

Investigação ao serviço da sociedade

<https://doi.org/10.21814/uminho.ed.24.14>

Maria Isabel Veiga

Maria Isabel Veiga ([ORCID: 0000-0002-2205-8102](https://orcid.org/0000-0002-2205-8102)) é doutorada em Ciências Médicas pelo Instituto Karolinska e investigadora do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) da Universidade do Minho. A sua área de investigação converge, há mais de 16 anos, na problemática da malária. Foi galardoada com a medalha de Honra da Lóreal Portugal/Unesco e destacada na 2ª edição do Livro “Mulheres na Ciência” - Ciência Viva.

Nuno S. Osório

Nuno S. Osório ([ORCID: 0000-0003-0949-5399](https://orcid.org/0000-0003-0949-5399)) é biólogo e doutorado em Ciências da Saúde pela Universidade do Minho e investigador do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) da mesma Universidade, onde se dedica a investigar a diversidade genética e a evolução de microrganismos e vírus propiciando o desenvolvimento de formas inovadoras para combater as principais doenças infecciosas humanas.

No contexto da pandemia da COVID-19, Isabel e Nuno são voluntários no serviço de diagnóstico prestado pela UMinho à comunidade e com financiamento do “RESEARCH 4 COVID 19 - apoio especial a projetos de implementação rápida”, promovido pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), em colaboração com a Agência de Investigação Clínica e Inovação Biomédica (AICIB), estão a desenvolver um método de diagnóstico molecular de SARS-CoV-2, inovador e diferenciado dos preexistentes.

OS CORONAVIRUS ANTES DA PANDEMIA DA COVID-19

A família *Coronaviridae* inclui uma panóplia de vírus compostos por envelope e RNA de cadeia simples que infetam aves e mamíferos (Payne, 2017). Existem pelo menos sete coronavírus humanos (HCoV), nomeadamente o HCoV-229E, o HCoV-OC43, o HCoV-NL63, o HCoV-HKU1, o coronavírus da síndrome respiratória aguda severa (SARS-CoV), o coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) e o mais recente coronavírus da síndrome respiratória aguda severa (SARS-CoV-2). Ao contrário dos SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, os HCoV “comuns” geralmente causam doença pouco severa das vias respiratórias superiores e contribuem de forma sazonal para 15% a 30% dos casos de “gripe comum” em adultos (Liu, Liang, & Fung, 2020; Woo, Lau, Yip, Huang, & Yuen, 2009).

A primeira epidemia severa causada por coronavírus remonta a novembro de 2002, com a transmissão entre pessoas do vírus SARS-CoV. Os sintomas de SARS incluem febre, mal-estar, dor de cabeça, diarreia, entre outros, não havendo um quadro de sintomas específico que permita *per se* o diagnóstico da doença. A origem do surto de SARS terá, presumivelmente, sido a infeção de pessoas a partir de morcegos num mercado com animais vivos em Guangdong, na China (Zhong *et al.*, 2003). Este coronavírus altamente contagioso, e causador de elevada taxa de mortalidade (9.6%), infetou entre 2002 e 2003 mais de 8000 pessoas, matou mais de 700 e propagou-se a pelo menos 26 países (J. T. Wang & Chang, 2004). Constrangeu períodos de quarentena e de restrições a viagens que conduziram a perdas económicas estimadas num total de 40 mil milhões de dólares, correspondentes a prejuízos na ordem dos 2,6% do PIB na China, 1,05% em Hong Kong e 0,15% no Canadá (Website, 2020). O período de maior verosimilhança de uma pessoa infetada transmitir SARS-CoV foi descrito na segunda semana de doença, aquando do pico de cargas virais no hospedeiro e no qual os sintomas eram regularmente evidentes (Petersen *et al.*, 2020). Esta característica do vírus pode ter ajudado na implementação de práticas adequadas de proteção, tendo o notável esforço realizado permitido o controlo total desta epidemia no final de maio de 2003. Desde então, a transmissão entre pessoas do SARS-CoV parece ter parado, com exceção de casos esporádicos resultantes de acidentes laboratoriais (Lim *et al.*, 2004).

A propensão dos coronavírus para ultrapassar as barreiras entre espécies e avançar para o hospedeiro humano confirmou-se novamente passados 10 anos do surto de SARS pela emergência do vírus MERS-CoV. As autoridades de saúde reportaram pela primeira vez a MERS na Arábia Saudita, em setembro de 2012. No entanto, um estudo retrospectivo sugere que os primeiros casos cónitos de MERS possam datar de abril de 2012, na Jordânia (Hijawi *et al.*, 2013). Até novembro de 2019, todos os casos de MERS foram epidemiologicamente ligados à Península Arábica, tendo esta doença alastrado por 27 países. O maior surto conhecido de MERS fora desta região ocorreu na República da Coreia, em 2015, tendo sido relacionado com um viajante que regressava da Península Arábica. No final de novembro de 2019, eram contabilizados pela OMS um total de 2494 casos confirmados de MERS, resultando em 858 mortes (WHO, 2020).

O SARS-CoV e o MERS-CoV são agentes patogénicos zoonóticos que transpuseram a barreira entre espécies evoluindo para infetar seres humanos. Apesar do mecanismo de transferência zoonótica dos vírus não ser conhecido em profundidade, os coronavírus possuem uma proteína chamada “Spike” (S) que deterá um papel central na definição da especificidade dos coronavírus para um determinado hospedeiro. A proteína S medeia o reconhecimento do recetor nas células do hospedeiro e depende de fatores como a especificidade das proteases do hospedeiro para que possa ser clivada e executar a sua função (Hulswit, de Haan, & Bosch, 2016).

Não obstante a pandemia de COVID-19 ter sido frequentemente narrada no espaço público como uma “catástrofe imprevisível”, é importante notar que o SARS-CoV-2 parece ter seguido um padrão natural de evolução para o hospedeiro humano, de forma absolutamente conjeturável à luz das epidemias anteriores de SARS e MERS. Nas últimas décadas a ciência tem sido fortemente influenciada por correntes de opinião, pressões económicas e políticas para centralizar toda a investigação científica em projetos com potencialidade direta de aplicação, em detrimento da ciência dita “básica ou fundamental”. Esta pressão “imediatista”, aliada a uma manifesta falta de financiamento para a ciência, teve consequências, nomeadamente o abandono da maioria das linhas de investigação em coronavírus assim que o SARS-CoV foi desconsiderado como uma potencial ameaça global. A investigação que foi possível produzir demonstrou, há mais de uma década, a existência de uma vasta diversidade de coronavírus em

reservatórios animais, alguns dos quais com forte potencial para serem causadores de pandemias humanas. Tivessem as prioridades da nossa sociedade e as políticas de atribuição de financiamento para a ciência sido diferentes e poderiam ser hoje tangíveis progressos científicos, permitindo entender e controlar a transposição de coronavírus entre espécies, ou o desenvolvimento de vacinas e antivirais de largo espectro contra membros da família *Coronaviridae*. O que sabemos hoje parece sugerir que se os esforços de investigação e desenvolvimento biomédico nesta área tivessem sido suportados de forma continuada poderiam ter possibilitado evitar, ou pelo menos minimizar, os nefastos impactos da pandemia da COVID-19. Muita da investigação que, de forma meritória, tem vindo a ser realizada sob a enorme pressão da resposta à pandemia da COVID-19 podia ter sido iniciada anteriormente. A consequência desta falta de visão pode ter levado à perda desnecessária de milhões de vidas humanas e estar na essência de uma crise económica global que pode exacerbar desigualdades e pôr em causa direitos humanos fundamentais. A percentagem do PIB aplicado em investigação e desenvolvimento, mesmo nos países mais desenvolvidos, é pouco mais que 2%. A pandemia de SARS-CoV-2 deve levar-nos a refletir sobre as prioridades da nossa sociedade e sobre a importância de existir um investimento em ciência, maior e mais sustentado.

A REVOLUÇÃO NA INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA EM RESPOSTA À COVID-19

Quando se instalou a pandemia da COVID-19, foi iniciada uma revolução na investigação levando, por todo o mundo, a que cientistas, médicos e outros profissionais de áreas afins trabalhassem a uma velocidade vertiginosa com o objetivo de encontrar modos de conhecer e combater o vírus SARS-CoV-2. Este movimento foi verdadeiramente multidisciplinar e de forma nenhuma restrito a especialistas em doenças provocadas por coronavírus, ou mesmo em virologia geral. Diversos investigadores rapidamente reorientaram esforços de investigação para colocar à disposição todo o conhecimento científico que pudesse atender, a curto e médio prazo, às necessidades impostas pela nova pandemia. Este movimento englobou a exploração e entendimento de processos biológicos fundamentais associados ao SARS-CoV2 nomeadamente, a sua propagação, invasão, replicação e evolução e a sua aplicação no combate a esta

pandemia. Foram também encetados diversos projetos para o desenvolvimento de vacinas, terapias eficazes e testes de diagnóstico específicos, sensíveis e rápidos. A multidisciplinaridade dos esforços produzidos incluiu não só as áreas cientificamente mais afins como a medicina, microbiologia, virologia, imunologia ou epidemiologia, mas também diversas áreas que seriam teoricamente menos relacionadas como a engenharia, tecnologia, economia, ciências sociais ou psiquiatria. No imediato, um meritório exemplo do que foi possível conseguir é o desenvolvimento e produção, em Portugal, do ventilador *Atena* para utilização em unidades de cuidados intensivos (JN, 2020).

A reorientação da comunidade científica para a resposta à COVID-19 foi também fomentada pelo rápido compromisso e disponibilização de financiamento de diversas entidades governamentais e privadas ao nível nacional e internacional. A título de exemplo, é importante mencionar os concursos para financiamento competitivo para atividades de investigação relacionadas com a COVID-19 promovidos por parte da Comissão Europeia, EDCTP, FCT ou Fundação “laCaixa” (EDCTP, 2020; EuropeanCommission, 2020; FCT, 2020; Fundação”laCaixa”, 2020).

Esta “revolução” na atividade científica teve um impacto quase imediato nos trabalhos científicos produzidos a nível mundial. Em apenas seis meses, foi gerado um volume de trabalho científico publicado muito superior ao que tinha, historicamente, sido produzido para outras doenças infecciosas humanas. Ao nível das publicações científicas a resposta tem sido imediata e intensa, a uma velocidade que ultrapassa o que se pensava ser possível. Até 20 de julho de 2020, foram divulgadas sobre a COVID-19 mais de 87.267 publicações (incluindo “pré-publicações”, artigos científicos, capítulos de livros, monografias e procedimentos), 919 base de dados e 4 621 ensaios clínicos (Dimensions, 2020). Recorrendo ao portal de serviços PubMed e comparando o volume de artigos científicos publicados em COVID-19 com as publicações feitas sobre as doenças infecciosas que mundialmente mais mortes provocam são evidenciados 30 240 artigos sobre COVID-19 entre janeiro e julho de 2020, contra 19-130 artigos publicados em SIDA, tuberculose e malária no período homólogo (Figura 1).

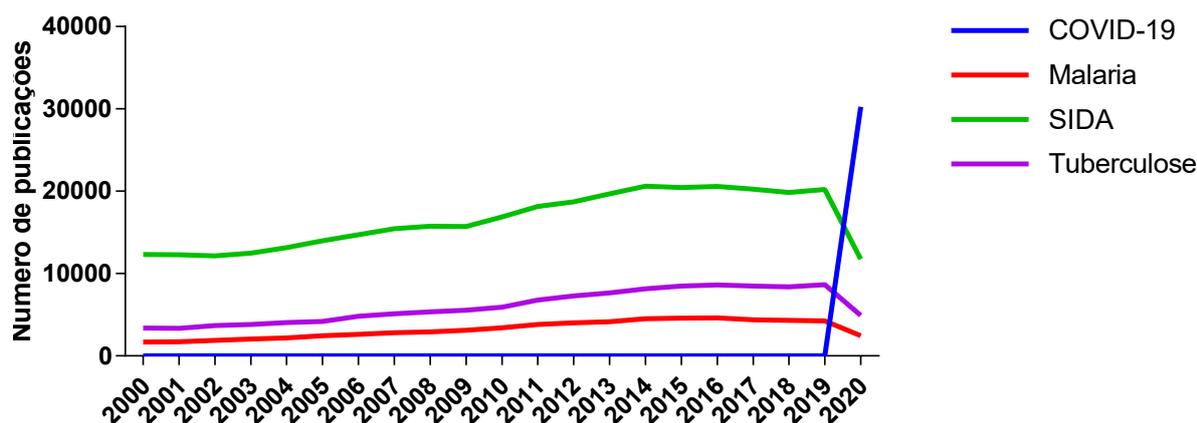


Figura 1. Número de publicações na base de dados PubMed. Os artigos científicos publicados na base de dados PubMed desde 2000-2020 relativamente às doenças infecciosas que mais mortes provocaram nos últimos anos (Malária, Tuberculose e Sida) e a recente pandemia da COVID-19. Os dados foram recolhidos por pesquisa das *keywords* “COVID-19”, “SARS-CoV-2”, “Malária”, “Tuberculosis”, “Mtb”, “AIDS”, “HIV”. Data da pesquisa de literatura 09/07/2020 pelo que os dados do ano 2020 se referem apenas a aproximadamente metade do ano.

Um outro fator muito importante na rápida e eficaz disseminação dos trabalhos científicos foi o aproveitamento da crescente relação entre as ciências da saúde e os repositórios de “pré-publicações” (ex. <https://www.biorxiv.org/> ou <https://www.medrxiv.org/>). As “pré-publicações” permitem que os cientistas e o público em geral tenham acesso a descobertas de ponta mais rapidamente e antes da submissão dos artigos para o processo de revisão por pares, que pode levar meses a ser realizado (Brainard, 2020; Daniel Hook, 2020). A acrescentar a este fator, releva-se a ágil resposta dos editores e revisores das revistas científicas, muitos deles voluntários, e que graças a um trabalho intenso conseguiram acelerar o processo de revisão por pares. Foi também generalizado o acesso aberto “Open Access” à literatura sobre COVID-19, assegurando que investigadores e outras pessoas interessadas tivessem acesso a todas as publicações de forma gratuita. Como exemplo, a revista científica *Science* cita na sua página da internet:

“The *Science* journals are striving to provide the best and most timely research, analysis, and news coverage of COVID-19 and the coronavirus that causes it. All content is free to access.”

(Science, 2020)

Em 6 meses de investigação exaustiva foi percorrido um caminho desde o desconhecimento do agente etiológico da COVID-19, até à descoberta de aspetos importantes da resposta imune, transmissão, tratamentos, fatores de suscetibilidade a doença severa, etc. Os cientistas ainda correm contra o tempo na busca incessante de respostas sobre a COVID-19 e como combater o vírus SARS-CoV-2. Nomeadamente, foi desenvolvido como o vírus invade e coloniza as células humanas (Bao *et al.*, 2020; Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2020; Wölfel *et al.*, 2020; Wrapp *et al.*, 2020), descritas algumas formas como algumas pessoas conseguem resistir enquanto outras perecem (Dorward *et al.*, 2020; Ledford, 2020). Do ponto de vista mais translacional e de impacto direto sobre a saúde e sociedade, foram já identificados alguns fármacos que beneficiam doentes em situações mais graves (Beigel *et al.*, 2020; P. Horby *et al.*, 2020) e estão em desenvolvimento diversos fármacos com propriedades terapêuticas e cerca de 200 potenciais vacinas (Gao *et al.*, 2020; van Doremalen *et al.*, 2020).

Um outro fator de elevada relevância para o controlo e eliminação da doença é a correta identificação das pessoas infetadas com SARS-CoV-2 e o diagnóstico precoce de COVID-19. Tal como descrito em cima, os sintomas incluem tosse, febre ou dores musculares assemelhando-se aos de muitas outras doenças, como a gripe. A realização de testes laboratoriais para o diagnóstico da infeção por SARS-CoV-2 tornou-se assim uma ferramenta de essencial importância possibilitando uma melhor orientação clínica e de saúde pública. Em acréscimo na ajuda ao diagnóstico clínico, os testes, ao permitirem um diagnóstico preciso, têm capacidade de detetar pessoas portadoras do vírus mesmo que não apresentem sintomas clínicos (Chau *et al.*, 2020), facilitando o rastreamento de casos positivos de forma a conter a transmissão. Os testes de diagnóstico são também uma ferramenta essencial para melhorar a nossa compreensão de como o vírus se transmite, facilitando a monitorização e eficácia das medidas de controlo. A relevância em realizar testes para detetar o SARS-CoV-2 foi, neste tempo de pandemia, bem frisada pelo Diretor Geral da Organização Mundial de Saúde, Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, numa conferência de imprensa realizada a 16 de março de 2020: “*We have not seen an urgent enough escalation in testing, isolation and contact tracing, which is the backbone of the response*”... “*Our key message is: test, test, test*” (Ghebreyesus, 2020). Face a esta necessidade, houve também nos últimos 6 meses, um forte

empenho por parte da comunidade científica internacional no desenvolvimento de testes de diagnóstico e deteção de SARS-CoV-2, que sejam rápidos, escaláveis, precisos, de alta qualidade, fácil manuseamento e baixo custo.

AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Os testes de diagnóstico para a COVID-19, apoiam-se presentemente na deteção do material genético do vírus em amostras recolhidas no trato respiratório de um indivíduo, ou na deteção de anticorpos produzidos pelo nosso sistema imune em resposta à infeção viral. Para a deteção do material genético, RNA viral do SARS-CoV-2, são usadas técnicas moleculares baseadas na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), ou em estratégias baseadas na hibridação do material genético. Os testes serológicos e imunológicos são usados para detetar anticorpos ou para detetar proteínas antigénicas em indivíduos infetados. Algumas técnicas de imagiologia médica são também uma mais valia no diagnóstico e tratamento da COVID-19, mas requerem *expertise* e equipamentos hospitalares avançados. Estas metodologias como a tomografia computacional não serão abordados nesta secção que se foca em testes com potencial para utilização “Point-of-Care” (PoC).

Na Europa, Estados Unidos e no mercado asiático, são disponibilizados atualmente 237 testes de diagnóstico (360Dx, 2020), dos quais 177 se baseiam na deteção do material genético do SARS-CoV-2 e 60 na deteção de anticorpos/antigénios. Ambas as categorias apresentam vantagens e limitações e devem ser escolhidas tendo em conta as características de diagnóstico desejadas, nomeadamente a sua especificidade e sensibilidade e a conjugação destes parâmetros com outros fatores cruciais como a rapidez, custo do teste, ou o potencial para serem utilizados em PoC. A deteção de material genético do vírus ou manifestações da resposta imune específica deve ser feita de forma complementar, otimizando a gestão e monitorização da situação pandémica nos diferentes contextos geográficos. Enquanto que o teste de deteção do RNA viral identifica os indivíduos nos quais o vírus ainda se encontra presente, os testes serológicos identificam os indivíduos que foram expostos ao vírus e desenvolveram uma resposta imune específica para o SARS-CoV-2. Ambos os testes têm o potencial para promover a capacidade de rastreamento da transmissão do vírus sendo que os

testes imunológicos podem também informar sobre a força e durabilidade da imunidade na população.

Tem havido melhorias constantes nos testes de diagnóstico com melhoramentos na precisão, eficiência, rapidez e a sua inclusão numa vasta gama de dispositivos PoC. As estratégias atuais usadas no diagnóstico da COVID-19 têm como base metodologias convencionais, mas também tecnologias inovadoras. Embora existia na literatura um elevado número de diferentes testes moleculares para detetar ácidos nucleicos virais, os testes mais recentemente desenvolvidos para detetar os ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 baseiam-se principalmente na tecnologia de transcrição reversa (RT), seguida da deteção quantitativa da reação em cadeia da polimerase (qPCR), ou por amplificação isotérmica de ácidos nucleicos tal como *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Dos 177 testes moleculares comercialmente disponíveis para detetar o SARS-CoV-2, 95% utiliza a tecnologia de PCR ou o RT-qPCR, sendo os restantes 5% baseados na tecnologia de ampliação isotérmica, o uso do sistema de CRISPR e também de sequenciação (360Dx, 2020).

Os testes moleculares, nomeadamente o RT-qPCR, são hoje considerados o método *gold standard* para a identificação do SARS-CoV-2 e baseiam-se na capacidade de polimerizar muitas cópias de um ou mais segmentos do genoma do vírus de forma orientada por sequências nucleotídicas específicas e frequentemente designadas por “*primers*”. O desenho dos “*primers*” só foi possível graças à rápida sequenciação e disponibilização do primeiro genoma de SARS-CoV-2 (Zhang, 2020). O genoma deste vírus é composto por uma cadeia simples e de sentido positivo de RNA. O método RT-qPCR começa com a conversão do RNA viral em DNA complementar (DNAC) usando a enzima transcriptase reversa. Posteriormente, a ampliação do DNA é feita através de uma polimerase com recurso aos “*primers*”. É possível monitorizar cada ciclo desta reação química em tempo real, usando uma sonda de DNA marcada com moléculas que apenas emitem fluorescência quando há polimerização do DNA alvo. As condições para a polimerização de DNA são repetidas por cerca de 40 a 45 ciclos, num sistema automatizado permitindo que o DNAC do vírus possa ser amplificado e detetado. Até à data, a maioria dos testes de diagnóstico moleculares desenvolvidos utilizam a tecnologia RT-qPCR, para detetar diferentes regiões genómicas do SARS-CoV-2

incidindo principalmente no ORF1ab, ou os genes que codificam para o envelope ou cápsula (E) viral, a proteína “Spike” (S) ou o nucleocapsídeo (N) (Saúde, 2020).

Os testes de diagnóstico por RT-qPCR estão a sofrer uma constante evolução com o melhoramento dos métodos de deteção e automatização de sistemas. No entanto, embora seja o método ainda hoje mais usado para a deteção das infeções com SARS-CoV-2, tem a desvantagem de requerer equipamento de laboratório oneroso, de necessitar de recursos especializados e com um tempo relativamente elevado desde a recolha da amostra até à obtenção dos resultados. A sensibilidade dos métodos de diagnóstico por RT-qPCR para deteção de SARS-Cov-2 são também dependentes dos processos evolutivos do vírus (Osorio & Correia-Neves, 2020). Como resposta a estas limitações, investigadores por todo o mundo, têm-se dedicado a melhorar a eficiência e rapidez da tecnologia RT-qPCR e também a desenvolver várias outras técnicas.

Como exemplo de outras tecnologias de deteção molecular, a LAMP é uma estratégia alternativa que, tal como o nome indica, permite a ampliação do ADN apenas com uma única temperatura constante, eliminando assim a necessidade de um equipamento de laboratório caro - termociclador. Existem já diversos métodos desenvolvidos baseados neste princípio, entre os quais: Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) (Kashir & Yaqinuddin, 2020), Transcription-Mediated Amplification (TMA) (Gorzalski *et al.*, 2020), Rolling Circle Amplification (RCA) (B. Wang *et al.*, 2005) e até mesmo um sistema baseado na recente metodologia de edição génica por CRISPR (Broughton *et al.*, 2020). Estas metodologias, variam em sensibilidade e eficiência em detetar o SARS-CoV-2, mas todas apresentam resultados mais rápidos e equipamentos mais simples comparado com RT-qPCR, revelando-se muito promissores para dispositivos PoC.

Testes baseados na tecnologia de *microarray* têm sido usados também para uma rápida deteção de ácidos nucleicos viral, mas a sua maior vantagem é a possibilidade de detetar múltiplos polimorfismos que asseguram uma precisão de deteção de SARS-CoV-2 elevada e a presença de outros patogénicos (Chen *et al.*, 2010). A sequenciação total do genoma presente nas amostras clínicas, recorrendo a técnicas de sequenciação de “nova geração” (NGS), asseguram ainda mais a especificidade da deteção de SARS-CoV-2 tendo também o potencial para sondar a presença de outros patógenos.

Para além disso a sequenciação total tem a vantagem de permitir efetuar um potencial rastreio o SARS-CoV-2 por contacto, permitindo efetuar estudos de epidemiologia molecular e estudos de evolução do vírus.

Para monitorizar o progresso das diferentes fases da doença e para uma identificação mais ampla de quem esteve infetado e do seu estado de imunidade, os testes baseados na deteção do material genético viral, como o RT-PCR, não são apropriados. Aqui entra o papel muito importante dos testes serológicos/imunológicos.

Os testes serológicos usam como base amostras de sangue ou plasma, mas atualmente já existe algum desenvolvimento para que sejam usadas amostras cuja recolha não é evasiva tal como a saliva, escarro ou outro fluido biológico. Os testes baseiam-se na deteção da presença dos anticorpos imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). O IgM é um indicador de uma infeção na fase inicial (deteta-se no soro após dias da infeção com duração de algumas semanas) e o IgG é um indicador de uma infeção prévia ou presente (aparece após a resposta IgM), podendo também ser usado como indicador sugestivo da presença de imunidade “pós-infeção”. Este tipo de teste, fornece informação sobre a trajetória da resposta imunológica temporal (curto-prazo - dias a semanas, longo-prazo - anos), assim como a quantidade e diversidade dos anticorpos. No entanto, apresentam algumas limitações de sensibilidade e especificidade que merecem hoje bastante atenção por parte dos investigadores para os mitigar. Um outro ponto muito importante a considerar, que pode ter consequências a nível de decisões socioeconómicas, é o fato de os resultados poderem surgir erróneos considerando a existência de um grupo de indivíduos que apesar de serem diagnosticados positivos por RT-PCR, apresentam-se seronegativos (devido a um possível atraso na produção de anticorpos após infeção), ou o oposto, os indivíduos serem diagnosticados como seropositivos apesar de apresentarem um resultado de RT-PCR negativo, revelando assim uma infeção anterior possivelmente assintomática ou com quadros sintomatológicos pouco severos.

As metodologias usadas para a identificação de IgM ou IgG específicas para vários antigénios virais (ex. as subunidades S1 e S2 da glicoproteína da proteína “spike” ou do nucleocapsídeo), incluem técnicas de imunoensaios mais convencionais tais como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou imunoensaios com dispositivos

Lateral flow, e uso de biosensores (Park, Hyun, Lee, Lee, & Ko, 2009) que se baseiam em converter uma interação específica de biomoléculas numa leitura mensurável através, por exemplo de métodos óticos, elétricos ou enzimáticos. As biomoléculas detetadas por biosensores incluem, para além de anticorpos e antígenos, moléculas de RNA viral, que devido à sua incrível sensibilidade, rapidez e de grande potencial para dispositivos PoC está hoje a ser fortemente estudado e desenvolvido por empresas e investigadores para deteção de SARS-CoV-2 (Perry, 2020).

Até á data, tem sido notável o empenho da comunidade científica no desenvolvimento, melhoria e até na apresentação de novas abordagens técnicas para a deteção do vírus pandémico causador da COVID-19. A velocidade a que temos presenciado o desenvolvimento de novas tecnologias faz prever um futuro com métodos de deteção mais eficientes e de excelência, que permitirão a deteção rápida e em qualquer lado, permitindo entre outros uma gestão clínica e epidemiológica mais adequada das infeções. Ao mesmo tempo, tendo um conhecimento base mais consistente das limitações dos vários tipos de deteção disponíveis, irá permitir a possibilidade de escolha consoante o fim específico, podendo obter a opção mais vantajosa.

RESULTADOS DA INVESTIGAÇÃO EM SARS-CoV-2/COVID-19

Em consequência do intento notável da comunidade científica internacional foi possível, em apenas 6 meses, produzir um amplo conjunto de evidências científicas que permitem entender melhor aspetos proeminentes associados à COVID-19 e ao seu agente etiológico, o vírus SARS-CoV-2. Embora o balanço seja fortemente benéfico, esporadicamente, a interpretação abusiva de estudos sem revisão científica (“pré-publicação”) ou mesmo a publicação precipitada de estudos de menor qualidade levou à hiperbolização de algumas conceções erróneas. Um exemplo amplamente divulgado foram as teorias conforme as quais o vírus SARS-CoV-2 teria sido concebido em laboratório. A evidência científica disponível refuta distintamente essa hipótese. Se o SARS-CoV-2 tivesse sido gerado por manipulação laboratorial a partir de um outro coronavírus esse processo deixaria provas no genoma do novo vírus que não foram encontradas (Andersen, Rambaut, Lipkin, Holmes, & Garry, 2020). Adicionalmente, as soluções “descobertas pelo vírus”, designadamente para permitir a ligação ao

recetor alvo nas células humanas vão para além da compreensão científica preexistente (Andersen *et al.*, 2020). A hipótese mais provável e altamente consensual entre a comunidade científica é que na origem do SARS-CoV-2 esteve um processo de seleção natural e transferência zoonótica semelhante ao que levou, no passado, à emergência do SARS-CoV ou do MERS-CoV. A ordem de ocorrência das etapas e os reservatórios animais envolvidos neste processo não são inteiramente conhecidos. É possível que o vírus tenha sofrido seleção natural ainda no hospedeiro animal, ficando mais adaptado ao ser humano, sendo depois transmitido para o homem. Alternativamente, podem ter ocorrido um ou mais eventos de contacto entre pessoas e animais infetados nos quais o vírus foi transferido para o hospedeiro humano tendo o processo de seleção natural do vírus ocorrido já no homem (Andersen *et al.*, 2020). Um animal iminente implicado na ancestralidade do vírus, apesar do provável envolvimento de outros intermediários ainda desconhecidos, é o morcego da espécie *Rhinolophus affinis*. Esta dedução decorre do facto de um coronavírus, denominado RATG13, cujo genoma é 96% idêntico ao genoma do SARS-CoV-2 ter sido isolado desta espécie de morcego em 2013, na China (Zhou *et al.*, 2020). A análise filogeográfica de milhares de genomas da SARS-CoV-2 isolados em todo o mundo aponta para que o vírus tenha emergido na China em novembro de 2019 (L. van Dorp *et al.*, 2020). Estas estimativas coincidem com os primeiros relatos públicos da doença em Wuhan, uma cidade de 11 milhões de pessoas na província de Hubei, na China. As primeiras infeções com SARS-CoV-2 na Europa foram detetadas em janeiro de 2020 (Olsen *et al.*, 2020). A vigilância da COVID-19 promovida pela OMS foi implementada na Europa no dia 27 de janeiro. No dia 21 de fevereiro, nove países europeus registaram 47 casos (Spiteri *et al.*, 2020). No começo de julho de 2020, a mortalidade causada pela pandemia COVID-19 era já a segunda maior entre as doenças infecciosas a nível global, sendo apenas subalterna à mortalidade provocada pela tuberculose (Figura 2).

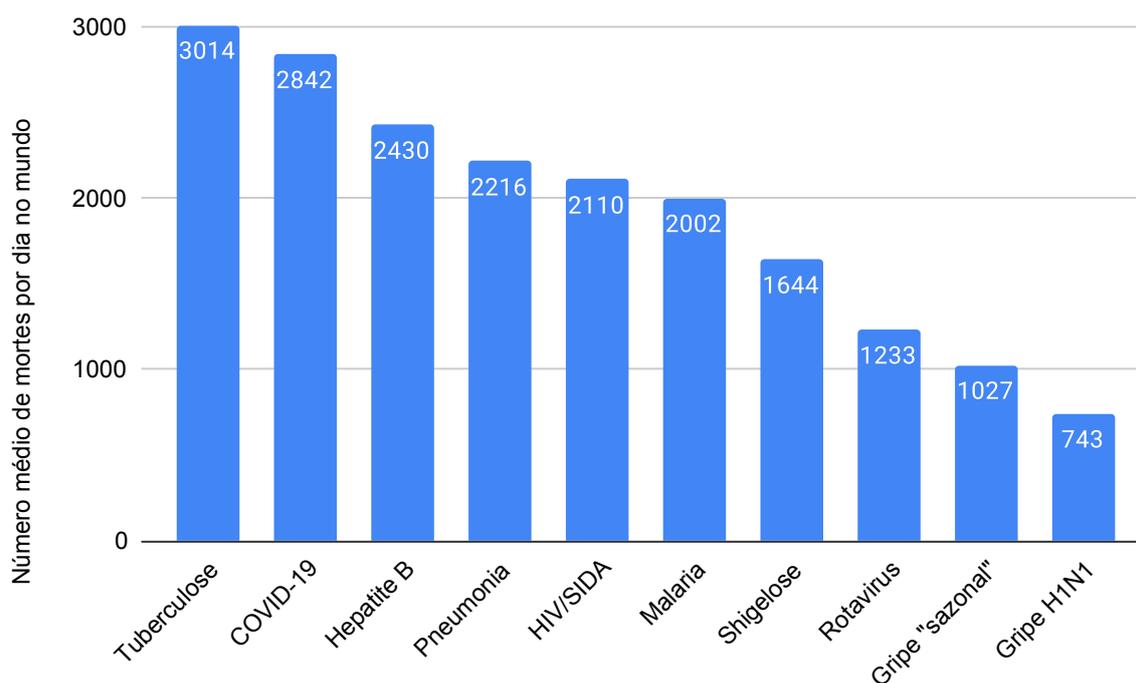


Figura 2. Número médio de mortes por dia provocados a nível global por doenças infecciosas. Adaptado de informationisbeautiful.net com dados do US Centre for Disease Control (US CDC), OMS e The Lancet disponíveis a 7 de julho de 2020.

A participação de pessoas pré-sintomáticas ou assintomáticas na transmissão de SARS-CoV-2 pode ter sido uma vantagem decisiva promovendo a rápida expansão geográfica do vírus. Um indivíduo infetado com SARS-CoV-2 pode não apresentar sintomas quando testa positivo, apresentando os sintomas mais tarde (pré-sintomático), ou pode não manifestar quaisquer sintomas durante todo o ciclo de infeção com o SARS-CoV-2 (assintomático). Estas pessoas por não suspeitarem que estão infetadas são um desafio às medidas de controlo da transmissão. As estimativas do US CDC disponíveis em julho de 2020 indicavam que 40% das infeções por SARS-CoV-2 nos EUA seriam assintomáticas e que a transmissão do vírus na ausência de sintomas representaria 50% do total (CDC). Outros estudos disponíveis reportam percentagens de indivíduos infetados com SARS-CoV-2, que não apresentam sintomas no momento do teste, entre os 20 a 80% (Bi *et al.*, 2020; Hoxha *et al.*, 2020; Sutton, Fuchs, D'Alton, & Goffman, 2020). Estas percentagens colocam o SARS-CoV-2 próximo dos valores estimados para a gripe por influenza, em que a proporção estimada de infeções

assintomáticas varia entre 50 e 75% (Hayward *et al.*, 2014; P. W. Horby, 2014). A existência destes reservatórios de pessoas assintomáticas contribui para o sucesso e reaparecimento sazonal do vírus influenza. No entanto, é importante notar que o vírus influenza é muito diferente do SARS-CoV-2. Por exemplo, a taxa de mutação do influenza é mais elevada permitindo-lhe evadir-se ao sistema imune num processo conhecido como deriva antigénica (Rambaut *et al.*, 2008). Este mecanismo é considerado central para a manifestação sazonal de novas linhagens eficazes do vírus da gripe a partir dos reservatórios preexistentes (Rambaut *et al.*, 2008). No que se refere ao SARS-CoV-2, o elevado número de infeções em pessoas sem sintomas e a probabilidade de estas transmitirem o vírus tem implicações claras na definição de políticas de isolamento, medidas de distanciamento social e nas estratégias para a realização de testes. Existe uma heterogeneidade vigorosa de fatores que se relacionam com a transmissão de vírus respiratórios, nomeadamente os diferentes padrões de contacto entre indivíduos, os níveis de imunidade, variáveis ambientais, entre outros. Um estudo ainda em fase de “pré-publicação” efetuou a caracterização de 318 cadeias de transmissão do SARS-CoV-2 (Qian *et al.*, 2020). A investigação mostra que a maioria dos casos de transmissão sucedeu em espaços interiores, sendo que apenas um evento de transmissão ocorreu ao ar livre e apenas entre 2 pessoas (Qian *et al.*, 2020). Assim, a partilha de espaços interiores parece representar maior risco de infeção por SARS-CoV-2 quando comparada com a concomitância em espaços exteriores. Os fatores na base desta diferença permanecem por circunscrever, mas é possível que o menor tempo de contacto próximo entre as pessoas, a temperatura, o vento, ou a luz solar cumpram um papel influente na redução da probabilidade de transmissão do vírus no exterior (Takagi *et al.*, 2020). Tem havido um acréscimo notável do conhecimento sobre a resposta imune à infeção com SARS-CoV-2. Os estudos preliminares focaram-se na investigação das respostas mediadas por linfócitos B e consequente produção de anticorpos. Foi demonstrado que a maioria das pessoas com COVID-19 desenvolvem níveis detetáveis de anticorpos que são específicos para o vírus (Long *et al.*, 2020). Devido ao pouco tempo de existência do vírus ainda não há informações detalhadas sobre qual a duração dos anticorpos ou se irão fornecer proteção contra eventuais reinfeções. Um estudo na fase de “pré-publicação”, acompanhou 65 pessoas infetadas durante 94 dias e verificou que a produção de anticorpos é maior em pessoas com sintomas mais severos e que um declínio considerável dos principais

anticorpos contra o SARS-CoV-2 começa a ocorrer um mês após o aparecimento dos sintomas (Seow *et al.*, 2020). Contrariamente, a resposta imune mediada por células T contra o SARS-CoV-2 parece ser extremamente duradoura havendo também evidência de imunidade cruzada com outros coronavírus (Grifoni *et al.*, 2020). Uma “pré-publicação” sugere que as pessoas infetadas com SARS-CoV em 2003, conservam, 17 anos depois, uma resposta imune mediada por células T que pode ser eficaz contra o SARS-CoV-2 (Bert *et al.*, 2020).

Apesar dos notáveis avanços feitos nos primeiros meses da epidemia, ainda não há respostas claras para questões essenciais. No momento da escrita deste texto ainda não tinha sido cientificamente estabelecido nenhum caso de reinfeção com SARS-CoV-2, não se sabendo, se tal ocorrer, se os sintomas serão diferentes e eventualmente menos graves do que na primeira infeção. Relativamente à transmissão do vírus, numa carta aberta, publicada a 6 de julho de 2020, 239 cientistas de 32 países alertam sobre o potencial de transmissão aérea do SARS-CoV-2 (Morawska & Milton, 2020). Os autores escrevem que um conjunto crescente de evidências científicas sugere “para além de qualquer dúvida razoável” que o vírus se transmite através de aerossóis, partículas pequenas capazes de circular no ar por longos períodos e que esta constatação deve ser refletida nas recomendações da OMS. A relevância das mutações amplamente descritas no genoma de SARS-CoV-2 e a possível evolução do vírus durante a transmissão pandémica de pessoa-a-pessoa é outro dos quesitos científicos em aprofundamento. Foi identificado que algumas das mutações de SARS-CoV-2, possivelmente relacionadas com processos evolutivos, podem interferir com a sensibilidade dos métodos diagnóstico molecular para deteção de vírus (Osorio & Correia-Neves, 2020). No entanto, ainda não é claro se alguma destas mutações podem alterar a transmissibilidade ou severidade do vírus. Neste contexto, a mutação D614G na proteína S tem sido objeto de debate sobre o possível papel que desempenha em tornar o vírus mais transmissível (Korber *et al.*, 2020; Lucy van Dorp *et al.*, 2020). Naturalmente, a maior questão científica ainda sem resposta será qual a eficácia das futuras estratégias de vacinação. Existiam no início de julho de 2020 mais de 20 vacinas em ensaios clínicos. Os primeiros resultados de testes de eficácia em larga escala para comparar as taxas de infeção e o desenvolvimento da COVID-19 entre as

peessoas que recebem a vacina e as que recebem um placebo vão começar a surgir nos próximos meses. Estes resultados são altamente aguardados pois uma vacina eficaz pode ser uma forma ímpar e extraordinária de controlar esta pandemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 360Dx. (2020). *Coronavirus Test Tracker: Commercially Available COVID-19 Diagnostic Tests*. Retrieved from <https://www.360dx.com/coronavirus-test-tracker-launched-COVID-19-tests>.
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*, 26(4), 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- Bao, L., Deng, W., Gao, H., Xiao, C., Liu, J., Xue, J., . . . Qin, C. (2020). Lack of Reinfection in Rhesus Macaques Infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2003.2013.990226. <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226>.
- Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., . . . Lane, H. C. e. (2020). Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report, *N Engl J Med*, 383:1813-1826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>.
- Bert, N. L., Tan, A. T., Kunasegaran, K., Tham, C. Y. L., Hafezi, M., Chia, A., . . . Bertoletti, A. (2020). Different pattern of pre-existing SARS-COV-2 specific T cell immunity in SARS-recovered and uninfected individuals. *bioRxiv*, 2020.2005.2026.115832. <https://doi.org/10.1101/2020.05.26.115832>.
- Bi, Q., Wu, Y., Mei, S., Ye, C., Zou, X., Zhang, Z., . . . Feng, T. (2020). Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30287-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30287-5).
- Brainard, J. (2020, May. 13, 2020). Scientists are drowning in COVID-19 papers. Can new tools keep them afloat? *Science*. Retrieved from <https://www.sciencemag.org/news/2020/05/scientists-are-drowning-COVID-19-papers-can-new-tools-keep-them-afloat>.
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., . . . Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 38(7), 870-874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.
- Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., . . . Simons, M. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and provides a possible pathway into the central nervous system. *bioRxiv*, 2020.2006.2007.137802. <https://doi.org/10.1101/2020.06.07.137802>.
- CDC. *COVID-19 Pandemic Planning Scenarios* | CDC. Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html>.
- Chau, N. V. V., Thanh Lam, V., Thanh Dung, N., Yen, L. M., Minh, N. N. Q., Hung, L. M., . . . group, O. C.-r. (2020). The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa711>.

Chen, Q., Li, J., Deng, Z., Xiong, W., Wang, Q., & Hu, Y. Q. (2010). Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. *Intervirology*, 53(2), 95-104. <https://doi.org/10.1159/000264199>.

Daniel Hook, S. P. (2020, 06 MAY 2020). How COVID-19 is changing research culture. *Research Professional News*. Retrieved from <https://www.researchprofessionalnews.com/tr-news-uk-views-of-the-uk-2020-5-how-COVID-19-is-changing-research-culture/>.

Dimensions. (2020). *Dimensions is facilitating access to COVID-19 research*. Retrieved from <https://COVID-19.dimensions.ai>.

Doremalen, N., Lambe, T., Spencer, A., Belij-Rammerstorfer, S., Purushotham, J. N., Port, J. R., . . . Munster, V. J. (2020). ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *bioRxiv*, 2020.2005.2013.093195. <https://doi.org/10.1101/2020.05.13.093195>.

Dorward, D. A., Russell, C. D., Um, I. H., Elshani, M., Armstrong, S. D., Penrice-Randal, R., . . . Lucas, C. D. (2020). Tissue-specific tolerance in fatal COVID-19. *medRxiv*, 2020.2007.2002.20145003. <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.20145003>.

EDCTP. (2020). *Emergency funding of COVID-19 research among EDCTP 2020 calls for proposals*. Retrieved from <http://www.edctp.org/news/emergency-funding-of-COVID-19-research-among-edctp-2020-calls-for-proposals/>.

European Commission. (2020). *Funding & tender opportunities. European Research Area (ERA) corona platform*. Retrieved from <https://ec.europa.eu/info/funding-tenders/opportunities/portal/screen/COVID-19>.

FCT. (2020). *COVID-19*. Retrieved from <https://www.fct.pt/COVID-19/index.phtml.pt>.

Fundação "la Caixa". (2020). *A Fundação "la Caixa" destina 1,5 milhões de euros a projetos de inovação ligados à COVID-19*. Retrieved from <https://fundacaolacaixa.pt/documents/728273/820033/fundacao-la-caixa-destina-1-5-milhoes-euros-a-projetos-inovacao-ligados-a-COVID-19.pdf>.

Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., Yang, M., . . . Qin, C. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, 369(6499), 77-81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>.

Ghebreyesus, T. A. (2020). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 16 March 2020* [Press release]. Retrieved from <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---16-march-2020>.

Gorzalski, A. J., Tian, H., Laverdure, C., Morzunov, S., Verma, S. C., VanHooser, S., & Pandori, M. W. (2020). High-Throughput Transcription-mediated amplification on the Hologic Panther is a highly sensitive method of detection for SARS-CoV-2. *J Clin Virol*, 129, 104501-104501. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104501>.

Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., . . . Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501 e1415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>.

- Hayward, A. C., Fragaszy, E. B., Bermingham, A., Wang, L., Copas, A., Edmunds, W. J., . . . Flu Watch, G. (2014). Comparative community burden and severity of seasonal and pandemic influenza: results of the Flu Watch cohort study. *Lancet Respir Med*, 2(6), 445-454. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70034-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70034-7).
- Hijawi, B., Abdallat, M., Sayaydeh, A., Alqasrawi, S., Haddadin, A., Jaarour, N., . . . Alsanouri, T. (2013). Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East Mediterr Health J*, 19 Suppl 1, S12-18.
- Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J., Mafham, M., Bell, J., Linsell, L., . . . Landray, M. J. (2020). Effect of Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19: Preliminary Report. *medRxiv*, 2020.2006.2022.20137273. <https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20137273>.
- Horby, P. W. (2014). Community studies of influenza: new knowledge, new questions. *Lancet Respir Med*, 2(6), 430-431. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70053-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70053-0).
- Hoxha, A., Wyndham-Thomas, C., Klamer, S., Dubourg, D., Vermeulen, M., Hammami, N., & Cornelissen, L. (2020). Asymptomatic SARS-CoV-2 infection in Belgian long-term care facilities. *Lancet Infect Dis*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30560-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30560-0).
- Hulswit, R. J., de Haan, C. A., & Bosch, B. J. (2016). Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Adv Virus Res*, 96, 29-57. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>.
- JN. (2020). Ventilador produzido em Portugal recebe luz verde do Infarmed. *Jornal de Notícias*. Retrieved from <https://www.jn.pt/nacional/ventilador-produzido-em-portugal-recebe-luz-verde-do-infarmed-12427363.html>.
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical hypotheses*, 141, 109786-109786. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>.
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., . . . Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>.
- Ledford, H. (2020). How does COVID-19 kill? Uncertainty is hampering doctors' ability to choose treatments. *Nature*, 580 (7803), 311-312. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01056-7>.
- Lim, P. L., Kurup, A., Gopalakrishna, G., Chan, K. P., Wong, C. W., Ng, L. C., . . . Leo, Y. S. (2004). Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 350 (17), 1740-1745. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032565>.
- Liu, D. X., Liang, J. Q., & Fung, T. S. (2020). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1. In *Reference Module in Life Sciences*: Elsevier.
- Long, Q. X., Liu, B. Z., Deng, H. J., Wu, G. C., Deng, K., Chen, Y. K., . . . Huang, A. L. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*, 26 (6), 845-848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>.
- Morawska, L., & Milton, D. K. (2020). It is Time to Address Airborne Transmission of COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa939>.

- Olsen, S., Chen, M.-Y., Liu, Y.-L., Witschi, M., Ardoin, A., Calba, C., . . . Pukkila, J. (2020). Early Introduction of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 into Europe. *Emerging Infectious Disease journal*, 26 (7), 1567. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200359>.
- Osorio, N. S., & Correia-Neves, M. (2020). Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays. *Lancet Infect Dis*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30435-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30435-7).
- Park, T. J., Hyun, M. S., Lee, H. J., Lee, S. Y., & Ko, S. (2009). A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Talanta*, 79 (2), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.051>.
- Payne, S. (2017). Chapter 17 - Family Coronaviridae. In S. Payne (Ed.), *Viruses* (pp. 149-158): Academic Press.
- Perry, T. S. (2020). *Biosensors May Hold the Key to Mass Coronavirus Testing*. Retrieved from <https://spectrum.ieee.org/view-from-the-valley/biomedical/diagnostics/biosensors-key-mass-coronavirus-testing>.
- Petersen, E., Koopmans, M., Go, U., Hamer, D. H., Petrosillo, N., Castelli, F., . . . Simonsen, L. (2020). Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30484-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30484-9).
- Qian, H., Miao, T., LIU, L., Zheng, X., Luo, D., & Li, Y. (2020). Indoor transmission of SARS-CoV-2. *medRxiv*, 2020.2004.2004.20053058. <https://doi.org/10.1101/2020.04.04.20053058>.
- Rambaut, A., Pybus, O. G., Nelson, M. I., Viboud, C., Taubenberger, J. K., & Holmes, E. C. (2008). The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*, 453 (7195), 615-619. <https://doi.org/10.1038/nature06945>.
- Saúde, D. G. d. (2020). *COVID-19: Diagnóstico Laboratorial*. Retrieved from <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>.
- Science. (2020). *The Science journals are striving to provide the best and most timely research, analysis, and news coverage of COVID-19 and the coronavirus that causes it*. All content is free to access. Retrieved from https://www.sciencemag.org/collections/coronavirus?intcmp=ghd_cov.
- Seow, J., Graham, C., Merrick, B., Acors, S., Steel, K. J. A., Hemmings, O., . . . Doores, K. (2020). Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection. *medRxiv*, 2020.2007.2009.20148429. <https://doi.org/10.1101/2020.07.09.20148429>.
- Spiteri, G., Fielding, J., Diercke, M., Campese, C., Enouf, V., Gaymard, A., . . . Ciancio, B. C. (2020). First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the WHO European Region, 24 January to 21 February 2020. *Eurosurveillance*, 25(9), 2000178. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000178>.
- Sutton, D., Fuchs, K., D'Alton, M., & Goffman, D. (2020). Universal Screening for SARS-CoV-2 in Women Admitted for Delivery. *N Engl J Med*, 382(22), 2163-2164. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009316>.
- Takagi, H., Kuno, T., Yokoyama, Y., Ueyama, H., Matsushiro, T., Hari, Y., & Ando, T. (2020). Higher Temperature, Pressure, and Ultraviolet Are Associated with Less COVID-19 Prevalence: Meta-Regression of Japanese Prefectural Data. *medRxiv*, 2020.2005.2009.20096321. <https://doi.org/10.1101/2020.05.09.20096321>.

- van Dorp, L., Acman, M., Richard, D., Shaw, L. P., Ford, C. E., Ormond, L., . . . Balloux, F. (2020). Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol*, 83, 104351. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104351>.
- van Dorp, L., Richard, D., Tan, C. C., Shaw, L. P., Acman, M., & Balloux, F. (2020). No evidence for increased transmissibility from recurrent mutations in SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2005.2021.108506. <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.108506>.
- Wang, B., Potter, S. J., Lin, Y., Cunningham, A. L., Dwyer, D. E., Su, Y., . . . Saxena, N. K. (2005). Rapid and Sensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Rolling Circle Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2339-2344. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.5.2339-2344.2005>.
- Wang, J. T., & Chang, S. C. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Curr Opin Infect Dis*, 17(2), 143-148. <https://doi.org/10.1097/00001432-200404000-00013>.
- Website. (2020). *International Dimensions of Ethics Education*. Retrieved from <https://www.umass.edu/sts/ethics/sars.html>.
- WHO. (2020). *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. Retrieved from <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., . . . Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465-469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Yip, C. C., Huang, Y., & Yuen, K. Y. (2009). More and More Coronaviruses: Human Coronavirus HKU1. *Viruses*, 1 (1), 57-71. <https://doi.org/10.3390/v1010057>.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., . . . McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.
- Zhang, Y.-Z., Wu, F., Chen, Y.-M., Pei, Y.-Y., Xu, L., Wang, W., Zhao, S., Yu, B., Hu, Y., Tao, Z.-W., Song, Z.-G., Tian, J.-H., Zhang, Y.-L., Liu, Y., Zheng, J.-J., Dai, F.-H., Wang, Q.-M., She, J.-L. and Zhu, T.-Y. (2020). *Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN908947.2>.
- Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, Xie, Z. H., Chan, K. H., . . . Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, 362 (9393), 1353-1358. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14630-2).
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., . . . Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579 (7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.