Estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 em amostras armazenadas em água ultrapura a –80 °C por até 24 meses

Stability of SARS-CoV-2 RNA in Samples Stored in Ultrapure Water at –80 °C for up to 24 Months

Matheus Victor de Souza Laurentino[1,2], Sérgio Dias Costa-Júnior[3], Cristiane Oliveira Santos[1], Fabrine Felipe Hilário[1], Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha[2], Marcia Regina Piuvezam[2], Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros[1], Eduardo Sérgio Soares Sousa[1,4], Eloiza Helena Campana[1,5], Naiara Naiana Dejani[1,3]

[1] Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Biologia Molecular. João Pessoa, PB, Brasil.

[2] Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, PB, Brasil.

[3] Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Biomédicas. João Pessoa, PB, Brasil.

[4] Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. João Pessoa, PB, Brasil.

[5] Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Ciências Farmacêuticas. João Pessoa, PB, Brasil.

Resumo

Durante a pandemia de COVID-19, a detecção da infecção por SARS-CoV-2 por meio de ensaios de amplificação de ácidos nucleicos foi uma ferramenta crucial para a vigilância epidemiológica e para as estratégias de controle. Análises prospectivas e retrospectivas do genoma viral podem revelar informações importantes sobre a adaptação e a evolução do vírus em diferentes períodos epidemiológicos, e a qualidade das amostras virais armazenadas é fundamental para esse tipo de análise. Neste estudo, a estabilidade de amostras de RNA do SARS-CoV-2 armazenadas após extração de swabs nasofaríngeos humanos foi avaliada ao longo de um período de dois anos. Amostras de RNA do SARS-CoV-2 foram selecionadas aleatoriamente para avaliar a detecção dos genes ORF1ab e N após longos períodos de armazenamento em água livre de DNase/RNase a –80 °C. Foi realizado um ensaio de RT-qPCR multiplex para determinar os valores de Ct dos genes N e ORF1ab após diferentes períodos de armazenamento (seis, 12, 18 ou 24 meses) e compará-los com o valor de Ct obtido antes do armazenamento (tempo zero). Os valores de Ct não diferiram após seis e 12 meses em comparação com o tempo zero para todos os alvos. O gene N apresentou aumento nos valores de Ct aos 18 e 24 meses quando comparado ao tempo zero, enquanto o gene ORF1ab foi o alvo mais estável, não apresentando diferenças significativas nos valores de Ct mesmo após 24 meses de armazenamento. Em conjunto, os resultados sugerem uma redução na estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 após 12 meses de armazenamento e fornecem informações relevantes sobre a estabilidade de amostras de RNA viral armazenadas por longos períodos para vigilância genômica retrospectiva.

Palavras-chave: COVID-19; pandemia; vírus de RNA; RT-qPCR.

Abstract

During the COVID-19 pandemic, the detection of SARS-CoV-2 infection by nucleic acid amplification assays was a crucial tool for epidemiological surveillance and control strategies. Prospective and retrospective analyses of viral genomes may reveal important information about viral adaptation and evolution across different epidemiological periods, and the quality of stored viral genome samples is critical for such analyses. In this study, the stability of SARS-CoV-2 RNA samples stored after extraction from human nasopharyngeal swab specimens was evaluated over a two-year period. SARS-CoV-2 RNA samples were randomly selected to assess the detection of the ORF1ab and N genes after long-term storage in DNase/RNase-free water at –80 °C. A multiplex RT-qPCR assay was performed to determine Ct values for the N and ORF1ab genes after different storage periods (six, 12, 18, or 24 months) and compared with the Ct values obtained before storage (time zero). Ct values did not differ after six and 12 months compared with time zero for all targets. The N gene showed increased Ct values at 18 and 24 months compared with time zero, whereas the ORF1ab gene was the most stable target, showing no significant differences in Ct values even after 24 months of storage. Collectively, our results suggest a slight reduction in SARS-CoV-2 RNA stability after 12 months of storage and provide useful insights into the stability of viral RNA samples stored long-term for retrospective genomic surveillance.

Keywords: COVID-19; pandemic; RNA virus; RT-qPCR.

Correspondência
Sérgio Dias Costa-Júnior
E-mail: sergio.costa@ufpe.br

Recebido em 31/03/2025 | Aprovado em 22/08/2025 | DOI: 10.21877/2448-3877.202600229.pt

INTRODUÇÃO

Desde 2020, o mundo enfrenta a pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), uma doença respiratória grave causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). O SARS-CoV-2, um vírus pertencente à espécie *Betacoronavirus pandemicum* e ao gênero *Betacoronavirus*, foi isolado pela primeira vez em Wuhan, China.[1] Houve ampla mobilização científica e sanitária voltada ao controle e tratamento da COVID-19, e o diagnóstico rápido da infecção viral tem sido crucial para uma resposta emergencial eficaz.[2]

O diagnóstico laboratorial de infecções virais pode ser realizado por diferentes métodos, incluindo a detecção do genoma viral por meio de testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs). Também podem ser utilizados ensaios imunológicos para detecção de antígenos virais ou da presença de anticorpos específicos do paciente, além de abordagens menos comuns, como a visualização do vírus por microscopia eletrônica e a detecção por métodos de cultura celular.[3,4] Os NAATs apresentam maior sensibilidade e especificidade em comparação com os ensaios imunológicos, além de serem mais rápidos e menos complexos do que os métodos de cultura celular e a microscopia eletrônica.[5,6]

O SARS-CoV-2 possui um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, com aproximadamente 29,9 kb, que codifica 13 quadros de leitura abertos (Open Reading Frames — ORFs).[7] A detecção do RNA viral em amostras de pacientes por RT-qPCR, uma metodologia de NAAT, tem sido universalmente utilizada como método padrão-ouro para confirmar a infecção viral. Um elemento fundamental do método de RT-qPCR é a etapa inicial de extração e purificação do ácido nucleico viral a partir das amostras do paciente. Diversas amostras do trato respiratório (como saliva, swabs nasofaríngeos, escarro e fluido brônquico) têm sido utilizadas para a extração de RNA.[2,8] Como o genoma viral é uma molécula de RNA, a detecção envolve uma etapa de transcrição reversa (RT) para sintetizar DNA complementar (cDNA) a partir do genoma de RNA e, subsequentemente, uma reação em cadeia da polimerase em tempo real para amplificar sequências específicas de cDNA utilizando primers específicos para os genes e sondas fluorescentes.[9]

As principais limitações da RT-qPCR estão relacionadas a problemas na coleta das amostras, no armazenamento das amostras e nas etapas iniciais de extração/purificação do RNA, o que pode levar à potencial degradação do RNA e à contaminação por inibidores da PCR. Além disso, mutações genômicas podem resultar em redução da sensibilidade do método.[10] Ademais, a qualidade e a estabilidade do RNA genômico viral constituem fatores críticos para estudos retrospectivos de vigilância genômica após longos períodos de armazenamento.[11-18] A estabilidade de produtos biológicos durante o congelamento em temperaturas ultrabaixas pode ser influenciada por diversos fatores, como o volume da amostra, que afeta diretamente a velocidade e o tempo de congelamento. Além disso, os efeitos da crioconcentração e do estresse mecânico associados ao processo de congelamento desempenham papel importante na estabilidade do material biológico.[12]

Considerando a importância da manutenção da integridade das amostras para estudos retrospectivos de vigilância genômica, este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 armazenado em água ultrapura a -80°C por até 24 meses utilizando RT-qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

O RNA genômico do SARS-CoV-2 foi extraído e purificado a partir de amostras de swabs nasofaríngeos utilizando o sistema automatizado *Maxwell Rapid Sample Concentrator Instrument* (Promega®, Estados Unidos) e o *RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit* (Promega®, Estados Unidos), resultando em um eluato final de 75 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração/purificação, as amostras foram imediatamente submetidas à detecção do RNA viral, para fins diagnósticos no tempo zero, e posteriormente armazenadas a -80°C em um ultrafreezer ULT (Indrel Scientific®, Brasil).

Para este estudo, amostras contendo RNA do SARS-CoV-2 detectado por RT-qPCR, provenientes de pacientes sintomáticos, sem ciclos prévios de congelamento-descongelamento, com valor de *cycle threshold* (Ct) < 35, e armazenadas por seis, 12, 18 ou 24 meses a -80°C foram selecionadas aleatoriamente (n = 20 por período). A detecção dos alvos N e ORF1ab do SARS-CoV-2 foi realizada por RT-qPCR utilizando o One Step/COVID-19-IBMP Kit (Instituto Brasileiro de Biologia Molecular do Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, em um termociclador *QuantStudio* 3 (ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos). As sondas empregadas foram FAM para ORF1ab, HEX/VIC para o gene N, e ROX para o controle interno da extração de RNA (IC). Controles positivos e negativos para os alvos gênicos avaliados foram incluídos em todos os ensaios de RT-qPCR para garantir a confiabilidade dos resultados.

Os valores de Ct foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Anderson–Darling, seguido de teste t pareado. O coeficiente de variação (CV) dos valores de Ct foi avaliado para os alvos do SARS-CoV-2 (N e ORF1ab) e para o controle interno (IC) no tempo zero e após seis, 12, 18 ou 24 meses de armazenamento. Adicionalmente, as amostras foram analisadas em duplicata, em duas placas independentes de RT-qPCR.

Foi adotado nível de significância de $p < 0,05$ para as análises. A análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism* versão 9.0.0 (Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (número 4.026.905).

RESULTADOS

Conforme apresentado na Tabela 1, não houve diferença significativa entre o valor médio de Ct do alvo de controle interno humano (IC) no tempo zero quando comparado aos intervalos de seis, 12 e 18 meses. Entretanto, após 24 meses de armazenamento (28,00 ± 0,33 para 29,22 ± 0,70), observou-se aumento significativo no Ct médio para o IC.

Nas análises dos alvos do SARS-CoV-2, observou-se um aumento no valor de Ct para o gene N após 18 meses (22,35 ± 4,40 para 23,45 ± 4,23) e 24 meses (24,20 ± 3,7 para 25,75 ± 3,38) quando comparado ao tempo zero. Além disso, a detecção do gene ORF1ab não apresentou variação significativa ao longo de dois anos; não houve diferença significativa no valor médio de Ct para ORF1ab após 24 meses em comparação ao tempo zero.

Todos os alvos do SARS-CoV-2 apresentaram aumento do coeficiente de variação médio. Entre os alvos do SARS-CoV-2, o menor CV médio foi 2,64% (gene N após seis meses) e o maior foi 4,19% (ORF1ab após seis meses). O controle interno (IC) também apresentou aumento no CV médio, com 3,46% (após 18 meses) e 6,16% (após seis meses).

Tabela 1

Análise da estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 em diferentes períodos de armazenamento.

Alvo	Períodos de armazenamento (Média ± DP) (n = 20 por período)		Valor de *p**	Coeficiente de variação (Média ± DP)
	Tempo zero	**06 meses**		
Controle interno	25,40 ± 6,80	27,40 ± 4,24	0,317	6,16% ± 8,40%
N	22,90 ± 3,43	22,40 ± 3,89	0,056	2,64% ± 3,11%
ORF1ab	22,65 ± 4,73	21,58 ± 3,76	0,250	4,19% ± 3,32%
	Tempo zero	**12 meses**		
Controle interno	28,35 ± 3,23	26,22 ± 2,21	0,050	4,47% ± 7,48%
N	23,10 ± 4,49	23,00 ± 3.92	0,803	3,15% ± 3,32%
ORF1ab	22,10 ± 3,71	22,30 ± 3,72	0,463	3,23% ± 2,10%
	Tempo zero	**18 meses**		
Controle interno	27,10 ± 2,42	26,95 ± 6,92	0,491	3,46% ± 3,45%
N	22,35 ± 4,40	23,45 ± 4,23	0,012*	4,06% ± 4,96%
ORF1ab	22,80 ± 4,51	22,55 ± 4,45	0,675	4,37% ± 6,62%
	Tempo zero	**24 meses**		
Controle interno	28,00 ± 0,33	29,22 ± 0,70	0,0479*	4,92% ± 1,24%
N	24,20 ± 3,70	25,75 ± 3,38	0,004**	3,83% ± 3,02%
ORF1ab	23,40 ± 4,07	24,05 ± 3,79	0,389	3,74% ± 5,46%

DP: Desvio padrão.

DISCUSSÃO

Um estudo anterior demonstrou que amostras respiratórias positivas para RNA do SARS-CoV-2 podem ser mantidas por seis meses em temperaturas iguais ou inferiores a -70°C, sem comprometer a integridade das amostras.[19,20] No presente estudo, a avaliação de amostras de RNA do SARS-CoV-2 extraídas/purificadas e armazenadas por diferentes períodos demonstrou que, após 12 meses de armazenamento a -80°C, a detecção do RNA permanece sem diferenças significativas na RT-qPCR, corroborando os achados de De Oliveira (2022) [11] sobre a qualidade do RNA do SARS-CoV-2. Entretanto, o presente estudo demonstrou que, após 18 e 24 meses, ocorreram aumentos significativos no valor médio de Ct do alvo N.

Neste trabalho, o valor de Ct do alvo N apresentou aumento de 1,1 após 18 meses e 1,55 após 24 meses. Uma possível explicação para esse aumento no valor de Ct é que ciclos de congelamento e descongelamento (freeze-thaw) podem reduzir a qualidade do RNA e, consequentemente, aumentar o Ct. Foi relatado que múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento aumentam em 0,08 o valor de Ct dos alvos do SARS-CoV-2.[18] Adicionalmente, Dzung et al. (2020),[12] ao avaliarem a detectabilidade do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de swab submetidas a ciclos de congelamento-descongelamento, observaram um aumento nos valores de Ct de 0,10 a 0,19 por ciclo para três alvos do SARS-CoV-2 (S, N e ORF1ab). Em outro estudo, Li et al. (2020)[13] relataram que ciclos de congelamento-descongelamento impactaram a detecção do RNA do SARS-CoV-2 extraído de amostras de swab nasofaríngeo, resultando em um aumento de 0,41 no valor de Ct do gene ORF1ab após um ciclo e 0,82 após dois ciclos.[13] Em contraste, no presente estudo, os ciclos de congelamento-descongelamento não constituíram variável neste estudo, uma vez que as amostras de RNA em água ultrapura foram testadas para SARS-CoV-2 e armazenadas a -80°C, sendo descongeladas apenas uma vez ao final do período de armazenamento para avaliação da estabilidade do RNA.

Neste estudo, as amostras apresentaram CVs entre 2,6% e 4% para os alvos do SARS-CoV-2. Pesquisas anteriores demonstraram que amostras com valores elevados de Ct apresentam CVs mais altos em comparação com uma segunda RT-qPCR.[11,20] Amostras com Ct inicial em torno de 36 apresentaram CV médio de 10%, enquanto amostras com Ct inicial em torno de 27 apresentaram CV entre 2% e 3%.[20] No presente estudo, observou-se aumento do coeficiente de variação para os alvos N, ORF1ab e IC nas amostras com valores médios de Ct em todos os tempos avaliados em comparação ao tempo zero, conforme previamente relatado para os genes N1 e N2 do SARS-CoV-2 após 12 meses de armazenamento.[11]

Em todos os períodos avaliados, os valores de Ct dos alvos gênicos do SARS-CoV-2 permaneceram abaixo de 30 ciclos, indicando que, mesmo com a redução da estabilidade do alvo N após 18 e 24 meses, os valores de Ct das amostras permanecem adequados para análise por sequenciamento, uma vez que estudos de sequenciamento do SARS-CoV-2 consideram Ct < 30 para alvos virais como critério de inclusão, a fim de obter maior rendimento de sequenciamento.[21,22] Assim, mesmo após longos períodos de armazenamento a -80°C em água, as amostras extraídas/purificadas permanecem viáveis para uso em estudos retrospectivos de sequenciamento do SARS-CoV-2 e vigilância genômica, especialmente aquelas inicialmente armazenadas com valores de Ct mais baixos. Estudos de sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 são fundamentais para fornecer informações sobre a dinâmica evolutiva e epidemiológica do vírus.[23,24] Além disso, a vigilância genômica é necessária para monitorar a evolução e a disseminação do vírus, além de contribuir para a otimização de testes moleculares e vacinas.[25]

Este estudo apresenta limitações. A análise baseou-se exclusivamente nos valores de Ct obtidos por RT-qPCR, sem avaliações complementares da integridade do RNA. Além disso, o tamanho da amostra por grupo foi relativamente modesto, e as condições de armazenamento podem não refletir condições mais variáveis, como transporte das amostras ou descongelamentos repetidos. Estudos futuros que incorporem diferentes tampões de armazenamento, métricas quantitativas de integridade do RNA e estratificação por carga viral poderão fornecer validação mais ampla desses achados.

CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a estabilidade de amostras de RNA do SARS-CoV-2 armazenadas por longos períodos em água ultrapura a -80°C e demonstrou que permanecem adequadas para análise por RT-qPCR por até 24 meses, com pequenos aumentos nos valores de Ct após 18 meses. Esses achados sustentam o uso de amostras armazenadas por longos períodos em estudos retrospectivos de vigilância genômica e reforçam a importância do armazenamento em temperaturas ultrabaixas para biobancos de RNA viral.

REFERÊNCIAS

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y.M, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 579(7798):265-269.
2. Hu B, Guo H, Zhou P & Shi ZL. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154.
3. Pellet P.E, Mitra S & Holland TC. (2014). Basics of virology. *Handbook of clinical neurology*, 123, 45-66.
4. Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, ... & Jiang S. (2020). Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of medical virology*, 92(4), 408-417.
5. D'cruz RJ, Currier AW & Sampson VB. (2020). Laboratory testing methods for novel severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 468.
6. Mahony JB, Petrich A & Smieja M. (2011). Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(5-6), 217-249.
7. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim MJW, Kim VN, Chang H. (2020) The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. Cell. 14;181(4):914-921.e10.
8. Hitzenbichler F, Bauernfeind S, Salzberger B, Schmidt B & Wenzel JJ. (2021). Comparison of throat washings, nasopharyngeal swabs and oropharyngeal swabs for detection of SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(4), 653.
9. Yüce M, Filiztekin E & Özakaya KG. (2021). COVID-19 diagnosis—A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 172, 112752.
10. Afzal A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of advanced research*, 26, 149-159.
11. De Oliveira PSS, De Oliveira Silva B, e Silva, RP, Galdino LV, De Carvalho VMF, De Almeida AR, ... & Pereira MC. (2022). Evaluation of long-term stability of SARS-CoV-2 nucleic acid extracted from human nasopharyngeal samples. *Journal of Virological Methods*, 305, 114529.
12. Dzung A, Cheng PF, Stoffel C, Tastanova A, Turko P, Levesque MP & Bosshard PP. (2021). Prolonged unfrozen storage and repeated freeze-thawing of SARS-CoV-2 patient samples have minor effects on SARS-CoV-2 detectability by RT-PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(6), 691-697.
13. Li L, Li X, Guo Z, Wang Z, Zhang K, Li C, ... & Zhang S. (2020). Influence of storage conditions on SARS-CoV-2 nucleic acid detection in throat swabs. *The Journal of infectious diseases*, 222(2), 203-205.
14. Ott IM, Strine MS, Watkins AE, Boot M, Kalinich CC, Harden CA, ... & Wyllie AL. (2021). Stability of SARS-CoV-2 RNA in nonsupplemented saliva. *Emerging infectious diseases*, 27(4), 1146.
15. Perumal N, Jain RK, Shrivastava R, Lalwani J & Chaurasia D. (2020). Stability of SARS-CoV-2 RNA in viral lysis buffer stored at different temperatures. *Journal of laboratory physicians*, 12(04), 268-270.
16. Sabino BD, Alonso FDOM, Machado ACD, Junior AC, Venceslau MT, Knackfuss FB & Brandão Varella R. (2023). Stability of SARS-CoV-2 respiratory samples in non-freezing condition: importance for tropical countries under heavy diagnostic demand. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 61(6), e78-e80.
17. Stohr JJ, Wennekes M, Van Der Ent M, Diederen BM, Kluytmans-Van Den Bergh MF, Bergmans AM, ... & Pas SD. (2020). Clinical performance and sample freeze-thaw stability of the cobas® 6800 SARS-CoV-2 assay for the detection of SARS-CoV-2 in oro-/nasopharyngeal swabs and lower respiratory specimens. *Journal of Clinical Virology*, 133, 104686.
18. Thapar I, Langan LM, Davis H, Norman RS, Bojes HK & Brooks BW. (2023). Influence of storage conditions and multiple freeze-thaw cycles on N1 SARS-CoV-2, PMMoV, and BCoV signal. *Science of The Total Environment*, 896, 165098.
19. Aijaz J, Naseer F, Dojki M & Jamal S. (2022). Duration of respiratory sample stability at -80°C for SARS-CoV-2 PCR. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 38(2), 393.
20. Basso D, Aita A, Navaglia F, Franchin E, Fioretto P, Moz S, ... & Plebani M. (2020). SARS-CoV-2 RNA identification in nasopharyngeal swabs: issues in pre-analytics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(9), 1579-1586.
21. De Menezes MT, Moreira FRR, Whittaker C, Santos FM, Queiroz DC, Geddes V, ... & Aguiar RS. (2023). Dynamics of early establishment of SARS-CoV-2 VOC omicron lineages in Minas Gerais, Brazil. *Viruses*, 15(2), 585.
22. Iwamoto R, Yamaguchi K, Katayama K, Ando H, Setsukinai KI, Kobayashi H, ... & Kitajima M. (2023). Identification of SARS-CoV-2 variants in wastewater using targeted amplicon sequencing during a low COVID-19 prevalence period in Japan. *Science of The Total Environment*, 887, 163706.
23. Capozzi L, Bianco A, Del Sambro L, Simone D, Lippolis A, Notarnicola M, ... & Parisi A. (2021). Genomic surveillance of circulating SARS-CoV-2 in South East Italy: a one-year retrospective genetic study. *Viruses*, 13(5), 731.
24. Giovanetti M, Branda F, Cella E, Scarpa F, Bazzani L, Ciccozzi A, ... & Ciccozzi M. (2023). Epidemic history and evolution of an emerging threat of international concern, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Journal of Medical Virology*, 95(8), e29012.
25. Brito AF, Semenova E, Dudas G, Hassler GW, Kalinich CC, Kraemer MU, ... & Faria NR. (2022). Global disparities in SARS-CoV-2 genomic surveillance. *Nature communications*, 13(1), 7003.
26. Authelin JR, Rodrigues MA, Tchessalov S, Singh SK, McCoy T, Wang S & Shalaev E. (2020). Freezing of biologicals revisited: scale, stability, excipients, and degradation stresses. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 44-61.