



NOTA TÉCNICA

NOVAS VARIANTES DO SARS-COV-2 CIRCULANTES NO ESTADO E O IMPACTO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO



NOTA TÉCNICA

NOVAS VARIANTES DO SARS-COV-2 CIRCULANTES NO ESTADO E O IMPACTO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR PCR EM TEMPO REAL

Rômulo Pessoa e Silva¹, Marcos da Silveira Regueira Neto², Breno Caldas de Araujo¹, Klarissa Miranda Guarines¹, Michelle Melgarejo da Rosa¹, Valdir de Queiroz Balbino², Maira Galdino da Rocha Pitta¹, Michelly Cristiny Pereira¹.

- 1- Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT) – Universidade Federal de Pernambuco
- 2- Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) – Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco

Desde o dia 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a doença causada pelo coronavírus 2019 (*Coronavirus Disease 2019 - COVID-19*) como pandêmica, e apesar das medidas de prevenção e do início das campanhas de vacinação pelo mundo, o número de mortes ainda preocupa, com aproximadamente 380 mil óbitos registrados apenas no mês de janeiro de 2021 (WHO, 2021a). No Brasil, os números crescentes de infectados e de mortes causadas pelo novo coronavírus têm provocado apreensão em todas as esferas de governo. Desde o primeiro caso da COVID-19, registrado em 26 de fevereiro de 2020, até 03 de março de 2021, foram mais de 10,7 milhões de casos confirmados e mais de 259 mil mortes (WHO, 2021b; Ministério da Saúde, 2021). No estado de Pernambuco, 254 mil infectados e mais de 10,9 mil mortes já foram contabilizados (Ministério da Saúde, 2021).

O aparecimento de novas variantes do novo coronavírus (SARS-COV-2) tem causado grande alarde em diversos países em relação à sensibilidade do diagnóstico molecular e à cobertura vacinal. De acordo com dados disponíveis no GISAID (*Global initiative on sharing all influenza data*), até o momento, existem cinco variantes do SARS-CoV-2, sendo elas: VUI202012/01 GR/501Y.V1 (Reino Unido, a primeira a surgir); GH/501Y.V2 [B.1.351] (variante da África do Sul); GR/484K.V2 [P.1] (variante de Manaus, Brasil); e GH/452R.V1 [B.1.429+B.1.427] (Califórnia, EUA); e G/484K.V3 [B.1.525] (variante norueguesa). No Brasil, além da variante de Manaus, apenas a do Reino Unido, até a presente data, foi detectada e depositada no GISAID.⁵⁴

Até o presente momento, Pernambuco conta com 161 genomas sequenciados, sendo 23 disponíveis no GISAID (número obtido após a aplicação de filtros de qualidade) e 138 sequenciados pela Universidade Federal de Pernambuco. As cepas sequenciadas pela UFPE compreendem amostras coletadas entre os meses de maio e outubro de 2020, período associado à primeira onda de Covid-19 em Pernambuco. Em análise de atribuição de linhagens recentemente realizada através da plataforma PANGOLIN (*Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages*), constatou-se a circulação de pelo menos 21 linhagens, a saber: B.1.1.10; B.1.1.127; B.1.1.147; B.1.1.15; B.1.1.155; B.1.1.192; B.1.1.214; B.1.1.28; B.1.1.29; B.1.1.307; B.1.1.314; B.1.1.33; B.1.1.67; B.1.1.74; B.1.1.94; B.1.1. 173; B.1.1.212; B.1.1.117;

B.1.1.186; B e P2. As linhagens B.1.1.29 (80) e B.1.1.28 (37) apresentam-se em maior número dentre os genomas pernambucanos sequenciados.

Além dessas variantes, diversas mutações pontuais de substituição de bases, bem como deleções já foram descritas em cepas e depositadas em bancos de dados públicos. Existem diversos sistemas de *primers/probes* utilizados para a detecção do novo coronavírus pela técnica RT-qPCR. Os Centros de Referência, laboratórios de campanha e a Rede privada têm utilizado sistemas cujos alvos são principalmente os genes das proteínas Spike (S), do envelope (E) e do Nucleocapsídeo (N), em reações uniplex ou multiplex.

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da Universidade Federal de Pernambuco tem realizado o teste molecular por PCR em tempo real para o diagnóstico da COVID-19 no estado de Pernambuco, contribuindo para um melhor rastreio da doença, além de redução na transmissibilidade viral. Desde o início da Pandemia no estado, o NUPIT-UFPE já realizou 74.337 exames. O kit de *primers/probes* utilizado é o 2019-nCoV_N1/N2/RP CDC (Atlanta, USA), o qual detecta sequências da região do gene N.

A maioria das novas variantes do SARS-CoV-2 apresenta mutações importantes em vários genes do genoma viral, mas aquelas de maior significância e impacto foram detectadas na sequência gênica da SPIKE (S), que codifica uma proteína importante para a entrada do vírus nas células-alvo. A sequência abaixo mostra, em negrito e sublinhadas, as sequências dos *primers* N1/N2 utilizadas e as mutações mais frequentes encontradas na sequência do gene N (Rahman et al., 2020) (Tabela 01). Nenhuma dessas mutações está localizada na sequência dos primers utilizados.

As cepas de SARS-CoV-2 sequenciadas no estado de Pernambuco apresentam 44 sítios mutacionais no gene do nucleocapsídeo (N); apesar do quantitativo razoável, as mutações identificadas se apresentam em baixa frequência, com a maioria tendo sido detectada em apenas 0,7% dos genomas sequenciados. De um modo geral, observou-se que estas alterações não ocasionam mudanças drásticas na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo. Dentre os 161 genomas de cepas pernambucanas sequenciados, apenas quatro deles apresentaram uma mudança de nucleotídeo único (sendo que cada genoma apresentou apenas uma variação) na sequência de reconhecimento de três dos quatro *primers* usados na rotina de detecção viral (Tabela 02). Ademais o local das substituições está mais próximo à região 5' dos *primers*, o que não prejudica o anelamento destes na região alvo. Devido à baixa frequência dessas mutações no estado de Pernambuco, que podem ter se originado de processo espontâneo e independente, não se espera que elas afetem o diagnóstico da COVID-19 através da RT-PCR de forma significativa para os *primers* N1 e N2.

Portanto, os *primers* 2019-nCoV_N1/N2/RP CDC (Atlanta, USA) utilizados pelo NUPIT-UFPE são, até o momento, eficientes na detecção das variantes SARS-CoV-2 circulantes. Vale ressaltar que esta análise deve ser feita com frequência regular, visto que o aparecimento de novas mutações no genoma do SARS-COV-2 é um evento comum e o rastreio das linhagens circulantes no estado é fundamental para o acompanhamento epidemiológico da COVID-19.

Os pesquisadores envolvidos no diagnóstico e sequenciamento das linhagens do SARS-CoV-2 da Universidade Federal de Pernambuco reforçam o compromisso de continuar realizando o rastreamento das mutações depositadas nos bancos de dados, contribuindo assim para a manutenção da detecção acurada dos pacientes com COVID-19 no estado.

Recife, 04 de março de 2021

Sequência do Gene N (Nucleocapsídeo), mostrando as sequências dos primers e localização das mutações.

ATGTCTGATAATG**GACCCAAAATCAGCGAAAT**GCACC³CCGCATTACGTTTGGTGGAC
 CCT**CAGATTCAACTGGCAGTAACCAGA**ATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAAACAA
 CGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACA
 TGGCAAGGAAGACCTTAAATTCCTCGAGGACAAGGCGTCCAATTAACACCAATAGCA
 GTCCAGATGACCAAATTTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTGAC
 GGTAATAATGAAA**G**⁴ATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAG
 AAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGA
 GCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCTGCAAT
 CGTGCTACAACCTTCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCA
 GAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTT**C**²AAGAAA
 TTCAACTCCAGGCAGCAGTAG**GGG**¹GAACTTCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGT
 GATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTC
 TGGTAAAGGCCAACAAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTT
 CTAAGAAGCCTCGGCCAAAACGTACTGCCACTAAAGCATACAATGTAACACAAGCTTTC
 GGCAGACGTGGTCCAGAACAACCCAAGGAAATTTGGGGACCAGGAACTAATCAGACA
 AGGAACTGA**TTACAACATTGGCCGCAA**ATTGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGT
TCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTAC
 ACAGGTGCCATCAAATTTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCT
 GAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTTCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAA
 AGAAGAAGGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACCTGTG
 ACTCTTCTTCCCTGCTGCAGATTTGGATGATTTCTCCAACAATTGCAACAATCCATGAG
 CAGTGCTGACTCAACTCAGGCCTAA

Tabela 1. Mutações pontuais mais frequentes no gene N a nível global com as suas respectivas localizações e substituições.

Mutação	Localização
R203K/G204R (1)	GGG 28.881 AAC
S194L (2)	C 28.854 T
P13L (3)	T 28.311 C
D103L (4)	G 28580 T

Tabela 2. Relação das mutações encontradas na região complementar aos primers (N1 e N1) utilizados no diagnóstico da COVID-19 através da RT-PCR. As sequências dos primers N1 e N2 foram alinhadas aos 2253 de genomas sequenciados no Brasil utilizando o software Mafft (Kato et al., 2013) e a análise das variantes foi realizada usando o FreeBayes (Garrison et al., 2012).

N1 - F- 5'GACCCCAAATCAGCGAAAT3'	Identificação	Estado	Posição em relação à referência	Mutação	Troca de aminoácidos	Linhagem
	RJ-00409	RJ	28291	C->T	Pro6Pro	B.1.1.28
	RJ-00446	RJ	28300	G->T	Gln9His	B.1.1.33
	GO-1190R1	GO	28292	C->A	Gln7Lys	B.1.1.28
	RJ-2966	RJ	28300	G->T	Gln9His	B.1.1.33
	PE-IAM711	PE	28290	C->T	Pro6His	B.1.1.214
	SP-956	SP	28300	G->T	Gln9His	B.1.1.28
	RS-38171	RS	28290	C->T	Pro6His	B.1.1.33
	SP-BT6815	SP	28295	A->T	Asn8Tyr	B.1.1.28
	SP-BT6714	SP	28295	A->T	Asn8Tyr	B.1.1.28
	PR-28610	PR	28290	C->A	Pro6His	B.1.1.28
	AM-L87-CD2415	AM	28291	C->T	Pro6Pro	P2
	AM-L81-CD2435	AM	28291	C->T	Pro6Pro	P2
	SP-1008	SP	28289	C->T	Pro6Ser	P2
N1 - R- 5'TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG3'	ID	Estado	Posição em relação à referência	Mutação	Troca de aminoácidos	Linhagem
	AMU355	PE	28344	C->T	Thr24Ile	B.1.1.29
	RJ-1627	RJ	28347	G->A	Gly25Asp	B.1.1.314
	RJ-INCA-C190	RJ	28347	G->A	Gly25Asp	B.1.1.314
	RJ-INCA-C31	RJ	28347	G->A	Gly25Asp	B.1.1.314
	RJ-2951	RJ	28347	G->A	Gly25Asp	B.1.1.314
	TO-1177	TO	28337	G->T	Asp22Tyr	B.1.1.28
	AMU14635	PE	28344	C->T	Thr24Ile	B.1.1.33
	AM-L81-CD2277	AM	28346	G->A	Gly25Ser	P2

	AM-L81-CD2453	AM	28346	G->A	Gly25Ser	P2
	TO-1185	TO	28352	A->G	Asn27Asp	P2
N2 - F- 5'TTACAAACATTGGCCGAAA3'	ID	Estado	Posição em relação à referência	Mutação	Troca de aminoácidos	Linhagem
	SP-BT6827	SP	29179	G->T	Pro302Pro	B.1.1.28
	RJ-00517	RJ	29167	C->T	Tyr298Tyr	B.1.1.33
	RS-00638	RS	29171	C->T	His300Tyr	B.1.1.28
	RS-00637	RS	29171	C->T	His300Tyr	B.1.1.28
	RS-00620	RS	29171	C->T	His300Tyr	B.1.1.28
	SP-692	SP	29171	C->T	His300Tyr	B.1.1.28
	SP-BT6810	SP	29179	G->T	Pro302Pro	B.1.1.28
	RS-00640	RS	29171	C->T	His300Tyr	B.1.1.28
	RS-6203	RS	29179	G->T	Pro302Pro	B.1.1.33
	RJ-00475	RJ	29167	C->T	Tyr298Tyr	B.1.1.33
	RJ-00447	RJ	29167	C->T	Tyr298Tyr	B.1.1.33
N2 - R- 5'GCGCGACATTCCGAAGAA3'	ID	Estado	Posição em relação à referência	Mutação	Troca de aminoácidos	Linhagem
	SP-1246	SP	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.28
	TO-1172	TO	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.28
	RJ-UFRJ-32321	RJ	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.33
	RJ-00411	RJ	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.28
	SP-698	SP	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.28
	RS-6227	RS	29227	G->T	Ser318Ser	B.1.1.33
	RJ-00430	RJ	29218	C->T	Phe315Phe	B.1.1.28
	AMU872	PE	29216	T->C	Phe315Leu	B.1.1.28
	RS-11069	RS	29224	G->T	Met317Ile	B.1.1.33

REFERÊNCIAS

Garrison E, Marth G (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing -- Free bayes -- Variant Calling -- Longranger. arXiv preprint arXiv:1207.3907.

Katoh, K.; Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. DOI: 10.1093/molbev/mst010. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/mst010>. Acesso em: 3 mar. 2021.

Ministério da Saúde (BR). Painel Coronavírus. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 26 fev. 2021.

Rahman, et al. Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (N protein) and its consequences. *J Med Virol*. 93(4):2177-2195, 2021.

World Health Organization (WHO). 2021a. Coronavirus Disease (COVID-19). Disponível em: <https://covid19.who.int/table>. Acesso em: 26 fev. 2021.

World Health Organization (WHO). 2021b. Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Acesso em: 26 fev. 2021.