPRSS2, a clivagem S2' ocorre na superfície celular. Em ambas as vias de entrada, a clivagem do sítio S2' expõe o peptídeo de fusão e a dissociação de S1 de S2 induz alterações conformacionais significativas na subunidade S2, impulsionando o peptídeo de fusão para a frente na membrana alvo, iniciando a fusão da membrana. A fusão entre as membranas viral e celular forma um poro de fusão através do qual o RNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira para iniciar o processo de replicação (FIGURA 7) (JACKSON *et al.*, 2022).



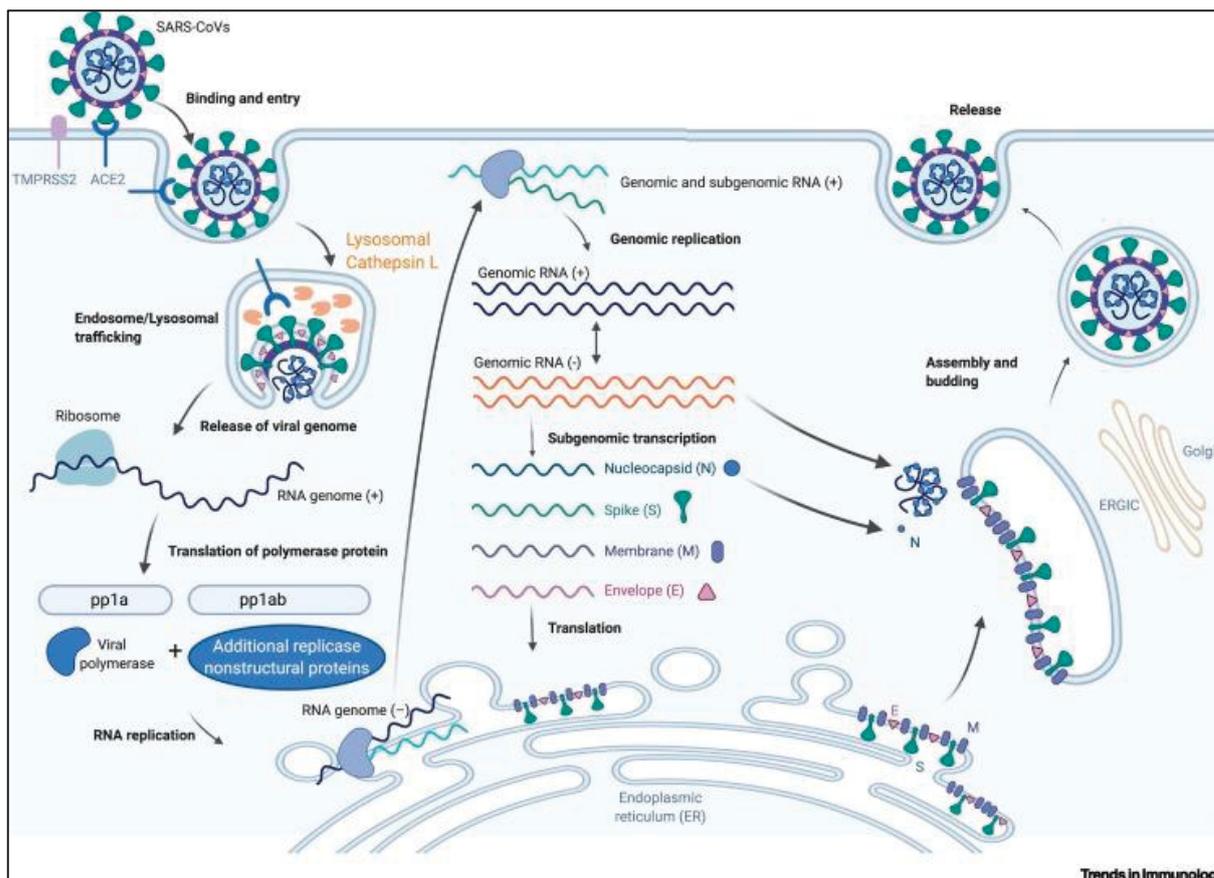
**FIGURA 7 – VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DO SARS-COV-2 NA CÉLULA DO HOSPEDEIRO**

**LEGENDA –** A entrada do vírus via endossomo (esquerda) é realizada na falta da TMPRSS2, o vírus é internalizado através de uma vesícula transportadora (2) a clivagem de S2' é realizada por catepsinas (4). Já, a entrada pela superfície celular (direita) é a principal via de internalização celular,

a clivagem é realizada por TMPRSS2 (2) e, após a fusão com a membrana da célula do hospedeiro (3), o RNA viral é inserido no citoplasma.  
FONTE: adaptado JACKSON *et al.*, 2022.

Apesar de principal, a ECA2 não é a única via de entrada celular utilizada pelo SARS-CoV-2. Estudos recentes demonstraram que esse vírus pode usar outras vias de entrada como: neuropilina-1, sistema tirosina-proteína quinase UFO (AXL), receptor de asialoglicoproteína 1 (ASGR1) e proteína Kremen 1 (KREMEN1). Os vírus também podem invadir células hospedeiras por meio da internalização mediada por anticorpos dos imunocomplexos vírus-anticorpos. Esse fenômeno, chamado efeito de aprimoramento dependente de anticorpos (ADE), já foi documentado para vários vírus, dentre eles os vírus da dengue, zika e CoV, entre outros. Embora estudos *in vitro* não tenham demonstrado nenhum efeito de ADE nas infecções por SARS-CoV-2, estudos recentes em pacientes mostram que vários anticorpos, como XG016, XG005, DH1047, DH1041 e MW05, de fato induzem ADE (ZHANG *et al.*, 2021b).

Após a entrada do vírus, a replicação do genoma SARS-CoV-2 é operada pela cooperação de várias proteínas não estruturais. O SARS-CoV-2 infecta principalmente células epiteliais linfáticas e pneumócitos tipo II com o início da resposta imune inata produzindo interferons (IFN). No entanto, o IFN ativa a expressão da proteína ECA2, que atua como receptor para a ligação do vírus às células hospedeiras. O RNA de fita simples no genoma viral é traduzido pela maquinaria do hospedeiro para produzir polipeptídeos virais (pp1a e pp1ab), que sofrem clivagem proteolítica pelas proteínas PLpro e Mpro para sintetizar proteínas não estruturais. Essas NSP codificam o complexo de transcrição de replicação, que se replica continuamente e produz uma série de RNA mensageiros subgenômicos que codificam as proteínas acessórias e estruturais. O RNA genômico viral e as proteínas são montados para formar as partículas virais no compartimento intermediário retículo endoplasmático-golgi. Os vírus formados são liberados por exocitose para infectar outras células do hospedeiro (FIGURA 8) (HARRISON, *et al.*, 2020).



**FIGURA 8 - CICLO DE REPLICAÇÃO DO SARS-COV-2**

LEGENDA – Após a ligação da proteína *spike* à ECA2 ocorre a fusão de membranas e o RNA viral é inserido no citosol através de poros de fusão. A replicação começa em vesículas de membrana dupla induzidas por vírus derivadas do retículo endoplasmático (ER). O RNA viral serve como modelo para o RNA de cadeia negativa completo e o RNA subgenômico (sgRNA). A tradução do sgRNA resulta em proteínas estruturais e proteínas acessórias que são inseridas no compartimento intermediário retículo endoplasmático-golgi (ERGIC) para a montagem do virion. Por fim, genomas de RNA positivo subsequentes são incorporados em virions recém-sintetizados, que são secretados pela membrana plasmática.

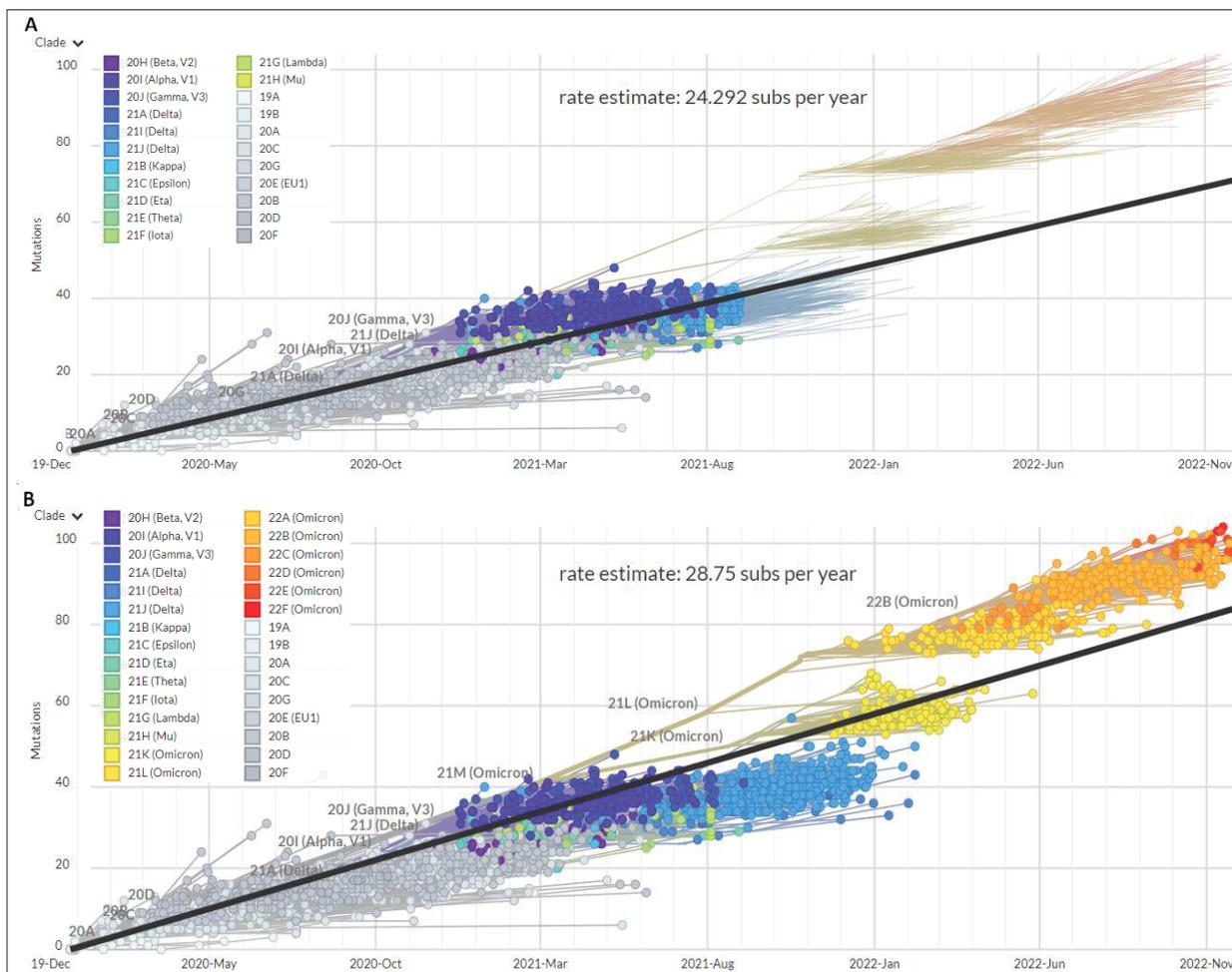
FONTE – HARRISON, *et al.*, 2020.

### 2.1.5 Mutações

Os vírus com genoma de RNA são conhecidos por terem taxas de mutação mais altas do que vírus DNA. A mutagenese do genoma do SARS-CoV-2 é relatada desde os estágios iniciais da pandemia, sendo estimulada por inúmeros processos, incluindo mudanças aleatórias em escala molecular; erros de replicação, transcrição e de tradução, resposta e recombinação vírus-hospedeiro e seleção natural. Entretanto, o vírus SARS-CoV-2 apresenta taxa de mutação bem inferior a outros vírus de RNA, como vírus influenza (respectivamente  $8,5 \times 10^{-4}$  e  $2,3 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos/local/ano), pois, diferente de outros vírus, o SARS-CoV-2 possui uma exoribonuclease de revisão – a NSP14 (MINSKAIA, *et al.*, 2006; VOLZ, *et al.*, 2021).

As mutações mais comuns descritas são polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e pequenas deleções. Embora a maioria das mutações sejam silenciosas – sem impacto biológico –, ou deletérias, outras podem conferir vantagem seletiva no *fitness* viral. Desta forma, a emergência de novas variantes pode implicar diretamente na virulência, infectividade, reinfeção, transmissibilidade, gravidade de doença e escape imunológico do vírus SARS-CoV-2. Este último pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos como: alteração da interação com genes reguladores imunológicos, perda de epítomos, escape de células T citotóxicas e baixa afinidade por anticorpos neutralizantes (HAAGE, *et al.*, 2021).

A contínua evolução molecular do SARS-CoV-2 tem levado ao surgimento de diversas variantes (FIGURA 9). A caracterização do vírus circulante demonstra que o vírus original identificado pela primeira vez em Wuhan, em dezembro de 2019, desapareceu progressivamente nas ondas subseqüentes com a entrada das variantes. Além disso, o acúmulo de mutações na emergência de *Gamma* e *Delta* aconteceram acima da linha de tendência em relação aos genótipos anteriores (Figura 9A) e o acúmulo de mutações na emergência de *Omicron* foi mais acentuado do que estas duas (Figura 9B) (HADFIELD *et al.*, 2018).



**FIGURA 9 – EVOLUÇÃO DO SARS-CoV-2.** Genótipos de todas as sequências depositadas no banco de dados GISAID. A) Período entre Dez/2019 e Ago/2021. B) Período entre Dez/2019 e Nov/2022. Atualmente as sublinhagens da variante *Omicron* dominam os casos de infecção por SARS-CoV-2. A linha em preto representa uma linha de tendência linear, as sequências estão coloridas pelo clado a que pertencem.

FONTE: HADFIELD *et al.*, 2018. (<https://nextstrain.org/sars-cov-2/>)

Periwal e colaboradores (2022) demonstraram que a proteína *spike* apresentou a maior frequência de mutações (20,10%), seguida por ORF6 (18%) e ORF1ab (8,59%). A proteína de membrana teve o menor número de mutações em comparação com as outras proteínas, sugerindo que essa região pode ser altamente conservada entre as variantes do SARS-CoV-2.

A epidemiologia molecular mundial tem concentrado suas investigações principalmente na proteína *spike* devido a seus papéis principais na entrada do vírus, na atividade antigênica, bem como pelo fato dessa proteína constituir a base de inúmeras vacinas SARS-CoV-2 (RUIZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2021).

As regiões mais diversas na genômica do vírus estão distribuídas no NTD e na RBD da *spike* (Figura 4), sendo as posições E484, S494, N501, K417, L452 as mais importantes em relação a interação RBD-ECA2. Estudos demonstram que as

mutações S13I, L18F, 69–70del, 141–143del, 144del, W152C R246I/M, N440K, K417N/T/M, K444Q, V445A, N450D, L452R, S477G/N/R, E484K/A/Q/P, Q493K/R, N501Y, H655Y estão associadas com a evasão de anticorpos (LIU *et al.*, 2021a). As mutações G339D, N440K, L452R, S477N, T478K, E484K e N501Y reduzem a neutralização dos vírus em soros convalescentes. As mutações S477G/N/R, N501Y, D614G aumentam a afinidade de ligação da *spike* com a ECA2; já a L452R e a P681H/R aumentam a transmissibilidade do vírus; enquanto a 69–70del e a P681H/R aumentam a infectividade do vírus e a 69–70del e a K417N estão relacionadas à alteração conformacional da proteína *spike* (YAN, *et al.*, 2022).

A primeira mutação estabelecida na população foi uma alteração do ácido aspartato para uma glicina na subunidade S1 da proteína *spike* na posição 614. A D614G foi identificada no final de janeiro de 2020 e se espalhou rapidamente pela população global. Ela é encontrada em todas as principais cepas circulantes de SARS-CoV-2 e foi associada com um aumento substancial da infectividade do vírus em relação à cepa ancestral Wuhan-19 (KORBER *et al.*, 2020). Embora a aquisição do sítio furina pelo SARS-CoV-2 e a clivagem resultante da proteína S pareçam ser essenciais para a infecção humana, eles também tornam o vírus menos infeccioso que o SARS-CoV. Para compensar essa desvantagem, a proteína *spike* do SARS-CoV-2 parece ter adquirido uma associação intermolecular mais forte entre as subunidades S1 e S2 por meio da mutação D614G, que torna o loop 630 mais ordenado, protegendo NTD e CTD1, reduzindo a perda de S1. Vários estudos têm apoiado um efeito estabilizador como o aumento da infectividade da variante do vírus (ZHANG *et al.*, 2021b).

As mutações E484GK/Q/P foram descritas como as mutações mais importantes na redução da ligação e neutralização de anticorpos policlonais. De acordo com estudos essa mutação reduz 10 vezes mais a resposta do vírus ao sistema imune em comparação com outras mutações (GREANEY *et al.*, 2021).

A mutação N501Y aumenta a afinidade de ligação da *spike* ao receptor celular ECA2, pois ao adicionar uma ligação de hidrogênio entre eles aumenta a eficiência da infecção e transmissão viral (STARR *et al.*, 2020).

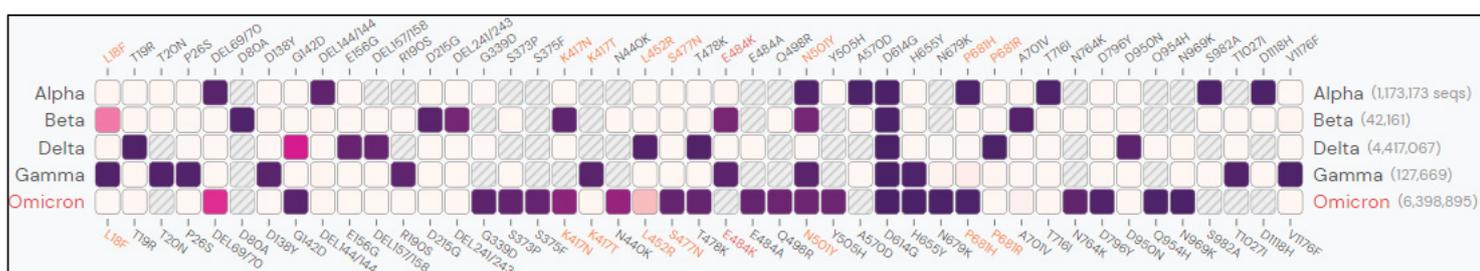
A mutação P681H é adjacente ao local de clivagem da furina, potencialmente pode ter um efeito na clivagem S1/S2 e, portanto, na entrada celular e infectividade (HOFFMAN *et al.*, 2020).

A mutação N439K - a segunda mutação mais comum no RBD da *spike* e a sexta mutação mais comum em toda *spike* - é também uma mutação crucial que compromete a resposta humoral favorecendo o escape de anticorpos neutralizantes pelo vírus. Ela é relatada como favorecendo a flexibilidade da *spike*, permitindo uma conformação aberta onde um RBD livre pode se ligar à ECA2 e, assim, aumentar a infectividade e evitar a resposta imune humoral (THOMSON *et al.*, 2020).

As mutações A475KV e F490L conferem resistência a anticorpos policlonais neutralizantes, anticorpos monoclonais e plasmas de convalescentes. A mudança de A475 para V475 leva à formação de ligações de hidrogênio mais fracas e interações hidrofóbicas entre RBD e os anticorpos neutralizantes. Já a mudança de F490 para L490 leva à perturbação da interação hidrofóbica de moléculas envolvidas na integração anticorpo-RBD (LI *et al.*, 2020).

Catorze das dezoito mutações que ocorrem no NTD das VoC ocorrem nas proximidades do "supersítio" - aminoácidos 14–20, 140–158 e 245–264, local onde se ligam quase todos os anticorpos (Figura 4d). Os anticorpos desse grupo são sensíveis à conformação e também afetados por mutações além dos epítomos, como deleções frequentes localizadas em NTD (69–70del, 144del, 157–158del, 211del e 242–244del), sendo muitas dessas mutações encontradas na variante *Omicron*, que emergiu após a vacinação se tornar mais ampla.

A figura 10 ilustra as mutações mais frequentes das VoC na proteína *spike*.



**FIGURA 10** – FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NA SPIKE DE ACORDO COM A VARIANTE DE PREOCUPAÇÃO. Apenas mutações que ocorreram em mais de 75% em uma variante foram mostradas. Quadrados rachurados significam que não há descrição desta mutação, quadrado roxo significa 100% de identificação. A atual variante de preocupação, assim como suas mutações características estão destacados em vermelho.



FONTE: Gangavarapu *et al.*, 2022 (<https://outbreak.info>).

### 2.1.6 Variantes do SARS-CoV-2

As variantes de SARS-CoV-2 são classificadas pela OMS com base em alterações genéticas que tenham potencial de afetar as características do vírus, como transmissibilidade, virulência, alteração nos sintomas clínicos, diminuição da eficácia das medidas de saúde pública e sociais ou diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis. Eles são identificados como causadores de transmissão comunitária significativa ou múltiplos grupos de COVID-19 em vários países, causam aumento no número de novos casos ao longo do tempo, ou outros impactos epidemiológicos como aumento de hospitalização, óbito ou diminuição da efetividade de vacina e por isso, constitui um risco emergente para o agravamento da pandemia de COVID-19 (WHO, 2022).

Alterações de aminoácidos, epidemiológicas e/ou fenotípicas em relação a um vírus de referência, que pode causar transmissão comunitária são designadas pelas organizações de saúde pública como uma variante a ser monitorada (VuM). Já as variantes associadas ao aumento da transmissibilidade, aumento da virulência ou alteração do quadro clínico da doença, podendo prejudicar a ligação de anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente aumentar o risco de reinfecções, diminuir a eficácia das vacinas e das terapias disponíveis, são chamadas de variante de interesse (VoI). Quando uma VoI apresenta evidências de aumento de hospitalizações ou óbitos, ela passa a ser considerada uma variante de preocupação (VoC) (WHO, 2022).

Segundo a OMS (WHO, 2022), as VoI requerem uma vigilância constante, com caracterização laboratorial, se possível, ou investigações epidemiológicas como prevenção. As VoC necessitam de ações rápidas de saúde pública, como notificação aos centros internacionais de vigilância, de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional, para que possam ser estudadas estratégias que consigam controlar rapidamente a sua disseminação (WHO, 2022).

As variantes emergentes do SARS-CoV-2, principalmente as VoC, estão demonstrando sensibilidade reduzida a soros de convalescentes e anticorpos monoclonais, representando uma preocupação significativa nas estratégias de imunoterapia e imunização (SHARUN *et al.*, 2021).

Ao longo da pandemia, a OMS já designou cinco VoC: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* e, a vigente até novembro de 2022, *Omicron*. (HE *et al.*, 2021). O quadro 2

descreve as variantes que no período de emergência foram consideradas de interesse ou de preocupação.

A variante *Beta* surgiu na África do Sul, os registros das cepas mais antigas datam de março de 2020. Aproximadamente 77% de suas mutações não-silenciosas estão localizadas na proteína *spike*. Estudos mostraram que essa variante apresentou resistência à neutralização para a maioria dos anticorpos monoclonais em NTD e RBM. Essa resistência é atribuída principalmente a três mutações dentro do RBD (K417N, E484K e N501Y), sendo necessário que N501Y esteja em conjunto com a K417N e a E484K para atuar prejudicando a neutralização (WANG *et al.*, 2021).

A variante *Alpha* emergiu no Reino Unido, tem cepas identificadas a partir de setembro de 2020 e apesar de ter se originado após a *Beta*, se disseminou mais rápido que esta. *Alpha* possui 22 mutações, das quais 9 se encontram na proteína *spike*. E, apesar de três dessas mutações - N501Y, P681H e a deleção dos aminoácidos 69 e 70 (69–70del) - serem de potencial importância biológica, essa variante é sensível à neutralização por anticorpos induzidos pelas vacinas vigentes (GALLOWAY *et al.*, 2021; VOLZ *et al.*, 2021).

A terceira VoC, *Gamma*, foi identificada no Japão pela primeira vez no final de dezembro de 2020 em quatro viajantes que voltavam do estado Amazonas. Ela possui dez mutações na proteína *spike* diferentes das variantes descritas anteriormente, além das três mutações semelhantes à variante *Beta* (K417T, E484K e N501Y). Essa variante foi responsável pela segunda, e mais crítica onda pandêmica no Brasil até então (novembro de 2022). Estudos iniciais estimaram que ela apresentou entre 1,4 e 2,2 vezes mais transmissibilidade que suas antecessoras (FREITAS *et al.*, 2021).

A seguinte VoC, *Delta*, circulava desde outubro de 2020 na Índia e apresentou maior transmissibilidade quando comparada com as variantes anteriores. As pessoas infectadas com esta variante apresentaram uma carga viral cerca de 1.000 vezes maior do que as pessoas infectadas com o vírus da cepa selvagem, além de uma maior taxa de replicação. Isso explica por que essa variante se tornou dominante em todo o mundo, até o surgimento da variante *Omicron* (LAZAREVIC *et al.*, 2021)

A *Delta* contém várias mutações importantes em aminoácidos da proteína *spike* - incluindo a deleção nos resíduos 156 e 157 (156–157del) e a substituição

R158G no NTD, além das mutações L452R, T478K na RBD e da mutação perto do local de clivagem da furina (P681R). Estudos recentes que testaram a eficácia das vacinas *Pfizer/BioNTech* e *Oxford-AstraZeneca* mostraram uma sensibilidade reduzida da variante *Delta* à neutralização de anticorpos, o que pode estar relacionada às mutações no RBD e sua combinação com mutações no NTD (SCOVINO *et al.*, 2022).

Descrita em novembro de 2021 na África do Sul, a mais recente variante, a *Omicron*, é cerca de 2,8 vezes mais infecciosa que a *Delta*, possui quase 90% de probabilidade de não responder às vacinas e tem o maior número de mutações em comparação às demais variantes - mais de 30 mutações na *spike*, com cerca de 15 presentes no RBD, algumas em regiões que se sobrepõem às mutações das outras variantes, como K417, E484 e N501. Essas deleções e mutações estão associadas ao aumento da transmissibilidade, maior afinidade da proteína *spike* com a ECA2, e também, associadas ao escape imunológico do hospedeiro e à redução da neutralização dos anticorpos induzidos pela vacina, resultando em rápida disseminação em todo o mundo em um período mais curto (HE *et al.*, 2021; MAGAZINE *et al.*, 2022).

A primeira subvariante de *Omicron*, BA.1 exibiu forte escape imunológico da imunidade induzida pela dose de vacina de mRNA que foi recuperada pela administração pela dose de reforço. Além disso, ela exibiu redução da fusão célula-célula, a replicação prejudicada em células epiteliais das vias aéreas inferiores, bem como preferência de rota de entrada alterada. Estas características correlacionam-se com uma capacidade de replicação reduzida da *Omicron* em tecidos pulmonares, aumento do tropismo nasofaríngeo e diminuição da patogenicidade *in vivo* (CHEN *et al.*, 2022).

A subvariante BA.2 dominou a BA.1 em março de 2022 devido à sua transmissibilidade e evasão imunológica ligeiramente aumentadas, com capacidade de reinfectar indivíduos previamente infectados com BA.1. De BA.2, várias subvariantes emergiram em rápida sucessão, muitas vezes com circulações simultâneas. Em julho de 2022, BA.4 e BA.5 dominaram a subvariante BA.2, pois exibiram mais escape imune. Essas subvariantes deram origem a várias subvariantes, valendo destacar as subvariantes BQ.1 e BQ.1.1, que se originaram de BA.5, nas quais uma forte resistência à neutralização é observada em soros de pacientes com 3 doses de vacina de mRNA e naqueles infectados com outras

variantes, sendo essa característica impulsionada em grande parte pela mutação N460K (QU *et al.*, 2022).

**QUADRO 2- CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES (continua)**

NOME	DATA/PAIS		*TIPO	MUTAÇÕES NA SPIKE					REFERÊNCIA
	Designação OMS			NTD	RBD	CTD2	S2		
<i>Epsilon</i> (B.1.427/9)	Abr/20 EUA	Vol	S13I, W152C	L452R	D614G	-	MCCALLUM <i>et al.</i> , 2021		
<i>Zeta</i> (P.2) (B.1.1.28.2)	Abr/20 Brasil	Vol	L18F, T20N, P26S, D138Y, F157L, R190S	E484K,	D614G, H655Y	S929I, T1027I, V1176F	CHAKRABORTY <i>et al.</i> , 2021		
<i>Iota</i> (B.1.526)	Nov/20 EUA	Vol	L5F, T95I, D253G	S477N, E484K	D614G	A701N	LIU <i>et al.</i> , 2021b		
<i>Alpha</i> (B.1.1.7)	Dez/20 Reino Unido	VoC	69-70del, 144- 145del	N501Y	A570D, D614G, P681H	T716I, S982A, D1118H	WASHINGTON <i>et al.</i> , 2021		
<i>Beta</i> (B.1.351)	Dez/20 África do Sul	VoC	L18F, D80A, D215G, 241- 243del, R246I	K417N, E484K, N501Y	D614G	A701V	WU <i>et al.</i> , 2021		
<i>Gamma</i> (P.1) (B.1.1.28.1)	Jan/21 Brasil	VoC	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S	K417T; E484K N501Y	D614G, H655Y	T1027I, V1176F	NAVECA <i>et al.</i> , 2021		
<i>Mu</i> (B.1.621)	Jan/21 Colômbia	Vol	T95I, Y144S, Y145N	R346K, E484K, N501Y	D614G, P681H	D950N	WHO, 2022		

QUADRO 2- CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES (continuação)

NOME	DATA/PAÍS		*TIPO	MUTAÇÕES NA SPIKE					REFERÊNCIA
	Designação OMS			NTD	RBD	CTD2	S2		
<i>Eta</i> (B.1.525)	Fev/21 África do Sul		Vol	<b>Q52R, A67V, 69-70del, 144-145del</b>	<b>E484K</b>	<b>D614G, Q677H</b>	<b>F888L</b>	<b>SPRATT et al., 2021</b>	
<i>Theta</i> (P.3) (B.1.1.28.3)	Fev/21 Filipinas		Vol	-	E484K, N501Y,	D614G, P681H	E1092K, H1101Y, V1176F	TABLIZO et al., 2021	
<i>Kappa</i> (B.1.617.1)	Abr/21 Índia		Vol	<b>T95I, G142D, E154K</b>	<b>L452R, E484Q</b>	<b>D614G, P681R,</b>	<b>Q1071H, H1101D</b>	EDARA et al., 2021	
<i>Delta</i> (B.1.617.2)	Abr/21 Índia		VoC	<b>T19R, G142D, E156, 157-158del</b>	<b>L452R, T478K,</b>	<b>D614G, P681R</b>	<b>D950N</b>	LOPEZ et al., 2021	
<i>Lambda</i> (B.1.1.1.37)	Jun/21 Peru		Vol	<b>G75V, T76I, R246N 247-253del, D253N</b>	<b>L452Q, F490S</b>	<b>D614G</b>	<b>T859N</b>	PADILLA-ROJAS et al., 2021	
<i>Omicron</i> (B.1.1.529)	Nov/21 África do Sul		VoC	<b>A67V, 69-70del, H69, V70, T95I, G142D, 143-145del, N212I, 212del, L212I, Y145D</b>	<b>G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H</b>	<b>T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H</b>	<b>N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F</b>	Xuemei et al., 2021	

LEGENDA -\* Os tipos de variante se referem à classificação dada pela OMS quando esses genótipos emergiram na população. As mutações características de cada variante de acordo com o CoV-lineage (O'TOOLE et al., 2021) estão destacadas em negrito.

De acordo com Chen e colaboradores (2021), cada variante emergente do SARS-CoV-2 tenderá a combinar alta infectividade com forte capacidade de escape à imunidade conferida. Com base nessa observação, esses pesquisadores sugerem que as próximas variantes de SARS-CoV-2 devem apresentar as mutações A411S, L452R, T478K, ou L452R, T478K, N501Y, ou K417N, L452R, T478K. Além disso, esse mesmo grupo de pesquisadores sugere que, embora a frequência de variantes de SARS-CoV-2 com o agrupamento de mutações L452R, T478K, E484K, N501Y e P384L, K417N, E484K, N501Y seja baixa, elas configuram uma grande ameaça, pois apresentam os maiores índices de disrupção antígeno-anticorpo.

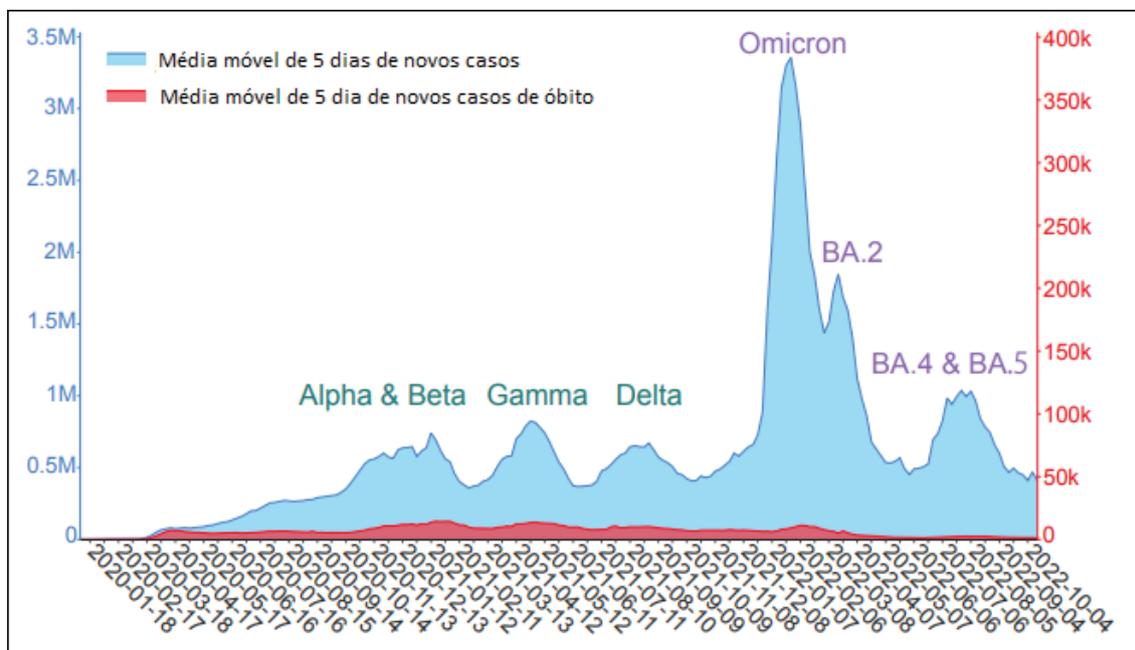
## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Após o alerta emitido pelo surgimento de uma nova cepa de CoV em 31 de dezembro de 2019, em 30 de janeiro de 2020, foi declarada a epidemia uma emergência internacional (PHEIC) (WHO,2020). Ao final do mês de janeiro, diversos países já haviam confirmado importações de caso, incluindo Estados Unidos, Canadá e Austrália. No Brasil, haviam 9 casos em investigação em 7 de fevereiro 2020, mas sem registros de casos confirmados. O primeiro paciente com COVID-19 no Brasil foi diagnosticado em São Paulo no dia 26 de fevereiro e era um caso importado da Itália (MS, 2020). No dia 11 de março de 2020 a COVID-19 foi declarada como uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020).

Logo após seu surgimento, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo, causando uma pandemia de grandes proporções, com grande impacto nas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, causou a maior crise sanitária já vista com repercussões e impactos sociais, econômicos, políticos, culturais e históricos nunca antes ocorrido na história recente das epidemias (CUNHA, *et al.*, 2020; MATTA, *et al.*, 2021).

As variantes *Alpha* e *Beta* contribuíram para um pico de aumento de número de casos e óbitos de COVID-19 entre outubro 2020 a janeiro de 2021. *Gamma* causou um segundo pico de aumento de número de casos e óbitos de COVID-19 entre abril e maio de 2021. *Delta* levou ao terceiro pico de aumento de número casos e óbitos de COVID-19 por volta de agosto de 2021. Mais

recentemente, a *Omicron*, que apresenta altos níveis de infectividade e resistência à vacina e escape de anticorpos neutralizantes, gerou um aumento no registro diário de infecções do mundo entre dezembro de 2021 e janeiro de 2022 (FIGURA 11) (WHO, 2022).



**FIGURA 11** – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS DE COVID-19 NO MUNDO

LEGENDA - casos diários de COVID-19 (azul claro) e óbitos (vermelho) desde 2020. As curvas representam a média de 5 dias.

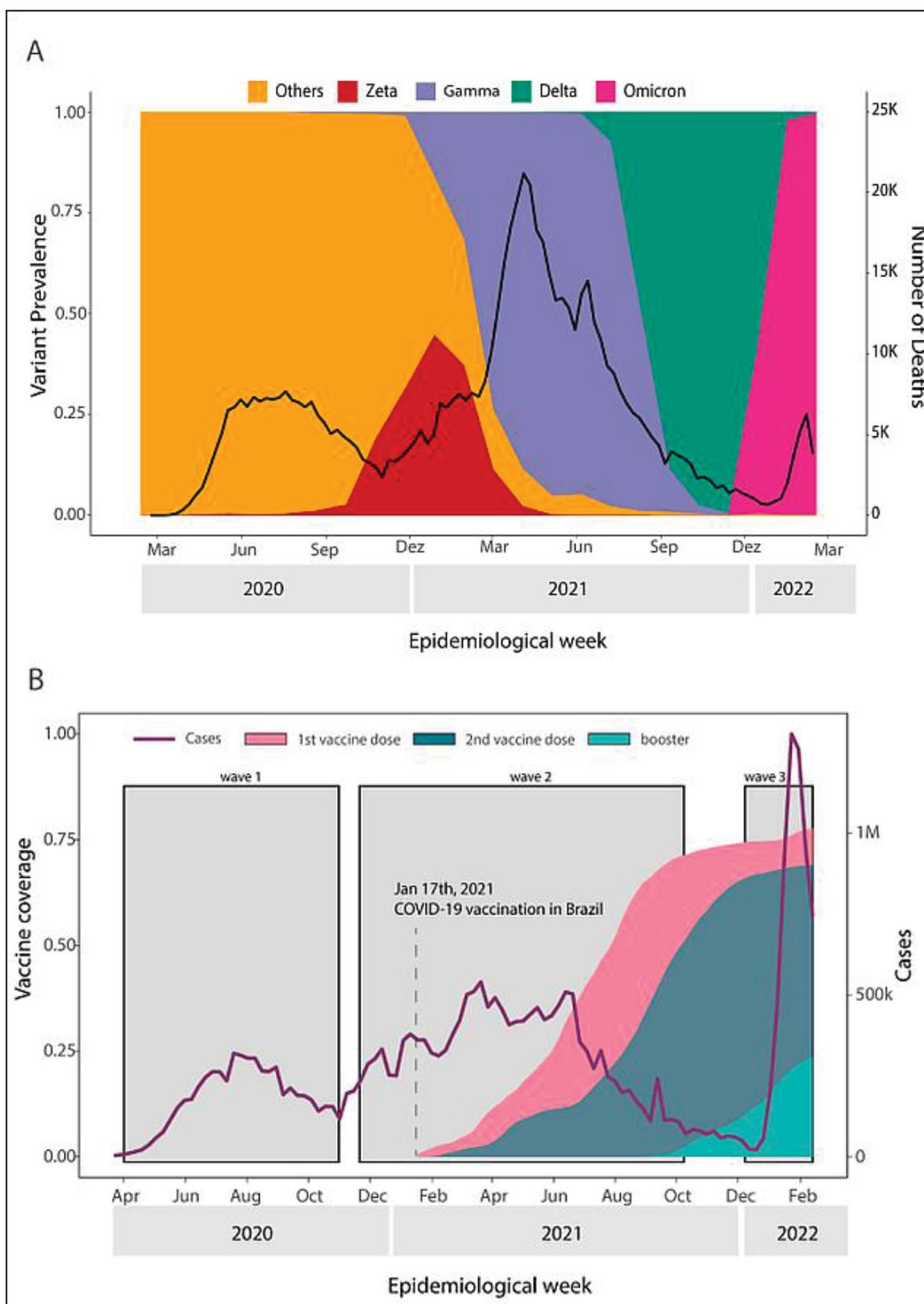
FONTE – adaptado CHEN *et al.*, 2022.

O SARS-CoV-2 demonstrou uma elevada taxa de transmissão e só nos primeiros seis meses infectou mais de 10 milhões de pessoas em várias partes do mundo, causando mais de 500 mil óbitos (RITCHIE, *et al.*, 2020). Devido ao subdiagnóstico, a taxa de letalidade é imprecisa. O Brasil apareceu como epicentro global da epidemia de COVID-19 em 2020, na chamada primeira onda pandêmica, iniciando uma segunda onda no início de 2021 com aumento de novos casos e óbitos. (JHU, 2022).

Até a presente data 240 genótipos de SARS-CoV-2 foram identificados no Brasil. Dentre essas, onze VoC - *Alpha*, *Gamma*, *Beta*, *Delta* e *Omicron* - e 4 Vol - *Eta*, *Lambda*, *Mu* e *Zeta* (FIOCRUZ, 2022). Nesse período, a epidemia brasileira tem se caracterizado por três ondas epidêmicas distintas, causando quase 35 milhões de casos e mais de 680 mil óbitos (WHO, 2022).

A primeira onda pandêmica (fevereiro de 2020 a outubro de 2020) foi caracterizada pela cocirculação de diferentes linhagens por causa de múltiplos eventos de emergência de novas variantes ao longo do tempo, inclusive a variante *Zeta*. A segunda onda epidêmica (novembro de 2020 a dezembro de 2021) foi alimentada pelo surgimento e circulação da variante *Gamma*. Logo após, em abril de 2021, a variante *Delta* começou a ser detectada no país, conseguindo se tornar a dominante no cenário nacional até o final de outubro de 2021 - período caracterizado por uma baixa incidência de casos e mortes por COVID-19. Apesar de ser o resultado de multifatores, é provável que essa diminuição de casos e óbitos seja devido à imunidade adquirida por infecção a outras variantes juntamente com uma cobertura vacinal acima de 50%. Desde os primeiros casos importados da *Omicron*, foi observado um significativo crescimento no número de infecções. Um mês após o primeiro caso no país, essa variante foi associada à transmissão sustentada em todas as regiões brasileiras e, até o final de 2022, se tornou predominante à *Delta* (FIGURA 12) (ALCANTARA *et al.*, 2022).

A primeira onda de *Omicron* teve um pico acentuado de número de casos e um declínio rápido, provavelmente devido ao impacto bem-sucedido das estratégias de imunização. Desde novembro de 2022, a população brasileira está enfrentando uma nova onda, causada desta vez pelas subvariantes da *Omicron*. Essas subvariantes apresentam redução à neutralização de anticorpos de vacinas e infecções prévias, assim como possuem mais mecanismos de escape do sistema imunológico (FIOCRUZ, 2022).



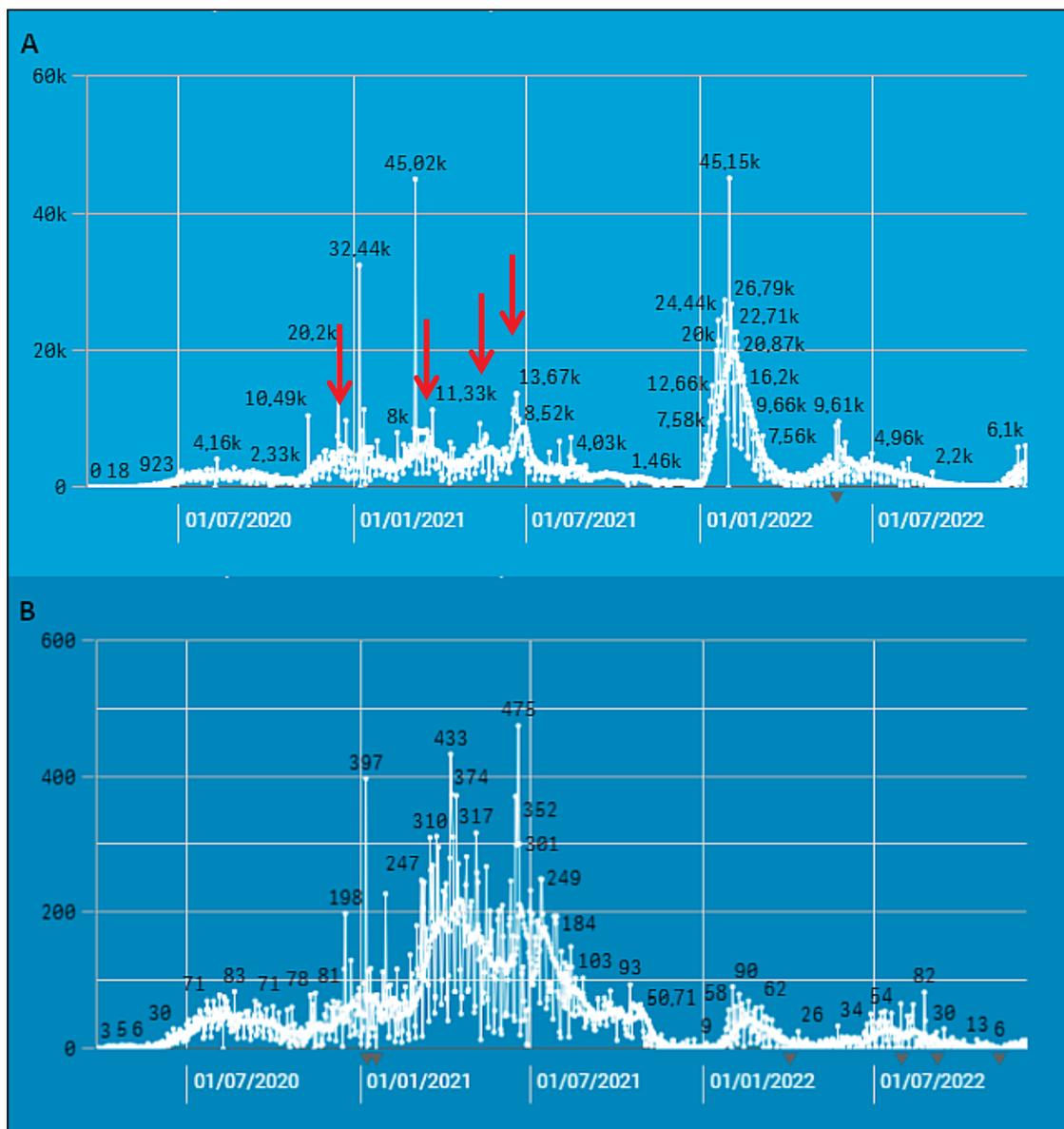
**FIGURA 12 – DINÂMICA EPIDEMIOLÓGICA DO SARS-COV-2 NO BRASIL ENTRE FEV/20 E FEV/22**

LEGENDA – A) Número de óbitos por COVID-19 e variantes de SARS-CoV-2 entre fev/20 e fev/22.

B) relação entre taxas de vacinação e número de casos de COVID-19 ao longo das três primeiras ondas pandêmicas no Brasil.

FONTE – adaptado ALCANTARA *et al.*, 2022.

No Paraná até dezembro de 2022 já foram notificados 2,8 milhões de casos e 45.569 óbitos de COVID-19. Após a emergência do SARS-COV-2, já foram descritos 7 picos de aumentos de número de casos, um devido à emergência da variante *Zeta*, dois pela *Gamma*, 1 pela *Delta*, um pela *Omicron* e outros dois picos por subvariantes da *Omicron* (FIGURA 13A). Já os óbitos se concentraram no período de emergência de *Gamma* e *Delta* (FIGURA 13B).



**Figura 13** – EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19 NO ESTADO DO PARANÁ. A) Distribuição de novos casos de COVID-19. As setas vermelhas indicam (da esquerda para a direita) o pico referente à emergência de *Zeta*, dois picos na emergência de *Gamma* e o pico na emergência de *Delta* respectivamente. B) Distribuição de novos casos de óbito por COVID-19.  
 FONTE – SVS/MS, 2022 (<https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19.html>).

## 2.3 COVID-19

A COVID-19 é uma infecção do sistema respiratório causada pelo vírus SARS-COV-2, apresenta uma diversa gama de sinais e sintomas, sua evolução pode variar de acordo com diferentes fatores relacionados ao patógeno, assim como do hospedeiro, tais como a idade, a presença de comorbidades e etnia (AGHAMIRZA, *et al.*, 2022)

Como se trata de uma doença zoonótica emergente resultou em uma séria ameaça à saúde mundial devido ao seu padrão de rápida disseminação e à gravidade dos quadros clínicos que uma parcela significativa dos pacientes infectados desenvolve (SASTHA *et al.*, 2020).

Segundo a OMS (OMS, 2022) cerca de 80% das pessoas com COVID-19 se recuperam da doença sem precisar de tratamento hospitalar. Uma em cada seis pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 fica gravemente doente e desenvolve dificuldade para respirar. Com base na gravidade da doença apresentada, que inclui sintomas clínicos, anormalidades laboratoriais e radiográficas, hemodinâmica e função do órgão, o Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) emitiu diretrizes que classificou a COVID-19 em cinco tipos distintos, que estão apresentados no quadro 3.

**QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA COVID-19 (continua)**

INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA OU PRÉ-SINTOMÁTICA	Pacientes que testam positivo para SARS-CoV-2 mas que não apresentam sintomas consistentes com COVID-19.
DOENÇA LEVE:	Indivíduos que apresentam algum dos sinais e sintomas de COVID-19 como: febre, fadiga, tosse (com ou sem produção de expectoração), anorexia, mal-estar, dor muscular, dor de garganta, dispneia, congestão nasal ou cefaleia, perda de paladar e olfato, mas sem sinais de gravidade. Podem apresentar, mais raramente, diarreia, náuseas e vômitos. Os pacientes idosos e/ou imunossuprimidos podem apresentar sintomas atípicos.
DOENÇA MODERADA:	Indivíduos que apresentam evidência de doença respiratória no trato respiratório inferior durante avaliação clínica ou imagem e que têm saturação de oxigênio (SpO <sub>2</sub> ) ≥94% em ar ambiente. Pneumonias sem sinais de gravidade e sem necessidade de oxigênio suplementar

**QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA COVID-19 (continuação)**

INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA OU PRÉ-SINTOMÁTICA	Pacientes que testam positivo para SARS-CoV-2 mas que não apresentam sintomas consistentes com COVID-19.
DOENÇA GRAVE:	Indivíduos com desconforto respiratório severo que têm SpO <sub>2</sub> < 94% em ar ambiente, relação entre pressão parcial arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ) <300 mm Hg, frequência respiratória >30 respirações/min ou infiltrados pulmonares > 50%. Em crianças desconforto respiratório severo como roncos, pneumonia com um sinal de risco geral (como, incapacidade de se amamentar ou beber, letargia ou inconsciência ou convulsões).
DOENÇA CRÍTICA:	Indivíduos com insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos.

FONTE: CDC, 2020.

### 2.3.1 Manifestações Clínicas

O período de incubação do SARS-CoV-2 varia de 4 a 14 dias, com mediana de cinco dias e, na maioria dos casos, os sintomas surgem quatro a cinco dias após a exposição (RAMANATHAN *et al.*, 2020).

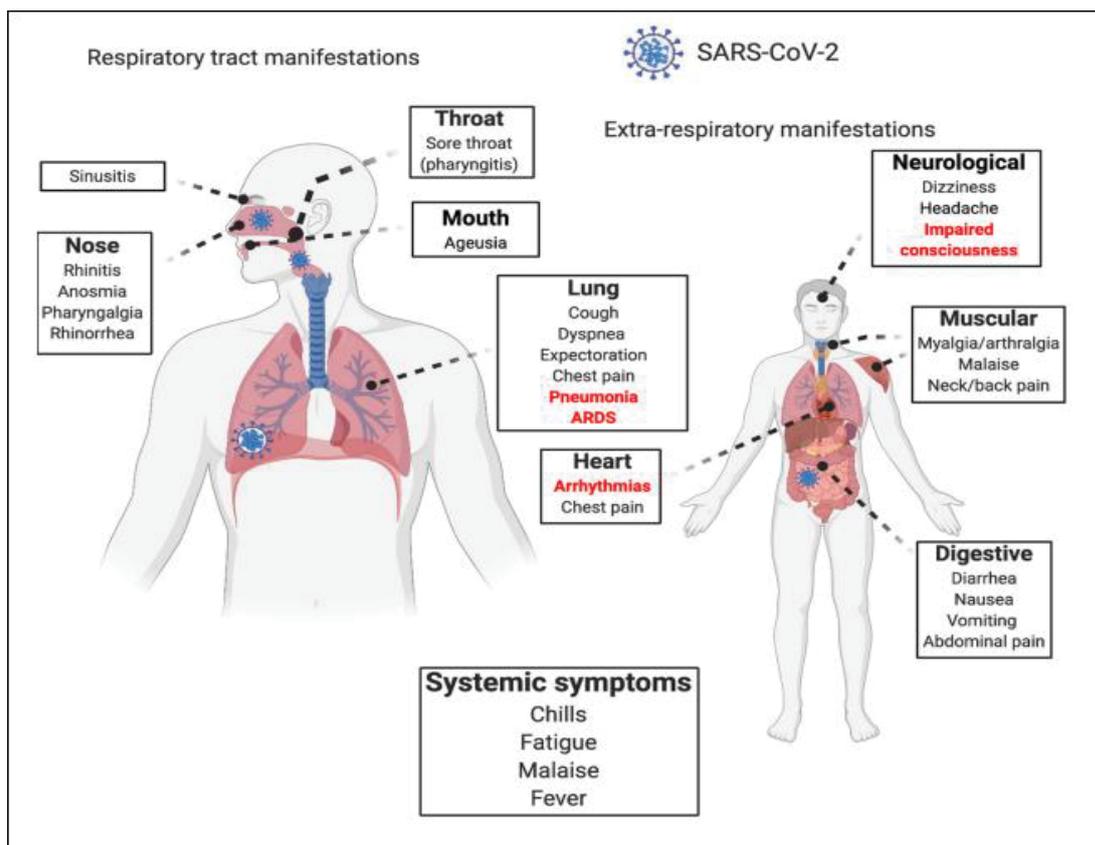
Em geral, os casos apresentam-se como uma Síndrome Gripal (SG) com febre, tosse, mialgia, disfunções olfativas e gustativas e, a maioria dos indivíduos, não apresenta manifestações graves ou críticas. Sintomas menos comuns incluem cefaléia, tontura, dor abdominal, náuseas e vômitos. Os pacientes podem apresentar perda do olfato (anosmia), distorção ou perda do paladar (dis/ageusia), náuseas e diarreia alguns dias antes da febre. E embora a febre seja um sinal importante, pode estar ausente (FIGURA 14) (HARRISON *et al.*, 2020).

Entretanto, a COVID-19 pode evoluir para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), além de poder progredir para inflamação sistêmica e disfunção multiorgânica, aumentando o risco de óbito nesses pacientes (ROTHAN *et al.*, 2020).

Laboratorialmente, pacientes com COVID-19 hospitalizados apresentam aumento da proteína C reativa (PCR), da ferritina, da velocidade de hemossedimentação (VHS), dos eritrócitos, da miohemoglobina, da lactato desidrogenase, das enzimas hepáticas, das enzimas musculares, proteinúria,

hematúria, anormalidades eletrolíticas, como hipercalemia, hiponatremia, distúrbios do equilíbrio ácido-base, trombocitopenia, alto nível de D-dímero e linfopenia avançada em casos graves (GUPTA, *et al.*, 2020).

Em média, o período entre o início dos sintomas e o óbito varia de 6 a 41 dias, com média de 14 dias. Este período depende dos fatores de risco associados à gravidade do COVID-19. Certos fatores demográficos relatados estão associados a uma taxa mais alta de um curso clínico grave da COVID-19. Entre eles, a idade acima de 65 anos é considerada um fator-chave nos escores de risco de gravidade clínica propostos. Os dados também sugerem que o sexo masculino é uma variável que está independentemente associada à gravidade da COVID-19. Além disso, condições pré-existentes, como doença cardiovascular, doença renal crônica, doença pulmonar crônica (principalmente asma), diabetes mellitus, hipertensão, imunossupressão e obesidade, predispõem os pacientes a um curso clínico desfavorável e aumentam o risco de ventilação mecânica e morte (REYNA-VILLASMIL *et al.*, 2022).



**FIGURA 14 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA COVID-19**

LEGENDA - As manifestações clínicas da COVID-19 foram descritas incorporando vários sistemas corporais com graus variados de início e gravidade. As manifestações do trato respiratório inferior e superior costumam ser as mais perceptíveis se o paciente não estiver assintomático, além dos sintomas sistêmicos que são os mais relatados independentemente da gravidade da doença. Sinais/sintomas destacados em vermelho estão associados com gravidade. ARDS: síndrome do desconforto respiratório agudo.

FONTE – HARRISON *et al.*, 2020.

### 2.3.2 Complicações da COVID-19

Pacientes hospitalizados com COVID-19 grave têm risco maior de desenvolver lesão renal, manifestando-se mais comumente como lesão renal aguda (LRA), que é a manifestação extrapulmonar mais frequente e está associada a um risco aumentado de mortalidade. O dano tecidual do pulmão é extenso e apresenta um padrão denominado de “vidro fosco” nos exames radiológicos (SHI *et al.*, 2020). O aspecto histológico do tecido pulmonar é caracterizado pela presença de um infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário, células epiteliais gigantes, vasos congestionados e macrófagos alveolares infectados (ZHOU *et al.*, 2020).

As complicações cardíacas como isquemia/infarto do miocárdio e miocardite são bem descritas em pacientes com COVID-19. Outras manifestações cardíacas comuns incluem síndrome coronariana aguda (SCA), arritmias, cardiomiopatia e choque cardiogênico (LIU *et al.*, 2020; JUNQUEIRA *et al.*, 2020).

A COVID-19 também está associada a uma hipercoagulabilidade, evidenciada pela alta prevalência de eventos venosos e tromboembólicos como embolia pulmonar, trombose venosa profunda, isquemia/infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico e trombose arterial que também ocorreram em pacientes apesar de mantidos em regime profilático ou mesmo anticoagulação sistêmica terapêutica. A trombocitopenia é relativamente comum em pacientes com COVID-19 e está associada a risco aumentado de mortalidade hospitalar (JUNQUEIRA *et al.*, 2020).

A disfunção hepática ocorre com mais frequência em pacientes com doença grave de COVID-19. Foram observadas a elevação nas enzimas hepáticas manifestando-se como um aumento agudo da aspartato transaminase (AST) e da alanina transaminase (ALT) (XU *et al.*, 2020).

Manifestações clínicas como níveis anormais de glicose no sangue, cetose euglicêmica e cetoacidose diabética foram observadas em pacientes hospitalizados com COVID-19 (GUPTA, *et al.*, 2020).

As complicações pela COVID-19 em crianças não foram o foco dos esforços do sistema de saúde no início da pandemia, dada a forma mais branda da COVID-19 em comparação com os adultos. No entanto, há um risco potencial para complicações graves ou prolongadas e recorrentes sintomas que podem afetar a saúde a longo prazo em crianças. A síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MIS-C), também conhecida como Síndrome Inflamatória Multissistêmica Pediátrica – Temporariamente Associada ao SARS-CoV-2 (PIMS-TS) é uma condição hiperinflamatória rara, mas grave, que ocorre aproximadamente 1 mês após a exposição ao SARS-CoV -2. A MIS-C compartilha características clínicas semelhantes à doença de Kawasaki e à síndrome do choque tóxico (ABRAMS *et al.*, 2021).

### 2.3.3 Patogênese

Uma vez que o vírus SARS-CoV-2 entra no hospedeiro pelo trato respiratório, ele infecta primariamente as células epiteliais das vias aéreas e alveolares, as células endoteliais e os macrófagos alveolares. No entanto, a COVID-19 é uma doença multissistêmica e, após iniciar a infecção no trato respiratório, o vírus se dissemina afetando vários sistemas que também expressam a ECA2. Os principais alvos desse agente são as células endoteliais presentes em vários tecidos, como vasos, pulmões, coração, trato gastrointestinal, rins, nervos e cérebro (SUN *et al.*, 2021).

O mecanismo patogênico da doença está associado ao desenvolvimento de resposta hiperinflamatória e de dano vascular com coagulopatia seguida de complicações tromboembólicas. O estado hiperinflamatório associado à baixa perfusão tecidual resulta na disfunção de múltiplos órgãos, choque e óbito (CASCELLA *et al.*, 2022).

### **2.3.3.1 Imunopatogênese**

Nas infecções virais, ocorre a ativação intracelular dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que podem detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O reconhecimento dos PAMPs leva às respostas citolíticas pela produção de IFN- I e IFN-III e ativação de células natural killer (NK), além da produção de interleucinas pró-inflamatórias. Em conjunto, essas citocinas induzem um programa antiviral em células-alvo do vírus e promovem a resposta adaptativa ao SARS-CoV-2 (ZHONG, *et al.*, 2020).

A resposta imunológica antiviral é absolutamente importante para eliminar o patógeno. No entanto, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2 estimula a produção excessiva de citocinas inflamatórias ou pró-inflamatórias, recebendo o nome de “tempestade de citocinas”. A liberação de tais mediadores é responsável pelo intenso dano tecidual e celular, pela inflamação pulmonar e sistêmica, levando a quadros de SRAG e sepse, além de contribuir para incidência de prováveis complicações hepáticas, cardiovasculares e neurais (MOORE & JUNE, 2020).

Pacientes com COVID-19 apresentam níveis elevados de citocinas derivadas de linfócitos dos tipos Th1 (IL-1 *Beta* e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-10) e, em

particular, pacientes internados em UTI apresentam altas concentrações plasmáticas de IL-2, IL-7, IL-10, IL-17, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína indutora de interferon-gama 10 (IP-10), proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ), proteína quimioatratadora de monócitos 1 (MCP-1) e TNF- $\alpha$  quando comparados a pacientes que não necessitaram de UTI. Também foi descrita uma diminuição da produção de IFN-I, detectado no soro, em particular, em pacientes com prognóstico ruim. Essa diminuição da produção de IFN poderia levar a uma maior carga viral e posterior hiperativação e exaustão da resposta de células T (RAMANATHAN *et al.*, 2020).

A resposta adaptativa tem um importante papel na resolução da infecção viral pela atividade citotóxica exercida pelas células T. Estudos mostram que os números de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK estão diminuídos em pacientes graves comparados àqueles com sintomas moderados. Foi também descrito que pacientes em estado grave infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam um padrão particular de linfócitos nos pulmões, com uma diminuição pronunciada de células T reguladoras Foxp-3+CD4+, associado ao predomínio de células CD4+CD25+PD-1+. Além disso, estudos sugerem que células T citotóxicas expressando perforina e granzimas poderiam estar envolvidas no processo de injúria imunológica tecidual nos pulmões de pacientes críticos infectados pelo SARS-CoV-2 (ZHONG *et al.*, 2020).

### **2.3.3.2 Alteração de coagulação**

Os distúrbios de coagulação são encontrados com grande frequência entre os pacientes com COVID-19. A taxa de tromboembolismo endovenoso (TEV) em pacientes sintomáticos hospitalizados com doença aguda chega a 10%, isso por que a inflamação induz lesão endotelial e resulta em produção elevada de trombina e alteração da fibrinólise, aumento da concentração de D-dímero, prolongamento do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), além de trombocitopenia. Nos pacientes críticos, os níveis de D-dímero encontram-se elevados cerca de três a seis

vezes, sendo este reconhecido como marcador de prognóstico e mortalidade (ROTHAN *et al.*, 2020).

Em crianças, as manifestações trombóticas são menos frequentes, devido às peculiaridades inerentes ao sistema hemostático infantil que está em desenvolvimento, no qual há geração menor de trombina e características fisiológicas protetoras do endotélio vascular (NATHANIELSZ *et al.*, 2022).

#### 2.3.4 Transmissão

A transmissão da COVID-19 é realizada primariamente de uma pessoa infectada – seja sintomática, pré-sintomática ou assintomática – a outra, através de partículas virais contidas em gotículas orais ou nasais, expelidas durante espirros, tosse ou fala. As partículas virais podem ficar suspensas no ar por algum tempo - dependendo de vários fatores como confinamento do ambiente, umidade relativa do ar e carga viral -, ou se depositarem em superfícies que estejam no entorno, como pisos e objetos. No caso de partículas virais suspensas, a contaminação se dá pela inalação e, no caso das partículas depositadas, através de manuseio das superfícies contaminadas e posterior contato com os olhos e a boca. Estudos em laboratório mostram que partículas de SARS-CoV-2 podem se manter viáveis por períodos que variam de minutos a horas, dependendo do tipo de superfície e da carga viral depositada sobre elas (HARRISON *et al.*, 2020).

#### 2.3.5 Diagnóstico laboratorial

O teste de diagnóstico pode envolver a detecção do próprio vírus (RNA viral ou antígeno) ou a detecção da resposta imune humana a infecção (anticorpos ou outros biomarcadores). A detecção do genoma viral SARS-CoV-2 por RT-qPCR (transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real) é o padrão-ouro de diagnósticos laboratoriais para COVID-19. Os alvos dos ensaios incluem regiões nos genes E, RdRP, N e S. O vírus pode ser detectado no trato respiratório superior entre 1 e 3 dias antes do início dos sintomas. Como amostras clínicas pode-se utilizar secreções da oro-

nasofaringe, saliva, escarro, lavado broncoalveolar, sangue ou outros tipos de amostras do corpo. O lavado broncoalveolar é o tipo de amostra que apresenta maior positividade (93%), seguida de escarro (72%), *swab* nasal (63%), saliva (56%) e *swab* faríngeo (32%). O SARS-CoV-2 pode ser detectado por até cinco dias a partir do início dos sintomas e pode persistir por dez dias ou mais em pacientes com formas graves ou imunocomprometidos, entretanto, a detecção de RNA viral, não indica necessariamente a presença de vírus viáveis (LIU *et al.*, 2020; GENELHOUD *et al.*, 2022).

Apesar da RT-qPCR apresentar alta sensibilidade e especificidade, este método leva pelo menos 2 horas em plataformas fechadas como *GeneXpert*<sup>TM</sup> - em que a amostra clínica é adicionada diretamente ao cacete do equipamento, sem necessidade de extração prévia do genoma viral. Em contrapartida, pode demorar até 72hs pelas plataformas convencionais, de acordo com o fluxo e a demanda de cada laboratório. Além disso o diagnóstico por RT-qPCR requer profissionais especializados e laboratórios equipados, dificultando o amplo acesso a essa metodologia. Nesse contexto, testes diagnósticos utilizando RT-LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa) foram desenvolvidos como uma solução para detecção molecular do SARS-CoV-2 de uma maneira mais rápida, fácil e acessível. A reação acontece em um dispositivo próprio em temperatura constante (60°C, normalmente) e o resultado pode ser observada a olho nu (RAVI *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020).

O sequenciamento completo do genoma (WGS) por sequenciamento de nova geração (NGS) é outra metodologia que identifica os ácidos nucleicos do SARS-CoV-2. Ele é utilizado na detecção de sequências que não são identificadas por RT-qPCR e na identificação de mutações. Por ser caro, demorado e necessitar profissionais altamente treinados, esse método não é adequado para testes em massa (JHON *et al.*, 2021).

Os imunoenaios também são uma opção no diagnóstico laboratorial da COVID-19, apesar de apresentarem menor sensibilidade que a RT-qPCR. Esses testes são divididos em detecção de antígenos e detecção de anticorpos IGM e IGG. Os testes de antígenos são usados em testes rápidos de cromatografia de fluxo lateral, enquanto a detecção de anticorpos é realizada

por ELISA ou imunoenensaio quimioluminescente (CLIA). Com o advento da vacinação, os testes de detecção de anticorpos deixaram de ser de caráter diagnóstico e passaram a ser usados, em menor escala, para avaliar a soroconversão. Em contrapartida, os testes de imunocromatografia de fluxo lateral que detectam antígenos são os testes mais realizados para o diagnóstico em massa, uma vez que é a alternativa mais acessível à população. Os testes rápidos são simples, não requerem profissional especializado para a leitura, baratos, levam em média 30 minutos para que se obtenha os resultados e chegam à beira de leitos, lugares remotos ou de difícil acesso. Contudo, esses testes apresentam baixa sensibilidade (entre 60 e 85%). Nesse cenário, testes rápidos que combinam fluxo lateral de tira e *LAMP* estão sendo desenvolvidos para unir a praticidade de um teste rápido à alta sensibilidade de um teste molecular (GRASSI *et al.*, 2020; PULIA *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, o sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) Associated System (CAS)) causou uma revolução na edição do genoma e desde então sua aplicação em tratamento de doenças e diagnóstico molecular de doenças infecciosas têm sido estudados. O CRISPR-Cas é uma parte do sistema imunológico bacteriano adquirido na defesa contra a invasão de fagos e de genoma exógeno. Consiste em duas partes, o arranjo de sequências curtas repetidas, CRISPR, e as proteínas Cas. O CRISPR atua como uma memória para reconhecer genomas Cas e proteínas como Cas 9 que destroem genomas estranhos. Dada a alta precisão, especificidade, rapidez, portabilidade e requisitos mínimos de equipamento, os métodos baseados em CRISPR-Cas se tornam ótimos candidatos de testes para aplicação em larga escala, que é crucial para diagnóstico de Covid19 principalmente em países em desenvolvimento ou mesmo locais com maior risco de contágio como aeroportos, portos e departamentos de emergência. (EBRAHIMI *et al.*, 2022)

### 2.3.6 Profilaxia

As estratégias de desenvolvimento de vacinas evoluíram com tempo, das vacinas tradicionais às de nova geração. As vacinas tradicionais incluem vacinas de patógenos inteiros, que podem ser vacinas vivas atenuadas ou

inativadas. As vacinas vivas atenuadas consistem no patógeno com uma virulência altamente reduzida (por exemplo, febre amarela/varíola). Por outro lado, as vacinas inativadas são patógenos quimicamente ou termicamente inativados (AGHAMIRZA, *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas é uma estratégia antiga e bem estabelecida que abriga propriedades imunogênicas rápidas e fornece memória imunológica contra patógenos específicos. No entanto, a desvantagem relacionada ao seu uso é a preocupação com a segurança, devido ao fato de que têm o potencial de reverter para a forma virulenta e podem infectar indivíduos imunocomprometidos. Da mesma forma, as vacinas atenuadas não exibem memória imunológica durável e, portanto, podem não ser seguras a longo prazo. A inativação de um patógeno deve neutralizar a virulência sem comprometer sua imunogenicidade (JOSEFSBERG *et al.*, 2012).

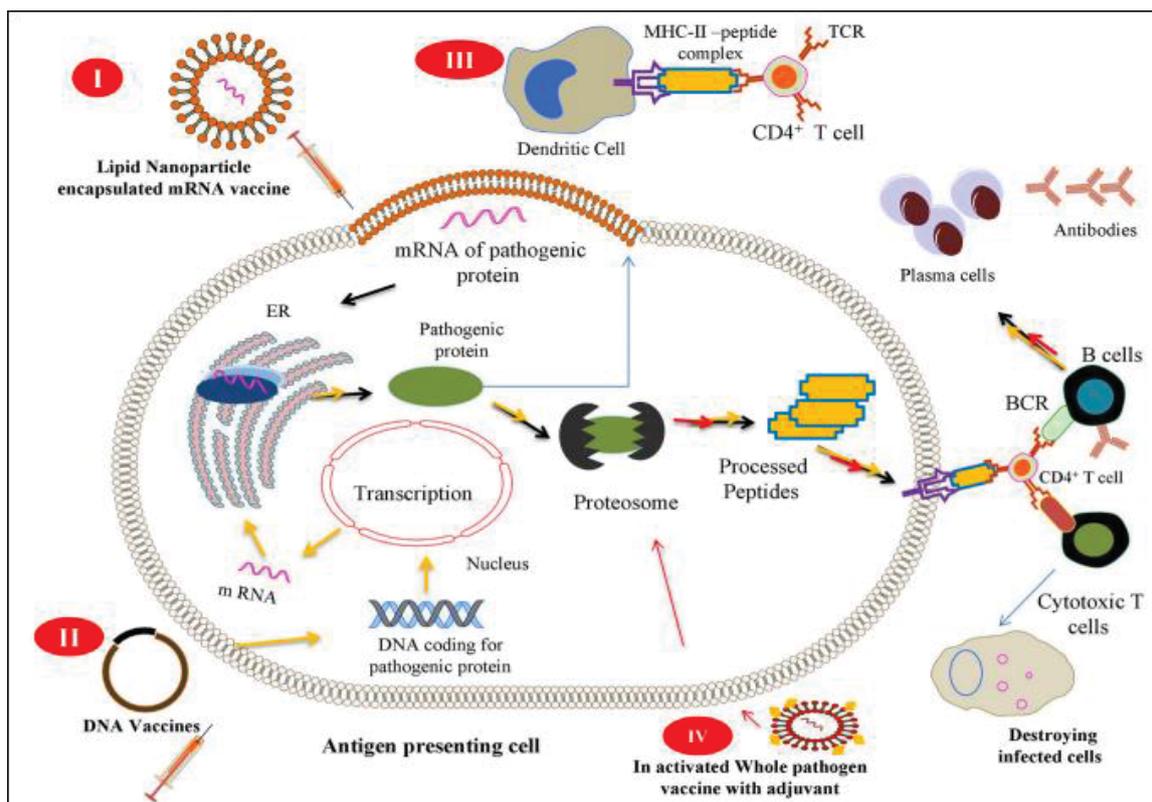
A vacina de vírus inativado é aplicada há mais de 60 anos, é segura para a aplicação em crianças com poucos meses de vida, até em adultos, no entanto, não são recomendadas para imunossuprimidos (HASSININ *et al.*, 2021).

As vacinas à base de proteínas podem consistir em uma proteína do vírus purificada, uma proteína recombinante, ou partículas semelhantes a vírus. Assim como as vacinas de vírus inativados, estas vacinas requerem adjuvantes para estimular o sistema imunológico. Mas ao contrário das vacinas atenuadas ou inativadas, as vacinas de proteína elas apresentam menos efeitos colaterais, além de maior segurança dentre grupo de imunossuprimidos (HASSANIN *et al.*, 2021).

Avanços na biologia molecular propiciaram uma oportunidade para identificar e suprimir genes de patógenos para combater o problema da reversão da virulência patogênica. No entanto, as preocupações com a segurança e a memória imunológica de curto prazo persistiram. Outra abordagem é a vacina de subunidade, que consiste em uma parte do patógeno projetada como um antígeno para provocar uma resposta imune no organismo hospedeiro. Os vetores adenovirais também estão sendo usados para fornecer alguns genes virais específicos que podem produzir peptídeos antigênicos

virais nas células hospedeiras para provocar a resposta imune. Outros tipos de vacina usam diretamente ácidos nucleicos (mRNA e DNA) integrados com abordagens de nanotecnologia para entrega, como usado pela *Moderna*<sup>®</sup> e *Pfizer*<sup>®</sup> para vacinas COVID-19, que serão discutidas em uma seção posterior (KHANDKER *et al.*, 2021).

Desde os primeiros relatos de infecções causadas pelo SARS-CoV-2, houve um esforço global para projetar, fabricar e testar várias vacinas contra o SARS-CoV-2. Ao todo, cinco tipos de vacinas, consistindo de vacina de RNA mensageiro (mRNA), vacina de vetores virais não replicantes e replicantes, vacina de vírus inativado, vacina de proteína e vacina de DNA, foram autorizadas para uso clínico. (FIGURA 15) (KARPINSKI *et al.*, 2021). Além disso, para controlar efetivamente a propagação da pandemia de COVID-19, outros tipos de vacinas estão em desenvolvimento. Segundo a OMS (WHO, 2022) atualmente existem 333 vacinas candidatas em desenvolvimento, das quais 139 entraram na fase clínica.



**FIGURA 15** – ESQUEMA DAS DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS

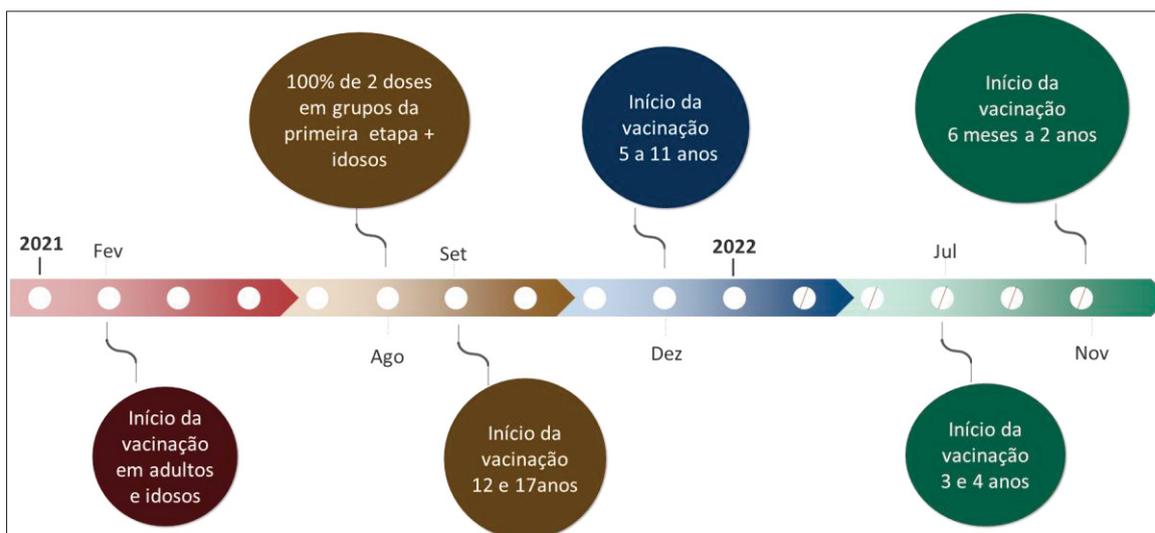
**LEGENDA** – (I) As vacinas de RNA mensageiro (mRNA) contêm mRNA que codifica uma proteína patogênica que atua como um imunógeno para induzir respostas imunes celulares e humorais. A vacina é injetada como um encapsulamento de nanopartículas lipídicas e o mRNA é liberado no interior das células (representado pela seta preta) e traduzido por ribossomos celulares e posteriormente apresentado na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). (II) As vacinas de DNA que codificam uma sequência específica para um gene patogênico são capturadas por APC que expressam e apresentam o antígeno às células imunes para provocar resposta imune (processo representado pela seta amarela). (III) Após a expressão de proteínas patogênicas dentro das APC, elas podem ser secretadas nos tecidos circundantes (representadas pela seta em azul), onde diferentes outras APC podem engolfá-las, processá-las e apresentá-las às células imunes. (IV) As vacinas de patógenos inteiros inativados contêm patógenos inteiros que foram submetidos a calor ou inativação química quando introduzidos no corpo (representado pela seta vermelha) e permanecem sem causar doença, mas imunogênicos. Essa estratégia não é capaz de trazer uma resposta imune celular efetiva devido à inativação de proteínas imunogênicas, necessitando de um adjuvante (pontos amarelos) para provocar tal resposta nas células.

**FONTE** – ISLAM *et al.*, 2021.

No Brasil, até novembro de 2022, 81,7% da população estava totalmente vacinada e 87,7% recebeu pelo menos uma dose. A Campanha Nacional de Vacinação contra a COVID-19 no Brasil teve início em 18 de janeiro de 2021, após a aprovação para uso emergencial das vacinas *Sinovac/Butantan* e *AstraZeneca/Fiocruz* pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em março de 2021 a vacina Pfizer recebeu a autorização definitiva e a vacina da *Janssen*, em abril de 2022 (SVS/MS, 2022).

Devido à não disponibilidade de doses suficientes de imunizantes COVID-19 no mercado mundial para o atendimento simultâneo de toda a população vacinável, o Plano Nacional de Operalização contra a COVID-19 direcionou a vacinação às pessoas do grupo de risco – pacientes com doença renal crônica, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, diabetes mellitus, hipertensão arterial grave, pneumopatias crônicas graves, anemia falciforme, câncer, obesidade mórbida ( $IMC \geq 40$ ), síndrome de Down, além de pessoas com idade superior a 60 anos e indivíduos imunocomprometidos -, às pessoas dos serviços de saúde e dos serviços essenciais. Em seguida foi aberta para os adultos em geral e em junho de 2021, a ANVISA autorizou a vacinação de crianças a partir de 12 anos com a vacina da Pfizer e, em dezembro de 2021, para crianças de 5 a 11 anos de idade. Em janeiro de 2022, a *CoronaVac* foi ampliada para uso pediátrico entre 6 e 17 anos, exceto imunocomprometidos, e em julho de 2022 foi ampliado para crianças entre 3 e 5 anos. E em setembro de 2022, o uso da vacina da Pfizer foi ampliada para crianças entre 6 meses e 4 anos (SVS/MS,2022).

No Paraná, de acordo com Ministério da Saúde, priorizou-se na primeira etapa da vacinação, trabalhadores de saúde, indígenas, pessoas com deficiência, institucionalizadas a partir de 60 anos e seus cuidadores. Progressivamente, foi incluída a população de idosos não institucionalizados, iniciando-se pelos de faixa etária de pessoas com mais de 90 anos e povos e comunidades tradicionais quilombolas e ribeirinhas. Cumpridas as etapas destacadas anteriormente, iniciou-se a vacinação de pessoas com deficiência permanente e pessoas com comorbidades que segue a definição do Plano Nacional de Operacionalização contra COVID-19 (FIGURA 16) (SESA/PR, 2022). A seguir serão descritas as vacinas de maior relevância no cenário brasileiro.



**FIGURA 16 – LINHA DO TEMPO DA VACINAÇÃO NO ESTADO DO PARANÁ**  
 FONTE – SESA/PR, 2022.

### 2.3.6.1 Vacinas inativadas

#### - *CoronaVac*<sup>®</sup>

Formulada com vírus inteiro pela inativação da cepa do CoV, CN2, a *CoronaVac*, anteriormente chamada de *PiCoVacc*, é fabricada pela empresa farmacêutica *SinoVac Biotech*, com sede em Pequim, em colaboração com o Centro Brasileiro de Pesquisas, Butantan. É administrada em duas doses por via intramuscular com intervalo de 14 a 28 dias. Ativa parcialmente a resposta imune e produz menores títulos de anticorpos em indivíduos com SARS-CoV-2. Apesar de requerer adjuvantes para aumentar as respostas imunes, como alume, produz menos efeitos colaterais e pode ser armazenada e transportada a 2–8°C (ZHANG *et al.*, 2021c).

A *CoronaVac* mostrou 65,9% para a prevenção de COVID-19 e 87,5% para a prevenção de hospitalização, 90,3% para a prevenção de internação na UTI e 86,3% para a prevenção de morte relacionada ao COVID-19. Com base em resultados preliminares, ela foi considerada ineficaz contra a variante *Gamma* no Brasil. Relatórios recentes mostraram que BBIBP-corV e *CoronaVac* foram igualmente eficazes contra a variante *Alpha* e menos eficazes contra a variante *Beta*. Essa vacina mostrou-se eficaz mesmo em crianças. Recentemente, foi desenvolvida uma versão específica que visa especialmente a variante *Omicron* (SHAO *et al.*, 2022).

### 2.3.6.2 Vacinas baseadas em RNA mensageiro (mRNA)

Com os avanços recentes em nanotecnologia, e particularmente nanopartículas baseadas em lipídios, surgiram as vacinas de mRNA. Estas vacinas fornecem o RNA mensageiro do vírus que é então traduzido no hospedeiro para produzir a proteína alvo e expressar o antígeno capaz de induzir a resposta imune. Como elas permitem que as células do corpo produzam proteínas *spike* específicas em vez de injetá-las nas células hospedeiras, essa plataforma reduz o tempo necessário para construir a eficiência da vacina, portanto, exige menos tempo em comparação com as outras vacinas convencionais. Além disso, o RNA não se integra ao genoma, ele é expresso de forma transitória, além de ser metabolizado e eliminado pelos mecanismos naturais do organismo sendo, portanto, considerado seguro (MULLIGAN *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021).

As vantagens desse tipo de vacina são a facilidade de fabricação, as respostas a anticorpos e linfócitos T citotóxicos e a ocorrência da tradução do mRNA no citosol e não no núcleo da célula hospedeira. Por outro lado, suas desvantagens são a necessidade de doses de reforço, a inclusão de nucleosídeos modificados para prevenir a degradação, porque o mRNA é instável, a necessidade de uma molécula carreadora para a entrada do mRNA nas células e por fim, a necessidade da cadeia de frio para sua conservação (FANG *et al.*, 2022). As duas primeiras vacinas a receberem autorização foram as vacinas de RNAm modificadas por nucleosídeos da BioNTech/Pfizer® e da Moderna®.

- Pfizer COVID-19 (BNT162b2)

A Comirnaty™ (BNT162b2) - nome genérico *tozinameran* - é fabricada pela Pfizer/BioNTech®. É administrada em duas doses com 3 semanas de intervalo. Recomenda-se que os indivíduos recebam uma injeção de reforço ou uma terceira dose a cada 12 meses. De acordo com estudos anteriores, sua eficácia mostrou forte proteção contra SARS-CoV-2 entre 10 a 14 dias após a administração da primeira dose e independentemente de raça e peso. Estudos relatam uma eficácia de cerca de 95% com um declínio gradual ao longo de um

período de 6 meses, além de ser relativamente menos eficaz contra o vírus SARS-CoV-2 quando o vírus tem a mutação da proteína *spike* semelhante à variante *Beta*. Duas doses de vacina exibiram 88% de eficácia contra a variante *Delta*, apresentando eficácia até contra a variante *Omicron* (KUMAR *et al.*, 2022).

#### - Moderna/mRNA-1273

É uma vacina de duas doses fabricada pela *Pharmaceutical Company*<sup>TM</sup>, com sede em Massachusetts, em colaboração com o Instituto Nacional de Saúde (NIH). Nesta vacina o mRNA-1273 é encapsulado em nanopartículas lipídicas. Possui muitas vantagens em relação à vacina da Pfizer, pois pode ser armazenada a -20°C e, portanto, é relativamente mais fácil de transportar, tem efeitos colaterais mínimos e provoca uma resposta imune mais intensa em crianças e adolescentes em comparação com pacientes com câncer e mulheres grávidas (SHAO *et al.*, 2022).

O relatório semanal de morbidade e mortalidade (MMWR) do CDC, que destaca as informações científicas mais recentes sobre a segurança e eficácia das vacinas COVID-19, mostrou uma eficácia de 92% para essa vacina. Além disso, o MMWR destacou que ela é 95% eficaz na prevenção da hospitalização de indivíduos com COVID-19 (BADEN *et al.*, 2021). Ademais, com base em dados clínicos, a vacina é 85% eficaz contra a variante *Omicron*. No entanto, os níveis de eficácia caíram para aproximadamente 55% após 7 meses de administração (PAJON *et al.*, 2022).

#### 2.3.6.3 Vacinas baseadas em vetor viral

Os vetores virais têm sido empregados para o desenvolvimento de vacinas contra diversos patógenos em muitos estudos pré-clínicos e clínicos. As vantagens dos vetores virais em relação as vacinas tradicionais são que, além de induzir uma excelente resposta imune humoral, são capazes de induzir uma resposta robusta de células T citotóxicas (linfócitos CD8+), células cruciais para eliminação de patógenos intracelulares. As vacinas de vetores virais atingem alta imunogenicidade, pois seus componentes virais estimulam a

produção de IFN e citocinas inflamatórias, logo, o uso de adjuvantes adicionais geralmente não é necessário, além disso não são necessárias condições de congelamento durante o transporte da vacina. Desta forma, os vetores virais são caracterizados por serem excelentes imunógenos e ótimos veículos de entrega de antígenos vacinais. Em contrapartida, existe a possibilidade de a imunidade preexistente aos vetores virais diminuir a eficácia da vacina (VAN DOREMALEN, *et al.*, 2022; STRIZOVA, *et al.*, 2021).

Para garantir o alto nível de segurança desta plataforma vacinal, os vírus utilizados são geneticamente modificados para reduzir ou eliminar a patogenicidade. Além disso, a maioria dos vetores virais são defeituosos para replicação (não-replicantes). Uma estratégia amplamente utilizada para reduzir ou eliminar a capacidade replicativa de vetores virais é a deleção direcionada de um ou mais genes específicos necessários para a replicação, síntese e montagem do genoma viral, o que garante a segurança para uso humano sem perda de potência. Os adenovírus são os vetores mais comuns usados para a entrega eficiente de um plasmídeo contendo um fragmento de DNA que codifica a proteína *spike* do SARS-CoV-2 (LUNDSTROM, *et al.*, 2020). Após a administração, os vetores virais entram nas células hospedeiras e entregam o material genético no núcleo. Uma vez transcrito, o mRNA deixa o núcleo e é traduzido nas proteínas *spike* e seus minúsculos fragmentos. Esses minúsculos fragmentos são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro e geram os anticorpos neutralizantes específicos, células T CD4+ e CD8+ e células B e células T de memória (ZHU *et al.*, 2020). São exemplos destas vacinas:

- *Oxford/AstraZeneca/AZD1222*

Produzida pela Universidade de Oxford em colaboração com a *AstraZeneca*, foi desenvolvida usando como vetor um adenovírus de chimpanzés recombinante (ChADd0x1). Em duas doses apresentou eficácia variando de 62% a 90%. Com base em relatórios recentes do CDC (MMWR), a vacina exibiu não apenas uma eficácia de 92% na prevenção do SARS-CoV-2, mas também reduziu a hospitalização em 95% dos casos. Um estudo clínico de fase 3 relatou uma eficácia geral estimada de 74% e em participantes com 65

anos de idade ou mais, uma eficácia de 83,5%. A eficácia da vacina contra a variante *Omicron* é de 85% trinta dias após a administração, mas diminui para 55% após 7 meses (EMARY *et al.*, 2021; FALSEY *et al.*, 2021)

- *Janssen/Ad26.COV2.S*

Fabricada pela *Janssen Pharmaceutical Company*<sup>®</sup>, aplicada em duas doses, essa vacina utiliza um adenovírus humano recombinante não replicante tipo 26 que contém a proteína *spike* do SARS-CoV-2 de comprimento total, que induz uma resposta de anticorpos contra a infecção por SARS-CoV-2. O anticorpo direcionado contra a proteína *spike* previne a invasão do vírus SARS-CoV-2 nas células alveolares tipo 2 dos pulmões, reduzindo assim a gravidade e a morbidade da infecção. Com base em dados clínicos, a eficácia da vacina foi relatada como 52,9% (SIMNANI *et al.*, 2022; FRANCIS *et al.*, 2022).

### 2.3.7 Tratamento

Com a rápida disseminação e gravidade do SARS-CoV-2, alguns medicamentos foram reaproveitados, como antivirais e imunobiológicos, para melhorar o prognóstico de pacientes hospitalizados com COVID-19. Atualmente a OMS continua a aprovar o reaproveitamento de medicamentos para o tratamento de COVID-19 em pacientes hospitalizados de acordo com a gravidade de sua doença.

Os medicamentos para artrite recentemente aprovados para o tratamento da COVID-19, tocilizumabe e sarilumabe, demonstraram ser eficazes no tratamento de pneumonia em pacientes com COVID-19 moderada a grave. Da mesma forma, a dexametasona, que é eficaz no controle de danos e inflamações pulmonares e o baricitinibe, um inibidor da janus quinase (JAK), também foram aprovados para tratamento em pacientes com COVID-19. Estudos demonstraram que o tratamento com dextrometorfano regulou a imunidade inata adaptativa, mas, não foi associado à regulação das vias pró-inflamatórias na síndrome respiratória aguda grave causada pela COVID-19 (FAHNOE *et al.*, 2022).

Recentemente a agência sanitária reguladora dos EUA emitiu uma autorização de uso de emergência do antiviral Paxlovid™ da Pfizer→ (comprimidos de nirmatrelvir + ritonavir) para o tratamento de pacientes com COVID-19 com sintomas leves a moderados e aqueles com alto risco de evoluir para doenças graves. Antes deste, havia disponível os antivirais remdesivir e o molnupiravir (FDA, 2022)

O remdesivir foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da COVID-19 em pacientes adultos, pediátricos e idosos que não necessitem de administração suplementar de oxigênio e que apresentem risco aumentado de progredir para caso grave de COVID-19. É um antiviral injetável produzido no formato de pó para diluição, em frascos de 100 mg. A substância impede a replicação do vírus no organismo, diminuindo o processo de infecção, para pacientes adultos. De acordo com a agência, esses medicamentos surgem como novas esperanças na luta contra a pandemia do COVID-19. O molnupiravir é um medicamento antiviral de uso oral que, nos ensaios clínicos, reduziu o risco de internações hospitalares e morte entre pacientes com COVID-19 não grave. Foi aprovado para o tratamento de pacientes adultos com COVID-19 leve a moderada na fase pré-hospitalar da infecção (até 5 dias após o início dos sintomas) com pelo menos um fator de risco para doença grave. De uso domiciliar, ele funciona de modo a reduzir as chances de replicação do SARS-CoV-2 (PITRE *et al.*, 2022).

Como algumas pessoas, incluindo pessoas imunocomprometidas e aquelas que não podem ser vacinadas, ainda permanecem em risco para desenvolver a COVID-19 grave, combinações de anticorpos monoclonais já estão em uso para profilaxia pré-exposição ou pós-exposição contra a COVID-19 leve a moderada (LEVIN *et al.*, 2022). Cinco anticorpos monoclonais anti-RBD do SARS-CoV-2 já foram autorizados pela agência sanitária reguladora dos EUA para uso emergencial no tratamento de pacientes com COVID-19 não hospitalizados que tenham maior probabilidade de desenvolver doenças mais graves em estágio posterior, são eles: bamlanivimabe + etesevimabe, casirivimabe+imdevimabe, sotrovimabe, tixagevimabe+cilgavimabe e, mais recentemente, o bebtelovimab. Todos eles mostraram eficácia nas VoC anteriores e reduziram a neutralização na *Omicron* (FALCONE *et al.*, 2021).

No Brasil os medicamentos aprovados para o tratamento da COVID-19 são: remdivisir, *Paxlovid*<sup>TM</sup>, molnupiravir, sotrovimabe, baricitinabe e o composição cilgavimabe + tixagevimabe (ANVISA, 2022).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O sequenciamento genético permitiu que o mundo identificasse rapidamente o SARS-CoV-2 como causador da COVID-19, o que propiciou o desenho de diagnósticos, medicamentos, vacinas e outras ferramentas para o combate à pandemia. E, mesmo após a introdução das vacinas, a COVID-19 continua sendo uma ameaça para a saúde das populações devido ao seu padrão de rápida disseminação e surgimento de novas variantes. Nesse contexto, a epidemiologia molecular tem um papel central no monitoramento da evolução do SARS-CoV-2 e na identificação de novas variantes com maior transmissibilidade, virulência, diminuição da resposta a vacinas e a agentes terapêuticos, sendo, desta forma, fulcral para complementar, apoiar e aumentar estratégias para redução da carga da COVID-19 na população mundial.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular, demográfica, clínica e laboratorial de pacientes adultos e pediátricos infectados pelo vírus SARS-CoV-2 em Curitiba, Paraná.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar genotipagem das amostras de SARS-CoV-2 por RT-qPCR;
- Realizar o sequenciamento completo do genoma por NGS em amostras que apresentem RT-qPCR de SARS-CoV-2 com Cq  $\leq 25$ ;
- Descrever a prevalência dos genótipos de SARS-CoV-2 em amostras clínicas de pacientes ambulatoriais e hospitalizados com COVID-19;
- Avaliar o perfil clínico-epidemiológico de acordo com as variantes;
- Comparar o perfil molecular, clínico e epidemiológico entre adulto e crianças;
- Descrever as mutações nos sítios NTD, CTD2, RBD e porção proximal de S2 (14 a 1068 aminoácido) na proteína *spike*;
- Descrever o impacto clínico-epidemiológico das mutações na *spike*;
- Identificar fatores associados à gravidade de doença.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal, de coleta de dados retrospectiva, com amostragem por conveniência em dois hospitais universitários terciários, com coleta entre março/2020 e agosto/2021. O estudo foi aprovado por dois Comitês de Ética Institucionais sob nº 51400121.9.0000.0096, e nº 09740619.4.0000.0097 em que a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi dispensado.

#### 5.1.1 Serviços hospitalares

Ambos os hospitais são serviços de referência para o atendimento da COVID-19 em Curitiba, no estado do Paraná. O Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HIPP) faz parte da *The Global Influenza Hospital Surveillance Network* (GIHSN), é um hospital exclusivamente pediátrico que possui 384 leitos dos quais 34 foram destinados exclusivamente para a COVID-19. Já o Complexo Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), faz parte da rede nacional de vigilância para infecção respiratória aguda grave (SRAG), com atendimento majoritário não pediátrico e chegou a disponibilizar 188 leitos exclusivos para a pacientes com COVID-19, sendo 88 UTI.

#### 5.1.2 Amostras

O estudo foi realizado com *swabs* nasofaríngeos coletados para teste diagnóstico de SARS-CoV-2 de pacientes ambulatoriais e internados no CHC-UFPR e HIPP. No total de 19.404 pacientes investigados para COVID-19, 1.878 estavam aptos para serem incluídos no estudo – 531 pacientes pediátricos e 1.347 pacientes adultos.

#### 5.1.3 Critérios de inclusão

Pacientes com confirmação de COVID-19 por RT-qPCR que apresentavam  $Cq \leq 35$ .

#### 5.1.4 Critérios de exclusão

Amostras que não foram armazenadas, que continham volume insuficiente para os ensaios ou amostras sequenciais de pacientes em um período menor de 6 meses após a primo-infecção.

#### 5.1.5 Coleta de dados

Os dados de vacinação em Curitiba foram retirados dos informes da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba. (SMS-Curitiba, 2022). Os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram revisados dos prontuários médicos.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES

Todas amostras incluídas no estudo foram submetidas à genotipagem por RT-qPCR. As amostras que apresentavam a RT-qPCR de SARS-CoV-2 com  $Cq \leq 25$  também foram genotipadas pelo sequenciamento completo do genoma (WGS) por NGS.

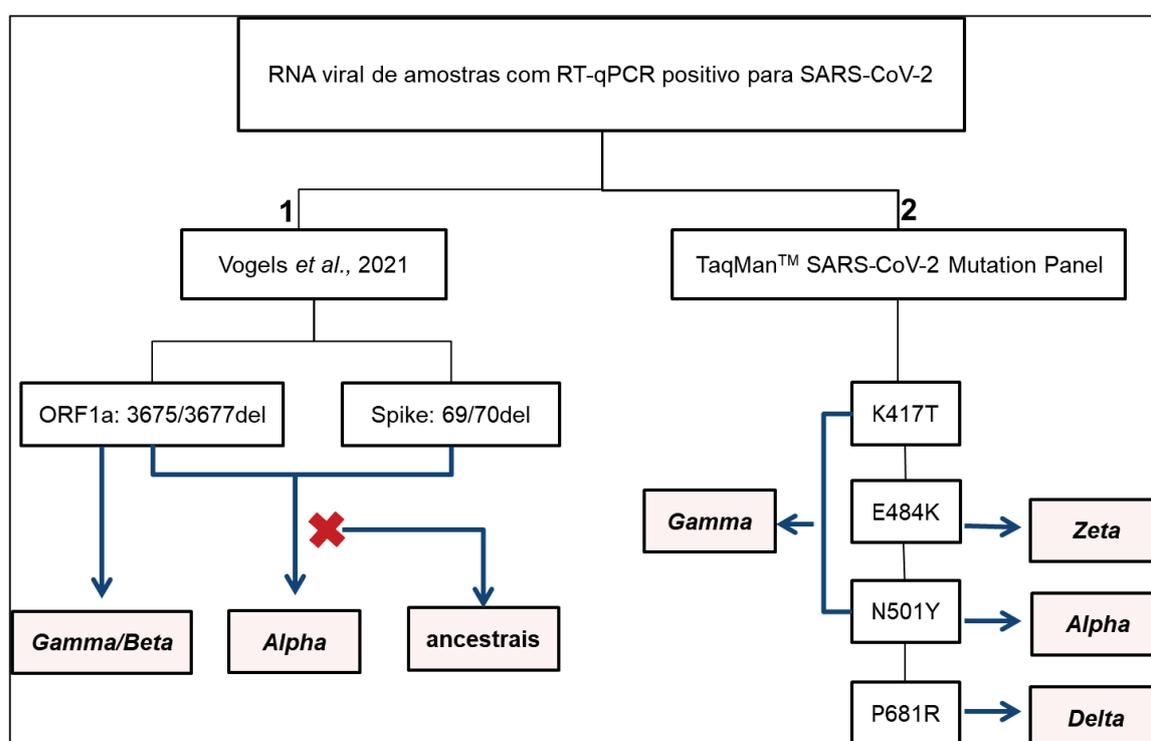
#### 5.2.1 Extração do RNA

Após a coleta em meio de transporte viral, as amostras clínicas eram transportadas climatizadas para os laboratórios de diagnóstico, onde em até 24 horas seria realizado o isolamento do RNA viral pelo sistema de extração automatizado Extracta 32 com o kit EXTRACTA DNA and viral RNA (Loccus, SP, Brasil).

#### 5.2.2 Genotipagem por RT-qPCR

Foram utilizados em sequência dois protocolos de genotipagem baseados em sondas para identificação de VoC (ADAMOSKI *et al.*, 2021). O

primeiro utilizava como alvo duas regiões de deleção - 69-70del na *spike* e 3675-3677del e na ORF1- para identificar *Alpha*, *Beta/Gamma*, sem discriminar as duas últimas. (VOGELS *et al.*, 2021). O protocolo seguinte utilizou primers do painel da Thermo Fischer Scientific (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, US), que usa como alvo as mutações K417T, E484K, N501Y, P681R, para identificar as variantes *Delta* e *Zeta*, além de diferenciar *Beta* de *Gamma*. A reação de RT-qPCR foi realizada com GoTaq™ Probe 1-step RT-PCR (Promega Bio Sciences,™ CA, EUA) de acordo com as diretrizes do fabricante, usando uma entrada de 2,5uL de RNA em um volume total de reação de 10uL (Figura 17).



**FIGURA 17** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GENOTIPAGEM POR RT-qPCR. 1) primeiro foi realizado o protocolo multiplex de Vogels *et al.*, 2021, em que apenas a amplificação do alvo da deleção em ORF1a indicava *Gamma/Beta*, a amplificação dos alvos das deleções em ORF1a e *spike* indicava *Alpha* e amostras em que nenhuma amplificação era observada foram classificadas como ancestrais. O alvo para o gene N (CDC, 2020) (não ilustrado na figura) foi utilizado como controle da reação. 2) Em seguida para discriminar *Gamma* de *Beta*, *Zeta* das ancestrais, confirmar a *Alpha* e identificar *Delta*, foram utilizados os protocolos duplex do painel de mutações de SARS-CoV-2 da TaqMan™. A amplificação de K417T, E484K e N501Y indicava *Gamma*, a amplificação de apenas E484K indicava *Zeta*, a amplificação de apenas N501Y indicava *Alpha* e a amplificação de apenas P681R indicava *Delta*.

### 5.2.3 Genotipagem por NGS

O sequenciamento completo do genoma viral foi realizado de acordo com a diretriz da OMS sobre o sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 (PAHO, 2022) pelo método de sequenciamento de nova geração (NGS) Illumina Mi-seq, utilizando o kit Illumina COVIDSeq Test (Illumina™, CA, EUA).

A montagem da sequência consenso e a identificação do genótipo foram realizados pelo Viralflo - um fluxo de trabalho automatizado para montagem do genoma SARS-CoV-2, atribuição de linhagem, mutações e detecção de variantes intra-hospedeiro (DEZORDI *et al.*, 2021). Apenas as sequências com <1% de nucleotídeos não identificados e >29 kb foram depositadas no banco de dados GISAID e utilizadas na análise molecular.

As sequências consenso foram alinhadas com as sequências referência da cepa selvagem (Wuhan-Hu-1 - EPI\_ISL\_402124) e das variantes B.1.1.28, B.1.1.33 *Alpha*, *Delta*, *Gamma* e *Zeta* - disponíveis no banco de dados EpiCoV do GISAID – utilizando o MAFFT v.7. Em seguida, no PhyML v.3.1, a árvore filogenética foi realizada por máxima verossimilhança (ML), com 100 réplicas de bootstrap, sob o melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado no ModelTest-NG (DARRIBA *et al.*, 2020). O suporte do ramo foi avaliado pelo teste aproximado da razão de verossimilhança baseado no procedimento de Shimodaira-Hasegawa (SHaLRT) com 1000 réplicas (GUINDON *et al.*, 2010). Por fim, a árvore filogenética foi editada na ferramenta Fig tree v.1.4.4. Apenas mutações que ocorreram em pelo menos 1% da população foram incluídas no estudo

#### 5.2.4 Classificação das variantes

As variantes foram classificadas como VoC ou Vol de acordo com o estabelecido pela OMS no surgimento de cada variante (WHO, 2022). Dessa forma, nesse estudo, *Alpha*, *Beta*, *Delta* e *Gamma* (e suas sublinhagens) foram classificadas como variantes de preocupação. A fim de análise, as variantes antecessoras à primeira VoC (B.1.1, B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.332 e B.1.382) foram agrupadas como *wild* e B.1.177.2, P.7 e N.9 foram agrupadas como outras variantes.

### 5.3 VARIÁVEIS DO ESTUDO

O estudo avaliou o efeito das co-variáveis demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais em relação à: i) grupo etário; ii) genótipo/ tipo de variante; iii) internação em UTI e iv) óbitos.

Co-variáveis demográficas: idade, grupo etário, gênero, etnia.

Co-variáveis epidemiológicas: onda pandêmica, tipo de variante, genótipos, mutações na proteína *spike*.

Co-variáveis clínicas: fator de risco, tempo de sintoma até atendimento médico, hospitalização, tempo de hospitalização, internação em UTI, tempo de internação em UTI, uso de suporte ventilatório, óbito.

Co-variáveis laboratoriais: contagem de linfócitos, creatinina, LDH, ferritina, proteína C reativa, procalcitonina, d-dímero.

Para co-variáveis qualitativas (grupo etário, gênero, etnia, onda pandêmica, tipo de variante, genótipos, mutações em *spike*, fator de risco, hospitalização, internação em UTI, uso de suporte ventilatório e óbito) foram apresentados a quantidade absoluta e calculadas as frequências nos grupos das variáveis dependentes. Para co-variáveis quantitativas contínuas (idade, tempo de sintoma até atendimento médico, tempo de hospitalização, tempo de internação em UTI) foram calculadas as medianas e intervalo interquartil.

Apenas as co-variáveis associadas estatisticamente às variáveis dependentes foram apresentadas nos resultados.

#### 5.3.1 Definições

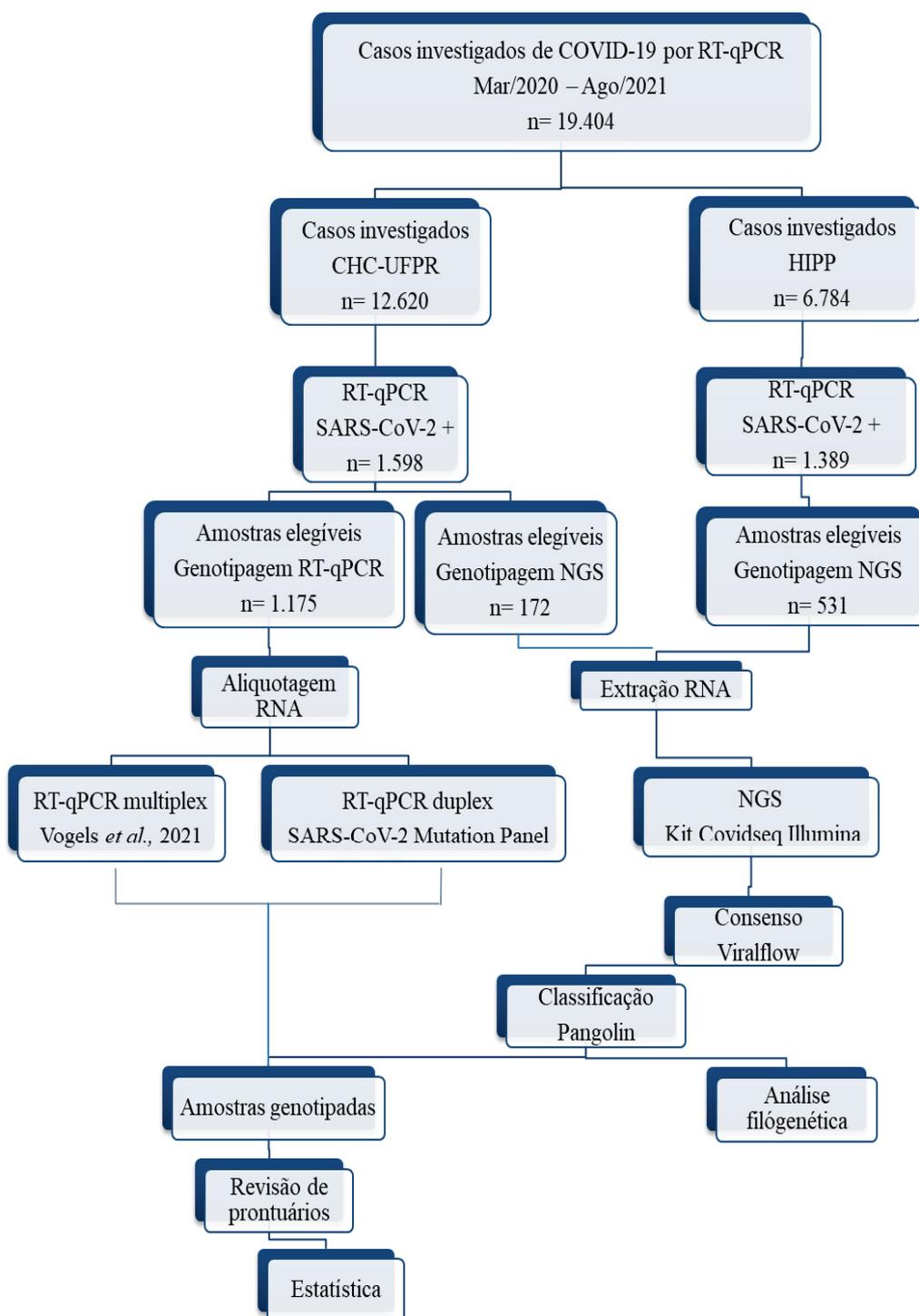
Grupo etário foi dividido em adultos e pacientes pediátricos. Adultos são pacientes acima de 18 anos. A primeira onda pandêmica refere-se ao período entre março de 2020 (SE 10/20) e outubro de 2020 SE 44/20. A segunda teve início em novembro de 2020 e até o fim do período do estudo ainda estava vigente (MS, 2022). Picos de casos referem-se a um aumento abrupto de casos de COVID-19. Imunossuprimidos referem-se pacientes infectados pelo HIV, neoplasias hematológicas e uso de corticosteroides sistêmicos. Como fatores de risco para COVID-19 grave foram considerados idade acima de 65 anos, gestação e comorbidades (incluindo obesidade).

Entende-se por “tipo de variante” a classificação em VoC e não-VoC. Os potenciais efeitos de confusão presentes no estudo são a diferença do isolamento entre o grupo adulto e o pediátrico, a dificuldade do acesso a leitos adultos nos picos da pandemia devido ao esgotamento dos serviços de saúde pública, a diferença fisiológica entre os grupos adulto e pediátrico e a diferença na taxa de imunização. Os efeitos modificadores são: diferença de sensibilidade entre a genotipagem por NGS e por RT-qPCR, aumento da testagem de casos suspeitos de COVID-19, a duração do início dos sintomas até a internação em hospital terciário, introdução da vacina, proposição e constante aperfeiçoamento de estratégias de mitigação e protocolos de manejo clínico.

#### 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas univariadas foram realizadas usando o SPSS IBM v.23 e as multivariadas usando R v4.2.1. As análises univariadas foram realizadas com o teste Fisher ou qui-quadrado para variáveis categóricas, com os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e teste post-hoc de Tukey para variáveis contínuas. Além disso, a anova two-way foi realizada para avaliar o efeito da interação entre as variáveis categóricas com a idade. Curvas-ROC (Receiver Operating Characteristic) foram usadas para determinar o valor de corte associado aos desfechos UTI e óbito. O índice de Youden (J) foi definido para todos os pontos da curva ROC. O valor máximo do índice foi utilizado como critério para selecionar o ponto de corte ótimo de um teste diagnóstico (AKOBENG, 2007a, 2007b). As análises de sobrevida dos pacientes hospitalizados e pacientes internados em UTI foram realizadas por Kaplan-Meier. A análise multivariada dos cofatores relacionados aos desfechos primários e secundários foi realizada pela regressão logística. O Odds Ratio ajustado (aOR) foi calculado por meio do modelo multivariado com seleção *stepwise* das variáveis. As análises de Pearson e desvio residual foram realizadas para testar o modelo de ajuste. Todos os testes estatísticos foram bilaterais, com significância de  $p < 0,05$  e intervalo de confiança (IC) de 95%.

A figura 18 ilustra as etapas supracitadas.



**FIGURA 18** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO ESTUDO.

Legenda: PANGOLIN – Ferramenta oficial para classificação dos genótipos de SARS-CoV-2.

FONTE: a autora, 2022.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

6.1 ARTIGO 1 - SARS-COV-2 MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN ADULT AND PEDIATRIC PATIENTS - A RETROSPECTIVE MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY IN SOUTHERN BRAZIL.

**SARS-COV-2 MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN ADULT AND PEDIATRIC PATIENTS - A RETROSPECTIVE MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY IN SOUTHERN BRAZIL.**

Lapinski BA<sup>1</sup>, Domino NR<sup>12</sup>, Pereira LA<sup>2</sup>, Resende PC<sup>3</sup>, Siqueira MM<sup>3</sup>, Debur MC<sup>4</sup>, Adamoski D<sup>5</sup>, de Oliveira JC<sup>5</sup>, Gradia, DF<sup>5</sup>, Bonatto AC<sup>5</sup>, Wassem R<sup>5</sup>, da Silva Trindade E<sup>6</sup>, de Souza EM<sup>7</sup>, Genelhoud G<sup>2</sup>, Giamberardino HI<sup>8</sup>, Krys P<sup>8</sup>, Dourado RM<sup>8</sup>, Benthien PHB<sup>9</sup>, da Costa ECS<sup>9</sup>, Yamaguto GE<sup>9</sup>, Zhen F<sup>9</sup>, da Silva BG<sup>2</sup>, Nogueira MB<sup>2</sup>, Noronha L<sup>10</sup>, de Souza CM<sup>11</sup>, SCB-UFPR COVID-19 team, Raboni, SM.<sup>12\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Internal Medicine and Health Sciences, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Virology Laboratory, Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Brazil

<sup>3</sup>National Respiratory Viruses Surveillance Laboratory – Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro Brazil.

<sup>4</sup>Public Health Laboratory of Paraná, Brazil.

<sup>5</sup>Sector of Biological Science, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>6</sup>Sector of Biological Science, Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>7</sup>Sector of Biological Science, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>8</sup>Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Paraná, Brazil.

<sup>9</sup>Sector of Health Sciences, Medical School, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>10</sup> Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Brazil.

<sup>11</sup> Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Brazil.

<sup>12</sup>Infectious Diseases Division, Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Brazil.

SCB-UFPR COVID-19 team: Altina Bruna de Souza Barbosa, Beatriz Bocatte de Mattos, Bruna da Silva Soley, Carla Adriane Royer, Cibele Batina Rabelo, Cristina

Kaehler, Diego Candido de Abreu, Guilherme Antonio Vendramin, Helyn Priscila de Oliveira Barddal, Letícia Dalla Vechia Henschel, Madson Silveira de Melo, Nathalie Carla Cardoso, and Rachel dos Santos de Sena de Vasconcelos.

\*Corresponding author:

Sonia Mara Raboni.

Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná

Rua Padre Camargo, nº 280, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Zip Code 82060-240 –

Brasil. E-mail: [sraboni@ufpr.br](mailto:sraboni@ufpr.br)

## ABSTRACT

SARS-CoV-2 molecular epidemiology has been essential during the pandemic to monitor variant emergence, to estimate outbreaks, and to provide information for vaccine and therapeutic development. This study aimed to genotype the SARS-CoV-2 virus and to compare its molecular and epidemiological profiles according to, age, hospitalization, and death. This retrospective cross-sectional study included a convenience sample from a general and a pediatric tertiary hospital from March/2020 to August/2021. RT-qPCR or next-generation sequencing was performed for viral genotyping. The hospitalization and case fatality rates (CFR) were higher in the first wave ( $p < 0.0001$ ), particularly among the older adult group; the highest number of cases occurred in the second wave, mainly in the pediatric group ( $p < 0.0001$ ). Gamma and wild types were significantly higher in the pediatric and adult groups, respectively. The epidemiological profiles between ages showed that infection in adults were associated with female sex (OR=2.48; 95% CI= 1.96-3.14), non-VoC (aOR= 2.68; 95% CI= 2.13-3.38), increased the chance of hospitalization (aOR= 5.86; 95%CI= 4.22-8.15) and death (aOR= 8.19; 95% CI= 2.91-23.10). The clades identified were 20B, 20 E (EU1), 20J (Gamma V3), 20I (Alpha V1), and 21J (Delta). Logistic regression showed that first wave (aOR= 2.20; 95% CI 1.15- 4.20), adults (aOR=13.41; 95%CI= 8.19 - 21.96), and E484K mutation (aOR= 1.93; 95%CI= 1.16-3.20) were related to higher hospitalization, while death was associated with first wave (aOR= 3.71; 95%CI= 1.65- 8.32). COVID-19 infection profiles vary according to host and viral factors. Therefore, continuous epidemiological and molecular surveillance is essential to minimize the burden of the pandemic.

**Key-words:** SARS-CoV-2, COVID-19, next generation sequencing, mutation, variant, VoC, VoI, genotype, adult, pediatric, E484K

## BACKGROUND

The SARS-CoV-2 pandemic has an immeasurable global burden<sup>1</sup>, affecting approximately 650 million people worldwide, leading to the death of more than 6.5 million people by the end of the second half of 2022<sup>2</sup>. Brazil was one of the main epicenters of the pandemic, and it is the country of origin of the variant of concern Gamma. Brazil ranks third in the world, in terms of the global number of SARS-CoV-2 reported cases.<sup>3,4</sup>

High viral circulation favors numerous viral mutation events, which may lead to the emergence of variants with greater potential for immune escape, virulence, and pathogenesis. These events have a high impact on the demographic profile of hospitalizations, increasing viral fitness and reducing vaccine and immunotherapy responses.<sup>5</sup>

Currently literature indicates that children in relation adults may have presented an increased risk of infection by Gamma, Delta and Omicron variants related to lack of immunization. As the global prevalence of these variants has increased in areas where the virus has not been contained by public health mitigation strategies, there have been increasing numbers of children requiring intensive care (e.g. United States of America and United Kingdom). On the other hand, in low-to-middle-income countries, where there is generally less availability of vaccines, less critical care capacity and poor quality of health care, there have been disproportionate deaths.<sup>6</sup>

Mutations in the spike protein play a crucial role in the emergence of new variants. Therefore, it has been the focus of molecular epidemiology worldwide.<sup>7</sup> The NTD and RBD of the spike protein are the most diverse regions, and mutations beyond these subdomains strongly influence the infectivity and sensitivity of SARS-CoV-2 to sera from convalescent and vaccinated individuals. Despite being outside the major

subdomains, all residues in the proximal region of S2 (836-1068aa) substantially alter the electropositivity and hydrophobicity, increasing the likelihood of modifying the protein's local structure and function.<sup>8</sup>

In this scenario, molecular epidemiology has been essential for understanding the impact of new variants on the course of the COVID-19 pandemic. The association between genetic mutations and phenotypic expression allows for a better understanding of viral dynamics for public health decision-making, next generation vaccine development, and drug proposals.<sup>9</sup>

The purpose of this study was to examine the molecular characteristics and the epidemiological profile of SARS-CoV-2 variant infections in outpatients and inpatients treated at two tertiary hospitals in southern Brazil from March/2020 to August/2021.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

A retrospective cross-sectional study with convenience sampling was conducted at two tertiary university hospitals in Curitiba, Paraná, southern Brazil, from March/2020 to August/2021. The study was approved by the two Institutional Ethics Committee boards under number # 51400121.9.0000.0096, and number # 09740619.4.0000.0097. The informed consent signature was waived.

### **Samples**

Nasopharyngeal swabs were collected for SARS-CoV-2 diagnostic testing from the outpatients and inpatients treated at the tertiary health center Complexo Hospital de Clínicas- UFPR (CHC-UFPR) and Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HIPP) - a

pediatric hospital. The inclusion criteria were COVID-19 patients with RT-qPCR confirmation. Exclusion criteria were patients who had a  $Cq > 35$  or whose samples were not stored, insufficient volume to perform the assays, or sequential positive samples from patients within 6 months of SARS-CoV-2 infection. All samples were submitted to RT-qPCR genotyping and whole genome sequencing (WGS) genotyping was carried out in samples with  $Cq \leq 25$ . A total of 19,404 patients were screened, and 1,878 patients were included in the study.

### **Data collection**

Curitiba vaccination coverage was collected from epidemiological reports. The demographic, clinical, and laboratory data of the patients were collected from the review of medical records.

### **Definitions**

The pediatric group consists of patients under the age of 18. According to national epidemiological data, the first pandemic wave refers to the period between March 2020 (SE 10/20) and October 2020 SE 44/20. The second wave began in November 2020 and lasted until the end of the study period. Case peaks refer to an abrupt increase in cases of COVID-19.<sup>10</sup> Variant type means the VoC and non-VoC discrimination. The primary outcome is the variant infection. Variant type, age (adult or pediatric group), hospitalization and fatality rate are the secondary outcomes. Hospitalization, ICU admission, and death are considered indicators of disease severity. Potential confounders are the difference in virus exposure between adult and pediatric patients, and the adult hospital bed restriction during at the pandemic's peaks due to the collapse of public health services. Modifying effects are the difference between NGS and RT-

qPCR genotyping sensitivity, increased testing of suspected COVID-19 patients, the time between symptom onset and admission to a tertiary hospital, vaccine introduction, proposition, frequent improvement of mitigation strategies, and clinical management protocols. Biases: sample disposal due to high demand exceeding storage capacity; use of several RT-qPCR kits with different target genes for SARS-CoV-2 diagnosis, which directly impacted the Cqs obtained for the inclusion criteria, and bias due to limited sensitivity of genotyping methods. The VoC classification was performed according to the World Health Organization recommendations until the last month of sample inclusion. Thus, Alpha (B.1.77), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) and their subvariants, as well as Gamma (P.1) and their subvariants make up this group<sup>9</sup>. The wild-type group is formed by the genotypes B.1.1, B.1.1.28, B1.1.33, B.1.332, and B.1.382. Other variants include B.1.177.2, P.7, and N.9.

### **Virus genotyping**

Viral RNA was isolated using the Extracta 32 automated extraction system with the EXTRACTA DNA and viral RNA kit (Loccus, SP, Brazil). To perform the RT-qPCR genotyping we used two probe-based genotyping systems.<sup>11</sup> At first Vogels *et al*<sup>12</sup> approach was applied to detect deletion regions - 69-70del in the spike and 3675-3677del in the ORF1- as an outcome for distinguishing Alpha, Beta/Gamma, Delta or other wild-type variants. The second genotyping system used primers from the TaqMan<sup>TM</sup> SARS-CoV-2 mutation panel (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, US), which targets the mutations K417T, E484K, N501Y P681R, to confirm the genotypes and identified Zeta variants, in addition to differentiating Beta from Gamma. RT-qPCR reaction was performed in the GoTaq<sup>TM</sup> Probe 1-step RT-PCR system (Promega Bio Sciences,<sup>TM</sup> CA, USA) according to the manufacturer's guidelines

using an input of 2.5uL RNA in a total reaction volume of 10uL. Viral whole genome sequencing (WGS) was performed according to the WHO SARS-CoV-2 genome sequencing guidelines<sup>13</sup> by next-generation sequencing method (NGS) Illumina Mi-seq, using the Illumina kit COVIDSeq test (Illumina™, CA, USA).

To assemble the consensus sequence and to identify the genotype, the Viralflo, an integrated workflow for the SARS-CoV-2 genome assembly, lineage receiving, observation, and detection of intra-host variants was utilized<sup>14</sup>. Only sequences with < 1% N and > 29 kb were deposited in the GISAID database (Supplementary material Table 1) and used in the molecular analysis.

The consensus sequences were aligned with the reference sequences of the wild-type strain (Wuhan-Hu-1 - EPI\_ISL\_402124) and variants B.1.1.28, B.1.1.33 Alpha, Delta, Gamma and Zeta - available in the EpiCoV from the GISAID database – using MAFFT v.7. The phylogenetic tree was constructed in PhymL v.3.1 using maximum likelihood (ML) with 100 bootstrap replicates using the best nucleotide substitution model identified in ModelTest-NG. Branch support was assessed using the approximate likelihood ratio test based on the Shimodaira-Hasegawa procedure (SHaLRT) with 1000 replicates. Finally, the phylogenetic tree was visualized in Fig tree v.1.4.4. Only mutations with a frequency greater than 1% between amino acids 14 and 1068 of the spike protein were described.

### **Data analysis**

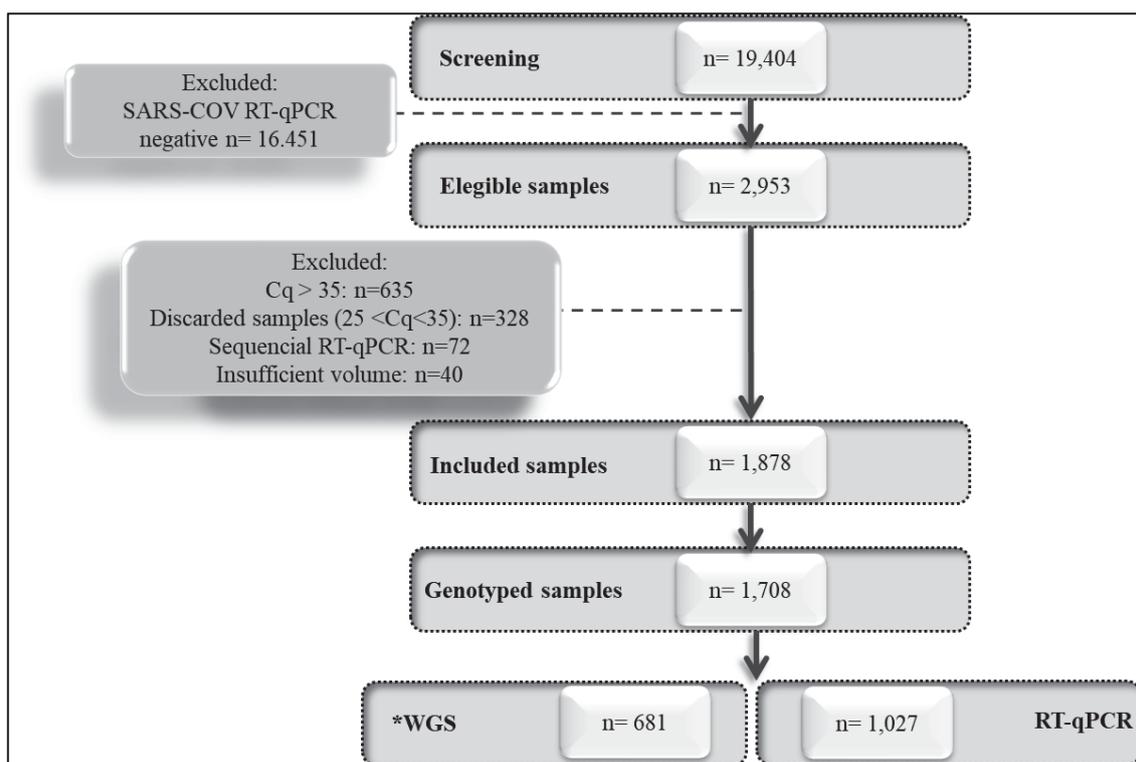
Statistical analyses were performed using the IBM SPSS statistics version 23. The univariate analysis was performed using the Fisher's exact and Chi-squared tests for categorical variables, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis rank sum tests with Tukey's multiple post hoc comparisons for continuous variables, as appropriate. In

addition, the two-way ANOVA was performed to evaluate the effect of the interaction between categorical variables and age. Multivariate logistic regression analysis was performed to assess covariates related to disease severity. Adjusted odds ratio (aOR) was calculated using the multivariate model with a stepwise selection of variables, with a cut-off point of  $p < 0.2$ . Pearson and residual deviance analyses were performed to test the model fit. All statistical tests were two-sided, with significance level set at  $p < 0.05$ . A confidence interval of 95% (95%CI) was used to adjust the estimates.

## RESULTS

From the 1,878 samples included in the study, 1,708 (91%) samples were genotyped (Fig. 1). Of these, 531 (31%) were pediatric samples from the HIPP and 1,177 (69%) were adult samples from the CHC-UFPR.

When assessing the efficiency of genotyping methodologies, a 92% agreement ( $n=627/681$ ) was observed in genotyping between Vogels *et al.* (2021)<sup>12</sup> RT-qPCR protocol and the WGS, 95% ( $n=647/681$ ) between the TaqMan™ SARS-CoV-2 mutation panel protocol and the WGS and 84% ( $n=572/681$ ) between the three genotyping methods.

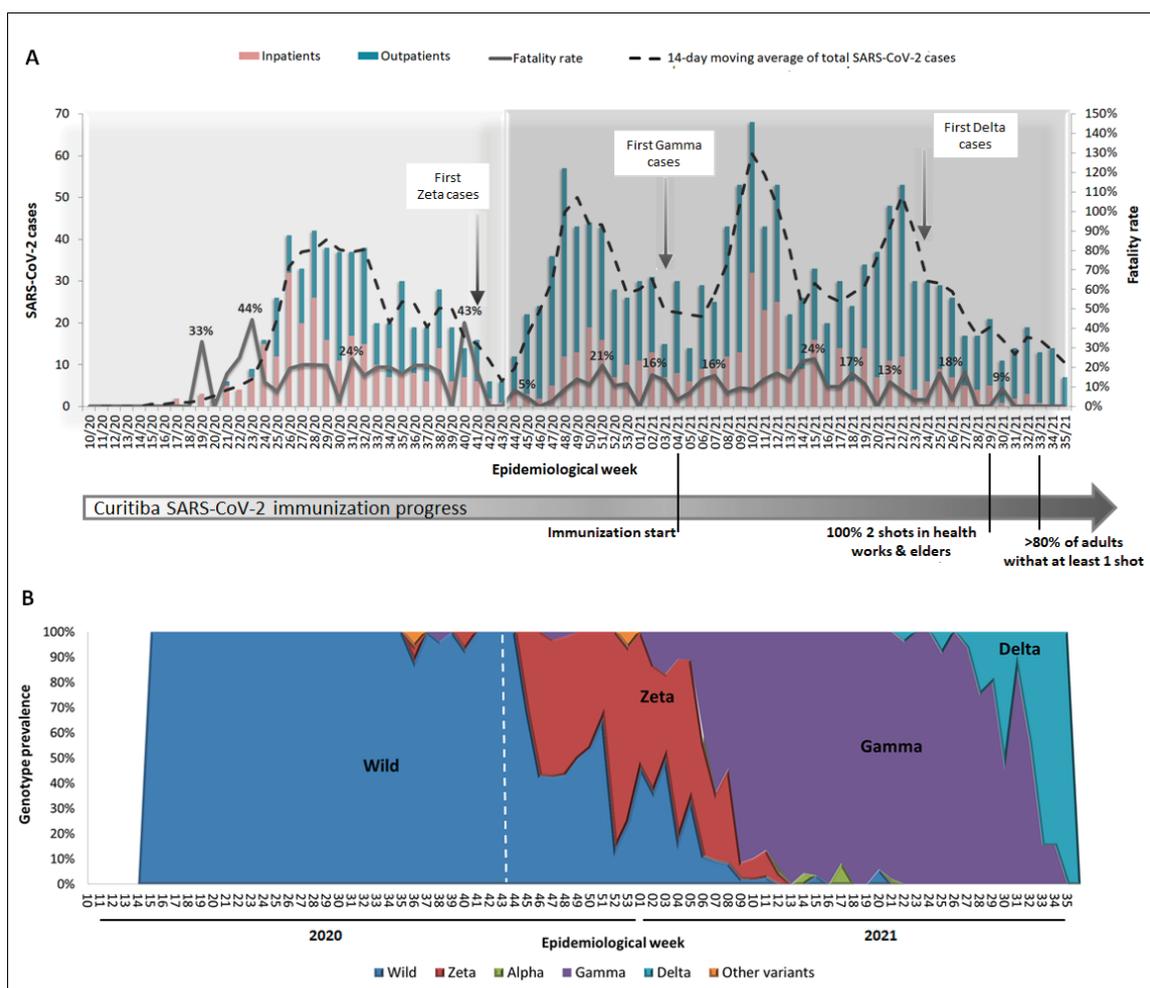


**Figure 1.** Flowchart of the inclusion process and results. \* Whole genome sequence.

### Epidemiological characterization

The study period lasted 77 epidemiological weeks (EW), of which only 6 SARS-CoV-2 infections were observed in the first 5 EW and 4 epidemic peaks occurred in this period. The first peak occurred with the emergence of SARS-CoV-2 in the population, and the second peak occurred with the emergence of the Zeta variant. Two peaks occurred after the Gamma variant emergence. During the first 14 weeks of the pandemic and the fourth pandemic peak, the number of inpatients was greater than outpatients. Nonetheless, hospitalizations declined following the Delta emergency and finally reached zero. Hospitalization and fatality rates were 36% and 12%, respectively. Wild-type infections (500/544; 92%;  $p < 0.0001$ ), inpatients (265/544; 49%;  $p < 0.0001$ ), and deaths (97/544; 18%;  $p < 0.0001$ ) were associated with the first pandemic wave. The highest weekly fatality rate occurred in epidemiological weeks 23/20 and 40/20 (44% and 43%, respectively). The fatality rate in the second wave did not surpass 24%, and there were

no deaths from week 31/21 forward (fig. 2A). Wild-type variants were prevalent in the first pandemic wave. Although Zeta emerged in the first wave, it concentrated its cases in the second, a period in which the emergence of Gamma and Delta was also observed (fig 2B). The distribution of cases in the pediatric and adult groups was similar to that observed in the city of Curitiba, however, in the study population, the increase in the number of deaths was not proportional to the peaks in the increase in cases as observed in the population of Curitiba (Supplementary material fig 1). The prevalence profile of the variants was different between the pediatric and the adult groups. The SARS-CoV-2 infections at the HIPP started 7 weeks after the CHC-UFPR. Zeta infections were firstly identified in pediatric patients, followed by adults. In addition, Gamma infections were identified in HIPP patients weeks after the Delta variant had already predominance among CHC-UFPR cases (Supplementary material fig 2).



**Figure 2.** Distribution of SARS-CoV-2 between EW 10/20 and 35/21. A) Distribution of outpatients and inpatients SARS-CoV-2 cases, 14-day moving average of total cases, and fatality rate. 1<sup>st</sup> pandemic wave - lighter gray quadrant; 2<sup>nd</sup> pandemic wave - darker gray quadrant; primary axis - number of SARS-CoV-2 cases and 14-day moving average of cases; secondary axis - fatality rate of SARS-CoV-2 genotyped cases. B) SARS-CoV-2 variants prevalence. The dotted line indicates the beginning of 2<sup>nd</sup> pandemic wave.

The clinical-epidemiological characterization showed that the second pandemic wave had the highest number of COVID-19 cases, and the majority of them occurred in the pediatric group ( $p < 0.0001$ ). No Beta variant was found in the study. Gamma infection was higher in the pediatric group ( $p < 0.0001$ ), while wild-type infection was higher in the adult group ( $p < 0.0001$ ). Infections in women ( $p < 0.0001$ ), hospitalization rate ( $p < 0.0001$ ), and fatality rate ( $p < 0.0001$ ) were higher in adults ( $p < 0.0001$ ) (Table 1).

**Table 1. Epidemiological characterization.**

Features	Total n=1,878	Adult n= 1,297	Pediatric n=581	*p
2 <sup>nd</sup> pandemic wave n(%)	1,334 (71)	843 (65)	491 (84)	<0.0001

<b>Variants n(%)</b>				<b>&lt;0.0001</b>
Non-Voc	967 (52)	739 (57)	228 (39)	
VoC	741 (39)	407 (31)	334 (57)	
Inconclusive	170 (9)	151 (12)	19 (3)	
<b>Genotypes n(%)</b>				<b>&lt;0.0001</b>
<i>Non-VoC</i>				
Wild-type	702 (37)	575 (44)	127 (22)	
Other variants	21 (1)	3 (<1)	18 (3)	
Zeta	244 (13)	161 (12)	83 (14)	
<i>VoC</i>				
Alpha	6 (<1)	3 (<1)	3 (<1)	
Gamma	680 (36)	368 (28)	312 (53)	
Delta	55 (3)	36 (3)	19 (3)	
<b>Gender – female n(%)</b>	988 (52)	734 (57)	254 (43)	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>Median age (IQR) years</b>	43 (27-60)	48 (35-63)	6 (2-10)	-
<b>Inpatients n(%)</b>	673 (64)	616 (48)	57 (10)	
<b>Hospitalization rate</b>	0.36	0.45	0.10	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>Deaths n(%)</b>	230 (12)	226 (17)	4 (<1)	
<b>Fatality rate</b>	0.12	0.17	0.01	<b>&lt; 0.0001</b>

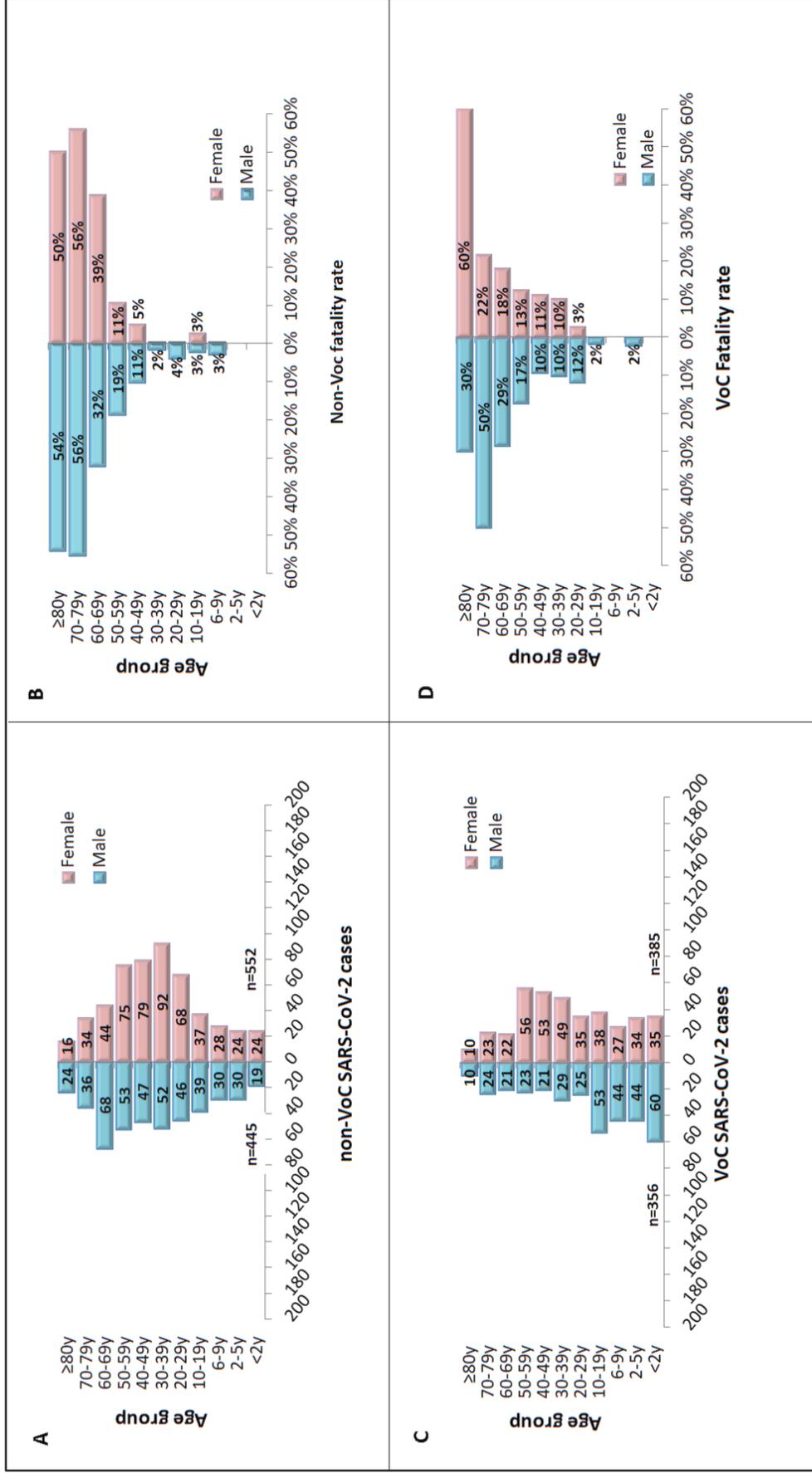
\*Mann-Whitney nonparametric test

Logistic regression showed that SARS-CoV-2 infections in adults were directly associated with female (aOR=2.48; 95%CI= 1.96-3.14;  $p < 0.0001$ ), non-VoC (aOR= 2.68; 95%CI= 2.13-3.38;  $p < 0.0001$ ), increased the odds of hospitalization by 6 times (aOR= 5.86; 95%CI= 4.22-8.15;  $p < 0.0001$ ) and death by 8 times (aOR= 8.19 95% CI= 2.91-23.10;  $p < 0.0001$ ).

Non-VoC infected more patients between the ages of 30 and 49 ( $p < 0.0001$ ), and no difference was observed between the ages of the pyramid's extremities. Infections were more common in males and females between the ages of 20 and 69 (Figure 3A). Cases of VoC infections were more common in males under the age of 19 ( $p < 0.0001$ ) and in females between the ages of 30 and 59 ( $p < 0.0001$ ). Furthermore, the number of cases at the bottom of the age pyramid is higher than the number near the top ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3C). There was a difference in the number of cases by age group among males infected with VoC and non-VoC, with VoC infection being associated with pediatric

patients ( $p < 0.0001$ ). Among women, no difference was found by variant type. Highest fatality rates for both sexes occurred in the elderly. However, VoC infections had higher fatality rates between the ages of 20 and 39 than non-Voc infections ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3B, 3D). Although the number of VoC infections was higher in the pediatric group, no increase in fatality rate was observed.

Non-VoC infection was associated with adult cases (739/967; 76%; aOR 1.59 95%CI 1.42 - 1.77;  $p < 0.0001$ ). Wild-type infection was directly associated with higher number of hospitalizations (314/703; 45%;  $p < 0.0001$ ) and death (115/703; 16%;  $p < 0.0001$ ). The Delta variant infection had the lowest hospitalization rate (1.8%) and no deaths occurred. There was no difference in the median age of pediatric and adult patients by variant type, whether wild-type, Zeta, Gamma, or Delta. However, there was a difference in hospitalization rates between the two groups based on the variant. Among adults, the wild-type and Gamma variants had the highest hospitalization rates, and yet no difference was found between the two variants ( $p < 0.0001$ ). Among pediatric patients, the wild-type was responsible for the highest number of hospitalizations, while the Delta variant did not result in any (Table 2A, 2b).



**Figure 3.** Distribution of case numbers and fatality rate of SARS-CoV-2 infections in age pyramids by gender. A) cases of non-VoC infections; B) fatality rate in non-VoC infections; C) cases of VoC infections; D) fatality rate in VoC infection.

**Table 2a. SARS-CoV-2 infection profile in the adult population by variant type.**

	Adult (n= 1,150)				<b>**p</b>
	<b>Wild-type n=575 (50)</b>	<b>Zeta n=161 (14)</b>	<b>Gamma n=378 (33)</b>	<b>Delta n=36 (3)</b>	
<b>Median age (IQR) years</b>	48 (35-66)	47 (33-64)	47 (35-62)	41 (28-55)	0.229
<b>Inpatient n (%)</b>	289 (50)	55 (34)	188 (50)	1 (2)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Hospitalization rate</b>	0.50	0.34	0.50	0.02	
<b>Death n (%)</b>	113 (20)	19 (12)	68 (18)	0	0.073

**Table 2b. SARS-CoV-2 infection profile in the pediatric population by variant type.**

	Pediatric (n=531)				<b>p</b>
	<b>Wild-type n=117 (23)</b>	<b>Zeta n= 83 (15)</b>	<b>Gamma n=312 (58)</b>	<b>Delta n=19 (4)</b>	
<b>Median age (IQR) years</b>	6 (2-10)	6 (2-11)	5 (1-10)	4 (1-8)	0.152
<b>Inpatient n (%)</b>	25 (20)	8 (1)	23 (7)	0	<b>*0.007</b>
<b>Hospitalization rate</b>	0.20	0.01	0.07	-	
<b>Death n (%)</b>	2 (2)	0	2 (<1)	0	-

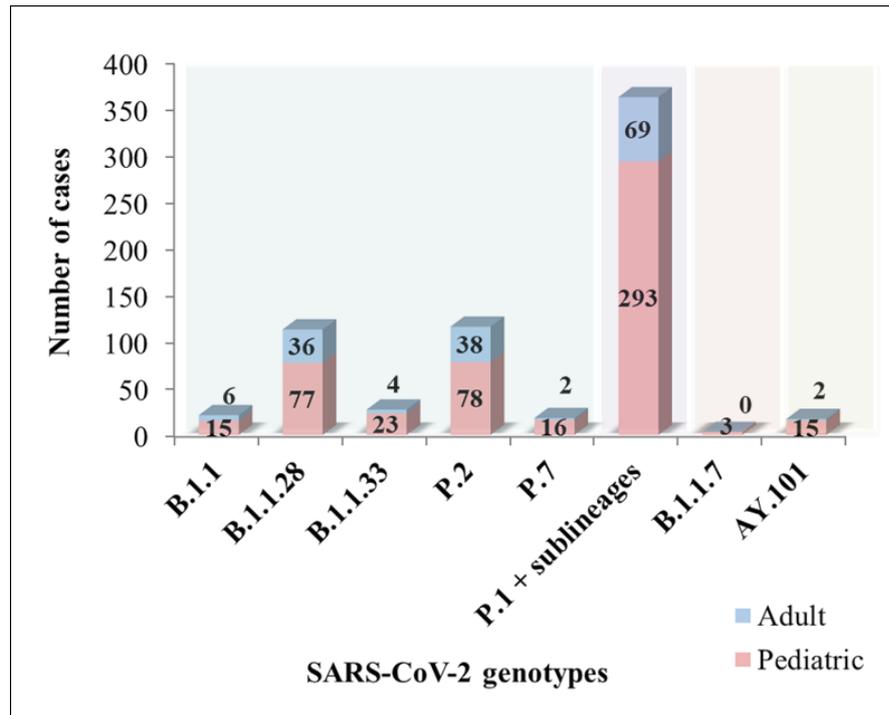
\* statistics regarding the evaluation of wild-type, Zeta and Gamma groups.

\*\*Kruskal Wallis nonparametric test.

Two-way ANOVA showed an association between the age of participants with COVID-19 and both sex ( $p=0.011$ ) and type of variant ( $p<0.0001$ ). In addition, there was an interaction between gender and variant type ( $p<0.0001$ ). Males infected by VoC were younger than females, while females infected by non-VoC were older than men.

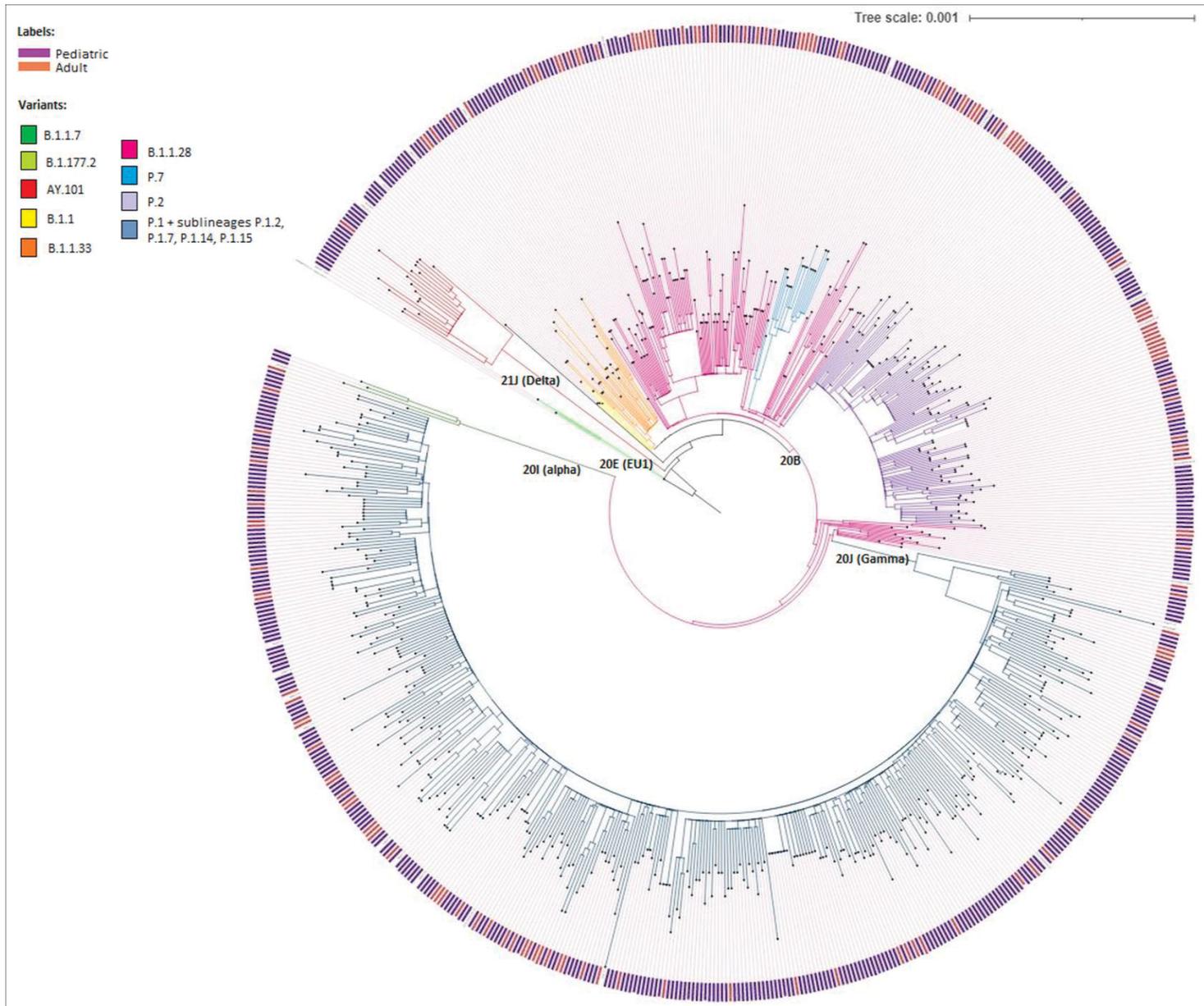
### **SARS-COV- 2 whole genome sequencing**

The prevalence of sequenced samples was equivalent to that found in a total of samples. Of the 681 samples sequenced, 159 (23%) were from the adult group and 522 (73%) from the pediatric group. The genotypes N9, B.1.177.22, B.1.332, and B.1.382, were each identified once in pediatric patients. Five subvariants of P.1 were identified: two P1.1, four P.1.2, eight P.1.7, eight P.1.14, and two P.1.15. In the adult sequenced samples, no Delta infection was found, and all those found in pediatric patients were subvariant AY.101. Figure 4 illustrates the most frequent genotype distribution between adult and pediatric patients.



**Figure 4.** SARS-CoV-2 genotypes identified by WGS. From left to right, the color gradient indicates clades 20B, 20J (Gamma V3), 20I (Alpha V1), 21J (Delta), respectively.

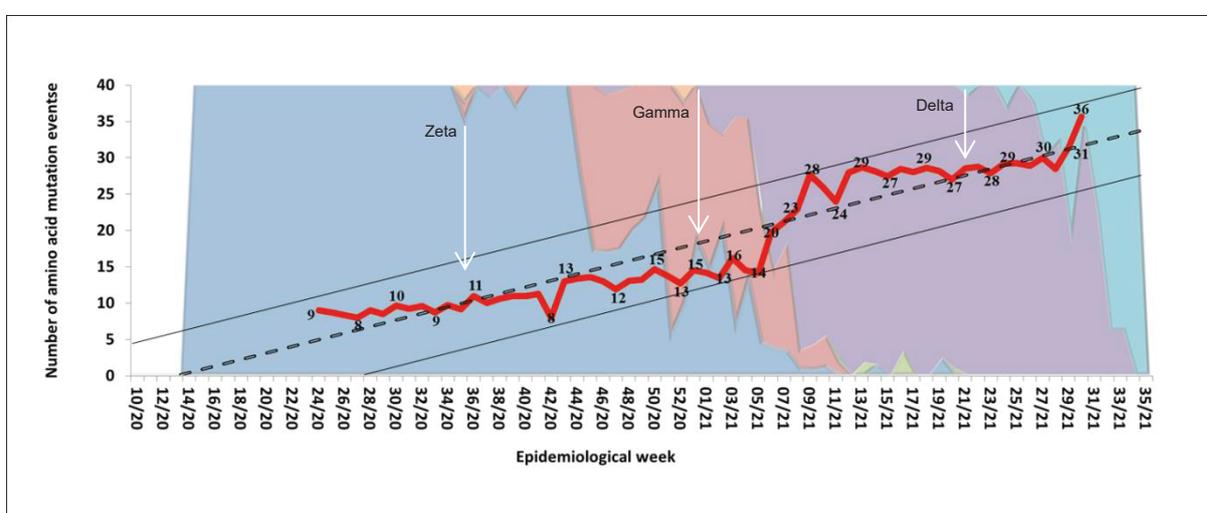
The genotypes were distributed in five distinct clades - 20B, 20 E (EU1), 20J (Gamma V3), 20I (Alpha V1), and 21J (Delta) (Figure 5).



**Figure 5.** Evolution and spatial-temporal distribution of SARS-CoV-2 viruses from patients treated at CHC-UFPR and HIPP hospitals between March/2020 and August/2021, Curitiba/Paraná, Brazil. SARS-CoV-2 whole genome sequences of maximum likelihood (ML) phylogenetic tree, with 100 replicates bootstrap, SH-aLRT test (-aLRT 1000), and best-fit model: GTR + F + G4 chosen according to BIC. The B.1.1.7 sequences are represented by dark green, B.1.177.2 by light green, AY.101 by red, B.1.1 by yellow, B.1.1.33 by orange, the B.1.1.28 by pink, P.7 by light blue, P.2 by lilac, and P.1 and their underlinings by dark blue. Salmon color labels identified samples from adult patients and purple color labels from pediatric patients.

The molecular evolution of SARS-CoV-2 showed that the average number of mutations per genotype remained constant during wild-type prevalence and demonstrated an increase below the trend line with Zeta emergence. However, it was during the emergence of the Gamma variant that the average number of mutations showed a significant boost above the linear

trend. The average remained constant prior to the appearance of Gamma subvariants until the Delta variant emergence, when it presented a new peak, with an increase above the growth estimate ( $p < 0.0001$ ) (Figure 6). The increase in the number of cases caused by the emergence of Gamma was directly associated with the mean increase in SARS-CoV-2 amino acid mutations ( $p < 0.0001$ ). In contrast, an average increase in mutations was observed in the emergence of Delta, although this variant did not cause an increase in the number of cases in the study population.

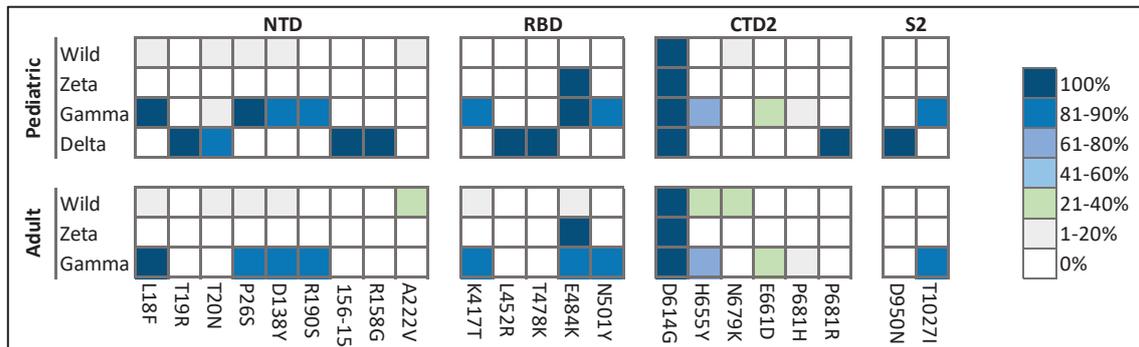


**Figure 6.** The average amino acid mutations of the SARS-CoV-2 variants over the epidemiological weeks. The genotyped samples are distributed between the epidemiological week 23/20 to 31/21. The red line indicates the average number of mutations presented by the variants identified in each epidemiological week. The dotted line indicates the linear trend of the number of mutations against evolution time, the parallel lines to the trend line represent the lower and upper 95% limit range. The colors in the plot area indicate the prevalence of variants according to the epidemiological week. From left to right, the color red: Zeta; orange: other variants; green: Alpha, purple: Gamma, and cyan: Delta. White arrows indicate emergence of the variant in the study population.

### Spike protein mutations

Twenty-five amino acid mutations with a frequency greater than 10% were found in the spike protein between positions 14 and 1068. Among these, 9 are in the NTD: L18F (n=361), T19R (n=16), T20N (n=17), P26S (n=358), D138Y (n=355), R190S (n=349), 156-157del (n=16), R158G (n=16), and A222V (n=25). There were five mutations in the RBD: K417T (n=324), L452R (17), T478K (n=16), E484K (n=467), and N501Y (n=356). In CTD2, there were 6 mutations: D614G (681), H655Y (n=231), N679K (n=25), E661D (n=101), P681H (n=11),

and P681R (n=16). Finally, two mutations were found in the proximal site of S2: D950N (16) and T1027I (n=350). Only five of these mutations were not characteristic of the analyzed variants, T19R, D138Y, T478K, N679K, and E661D. The frequency of mutations was similar in adult and pediatric patients, except for H665Y, and N679K, which were higher in adults, and E661D, in pediatric patients ( $p < 0.0001$ ) (Figure 7). The mutation H655Y was associated with the second peak of the Gamma ( $p < 0.0001$ ), regardless of the subvariant.



**Figure 7.** Frequency of spike protein mutations. No Delta variants were identified in adults.

### Disease severity factors associated with spike mutations

Regarding outcome severity, multivariate analysis of the interaction between spike mutations and epidemiological factors showed that first wave (aOR= 2.20; 95% CI = 1.15 - 4.20;  $p=0.017$ ), adults (aOR= 13.41; 95% CI= 8.19 - 21.96;  $p < 0.0001$ ) and E484K mutation (aOR= 1.93; 95% CI= 1.16 - 3.20;  $p < 0.0001$ ) were associated with higher hospitalization, while death was associated with infections only in the first pandemic wave (aOR= 3.71; 95% CI= 1.65 - 8.32;  $p=0.001$ ).

## DISCUSSION

This study examined the molecular epidemiology of the SARS-CoV-2 virus in adult and pediatric patients in southern Brazil during two pandemic waves. One VoI, Zeta, and three VoC, Alpha, Gamma, and Delta were identified during the study period. In addition,

hospitalization was associated with wild-type, first pandemic wave, and adult group. In contrast, in the sequenced samples, the factors associated with hospitalization were first wave, adult group, and E484K mutation detection.

Despite being the fundamental key for the rapid identification of SARS-CoV-2 and the molecular surveillance of the variants, complete genome sequencing requires skilled professionals, supplies, and structural resources. As a result, its use in laboratory routines in Brazil and worldwide is limited.<sup>15</sup> Thus, during the study period, the state of Paraná had previously contributed with 877 of the Brazilian sequences deposited in the GISAID bank<sup>16</sup>. Therefore, the addition of the 681 samples from the present study represents a substantial contribution (43%) to the total SARS-CoV-2 samples from Paraná deposited at GISAID.

An option for large-scale molecular surveillance of SARS-CoV-2, given the limitations of the WGS, is the genotyping of variants by RT-qPCR. There are several protocols described in the literature, whose accuracy oscillates between 85-100% according to variants and amplification targets.<sup>17</sup> Our results demonstrated a high accuracy of genotyping by RT-qPCR. However, when evaluating the agreement of the three methodologies, it was observed that the strategy of using the three methodologies in sequence did not imply an increase in the accuracy of the genotyping of the samples. Thus, a solution to optimize SARS-CoV-2 genotyping would be to adopt the genotyping algorithm developed by Adamoski *et al.* (2022) which is adapted from Vogels *et al.* (2021)<sup>12</sup> and the TaqMan™ SARS-CoV-2 mutation panel.<sup>18</sup>

The prevalence of the SARS-CoV-2 variants is in line with what is observed in Paraná<sup>19</sup>, Brazil<sup>20</sup> and worldwide<sup>21</sup>. Interestingly, a greater diversity of genotypes was found in the pediatric group compared to adults. Both symptomatic and asymptomatic children may have a high viral load of live and replicating SARS-CoV-2.<sup>22</sup> Studies show that the innate immune response in this group is generally insufficient to eliminate SARS-CoV-2, resulting in longer

viral elimination time and higher SARS-CoV-2 replication rates<sup>23</sup>. Thus, the pediatric group may present a potential reservoir in terms of transmission and evolution of genetic variants. However, our findings may have a sampling bias, since the majority of adult sequenced data were from hospitalized patients, implying that genotype frequency is more closely related to hospitalization. In contrast, more than 90% of the pediatric sequenced data were outpatients from the HIPP, which may better reflect the dynamics of SARS-CoV-2 in the community.

The distribution of COVID-19 cases in this study lasted until week 29/21, coinciding with the emergence of the Delta variant, which did not impact the number of cases in both study hospitals as it impacted the number of cases reported in the regional epidemiological reports.<sup>24</sup> The Delta variant (B.1.617.2) has the mutations L452R and P681R that increase transmissibility and, consequently rising viral infectivity. In contrast, the Delta variant did not show a phenotype of greater virulence or substantially reduced response to vaccination<sup>25</sup>. This factor, added to the immunization rate in Curitiba, which has reached 100% for two doses in health workers and risk groups and more than 80% for one dose in adults in the general population.<sup>24</sup>

According to the variant reported in this study, data from hospitalizations in pediatrics and adults rule out the hypothesis that the Delta variant had a more transmissible phenotype with greater virulence. We showed that the rate of hospitalization for Delta was lower for wild-type, Zeta, and Gamma in the adult and pediatric populations, and the latter was not even ready for immunization. However, this finding disagrees with the findings of a cohort study that identified high hospitalization rates in emergency care due to the Delta wave and proposed the infection of the unvaccinated population as a potential factor of disease severity.<sup>26</sup>

The lower hospitalization rate in pediatric patients compared to adults is consistent with previous reports. Studies have shown that 90% to 98% of confirmed pediatric COVID-19

cases are asymptomatic, mild or moderate, and do not require hospitalization.<sup>27</sup> However, there has been no previous description of the association between higher rates of infection by VoC in children and adults. This finding may be related to the non-VoC being concentrated during a period without vaccine, when children were confined at home due to school closures, favoring adults to viral exposure, and therefore being the group in which infections spread. However, VoC emerge with the introduction of the anti-COVID-19 vaccine. During periods with high vaccination coverage rates in adults and relaxation of isolation regulations, children began to show more infections because they were not immunized.

Contrary to the literature<sup>28</sup>, the wild-type variant was not associated with lower hospitalization and death rates compared to the other variants. These results may be related to the pandemic period and not to viral characteristics, as the highest rates of hospitalization and death occurred in the first pandemic wave. In Brazil, the learning curve for managing the COVID-19 pandemic was longer than in high-income countries for a variety of reasons including the lack of a national plan to combat the pandemic, difficulties in implementing mitigation strategies, socioeconomic fragility, delays in closing borders, non-adherence to the blocking measures, and delays in purchasing vaccines<sup>29</sup>. These sociopolitical-economic factors may directly impact the higher rates of hospitalization and deaths associated with the wild type in this study.<sup>30</sup>

The high mortality rate found in older adults is the most remarkable consensus in the literature on risk factors for severe or critical COVID-19.<sup>31</sup> However, when assessing results by gender, our findings showed that VoC infections in men are associated with younger patients. As we have shown, young age (e.g., children) was associated with lower disease severity. In addition, results showed that the younger the person, the lower the mortality rate. Therefore, we did not find an association between male gender and disease severity, as previously reported.<sup>32</sup>

The present study identified five of the twenty major clades of SARS-CoV-2 known at the time. The genotypes described agree with those deposited in GISAD from southern Brazil over the same time period.<sup>33</sup>

The dynamics of mutation frequency reflected the observed in global SARS-CoV-2 evolution<sup>34</sup>. The various events of Gamma and Delta emergence led to an increase in the number of cases compared to the previous average. The higher an organism's replication rate, the greater its mutation rate and plasticity.<sup>35</sup> Furthermore, the positive selective pressure on the spike protein's RBD increases with the immunization rate growth.<sup>36</sup> Therefore, the increase in the mean number of mutation events above the trend line in the delta and gamma variants may be explained by the high viral replication combined with a high rate of immunization compared to previous variants.

Two spike mutations have been linked to population outcomes. The H665Y was associated with the second peak caused by the Gamma variant. Recent studies have shown that H655Y reduces plasma membrane entry and facilitates endosomal entry, characteristics that have given Omicron, which modulates cell tropism conferring greater infectious capacity with reduced pathogenicity.<sup>37</sup>

The E484K mutation is associated with increased hospitalization, significantly impacts viral fitness and adaptive evolution. A new binding site for ACE2 (amino acid 75) is generated by this mutation, creating a substantially stronger RBD-ACE2 interaction. In addition, E484K reduces the response to convalescent sera, treatment with monoclonal antibodies, and vaccine efficacy<sup>38</sup>, and it is associated with hospitalization and deaths.<sup>39</sup>

This study has some limitations: 1) retrospective data collection; 2) the lack of data in the medical records as a result of the pandemic's high clinical demand; 3) the difference in clinical management protocols between CHC-UFPR and HIPP; 4) the inclusion bias generated by the limited sensitivity of genotyping methodologies; 5) the need to use kits for

SARS-CoV-2 diagnosis by RT-qPCR with different target genes, which may have affected Cq amplification; 6) large sample disposal due to lack of storage space; 7) loss of patients from other health services, due to lack of data crossover between public health services; and finally, 8) false-negatives due to testing outside the SARS-CoV-2 diagnosis window diagnostic window of SARS-CoV-2.

However, most of these limitations are associated with the pandemic period and are shared by other retrospective studies conducted at the same time. Given the outstanding contribution of the samples deposited in the GISAID database in understanding the molecular panorama of viruses circulating in the state of Paraná, as well as the elucidation of the epidemic-molecular dynamics of SARS-CoV-2 in two tertiary hospitals with both pediatric and adult patients, the current work is relevant for the study of individuals with moderate to severe COVID-19.

## **CONCLUSION**

The number of cases, hospitalization, and fatality rates during the COVID-19 pandemic differ according to host and viral factors. Therefore, continuous epidemiological and molecular surveillance is essential for managing the pandemic, either by identifying mutations or by providing data for the development of epidemiometric models that assist in public health decision-making.

## **FUNDING INFORMATION:**

This work was supported by: PROPLAN /Federal University of Parana, Curitiba-Paraná-Brazil; FINEP - Funder of Studies and Projects, Ministry of Science, Technology and Innovation- Brazil - Institutional Network Project: Laboratories for Diagnostic tests for COVID-19 (0494/20).

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- <sup>1</sup>WHO. Guidance for surveillance of SARS-CoV-2 variants: interim guidance. 2021;(August):18.1.
- <sup>2</sup>Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Inf Dis.* 20(5):533-534.
- <sup>3</sup>Costa KTDS, Morais TNB, Justino DCP, Andrade FB. Evaluation of the epidemiological behavior of mortality due to COVID-19 in Brazil: A time series study. *PLoS One.* 2021;16(8):e0256169.
- <sup>4</sup>de Souza WM, Buss LF, Candido DDS, et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nat Hum Behav.* 2020;4(8):856-865.
- <sup>5</sup>Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA.* 2021 Feb 9;325(6):529-531. doi: 10.1001/jama.2020.27124. PMID: 33404586MS – Ministério da Saúde, Brasil. COVID-19 – Painel Coronavírus [internet]. Brasília:2021. Accessed 2022 mar 16, Available: <<https://covid.saude.gov.br/>>.
- <sup>6</sup>Nathanielsz J, Toh ZQ, Do LAH, Mulholland K, Licciardi PV. SARS-CoV-2 infection in children and implications for vaccination [published online ahead of print, 2022 Aug 15]. *Pediatr Res.* 2022;1-11.
- Ruiz-Rodriguez P, Francés-Gómez C, Chiner-Oms Á, et al. Evolutionary and Phenotypic Characterization of Two Spike Mutations in European Lineage 20E of SARS-CoV-2. *mBio.* 2021;12(6):e0231521.
- <sup>8</sup>Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses.* 2022;14(3):640. Published 2022 Mar 19.
- <sup>9</sup>WHO – World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants.[internet]. Available in <<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>; accessed in March, 2022.
- <sup>10</sup>MS – Ministério da Saúde do Brasil. COVID-19 - Painel Coronavírus, Brasília :2021. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16/03/2022
- <sup>11</sup> Adamoski D, de Oliveira JC, Bonatto AC, Wassem, R, Nogueira MB, Raboni SM, et al. Large-Scale Screening of Asymptomatic Persons for SARS-CoV-2 Variants of Concern and Gamma Takeover, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.27 (12), 3124–312, 2021.
- <sup>12</sup>Vogels CBF, Breban MI, Ott IM, Alpert T, Petrone ME, Watkins AE, et al.; Brazil-UK CADDE Genomic Network; Network for Genomic Surveillance in South Africa. Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. *PLoS Biol.* 2021;19:e3001236.
- <sup>13</sup>PAHO Sequenciamento genômico do SARS-CoV-2. Guia de implementação para máximo impacto na saúde pública. 8 de janeiro de 2021. Brasília, D.F.: Organização Pan-Americana

da Saúde; 2021. Available in <<https://doi.org/10.37774/9789275723890>>; accessed in March, 2022.

<sup>14</sup>Dezordi FZ, Neto AMDS, Campos TL, et al. ViralFlow: A Versatile Automated Workflow for SARS-CoV-2 Genome Assembly, Lineage Assignment, Mutations and Intrahost Variant Detection. *Viruses*. 2022;14(2):217.

<sup>15</sup>Aghamirza MAH, Eivazzadeh-Keihan R, Beig PA, et al. COVID-19: A systematic review and update on prevention, diagnosis, and treatment. *MedComm (2020)*. 2022;3(1):e115.

<sup>16</sup>Fiocruz. Painel de variantes. Rede genômica. (2022). Available in: <<https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard/>>. Accessed in March, 2022.

<sup>17</sup>Wang H, Miller JA, Verghese M, et al. Multiplex SARS-CoV-2 Genotyping Reverse Transcriptase PCR for Population-Level Variant Screening and Epidemiologic Surveillance. *J Clin Microbiol*. 2021;59(8):e0085921.

<sup>18</sup>Adamoski D, Baura VA, Rodrigues AC, et al. SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants Surge in Curitiba, Southern Brazil, and Its Impact on Overall COVID-19 Lethality. *Viruses*. 2022;14(4):809.

<sup>19</sup>Oliveira MM, Schemberger MO, Suzukawa AA, et al. Re-emergence of Gamma-like-II and emergence of Gamma-S:E661D SARS-CoV-2 lineages in the south of Brazil after the 2021 outbreak. *Virol J*. 2021;18(1):222.

<sup>20</sup>Alcantara LCJ, Nogueira E, Shuab G, et al. SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. *Virus Res*. 2022;315:198785.

<sup>21</sup>Scovino AM, Dahab EC, Vieira GF, Freire-de-Lima L, Freire-de-Lima CG, Morrot A. SARS-CoV-2's Variants of Concern: A Brief Characterization. *Front Immunol*. 2022;13:834098.

<sup>22</sup>Yonker LM, Boucau J, Regan J, et al. Virologic features of SARS-CoV-2 infection in children. Preprint. *medRxiv*. 2021;2021.05.30.21258086.

<sup>23</sup>Brodin P. SARS-CoV-2 infections in children: Understanding diverse outcomes. *Immunity*. 2022;55(2):201-209.

<sup>24</sup>SESA-PR. Informe semanal da COVID-19. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Available in: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Coronavirus-COVID-19>>. Accessed in November, 2022.

<sup>25</sup>Chen J, Wang R, Hozumi Y, et al. Emerging dominant SARS-CoV-2 variants. Preprint. *ArXiv*. 2022;arXiv:2210.09485v1.

<sup>26</sup>Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, et al. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) compared with Alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):35-42.

- <sup>27</sup>Ludvigsson JF. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr.* 2020;109(6):1088-1095.
- <sup>28</sup>Lin L, Liu Y, Tang X, He D. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Public Health.* 2021;9:775224.
- <sup>29</sup>de Souza WM, Buss LF, Candido DDS, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nat Hum Behav.* 2020;4(8):856-865.
- <sup>30</sup>Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, Cochran KB, Walsh SP, Meyerowitz-Katz G. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur J Epidemiol.* 2020;35(12):1123-1138.
- <sup>31</sup>Mehta AA, Haridas N, Belgundi P, Jose WM. A systematic review of clinical and laboratory parameters associated with increased severity among COVID-19 patients. *Diabetes Metab Syndr.* 2021;15(2):535-541.
- <sup>32</sup>Nasiri MJ, Haddadi S, Tahvildari A, *et al.* COVID-19 Clinical Characteristics, and Sex-Specific Risk of Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:459.
- <sup>33</sup>de Souza UJB, Dos Santos RN, Campos FS, *et al.* High Rate of Mutational Events in SARS-CoV-2 Genomes across Brazilian Geographical Regions, February 2020 to June 2021. *Viruses.* 2021;13(9):1806.
- <sup>34</sup>HADFIELD J, MEGILL C, BELL SM, *et al.* Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 2018;34(23):4121-4123.
- <sup>35</sup>Freer G, Lai M, Quaranta P, Spezia PG, Pistello M. Evolution of viruses and the emergence of SARS-CoV-2 variants. *New Microbiol.* 2021;44(4):191-204.
- <sup>36</sup>Wrobel AG, Benton DJ, Roustan, C. *et al.* Evolution of the SARS-CoV-2 spike protein in the human host. *Nat Commun* **13**, 1178 (2022).
- <sup>37</sup>Hu B, Chan JF, Liu H, *et al.* Spike mutations contributing to the altered entry preference of SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):2275-2287.
- <sup>38</sup>Yang WT, Huang WH, Liao TL, Hsiao TH, Chuang HN, Liu PY. SARS-CoV-2 E484K Mutation Narrative Review: Epidemiology, Immune Escape, Clinical Implications, and Future Considerations. *Infect Drug Resist.* 2022;15:373-385.
- <sup>39</sup>Sharif N, Alzahrani KJ, Ahmed SN, *et al.* Genomic surveillance, evolution and global transmission of SARS-CoV-2 during 2019-2022. *PLoS One.* 2022;17(8):e0271074.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table 1. SARS-CoV-2 sequences deposited at GISAID**

EPI_ISL_8005208	EPI_ISL_8005227	EPI_ISL_8005502	EPI_ISL_8004995	EPI_ISL_8004996
EPI_ISL_8005209	EPI_ISL_8004992	EPI_ISL_8005251	EPI_ISL_8005612	EPI_ISL_8005301
EPI_ISL_8005210	EPI_ISL_8004992	EPI_ISL_8005252	EPI_ISL_8005277	EPI_ISL_8005516
EPI_ISL_8005045	EPI_ISL_8005228	EPI_ISL_8005253	EPI_ISL_8005278	EPI_ISL_8005565
EPI_ISL_8005211	EPI_ISL_8005229	EPI_ISL_8005254	EPI_ISL_8005022	EPI_ISL_8005302
EPI_ISL_8005212	EPI_ISL_8005230	EPI_ISL_8005255	EPI_ISL_8005058	EPI_ISL_8005044
EPI_ISL_8005213	EPI_ISL_8005231	EPI_ISL_8004972	EPI_ISL_8005508	EPI_ISL_8005039
EPI_ISL_8005214	EPI_ISL_8005232	EPI_ISL_8005256	EPI_ISL_8005509	EPI_ISL_8005041
EPI_ISL_8005483	EPI_ISL_8005496	EPI_ISL_8005257	EPI_ISL_8005510	EPI_ISL_8005303
EPI_ISL_8005490	EPI_ISL_8005106	EPI_ISL_8005258	EPI_ISL_8005511	EPI_ISL_8005071
EPI_ISL_8005215	EPI_ISL_8005497	EPI_ISL_8005611	EPI_ISL_8005512	EPI_ISL_8005304
EPI_ISL_8005216	EPI_ISL_8005498	EPI_ISL_8005259	EPI_ISL_8005279	EPI_ISL_8012917
EPI_ISL_8005217	EPI_ISL_8005233	EPI_ISL_8005260	EPI_ISL_8005280	EPI_ISL_8005305
EPI_ISL_8005218	EPI_ISL_8005082	EPI_ISL_8004994	EPI_ISL_8005281	EPI_ISL_8005579
EPI_ISL_8005219	EPI_ISL_8005090	EPI_ISL_8005261	EPI_ISL_8005282	EPI_ISL_8005517
EPI_ISL_8005101	EPI_ISL_8005234	EPI_ISL_8005069	EPI_ISL_8005283	EPI_ISL_8005518
EPI_ISL_8005484	EPI_ISL_8005235	EPI_ISL_8005262	EPI_ISL_8005284	EPI_ISL_8005306
EPI_ISL_8005485	EPI_ISL_8005236	EPI_ISL_8005263	EPI_ISL_8005285	EPI_ISL_8005307
EPI_ISL_8005486	EPI_ISL_8005237	EPI_ISL_8005034	EPI_ISL_8005286	EPI_ISL_8004997
EPI_ISL_8005487	EPI_ISL_8005238	EPI_ISL_8005264	EPI_ISL_8005613	EPI_ISL_8005308
EPI_ISL_8005492	EPI_ISL_8005560	EPI_ISL_8005503	EPI_ISL_8005288	EPI_ISL_8005309
EPI_ISL_8005220	EPI_ISL_8005239	EPI_ISL_8005021	EPI_ISL_8005070	EPI_ISL_8005310
EPI_ISL_8005221	EPI_ISL_8005499	EPI_ISL_8005504	EPI_ISL_8005564	EPI_ISL_8005072
EPI_ISL_8005488	EPI_ISL_8005080	EPI_ISL_8005036	EPI_ISL_8005300	EPI_ISL_8004998
EPI_ISL_8005489	EPI_ISL_8005240	EPI_ISL_8005505	EPI_ISL_8005059	EPI_ISL_8005311
EPI_ISL_8005491	EPI_ISL_8004993	EPI_ISL_8005506	EPI_ISL_8005513	EPI_ISL_8005312
EPI_ISL_8005493	EPI_ISL_8005068	EPI_ISL_8005507	EPI_ISL_8005514	EPI_ISL_8005566
EPI_ISL_8005555	EPI_ISL_8005624	EPI_ISL_8005083	EPI_ISL_8005287	EPI_ISL_8005519
EPI_ISL_8005222	EPI_ISL_8005241	EPI_ISL_8005265	EPI_ISL_8005289	EPI_ISL_8005520
EPI_ISL_8005085	EPI_ISL_8005242	EPI_ISL_8005266	EPI_ISL_8005290	EPI_ISL_8005313
EPI_ISL_8005557	EPI_ISL_8005243	EPI_ISL_8005267	EPI_ISL_8005625	EPI_ISL_8005314
EPI_ISL_8005102	EPI_ISL_8005244	EPI_ISL_8005043	EPI_ISL_8005291	EPI_ISL_8005614
EPI_ISL_8005066	EPI_ISL_8005561	EPI_ISL_8005268	EPI_ISL_8005292	EPI_ISL_8005315
EPI_ISL_8005494	EPI_ISL_8005245	EPI_ISL_8005269	EPI_ISL_8005293	EPI_ISL_8005316
EPI_ISL_8005223	EPI_ISL_8005246	EPI_ISL_8005270	EPI_ISL_8005294	EPI_ISL_8005317
EPI_ISL_8005224	EPI_ISL_8005247	EPI_ISL_8005271	EPI_ISL_8005295	EPI_ISL_8005318
EPI_ISL_8005577	EPI_ISL_8005248	EPI_ISL_8005562	EPI_ISL_8005597	EPI_ISL_8005319
EPI_ISL_8005495	EPI_ISL_8005249	EPI_ISL_8005596	EPI_ISL_8005296	EPI_ISL_8005320
EPI_ISL_8005079	EPI_ISL_8005603	EPI_ISL_8005272	EPI_ISL_8005297	EPI_ISL_8005321
EPI_ISL_8005225	EPI_ISL_8005250	EPI_ISL_8005563	EPI_ISL_8005298	EPI_ISL_8004999
EPI_ISL_8005558	EPI_ISL_8005584	EPI_ISL_8005273	EPI_ISL_8005515	EPI_ISL_8005322
EPI_ISL_8005589	EPI_ISL_8004974	EPI_ISL_8005274	EPI_ISL_8005515	EPI_ISL_8005323

---

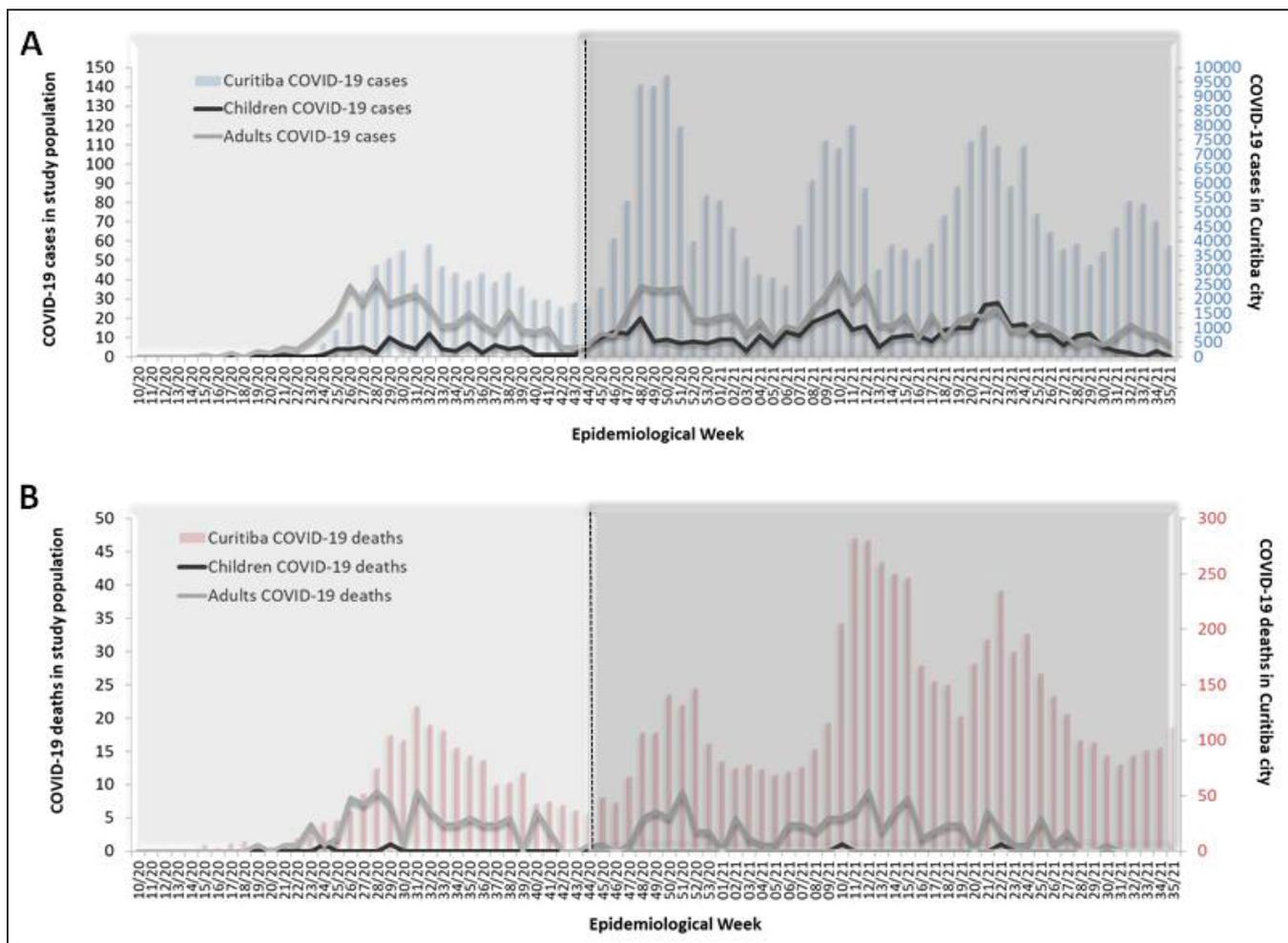
EPI_ISL_8005067	EPI_ISL_8005578	EPI_ISL_8005275	EPI_ISL_8005299	EPI_ISL_8005324
EPI_ISL_8005226	EPI_ISL_8005500	EPI_ISL_8005592	EPI_ISL_8005551	EPI_ISL_8005325
EPI_ISL_8005559	EPI_ISL_8005501	EPI_ISL_8005276	EPI_ISL_8005092	EPI_ISL_8005000
EPI_ISL_8005326	EPI_ISL_8005356	EPI_ISL_8005379	EPI_ISL_8005403	EPI_ISL_8005583
EPI_ISL_8005327	EPI_ISL_8005357	EPI_ISL_8005380	EPI_ISL_8005404	EPI_ISL_8005107
EPI_ISL_8005580	EPI_ISL_8005358	EPI_ISL_8005381	EPI_ISL_8005405	EPI_ISL_8005040
EPI_ISL_8005521	EPI_ISL_8005359	EPI_ISL_8005382	EPI_ISL_8005406	EPI_ISL_8005545
EPI_ISL_8005523	EPI_ISL_8005360	EPI_ISL_8005383	EPI_ISL_8005407	EPI_ISL_8005443
EPI_ISL_8005522	EPI_ISL_8005525	EPI_ISL_8005384	EPI_ISL_8005573	EPI_ISL_8005113
EPI_ISL_8005328	EPI_ISL_8005524	EPI_ISL_8005385	EPI_ISL_8005408	EPI_ISL_8005060
EPI_ISL_8005329	EPI_ISL_8005526	EPI_ISL_8005103	EPI_ISL_8005409	EPI_ISL_8004977
EPI_ISL_8005330	EPI_ISL_8005527	EPI_ISL_8005006	EPI_ISL_8005594	EPI_ISL_8005618
EPI_ISL_8005331	EPI_ISL_8005528	EPI_ISL_8005386	EPI_ISL_8005410	EPI_ISL_8005114
EPI_ISL_8005567	EPI_ISL_8005108	EPI_ISL_8005387	EPI_ISL_8005582	EPI_ISL_8005424
EPI_ISL_8005332	EPI_ISL_8005361	EPI_ISL_8005051	EPI_ISL_8005026	EPI_ISL_8005616
EPI_ISL_8005333	EPI_ISL_8005361	EPI_ISL_8005388	EPI_ISL_8005538	EPI_ISL_8005425
EPI_ISL_8012918	EPI_ISL_8005569	EPI_ISL_8005389	EPI_ISL_8005539	EPI_ISL_8005426
EPI_ISL_8005334	EPI_ISL_8005074	EPI_ISL_8005390	EPI_ISL_8005027	EPI_ISL_8005427
EPI_ISL_8005335	EPI_ISL_8005570	EPI_ISL_8005052	EPI_ISL_8005604	EPI_ISL_8005629
EPI_ISL_8005336	EPI_ISL_8005049	EPI_ISL_8005628	EPI_ISL_8005109	EPI_ISL_8005028
EPI_ISL_8005523	EPI_ISL_8005362	EPI_ISL_8005552	EPI_ISL_8005042	EPI_ISL_8005546
EPI_ISL_8005337	EPI_ISL_8005363	EPI_ISL_8005393	EPI_ISL_8005110	EPI_ISL_8005547
EPI_ISL_8005338	EPI_ISL_8005364	EPI_ISL_8005394	EPI_ISL_8005087	EPI_ISL_8005444
EPI_ISL_8005339	EPI_ISL_8005365	EPI_ISL_8005395	EPI_ISL_8005411	EPI_ISL_8005445
EPI_ISL_8005001	EPI_ISL_8005050	EPI_ISL_8005532	EPI_ISL_8005412	EPI_ISL_8005446
EPI_ISL_8005340	EPI_ISL_8005366	EPI_ISL_8005533	EPI_ISL_8005413	EPI_ISL_8004978
EPI_ISL_8005341	EPI_ISL_8005367	EPI_ISL_8005534	EPI_ISL_8005007	EPI_ISL_8005115
EPI_ISL_8005342	EPI_ISL_8005626	EPI_ISL_8005535	EPI_ISL_8005414	EPI_ISL_8005599
EPI_ISL_8005342	EPI_ISL_8005003	EPI_ISL_8005537	EPI_ISL_8005415	EPI_ISL_8005600
EPI_ISL_8005343	EPI_ISL_8005004	EPI_ISL_8005005	EPI_ISL_8005416	EPI_ISL_8005428
EPI_ISL_8005073	EPI_ISL_8005368	EPI_ISL_8005053	EPI_ISL_8005540	EPI_ISL_8005009
EPI_ISL_8005344	EPI_ISL_8005369	EPI_ISL_8005391	EPI_ISL_8005035	EPI_ISL_8005587
EPI_ISL_8005345	EPI_ISL_8005627	EPI_ISL_8005392	EPI_ISL_8005541	EPI_ISL_8005429
EPI_ISL_8005346	EPI_ISL_8005370	EPI_ISL_8005054	EPI_ISL_8005542	EPI_ISL_8005574
EPI_ISL_8005347	EPI_ISL_8005371	EPI_ISL_8005396	EPI_ISL_8005111	EPI_ISL_8005595
EPI_ISL_8005348	EPI_ISL_8005372	EPI_ISL_8005397	EPI_ISL_8005046	EPI_ISL_8005430
EPI_ISL_8005568	EPI_ISL_8005373	EPI_ISL_8005398	EPI_ISL_8005112	EPI_ISL_8005431
EPI_ISL_8005601	EPI_ISL_8005374	EPI_ISL_8005572	EPI_ISL_8005417	EPI_ISL_8005075
EPI_ISL_8005524	EPI_ISL_8005375	EPI_ISL_8005081	EPI_ISL_8005418	EPI_ISL_8005029
EPI_ISL_8005349	EPI_ISL_8005376	EPI_ISL_8005401	EPI_ISL_8005419	EPI_ISL_8005548
EPI_ISL_8005593	EPI_ISL_8005581	EPI_ISL_8005536	EPI_ISL_8005420	EPI_ISL_8005104
EPI_ISL_8005350	EPI_ISL_8005529	EPI_ISL_8005588	EPI_ISL_8005008	EPI_ISL_8005116
EPI_ISL_8005351	EPI_ISL_8005530	EPI_ISL_8005093	EPI_ISL_8005421	EPI_ISL_8005094
EPI_ISL_8005352	EPI_ISL_8005531	EPI_ISL_8005399	EPI_ISL_8005422	EPI_ISL_8005590
EPI_ISL_8005353	EPI_ISL_8005025	EPI_ISL_8005571	EPI_ISL_8005586	EPI_ISL_8005605
EPI_ISL_8005002	EPI_ISL_8005377	EPI_ISL_8005400	EPI_ISL_8005423	EPI_ISL_8005117

---

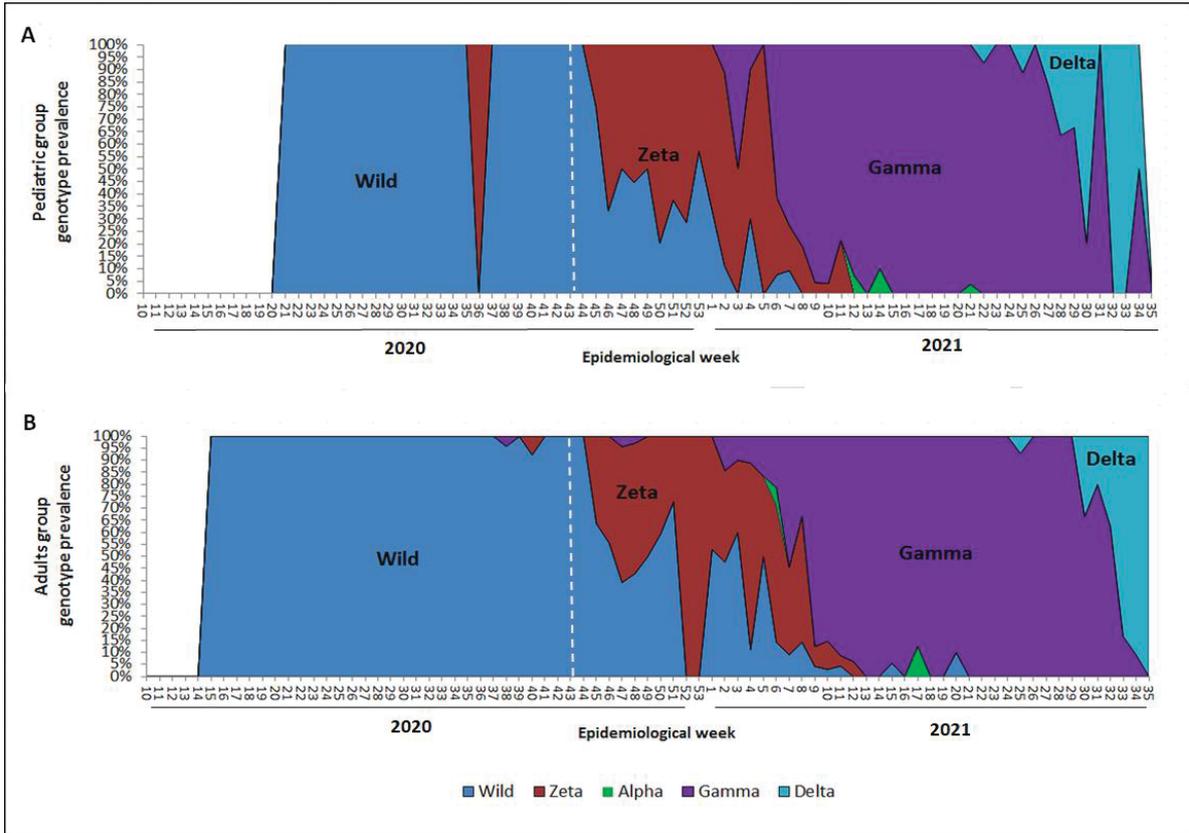
---

EPI_ISL_8005354	EPI_ISL_8005598	EPI_ISL_8005615	EPI_ISL_8005543	EPI_ISL_8005118
EPI_ISL_8005355	EPI_ISL_8005378	EPI_ISL_8005402	EPI_ISL_8005544	EPI_ISL_8005119
EPI_ISL_8005619	EPI_ISL_8005133	EPI_ISL_8005149	EPI_ISL_8005466	EPI_ISL_8005191
EPI_ISL_8005432	EPI_ISL_8005134	EPI_ISL_8005460	EPI_ISL_8005078	EPI_ISL_8005192
EPI_ISL_8005433	EPI_ISL_8005448	EPI_ISL_8005077	EPI_ISL_8004986	EPI_ISL_8005193
EPI_ISL_8005617	EPI_ISL_8005061	EPI_ISL_8005461	EPI_ISL_8005171	EPI_ISL_8004991
EPI_ISL_8005575	EPI_ISL_8005135	EPI_ISL_8005150	EPI_ISL_8005172	EPI_ISL_8005610
EPI_ISL_8005434	EPI_ISL_8005136	EPI_ISL_8005151	EPI_ISL_8005038	EPI_ISL_8005633
EPI_ISL_8005435	EPI_ISL_8005137	EPI_ISL_8005152	EPI_ISL_8005173	EPI_ISL_8005476
EPI_ISL_8005436	EPI_ISL_8005138	EPI_ISL_8005153	EPI_ISL_8005174	EPI_ISL_8005477
EPI_ISL_8005010	EPI_ISL_8005139	EPI_ISL_8005154	EPI_ISL_8005175	EPI_ISL_8005018
EPI_ISL_8005076	EPI_ISL_8004979	EPI_ISL_8005462	EPI_ISL_8005100	EPI_ISL_8005064
EPI_ISL_8005055	EPI_ISL_8005140	EPI_ISL_8005155	EPI_ISL_8005176	EPI_ISL_8005622
EPI_ISL_8005437	EPI_ISL_8005141	EPI_ISL_8005156	EPI_ISL_8005554	EPI_ISL_8005194
EPI_ISL_8005056	EPI_ISL_8005142	EPI_ISL_8005098	EPI_ISL_8005177	EPI_ISL_8005195
EPI_ISL_8005030	EPI_ISL_8005449	EPI_ISL_8005062	EPI_ISL_8005178	EPI_ISL_8005196
EPI_ISL_8005031	EPI_ISL_8005450	EPI_ISL_8005099	EPI_ISL_8004987	EPI_ISL_8005202
EPI_ISL_8005549	EPI_ISL_8005451	EPI_ISL_8005157	EPI_ISL_8004973	EPI_ISL_8005478
EPI_ISL_8005057	EPI_ISL_8005630	EPI_ISL_8005158	EPI_ISL_8005086	EPI_ISL_8005479
EPI_ISL_8005602	EPI_ISL_8005631	EPI_ISL_8005621	EPI_ISL_8005179	EPI_ISL_8005197
EPI_ISL_8005121	EPI_ISL_8005452	EPI_ISL_8005576	EPI_ISL_8005180	EPI_ISL_8005198
EPI_ISL_8005032	EPI_ISL_8005143	EPI_ISL_8005463	EPI_ISL_8005181	EPI_ISL_8005199
EPI_ISL_8005122	EPI_ISL_8004980	EPI_ISL_8004983	EPI_ISL_8004990	EPI_ISL_8005200
EPI_ISL_8005123	EPI_ISL_8005144	EPI_ISL_8004984	EPI_ISL_8005017	EPI_ISL_8005201
EPI_ISL_8005124	EPI_ISL_8004981	EPI_ISL_8005084	EPI_ISL_8005467	EPI_ISL_8005065
EPI_ISL_8005095	EPI_ISL_8005145	EPI_ISL_8005063	EPI_ISL_8005468	EPI_ISL_8005585
EPI_ISL_8005125	EPI_ISL_8005146	EPI_ISL_8005159	EPI_ISL_8005469	EPI_ISL_8005203
EPI_ISL_8005438	EPI_ISL_8005013	EPI_ISL_8005160	EPI_ISL_8005470	EPI_ISL_8005019
EPI_ISL_8005439	EPI_ISL_8005453	EPI_ISL_8005161	EPI_ISL_8005471	EPI_ISL_8005480
EPI_ISL_8005440	EPI_ISL_8005454	EPI_ISL_8004975	EPI_ISL_8005632	EPI_ISL_8005481
EPI_ISL_8005441	EPI_ISL_8005047	EPI_ISL_8005553	EPI_ISL_8004988	EPI_ISL_8005204
EPI_ISL_8005442	EPI_ISL_8005012	EPI_ISL_8005162	EPI_ISL_8005182	EPI_ISL_8005205
EPI_ISL_8005550	EPI_ISL_8005455	EPI_ISL_8005163	EPI_ISL_8004989	EPI_ISL_8005206
EPI_ISL_8005011	EPI_ISL_8005014	EPI_ISL_8005464	EPI_ISL_8005033	EPI_ISL_8004976
EPI_ISL_8005447	EPI_ISL_8005456	EPI_ISL_8005105	EPI_ISL_8005183	EPI_ISL_8005207
EPI_ISL_8005126	EPI_ISL_8005147	EPI_ISL_8005465	EPI_ISL_8005184	EPI_ISL_8005623
EPI_ISL_8005127	EPI_ISL_8005620	EPI_ISL_8005089	EPI_ISL_8005609	EPI_ISL_8005020
EPI_ISL_8005096	EPI_ISL_8005148	EPI_ISL_8005164	EPI_ISL_8005185	EPI_ISL_8005189
EPI_ISL_8005097	EPI_ISL_8004982	EPI_ISL_8005165	EPI_ISL_8005186	EPI_ISL_8005190
EPI_ISL_8005128	EPI_ISL_8005591	EPI_ISL_8005166	EPI_ISL_8005472	EPI_ISL_8005170
EPI_ISL_8005129	EPI_ISL_8005457	EPI_ISL_8005167	EPI_ISL_8005473	EPI_ISL_8005091
EPI_ISL_8005606	EPI_ISL_8005458	EPI_ISL_8005168	EPI_ISL_8005474	EPI_ISL_8005459
EPI_ISL_8005130	EPI_ISL_8005015	EPI_ISL_8005608	EPI_ISL_8005475	EPI_ISL_8005016
EPI_ISL_8005131	EPI_ISL_8005037	EPI_ISL_8005169	EPI_ISL_8005187	EPI_ISL_8005607
EPI_ISL_8005132	EPI_ISL_8005088	EPI_ISL_8004985	EPI_ISL_8005188	

---



**Figure 1** - Distribution of COVID-19 cases and deaths between EW 10/20 and 35/21. A) Distribution of COVID-19 cases in children, adults (primary axis), and Curitiba city (secondary axis). B) Distribution of COVID-19 deaths in children, adults (primary axis), and Curitiba city (secondary axis). 1<sup>st</sup> pandemic wave - lighter gray quadrant; 2<sup>nd</sup> pandemic wave – darker gray quadrant.



**Figure 2 - SARS-CoV-2 variants prevalence.** A) pediatric group; B) adult group. The dotted line indicates the beginning of 2<sup>nd</sup> pandemic wave.

6.2 ARTIGO 2 - COVID-19 EM PACIENTES ADULTOS E PEDIÁTRICOS -  
UM ESTUDO TRANSVERSAL RETROSPECTIVO MULTICÊNTRICO NO SUL  
DO BRASIL.

**COVID-19 IN PEDIATRIC AND ADULT INPATIENTS - A RETROSPECTIVE  
MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY IN SOUTHERN BRAZIL.**

Lapinski BA<sup>1</sup>, Pereira LA<sup>2</sup>, De Almeida SM<sup>3</sup>, Rotta I<sup>2</sup>, Giamberardino HIG<sup>4</sup>, Krys P<sup>4</sup>,  
Dourado RM<sup>4</sup>, Resende PC<sup>5</sup>, Siqueira MM<sup>5</sup>, Debur MC<sup>6</sup>, Adamoski D<sup>7</sup>, de Oliveira JC<sup>7</sup>,  
Bonatto AC<sup>7</sup>, Wassem R<sup>7</sup>, da Silva Trindade E<sup>8</sup>, de Souza EM<sup>9</sup>, Gradia, DF<sup>7</sup>, Petterle RR<sup>10</sup>  
Benthien PHB<sup>11</sup>, Nogueira MB<sup>3</sup>, Domino NR<sup>14</sup>, Noronha L<sup>12</sup>, de Souza CM<sup>13</sup>, Genelhoud G<sup>3</sup>,  
da Costa ECS<sup>11</sup>, Yamaguto GE<sup>11</sup>, Zhen F<sup>11</sup>, Tresoldi-Neto J<sup>11</sup>, Tassinari ER<sup>11</sup>, da Silva BG<sup>2</sup>,  
SCB-UFPR COVID-19 team, Raboni, SM.<sup>14\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Internal Medicine and Health Science, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil

<sup>3</sup>Adjunct Professor III of the Department of Medical Pathology of University of Paraná, Brazil

<sup>4</sup>Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Paraná, Brazil.

<sup>5</sup>National Respiratory Viruses Surveillance Laboratório de vírus respiratórios - IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>6</sup>Public Health Laboratory, Paraná, Brazil.

<sup>7</sup>Sector of Biological Science, Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>8</sup>Sector of Biological Science, Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>9</sup>Sector of Biological Science, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>10</sup> Sector of Health Sciences, Department of Statistic, Universidade Federal do Paraná, Brazil

<sup>11</sup>Sector of Health Sciences, Medical School, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

<sup>12</sup>Postgraduated Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brazil.

<sup>13</sup>Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Brazil.

<sup>14</sup>Infectious Diseases Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

SCB-UFPR COVID-19 team: Altina Bruna de Souza Barbosa, Beatriz Bocatte de Mattos, Bruna da Silva Soley, Carla Adriane Royer, Cibele Batina Rabelo, Cristina Kaehler, Diego Candido de Abreu, Guilherme Antonio Vendramin, Helyn Priscila de Oliveira Barddal, Letícia Dalla Vechia Henschel, Madson Silveira de Melo, Nathalie Carla Cardoso, and Rachel dos Santos de Sena de Vasconcelos.

\*Corresponding author:

Sonia Mara Raboni.

Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná

Rua Padre Camargo, nº 280, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Zip Code 82060-240 –

Brasil. E-mail: [sraboni@ufpr.br](mailto:sraboni@ufpr.br)

## ABSTRACT

The clinical course of COVID-19 varies according to virus and host factors. This study aimed to outline the clinical profile of adults and pediatric COVID-19 inpatients to identify risk factors related to ICU admission and death. For a retrospective cross-sectional study, virus genotyping and a review of medical records were performed in convenience samples collected from Mar/2020 to Aug/2021 from two tertiary hospitals. Kaplan-meier analyses showed 30-day survival was 97.6% in children, 48.3% in patients between 17-65y, and 32.8% in those older than 65y. Multivariate analysis showed Gamma variant was associated with caucasian infection (aOR= 4.17; 95%CI= 1.59-10.94; p=0.004), having at least one risk factor (aOR= 1.97; 95%CI= 1.05-3.67; p=0.001), and invasive ventilatory support (aOR= 2.51; 95%CI= 1.07-5.88; p=0.035). Increasing age was identified as a risk for ICU admission in pediatric patients (aOR= 1.34; 95% CI= 1.03-1.73; p=0.028). In adults, the risk factors were afro-descendant (aOR= 2.547; 95%CI 1.35-4.80; p=0.004) and obesity (aOR= 2.26; 95%CI= 1.31-3.93; p=0.004) patients. Risk factors for death in adults were increased age (aOR= 1.04; 95%CI= 1.03-1.06; p<0.0001), liver disease (aOR= 2.95; 95% CI= 1.07-8.11; p=0.036), patients with cancer (aOR= 3.31; 95%CI= 1.17-9.37; p=0.024), obesity (aOR= 2.20; 95%CI= 1.12-4.32; p=0.022) and ICU admission (aOR= 8.45; 95%CI= 4.86-14.70; p<0.0001). ROC curve shows procalcitonin, D-dimer, creatinine, and LDH are potential biomarkers of ICU admission (AUC = 0.721, 0.699, 0.690, 0.680 respectively) (p<0.0001) and death (AUC= 0.768, 0.701, 0.700, and 0.694 respectively) (p<0.0001) in adult inpatients. The COVID-19 clinical-epidemiological profile can be modulated by host, virus, and environmental risk factors. So, identifying the risk factors associated with worse outcomes is essential for proposing more assertive and equitable health policies to mitigate the burden of the COVID-19 pandemic on the population.

Key-words: COVID-19, risk factor, poor outcome, ICU, children, SARS-COV-2 variant, adult.

## BACKGROUND

The burden of the SARS-CoV-2 pandemic on human health, economic and social aspects is unprecedented. Since its inception, the elderly and patients with comorbidities have been its main targets. Its rapid spread, accompanied by misinformation and weak government policies for its control, has led Brazil to a considerable number of infected people and one of the highest fatality rates in the world. In its initial phase the infection in children did not stand out importantly, who were more protected due to the closure of schools. Because they had lower infection rates and less severity, vaccine studies did not prioritize the pediatric population.<sup>1</sup>

Due to the severity of the pandemic, the need to better understand the disease and patient management has become a challenge and numerous studies emerged resulting in the development of vaccines in record time.<sup>2</sup>

In adults, several host factors, including advanced age, male sex, pregnant woman, and comorbidities such as cardiovascular disease, chronic lung disease, diabetes, hypertension, obesity, cancer, and acute renal failure, have been associated with worse outcomes.<sup>3-6</sup>

However, in pediatric patients those outcomes have been associated with chronic lung disease, neurologic disorders cardiovascular disease, prematurity, and airway abnormality, diabetes mellitus, and obesity.<sup>7</sup>

Regional differences in the vaccination coverage rate lead to constant mutations and the emergence of new viral variants, factors that threaten the control of the pandemic due to immune escape, changes in transmissibility, infectivity, pathogenesis, virulence, viral fitness, therapeutic and vaccine response.<sup>8</sup>

In addition to the difference in vaccination coverage, physiological differences imply a difference in the clinical, epidemiological and biomarker profile of COVID-19 in adults and children.<sup>9</sup>

The incidence and fatality rates in pediatric population have been lower than adults in several countries, ranging from 1% to 3% of confirmed cases of COVID-19.<sup>10</sup> In addition, studies conducted with children and adolescents have shown that COVID-19 can mainly cause mild to moderate infections. The hypotheses for these findings are related to physiological differences that children presented in relation adults that protect them from the immunopathogenic mechanism of SARS-CoV-2 and from multisystemic complications.<sup>11,12</sup>

The return to face-to-face activities in schools and the reopening of day care centers were carried out without the impact of this emerging pathogen on children's health being known. Thus, the objective of this study was to compare the clinical and epidemiological profile of the inpatients at reference pediatric hospital with adult inpatients at a tertiary reference hospital for patients with COVID-19 between March 2020 and August 2022.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

A retrospective cross-sectional study with convenience sampling was carried as previous described.<sup>13</sup>

### **Samples**

The study was carried out with nasopharyngeal swabs collected for SARS-CoV-2 diagnostic testing from inpatients of tertiary health center Complexo Hospital de Clínicas- UFPR (CHC-UFPR) and Hospital Infantil Pequeno Príncipe (HIPP) - a pediatric hospital. The inclusion criteria were COVID-19 inpatients with RT-qPCR confirmation. Exclusion criteria were patients with a Cq >35 or whose samples were not stored, contained insufficient volume for the assays, or sequential positive samples from patients within 6 months of SARS-CoV-2 infection. From 2,953 patients with SARS-CoV-2 RT-qPCR positive, 1,878 (64%) had Cq ≤

35. From these, 673 (36%) were hospitalized, and 652 (97%) were included in the study. Clinical, epidemiological and laboratory data were obtained from medical records reviews.

### **Medical care centers**

Both hospitals were reference services for COVID-19 care in Curitiba, Paraná state. HIPP participates in The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN), is a pediatric hospital with 384 beds of which 34 were exclusive to COVID-19. CHC-UFPR participates in the national surveillance network for severe acute respiratory infection (SARI), with non-pediatric majority care that has 653 beds, of which 193 were exclusive for COVID-19.

### **Definition**

Adults are patients over 18 years old. The immunosuppressed refers to HIV+ patients, hematological neoplasms, and the use of systemic corticosteroids. As risk factors for severe COVID-19, age over 65 years, pregnancy, and comorbidities (including obesity) were considered. The primary outcome was a variant infection. Secondary outcomes were age group, intensive care unit (ICU) admission, and death. ICU admission and death are considered indicators of disease severity. Predictors are distinct in three major categories: epidemiological (age, gender, ethnicity, comorbidities, time of symptom onset hospitalization), clinical (length of hospitalization stay, mechanical ventilatory support, length of ICU stay), and laboratory (lymphocytes, creatinine, lactate dehydrogenase (LDH), ferritin, C-reactive protein (CRP), procalcitonin, D-dimer). Potential confounders are the difference in virus exposure between adult and pediatric patients, the difficulty in accessing adult beds pandemic's peaks due to the collapse of public health services, the physiological difference between the adult and pediatric groups and the difference in immunization rate. Modifying effects are the difference between NGS and RT-qPCR genotyping sensitivity, the time between symptom onset and admission to a tertiary hospital, vaccine introduction,

proposition, and frequent improvement of mitigation strategies and clinical management protocols. The wild group is formed by the genotypes B.1.1, B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.332, and B.1.382.<sup>14</sup> Other variants are B.1.177.2, P.7, and N.9.

### **Virus genotyping**

The SARS-CoV-2 genotyping was conducted as previous described.<sup>13</sup>

### **Data analysis**

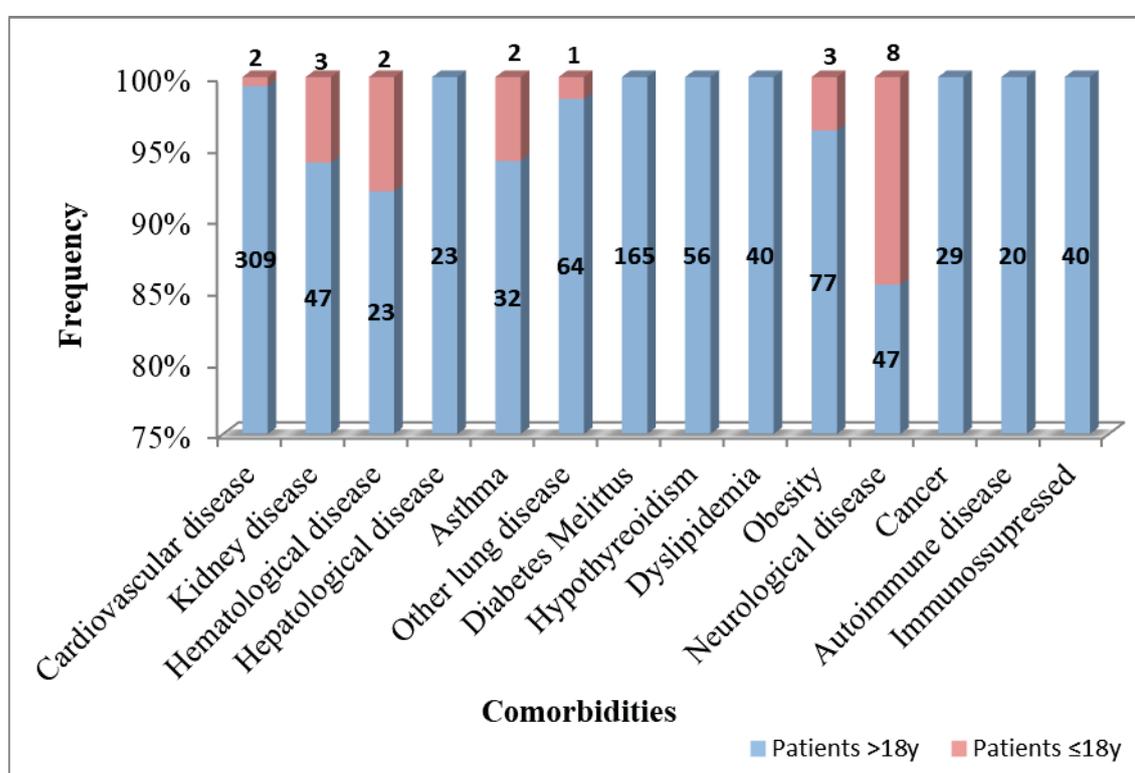
Statistical analyses were performed using R version 4.2.1. The univariate analysis was performed using Fisher's exact and chi-square tests for categorical variables, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis rank sum tests with Tukey's multiple post hoc comparisons for continuous variables, as appropriate. Survival analyzes of hospitalized patients and patients admitted to the ICU were performed by Kaplan-Meier. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to determine the cutoff value associated with ICU admission and death outcomes. The Youden index (J) was defined for all points in the ROC curve; the maximum value of the index was used as a criterion to select the optimal cutoff point of a diagnostic test. Multivariate logistic regression analysis was performed to assess independent variants related to outcomes. Adjusted OR (aOR) was calculated using the multivariate model with a stepwise selection of variables, with a cutoff point of  $p < 0.2$ . Pearson and residual deviance analyses were performed to test the fit model. All statistical tests were two-sided, with significance set at  $p < 0.05$ . A confidence interval (CI) of 95% was used to adjust the estimates.

## **RESULTS**

The study included 652 patients, 45 pediatric patients and 607 adults. Overall, in this group, there was a 55% ICU admission rate ( $n=361/652$ ), a 36% mortality rate ( $n=237/652$ ), a 52%

need for invasive mechanical ventilatory support ( $n = 338/652$ ), 48% of patients had at least two risk factors ( $n=313/652$ ) and 41% had at least one comorbidity ( $n=264/652$ ) (Supplementary Table 1).

A total of 264 patients had an underlying disease. The group younger than 18 years had more patients with at least one underlying disease ( $n=21/45$ ; 47%) than those older than 18 years ( $n=240/607$ ; 40%) ( $p<0.0001$ ), being neurologic diseases the most frequent (38%). Cardiac diseases ( $n=309/972$ ; 32%) were the most frequent in the population over 18 years old, followed by diabetes mellitus ( $n=165/972$ ; 17%) (Figure 1).



**FIGURE 1.** Cases of underlying diseases according to group age

In adults, desaturation and dyspnea were the most frequent symptoms ( $n=495/531$  93% and  $n=454/531$  85% respectively), while fatigue, anosmia and dys/ageusia were the least frequent. With the exception of dyspnea, children do not have the symptoms related to disease severity, the most frequent being fever and odynophagia ( $n=15/44$  33% and  $13/44$  29% respectively).

Dyspnea ( $p<0.0001$ ), cough ( $p<0.0001$ ) were more frequent in adults than children while odynophagia was more frequent in those ( $p<0.0001$ ). (Supplementary Table 2.).

From 652 samples included in study, 575 (88%) were genotyped, 45 (8%) were pediatrics, and 530 (92%) were adults. There was identified 306 wild, 63 Zeta, 202 Gamma, 2 Alpha, 1 Delta, and 1 P.7. Seventy-three genotypes were inconclusive. No significant difference was observed between both groups and virus variant distribution.

The analysis of the clinical, epidemiological, and laboratory profile of infected patients according to the viral variants showed that patients infected with Gamma were mostly Caucasian ( $p=0.007$ ), required more invasive mechanical ventilatory support ( $p=0.017$ ), and had higher serum levels of CRP (0.034) than those by wild-type and Zeta (Table1).

**Table 1. Demographic, epidemiological, clinical data, and serum biomarkers of the participants by SARS-CoV 2 genotype.**

	Wild n=306	Zeta n=63	Gamma n=202	<i>p</i> <sup>1</sup>
<b>Medical care n(%)</b>				
HIPP	23 (8)	8 (13)	13 (6)	0.262
CHC-UFPR	283 (92)	55 (87)	189 (94)	
<b>1<sup>st</sup> pandemic wave n(%)</b>	248 (81)	18 (63)	0	-
<b>Median age, year (IQR)</b>	58 (45;70)	60 (46;49)	58 (41;71)	0.915
<b>Male n(%)</b>	131 (43)	29 (46)	90 (45)	0.862
<b>Ethnicity n(%)</b>				
Caucasian	260 (85)	51 (81)	191 (95)	<b>0.007</b>
Afro-descendant	37 (12)	9 (14)	9 (4)	
<b>Risk factor n(%)</b>				
No	71 (23)	20 (31)	43 (21)	0.061
Yes – 1 factor	77 (25)	18 (29)	71 (35)	
Yes >2 factors	158 (52)	25 (40)	88 (44)	
<b>Median time of onset symptoms until hospitalization, days (IQR)</b>	5 (3;8)	4 (1;9)	11 (6;23)	0.085
<b>Ventilatory support n(%)</b>				
No	41 (13)	11 (18)	24 (12)	<b>0.017</b>
Yes – non-invasive	52 (17)	5 (8)	16 (8)	
Yes – invasive	213 (70)	47 (74)	162 (80)	
<b>ICU n(%)</b>	182 (60)	33 (52)	108 (54)	0.317
<b>Median length of stay, days (IQR)</b>	11 (6;21)	13 (5;24)	11 (6;23)	0.706
<b>Median length of ICU, days (IQR)</b>	9 (4;19)	11 (4;20)	7 (3;18)	0.621
<b>Death n(%)</b>	116 (38)	24 (38)	76 (38)	0.997

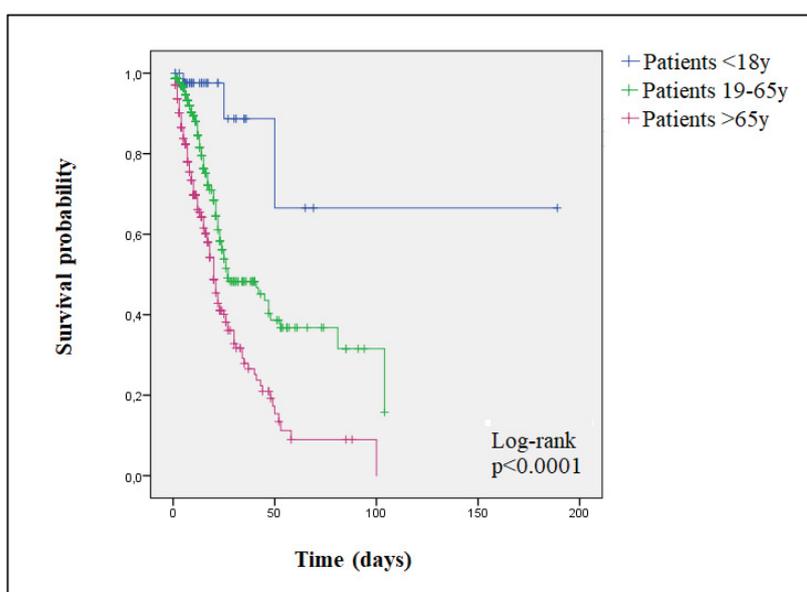
<b>Lymphocytes, cell/mm<sup>3</sup></b>	833.0 (472;1223)	678 (376;1002)	808 (457;1212)	0.074
<b>Creatinine, mg/dL</b>	1.0 (0.7;1.3)	1.1 (0.8;2.1)	1.0 (0.8;1.7)	0.199
<b>LDH, U/L</b>	377 (248;493)	357 (237;569)	414 (284;615)	0.213
<b>Ferritin, ng/mL</b>	1003 (352;2043)	1241 (701;2690)	1218 (317;2311)	0.192
<b>CRP, mg/dL</b>	9 (4;15)	8 (4;14)	10 (5;16)	<b>0.034</b>
<b>PCT, ng/mL</b>	0.4 (0.1;1.1)	0.7 (0.2;2.2)	0.3 (0.1;1.2)	0.255
<b>D-dimer, ng/mL</b>	1.5 (0.6;3.3)	2.5 (0.9;5.1)	1.5 (0.7;3.5)	0.154

In bold - statistically significant values. ICU, intensive care unit; LDH – lactate dehydrogenase; CRP – C reactive protein; PCT pro-calcitonin.

<sup>1</sup>p, Kruskal Wallis nonparametric test or chi-squared test, as appropriate

Multivariate analysis showed that Gamma infection is positively associated with Caucasian subjects (aOR= 4.17; 95% CI= 1.59-10.94; p=0.004), having a risk factor (aOR= 1.97; 95%CI= 1.05-3.67; p=0.001) and requiring invasive ventilatory support (aOR= 2.51; 95%CI= 1.07-5.88; p=0.035) when compared with wild-type infection.

Survival analysis of all hospitalized and ICU patients according to the wild, Zeta, and Gamma variants showed no statistical difference. However, inpatients' 30-day survival was 97.6% in those younger than 18 years, 48.3% between 17-65y, and 32.8% in those older than 65y (Figure 2). The survival probability in patients admitted to the ICU presented the same pattern found in all hospitalized patients (Supplementary material Fig 1).



**Figure 2.** Inpatients survival curve by Kaplan-Meier. Blue - patients <18Y; green - patients between 19-65y; pink – patients >65y.

The ICU admission rates were 31% and 57% in children and adults, respectively. Clinical, epidemiological, and laboratory profile characterization according to age showed adults have a higher time of onset symptoms until hospitalization ( $p < 0.0001$ ), more female infections ( $p = 0.029$ ), presented more risk factors ( $p < 0.0001$ ), ICU admission ( $p = 0.001$ ), invasive mechanical ventilatory support ( $p < 0.0001$ ), death ( $p < 0.0001$ ), and less Zeta infections ( $p < 0.0001$ ) than pediatrics group. In addition, adults presented serum levels of LDH ( $p < 0.0001$ ) and D-dimer ( $p < 0.0001$ ) increased, and lymphocyte median count presented normal values. At the same time, both biomarkers showed typical values and lymphopenia more frequently in pediatric patients ( $p < 0.0001$ ). Patients under 18 years old infected with Gamma had longer length of hospital and ICU stay ( $p = 0.028$  and  $p < 0.0001$ , respectively) than those infected with other variants. Adults had high serum level of C reactive protein (CRP) in Gamma infections ( $p = 0.021$ ) in relation to other variants (Table 2).

Table 2. Demographic, epidemiological, clinical data, and serum biomarkers of the participants classified by age and SARS-CoV2 genotypes

	Patients ≤ 18y				Patients > 18y				p <sup>1</sup>	f vs.g vs.h	p <sup>2</sup>
	<sup>a</sup> Total	<sup>b</sup> Wild-type	<sup>c</sup> Gamma	<sup>d</sup> Zeta	<sup>e</sup> Total	<sup>f</sup> Wild-type	<sup>g</sup> Gamma	<sup>h</sup> Zeta			
N	44	23	13	8	527	283	189	55	<0.0001	<0.0001	
1 <sup>st</sup> Pandemic wave n(%)	20 (45)	20 (87)	0 (0)	0 (0)	245 (40)	171 (60)	34 (18)	18 (33)	<0.0001	<0.0001	0.638
Median age, year (IQR)	6 (1; 13)	3 (1; 9)	10 (2; 14)	2 (1; 12)	60 (47; 71)	60 (49; 71)	60 (44; 72)	62 (52; 70)	0.666	0.666	-
Male n(%)	32 (71)	16 (70)	11 (85)	5 (63)	328 (54)	159 (56)	101 (53)	29 (53)	0.796	0.796	<b>0.029</b>
Ethnicity n(%)											
Caucasian	45 (100)	23 (100)	13 (100)	8 (100)	537 (90)	237 (86)	178 (95)	43 (83)	-	-	0.083
Afro-descendant	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	57 (10)	37 (14)	9 (5)	9 (17)			
Risk factors n(%)											<0.0001
No	24 (53)	12 (52)	5 (62)	4 (31)	133 (22)	59 (21)	15 (27)	39 (21)	0.142	0.142	
Yes - 1 factor	21 (47)	10 (44)	2 (25)	9 (69)	163 (27)	67 (24)	16 (29)	62 (33)			
Yes - ≥ 2 factors	2 (4)	1 (4)	1 (13)	0	311 (51)	157 (55)	24 (44)	88 (47)			
Median time of onset symptoms until hospitalization, days (IQR)	2.0 (1.0; 3.0)	1.0 (1.0; 2.0)	3.0 (1.0; 4.5)	1.5 (1.0; 2.8)	6.0 (3.0; 9.0)	6.0 (3.0; 8.0)	6.0 (3.0; 10.0)	4.0 (2.0; 9.2)	0.253	0.253	<0.0001
Ventilatory support n(%)											
No	29 (64)	14 (61)	8 (62)	7 (88)	55 (9)	27 (10)	16 (9)	4 (7)	0.617	0.617	<0.0001
Yes - non-invasive	10 (22)	5 (22)	3 (23)	1 (12)	221 (36)	91 (32)	74 (40)	20 (36)			
Yes - invasive	6 (13)	4 (17)	2 (15)	0 (0)	332 (55)	165 (58)	99 (53)	31 (56)			
ICU n(%)	14 (31)	11 (48)	3 (23)	0 (0)	347 (57)	171 (60)	104 (55)	33 (60)	0.492	0.492	<b>0.001</b>
Median length of hospital stay, days (IQR)	9.0 (5.5; 23.5)	13.0 (6.0; 35.0)	15.0 (6.0; 23.5)	5.5 (1.5; 8.5)	11.0 (5.0; 21.0)	11.0 (5.0; 20.0)	11.0 (5.5; 23.0)	15.0 (6.0; 26.0)	0.158	0.158	0.956
Median length of ICU stay, days (IQR)	11.5 (1.8; 22.8)	8.0 (1.0; 17.0)	22.0 (5.0; 25.0)	-	9.0 (4.0; 19.0)	10.0 (5.0; 19.0)	7.0 (3.0; 18.0)	11.0 (4.0; 19.5)	0.417	0.417	-
Death n(%)	3 (7)	2 (9)	1 (8)	0 (0)	234 (38)	114 (40)	75 (40)	24 (44)	0.869	0.869	<0.0001
Lymphocytes, cell/mm <sup>3</sup>	285 (180; 550)	280 (135; 555)	325 (160; 545)	350 (168; 578)	852 (511; 1257)	890 (576; 1260)	834 (508; 1290)	742 (508; 1111)	0.249	0.249	<0.0001

	0.3 (0.2; 0.5)	0.2 (0.2; 0.3)	0.5 (0.4; 4.6)	0.3 (0.2; 0.6)	<b>0.027</b>	1.0 (0.8; 1.5)	0.8 (0.8; 1.4)	1.0 (0.8; 1.6)	1.3 (0.8; 2.3)	0.085	<0.0001
<b>Creatinine, mg/dL</b>											
<b>LDH, U/L</b>	130 (100; 220)	200 (90; 440)	120 (100; 170)	130 (90; 200)	0.558	399 (284; 543)	385 (267; 494)	427 (293; 629)	416 (301; 624)	0.060	<0.0001
<b>Ferritin, ng/mL</b>	105 (42; 198)	-	105 (42; 198)	-	-	1128 (394; 2309)	973 (348; 2134)	1256 (369; 2451)	1241 (618; 3117)	0.131	-
<b>CRP, mg/dL</b>	11 (3; 19)	11 (4; 39)	10 (4; 18)	6 (3; 16)	0.521	10 (4; 16)	9 (3; 15)	10 (5; 16)	8 (3; 14)	0.021	0.127
<b>PCT, ng/mL</b>	-	-	-	-	-	0.3 (0.1; 1.2)	0.4 (0.1; 1.1)	0.3 (0.1; 1.2)	0.7 (0.2; 2.5)	0.289	-
<b>D-dimer, ng/mL</b>	0.4 (0.2; 0.7)	0.5 (0.3; 2.7)	0.4 (0.2; 1.0)	0.3 (0.1; 0.4)	0.156	1.5 (0.7; 3.5)	1.4 (0.6; 2.9)	1.4 (0.7; 3.5)	2.0 (0.8; 7.7)	0.153	<0.0001

In bold: statistical significant values. ICU, intensive care unit; VoC, Variant of concern. LDH – lactate dehydrogenase. CRP – C reactive protein. PCT pro-calcitonin.

<sup>1</sup>p, Kruskal Wallis nonparametric test. ICU, intensive care unit; VoC, Variant of concern. LDH – lactate dehydrogenase. CRP – C reactive protein. PCT pro-calcitonin.

<sup>2</sup>p, Mann-Whitney nonparametric test or chi-squared test, as appropriate

\* value calculated without column without data

### ICU admission and clinical, epidemiological, and molecular profile

The fatality rate was 21% in pediatric and 58% adult patients, respectively. Infections in the first wave ( $p < 0.0001$ ) and longer length of stay ( $p < 0.0001$ ) were associated with pediatric patients requiring ICU compared to those who do not. Concerning adults, a high frequency of cases in the first wave ( $p = 0.030$ ), extended length of stay ( $p < 0.0001$ ), increased age ( $p = 0.017$ ), presence of risk factors ( $p = 0.009$ ), and high fatality rate ( $p < 0.0001$ ) were associated with ICU admission (Table 3).

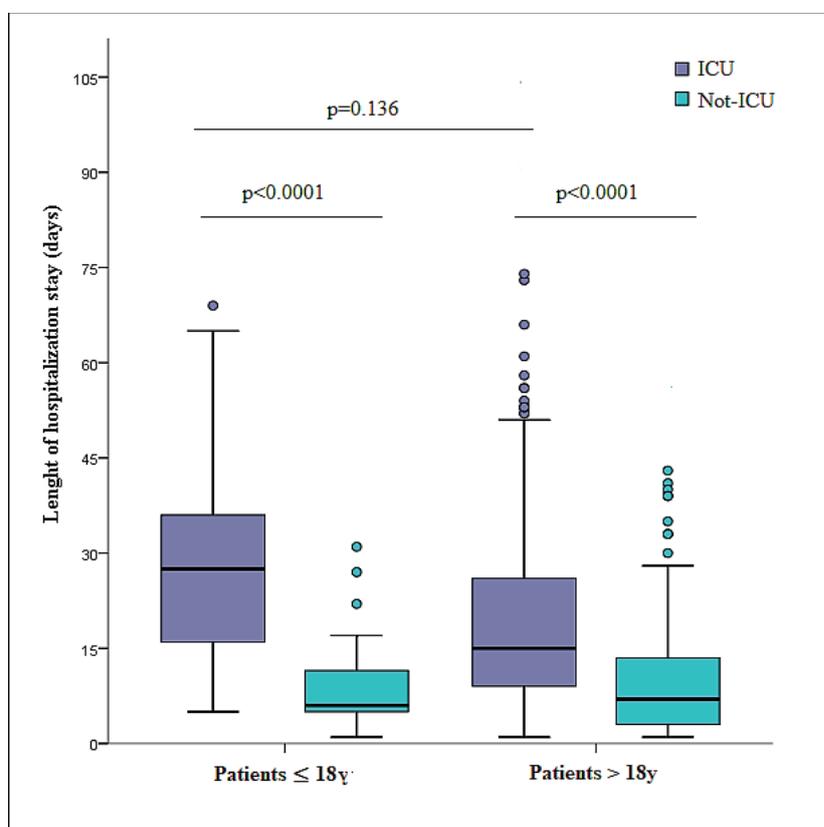
**Table 3. Demographic and SARS-CoV-2 epidemiological data of participants admitted to the ICU compared with the ones not admitted**

	Patients $\leq 18$ y			Patients $> 18$		
	ICU n=14	Not ICU n=31	$P^1$	ICU n=347	Not ICU n=261	$P^1$
<b>1<sup>st</sup> Pandemic wave, n(%)</b>	11 (79)	9 (29)	<b>0.003</b>	153 (44)	92 (35)	<b>0.030</b>
<b>Median Age, year (IQR)</b>	10 (5; 13)	3 (1; 9)	0.062	63 (48; 72)	58 (46; 69)	<b>0.017</b>
<b>Male n(%)</b>	11 (79)	21 (68)	0.724	196 (56)	132 (51)	0.163
<b>Ethnicity n(%)</b>						
Caucasian	14 (100)	31 (10)		295 (87)	242 (95)	<b>0.011</b>
Afro descendant	0	0		43 (13)	1 (<1)	
<b>VoC n(%)</b>	3 (21)	10 (33)	0.498	106 (34)	86 (39)	0.271
<b>SARS-CoV-2 variants n(%)</b>			<b>0.032</b>			0.492
Wild	11 (79)	12 (40)		171 (56)	112 (50)	
Gamma	3 (21)	10 (33)		104 (34)	85 (38)	
Zeta	0	8 (27)		33 (11)	22 (10)	
<b>Risk factors n(%)</b>			0.566			<b>0.009</b>
No	5 (36)	16 (52)		61 (18)	72 (28)	
Yes -1 factor	8 (58)	14 (45)		96 (28)	67 (26)	
Yes $\geq 2$ factors	1 (7)	1 (3)		191 (55)	120 (46)	
<b>Median time of onset symptoms until hospitalization, days (IQR)</b>	1.5 (1.0; 3.0)	2. (1.0; 3.0)	0.946	6.0 (3.0; 9.0)	6.5 (3.8; 10.0)	<b>0.024</b>
<b>Ventilatory support n(%)</b>			<b>0.004</b>			<b>&lt;0.0001</b>
No	5 (36)	24 (77)		3 (<1)	52 (20)	
Yes – non-invasive	3 (21)	7 (23)		15 (4)	206 (79)	
Yes – invasive	6 (43)	0		329 (95)	3 (1)	
<b>Median length of stay, days (IQR)</b>	27 (16; 40)	6 (5; 13)	<b>&lt;0.0001</b>	15 (9; 26)	7 (3; 14)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Death n(%)</b>	3 (21)	0	-	201 (58)	33 (13)	<b>&lt;0.0001</b>

In bold: statistical significant values. ICU, intensive care unit; VoC, Variant of concern

<sup>1</sup>p, Mann-Whitney nonparametric test or chi-squared test, as appropriate

Figure 3 shows that the length of hospital stay is significantly longer in pediatrics and adults patients admitted in ICU than those were not ( $p < 0.0001$ ). Still, no significant difference was observed between these two groups.



**Figure 3.** Length of hospitalization of patients under and over 18 years old according to the need for ICU admission.

### Poor outcome and clinical, epidemiological, and molecular profile

No factor associated with death was found in patients younger than 18 years old. However, those over 18 years old have at least two risk factors ( $p < 0.0001$ ), age ( $p < 0.0001$ ), the length between the onset of symptoms and hospitalization, and length of hospitalization ( $p = 0.025$ ) had a positive association with those who died compared to those who were discharged (Table 4).

**Table 4. Demographic and SARS-CoV-2 epidemiological data in the participants according to the outcome: Death or Discharge**

	Patients ≤18			Patients >18		
	Death n=3	Discharge n=42	<i>p</i> <sup>1</sup>	Death n=234	Discharge n=374	<i>p</i> <sup>1</sup>
<b>1<sup>st</sup> pandemic wave, n(%)</b>	2 (67)	18 (43)	0.770	93 (40)	152 (41)	0.865
<b>Median age, year (IQR)</b>	15 (6; 17)	3 (1; 11)	<b>0.041</b>	68 (57; 76)	55 (42; 67)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Male n(%)</b>	2 (67)	30 (72)	1.000	126 (54)	202 (54)	1.000
<b>Ethnicity n(%)</b>						
Caucasian	3 (100)	42 (100)	-	211 (91)	326 (89)	0.668
Afro-descendant	0	0		19 (8)	38 (10)	
<b>VoC n(%)</b>	1 (33)	12 (29)	1.000	76 (35)	116 (37)	0.783
<b>SARS-CoV-2 variant n(%)</b>						
Wild	2 (67)	21 (51)	0.695	114 (53)	169 (54)	0.869
Gamma	1 (3)	12 (29)		75 (35)	114 (36)	
Zeta	0	8 (20)		24 (11)	31 (10)	
<b>Risk factors n(%)</b>						<b>&lt;0.0001</b>
No	0	21 (50)	-	40 (17)	93 (25)	
Yes -1 factor	3 (100)	19 (45)		48 (21)	115 (31)	
Yes – ≥ 2 factors	0	2 (5)		146 (62)	165 (42)	
<b>Median time of onset symptoms until hospitalization, days (IQR)</b>	3 (1; 4)	2 (1; 3)	0.367	6 (3; 10)	5 (2; 9)	<b>0.025</b>
<b>Ventilatory support n(%)</b>						
No	0	29 (69)	-	8 (3)	47 (12)	<b>&lt;0.0001</b>
Yes – non-invasive	0	10 (24)		26 (11)	195 (52)	
Yes – invasive	3 (100)	3 (7)		200 (85)	132 (35)	
<b>Median length of stay, days (IQR)</b>	25 (5; 50)	9. (6; 22)	0.490	13 (7; 22)	10 (5; 20)	<b>0.026</b>
<b>ICU n(%)</b>	3 (100)	11 (26)	0.026	201 (86)	146 (39)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Median length of ICU, days (IQR)</b>	25 (3; 47)	7 (1; 17)	0.158	11 (4; 20)	8 (4; 18)	0.515

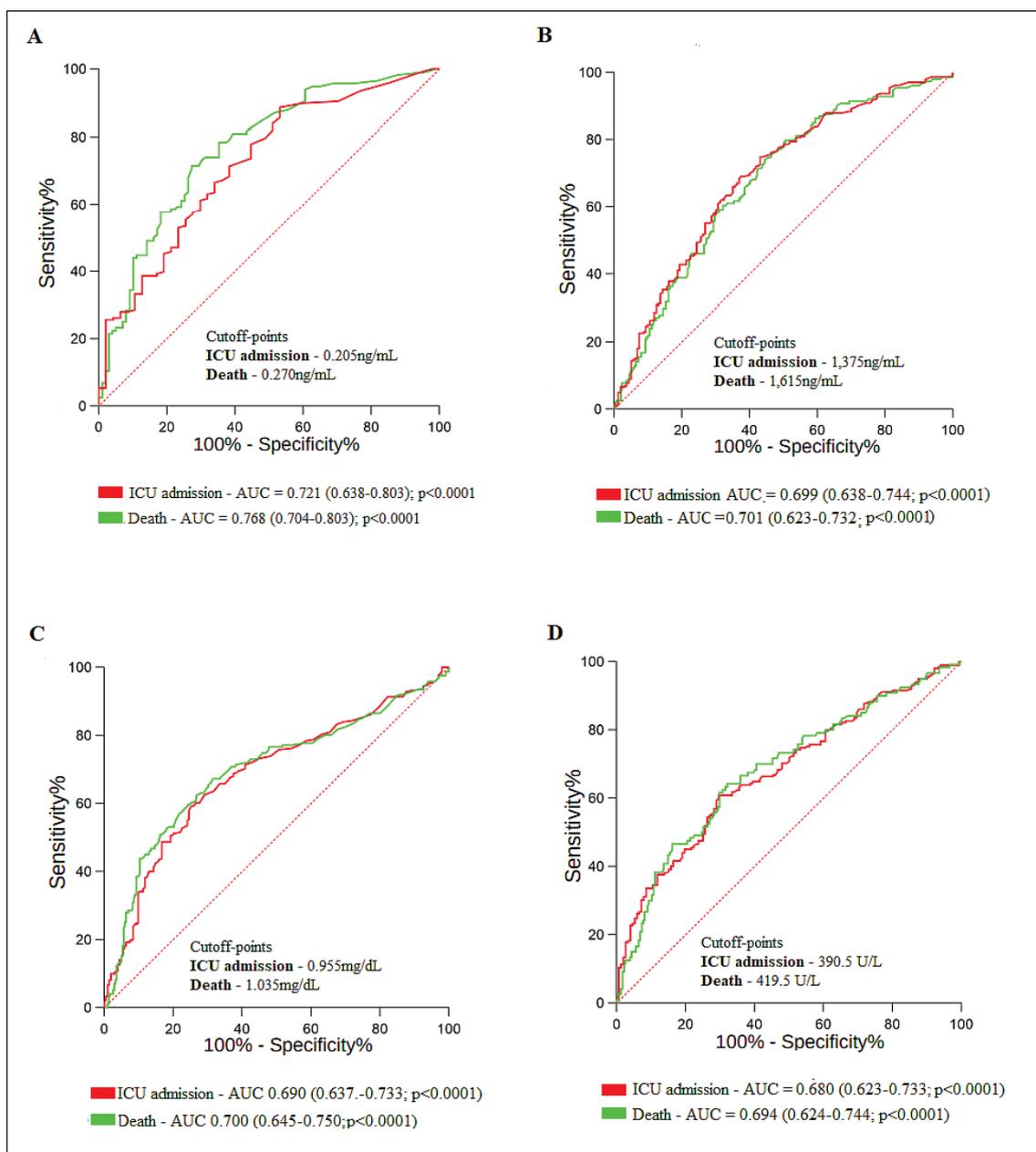
In bold: statistical significant values. ICU, intensive care unit; VoC, Variant of concern  
<sup>1</sup>p, Mann-Whitney nonparametric test or chi-squared test, as appropriate

### Multivariate analysis and Disease severity

The only risk factor identified in pediatric patients was refer to outcome for ICU admission, it was increased age (aOR= 1.34; 95% CI= 1.03-1.73; p=0.028). In patients over 18 years old, the risk factors identified for ICU admission were afro descendant ethnicity (aOR= 2.55; 95%CI= 1.35-4.80; p=0.004) and obesity (aOR= 2.26; 95%CI= 1.31-3.93; p=0.004).

Risk factors for death in adults were increased age (aOR= 1.04; 95% CI= 1.03-1.06;  $p<0.0001$ ), having liver disease (aOR= 2.95; 95%CI = 1.07-8.11;  $p=0.036$ ), cancer (aOR= 3.31; 95% CI= 1.17-9.37;  $p=0.024$ ), obesity (aOR= 2.20; 95%CI= 1.12-4.32;  $p=0.022$ ) and ICU admission (aOR=8.45; 95%CI= 4.86-14.70;  $p<0.0001$ ).

Four usual laboratory biomarkers, procalcitonin, D-dimer, creatinine, and LDH, were evaluated as potentially associated with ICU admission and death in hospitalized patients over 18 years old. ROC curves were constructed to analyze these data, and the results are shown in Figure 4. All biomarkers' cutoff points presented AUC values between 0.7 to 0.8, which is considered acceptable, though only procalcitonin and LDH had cut off points above normal values.



**Figure 4.** ROC curve to determine the cutoff value of serum levels of biomarkers associated with ICU admission and death in hospitalized adults. A) Procalcitonin; B) D-dimer; C) Creatinine; D) lactate dehydrogenase.

## DISCUSSION

COVID-19 is a systemic infection that presents a diverse range of signs and symptoms, and its evolution may vary according to different factors related to the virus, as well as to the host, such as age, presence of comorbidities, and ethnicity.<sup>17</sup> In this study, the characterization of the clinical, epidemiological, and molecular profile of COVID-19 in hospitalized patients was performed, from which risk factors for disease severity were identified both for the pediatric group and those over 18 years old. Increasing age was identified as a risk factor for ICU

admission in patients younger than 18 years old. The risk factors for those over 18 years old were afro-descendant and obese patients. Risk factors for death in adults were increased age, liver disease, patients with cancer, obesity, and ICU admission. Procalcitonin, D-dimer, creatinine, and lactate dehydrogenase were proposed as potential biomarkers of ICU admission and death in hospitalized patients over 18 years old.

The fatality rate of the total population and frequency of ICU admissions in patients younger than 18 years old align with what was previously reported<sup>18,19</sup> However, the percentage of use of mechanical ventilatory support is twice as high as in other studies.<sup>20</sup> In addition, the frequency of hospitalization of patients older than 18 years in the ICU is also higher.<sup>20</sup> These results might be related to the profile of greater complexity that inpatients from tertiary hospitals present, taking as an example of this the studied population that presented a higher frequency of comorbidity both in adults and in children with those described in recent meta-analyses.<sup>21,22</sup>

Cardiovascular diseases and Diabetes Mellitus were also the most frequent comorbidities, as described in Brazil<sup>23</sup> and worldwide<sup>24</sup>. The high prevalence of comorbidities related to the cardiometabolic disease is related to the pathogenesis of COVID-19, which increases inflammation with dysregulation of the immune response and triggering the “cytokine storm”. These factors increase the pro-inflammatory immune response already present in individuals with cardiometabolic diseases, implying hospitalization and more severe clinical conditions of COVID-19.<sup>25</sup>

Although there were no previous reports about a relationship between Gamma and an increase in ICU cases or death<sup>26</sup>. Gamma infection resulted in greater disease severity than the wild-type variant, being related to the rise of 2.5 times the chance of using invasive ventilatory support, which can be explained by the high infectivity observed by this variant. Another factor related to disease severity observed and corroborated by the literature<sup>27</sup> is the direct

relationship between death and age. The analysis of the survival curve of inpatients and those ICU admitted showed a drastic drop in the probability of survival of patients over 65 years old in the first 30 days of hospitalization, concerning the groups under 65. In addition, patients aged 18-65 also had a decreased survival rate compared to the pediatric group. Similar findings were also reported by Garbin *et al.* (2022).<sup>28</sup>

The epidemiological and clinical profile of patients admitted to the ICU corroborates the understanding that the pediatric group has a more moderate course of COVID-19 than adults<sup>29</sup>. Contrary to what was observed in patients over 18 years of age, the pediatric population was not associated with ICU admission and increased deaths. Furthermore, there were no cases of SpO<sub>2</sub> < 90% in this group.

There are some hypotheses for the association between pediatric patients and less severe COVID-19. The first deals with the increase in the angiotensin-2-converting enzyme (ACE-2) in the nasal epithelium proportional to age. The low expression of the SARS-CoV-2 receptor on the cell surface may contribute to protecting children against the virus. Furthermore, this group has a more robust innate immune response with higher natural killer cells, so their first immune response is better than adults to fight SARS-CoV-2. Lastly, activation of coagulation pathways and formation of microthrombi as a result of endothelial damage, and angiogenesis play an important role in the pathogenesis of COVID-19 and can lead to thrombotic complications such as heart attacks and strokes. In this way, differences in endothelium and clotting function compared to adults make children less prone to abnormal clotting. It may also explain why patients with conditions that affect the endothelium, such as diabetes and hypertension, are at greater risk for COVID-19. It is important to note that the age profile of severe COVID-19 (and the increased risk in men) mirrors that of thrombotic diseases such as deep vein thrombosis.<sup>30</sup>

The implications of these physiological differences between adult and pediatric individuals were observed throughout the study in the description of clinical, epidemiological, and molecular profiles. In addition, it implied the proposition of risk factors related to admission to UTI and poor evolution. In the pediatric group, only one risk factor was identified. The multivariate analysis showed that age was a risk factor for ICU admission. In the adult group, risk factors for both outcomes were identified. Afro-descendant patients and obesity were factors related to the first outcome and increasing age, liver disease, cancer, obesity, and ICU stay were factors associated with the last outcome.

In addition to epidemiological risk factors, four laboratory parameters (procalcitonin, D-dimer, creatinine, and lactate dehydrogenase) have been identified, based on the AUC analysis of the ROC curve, as biomarkers for predicting ICU admission and progression to death. However, the cutoff values of the laboratory parameters for both the outcome of admission to the ICU and death are below what is described in the literature<sup>20,31</sup> and clinically represent a slight change.

The risk factors and prognostic predictors identified in this study are associated in the literature with disease severity and worse outcomes due to the relationship with the response to hyperinflammation and vascular damage caused by the pathogenesis of SARS-CoV-2<sup>10,32</sup>, except for the risk factor related to ethnicity that present a socio-political-economic character. Recent studies associate ethnic minorities with worse COVID-19 outcomes due to socioeconomic determinants that imply a large discrepancy that this population has in relation to access to health services, diagnosis, viral exposure and access to personal protective material when compared to individuals of better socio-economic conditions.<sup>33</sup> Thus, the risk factors for severe COVID-19 identified in this study involve demographic, clinical and socio-environmental characteristics.

This study has some limitations: 1) retrospective data collection; 2) the lack of data in the medical records due to the high clinical demand of the pandemic; 3) the difference in clinical management protocols between CHC-UFPR and HIPP; 4) inclusion bias due to limited sensitivity of the genotyping method, 5) physiological difference between the two groups; 6) as the two hospitals are tertiary, they receive complex cases and with a higher stage of illness than in other services; and 7) due to the collapse of the health system, many adults patients with severe COVID-19 were not admitted to the ICU.

On the other hand, this study evaluates a broad, diverse and representative inpatients population from two reference hospitals in southern Brazil over a wide period, covering different phases of the pandemic and the emergence of many variants. Therefore, the impact of this new infection on children's health is still not entirely known. The continuity of the pandemic and the limitation of vaccines will certainly increase the number of infected children, which the health system will have to be prepared for to face.

## **CONCLUSION**

Host, virus, and environmental factors can modulate the clinical profile and impact of COVID-19. In this way, constant clinical-epidemiological and molecular surveillance to identify these risk factors is essential for proposing more assertive and equitable health policies to mitigate the burden of the COVID-19 pandemic on the population.

## **FUNDING INFORMATION:**

This work was supported by the: PROPLAN /Federal University of Parana, Curitiba-Paraná-Brazil; FINEP - Funder of Studies and Projects, Ministry of Science, Technology and Innovation- Brazil - Institutional Network Project: Laboratories for Diagnostic tests for COVID-19 (0494/20).

## REFERENCES

1. Badal S, Thapa Bajgain K, Badal S, Thapa R, Bajgain BB, Santana MJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes of pediatric COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2021;135:104715.
2. Madewell ZJ, Yang Y, Longini IM, Halloran ME, Dean NE. Household transmission of SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2020;3(12):e2031756.
3. Reyna-Villasmil E, Caponcello MG, Maldonado N, Olivares P, et al. Association of Patients' Epidemiological Characteristics and Comorbidities with Severity and Related Mortality Risk of SARS-CoV-2 Infection: Results of an Umbrella Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines.* 2022 Sep 29;10(10):2437.
4. Bepouka, B., Bandubuilda Kaja, P., & Situakibanza, H. (2022). Treatment and case fatality rate of COVID-19 in Africa. *Journal of Public Health in Africa*, 13(3).
5. Xu J, Xiao W, Liang X, Shi L, Zhang P, Wang Y, et al. A meta-analysis on the risk factors adjusted association between cardiovascular disease and COVID-19 severity. *BMC Public Health.* 2021 Aug 11; 21 (1):1533.
6. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis.* 2021 Aug 21; 21(1):855.
7. Woodruff RC, Campbell AP, Taylor CA, et al. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children. *Pediatrics.* 2022;149(1):e2021053418.
8. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? *JAMA.* 2021 Feb 9;325(6):529-531. doi: 10.1001/jama.2020.27124. PMID: 33404586MS – Ministério da Saúde, Brasil. COVID-19 – Painel Coronavírus [internet]. Brasília:2021.
9. Pormohammad A, Ghorbani S, Baradaran B, et al. Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes of 61,742 patients with confirmed COVID-19 infection: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2020;147:104390.
10. Bhopal S, Bagaria J, Bhopal R. Children's mortality from COVID-19 compared with all-deaths and other relevant causes of death: epidemiological information for decision-making by parents, teachers, clinicians and policymakers. *Public Health.* 2020 Ago;185:19-20.
11. Götzinger F, Santiago-García B, Noguera-Julián A, et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicenter cohort study. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2020;4(9):653-661.
12. Afonso ET, Marques SM, Costa LDC, Fortes PM, et al. Secondary household transmission of SARS-CoV-2 among children and adolescents: Clinical and epidemiological aspects. *Pediatr Pulmonol.* 2022 Jan;57(1):162-175. doi: 10.1002/ppul.25711. Epub 2021 Oct 13. PMID: 34590794; PMCID: PMC8661607.

13. Lapinski BA, Domino NR, Pereira LA *et al.* SARS-CoV-2 molecular epidemiology in adult and pediatric patients – a retrospective multicenter cross-sectional study in southern Brazil. (2022). Manuscript in preparation.
14. WHO – World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants.[internet]. Available in <<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>; accessed in March, 2022.
15. Vogels CBF, Breban MI, Ott IM, Alpert T, Petrone ME, Watkins AE, *et al.*; Brazil-UK CADDE Genomic Network; Network for Genomic Surveillance in South Africa. Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. *PLoS Biol.* 2021;19:e3001236.
16. PAHO Sequenciamento genômico do SARS-CoV-2. Guia de implementação para máximo impacto na saúde pública. 8 de janeiro de 2021. Brasília, D.F.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2021. Available in <<https://doi.org/10.37774/9789275723890>>; accessed in March, 2022.
17. Aghamirza MAH, Eivazzadeh-Keihan R, Beig PA, *et al.* COVID-19: A systematic review and update on prevention, diagnosis, and treatment. *MedComm (2020)*. 2022;3(1):e115.
18. Santos JNV, Mendonça VA, Fernandes AC, *et al.* Recent Advance Analysis of Recovery in Hospitalized People with COVID-19: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(21):14609.
19. Vosoughi F, Makuku R, Tantuoyir MM, *et al.* A systematic review and meta-analysis of the epidemiological characteristics of COVID-19 in children. *BMC Pediatr.* 2022;22(1):613.
20. Mehta AA, Haridas N, Belgundi P, Jose WM. A systematic review of clinical and laboratory parameters associated with increased severity among COVID-19 patients. *Diabetes Metab Syndr.* 2021;15(2):535-541.
21. Khamis AH, Jaber M, Azar A, AlQahtani F, Bishawi K, Shanably A. Clinical and laboratory findings of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *J Formos Med Assoc.* 2021;120(9):1706-1718.
22. Wanga V, Gerdes ME, Shi DS, *et al.* Characteristics and Clinical Outcomes of Children and Adolescents Aged <18 Years Hospitalized with COVID-19 - Six Hospitals, United States, July-August 2021 [published correction appears in *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2022 Feb 04;71(5):185]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(5152):1766-1772.
23. de Souza WM, Buss LF, Candido DDS, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nat Hum Behav.* 2020;4(8):856-865.
24. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, *et al.* Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* 2020;34:101623.

25. Lo Presti E, Nuzzo D, Al Mahmeed W, et al. Molecular and pro-inflammatory aspects of COVID-19: The impact on cardiometabolic health. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022;1868(12):166559.
26. Lin L, Liu Y, Tang X, He D. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Public Health.* 2021;9:775224.
27. Chen Z, Peng Y, Wu X, et al. Comorbidities and complications of COVID-19 associated with disease severity, progression, and mortality in China with centralized isolation and hospitalization: A systematic review and meta-analysis. *Front Public Health.* 2022;10:923485.
28. Garbin JRT, Leite FMC, Lopes-Júnior LC, Dell'Antonio CSDS, Dell'Antonio LS, Santos APBD. Analysis of Survival of Patients Hospitalized with COVID-19 in Espírito Santo, Brazil. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(14):8709.
29. Xiao F, Tang M, Yan K, Zhou W. Clinical features of infants with SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis [published online ahead of print, 2022 Oct 31]. *Ann Palliat Med.* 2022;apm-22-933.
30. Zimmermann P, Curtis N. Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Archives of Disease in Childhood* 2021;106:429-439.
31. Cao B, Jing X, Liu Y, Wen R, Wang C. Comparison of laboratory parameters in mild vs. severe cases and died vs. survived patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis.* 2022;14(5):1478-1487.
32. Xie J, Wang Q, Xu Y, et al. Clinical characteristics, laboratory abnormalities and CT findings of COVID-19 patients and risk factors of severe disease: a systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med.* 2021;10(2):1928-1949.
33. de Acosta AM, Garg S, Pham H, et al. Racial and Ethnic Disparities in Rates of COVID-19-Associated Hospitalization, Intensive Care Unit Admission, and In-Hospital Death in the United States From March 2020 to February 2021. *JAMA Netw Open.* 2021;4(10):e2130479.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**TABLE 1. CHARACTERIZATION OF THE POPULATION**

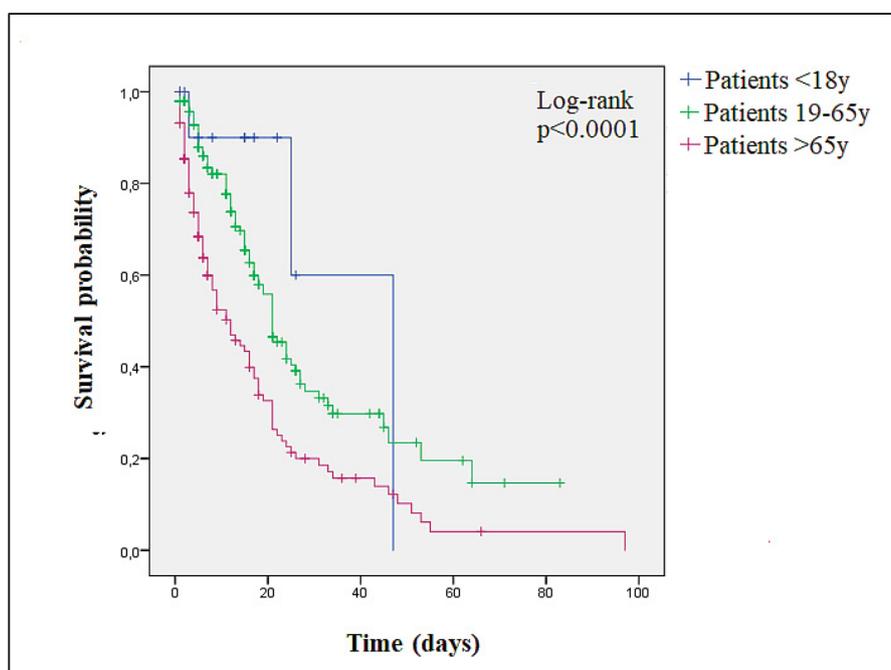
<b>Total n=652</b>	
<b>Medical care n(%)</b>	
HIPP	45 (7)
CHC-UFPR	607 (93)
<b>1<sup>st</sup> pandemic wave n(%)</b>	266 (41)
<b>Male n(%)</b>	360 (55)
<b>Ethnicity n(%)</b>	
Caucasian	595 (91)
Afrodescendent	57 (9)
<b>VoC n(%)</b>	205 (31)
<b>SARS-CoV-2 variants n(%)</b>	
Wild	306 (47)
Zeta	63 (10)
Gamma	202 (31)
Alpha	2 (0)
Delta	1 (0)
Other variants	1 (0)
Inconclusive	73 (12)
<b>Risk factor n(%)</b>	
No	154 (24)
Yes – 1 factor	185 (28)
Yes $\geq 2$ factors	313 (48)
<b>Age &gt;65y n(%)</b>	238 (37)
<b>Pregnant n(%)</b>	16 (2)
<b>Patients with comorbidity n(%)</b>	264 (41)
<b>Ventilatory support n(%)</b>	
No	84 (13)
Yes – non-invasive	231 (35)
Yes – invasive	338 (52)
<b>ICU n(%)</b>	361 (55)
<b>Death n(%)</b>	237 (36)

**TABLE 2 . SYMPTOMS OF THE PARTICIPANTS WITH SARS-COV-2 DISEASE CLASSIFIED BY AGE**

Symptoms n(%)	Total n=575	Patients ≤18y n=44	Patients >18y n=531	p <sup>1</sup>
Fever	281 (49)	15 (33)	266 (50)	0.173
Cough	336 (58)	10 (22)	326 (61)	<0.0001
Diyspnea	465 (81)	11 (24)	454 (85)	<0.0001
SpO2< 90%	495 (86)	0	495 (93)	-
Odynophagia	64 (10)	13 (29)	51 (10)	<0.0001
Respiratory distress	72 (11)	8 (18)	64 (12)	0.134
Diarrhea	99 (17)	6 (13)	93 (18)	0.723
Vomit	51 (9)	0	51 (10)	-
Fatigue	17 (3)	0	17 (3)	-
Anosmia	31 (5)	0	31 (6)	-
Dys/ageusia	25 (4)	0	25 (5)	-

Data are presented as number (%).SpO2< 90% Partial oxygen saturation <90%.

<sup>1</sup>p, chi-squared test



**Figure 1.**Survival curve of patients admitted in ICU by Kaplan-Meier. Blue - patients <18Y; green - patients between 19-65y; pink – patients >65y.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A emergência de novas variantes é um grande desafio no combate à pandemia de COVID-19, pois pode implicar em um aumento do *fitness* viral, virulência e transmissibilidade, alteração do perfil clínico-epidemiológico, redução da resposta a vacinas e imunoterapias, sendo crucial a constante atualização das estratégias de mitigação, diagnóstico, manejo clínico e tratamento de acordo com as características das variantes circulantes (WHO, 2021). Nesse cenário, este estudo realizou uma epidemiologia molecular do vírus SARS-CoV-2 em pacientes adultos e pediátricos de dois hospitais universitários terciários em Curitiba entre Março de 2020 e Agosto de 2022, em que observou duas ondas pandêmicas, a circulação de uma variante de interesse, *Zeta*, e três variantes de preocupação, *Alpha*, *Gamma* e *Delta*.

A caracterização molecular viral e avaliação epidemiológica dos pacientes ambulatoriais e hospitalizados mostrou que o maior número de casos ocorreu na segunda onda pandêmica. Observou-se uma alta taxa de hospitalização e de fatalidade que foram associadas à primeira onda pandêmica, à variante *wild* e a infecções em adultos. A associação da primeira onda e, conseqüentemente, da variante *wild* com os desfechos de gravidade estão de acordo com o que encontramos em estudos em países em desenvolvimento (ARGALA *et al.*, 2022; RUIZ-STERNBERG *et al.*, 2022). Em países desenvolvidos, porém, esses desfechos relacionados a gravidade de doença estão relacionados à emergência das VoC *Gamma* e *Delta*, logo, após a primeira onda. A associação encontrada entre VoC e infecções em pacientes pediátricos novamente contradiz os achados nos estudos, pois eles mostram que as infecções por VoC estão relacionadas a maior gravidade de doença, porém crianças, quando são sintomáticas, apresentam COVID-19 leve ou moderada, com baixas taxas de hospitalização e óbito, o mesmo que observado no presente estudo. Esses resultados discrepantes podem ser explicados por fatores políticos, econômicos e sociais que dificultaram o manejo da pandemia nos primeiros meses, implicando no aumento do impacto da COVID-19 no Brasil na primeira onda em relação a outros países.

O estudo mostrou que infecções em adultos apresentam 2,5 vezes mais chance de ser no sexo feminino, aumentam seis vezes a necessidade de

hospitalização e oito vezes de óbitos em relação à infecção em pacientes pediátricos. Não há estudos que comparem esses dois grupos, mas estudos de metanálise vêm demonstrando uma tendência de homens apresentarem maior gravidade de doença, o que por consequência, está em desacordo com os resultados encontrados no presente estudo.

Não foram encontrados dentre as amostras sequenciadas *clusters* específicos dos hospitais provenientes, os genótipos estão de acordo com o descrito no Paraná. As mutações mais frequentes da proteína *spike* eram referentes às mutações características das variantes circulantes. As mutações mais frequentes no NTD e no RBD da proteína *spike* eram referentes às mutações características das variantes.

Foram identificadas duas mutações associadas com eventos na população. A mutação H665Y foi associada ao segundo pico de casos causado pela variante *Gamma*, em que o número de casos aumentou sem percepção de aumento de hospitalizações e casos graves. A segunda, E484K, foi associada ao aumento de hospitalizações. A baixa associação de mutações relacionadas a maior transmissibilidade e infectividade com maior número de casos, hospitalizações ou óbitos, parte pode ser explicada pelas associações encontradas neste estudo, discutidas anteriormente, entre não-VoC e maior gravidade de doença e, também, porque o fenótipo de um vírus é o resultado da combinação das quasi-espécies (estrutura populacional de vírus que infectam um mesmo hospedeiro e apresentam um grande número de mutações pontuais nos genomas) desse organismo, que podem modular positiva ou negativamente a expressão de determinadas características de acordo com o ambiente. Além disso, fatores do hospedeiro, ambientais e sociais também podem implicar diretamente no número de casos, hospitalizações e óbito.

Em relação às avaliações exclusivamente em pacientes hospitalizados, foi observado que o tempo de internação de crianças infectadas por *Zeta* foi menor do que crianças infectadas pelas demais variantes e menor dos adultos infectados por *Zeta*. À exceção desta variável, o perfil clínico epidemiológico e laboratorial dos tanto nos adultos quanto em pacientes pediátricos não foi diferente entre as variantes de SARS-CoV. COVID-19 no grupo pediátrico foi associado com menor internamento em UTI, menor uso de suporte ventilatório mecânico, menor tempo de internação,

maior tempo de UTI e com infecções pela variante *Gamma*. Novamente é encontrada a associação VoC com doença mais branda, à exceção do tempo maior de internação em UTI, que é relatado em estudos de metanálise associado à variante *Gamma*.

A respeito dos fatores associados à gravidade de doença, estes são associados à internação do grupo pediátrico em UTI, maior número de internação na primeira onda pandêmica, maior tempo de hospitalização, maior necessidade de suporte ventilatório mecânico invasivo e mais infecções pelo vírus ancestral. Já em adultos, a internação em UTI esteve relacionada com infecções em idosos, maior proporção de afro descendentes em relação a caucasianos, maior número de internação na primeira onda pandêmica, aumento do tempo de hospitalização, maior necessidade de suporte ventilatório invasivo, e pacientes obesos. Ambos os grupos apresentaram, aumento do tempo de hospitalização e aumento de do uso do suporte ventilatório mecânico invasivo, que são fatores relacionados a internação em UTI em geral, entretanto os adultos apresentaram características relacionados com fatores de risco descritos na literatura, como a idade e obesidade. A etnia também é relacionada a piores desfechos da COVID-19, devido a fragilidades socioeconômicas dos grupos minoritários que implicam em maior exposição viral e menor acesso a serviços de saúde.

Quando comparados os grupos pediátrico e adultos que internaram em UTI, os primeiros apresentaram mais infecções em homens, tempo de início de sintoma até hospitalização 4 vezes menor, tempo de hospitalização maior, menor uso de suporte ventilatório invasivo, mais casos na primeira onda, mais pacientes com doenças neurológicas e mais infecções por genótipo selvagem do que adultos que foram internados em UTI. O tempo de início de sintomas até hospitalização maior em adultos pode ser explicado pela falta de leitos para esse grupo devido ao esgotamento dos serviços de saúde com a alta demanda causada pela primeira onda de *Gamma*.

Por fim, este estudo apresenta algumas limitações: 1) a coleta retrospectiva de dados; 2) a falta de dados nos prontuários devido à alta demanda clínica; 3) a diferença nos protocolos de manejo clínico entre CHC-UFPR e HIPP; 4) viés de inclusão gerado pela sensibilidade limitada das metodologias de genotipagem; 5) necessidade de utilizar kits para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR com

diferentes genes-alvo, o que pode impactar no Cq da amplificação; 6) grande descarte de amostras por falta de espaço para armazenamento; 7) perda de casos de pacientes de outros serviços de saúde, por falta de cruzamento de dados entre os serviços públicos de saúde; e, finalmente, 8) perda de casos falso-negativos devido a testes fora da janela diagnóstica do SARS-CoV-2. No entanto, a maioria dessas limitações está associada ao período pandêmico e são compartilhadas por outros estudos retrospectivos realizados na mesma época.

De outro modo, os sequenciamentos depositados no banco de dados GISAID referem-se a 43% do total do Paraná no período estudado, o que contribui para a compreensão mais ampla do panorama molecular dos vírus circulantes no estado e a dinâmica da pandemia no Brasil. Outra característica a se destacar é que, diferente da maioria dos estudos moleculares, este trabalho possui metadados que possibilitam a associação de alterações genômicas com desfechos. Além disso, é um dos poucos estudos, senão o único, que compara o perfil clínico-epidemiológico e molecular da COVID-19 entre pacientes adultos e pediátricos. Desta forma, o presente trabalho apresenta relevância para a compreensão da epidemiologia molecular de pacientes com COVID-19 moderado a grave.

## 8 PERSPECTIVAS

O sequenciamento genômico produz uma infinidade de informações e variáveis que não puderam ser analisadas no presente estudo. Portanto, a expansão dos genes avaliados e o aprofundamento das análises ficam como perspectivas para próximos trabalhos.

## 9 CONCLUSÃO

Variantes ancestrais, uma Vol, a *Zeta*, e três VoC, *Alpha*, *Gamma* e *Delta* foram identificadas por genotipagem por RT-qPCR.

Foi observada uma alta concordância entre a genotipagem por RT-qPCR e WGS. Os pacientes pediátricos apresentaram maior diversidade de genótipos.

O SARS-CoV-2 surgiu no final de março de 20 iniciando a primeira onda pandêmica no Brasil e no Paraná, no final de outubro de 20 emergiu a variante *Zeta* dando início à segunda onda pandêmica, que apresentou até a data final de coleta de amostras 3 picos pandêmicos, um pela *Zeta* e dois pela *Gamma*. Esta última foi identificada no estudo a partir de janeiro de 2021 e em seis semanas após era a variante dominante, sendo responsável por quase totalidade dos genótipos identificados no Paraná e no Brasil. Não há amostras suficientes de *Alpha* e *Delta* para que se possa avaliar a dinâmica delas no estudo.

O maior número de casos se concentrou na segunda onda, mas a maior taxa de hospitalização e óbito referiu-se à primeira. A maioria dos pacientes hospitalizados era do sexo masculino, possuía pelo menos uma comorbidade - dentre as mais frequentes doenças cardiovasculares e diabetes -, metade da população fez uso de suporte ventilatório mecânico invasivo, apresentaram alta taxa de admissão em UTI e a taxa de fatalidade, apesar de não ser baixa, está dentro do esperado para hospital terciário. Em relação aos parâmetros laboratoriais, foi encontrado linfopenia nos pacientes pediátricos, D-dímero e creatinina sérica aumentados em adultos e os demais parâmetros estavam aumentados em ambos os grupos.

Pacientes pediátricos apresentaram menor tempo entre início de sintoma e hospitalização, doença menos severa, possuindo menor taxa de hospitalização, maior probabilidade de sobrevivência em 30 dias de hospitalização, menor admissão em UTI e óbito. Na população geral foram associados a infecções por *Gamma*, além disso, esses pacientes apresentaram uma variabilidade de mutações maior do que nos pacientes maiores de 18 anos.

Foram encontradas 22 mutações com mais de 1% de frequência na região do aminoácido 14 ao 1068 no gene da proteína *spike do vírus SARS-CoV-2* que compreende a região do NTD (9 mutações), o RBD (5 mutações), CTD2 (6 mutações) e a região proximal da subunidade S2 (2 mutações), principais regiões responsáveis pela interação vírus receptor, fusão celular e reconhecimento do sistema imune humoral. Destas 22 mutações apenas cinco não são referentes às mutações características das variantes.

Duas mutações foram associadas com desfechos epidemiológicos, a primeira, H665Y, foi associada com o segundo surto de casos após a emergência da variante *Gamma* e a E484K que foi associada ao aumento do número de hospitalizações.

Quando avaliado os pacientes ambulatoriais e hospitalizados, os fatores de risco de hospitalização a primeira onda pandêmica, infecções em adultos e a presença da mutação E484K, enquanto para óbito apenas foi observado como fator de risco os casos ocorridos na primeira onda. Já a avaliação dos pacientes hospitalizados mostrou que no grupo pediátrico só foi observado como fator de risco para admissão em UTI ter maior idade. Em contrapartida, foram identificados fatores de risco tanto para admissão em UTI, quanto para óbito. O primeiro desfecho se associou a infecção em afrodescendentes e obesos e o segundo desfecho se relacionou a idade maior, doença hepáticas, câncer, obesidade e admissão em UTI. Além disso foram identificados 4 biomarcadores séricos, procalcitonina, D-dímero, creatinina e lactato desidrogenase, como preditores de mau prognóstico da COVID-19 (admissão em UTI e óbito).

## REFERÊNCIAS

ABRAMS JY, OSTER EM, GODFRED-CATO SE *et al.* Factors linked to severe outcomes in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) in the USA: a retrospective surveillance study. **Lancet Child Adolesc. Health.** 2021;5:323–331.

ADAMOSKI D, DE OLIVEIRA JC, BONATTO AC, *et al.* Large-Scale Screening of Asymptomatic Persons for SARS-CoV-2 Variants of Concern and Gamma Takeover, Brazil. **Emerg Infect Dis.** v.27(12):3124-3127, 2021.

AGARWALA P, BHARGAVA A, GAHWAI DK, NEGI SS, SHUKLA P, DAYAMA S. Epidemiological Characteristics of the COVID-19 Pandemic During the First and Second Waves in Chhattisgarh, Central India: A Comparative Analysis. **Cureus.** 2022;14(4):e24131.

AGHAMIRZA MAH, EIVAZZADEH-KEIHAN R, BEIG PA, *et al.* COVID-19: A systematic review and update on prevention, diagnosis, and treatment. **MedComm (2020).** 2022;3(1):e115.

AKOBENG, AK. Understanding diagnostic tests 2: likelihood ratios, pre- and post-test probabilities and their use in clinical practice. **Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 96, n. 4, p. 487–491, abr. 2007a.

AKOBENG, AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. **Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 96, n. 5, p. 644–647, maio 2007b.

ALCANTARA LCJ, NOGUEIRA E, SHUAB G, *et al.* SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. **Virus Res.** 2022;315:198785.

ALI, K.; BERMAN, G.; ZHOU, H.; *et al.* Evaluation of mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Adolescents. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 24, p. 2241–2251, 2021.

ANDERSEN, K.G.; RAMBAUT, W. I.; IAN, W. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, p. 450–455, April 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos aprovados para tratamento da COVID-19. Ministério da Saúde. Brasília, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>>. Acessado em novembro de 2022.

BANERJEE, A. K.; BLANCO, M. R.; HONSON, D. D.; *et al.* SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. **Cell**, v. 183, n. 5, p. 1325- 1339.e21, 2020.

BEISSERT, T.; PERKOVIC, M.; VOGEL, A.; *et al.* A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 1, p. 119–128, 2020.

BEUN, R.; KUSADASI, N.; SIKMA, M.; WESTERINK, J.; HUISMAN, A. Thromboembolic events and apparent heparin resistance in patients infected with SARS-CoV-2. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 42, n. S1, p. 19–20, 2020.

BORGES, A. A.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**. Salvador: Edufba. v. 1. p. 1–21, 2020.

BOSCH, B. J.; ZEE, R.; HAAN, C. A. M.; *et al.* The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8801–8811, 2003.

BRANDÃO, S. C. S.; GODOI, E. T. A. M.; RAMOS, J. O. X.; *et al.* COVID-19 grave: entenda o papel da imunidade, do endotélio e da coagulação na prática clínica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, p. 1–11, 2020.

BRITO, S. B. P.; BRAGA, I. O.; CUNHA, C. C.; *et al.* Pandemia da COVID-19: o maior desafio do século XXI - COVID-19 pandemic: the biggest challenge for the 21st century. **Vigil. sanit. debate**, v. 8, p.54-63, 2020.

CASCELLA, M.; RAJNIK, M.; ALEEM, A.; *et al.*, Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). 2022 Jun 30. StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; Jan 2022.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. **COVID-19 (coronavirus disease): people with certain medical conditions. 2020.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>. Acesso em: 31 agosto 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019ncov/variants/variant>. Acesso em: 30/08/2021.

CERQUEIRA-SILVA, T.; ANDRADE, A. B. M. D. G.; BARRAL-NETTO, M.; *et al.* Vacinas contra a infecção pelo SARS-CoV-2. **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, p. 1–31, 2020.

CHAKRABORTY C, BHATTACHARYA M, SHARMA AR, LEE SS, AGORAMOORTHY G. SARS-CoV-2 Brazil variants in Latin America: more serious research urgently needed on public health and vaccine protection. **Ann Med Surg (Lond)**. 2021;66:102428.

CHEN, J.; WANG, R.; HOZUMI, Y.; *et al.* Emerging dominant SARS-CoV-2 variants. **ArXiv**, 2022.

CHEN, J.; WANG, R.; WEI, G.-W. Review of the mechanisms of SARS-CoV-2 evolution and transmission. **ArXiv**, 2021.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 2020.

CORBETT, K. S.; EDWARDS, D. K.; LEIST, S. R.; *et al.* SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 567–571, 2020. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>>.

CORNILLEZ-TY CT, LIAO L, YATES JR 3RD, KUHN P, BUCHMEIER MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. **J Virol.**, v.83(19):10314-10318, 2009.

**COVID-19 rapid guideline: managing COVID-19. NICE guideline [NG191]**  
Published: 23 March 2021 Last updated: 03 June 2021. Disponível em:  
<https://www.nice.org.uk/guidance/ng191>. Acesso em: 07/2021.

**COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines.** National Institutes of Health. Disponível em:  
<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov>. Acesso em: 03/2022.

CROOK H, RAZA S, NOWELL J, YOUNG M, EDISON P. Long covid—mechanisms, risk factors, and management **BMJ**, 2021; 374 :n1648.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

DA SILVA C.K. T.; DE MORAIS, T. N. B.; JUSTINO, D. C. P.; DE ANDRADE, F. B. Evaluation of the epidemiological behavior of mortality due to COVID-19 in Brazil: A time series study. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8 August, p. 1–9, 2021.

DARRIBA D, POSADA D, KOZLOV AM, STAMATAKIS A, MOREL B, FLOURI T. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. **Mol Biol Evol.** v.37(1):291-294, 2020.

DE SOUZA, U. J. B.; DOS SANTOS, R. N.; CAMPOS, F. S.; *et al.* High rate of mutational events in sars-cov-2 genomes across brazilian geographical regions, february 2020 to june 2021. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1–13, 2021.

DELAHOY, M. J. UJAMAA, D.; WHITAKER, M.; *et a.* / Hospitalizations Associated with COVID-19 Among Children and Adolescents. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 36, p. 1255–1260, 2021.

DEMING DJ, GRAHAM RL, DENISON MR, BARIC RS. Processing of open reading frame 1a replicase proteins nsp7 to nsp10 in murine hepatitis virus strain A59 replication. **J Virol.**, v.81(19):10280-10291, 2007.

DENG X, BAKER SC. An "Old" protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. **Virology.** v.517:157-163, 2018.

DONOGHUE, M. HSIEH, F.; BARONAS, E.; *et al.* UltraRapid Communication A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. **Circ Res**, v. 87, p. 1–9, 2000.

EBRAHIMI S, KHANBABAEI H, ABBASI S, *et al.* CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. **Avicenna J Med Biotechnol.** V.14(1):3-9, 2022.

EMARY, K.R.W.; PATH, F. R. C.; GOLUBCHIK, T.; *et al.* Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 397, n. 10282, p. 1351-1362, april 10, 2021.

FALCONE, M.; TISEO, G.; VALORIANI, B.; *et al.* Efficacy of bamlanivimab/etesevimab and casirivimab/imdevimab in preventing progression to severe COVID-19 and role of variants of concern. **Infections. Diseases and Therapy**, v.10, n. 4, p. 2479–2488, 2021.

FALSEY, A.R.; FRENCK, R.W.; WALSH, E. E.; *et al.* SARS-CoV-2 Neutralization with BNT162b2 Vaccine Dose 3. **N Engl J Med**, v. 385, n.17, p.1627-1629, 2021.

FAN, X.; CAO, D.; KONG, L.; ZHANG, X. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020.

FANG SG, SHEN H, WANG J, TAY FP, LIU DX. Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. **Virology.** v.379(2):175-180, 2008.

FANG, E.; LIU, X.; LI, M.; *et al.* Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–31, 2022.

FANG FF, SHI PY. Omicron: a drug developer's perspective. **Emerg Microbes Infect**, v.11(1):208-211, 2022a.

FAHNØE, U.; PHAM, L. V.; FERNANDEZ-ANTUNEZ, C.; *et al.* Versatile SARS-CoV-2 Reverse-Genetics Systems for the Study of Antiviral Resistance and Replication. **Viruses.** v. 14, n. 2, p.172, 2022.

FRANCIS, A. L.; GHANY, S.; GILKES, T.; *et al.* Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy, and geographical distributions. **Postgrad Med J**, v. 98 p. 389-394, 2022.

FREITAS, A. R.; ALBUQUERQUE, O.; *et al.* The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil ) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. **The Lancet**, 2020.

GANGAVARAPU K, LATIF AA, MULLEN J, *et al.* **Outbreak.info**. (2022). Disponível em: <<https://outbreak.info/compare-lineages?pango=BA.1&gene=S&threshold=0.2>>. Acessado em dezembro de 2022.

GALLOWAY, S. E.; PAUL, P.; MACCANNELL, D. R.; JOHANSSON, M. A. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage —United States, December 29, 2020–January 12, 2021. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 3, p. 95–99, 2021.

GENELHOUD G, ADAMOSKI D, SPALANZANI RN, *et al.* Comparison of SARS-CoV-2 molecular detection in nasopharyngeal swab, saliva, and gargle samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.103(2):115678, 2022.

GIOVANETTI M, SLAVOV SN, FONSECA V, *et al.* Genomic epidemiology reveals the impact of national and international restrictions measures on the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Preprint. medRxiv**. 2022;2021.10.07.21264644

GOLDENBERG, S. Aspectos genéticos da patogênese e suscetibilidade à COVID-19. Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. **Edufba**, v. 1, 2020.

GONG Y, QIN S, DAI L, *et al.* The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. **Sig Transduct Target Ther.**, v.6, 396, 2021.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S.; BARIC, R.; *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

GORDON, C. J.; TCHESNOKOV, E. P.; WOOLNER, E.; *et al.* Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 20, p. 6785–6797, 2020.

GRÄF, T. Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-CoV-2. **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, p. 1–19, 2020.

GRASSI, M. F. R.; STRINA, A.; NUNES, C. L. O.; *et al.* Aspectos clínicos e terapêuticos da COVID-19 . **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, p. 1–35, 2020.

GREANEY, A. J.; LOES, A. N.; CRAWFORD, K. H. D.; *et al.* Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. **Cell Host & Microbe**, v.29, 463–476, 2021.

Guindon S. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v.59(3), 307–321, 2010.

GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V; SEHGAL, K.; *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. July, 2020.

GUPTA SK, MINOCHA R, THAPA PJ, SRIVASTAVA M, DANDEKAR T. Role of the Pangolin in Origin of SARS-CoV-2: An Evolutionary Perspective. **Int J Mol Sci**, v.23(16):9115, 2022.

HAAGE, V.; MOREIRA-SOTO, A.; SACKS, J. A. *et al.* Limited specificity of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests at low temperatures. **medRxiv preprint**, February 3, 2021.

HADFIELD J, MEGILL C, BELL SM, *et al.* Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. **Bioinformatics**. 2018;34(23):4121-4123.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, p. 631–637, 2004.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 2020.

HASSANIN, A. A.; RAZA, S. H. A.; UJJAN, J. A.; *et al.* Emergence, evolution, and vaccine production approaches of SARS-CoV-2 VIRUS: Benefits of getting vaccinated and common questios. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2021.

HE, J. TAO, H.; YAN, Y.; *et al.* Molecular mechanism of evolution and human infection with SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 12, n. 4, 2020.

HE, X.; HONG, W.; PAN, X.; LU, G.; WEI, X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 838–845, 2021.

HILLEN, H. S.; KOKIC, G.; FARNUNG, L.; *et al.* Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. **Nature**, v. 584, n. 7819, p. 154–156, 2020.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 779- 784.e5, 2020.

**International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Coronaviridae. [S. I.], 2011.** Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-)

sense-rna-viruses-2011/w/posrna\_viruses/222/coronaviridae. Acesso em: 28/03/2022.

**International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2021 release. EC 50, Washington, DC; July 2018.** Email ratification March 2022 (MSL #34). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 04/2022.

**International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2020. EC 50, Washington, DC; July 2018.** Email ratification March 2022 (MSL #34). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 04/2022.

ISABEL, S.; GRÑA-MIRAGLIA, L.; GUTIERREZ, J. M.; *et al.* Evolutionary and structural analyses of SARS-CoV-2 D614G spike protein mutation now documented worldwide. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

ISHAK A, MEHENDALE M, ALRAWASHDEH MM, *et al.* The association of COVID-19 severity and susceptibility and genetic risk factors: A systematic review of the literature. **Gene**, 836:146674, 2022.

ISLAM, K. U.; A-ELGADIR, T. M. E.; AFAQ, S.; *et al.* Molecular and Clinical Aspects of COVID-19 Vaccines and Other Therapeutic Interventions Apropos Emerging Variants of Concern. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. December, p. 1–16, 2021.

IVANOV KA, THIEL V, DOBBE JC, VAN DER MEER Y, SNIJDER EJ, ZIEBUHR J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. **J Virol**. v.78(11):5619-5632, 2004.

JOHN, G.; SAHAJPAL, N. S.; MONDAL, A. K.; *et al.* Next-generation sequencing (Ngs) in covid-19: A tool for sars-cov-2 diagnosis, monitoring new strains and phylodynamic modeling in molecular epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 845–867, 2021.

**Johns Hopkins University. Coronavirus COVID-19 global cases by Johns Hopkins CSSE.** Disponível em: <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>. Acesso em: 03/06/2022.

JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B.; CONSULTING, B.; AVENUE, J.; BEACH, M. Vaccine Process Technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, 2012.

JUNQUEIRA, P. L.; FRANCO, A. C. G.; GONÇALVES, M. S.; *et al.* Alterações da coagulação na COVID-19. **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, p. 1–11, 2020.

Karpiński TM, Ożarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, *et al.* The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines. **Theranostics**, v. 11(4), 1690, 2021.

KATO, T.; TAKAMI, Y.; DEO, V. K.; *et al.* Preparation of virus-like particle mimetic nanovesicles displaying the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus using insect cells. **Journal of Biotechnology**, v. 306 p. 177-184, 2019.

KHANDKER, S. S.; GODMAN, B.; JAWAD, I.; *et al.* A systematic review on covid-19 vaccine strategies, their effectiveness, and issues. **Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1–37, 2021.

KORBER, B.; FISCHER, W. M.; GNANAKARAN, S.; *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 812- 827.e19, 2020.

KWON, D. Antibody-laden Nasal spray Could Provide COVID protection and Treatment. **Nature**. June, 2021.

LA ROSA, G.; BRANDTNER, D.; MANCINI, P.; *et al.* Key sars-cov-2 mutations of alpha, gamma, and eta variants detected in urban wastewaters in italy by long-read amplicon sequencing based on nanopore technology. **Water (Switzerland)**, v. 13, n. 18, 2021.

LAI, M.M.; PERLMAN, S.; ANDERSON, L. Coronaviridae. In **Fields Virology**; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, v. 1, pp. 1305–1318, 2007.

LAUE, M.; KAUTER, A.; HOFFMANN, T.; *et al.* Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2 - What Do They Mean? **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 325, n. 6, p. 529–531, 2021.

LAZAREVIC, I.; PRAVICA, V.; MILJANOVIC, D.; CUPIC, M. Immune evasion of sars-cov-2 emerging variants: What have we learnt so far? **Viruses**, v. 13, n. 7, 2021.

LEVIN, M. J.; USTIANOWSKI, A.; DE WIT, S.; *et al.* Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab Cilgavimab) for *Prevention* of Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, 2022.

LI, J.; LAI, S.; GAO, G. F.; *et al.* . The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 600, n. 7889, p. 408–418, 2021.

LI, Q.; WU, J.; NIE, J.; *et al.* The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1284- 1294.e9, 2020.

LITTLER DR, GULLY BS, COLSON RN, ROSSJOHN J. Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9. **iScience**, v.23(7):101258, 2020.

LIU, J.; LIU, Y.; XIA, H.; *et al.* BNT162b2-elicited neutralization of B.1.617 and other SARS-CoV-2 variants. **Nature**, v. 596, n. 7871, p. 273–275, 2021.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; *et al* .Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

LUNDSTROM, K.; SEYRAN, M.; PIZZOL, D.; *et al*.The Importance of Research on the Origin of SARS-CoV-2". **USF Libraries Florida COVID Research Collection publications**, 2020.

MAGAZINE, N.; ZHANG, T.; WU, Y.; *et al*. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Viruses**, v. 14, n. 3, 2022.

MALIK, Y. A. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 42, n. 1, p. 3–11, 2020.

MARIANO, G.; FARTHING, R. J.; LALE-FARJAT, S. L. M.; BERGERON, J. R. C. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. December, 2020.

MATTA, G. C.; REGO, S.; SOUTO, E.P.; *et al*. Os impactos sociais da Covid-19 no Brasil: populações *vulnerabilizadas* e respostas à pandemia. **Fiocruz**. p. 137-148, 2021.

MEYEROWITZ, E. A.; RICHTERMAN, A.; GANDHI, R. T.; *et al* .Transmission of sars-cov-2: A review of viral, host, and environmental factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 1, p. 69–79, 2021.

MIELECH AM, CHEN Y, MESECAR AD, BAKER SC. Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. **Virus Res**. v.194:184-190, 2014.

MINSKAIA E, HERTZIG T, GORBALENYA AE, *et al*. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.103(13):5108-5113, 2006.

MOORE JB, JUNE CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science**. 2020;368(6490):473-474.

MONAJJEMI, M.; SAYINER, H. S.; KANDEMIRLI, F.; *et al*. An overview on lambda, epsilon, kappa, iota and zeta variants of covid-19 and its probability to merge with delta & delta plus, why it is a concern. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 6895–6914, 2022.

MS – Ministério da Saúde do Brasil. COVID-19 - Painel Coronavírus, Brasília :2021. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16/03/2022

MULLIGAN, M. J.; LYKE, K. E.; KITCHIN, N.; *et al*. Phase I / II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. **Nature**, v. 586, n. June, 2020.

MUUS C, LUECKEN MD, ERASLAN G, *et al.* Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. **Nat Med**, v.27(3):546-559, 2021.

NARAYANAN K, RAMIREZ SI, LOKUGAMAGE KG, MAKINO S. Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. **Virus Res.**, v.202:89-100, 2015.

NATHANIELSZ, J.; TOH, Z. Q.; DO, L. A. H.; MULHOLLAND, K.; LICCIARDI, P. V. SARS-CoV-2 infection in children and implications for vaccination. **Pediatric Research**, n. June, p. 1–11, 2022.

OLIVEIRA, P. R. S.; TAVARES, N. M. Resposta imune humoral na COVID-19. **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, p. 1–28, 2020.

OOSTRA M, TE LINTELO EG, DEIJS M, VERHEIJE MH, ROTTIER PJ, DE HAAN CA. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. **J Virol.**, v.81(22):12323-12336, 2007.

O'TOOLE Á, HILL V, PYBUS OG, *et al.* Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2 with grinch. **Wellcome Open Res.** 2021;6:121.

PERIWAL, N.; RATHOD, S. B.; SARMA, S.; *et al.* Time Series Analysis of SARS-CoV-2 Genomes and Correlations among Highly Prevalent Mutations. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. 1–21, 2022.

PITRE, T.; ALSTINE, R. V.; CHICK, G.; *et al.* Antiviral drug treatment for nonsevere COVID-19: a systematic review and network meta-analysis. **CMAJ**, v.194, n. 28, p. 969-980, 2022.

QU, P.; EVANS, J. P.; FARAONE, J.; *et al.* Distinct Neutralizing Antibody Escape of SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7 and BA.2.75.2 **bioRxiv**, 2022.

RAJ R. Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. **Biochem Biophys Rep.**, v.25:100847, 2020.

RAMANATHAN, K.; ANTOGNINI, D.; COMBES, A.; *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 20, p. 497–506, 2020.

RAVI, N.; CORTADE, D. L.; NG, E.; WANG, S. X. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVI-19 testing landscape January, **Biosensors and Bioelectronics**, 2020.

REDONDO, N.; ZALDÍVAR-LÓPEZ, S.; GARRIDO, J. J.; MONTOYA, M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. July, p. 1–8, 2021.

RESENDE, P. C.; GRÄF, T.; PAIXÃO, A. C. D.; *et al* .A potential sars-cov-2 variant of interest (Voi) harboring mutation e484k in the spike protein was identified within lineage b.1.1.33 circulating in Brazil. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 1–7, 2021.

RESENDE, P. C.; NAVECA, F. G.; LINS, R. D.; *et al* .The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)-terminal domain of the spike protein. **Virus Evolution**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2021.

REYNA-VILLASMIL, E.; CAPONCELLO, M. G.; MALDONADO, N.; *et al* . Association of Patients Epidemiological Characteristics and Comorbidities with Severity and Related Mortality Risk of SARS-CoV-2 Infection :Results of an Umbrella Systematic Review and Meta-Analysis. **Biomedicines**. 10(10):2437, 2022.

ROCHMAN, N. D.; WOLF, Y.; FAURE, G.; *et al* .Ongoing global and regional adaptive evolution of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 29, 2021.

ROHAIM, M. A.; EL NAGGAR, R. F.; CLAYTON, E.; MUNIR, M. Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, n. November 2020.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, n. February, 2020.

RUIZ-RODRIGUEZ, P.; FRANCÉS-GÓMEZ, C.; CHINER-OMS, Á.; *et al* . Evolutionary and Phenotypic Characterization of Two Spike Mutations in European Lineage 20E of SARS-CoV-2. **mBio**, v. 12, p.1-19, November/December 2021.

RUIZ-STERBERG ÁM, CHAPARRO-SOLANO HM, ALBORNÓZ LL, *et al* . Genomic characterization of SARS-CoV-2 and its association with clinical outcomes: a 1-year longitudinal study of the pandemic in Colombia. **Int J Infect Dis**.

SANTOS, T. A; TAVARES, N. M.; MENGEL, J. Imunopatogênese da COVID-19. **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, Salvador: **Edufba**, v. 1, 2020.

**SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Centers for Disease Control and Prevention.** Disponível em: [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019ncov/variants/variantinfo.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-surveillance%2Fvariant-info.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019ncov/variants/variantinfo.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fcases-updates%2Fvariant-surveillance%2Fvariant-info.html). Acesso em: 30/08/2021.

SATARKER S, NAMPOOTHIRI M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. **Arch Med Res.**, v.51(6):482-491, 2020.

SCOVINO, A. M.; DAHAB, E. C.; VIEIRA, G. F.; *et al.* SARS-CoV-2's Variants of Concern: A Brief Characterization. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. July, p. 1–8, 2022.

SESA/PR – Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná. Plano estadual de vacinação contra a COVID-19. 10ed, 2022. Disponível em: [https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2022-07/plano\\_estadual\\_vacinacao\\_contra\\_a\\_COVID-19\\_-\\_10\\_ed\\_11-07-22.pdf](https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2022-07/plano_estadual_vacinacao_contra_a_COVID-19_-_10_ed_11-07-22.pdf). Acessado em novembro de 2022.

SHANG, J.; YE, G.; SHI, K.; *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, 2020.

SHANTANAM, S. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **The Annual Review of Virology**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

SHAO W, CHEN X, ZHENG C, *et al.* Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern in real-world: a literature review and meta-analysis. **Emerg Microbes Infect.** 2022;11(1):2383-2392.

SHARUN, K.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; *et al.* Emerging SARS-CoV-2 variants: impact on vaccine efficacy and neutralizing antibodies. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 17, n. 10, p. 3491–3494, 2021.

SHIN, M. D. SHUKLA, S.; CHUNG, Y. H.; *et al.* COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. **Nature Nanotechnology**, v. 15 p. 656-655, 2020.

SIMNANI, F. Z.; SINGH, D.; KAUR, R. COVID-19 phase 4 vaccine candidates, effectiveness on SARS-CoV-2 variants, neutralizing antibody, rare side effects, traditional and nano-based vaccine platforms: a review3. **Biotech**, v. 12, n. 15 2022.

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

SNIJDER, E. J.; LIMPENS, R. W. A. L.; WILDE, A. H.; *et al.* A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. **PLoS Biology**, v. 18, n. 6, p. 1–25, 2020.

SMS-Curitiba. Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba. Painel COVID-19 Curitiba. Centro de epidemiologia. Disponível em: <<https://imunizaja.curitiba.pr.gov.br/PainelCovid/>>. Acessado em novembro de 2022.

SOUZA, W. M. DE; BUSS, L. F.; CANDIDO, S.; *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. August, p. 856–865, 2020.

STARR, T. N.; GREANEY, A. J.; HILTON, S. K.; *et al.* Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1295- 1310.e20, 2020.

STERTZ, S.; REICHLT, M.; SPIEGEL, M.; *et al.* The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 304–315, 2007.

STRIZOVA Z, SMETANOVA J, BARTUNKOVA J, MILOTA T. Principles and Challenges in anti-COVID-19 Vaccine Development. **Int Arch Allergy Immunol**. v.182(4):339-349, 2021.

STRUYF, T.; DEEKS, J.J.; DINNES, J. *et al.* Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19. **Cochrane Database Syst** , v. 19, 2021.

SUN, J.; ZHENG, Q.; MADHIRA, V.; *et al.* Association Between Immune Dysfunction and COVID-19 Breakthrough Infection After SARS-CoV-2 Vaccination in the US. **JAMA Internal Medicine**, v. 182 , n. 2, p. 153–162, 2022.

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis**. 2. ed. 121 p – Brasília, 2022. Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_nacional\\_operacionalizacao\\_vacinacao\\_covid19.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_operacionalizacao_vacinacao_covid19.pdf) ISBN 978-65-5993-316-7. Acessado em novembro de 2022.

TABLIZO FA, KIM KM, LAPID CM, *et al.* Genome sequencing and analysis of an emergent SARS-CoV-2 variant characterized by multiple spike protein mutations detected from the Central Visayas Region of the Philippines. medRxiv. Published online March 6, 2021. 10.1101/2021.03.03.21252812

TAN YW, FUNG TS, SHEN H, HUANG M, LIU DX. Coronavirus infectious bronchitis virus non-structural proteins 8 and 12 form stable complex independent of the non-translated regions of viral RNA and other viral proteins. **Virology**, v.513:75-84, 2018.

TANG, X.; WU, C.; LI, X.; *et al.* On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. **Natl Sci Rev**, v. 7, n. 6, p. 1012–1023, 2020.

TANONAKA, K.; MARUNOUCHI, T. Angiotensin-converting enzyme 2. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 147, n. 2, p. 120–121, 2016.

TAYLOR, P. C.; ADAMS, A. C.; HUFFORD, M. M.; *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v.21 p. 382, 2021.

TE VELTHUIS AJ, ARNOLD JJ, CAMERON CE, VAN DEN WORM SH, SNIJDER EJ. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent

[published correction appears in *Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res.*, v.38(1):203-214, 2010.

THOMSON, E. C.; ROSEN, L. E.; SHEPHERD, J. G.; *et al.* The circulating SARS-CoV-2 spike variant N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. *bioRxiv*, November 5, 2020.

TU, Y. F.; CHIEN, C.; YARMISHYN, A. A.; *et al.* A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 7, 2020.

TULI, H. S.; SAK, K.; AGGARWAL, P.; *et al.* Molecular Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Hazardous and More Hazardous Strains Behind the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Their Targeting by Drugs and Vaccines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, n. December, p. 1–13, 2021.

VAN DOREMALEN N, SCHULZ JE, ADNEY DR, *et al.* Efficacy of ChAdOx1 vaccines against SARS-CoV-2 Variants of Concern Beta, Delta and Omicron in the Syrian hamster model. Preprint. *Res Sq.* 2022.

VAN DORP, L.; ACMAN, M.; RICHARD, D.; *et al.* Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 83, n. April, p. 104351, 2020.

VAN EGEREN, D. NOVOKHODKO, A.; STODDARD, M.; *et al.* Controlling long-term SARS-CoV-2 infections can slow viral evolution and reduce the risk of treatment failure. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

VOLZ, E.; MISHRA, S.; CHAND, M.; *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2. *Nature*, v. 593, n. May, 2021.

WALENSKY, R.; WALKE, H. T.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 Variants of Concern in the United States Challenges and Opportunities. *Jama*, v. 325, p. 137-138, 2021.

WALLS, A. C.; PARK, Y.; TORTORICI, M. A.; *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 281-292.e6, 2020.

WANG, M. Y.; ZHAO, R.; GAO, L.; *et al.* SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, n. November, p. 1–17, 2020.

WANGA, V.; GERDES, M. E.; SHI, D. S.; *et al.* Characteristics and Clinical Outcomes of Children and Adolescents Aged <18 Years Hospitalized with COVID-19 — Six Hospitals, United States, July–August 2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 70, n. 5152, p. 1766–1772, 2021.

WATANABE, Y.; ALLEN, J. D.; WRAPP, D.; MCLELLAN, J. S.; CRISPIN, M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. **Science**, v. 369, n. 6501, p. 330–333, 2020.

WHO – World Health Organization. **Coronavirus disease 2019 (Covid-19): situation report 51**. Geneva: World Health Organization; 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331475/nCoVsitrep>. Acesso em: 11/03/2022.

WHO - World Health Organization. Guidance for surveillance of SARS-CoV-2 variants: interim guidance. 2021;(August):18.1.

WHO – World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants (2022).[internet]. Available in <<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>; Acesso em: 11/03/2022.

WOLF, J. M.; KIPPER, D.; BORGES, G.; *et al.* Temporal spread and evolution of SARS-CoV-2 in the second pandemic wave in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 3, p. 926–936, 2022.

WOLFF, G.; LIMPENS, R. W. A. L.; ZEVENHOVEN-DOBBE, J. C.; *et al.* A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. **Science**, v. 369, n. 6509, p. 1395–1398, 2020.

WRAPP, D.; WANG, N.; CORBETT, K. S.; *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

XIAO Y, MA Q, RESTLE T, *et al.* Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity. **J Virol**. v.86(8):4444-4454, 2012.

XU, X.; WU, X.; JIANG, X.; *et al.* Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus ( SARS-Cov-2 ) outside of Wuhan , China : retrospective case series. **BMJ**, p. 1–7, 2020.

XUEMEI H, HONG W, XIANGYU P, GUANGWEN L, XIawei W. SARS-CoV-2 Omicron variant: characteristics and prevention. **MedComm**. 2021;2(4):838-845.

YAN, W.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; HE, B.; CHENG, W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

YANG, W., DANG, X., WANG, Q., *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription RT-LAMP method. **MedRxiv**. 2020.

ZHANG, J.; CAI, Y.; XIAO, T.; *et al.* Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. **Science**, v. 530, n. April, p. 525–530, 2021a.

ZHANG, Q., XIANG, R., HUO, S. *et al.* Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021b.

ZHANG, L.; RICHARDS, A.; BARRASA, M. I.; *et al.* Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. **PNAS**, v. 118, n. 21, 2021c.

ZHONG, J., TANG, J., YE, C. The immunology of COVID-19: is immune modulation an option for treatment? **Lancet Rheumatol.**, V.2, n. 7, p. e428-436, 2020.

ZHOU, P.; YANG, X.; WANG, X.; *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

## APÊNDICE

### CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O DOUTORADO

#### Artigos científicos

1. Domino NR, **Lapinski BA**, ZHEN F, Yamaguto G, Vitor E, Pereira LA, Genelould G, Ferreira LH, Nogueira MB, Raboni SM. Clinical and epidemiological characteristics of admissions for COVID 19 at first and second wave of the pandemic in a tertiary hospital in southern Brazil. 2022 (artigo em submissão)
2. Lissa SM, **Lapinski BA**, Debur MC, Presibella M, Becker G, Marques N, Graf ME, Reda S, Raboni SM, Pereira LA, de Almeida BMM, Nogueira MB. Burden of viral respiratory infections on hospitalized pregnant women in southern Brazil, 2015-2018 – a cross-sectional study. 2022 (artigo submetido).
3. Pereira LA, **Lapinski BA**, Santos JS, Debur MC, Petterle RR, Nogueira MB, Vidal LRR, de Almeida SM, Raboni SM. Influenza A infections – predictors of disease severity. 2021 (submetido).
4. Pereira LA, **Lapinski BA**, Debur MC, Santos JS, Petterle RR, Nogueira MB, Vidal LRR, de Almeida SM, Raboni SM. Standardization of a high-performance RT-qPCR for viral load absolute quantification of influenza A. *J Virol Methods*. 2022;301:114439. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114439
5. Arowolo KO, Ayolabi CI, Adeleye IA, **Lapinski B**, Santos JS, Raboni SM. Molecular epidemiology of astrovirus in children with gastroenteritis in southwestern Nigeria. *Arch Virol*. 2020;165(11):2461-2469. doi:10.1007/s00705-020-04741-0
6. de Almeida SM, Furlan S, Cretella A, **Lapinski B**, Nogueira K, Cogo LL, Vidal L, Nogueira, MB. Comparison of Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Differential

Diagnosis of Acute Bacterial and Viral Meningitis with Atypical Cerebrospinal Fluid Characteristics. *Med Princ Pract.* 2020;29(3):244-254. doi:10.1159/000501925

7. Faggion HZ, Leotte J, Trombetta H, Pereira LA, **Lapinski BA**, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida BM, Petterle RR, Raboni SM. Influenza Sentinel Surveillance and Severe Acute Respiratory Infection in a Reference Hospital in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019;53:e20170498. Published 2019 Dec 20. doi:10.1590/0037-8682-0498-2017
8. Arowolo KO, Ayolabi CI, **Lapinski B**, Santos JS, Raboni SM. Epidemiology of enteric viruses in children with gastroenteritis in Ogun State, Nigeria. *J Med Virol.* 2019;91(6):1022-1029. doi:10.1002/jmv.25399

### Eventos científicos

1. Apresentação do Prêmio HGP – Congresso Nacional. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. Influenza A disease severity – a retrospective cross-sectional study, Southern Brazil. **Sociedade Brasileira de Virologia** (2021).
2. Pôster - XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. Burden of viral respiratory infections on hospitalized pregnant women in Southern Brazil, 2015-2018 – a cross-sectional study. **Sociedade Brasileira de Virologia** (2021).
3. Pôster – ISIRV-WHO Virtual Conference COVID-19, Influenza and RSV: surveillance-informed prevention and treatment. Molecular epidemiology of SARS-COV-2 from march/2020 to august/2021 in a tertiary hospital in southern Brazil. **International Society for Influenza and Other Respiratory Viruses Diseases** (2021).
4. Pôster – ISIRV-WHO Virtual Conference COVID-19, Influenza and RSV: surveillance-informed prevention and treatment. Influenza A viral load is

associated with disease severity - a retrospective cross-sectional study in a tertiary hospital in southern Brazil. **International Society for Influenza and Other Respiratory Viruses Diseases** (2021).

5. Pôster – ISIRV-WHO Virtual Conference COVID-19, Influenza and RSV: surveillance-informed prevention and treatment. Influenza A disease severity: proposition of a prognostic score. **International Society for Influenza and Other Respiratory Viruses Diseases** (2021).

## Projetos de Pesquisa

### 2021 – atual

Integrante – Análise comparativa do perfil clínico epidemiológico dos pacientes com COVID-19 em dois diferentes momentos da pandemia em um hospital no sul do Brasil. **Pesquisador Responsável:** Sonia Mara Raboni.

Integrante – Projeto avaliação clínica e laboratorial em pacientes com COVID-19 com esquema vacinal anti-SARS-CoV-2 completo e hospitalizados no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR). **Pesquisador Responsável:** Sonia Mara Raboni.

Integrante – Projeto persistência do SARS-CoV2 e evolução genética viral em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas no Complexo Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná. **Pesquisador Responsável:** Giovanni Luís Breda.

Integrante – Projeto síndrome respiratória aguda grave: epidemiologia molecular das infecções respiratórias virais e vigilância da emergência de variantes resistentes aos antivirais. **Pesquisador Responsável:** Sonia Mara Raboni.

### 2020 – atual

Integrante – Projeto frequência de SARS-CoV-2 entre profissionais da saúde, diretamente envolvidos no atendimento e manipulação de amostras respiratórias de pacientes com suspeita de COVID-19. **Pesquisador Responsável:** Meri Bordignon Nogueira.