

Directrizes sobre ferramentas para detecção e vigilância de variantes do SARS-CoV-2

Directrizes provisórias

Versão 1.0, 12 de Agosto de 2021

1. Introdução

À medida que a pandemia prossegue a nível mundial, o vírus SARS-CoV-2 continua a sofrer mutações e a emergência de variantes que diferem da estirpe original de Wuhan continuará a surgir, mas nem todas as variantes virais geradas através da mutação do vírus são importantes ou têm relevância imediata para a saúde pública. No entanto, as variantes com mutações específicas que afectam a forma como o vírus se comporta são agora consideradas Variantes de Interesse (VI) ou Variantes Preocupantes (VP), conforme as implicações que poderão ter para a saúde pública (1). Actualmente, existem 4 VP em circulação a nível mundial: Variantes Alfa, Beta, Gama e Delta. Existem ainda 4 VI: Eta, Iota, Capa e Lambda, que estão a ser monitorizadas e investigadas para se determinar se cumprem os critérios de VP. As VP diferem do vírus original de Wuhan porque contêm mutações no seu genoma. No entanto, são de interesse específico as mutações observadas no gene Spike (S) do vírus (**Tabela 1**). O gene viral S é importante, uma vez que codifica a proteína Spike, ou seja, a molécula que entra em contacto com o vírus e que permite a sua penetração em células hospedeiras susceptíveis, provocando infecção. Algumas mutações no gene S podem levar a alterações na proteína Spike, resultando na inibição do contacto e da penetração do vírus nas células humanas; no entanto, no caso das VP, estas contêm mutações no gene S que propiciam o processo de contacto e de penetração nas células humanas, aumentando a transmissibilidade do vírus.

Tabela 1: Posições de aminoácidos de mutações no gene S de 4 VP (variantes Alfa, Beta, Gama e Delta) e respectivas sublinhagens*

VP (Linhagem Pango) sublinhagem	Posições de aminoácidos de mutações no gene S de VP																								
	L	T	T	P	del	D	D	del	del	R	D	L	del	R	K	K	L	T	E	N	A	P	P	A	S
	1	1	2	2	H69	8	1	144-	157-	1	2	2	241-	2	4	4	4	4	5	5	6	6	7	9	
	8	9	0	6	-	0	3	145	158	9	1	4	243	4	1	1	5	7	8	0	7	8	8	0	5
	F	R	N	S	V70	A	8			S	G	H		I	N	T	R	K	K	Y	D	H	R	V	N
Alfa (B.1.1.7)					✓			✓												✓	✓	✓			
B.1.1.7 +E484K					✓			✓											✓	✓	✓	✓			
B.1.1.7 +L452R					✓			✓									✓			✓	✓	✓			
Beta (B.1.351)						✓					✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓					✓
B.1.351.2	✓					✓					✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓					✓
B.1.351.3	✓					✓					✓	✓	✓	✓	✓				✓	✓					✓
Gama (P1)	✓		✓	✓			✓			✓						✓			✓	✓					
P.1.1	✓		✓	✓			✓			✓						✓			✓	✓					
P.1.2	✓		✓	✓			✓			✓						✓			✓	✓					
Delta (B.1.617.2)		✓							✓								✓	✓						✓	✓
AY.1		✓						✓	✓						✓		✓	✓					✓	✓	✓
AY.2		✓						✓	✓						✓		✓	✓					✓	✓	✓

*Mutações noutras regiões do genoma podem também ser informativas na detecção de VI/VP conhecidas.

Estão disponíveis várias ferramentas para detecção de mutações características de vírus definidas como VI/VP. O objectivo deste documento é apresentar os métodos e as ferramentas disponíveis para o rastreio e sequenciamento de amostras de pacientes, com vista à detecção de VP ou de VI, com especial enfoque naqueles que oferecem um tempo de resposta rápido, de modo a permitir uma rápida implementação de acções de saúde pública para o controlo da COVID-19.

2. VP e VI designadas pela OMS

Até à data, a OMS designou 4 génotipos de SARS-CoV-2 que correspondem à definição de VP em vigor: i) contêm mutações divergentes da estirpe de Wuhan; e ii) cujas mutações têm impacto em um ou mais aspectos da infecção viral com relevância para a saúde pública. A OMS designou ainda 4 génotipos do vírus como VI. No entanto, a situação é extremamente dinâmica, por isso a informação relativa às definições e denominações em vigor de VI e VP, bem como a lista actual de VI/VP, podem ser consultadas [aqui \(1\)](#). Cada variante terá mutações ou um conjunto de mutações característicos que são exclusivos a essa variante em particular. Um resumo dos perfis de mutação das VP é apresentado abaixo (**Tabela 1**).

3. Testes de rastreio para detecção de VP/VI conhecidas

Em geral, estes ensaios e abordagens utilizam testes PCR para detectar mutações ou características específicas, tais como inserções, deleções e mutações pontuais no genoma do SARS-CoV-2 que são características de uma VP/VI específica. Actualmente, os fabricantes estão a focar-se e a direccionar os ensaios para mutações no gene S. No entanto, as mutações características de uma VP/VI específica podem ocorrer em qualquer parte do genoma do SARS-CoV-2 e podem ser visadas como região para detecção de VP/VI.

Nota: estes testes **NÃO PODEM** ser utilizados para o diagnóstico clínico do SARS-CoV-2 e são utilizados apenas para fins de investigação (RUO). Consulte a secção sobre **Escolher um teste de rastreio PCR para detecção de VP/VI** para obter mais informações sobre como seleccionar o teste que melhor se adapta às suas necessidades.

Falhas do alvo com PCR

Os testes de diagnóstico PCR actuais visam uma variedade de genes do SARS-CoV-2, e a grande maioria das sequências visadas estão localizadas em regiões altamente conservadas do genoma do SARS-CoV-2. As regiões altamente conservadas são menos propensas a sofrer mutações; portanto, existe uma elevada probabilidade de que o teste de diagnóstico continuará a ser exacto na presença de variantes.

O gene S é um dos genes estruturais do vírus que codifica uma proteína localizada à superfície do vírus SARS-CoV-2. Esta proteína é fundamental na ligação entre o vírus e uma célula hospedeira que consiga infectar.

Devido à sua exposição no exterior do vírus, a proteína S é também uma das partes do vírus que o sistema imunitário reconhece como estranha. Por conseguinte, este gene acumula mais mutações do que outras regiões do genoma do SARS-CoV-2. Uma vez que mais mutações se acumularão no gene S à medida que este é sujeito a pressão selectiva (Tabela 1), quando comparado com outras áreas do genoma, os testes de diagnóstico PCR raramente visam este gene. No entanto, alguns testes visam o gene S como alvo de amplificação.

Se o teste PCR incluir iniciadores de polimerização (ou *primers*) ou sondas que estabelecem ligação com a área de mutação(ões), o sinal produzido poderá ser mais fraco ou poder-se-á falhar por completo o alvo a amplificar: este processo é denominado por falha do alvo ou desconexão com o gene-alvo. Esta ocorrência pode ser indicativa da presença de uma variante na amostra testada.

Falha do alvo do gene S (SGTF)

Uma mutação significativa verificada no gene S é a deleção de 6 nucleotídeos nas posições dos nucleotídeos 207-212 ($\Delta 69-70$) (realçada a amarelo na Tabela 1) do gene S. Esta mutação observa-se na VP Alfa (B.1.117) e respectivas sublinhagens, mas não noutras VP; por isso, poderá ser explorada para fins de detecção de VP. No entanto, é importante referir que esta deleção está presente na VI Eta, e que pode estar presente noutras variantes que ainda não tenham sido classificadas como VI/VP. Actualmente, um dos testes comerciais (aprovado pela lista de utilização de emergência (EUL) da OMS (2), ThermoFisher, *kit* TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR) visa 3 genes do SARS-CoV-2, incluindo o gene S, especificamente na região da mutação $\Delta 69-70$. Por conseguinte, se a amostra testada com este teste contiver a VP Alfa, o alvo do gene S será amplificado de forma ténue ou não será amplificado de todo, um processo denominado por **desconexão com o gene S ou falha do alvo do gene S (SGTF)**, sugerindo assim a presença da VP Alfa na amostra, ou de outra variante que contenha esta deleção.

Vale a pena rever *in silico* os detalhes do teste de diagnóstico TAAN que está a utilizar para determinar se o teste visa o(s) gene(s)-alvo S e, se assim for, determinar se os iniciadores/as sondas são afectados por mutações específicas do gene S presentes nas VI/VP. É provável que surjam obstáculos a este processo, uma vez que as sequências de iniciadores/sondas constituem conteúdo confidencial. A GISAID permite a verificação de sequências em relação a iniciadores/sondas de protocolos de PCR disponíveis publicamente (por exemplo, CDC dos EUA, Charité, Hong Kong, etc.), ou vice-versa. Se conhecer a sequência do iniciador/da sonda do teste que está a utilizar, pode também verificar se as sequências disponíveis ou as sequências de referência contêm alguma mutação no ponto de ligação do iniciador com o gene-alvo².

² O PrimerChecker está disponível no site da GISAID (<https://www.gisaid.org/>) e é necessário um *login* no site da GISAID para aceder a esta ferramenta.

Testes de rastreio de PNU

O rastreio de polimorfismos de nucleotídeo único (PNU) pode ser realizado para detectar VI/VP, e estão disponíveis testes deste tipo no mercado. As mutações que visam especificamente a identificação de VP podem estar presentes no gene S ou noutros genes onde ocorrem mutações típicas. São necessários controlos positivos adequados de forma a garantir resultados válidos. As escolhas sobre as mutações a visar devem ser feitas cuidadosamente no caso da utilização destes testes de rastreio, uma vez que algumas linhagens de SARS-CoV-2 em circulação, incluindo linhagens não-VI/VP, podem conter algumas das mesmas mutações associadas às VI/VP. Por exemplo, existem linhagens em circulação que contêm a mutação N501Y mas que não são consideradas VI/VP.

Testes de rastreio de PNU utilizando a análise da curva de aquecimento

Várias plataformas de PCR em tempo real têm capacidade para utilizar a **análise da curva de aquecimento** para detectar genótipos (3). Actualmente, foram desenvolvidos testes para detectar as seguintes mutações utilizando a análise da curva de aquecimento: H66D, A67V, Δ69-70, D253G, K417N, K417T, N439K, L452R, Y453F, T478K E484K, E484Q, N501Y, A570D, D614G, P681H, P681R, F888L, Q949R e V1176F. Estes testes detectam mutações que incluem as 4 VP: Alfa, Beta, Gama e Delta, e 2 VI, Eta e Iota (4). No entanto, é importante referir que esta lista pode aumentar ou diminuir devido à natureza dinâmica da situação.

Testes multiplex de PNU, incluindo desconexão com o gene S

Estão disponíveis comercialmente testes multiplex para detecção de múltiplas mutações em VP e VI que poderão ser capazes de diferenciar entre a presença provável de duas ou mais VI/VP numa única reacção. Estes testes visam mutações no genoma do SARS-CoV-2 que poderão ser exclusivas das VP ou VI. Estas mutações poderão ou não estar presentes no gene S, mas poderão também estar presentes noutras partes do genoma viral, e são informativas no que diz respeito à detecção de uma VP ou VI. Desde que foi feita a primeira caracterização das VI/VP, muitos testes entraram no mercado e estão disponíveis para o rastreio de amostras positivas de SARS-CoV-2.

Existem também protocolos desenvolvidos em laboratório que foram concebidos para rastrear VI/VP. Por exemplo, foi desenvolvido um teste PCR por um laboratório brasileiro que visa uma detecção no gene nsp6, comum às VI/VP Alfa, Beta, Gama e Lambda, que pode ser usado para rastrear essas VI/VP, mas que não é capaz de diferenciar entre cada uma das VI/VP (5).

Consulte a secção sobre [Escolher um teste de rastreio PCR para detecção de VP](#) para obter mais informações sobre como seleccionar o teste que melhor se adapta às suas necessidades.

Nota: estes testes **NÃO PODEM** ser utilizados para o diagnóstico clínico do SARS-CoV-2 e são utilizados apenas para fins de investigação (RUO).

4. Sequenciamento de ADN

Sequenciamento do genoma inteiro (WGS)

O sequenciamento do genoma inteiro tornou-se mais acessível aos laboratórios com avanços tecnológicos, em particular na área do sequenciamento de nova geração (NGS). Tal como o nome indica, o WGS resultará na geração de uma sequência contígua que abrange todo o genoma viral. Esta metodologia facilita a detecção de mutações em todo o genoma do SARS-CoV-2 e pode fornecer informações importantes sobre mutações que poderão ter impacto na forma como o vírus se comporta. O sequenciamento do genoma inteiro é a melhor metodologia existente para confirmar uma VP. A tabela apresentada abaixo, retirada do documento de orientação dos Centros Europeus para Controlo de Doenças (**Tabela 2**), elenca exemplos de aplicações do WGS e as plataformas disponíveis que podem ser utilizadas. O WGS é o método mais preciso para detectar as VI/VP conhecidas; no entanto, trata-se de uma abordagem que requer uma utilização intensiva de recursos e recursos bioinformáticos, e os resultados não são imediatos – dependendo do protocolo utilizado, os resultados podem demorar até vários dias. Estão disponíveis orientações detalhadas sobre a utilização de sequenciamento no documento [WHO Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health.\(6\)](#)

Sequenciamento parcial/direccionado: Sequenciamento pelo método Sanger ou sequenciamento de nova geração com base em fragmentos amplificados

Estes métodos são um pouco mais simples e consistem em visar regiões específicas do genoma para amplificação e sequenciamento. Com estes métodos, só são amplificadas as regiões que contêm mutações informativas para a detecção de VP, e deve-se manter em mente que as mutações podem estar presentes no gene Spike ou noutras regiões do genoma do SARS-CoV-2. Para assegurar a detecção de todas as VP conhecidas, no caso de enfoque no gene S, o fragmento amplificado gerado para sequenciamento deve cobrir no mínimo todo o domínio N-terminal e o domínio de ligação ao receptor (aminoácidos 1-541, fragmento amplificado = 1623bp). Adicionalmente, devem ser considerados os fragmentos amplificados que abrangem o local de clivagem S1/S2 (posição do aminoácido 681) ou todo o gene S (aminoácidos 1-800, 2.400bp), de modo a monitorizar mutações no local de clivagem S1/S2 e noutros locais que possam ser relevantes no âmbito do gene S.

Tabela 2. Casos de utilização de plataformas de NGS no âmbito da vigilância e resposta do SARS-CoV-2 e das aplicações de sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2, e tecnologias recomendadas (7).

Aplicação	Plataformas de sequenciamento recomendadas	Abordagens recomendadas para construção de bibliotecas genómicas	Extensão de leitura recomendada	Cobertura local mínima recomendada (valor aproximado)
Padrões de transmissão, atribuição de clade/linhagem, confirmação de reinfeção, mutações fenotipicamente relevantes, apresentação de dados	MiSeq/NextSeq/iSeq/NovaSeq (Illumina), Ion Torrent (ThermoFisher), MinION (Oxford Nanopore), Sistema de sequenciamento (PacBio)	Baseada em fragmentos amplificados (ARTIC, comercial, interna)	>100 bp	>10x sobre >95% do genoma
Confirmação de reinfeção e/ou de transmissão directa (nos casos em que são necessárias variantes minoritárias)	MiSeq/NextSeq/iSeq/NovaSeq (Illumina), Série Ion S5 / Genexus (Thermo Fisher)	Baseada em fragmentos amplificados (ARTIC, comercial, interna)	>100 bp	>500x sobre >95% do genoma
Análise aprofundada do genoma (grandes indels, recombinação, reorganizações, haplótipos quasiespécies)	MinION (Oxford Nanopore), Sistema de sequenciamento (PacBio)	Baseada em fragmentos amplificados (> fragmentos 1000 bp), baseada em captura, não-direccionada	>1000 bp	>500x sobre >95% do genoma
Deteção de agentes patogénicos desconhecidos ou de estirpes altamente divergentes	MiSeq/NextSeq/iSeq/NovaSeq (Illumina), Série Ion S5 / Genexus (Thermo Fisher), MinION (Oxford Nanopore)	Sequenciamento do ARN não-direccionado, RT-PCR específicos a β -CoV	>100 bp	>5Gbp de dados por amostra

5. Critérios para seleccionar um teste de rastreio PCR para detecção de VP

O mercado de testes para detecção de mutações características de VP ou VI é e continuará a ser dinâmico à medida que o vírus continua a transformar-se. Para garantir a satisfação das suas necessidades a nível de testes/rastreio, é importante seleccionar testes adequados à sua finalidade tendo em conta o seu equipamento, experiência laboratorial e objectivos. Seguem-se algumas características que poderá ter em consideração ao escolher o tipo de teste.

- Formato utilizado – detecção/reacção de mutação única ou detecção/reacção de mutação múltipla (multiplex)? Ter em consideração quantas reacções é necessário realizar para detectar uma VP, e a forma como é feita essa detecção.
- Método de análise para detecção de mutação – o teste requer *software* especializado ou específico para detectar as mutações? Trata-se de uma simples análise com amplificação / sem amplificação? Utiliza a análise da curva de aquecimento?

- Fluoróforos usados no teste – é importante que os fluoróforos usados no teste consigam ser detectados pela sua plataforma de PCR em tempo real.
- Validação nas plataformas – verificar se o teste foi validado para a plataforma de PCR que está a utilizar, ou se existem publicações que validem esse teste na sua plataforma.

É importante referir que **nenhum dos actuais testes de rastreio de PNU nem dos protocolos de sequenciamento se destina a diagnosticar o SARS-CoV-2**. Por isso, é fundamental, como primeiro passo, começar por identificar amostras positivas de SARS-CoV-2 utilizando um teste de diagnóstico de qualidade garantida (idealmente aprovado pela EUL da OMS), p. ex. PCR e/ou TR-Ag (**ver Algoritmo**). Qualquer teste PCR escolhido para rastrear amostras com vista à detecção de mutações deve ser utilizado como segundo passo, após a detecção de casos positivos com base num teste aprovado para diagnóstico clínico, por exemplo, um teste PCR aprovado pela EUL da OMS.

6. Implementação de testes de rastreio PCR para detecção de VP

O principal papel dos testes de rastreio PCR é acelerar o processo de identificação de amostras que contêm mutações características das VI/VP nos países, de forma a permitir a rápida implementação das medidas sociais e de saúde pública para travar a transmissão do vírus, calcular a prevalência de determinada(s) mutação(ões) característica(s) de uma VI/VP, e reforçar o conjunto de dados sobre a circulação de VP a nível mundial. **A utilização de um teste PCR para detecção de VP ou VI conhecidas NÃO substitui a detecção de casos através de testes PCR ou TR-Ag aprovados pela EUL da OMS**. Em locais onde o sequenciamento de ADN não se encontra facilmente disponível, o rastreio de amostras positivas de SARS-CoV-2 para detecção de VP utilizando testes PCR deve ser considerado e acompanhado pelo sequenciamento de parte das amostras em laboratórios de referência para confirmação, se este processo estiver de acordo com as metas e os objectivos nacionais.

Do ponto de vista prático, não é necessário rastrear todas as amostras positivas de SARS-CoV-2 para detecção de VP. Pode ser rastreada uma percentagem seleccionada de amostras representativas de diferentes áreas geográficas, grupos ou categorias clínicas de doentes. É importante sequenciar uma proporção de amostras com mutações características de VP, de modo a confirmar e identificar mutações no perfil de mutação da VI/VP, para que se possam detectar quaisquer outras mutações no genoma que possam ser informativas, e também para fins de controlo de qualidade.

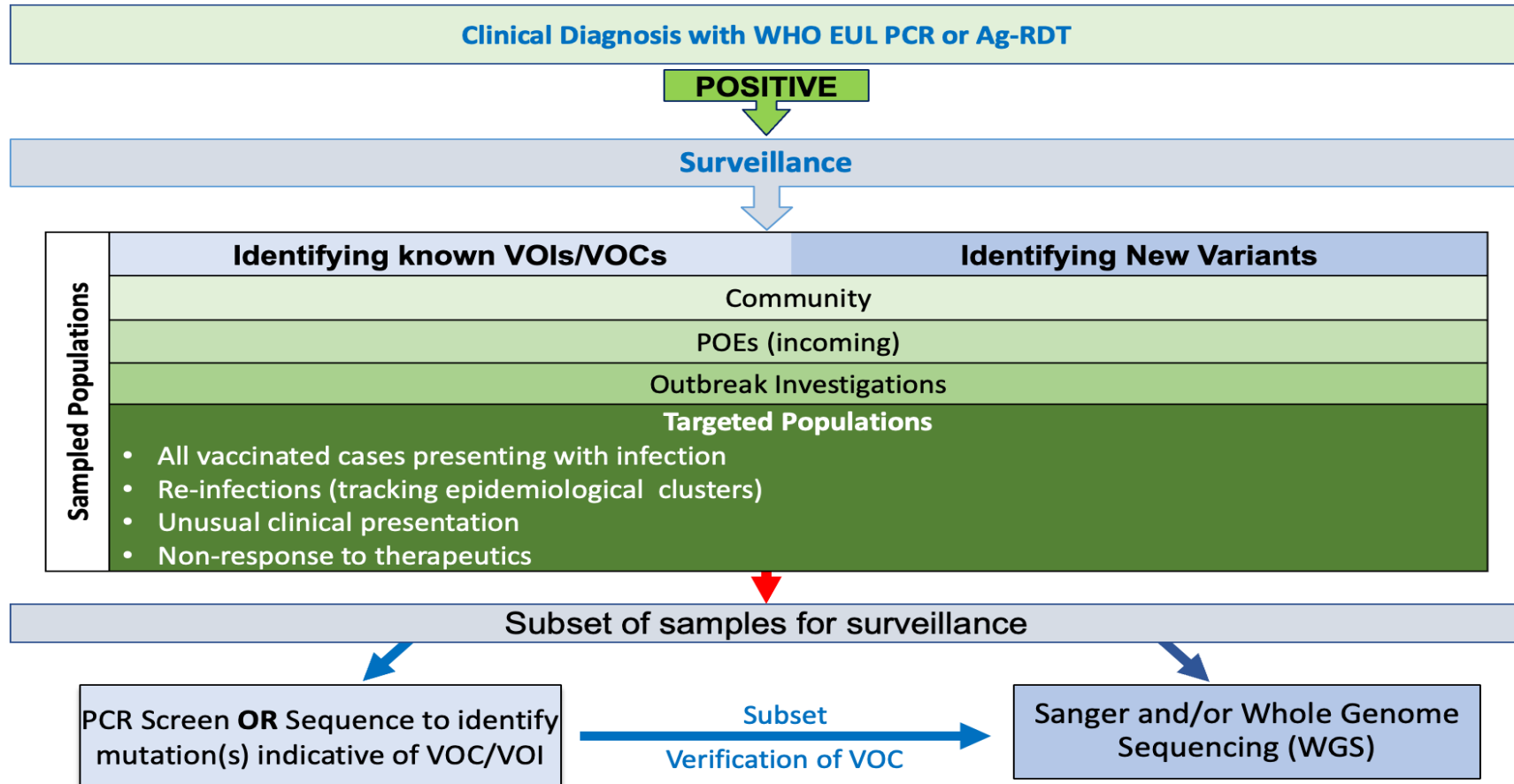
A questão de quantas amostras positivas de SARS-CoV-2 devem ser rastreadas com testes PCR para detecção de VI/VP, ou para sequenciamento com vista a rastrear a evolução do vírus, é complexa. O Escritório Regional da OMS para a África elaborou um guia que pode ser consultado [aqui](#) (8) para o ajudar a lidar com esta questão.

No entanto, ao seleccionar uma estratégia/dimensão de amostragem, particularmente em relação ao rastreio por PCR, deve considerar a capacidade laboratorial existente para efectuar testes adicionais, e deve ter em mente um plano para restringir ou reduzir o rastreio de VI/VP através de PCR, uma vez que assim que uma variante de SARS-CoV-2 mais robusta entre em circulação numa população, não demorará muito até que esta substitua as variantes existentes nessa mesma população. Se o rastreio for reduzido, continua a ser importante dar continuidade ao sequenciamento das proporções de casos positivos, com vista a acompanhar a evolução viral/deteccção de novas mutações. No âmbito da implementação, considere também a criação de sistemas de controlo de qualidade, tais como comparações interlaboratoriais, além da confirmação regular de um pequeno subconjunto de cada VP identificada pelo sequenciamento.

7. Referências

1. *Tracking SARS-CoV-2 variants*. Genebra, Suíça, Organização Mundial da Saúde, 2021 (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>, consultado a 10 de Agosto de 2021)
2. *WHO Emergency Use Listing for in vitro diagnostics (IVDs) Detecting SARS-CoV-2*, Genebra, Suíça, Organização Mundial da Saúde, 2021 (https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/210430_EUL_SARS-CoV-2_product_list.pdf, consultado a 10 de Agosto de 2021).
3. Farrar, JS., Reed GH e Wittwer, CT, 2010 , High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics, in Patrinos, GP e Ansoerge, WJ (eds.), *Molecular Diagnostics*. 2.^a ed., Elsevier Press; Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos.
4. SARS RT-PCR test kits, VirSNiP Assays, Berlim, Alemanha, TIB Molbiol, (<https://www.tib-molbiol.de/covid-19#nav-644>, consultado a 16 de Junho de 2021)
5. Naveca, F.G., Nascimento, V., de Souza, V.C. *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat Med* **27**, 1230–1238 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>
6. *WHO Genomic sequencing of SARS CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health*. Genebra, Suíça. Organização Mundial da Saúde, 2021. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>, consultado a 1 de Agosto de 2021)
7. *Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants*. Copenhaga, Dinamarca. Organização Mundial da Saúde. Escritório Regional para a Europa, Março de 2021. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/340067>, consultado a 11 de Julho de 2021)
8. *Variant Surveillance Guidance: Executive Summary*, Brazzaville, Congo. Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde para a África, 2021 (<https://www.afro.who.int/sites/default/files/Covid-19/Technical%20documents/Variant%20surveillance%20guidance%20-%20Executive%20summary.pdf>, consultado a 30 de Julho de 2021)

Estratégia para a utilização de sequenciamento de ADN e de testes de rastreio PCR para identificar mutações características de VP e para acompanhar a evolução viral.



* Os grupos especiais podem incluir doentes com apresentação ou doença invulgares, indivíduos imunocomprometidos, etc., mas devem ser determinados pelo país com base na sua situação epidemiológica específica.