



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DÉBORA MARIA ALMEIDA FERREIRA**

**APRIMORAMENTO DA VIGILÂNCIA MOLECULAR ATIVA POR  
MEIO DO MONITORAMENTO GENÔMICO DE VARIANTES EMERGENTES  
DE SARS-COV-2 NO ESTADO DO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2025**

DÉBORA MARIA ALMEIDA FERREIRA

APRIMORAMENTO DA VIGILÂNCIA MOLECULAR ATIVA POR MEIO  
DO MONITORAMENTO GENÔMICO DE VARIANTES EMERGENTES DE SARS-  
COV-2 NO ESTADO DO CEARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biotecnologia do Centro de Ciências da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
bacharel em Biotecnologia.

Orientador pedagógico: Prof. Dr. André  
Luis Coelho da Silva

Orientador técnico-científico: Prof. Dr.  
Fabio Miyajima

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F44a      Ferreira, Débora Maria Almeida.  
            Aprimoramento da vigilância molecular ativa por meio do monitoramento genômico de variantes emergentes de SARS-CoV-2 no estado do Ceará / Débora Maria Almeida Ferreira. – 2025.  
            91 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.  
            Orientação: Prof. Dr. Fabio Miyajima.  
            Coorientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Vigilância genômica. 2. SARS-CoV-2. 3. Ensaios moleculares de RT-qPCR. 4. Sequenciamento genômico. 5. Epidemiologia. I. Título.

CDD 661

---

DÉBORA MARIA ALMEIDA FERREIRA

APRIMORAMENTO DA VIGILÂNCIA MOLECULAR ATIVA POR MEIO  
DO MONITORAMENTO GENÔMICO DE VARIANTES EMERGENTES DE SARS-  
COV-2 NO ESTADO DO CEARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biotecnologia do Centro de Ciências da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Fabio Miyajima (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Caroline Rebouças Damasceno  
Fundação Oswaldo Cruz

À Deus.

À minha família, especialmente aos meus pais, Augusto Cesar, Maria do Socorro e a minha irmã Mariana Almeida, por fazerem parte de mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que me tem proporcionado: força, dedicação, motivação, sem isso, não teriam chegado até aqui.

Aos meus pais e minha família, pelo carinho, apoio moral e dedicação durante todo o percurso, não só estudantil, mas na vida, sempre me motivando e me fortalecendo na realização dos meus sonhos. O seu amor e incentivo, cuidado e zelo, paciência e apoio me auxiliaram a alcançar lugares que nunca havia imaginado antes.

À Fundação Oswaldo Cruz e a Universidade Federal do Ceará, pelo acolhimento, organização estrutural e acadêmico.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e tecnológico (FUNCAP) pelo apoio e manutenção financeiros da bolsa de auxílio a iniciação científica.

Aos membros da banca examinadora, agradeço por aceitarem o convite para participar da avaliação deste trabalho. Ao orientador e Prof. Dr. Fabio Miyajima, por aceitar esta orientação e conceder oportunidades durante minha trajetória na carreira científica. Ao Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva, pelos ensinamentos e acompanhamento durante a minha formação como biotecnologista. À Me. Caroline Rebouças Damasceno, pelo auxílio durante essa trajetória na carreira científica e ao Me. Cleber Furtado Aksenén, pela orientação durante esse trabalho, pelos ensinamentos técnico-científicos durante minha iniciação acadêmica e pelo auxílio prestado em todos os momentos de construção e desenvolvimento do projeto.

Aos colegas e amigos do ACME Lab, do Hemoce e da Fiocruz Ceará, Cleber Aksenén, Joaquim Júnior, Pedro Miguel, Bruna Maria, Caroline Rebouças, Thais Oliveira, Jamile Bezerra, Thaís Ferreira, Aurilene Cajado, Clara Norões, Mayra França, Luzia Zeferino, Joyce Carvalho, Ellen Gonçalves, Letícia Espinosa, Luisa Lopes, Lucas Delerino, Allyson Allan, Alyson Santos, Leonardo Araújo, Nicole Neves, Fábio Marconso, Suzana Porto, Eder Lopes, Fernando Braga, Alice Sabatino, Claudia Stutz, Veridiana Pessoa, Camila Vitorino e Davi Alves pela força e contribuição em diversos momentos.

Aos grandes amigos da Biotecnologia e da UFC, Alana Mara, Andrew Luna, Jônatas Girão, Guilherme Lobo, Laryssa Maia, Luan Maia, Axel Jhonantam, Arlene Almeida, Ana Carolina, Yandra, Ianah Marcilon, Gabriele Alice, Thiago Amorim, Beatriz Bezerra, Júlia Costa, Maria Eduarda Guedes, Levi Brito, Samuel, Pedro Coelho, Vitória

Leite, Hector Castro Girão, Rudá Ximenes, e a todos amigos e colegas que me auxiliaram e estiveram comigo nesta trajetória, agradeço por todas as dúvidas tiradas, por toda a companhia durante a graduação, e desejo sucesso à todos em suas carreiras científicas.

Aos novos amigos que fiz durante o caminho final da graduação que participaram do curso de verão, agradeço por expandirem meus horizontes e estarem presentes nessa fase de auto-descoberta profissional que estamos vivendo, e desejo muita sabedoria para nós.

Às minhas grandes amigas da escola para a vida, Dayane Hellen e Sarah Uchôa, por me derem motivação e me auxiliarem durante toda a realização do trabalho. Agradeço por sempre me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos, e por oferecerem companheirismo e força para que eu atingisse meus objetivos.

Aos médicos, enfermeiros, técnicos, demais profissionais da saúde, familiares, amigos e colegas de trabalho, que têm cuidado, orado, rezado e torcido pela vida da minha mãe e de diversas pessoas que sofrem com a COVID-19 neste momento difícil, meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

A todos os professores do Bacharelado em Biotecnologia e antigos orientadores e coorientadores pelos conhecimentos adquiridos e auxílio para minha formação acadêmica e profissional.

Finalmente, sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para elaboração deste trabalho e que estiveram presentes durante sua realização.

"Se vi mais longe, foi por estar de pé  
sobre ombros de gigantes."

(Isaac Newton)



## RESUMO

O estudo conduzido foi de grande importância para entender o cenário epidemiológico em constante mudança do Ceará durante a pandemia e pós-pandemia. O estudo objetivou o aprimoramento e a expansão de abordagens investigativas integradas de vigilância molecular aplicadas a vírus respiratórios, com foco no SARS-CoV-2, para o monitoramento e caracterização de variantes emergentes no estado do Ceará. Para isso, foram investigados o cenário epidemiológico da COVID-19 através da compilação do número de casos de SGs, de óbitos e de hospitalizações por SRAGs notificadas pelas bases de dados públicos DataSUS e IntegraSUS, durante o período de maio 2022 a fevereiro de 2024. Observou-se que a emergência de novas linhagens esteve possivelmente associada ao aumento no número de casos no Ceará. No agravamento desses casos, consequentemente acarretando a Síndrome Respiratória, foram observadas que as curvas de SRAGs seguem um padrão semelhante ao aumento do número de casos de COVID-19, denotando a influência de distintas linhagens na gravidade da doença (cura e óbito). Em seguida, avaliou-se a prevalência de assinaturas moleculares e a filogenia das linhagens circulantes através da compilação de 897, 508 e 802 genomas do GISAID, correspondentes aos períodos de circulação das linhagens BA.4, BE.9 e JN.1, respectivamente. O perfil das assinaturas moleculares dessas linhagens foi caracterizado, evidenciando as mutações-chave de 9 nucleotídeos deletados na proteína NSP6 (BA.4), a deleção de 244 nucleotídeos na região ORF7a (BE.9) e a inserção de 12 nucleotídeos na região Spike (JN.1). Essas mutações nortearam o desenvolvimento de ensaios de genotipagem, ampliando a detecção e o monitoramento das linhagens de interesse para 2023 e anos posteriores. Os ensaios ORF1a\_del9\_286 (BA.4), ORF7a\_244del (BE.9) e S\_INS12 (JN.1) apresentaram concordância de 98,33%, 89,7% e 94,40%, respectivamente. As sensibilidades foram de 98,69% (BA.4), 89,8% (BE.9) e 91,60% (JN.1), enquanto as especificidades alcançaram 98,20%, 89,6% e 100%. Os resultados obtidos demonstram validações satisfatórias, comparáveis a testes diagnósticos já estabelecidos. Além disso, o modelo de estudo e análise desenvolvido pode ser aplicado à vigilância de outros vírus respiratórios, como Influenza e Vírus Sincicial Respiratório (VSR), ampliando sua aplicabilidade na detecção e monitoramento de patógenos emergentes.

**Palavras-chave:** vigilância genômica; SARS-CoV-2; ensaios moleculares de RT-qPCR; sequenciamento genômico; epidemiologia

## ABSTRACT

The study conducted was of great importance in understanding the constantly changing epidemiological scenario in Ceará during the pandemic and post-pandemic periods. The study aimed to improve and expand integrated investigative approaches in molecular surveillance applied to respiratory viruses, focusing on SARS-CoV-2, for monitoring and characterizing emerging variants in the state of Ceará. To achieve this, the epidemiological scenario of COVID-19 was investigated through the compilation of the number of SG cases, deaths, and hospitalizations due to SRAG, as reported in the public databases DataSUS and IntegraSUS, during the period from May 2022 to February 2024. It was observed that the emergence of new lineages was possibly associated with an increase in the number of cases in Ceará. In the worsening of these cases, consequently leading to Severe Respiratory Syndrome, the SRAG curves followed a pattern similar to the increase in COVID-19 cases, indicating the influence of different lineages on disease severity (recovery and death). Subsequently, the prevalence of molecular signatures and the phylogeny of circulating lineages were analyzed through the compilation of 897, 508, and 802 genomes from GISAID, corresponding to the circulation periods of lineages BA.4, BE.9, and JN.1, respectively. The molecular signature profiles of these lineages were characterized, highlighting key mutations of 9 deleted nucleotides in the NSP6 protein (BA.4), the deletion of 244 nucleotides in the ORF7a region (BE.9), and the insertion of 12 nucleotides in the Spike region (JN.1). These mutations guided the development of genotyping assays, enhancing the detection and monitoring of lineages of interest for 2023 and subsequent years. The ORF1a\_del9\_286 (BA.4), ORF7a\_244del (BE.9), and S\_INS12 (JN.1) assays showed concordance rates of 98.33%, 89.7%, and 94.40%, respectively. Sensitivities were 98.69% (BA.4), 89.8% (BE.9), and 91.60% (JN.1), while specificities reached 98.20%, 89.6%, and 100%. The results obtained demonstrate satisfactory validations, comparable to already established diagnostic tests. Furthermore, the study and analysis model developed can be applied to the surveillance of other respiratory viruses, such as Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV), expanding its applicability in detecting and monitoring emerging pathogens.

**Keywords:** genomic surveillance; SARS-CoV-2; RT-qPCR molecular assays; genomic sequencing; epidemiology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de casos e óbitos registrados por COVID-19 mundialmente e nos seis países com maior número de registros. ....	25
Figura 2 - Arquitetura morfológica do genoma de SARS-CoV-2. A figura destaca em cores os genes responsáveis por traduzir as proteínas não estruturais do vírus em verde e azul, estruturais em amarelo e acessórias em roxo. ....	30
Figura 3 - Sequência temporal da emergência das variantes de preocupação e de interesse da COVID-19 .....	33
Figura 4 - Desenho experimental do estudo. ....	49
Figura 5 - Representação gráfica das assinaturas moleculares norteadoras dos ensaios de diferenciação das sublinhagens da VOC Ômicron de SARS-CoV-2. ....	52
Figura 6 - Circulação de variantes da COVID-19 registrados pelo GISAID ( <a href="https://gisaid.org/">https://gisaid.org/</a> ) no estado do Ceará .....	57
Figura 7 - Número de casos de COVID-19 registrados pelo IntegraSUS ( <a href="https://integrasus.saude.ce.gov.br/">https://integrasus.saude.ce.gov.br/</a> ) no estado do Ceará.....	58
Figura 8 - Número de casos de SRAGs hospitalizados por COVID-19 registrados pelo OpenDaraSUS ( <a href="https://opendatasus.saude.gov.br/">https://opendatasus.saude.gov.br/</a> ) no Brasil e no estado do Ceará.....	60
Figura 9 - Imunização vacinal da população do Ceará por percentual de doses aplicadas ao longo do tempo disponibilizados pelo governo ( <a href="https://infoms.saude.gov.br/">https://infoms.saude.gov.br/</a> ). ....	62
Figura 10 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre maio e setembro de 2022. ....	64
Figura 11 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre outubro de 2022 e fevereiro de 2023. ....	66
Figura 12 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre novembro de 2023 e janeiro de 2024.....	68
Figura 13 - Gráfico representativo do ensaio de genotipagem ORF1a_del9_286, desenvolvido para detecção da sublinhagem BA.4 da VOC Ômicron.....	71
Figura 14 - Gráfico representativo da curva de dissociação obtida no ensaio ORF7a_244del.....	72
Figura 15 - Gráfico representativo da curva de dissociação obtida no ensaio <i>Spike_ins12</i> . ....	74

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das Variantes de Preocupação (VOCs) designadas pela OMS.....	34
Quadro 2 – Designação da VOC Ômicron, suas respectivas sublinhagens e a VOI JN.1 pela OMS.....	38
Quadro 3 - Estudos publicados que avaliam a utilização de ensaios de genotipagem molecular para SARS-CoV-2 .....	45
Quadro 4 - Compilação de informações suplementares sobre os ensaios, sinapomorfias, linhagens monitoradas e as sequências de nucleotídeos de primers e sondas. ....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular ORF1a_del9_286. ....	70
Tabela 2 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular ORF7a_244del. ....	72
Tabela 3 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular S_INS12. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotestina 2 ( <i>Angiotensin-Converting-Enzyme 2</i> )
ACME	Laboratório Analítico de Competências Moleculares e Epidemiológicas
cDNA	DNA complementar
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019 ( <i>Coronavirus Disease 2019</i> )
COVs	Coronavírus ( <i>Coronaviruses</i> )
CT	Ciclo limiar de detecção ( <i>Cycle Threshold</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
e-SUS	Estratégia de Saúde Digital do SUS
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FLU	Influenza
GISAID	Iniciativa Global para Compartilhamento de Dados sobre Influenza ( <i>Global Initiative on sharing All Influenza data</i> )
HA	Hemaglutinina
HcOV	Coronavírus humano ( <i>Human Coronavirus</i> )
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HCV	Vírus da Hepatite C ( <i>Hepatitis C Virus</i> )
IESUS	Informações Epidemiológicas do SUS
IntegraSUS	Integração das informações da secretaria de saúde do estado do Ceará
kb	Quilobases
NA	Neuraminidase
NGS	Sequenciamento de nova geração ( <i>Next Generation Sequencing</i> )

NSPs	Proteínas Não Estruturais ( <i>Non-Structural Proteins</i> )
NTD	Domínio N-terminal ( <i>N-terminal Domain</i> )
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio ( <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Janelas Abertas de Leitura ( <i>Open Reading frames</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
qPCR	PCR quantitativa ( <i>Quantitative PCR</i> )
PNI	Plano Nacional de Imunização
RBD	Domínio de ligação ao receptor ( <i>Receptor-Binding Domain</i> )
RdRp	RNA Polimerase Dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop com Transcrição Reversa
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia Polimerase
SBS	Sequenciamento por Síntese ( <i>Sequencing by Synthesis</i> )
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave ( <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> )
SESA	Secretaria da Saúde do Estado do Ceará
SG	Síndrome gripal
SpO2	Saturação Periférica de Oxigênio
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SUS	Sistema Único de Saúde
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VOC	Variante de Preocupação de SARS-CoV-2 ( <i>SARS-CoV-2 variant of concern</i> )
VOI	Variante de interesse de SARS-CoV-2 ( <i>SARS-CoV-2 variant of interest</i> )

VUM	Variante sob monitoramento de SARS-CoV-2 ( <i>SARS-Cov-2 variant under monitoring</i> )
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
VSR	Vírus Sincicial Respiratório ( <i>Respiratory Syncytial Virus</i> )
WGS	Sequenciamento do Genoma Completo ( <i>Whole Genome Sequencing</i> )
WHO	Organização Mundial da Saúde ( <i>World Health Organization</i> )



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2.1 Epidemiologia e monitoramento de casos .....	22
2.2 Doenças infecciosas por vírus respiratórios .....	23
2.2.1 Surtos, endemias, pandemias e epidemias.....	24
2.2.2 Histórico de casos por COVID-19 .....	25
2.2.3 Síndrome respiratória aguda grave (SRAGs) e demais complicações.....	26
2.3 Vírus respiratórios e suas formas de transmissão .....	27
2.3.1 Eventos de mutação .....	28
2.3.2 Fatores hospedeiros e ambientais na evolução dos vírus .....	28
2.4 Aspectos morfológicos e genômicos do SARS-CoV-2 .....	29
2.4.1 Classificação de variantes e como surgem.....	31
2.4.1.1 Variantes de preocupação (VOCs) .....	33
2.5 Vigilância molecular ativa de patógenos emergentes .....	39
2.5.1 Diagnóstico laboratorial .....	39
2.5.2 Métodos de diagnóstico laboratorial .....	39
2.5.2.1 Diagnóstico laboratorial por biologia molecular .....	39
2.5.2.2 Diagnóstico laboratorial por teste rápido de antígeno .....	40
2.5.2.3 Regiões genômicas alvo no diagnóstico laboratorial .....	41
2.5.3 Vigilância molecular por sequenciamento de genoma completo (WGS) .....	41
2.5.4 Desafios e lacunas na vigilância genômica e novos métodos baseados em PCR..	43
2.5.5 Hipótese do estudo.....	47
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral .....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	48

4.1 Comitê de ética .....	48
4.2 Desenho experimental .....	49
4.3 Investigação do cenário epidemiológico da COVID-19.....	49
4.3.1 Obtenção/coleta de dados secundários .....	49
4.3.2 Avaliação exploratória do cenário epidemiológico .....	50
4.4 Identificação de assinaturas moleculares.....	50
4.4.1 Construção de mapas genômicos .....	50
4.4.1.1 Seleção de períodos .....	50
4.4.1.2 Avaliação da prevalência de assinaturas moleculares .....	50
4.4.1.3 Análises filogenéticas .....	51
4.4.2 Seleção das assinaturas moleculares .....	51
4.5 Testagem e otimização de painéis para ensaios de inferência molecular e genotipagem .....	52
4.5.1 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4 e BA.5) .....	53
4.5.2 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BE.9 e BQ.1) .....	53
4.5.3 Ensaios de genotipagem para VOI JN.1 (linhagens JN.1 e JD.1) .....	54
4.6 Avaliação de desempenho.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1 Avaliação exploratória epidemiológica.....	56
5.2 Identificação de assinaturas moleculares.....	62
5.2.1 Assinaturas moleculares identificadas de SARS-CoV-2 .....	62
5.3 Avaliação de desempenho.....	69
5.3.1 Ensaio para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4).....	69
5.3.2 Ensaio para VOC Ômicron (sublinhagem BE.9).....	71
5.3.3 Ensaio para VOI JN.1.....	74
5.3.4 Abordagem integrativa de vigilância genômica com ensaios de genotipagem dirigidos a alvos sinapomórficos.....	75

6 CONCLUSÃO.....	78
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
8 REFERÊNCIAS .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

A alta e constante propagação de patógenos infecciosos impacta diretamente no bem comum e na situação econômica de um país, desafiando a capacidade de resposta dos sistemas assistenciais, como o Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil (Leung, 2021; Noronha *et al.*, 2020). Dentre as diversas enfermidades, os vírus respiratórios destacam-se como um desafio significativo à saúde coletiva, uma vez que afetam indivíduos de diferentes perfis demográficos, desde crianças até idosos, independentemente de etnia ou condição de saúde, com maior risco para imunocomprometidos (Fonkwo, 2008; Wang *et al.*, 2021).

Dentre os vírus de alta circulação nas últimas décadas, destacam-se os vírus da influenza e o coronavírus humano SARS-CoV-2, além de outros agentes emergentes e endêmicos, como vírus sincicial respiratório (VSR) e o adenovírus (Dye, 2014). Estes destacam-se pela alta transmissibilidade e associação com quadros respiratórios graves, o que os tornam alvos prioritários no monitoramento epidemiológico (Petersen *et al.*, 2020). Esses agentes têm sido os principais responsáveis pelo surgimento e ressurgimento de ondas epidêmicas, representando um desafio constante, em especial devido à sua alta taxa de mutação e notável capacidade adaptativa. Essa plasticidade genética exige vigilância contínua sobre variantes emergentes, especialmente aquelas com maior relevância epidemiológica (Harvey *et al.*, 2021; Simonsen, 1999).

Exemplos do impacto dos vírus respiratórios podem ser observados com as epidemias anuais causadas por Influenza, que resultam em milhões de casos de SRAG e centenas de milhares de mortes em todo o mundo, afetando especialmente idosos e pessoas com condições debilitantes. Já para o VSR, estima-se que em 2019, este vírus foi responsável por infectar 33 milhões de pessoas e causar 26.300 mortes mundialmente, assim como o vírus SARS-CoV-2, responsável pela pandemia da COVID-19, que apresentou no Brasil, até 2020, mais de 4 milhões de casos confirmados e mais de 125 mil mortes associadas à doença (Hsieh *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2022; Mota e Teixeira, 2020).

A pandemia recente da COVID-19, de 2020 a 2023, reforçou a necessidade de um monitoramento genômico ativo das populações virais e do perfil evolutivo do SARS-CoV-2 e demais vírus endêmicos, particularmente quando associado à reemergências de surtos e epidemias, ou ao escape vacinal (Silva, Da *et al.*, 2022). A utilização do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), seja por meio de protocolos de amplificação ou hibridização, tem sido e continuará a ser o padrão-ouro para a detecção, identificação

e monitoramento de linhagens virais (Gardy e Loman, 2018; Robishaw et al., 2021). No entanto, a experiência adquirida com as múltiplas ondas pandêmicas globais da COVID-19, em função da disseminação das variantes de preocupação (VOCs), reforçou a necessidade de soluções analíticas inteligentes para lidar com os desafios relacionados à complexidade e às limitações de ampla testagem por NGS (Markov *et al.*, 2023; Silva, Da *et al.*, 2022). Uma das maneiras que serviços de vigilância têm realizado tais avaliações ocorre por meio da determinação de assinaturas moleculares características de cada linhagem predominante, com predição de mutações potencialmente associadas à pressão seletiva, seja em função de exposições prévias por meio de infecções naturais, ciclos de imunizações, ou até mesmo do nível de dispensação de antivirais (Zaas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2024).

Como resultado, durante a evolução pandêmica, foram implementadas estratégias práticas e economicamente viáveis, como os ensaios de inferência molecular, através da genotipagem de assinaturas-chave presentes em genomas virais. Tais estratégias aplicam técnicas baseadas na reação da cadeia da polimerase, utilizando a enzima transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR). Isto possibilitou complementar a vigilância genômica para a avaliação do cenário epidemiológico durante sucessivas ondas pandêmicas em que linhagens mais competentes de SARS-CoV-2 comumente emergiam e se tornavam predominantes (Bivins *et al.*, 2021; Vogels *et al.*, 2021).

A ampliação da investigação de padrões moleculares representativos das variantes virais de alta circulação possibilita um aprimoramento do monitoramento e da vigilância genômica em períodos hiperendêmicos e epidêmicos. Dessa forma, este trabalho propõe aprimorar e expandir abordagens investigativas integradas de vigilância molecular aplicadas a vírus respiratórios, com foco no SARS-CoV-2, para o monitoramento e caracterização de variantes emergentes em resposta a surtos epidemiológicos no estado do Ceará. Para isso, procura-se realizar a análise epidemiológica da doença por meio de dados sobre notificações de Síndrome Gripal (SG) e Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e busca-se desenvolver e validar estratégias complementares à vigilância genômica convencional por NGS, como RT-qPCR.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Epidemiologia e monitoramento de casos

A epidemiologia é a ciência dedicada ao estudo de determinantes capazes de influenciar a incidência e distribuição de agravos às coletividades humanas (Kostrzewski, 1973). Diferente da abordagem clínica, centrada na individualidade dos pacientes, a epidemiologia prioriza a análise coletiva, ao investigar padrões e comparativos que permitam identificar doenças, seus determinantes e consequências (Roux, 2025).

A aplicação de estudos epidemiológicos em cenários de elevada disseminação, direciona medidas em saúde pública, aplicando em especial, indicadores sobre taxa de incidência, taxa de prevalência e proporção de variantes. A incidência mede o número de novos casos de uma doença em uma população durante um período específico, sendo essencial para monitorar a disseminação inicial de um vírus e avaliar a eficácia de intervenções, como vacinas e medidas de contenção. A prevalência reflete a proporção de indivíduos infectados em um dado momento, sendo especialmente útil em cenários de surtos prolongados ou endemias (Faria, Alvarez e Santos, 2023). A análise da proporção de variantes com base em estudos genômicos indica a prevalência de variantes específicas em circulação, fornecendo subsídios para ações de vigilância e controle.

O ônus desses estudos é primordialmente aplicado à serviço de saúde, em prol da construção da vigilância epidemiológica e a tomada de decisões por parte das autoridades governamentais e de saúde pública. No Brasil, avanços estruturais marcaram a consolidação desse campo, como a criação do DATASUS em 1975, um banco de dados público para a compilação de informações do Sistema Único de Saúde (Lei nº 6.259/1975), e o Informe Epidemiológico do SUS (IESUS) em 1992, ambos responsáveis por fornecer conhecimento epidemiológico necessário para realização de ações de vigilância, prevenção, controle de doenças e agravos de interesse da saúde pública (Garcia e Duarte, 2015).

No período pós 2ª guerra, em 1952, a OMS iniciou a rede mundial de vigilância de vírus respiratórios, com ênfase na vigilância do vírus influenza, englobando o monitoramento sentinela dos casos de síndrome gripal (SG) e de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), a emergência de novos subtipos do vírus influenza e, hodiernamente, de novas variantes do vírus SARS-CoV-2 (Ziegler *et al.*, 2022). No Brasil, em 2000, 2009 e 2020 foram implantadas ações de vigilância, que passaram a ser

notificadas também pelo Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe (Sivep-Gripe) e e-SUS Notifica (e-SUS notifica: manual de instruções, 2022a) responsáveis pela organização dos dados computadorizados de doenças respiratórias e ampliação dos bancos de dados epidemiológicos.

Adicionalmente, à nível estadual, a Secretaria da Saúde do Estado (Sesa) elaborou a plataforma de transparência da gestão pública de saúde do Ceará, o IntegraSUS. Esta plataforma é responsável por integrar sistemas de monitoramento e gerenciamento epidemiológico, hospitalar, ambulatorial, administrativo, financeiro e de planejamento dos 184 municípios cearenses, sobretudo fornecendo painéis de diversos indicadores epidemiológicos, como número de casos, óbitos, cobertura vacinal, entre outros dados responsáveis por auxiliar a tomada de decisões em saúde pública no Ceará (Secretaria de saúde, IntegraSUS, disponível em: <https://integrasus.saude.ce.gov.br/>).

## **2.2 Doenças infecciosas por vírus respiratórios**

As doenças infecciosas englobam um amplo espectro de enfermidades causadas por microrganismos como bactérias, vírus, parasitas e fungos. Essas doenças ocorrem quando o sistema imunológico do hospedeiro é incapaz de eliminá-los de forma eficaz, permitindo sua multiplicação e disseminação no organismo (Jones *et al.*, 2008; Ristori *et al.*, 2024). Quando se propagam entre indivíduos, são classificadas como transmissíveis, podendo ocorrer por diferentes vias, incluindo contato direto com fluidos corporais, transfusão de produtos sanguíneos, exposição a superfícies contaminadas, transmissão por vetores biológicos ou pela inalação de aerossóis contendo partículas infecciosas (Randall *et al.*, 2021).

Os vírus respiratórios representam uma das principais causas de doenças infecciosas, contribuindo com um grande impacto na morbidade e mortalidade em escala global, especialmente entre populações vulneráveis e em contextos de surtos epidêmicos e pandemias (Leung, 2021; Wang, C. C. *et al.*, 2021). Dentre as famílias virais de maior impacto, destacam-se os *Coronaviridae*, responsáveis por doenças como MERS, SARS e a COVID-19, os *Orthomyxoviridae*, causadores da influenza sazonal e de pandemias gripais (Petersen *et al.*, 2020). Outras famílias virais também se destacam por sua relevância epidemiológica, como os *Retroviridae*, contemplando o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), *Hepadnaviridae*, responsáveis pela Hepatite B,

*Flaviviridae*, responsáveis pela Hepatite C, *Paramyxoviridae*, contemplando o Vírus Sincicial Respiratório (VSR) e *Adenoviridae*, contemplando os Adenovírus (Dye, 2014).

Estas possuem elevada capacidade adaptativa, que favorece a circulação e transmissão em diferentes ambientes e contextos, muitas vezes atingindo escala global. Historicamente, tais patógenos têm sido responsáveis por desencadear epidemias e pandemias de grande relevância para a saúde pública, influenciando não apenas a dinâmica de saúde global, mas também o desenvolvimento de estratégias de vigilância e controle (Flerlage *et al.*, 2021).

### **2.2.1 Surto, endemias, pandemias e epidemias**

Em epidemiologia, do grego *epi* (sobre), *demo* (estudo) e *logia* (população) (Pereira, 2003), se é estudado o conjunto dos fatores que determinam a frequência e a distribuição das doenças nas populações humanas (Kostrzewski, 1973). Essa distribuição pode variar tanto espacialmente quanto temporalmente, sendo influenciada por determinantes biológicos, ambientais, sociais e comportamentais. Dentre os principais tipos de evolução temporal de uma doença, existem as variações cíclicas sazonais e as variações irregulares (Grassly e Fraser, 2006). As variações sazonais ocorrem quando a incidência de uma doença está atrelada às estações do ano, como a gripe, enquanto as variações irregulares dizem respeito a eventos não esperados de uma doença (Gomes, 2015).

As variações para a ocorrência de doenças podem ser classificadas como: endemias, surtos, epidemias ou pandemias. Endemia refere-se à incidência constante de uma doença em uma região geográfica específica, seja de forma sazonal ou de forma irregular, sem apresentar variações abruptas em sua ocorrência e com níveis previsíveis temporalmente (Byrne e Hays, 2021). Em linhas gerais, está mais relacionada à frequência com que a doença ocorre em uma região do que ao número absoluto de casos registrados (Piret e Boivin, 2021). Diferentemente, surtos representam aumentos na incidência de uma doença em uma área delimitada, sendo classificados como epidemias caso a propagação se alastre para áreas mais amplas, ou pandemias, se alcançarem uma disseminação global (Torres Munguía *et al.*, 2022; Vora *et al.*, 2023). As pandemias geralmente superam as epidemias em escala, severidade e duração, e estão atreladas a doenças infecciosas e com alta taxa de transmissão (Piret e Boivin, 2021). O decreto



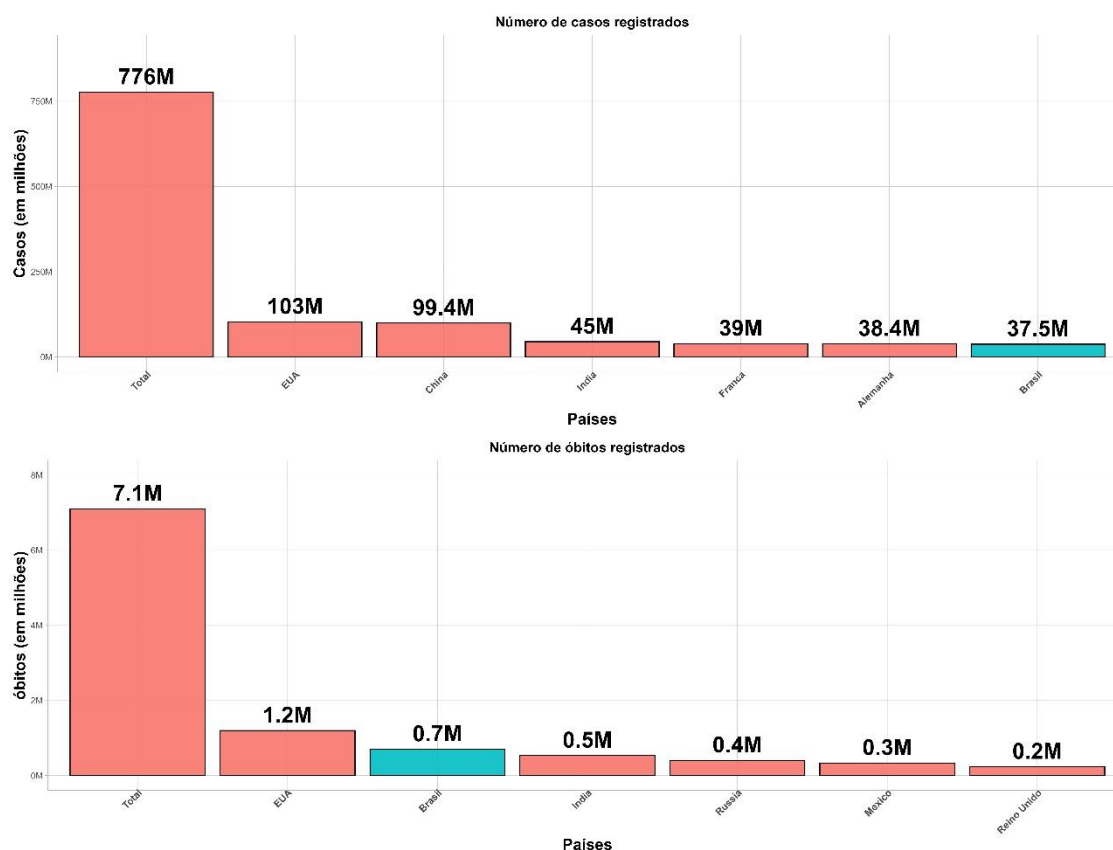
oficial de status de pandemia compete, de forma reservada, a autoridades em saúde pública, como a Organização Mundial de Saúde (OMS).

### ***2.2.2 Histórico de casos por COVID-19***

Em 2020, o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado no Brasil em um residente de São Paulo que regressava de uma viagem à Itália. Segundo dados do Ministério da Saúde, no período entre fevereiro de 2020 a abril de 2024 o país registrou mais de 38 milhões de casos da doença, dos quais 2.202.692 foram de hospitalizações por SRAG decorrentes da COVID-19 e 712.038 foram os casos que evoluíram à óbitos (boletim epidemiológico nº160 – COVID-19, disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br>).

Segundo dados da OMS para 2025, o Brasil registra o segundo maior número absoluto de óbitos por COVID-19, com mais de 700 mil óbitos registrados, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. No entanto, ocupa a sexta posição em número total de casos registrados, com 37,5 milhões, o que sugere uma possível subnotificação (dados da *World Health Organization* (WHO), disponíveis em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/>) **(Figura 1)**.

Figura 1 - Número de casos e óbitos registrados por COVID-19 mundialmente e nos seis países com maior número de registros.



Fonte: Elaborado pelo autor a partir de dados da *World Health Organization* (WHO), disponíveis em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/>

### 2.2.3 Síndrome respiratória aguda grave (SRAGs) e demais complicações

A infecção por SARS-CoV-2 pode variar desde casos assintomáticos e manifestações leves até quadros moderados, graves e críticos. De acordo com a nota técnica nº14 de 2022, os casos assintomáticos são definidos como aqueles onde o paciente está positivo para o teste laboratorial, mas não apresenta sintomas. Já os casos leves ou síndromes gripais (SG) se caracterizam pela presença de sintomas como febre, calafrios, dor de cabeça, tosse, coriza, entre outros, que quando evoluem para um quadro de dispneia/desconforto respiratório, pressão persistente no tórax, saturação de oxigênio menor que noventa e quatro por cento ( $SpO_2 \leq 94\%$ ) em ar ambiente e coloração azulada de lábios ou rosto, são chamados de casos graves ou SRAGs (Nota Técnica n.º 14/2022 - CGGRIPE/DEIDT/SVS/MS – 2022f, Guia de Vigilância Epidemiológica – 2022c). É fundamental monitorar atentamente os sinais e sintomas que indicam agravamento da condição, os quais podem necessitar de internação hospitalar.

### 2.3 Vírus respiratórios e suas formas de transmissão

Vírus são os menores agentes infecciosos existentes, com exceção dos príons. Eles possuem DNA ou RNA como material genético, além de componentes estruturais, como proteínas, lipídeos e glicoproteínas (Correa *et al.*, 2021). A infecção por vírus está atrelada a células-hospedeiras específicas e depende da presença de receptores de superfície que reconheçam as moléculas do vírus para a entrada na célula, haja vista o mecanismo parasitário intracelular obrigatório e a dependência do maquinário celular para síntese do seu material genético e de suas proteínas estruturais (Wißing *et al.*, 2021).

De acordo com Bardhan *et al.*, doenças zoonóticas são infecções transmitidas de espécies não humanas para humanas, e vírus como da raiva, influenza e COVID-19 são exemplos comuns dessas zoonoses. O desenvolvimento da civilização humana esteve associado à utilização de animais com fins de alimentação, transporte, negócios e estimação, elevando o contato entre humanos e animais e facilitando a transmissão dessas doenças (Bardhan *et al.*, 2023). A elevada capacidade pandêmica das zoonoses é determinada por fatores biológicos como eficiência de transmissibilidade em humanos, especialmente em espécies de parentesco próximo. A ausência de imunidade prévia na população frente a um novo agente infeccioso, fatores virais que potencializam a transmissão da infecção, como a virulência, e o nível de mutagenicidade do agente viral são os principais determinantes (Singh e Gajadhar, 2014). Adicionalmente, fatores não biológicos como aspectos político-econômicos, mobilidade populacional, infraestrutura sanitária e falhas na detecção precoce, contenção e resposta epidemiológica influenciam significativamente a disseminação dessas infecções (Morse *et al.*, 2012).

Para a influenza, as aves aquáticas são os principais reservatórios naturais, embora o vírus também possa infectar outros hospedeiros na natureza, como seres humanos, suínos, equinos e focas (Forleo-Neto *et al.*, 2003). Em geral, a transmissão ocorre dentro da mesma espécie, mas algumas linhagens podem atravessar barreiras interespecíficas. Os suínos possuem células que expressam receptores para os vírus humanos e aviários, permitindo a disseminação viral entre espécies. Os vírus influenza do tipo A possuem um amplo espectro de hospedeiros, infectando seres humanos, suínos, cavalos, mamíferos marinhos e aves, sendo, até o momento, os únicos vírus da Influenza conhecidos por causar pandemias em humanos; O tipo B ocorre primordialmente em seres humanos, mas não se observa associado a pandemias; O tipo C infecta humanos e suínos,

conhecido por geralmente causar infecções respiratórias mais leves, sem gerar surtos epidêmicos (Taubenberger & Kash, 2010, Zhu et al., 2023). O tipo D infecta principalmente gado com transmissão para outros animais, mas não são conhecidos por infectar pessoas e causar doença (Krammer *et al.*, 2018).

Para os coronavírus, ainda que os morcegos sejam os reservatórios primários destes agentes virais, a capacidade de mutação e adaptação desses vírus permitiu que houvesse o “salto” da barreira interespecífica da infecção, permitindo que eles pudessem infectar humanos. A emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) representou um grande desafio para a saúde pública mundial, uma vez que, por se tratar de um vírus emergente, a população não possuía imunidade prévia, o que impactou diretamente os índices de hospitalização e a eficácia dos tratamentos já existentes (Sharma, Ahmad Farouk e Lal, 2021).

### ***2.3.1 Eventos de mutação***

Mutações podem ser pontuais, afetando um único nucleotídeo, e são classificadas como sinônimas, quando não alteram a sequência de aminoácidos, ou não sinônimas, quando resultam em mudanças na composição proteica. Mutações também podem ocorrer na forma de inserções ou deleções (*indels*) no genoma, um fenômeno comum em coronavírus, mas ainda pouco estudado quanto à sua relevância estrutural (Jeronimo *et al.*, 2024).

As mutações podem ser classificadas de acordo com sua localização e impacto no genoma viral. As estruturais afetam genes que codificam proteínas estruturais do vírus, influenciando diretamente sua capacidade de se ligar às células hospedeiras. Já as não estruturais, envolvem genes responsáveis por proteínas acessórias, essenciais para a replicação e transcrição do RNA viral (Jahirul Islam *et al.*, 2023; Jeronimo *et al.*, 2024).

A maioria das mutações é neutra, ou seja, não confere vantagens ou desvantagens significativas ao vírus. No entanto, algumas podem proporcionar vantagens seletivas, como aumento da transmissibilidade ou evasão da resposta imune, levando ao surgimento de variantes de preocupação.

### ***2.3.2 Fatores hospedeiros e ambientais na evolução dos vírus***

O surgimento de novas variantes virais é influenciado por uma combinação de fatores que vão além dos mecanismos intrínsecos do próprio agente infeccioso. O

ambiente, expresso pela pressão seletiva, exercida pelo uso de antivirais e a interação com diferentes ecossistemas, em união com características do próprio hospedeiro, o que inclui sua resposta imunológica e padrões de transmissão, desempenham um papel fundamental na diversificação e adaptação dessas variantes ao longo do tempo (Jacobs, Haidar e Mellors, 2025).

Vírus demonstram uma forte capacidade de transmissão zoonótica, com aves e suínos servindo como principais reservatórios. Fatores ambientais, como densidade populacional, viagens globais e mudanças climáticas, contribuem para a transmissão entre espécies e a disseminação dos vírus SARS-CoV-2 por exemplo (Leung, 2021). Fatores como temperatura e umidade podem afetar significativamente sua transmissibilidade, especialmente em regiões temperadas. Além disso, intervenções humanas, como vacinação, uso de antivirais e distanciamento social, podem exercer pressões seletivas que influenciam a trajetória evolutiva do vírus (Leung, 2021; Meyerowitz *et al.*, 2021).

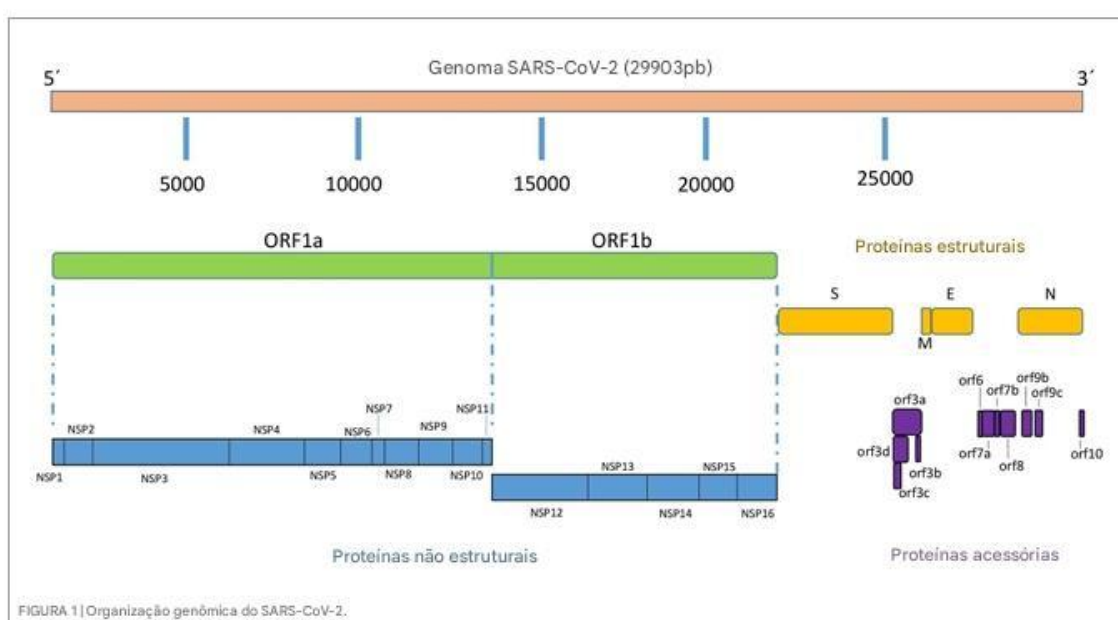
Em especial na pandemia de COVID-19, viagens e globalização aproximaram os seres humanos uns dos outros e de animais que hospedam patógenos novos. Áreas com intensa atividade humana, a proporção de espécies selvagens que hospedam patógenos compartilhados com humanos é maior em comparação com áreas próximas não perturbadas, o que revela que sugere que a redução da atividade humana e consequente conservação da diversidade da vida selvagem pode contribuir na diminuição de doenças zoonóticas (Buchy *et al.*, 2021).

## **2.4 Aspectos morfológicos e genômicos do SARS-CoV-2**

SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples, de sentido positivo não-segmentado (+ssRNA) de aproximadamente 30 quilobases (kb), considerado um dos maiores vírus de RNA já conhecidos (Abdelrahman, Li e Wang, 2020; Schoeman, Gordon e Fielding, 2022). Seu genoma é altamente conservado, arranjado em 14 janelas abertas de leitura (ORFs – do inglês, *open reading frames*), responsáveis pela síntese de 31 proteínas. Destas, 16 são proteínas não estruturais (NSPs), cuja função envolve a replicação do genoma e a regulação inicial da transcrição, 11 são proteínas acessórias e 4 são proteínas estruturais (Abdelrahman, Li e Wang, 2020; Redondo *et al.*, 2021). As proteínas estruturais são essenciais para a formação do capsídeo e da partícula viral, conhecidas como: spike (gene S), proteína de membrana (gene M), proteína do

nucleocapsídeo (gene N) e proteína de envelope (gene E). Dentre os vírus de RNA, os coronavírus são uns dos que possuem menores taxas de mutação, ao mesmo tempo que possuem maiores taxas de replicação intra-hospedeiro, devido à atividade exoribonucleásica 3'-5' da proteína não estrutural NSP 14. Essa proteína possui uma função de revisão do RNA e é responsável pela resistência dos coronavírus a agentes mutagênicos de RNA (Abdelrahman, Li e Wang, 2020) (**Figura 2**).

Figura 2 - Arquitetura morfológica do genoma de SARS-CoV-2. A figura destaca em cores os genes responsáveis por traduzir as proteínas não estruturais do vírus em verde e azul, estruturais em amarelo e acessórias em roxo.



Fonte: Redondo et al., 2021.

Dentre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2, a *Spike* possui maior destaque na infecção e resposta imunológica. Essa molécula imunogênica é um homotrímero glicosilado formado pelas subunidades S1 e S2, responsável por mediar a entrada viral no hospedeiro e sua transmissão. A subunidade S1 possui um domínio de ligação ao receptor (RBD), que identifica e interage com o receptor humano ACE2, garantindo elevada imunogenicidade (Zhang *et al.*, 2021).

Outra importante proteína estrutural é a do nucleocapsídeo, que possui dois domínios estruturais conservados: monômero NTD e dímero (CTD). Essa proteína é responsável pela proteção do genoma viral através da formação do complexo ribonucleoproteína e manutenção da conformação correta do RNA para replicação e transcrição (Bai *et al.*, 2021).

A proteína da membrana (M) é a mais abundante, caracterizada por três domínios transmembranares que contribuem para a estabilidade celular (Shamsi et al., 2021). Essa proteína desempenha um papel central na determinação da morfologia do vírion, atuando na interação com outras proteínas virais e servindo como suporte para a fixação do nucleocapsídeo (Bai, Zhong e Gao, 2022). Em contraste, a proteína do envelope (E) é a menor em tamanho. Além das proteínas estruturais, os CoVs codificam nove proteínas acessórias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c e 10), que exibem baixa conservação e estão envolvidas na modulação da patogenicidade e na evasão das respostas imunes, embora suas funções detalhadas permaneçam parcialmente desconhecidas (Bai, Zhong e Gao, 2022). Mutações nas proteínas acessórias ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 e ORF10 foram observadas em “variantes de preocupação”, potencialmente estando associadas à elevação da patogeneza e da transmissibilidade dessas cepas de SARS-CoV-2 (Redondo et al., 2021).

#### ***2.4.1 Classificação de variantes e como surgem***

Assim como outros vírus, o SARS-CoV-2 passou por mudanças constantes em seu genoma ao longo do tempo, o que reflete um processo natural da evolução viral. Tal processo se dá por recombinações e erros de transcrição característicos/inerente do processo de replicação dos vírus, ocasionando a aparição de mutações, tais como substituições, inserções e deleções, que se acumulam ao longo das gerações e resultam na formação de novas linhagens (*World Health Organization* (WHO), disponíveis em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>).

Ainda que grande parte dessas variações não afete significativamente as características do vírus, algumas alterações podem influenciar aspectos do vírus como a facilidade de transmissão, a gravidade da doença, o desempenho de vacinas e tratamentos, ferramentas de diagnóstico e outras medidas de saúde pública e sociais, desencadeando o surgimento de múltiplos surtos epidêmicos ao redor do mundo (Rede Genômica, 2022). Para melhor entender e estudar as alterações virais de SARS-CoV-2, um sistema de classificação foi desenvolvido para permitir a comparação e detecção das diferentes variações do vírus em quaisquer regiões do mundo.

Passou-se a ser definido como variante uma linhagem ou conjunto de linhagens que apresentam um impacto epidemiológico considerável. Uma variante possui linhagens

que compartilham um ancestral comum e apresentam mutações específicas, com um alto grau de similaridade genética entre si (Costa, 2023; Rede Genômica, 2022). Essas mudanças podem, ou não, conferir vantagens seletivas em comparação com o vírus ancestral. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em colaboração com parceiros, classificou as variantes em relação ao risco à saúde pública e atribuiu rótulos - letras gregas - aos grupos, subdividindo-os em categorias de Variante de preocupação (VOC), Variantes de Interesse (VOI) e Variantes sobre Monitoramento (VUM) (Rede Genômica, 2022). As variantes sob monitoramento (VUMs) são variantes que apresentam alterações genéticas suspeitas de impactar características virais, com potencial risco à saúde pública no futuro, mas sem evidências conclusivas de impacto epidemiológico, necessitando monitoramento. As variantes de interesse (VOIs) são variantes com alterações genéticas capazes ou potencialmente capazes de afetar a transmissibilidade, virulência, escape imunológico, detecção em testes diagnósticos ou resistência a terapias, além da transmissão comunitária significativa, múltiplos contágios em diferentes países ou aumento na prevalência relativa e nos casos, indicando possível risco emergente à saúde pública. Já as (VOCs) atendem aos critérios de VOIs e, adicionalmente, demonstram estar associadas (i) uma mudança prejudicial na severidade da doença, (ii) um impacto substancial na capacidade dos sistemas de saúde de providenciar assistência ou (iii) uma redução significativa na efetividade das vacinas disponíveis, representando um risco global elevado. Essas classificações são dinâmicas e ajustadas ao contexto epidemiológico. (dados da *World Health Organization* (WHO), disponíveis em: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>)

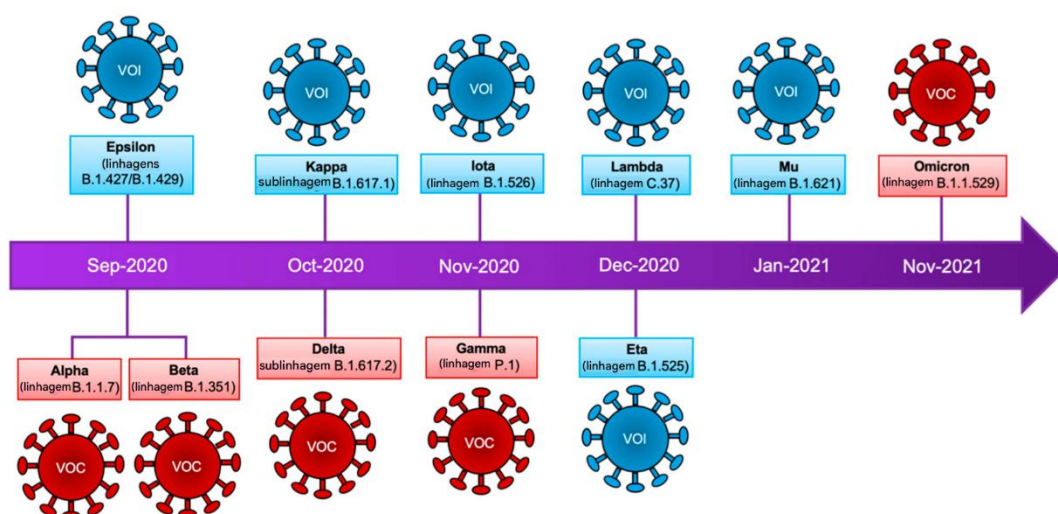
Por outro lado, uma linhagem é designada quando apresenta pelo menos uma diferença nucleotídica em relação à linhagem ancestral. Além disso, os genomas dentro dessa nova linhagem devem compartilhar pelo menos uma mutação entre si, que pode ou não ser a mesma que a diferenciou da ancestral. Para assegurar confiabilidade na designação, a nova linhagem deve possuir pelo menos cinco genomas com alta cobertura (>95%) e apresentar suporte filogenético robusto (bootstrap >70%) no nó definidor da linhagem (Rambaut *et al.*, 2020). Com o objetivo de atribuir uma nomenclatura racional e dinâmica para a diversidade filogenética em expansão de SARS-CoV-2, foram criados compilados de ferramentas de bioinformática e sistemas de nomes, mas em especial, o sistema Pango. Baseando-se em duas linhagens primordiais, A e B, os descendentes seriam



atribuídos a um valor numérico, como linhagem A.1 ou linhagem B.2, de modo que cada nova linhagem, após 4 subníveis, como A.1.1.1.1, se torna uma nova letra, como C.1 (Rambaut *et al.*, 2020). Em 15 de março de 2023, a OMS anunciou que, a partir de então, as letras gregas seriam usadas exclusivamente para as VOCs, enquanto as VOIs seriam nomeadas de acordo com sistemas como Pango (dados da *World Health Organization* (WHO), disponíveis em: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>) (Figura 3).

#### 2.4.1.1 Variantes de preocupação (VOCs)

Figura 3 - Sequência temporal da emergência das variantes de preocupação e de interesse da COVID-19



Fonte: Flores-Vega et al., 2022.

De acordo com as classificações iniciais definidas em 2021 pela OMS, as VOCs circulantes foram denominadas de Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529) (linhagem parental). Essas VOCs evoluíram independentemente, por distintas linhagens filogenéticas, realizando diversas mutações convergentes na proteína spike, responsável por alterações na transmissibilidade e antigenicidade.

A variante B.1.1.7 (VOC Alfa) foi identificada no sudeste da Inglaterra entre setembro e dezembro de 2020, caracterizada por diversas alterações genéticas e responsável por ser de 43 a 90% mais transmissível do que as cepas anteriores de SARS-

CoV-2 (Davies *et al.*, 2021). Durante o período de outubro de 2020 e início de 2021, abordagens genômicas identificaram as variantes B.1.351 (VOC Beta) e P.1 (VOC Gama) na África do Sul e no Brasil, na cidade de Manaus, respectivamente (Tegally *et al.*, 2021, Zimmerman *et al.*, 2022). Em outubro-dezembro de 2020, identificou-se na Índia a VOC Delta (B.1.617.2), responsável pela maioria dos casos positivos de SARS-CoV-2 no país (Limaye *et al.*, 2021), que se espalhou globalmente substituindo outras variantes em diversos países (Tian *et al.*, 2021) (**Quadro 1**).

No Brasil, a primeira onda pandêmica iniciou-se com a introdução, em fevereiro e março de 2020, de múltiplas linhagens ainda não classificadas como VOCs, sendo detectadas linhagens designadas como B.1.1.28 e B.1.1.33 (Giovanetti *et al.*, 2021). A segunda onda pandêmica se caracterizou pela circulação no final de 2020 e início de 2021 das VOCs Alfa e Gama, que dominaram a população viral por 8 meses consecutivos. A VOC Gama, em especial, com seu potencial elevado de transmissão, ocasionou aumento exponencial no número de casos no país, provavelmente sendo responsável pela maior severidade da segunda onda (Giovanetti *et al.*, 2021). Já a VOC Delta, apesar de circulação global, não foi responsável por geração de onda epidêmica no Brasil (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Classificação das Variantes de Preocupação (VOCs) designadas pela OMS

Nomenclatura da OMS	Linhagem Pango	Clado GISAID	Possível origem	Possível primeira notificação
<b>Alfa</b>	B.1.1.7	GRY	Reino Unido	Setembro de 2020
<b>Beta</b>	B.1.351	GH/501YV2	África do Sul	Maio de 2020
<b>Gama</b>	P.1	GR/501YV3	Brasil	Novembro de 2020
<b>Delta</b>	B.1.617.2	G/476KV1	Índia	Outubro de 2020
<b>Ômicron</b>	B.1.1.529	GR/484R	Múltiplas	Novembro de 2021

Fonte: Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/en-lineages/>

#### 2.4.1.2 Variante de preocupação Ômicron

No final de 2021, em Botsuana, na África do Sul, foi realizada a primeira identificação da nova variante chamada VOC Ômicron (B.1.1.529), expandindo-se posteriormente para 50 países. Observou-se que esta VOC seria altamente divergente e com muitas mutações, sendo dividida em sublinhagens: BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, BA.2.12.1 e, mais recentemente, derivadas da BA.2, como a JN.1 e JD.1, de modo que são passíveis de apresentar de diferenças genéticas e antigênicas (Parra-Lucares *et al.*, 2022) (**Quadro 2**).

Com mais de 30 mutações na proteína *Spike*, a Ômicron altera a resposta imune do hospedeiro ao impactar na geração de anticorpos neutralizantes para si, particularmente nas regiões RBD e NTD. As mutações compartilhadas da Ômicron com outras VOCs são as E484, K417N, T478K, N501Y e P681H, que estão associadas com a elevação da transmissibilidade, maior afinidade com receptor ACE2 e maior escape imunológico. Entretanto, as sublinhagens da Ômicron também apresentam mutações únicas (Chen, K. W. K., Tsung-Ning Huang e Huang, 2022). Dessas mutações, 15 estão localizadas na região RBD, o que resultou em sua rápida expansão e prevalência global (Tian *et al.*, 2022).

Em relação à circulação e características moleculares das sublinhagens, a BA.1 suplantou rapidamente a VOC Delta, alcançando circulação mundial que predominou de novembro de 2021 a janeiro de 2022. Essa linhagem foi caracterizada pela presença da  $\Delta 69-70$  em ensaios de RT-qPCR, uma deleção na região NTD que revelou estar associada com a replicação viral (Chen, K.-W. K., Tsung-Ning Huang e Huang, 2022). Sucessivamente, a BA.2 iniciou a substituição da BA.1 em diversos países, circulando de fevereiro e março de 2022 e caracterizada pela ausência da  $\Delta 69-70$ . Subsequentemente, surgiram na África do Sul as sublinhagens BA.4 e BA.5, que apresentavam maior transmissibilidade em relação à variante citada anteriormente. Essas sublinhagens circularam em abril de 2022, apresentando na proteína S a deleção  $\Delta 69-70$  e a mutação L452R – assim como a VOC Delta- e outras mutações ao longo do genoma que à distinguiu de outras variantes (Chen, K.-W. K., Tsung-Ning Huang e Huang, 2022).

A linhagem BQ.1 emergiu em setembro de 2022, caracterizada por ser uma sublinhagem da BA.5 e possuir as mutações K444T e N460K na proteína S, responsáveis por elevação nas taxas de transmissão e pela capacidade de escape imunológico (Mustafa

e Makhawi, 2022). Sucessivamente, surge em novembro de 2022 mais uma sublinhagem descendente da BA.5 no norte do Brasil, chamada de BE.9 (BA.5.3.1.9). Essa linhagem apresentava uma deleção 244 bases no gene ORF7a, não presente nas linhagens da BQ.1. Além disso, a BE.9 adquiriu diversas mutações relacionadas com a resistência à anticorpos, possivelmente contribuindo para o sucesso no aumento de casos (Ricardo Valverde, 2022).

A linhagem XBB surgiu a partir da recombinação de duas sublinhagens derivadas da BA.2, especificamente BJ.1 e BM.1.1.1 (Tamura *et al.*, 2023). Essa variante apresenta mutações significativas na proteína spike, que conferem maior capacidade de transmissão e escape imunológico em comparação com linhagens anteriores. No entanto, dados epidemiológicos sugerem que a XBB está associada a um risco reduzido de evolução para quadros graves de COVID-19, possivelmente devido à imunidade prévia adquirida por infecções anteriores ou vacinação (Ao *et al.*, 2023). Detectada inicialmente na Índia em agosto de 2022, a XBB rapidamente se espalhou para países como Singapura e Estados Unidos, onde sublinhagens relacionadas foram responsáveis por ondas de infecção ao longo de 2023.

A linhagem JN.1 (BA.2.86.1.1) é uma subvariante da BA.2.86, que, por sua vez, descende da variante Ômicron BA.2. Identificada no final de 2023, a JN.1 foi classificada como uma Variante de Interesse (VOI) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) devido ao seu rápido aumento na prevalência global e às suas características genômicas distintas (dados de WHO, disponíveis em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>). Essa linhagem apresenta mais de 30 mutações na proteína Spike, incluindo a mutação Leu455Ser, que está associada a um potencial aumento na capacidade de evasão imunológica e transmissibilidade (Comunidade de saúde, 2024). Após emergência dessa linhagem nos Estados Unidos, rapidamente atingiu predominância global, não havendo, no entanto, evidências robustas de que a JN.1 cause quadros mais graves de COVID-19 em comparação com outras variantes da Ômicron (Ma *et al.*, 2024).

A contínua evolução do SARS-CoV-2, com o surgimento de variantes como a JN.1, destaca a importância da vigilância genômica para guiar medidas de intervenção pelas autoridades de saúde pública, assim como a identificação de antígenos para atualização das vacinas de COVID-19, mitigando a disseminação do vírus e prevenindo

suas manifestações mais graves. O monitoramento contínuo e estudos sobre as características genéticas, transmissibilidade e escape imunológico das sublinhagens da VOC Ômicron é essencial para compreender sua evolução viral e impacto na saúde pública (Ma *et al.*, 2024).

Quadro 2 – Designação da VOC Ômicron, suas respectivas sublinhagens e a VOI JN.1 pela OMS

Designação OMS	Linagem Pango	Sublinhagem Pango	Principais mutações de interesse	Primeiros casos	Data de designação (OMS)
<b>VOC Ômicron</b>	B.1.1.529	BA.1	Múltiplas	Múltiplos países africanos, Nov-2021	VUM: 24-Nov-2021 VOC: 26-Nov-2021
	B.1.1.529	BA.2	Múltiplas	Reino Unido, Dez-2021	
	B.1.1.529	BA.4/BA.5	S:L452R S:F486V ORF7b:L11F N:P151S G12160A	Estados Unidos, Abr-2022	
	Sublinhagem da BA.5	BQ.1	Orf1b:Y264H S:N460K	Estados Unidos, Ago-2022	
	Sublinhagem da BA.5	BE.9	Orf7a:del244	Brasil, Ago-2022	
	Recombinante entre BA.2.10.1. e BA.2.75	XBB	Breakpoint em S, S:G252V	Índia, Europa Set-2022	
<b>VOI JN.1</b>	Sublinhagem da BA.2.86	JN.1	S:L455S	25 de agosto 2023	VOI: 18 de dezembro de 2023

Fonte: Disponível em <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>).

## **2.5 Vigilância molecular ativa de patógenos emergentes**

### **2.5.1 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial refere-se ao uso de testes laboratoriais para auxiliar na confirmação ou exclusão de uma suspeita clínica. No contexto da vigilância molecular ativa de patógenos, o diagnóstico laboratorial pode, adicionalmente, identificar novos focos de transmissão e monitorar surtos. Os resultados dos testes são fundamentais para orientar medidas de saúde pública, contribuindo para a promoção de estratégias de controle - o distanciamento social e a quarentena - e proteção de grupos mais vulneráveis, diminuindo, assim, a morbidade e mortalidade associadas à doença (Ministério da Saúde, 2025).

Para as doenças respiratórias, a similaridade dos sintomas manifestados e, eventualmente, a circulação concomitante dos agentes patogênicos, tais como SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios, exige que o diagnóstico laboratorial seja realizado ao invés de um diagnóstico puramente clínico (Ministério da Saúde, 2024).

### **2.5.2 Métodos de diagnóstico laboratorial**

De acordo com CDC, o diagnóstico laboratorial para COVID-19 pode ser efetuado por testes de biologia molecular ou por testes rápidos de antígeno (TR-Ag) (CDC, 2023c). As amostras clínicas prioritárias para o diagnóstico são amostras de secreção respiratória, nasofaringe ou orofaringe.

#### **2.5.2.1 Diagnóstico laboratorial por biologia molecular**

Os testes de biologia molecular utilizam da técnica padrão-ouro para diagnóstico de infecções virais, a RT-qPCR, utilizando a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. O processo envolve a conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa, seguida da amplificação de regiões específicas do genoma viral utilizando *primers* e sondas (Corman *et al.*, 2020). Nota-se que, a depender da distância entre os *primers* que anelam à esquerda do cDNA – *Forward* – e *primers* que anelam à direita do cDNA – *Reverse*, o tamanho do material genético amplificado - ou *amplicon* - é alterado. A amplificação ocorre em ciclos e cada ciclo possui 3 etapas relativas à desnaturação das fitas de cDNA, anelamento dos *primers* à fita e extensão da DNA polimerase gerando uma fita

complementar de cDNA, de modo que ao final de cada ciclo, o número de cópias do material genético é dobrado.

Durante a PCR em tempo real, o analista consegue visualizar a curva de amplificação do material genético quase instantaneamente, através da utilização de fluoróforos que enviam sinais ao equipamento a cada ciclo. Em fluoróforos inespecíficos como SYBR Green ou BRYT Green, a amplificação pode ser visualizada à medida que o número de cópias do genoma é multiplicado e o fluoróforo anelado às cópias das sequências emite a fluorescência. Nessa técnica, a análise da curva de melting é uma etapa crucial para avaliar a especificidade da amplificação, pois permite identificar produtos inespecíficos, como dímeros de primers, e confirmar a presença do amplicon desejado. A temperatura de melting ( $T_m$ ) é influenciada pelo tamanho do amplicon e pela composição de bases GC, sendo que amplicons maiores e com maior conteúdo de GC tendem a apresentar  $T_m$  mais elevada devido à maior estabilidade térmica. Essa análise é amplamente utilizada em genotipagem, detecção de mutações e validação de primers, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos na RT-qPCR (Hashemipetroudi *et al.*, 2018; Pryor e Wittwer, 2006).

Por outro lado, a amplificação pode ser monitorada através de corantes específicos denominados de sondas, que são oligonucleotídeos marcados por fluoróforos e seus silenciadores (*quenchers*) que anelam em regiões específicas das sequências. Esses *quenchers* quando hidrolisados, emitem uma fluorescência que se intensifica a cada ciclo de detecção (Han *et al.*, 2022).

Alternativamente à RT-qPCR, a amplificação isotérmica mediada por loop com transcriptase reversa, ou RT-LAMP, trata de um teste molecular que amplifica o RNA viral em condições isotérmicas, sem a necessidade de ciclos térmicos. Embora menos sensível que a RT-qPCR, a RT-LAMP é útil em cenários com infraestrutura limitada (Notomi, 2000).

#### 2.5.2.2 Diagnóstico laboratorial por teste rápido de antígeno

Além dos testes de biologia molecular, também podem ser realizados testes rápidos de antígeno para diagnóstico de COVID-19. Esses são imunoensaios *point-of-care*, baseados na técnica de imunocromatografia de fluxo lateral. Essa técnica consiste na captura de antígenos virais que estão presentes na amostra por meio de anticorpos imobilizados na membrana do dispositivo de teste rápido. Esses testes são menos



sensíveis que os métodos moleculares, mas oferecem resultados rápidos (15-30 minutos) e são ideais para triagem em larga escala e em locais com recursos limitados (Spicuzza *et al.*, 2023).

Por sua capacidade de identificação da infecção ativa (fase aguda) em amostras coletadas de modo não invasivo, como de nasal/nasofaringe, esse teste foi utilizado complementarmente ao da RT-PCR e como auto-teste, apresentando benefícios relacionados ao aumento de testagens e rapidez na identificação do SARS-CoV-2, sensibilidade e especificidade no monitoramento e custo-benefício acessível, em momentos onde os testes moleculares se tornaram dispendiosos e indisponíveis durante as crises mais graves da pandemia. Tais testes também auxiliam no monitoramento da soroprevalência da população naturalmente e vacinalmente imunizada, demonstrando a conservação e/ou durabilidade da imunização geral da população (Spicuzza *et al.*, 2023).

#### *2.5.2.3 Regiões genômicas alvo no diagnóstico laboratorial*

No diagnóstico de COVID-19, os kits de testes moleculares se dirigem primariamente à identificação de regiões como os genes E, RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) e N (nucleocapsídeo), que apresentam baixa variabilidade entre diferentes linhagens e variantes. A seleção de regiões conservadas do genoma viral auxilia na garantia da sensibilidade e a especificidade do teste (Karcioglu, 2024). Segundo Corman, genes de SARS-CoV-2 altamente conservados, foram amplamente utilizados em ensaios diagnósticos (Corman *et al.*, 2020). Já para outros vírus, como influenza, o gene da matriz (M) foi frequentemente utilizado como alvo, devido à sua conservação entre diferentes tipos e subtipos (WHO, 2011).

Regiões variáveis, como o gene da proteína Spike (S) no SARS-CoV-2, são interessantes para a diferenciação de variantes, mas não são ideais para ensaios diagnósticos universais, pois podem levar a falsos negativos em caso de mutações ou deleções (Vidya *et al.*, 2021). Portanto, para identificação e classificação de variantes, a realização de sequenciamento é necessária, além de fornecer auxílio na determinação da origem de SARS-CoV-2 (Karcioglu, 2024).

#### *2.5.3 Vigilância molecular por sequenciamento de genoma completo (WGS)*

Além das metodologias utilizadas para o diagnóstico, os métodos laboratoriais utilizados na vigilância genômica também abrangem técnicas importantes no combate a

epidemias emergentes e reemergentes, especialmente o sequenciamento genômico. Tal técnica permite mensurar e caracterizar a diversidade genética viral, auxiliando na compreensão da origem das epidemias, na estimativa das taxas de transmissão e na previsão de surtos futuros. Além disso, fornece dados essenciais para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos, bem como para o aprimoramento de diagnósticos sorológicos e moleculares (Camargo et al., 2021; OPAS, 2021).

Embora o sequenciamento genético tenha um papel vital no monitoramento da diversidade viral, ele não é utilizado rotineiramente para a confirmação de casos individuais de COVID-19, não sendo considerado um método diagnóstico para esse fim, além de não ser indicado para ser realizado em 100% dos casos (Camargo et al., 2021; Ministério da Saúde, 2024; OPAS, 2021). A análise dos resultados permite uma avaliação detalhada da diversidade genética dos vírus em circulação, como as variantes de SARS-CoV-2 e outros vírus, oferecendo informações críticas para estratégias de vigilância genômica.

O sequenciamento genômico completo WGS (*Whole-genome-sequencing*) é reconhecido como o padrão-ouro para a definição de linhagens e classificação filogenética de cepas (Hilt e Ferrieri, 2022). WGS realiza a determinação da ordem exata dos nucleotídeos (A, C, G, T ou U) que compõe o material genético do organismo (Brlek et al., 2024). Dentre os métodos de WGS, o sequenciamento por síntese (*Sequencing by Synthesis* - SBS) é amplamente utilizado, acessado por meio de plataformas como as da Illumina. A tecnologia aplicada é classificada como sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS), permite a leitura simultânea de milhões de fragmentos de DNA.

Para o SARS-CoV-2, os relatórios técnicos dos laboratórios devem incluir a linhagem definida pela ferramenta de classificação Pangolin (*Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages*). Recomenda-se a submissão dos genomas completos na plataforma GISAID, que inclui a bases de dado EpiCoV, para SARS-CoV-2. Até janeiro de 2025, mais de 9 milhões de genomas de SARS-CoV-2 já foram depositados, refletindo a importância dessas ferramentas no compartilhamento de dados genômicos globais e no combate a doenças infecciosas (dados de GISAID, disponível em <https://www.gisaid.org/>).

#### 2.5.4 Desafios e lacunas na vigilância genômica e novos métodos baseados em PCR

Para a vigilância genômica, a implementação de sequenciamento genético exige grandes investimentos em infraestrutura, equipamentos, insumos e treinamento de pessoal especializado, o que pode ser um desafio para muitos (Gardy e Loman, 2018). De tal modo, a implementação de protocolos complementares ao NGS de maior rapidez e custo-benefício, como RT-qPCR, assume o papel de uma estratégia essencial para triagem de amostras, identificação rápida de variantes e monitoramento de mutações específicas diante cenários nos quais é necessária uma vigilância mais ágil e cujos recursos são limitados.

Dentre os primeiros vírus a serem estudados com ensaios de PCR para diferenciação de variantes, como vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite C (HCV) (Ou et al., 1992, Simmonds et al., 1993), o vírus da Influenza certamente estabeleceu um marco no aperfeiçoamento da técnica. Esse vírus pôde ser diferenciado entre os tipos A, B e C, bem como subtipos (H1N1 e H3N2), e, posteriormente, por linhagens sazonais e pandêmicas. Frequentemente *primers* específicos para os genes HA e NA foram utilizados para essa finalidade (Wright *et al.*, 1995). Com a eclosão da pandemia de influenza A (H1N1) de 2009 (H1N1pdm09), os ensaios de RT-qPCR se tornaram ferramentas usuais para rápida caracterização viral e vigilância epidemiológica. Na ocasião, emergência do vírus H1N1pdm09 exigiu uma diferenciação precisa em relação aos vírus influenza sazonais, de modo a monitorar mais ativamente a disseminação do novo vírus e a orientar medidas de saúde pública, como vacinação e tratamento antiviral (Garten *et al.*, 2009), CDC, 2009).

O conhecimento adquirido durante a pandemia de influenza de 2009 orientou, nos anos posteriores, a rápida resposta à pandemia de COVID-19, através da utilização de ensaios de RT-qPCR para inferência de linhagens (Umunnakwe *et al.*, 2022) (**Quadro 3**). Através da detecção da presença ou ausência de mutações características de linhagens de SARS-CoV-2, como as VOCs, foi possível identificar surtos de casos em diversas regiões dos países e aumentar a capacidade de monitorar as amostras positivas (Abuyadek et al., 2023, Hosch et al., 2022). Entretanto, a interpretação de linhagens distintas com base em mudanças no genoma viral requer atenção à situação epidemiológica da região geográfica, ao período dos casos e ao perfil do paciente, considerando a constante evolução das variantes circulantes do vírus (Brasil, 2023h). Diferentes linhagens podem compartilhar mutações semelhantes devido à convergência evolutiva, e novas mutações

podem surgir, escapando à detecção pelos ensaios de RT-qPCR existentes, o que ressalta a importância de analisar a distribuição espaço-temporal dos dados (OPAS, 2021).

Quadro 3 - Estudos publicados que avaliam a utilização de ensaios de genotipagem molecular para SARS-CoV-2

Alvo	VOC	Método	N amostral	Período	Local	Procedência das amostras	Concordância com NGS	Referência
<b>ORF1a.3675-3677del e 69-70del (SGTF)</b>	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron	RT-qPCR Multiplex	2,853	N/I	Brasil	Diagnóstico COVID-19	99% (n=1.568)	(Fontana Maurell <i>et al.</i> , 2023)
<b>69-70del</b>	VOCs Alfa/Ômicron	TaqPath RT-qPCR COVID-19 Combo Kit	164,499	Dezembro/2020 a julho/2022	EUA	Diagnóstico COVID-19	99.3% (n=2.307)	(McMillen <i>et al.</i> , 2022)
<b>L452R, E484K e N501Y</b>	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Epsilon, VOI Iota, VOI Zeta	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	4.049	Dezembro/2020 a março/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	100% (n=229)	(Wang, Hannah <i>et al.</i> , 2021)
<b>N501Y, 69-70del, 242-244del, L452R e E484K</b>	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Epsilon, VOI Eta, VOI Zeta, VOI B.1.1.165	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	156	Fevereiro a abril/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	100% (n=30)	(Wang, Huanyu <i>et al.</i> , 2021)
<b>L452R, E484K, N501Y, del69-70,</b>	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e	RT-qPCR Multiplex presença/ausência	1.657	Abril/2021 a janeiro/2022	EUA	Diagnóstico COVID-19	95-100% (n=502 e 230)	(Yeung <i>et al.</i> , 2022)

<b>K417N e T478K</b>	VOC Ômicron	com sondas Taqman						
<b>Indel 211–214</b>	VOC Ômicron	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	94	Dezembro/2021	EUA	Diagnóstico COVID-19	100% (n=47)	(Sibai <i>et al.</i> , 2022)
<b>E484A/F486V</b>	VOC Ômicron	RT-qPCR Multiplex presença/ausência com sondas Taqman	72	Maio a junho/2022	Alemanha	Águas residuais	N/I	(Wilhelm <i>et al.</i> , 2022)
<b>ORF1A, RDR2, RDR1, ORF8, S:N501, RDR3-4, S:E484 e S:L452</b>	VOC Alfa, VOC Beta, VOC Gama, VOC Delta e VOC Ômicron, VOI Mu, VOI Iota e VOI Lambda	RT-qPCR 8-plex CoVarScan	3544	Abril/2021 a fevereiro/2022	EUA	Amostras clínico-respiratórias	95% (n=3378)	(Clark <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Adaptado de (Costa, 2023)

### **2.5.5 Hipótese do estudo**

A genotipagem por RT-qPCR baseada em assinaturas moleculares permite a identificação eficiente de linhagens emergentes de SARS-CoV-2, apresentando desempenho satisfatório na detecção de mutações definidoras, o que pode contribuir para o monitoramento da evolução viral e a vigilância epidemiológica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Aprimorar e expandir abordagens investigativas integradas de vigilância molecular aplicadas a vírus respiratórios, com foco no SARS-CoV-2, para o monitoramento e caracterização de variantes emergentes em resposta a surtos epidemiológicos no estado do Ceará.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Contextualizar o cenário epidemiológico em relação a casos notificados, internações e óbitos por SGs e SRAGs em relação à população viral de SARS-CoV-2 e variantes emergentes;
2. Avaliar a diversidade viral por meio dos dados genômicos das principais variantes circulantes de SARS-CoV-2, durante as principais ondas epidêmicas recentes;
3. Identificar e validar assinaturas moleculares e padrões de mutações sinapomórficas específicas para a determinação por RT-qPCR de linhagens circulantes, buscando complementar a vigilância genômica realizada diretamente por sequenciamento NGS
4. Avaliar e otimizar ensaios moleculares de RT-qPCR para aplicação em subtipagem e inferência de variantes emergentes de SARS-CoV-2.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Comitê de ética**

O estudo se encontra aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (ref. CAEE 50525221.7.3005.8152). Todas as atividades foram realizadas em parceria com a Rede Genômica da Fiocruz, o que inclui o envolvimento direto de laboratórios de referência nacional em vírus respiratórios do Ministério da Saúde. As atividades contemplam ações investigativas de vigilância laboratorial e genômica de vírus emergentes, a comunicação de agravos de notificação compulsória e/ou submissão de relatórios técnicos às autoridades de vigilância sanitária-

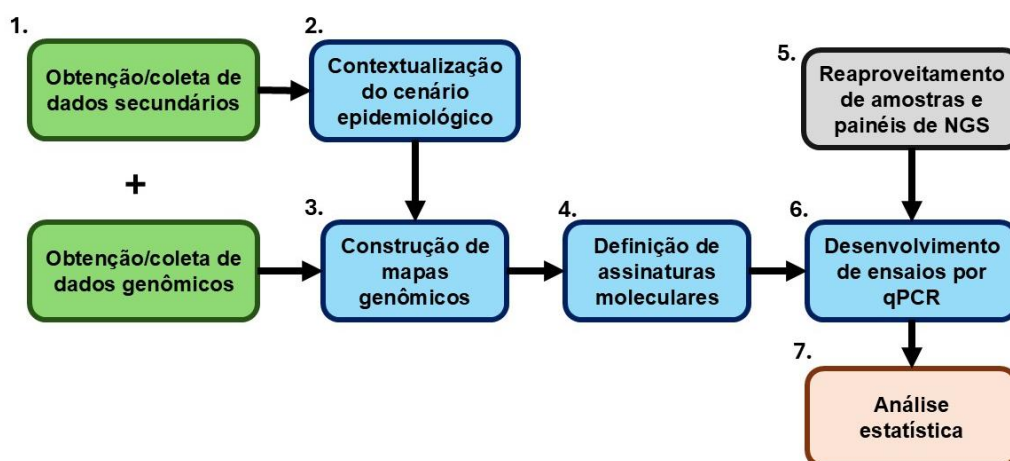


epidemiológica, dispensando a necessidade de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## 4.2 Desenho experimental

Este estudo focaliza na análise epidemiológica e genômica do SARS-CoV-2. Inicialmente, foram obtidos dados secundários e genômicos de diferentes bases públicas (DataSUS, IntegraSUS e GISAID EpiCoV) durante o período de estudo. Posteriormente, foi realizada a caracterização de assinaturas moleculares definidoras de variantes emergentes, para o desenvolvimento de ensaios baseados em qPCR, através do reaproveitamento de amostras do fluxo de vigilância ativa para COVID-19 da Rede Genômica Fiocruz. Por fim, foram avaliadas métricas de especificidade, sensibilidade, VPP e VPN e análises estatísticas para concordância com NGS (**Figura 4**).

Figura 4 - Desenho experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

## 4.3 Investigação do cenário epidemiológico da COVID-19

### 4.3.1 Obtenção/coleta de dados secundários

Foram compilados dados sobre o número de casos, óbitos e hospitalizações por SRAGs notificados diariamente a partir do acesso à bases de dados públicas, tais como DataSUS (<https://datasus.saude.gov.br/>) e IntegraSUS (<https://integrasus.saude.ce.gov.br/>). Percentuais de linhagens/variantes em circulação foram obtidos a partir das bases de dados patógeno-específicas do banco de dados internacional GISAID EpiCoV (<https://gisaid.org/>), a fim de obter genomas

representativos e de alta qualidade. Para isso, empregou-se o parâmetro *QC status* = “good” do programa Nextclade CLI v.3.8.

#### ***4.3.2 Avaliação exploratória do cenário epidemiológico***

As informações passaram por uma análise exploratória temporal, correlacionando indicadores de importância epidemiológica, tais como variações no número de casos de SRAGs notificados e taxas de hospitalizações, com tendências e sazonalidade do conjunto amostral. Posteriormente, os casos notificados, óbitos e SRAGs foram comparativamente analisados de forma descritiva e na forma de infográficos em relação as principais variantes/linhagens circulantes nos períodos investigados.

### **4.4 Identificação de assinaturas moleculares**

#### ***4.4.1 Construção de mapas genômicos***

A elaboração de um mapa genômico representativo se concentrou na realização de uma análise filogenética, juntamente com uma avaliação da prevalência de cada assinatura molecular nas linhagens da variante Ômicron e VOI JN.1 circulantes nos períodos propostos.

##### ***4.4.1.1 Seleção de períodos***

As análises foram realizadas com genomas de amostras coletadas em três períodos distintos: de maio a outubro de 2022, de outubro de 2022 a março de 2023 e de novembro de 2023 a fevereiro de 2024. Esses períodos foram escolhidos devido à circulação das linhagens e sublinhagens da variante Ômicron e da VOI JN.1, que foram responsáveis pelo aumento exponencial do número de casos, correspondendo ao quarto, quinto e sexto surto de casos no estado.

##### ***4.4.1.2 Avaliação da prevalência de assinaturas moleculares***

As sequências foram classificadas utilizando a nomenclatura PANGO por meio do *software* Pangolin CLI v.4.3.1. Apenas linhagens com mais de 1% de circulação e elevados padrões de qualidade foram incluídas, a fim de evitar vieses de confirmação e erros nos dados analisados. Isso resultou em um total de 897 genomas no primeiro período, 508 genomas no segundo período e 802 genomas no terceiro período. Estes foram alinhados contra a sequência de referência Wuhan-Hu-1/2019 (MN908947), e

sinapomorfias únicas, na forma de inserções ou deleções, foram analisadas para as sublinhagens BA.4 (B.1.1.529.4), BE.9 (B.1.1.529.5.3.1.9) e JN.1 (B.1.1.529.2.86.1.1). Essa análise foi realizada por meio de algoritmos desenvolvidos internamente em linguagem de programação Python e R.

#### 4.4.1.3 Análises filogenéticas

As sequências genômicas selecionadas para avaliação da prevalência foram, semelhantemente, utilizadas para construção das árvores filogenéticas das linhagens de SARS-CoV-2. Os arquivos FASTA foram alinhados contra a sequência de referência, utilizando o *software* de alinhamento MAFFT v7.453, através do comando '*mafft -auto -addfragments sequencias.fasta referencia.fasta > alinhamento.fasta*'. As análises filogenéticas foram executadas pelo programa IQ-TREE *multicore version 2.2.3 COVID Edition* para Linux 64-bit. Utilizou-se o modelo GTR+G4+F (*General Time Reversible*) com contagem da frequência de bases diretamente do alinhamento (*default*), utilizando o parâmetro *Approximate Likelihood-Ratio Test* (ALRT) com 1000 replicatas, através do comando '*iqtree -s alinhamento.fasta -m GTR+G4+F -alrt 1000 -nt AUTO*'. Para visualização personalizada do arquivo iqtree gerado, foi utilizada a ferramenta online ItoI v6 e o aplicativo online Biorender para edição das ilustrações, garantindo uma melhor visualização e qualidade.

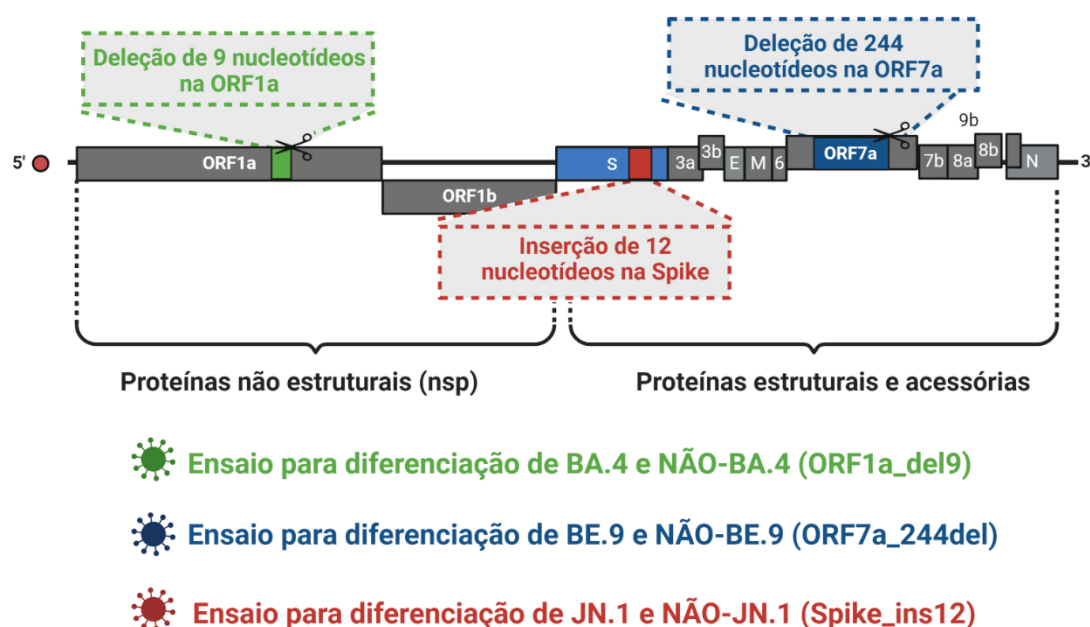
#### 4.4.2 Seleção das assinaturas moleculares

A partir dos mapas genômicos montados, foram estabelecidas as condições para definir os padrões moleculares que poderiam ser usados como marcadores das linhagens dos vírus respiratórios. De acordo com o cenário epidemiológico anteriormente analisado e os períodos estudados, foram consideradas como de interesse as sublinhagens da VOC Ômicron BA.4 e BE.9 e a VOI JN.1 para o estudo de SARS-CoV-2. Para essas linhagens, as sinapomorfias precisavam apresentar pelo menos 80% de prevalência para serem consideradas padrões de excelência para classificação. Em contrapartida, nas outras linhagens, as mesmas sinapomorfias não poderiam estar presentes em uma frequência superior a 1%, preferencialmente devendo estar ausentes (Fontana-Maurell *et al.*, 2023a; Gangavarapu *et al.*, 2023; McMillen *et al.*, 2022; Sibai *et al.*, 2022; Wang, Hannah *et al.*, 2021; Wang, Huanyu *et al.*, 2021; Yeung *et al.*, 2022).

#### 4.5 Testagem e otimização de painéis para ensaios de inferência molecular e genotipagem

Foram desenvolvidos ensaios customizados de RT-qPCR a partir do reaproveitamento de painéis de sequenciamento ou customização de primers, para rastreo das diferentes sinapomorfias identificadas anteriormente e diferenciação das outras linhagens co-circulantes (**Figura 5**).

Figura 5 - Representação gráfica das assinaturas moleculares norteadoras dos ensaios de diferenciação das sublinhagens da VOC Ômicron de SARS-CoV-2.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2025.

Os ensaios foram realizados utilizando o termociclador fluorescente QuantStudio™ 7 Pro qPCR Systems (Thermo Fisher Scientific Inc) e o *software* Design & Analysis v2.6.0. A interpretação dos dados de RT-qPCR foi realizada por avaliação manual, observando também o cenário epidemiológico do estado no momento da coleta da amostra para determinação dos resultados (**Quadro 4**). Por fim, buscou-se a validação das amostras positivas dos ensaios qPCR por meio da comparação com as mesmas amostras no NGS, técnica que é padrão-ouro para determinação das linhagens.

#### 4.5.1 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4 e BA.5)

O ensaio específico de dupla-sonda ORF1a\_del9\_286 para diferenciação entre BA.4 e não-BA.4 foi customizado a partir da deleção de 9 bases na região NSP6 (códon 686, ORF1a) presente no genoma de BA.4. O esquema de primers e sondas foi desenhado utilizando a ferramenta de bioinformática para biologia molecular Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) e sintetizado pela IDTDNA. Utilizou-se o kit comercial SARS-Cov-2 EDx (Biomanguinhos) para compor a reação de PCR (**Quadro 4**).

Foram utilizadas as sondas com fluoróforos FAM e VIC para a corrida de genotipagem. A sonda FAM anela-se à região com a deleção característica dessa sublinhagem, enquanto a sonda VIC anela-se à região sem a deleção (*wild type*), característica das sublinhagens não-BA.4 circulantes no mesmo período.

O protocolo foi ajustado para uma reação de 10 µL, utilizando 5 µL de Master Mix, 0,5 µL de cada primer a concentração de 10nM (*forward* e *reverse*), 0,1 µL de cada sonda (*wild type* e *del9*), 1,8 µL de água ultrapura e 2 µL de amostra de cDNA. A ciclagem utilizada nesta validação consistiu em uma fase inicial pré-PCR de 60 °C por 30 s, uma fase PCR de 45 ciclos com 2 etapas, uma de desnaturação a 95 °C por 20 s e uma de anelamento a 60 °C por 30 s, finalizando com uma fase final pós-PCR, de 60 °C por 30 s. O módulo de análise utilizado no software Design & Analysis 2.6.0 foi o *Genotyping*.

#### 4.5.2 Ensaios de genotipagem para VOC Ômicron (sublinhagem BE.9 e BQ.1)

Para o ensaio ORF7a\_244del, responsável pela diferenciação entre BE.9 e não-BE.9, foram utilizados um reaproveitamento de primers do painel Artic 4.1 (AW4 92L e 92R) para ensaio de curva de dissociação (*melting curve*) direcionados a uma deleção de 244 bases característica da BE.9. Utilizou-se o kit comercial GoTaq 1-Step RT-qPCR com fluoróforo BRYT Green ® (Promega) (**Quadro 4**).

Os volumes utilizados na reação foram validados para que cada reação de 10 µL fosse composta por 5 µL de Master Mix, 0,2 µL de enzima transcriptase-reversa GoScript, 0,5 µL de cada primer (a 10 nM), 0,8 µL de água ultrapura e 3 µL da amostra de RNA, otimizando o uso de reagentes e amostras. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de transcrição reversa, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 65 °C por 30 s e uma etapa de extensão a 72 °C por 50 s.

A etapa de anelamento se deu com um *touchdown* de delta de temperatura ( $\Delta T$ ) de  $-0,12\text{ }^{\circ}\text{C}$  por ciclo, de modo a auxiliar na redução da probabilidade de ligação não específica dos *primers*. Para a análise da curva de dissociação, foi realizada uma dissociação de alta resolução a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de  $0,075\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ . No software Design & Analysis 2.6.0, o módulo de análise utilizado para o ensaio foi o *Standard curve*.

#### 4.5.3 Ensaios de genotipagem para VOI JN.1 (linhagens JN.1 e JD.1)

O ensaio *Spike\_12ins* foi direcionado à inserção de 12 bases na região Spike 21609-21620 (TCATGCCGCTGT) para diferenciação entre JN.1 e não-JN.1. Os primers foram reaproveitados do painel Artic 5.3.2 (SARS-CoV-2\_400\_70\_LEFT\_0 e SARS-CoV-2\_400\_69\_RIGHT\_0). Assemelhando-se ao ensaio de curva de dissociação (melting curve) para BE.9, utilizou-se o kit comercial GoTaq 1-Step RT-qPCR com fluoróforo BRYT Green® (Promega) para realização do ensaio (**Quadro 4**).

Para o protocolo utilizado neste ensaio, a reação final obteve um volume de  $12\text{ }\mu\text{L}$ , empregando  $6\text{ }\mu\text{L}$  de Master Mix,  $0,2\text{ }\mu\text{L}$  da enzima transcriptase-reversa GoScript,  $0,15\text{ }\mu\text{L}$  de cada primer (a  $10\text{ nM}$ ),  $4,5\text{ }\mu\text{L}$  de água ultrapura e  $1\text{ }\mu\text{L}$  da amostra de RNA. Essa validação foi realizada em prol da redução na formação de dímeros de *primers* observados e da otimização do volume das amostras testadas.

A ciclagem para amplificação incluiu uma fase inicial de transcrição reversa, seguida por 40 ciclos de desnaturação a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 s, anelamento a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 s e uma fase de extensão a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 s. A etapa de anelamento se deu com um *touchdown*  $\Delta T$  de  $-0,12^{\circ}\text{C}$ . Para a avaliação da curva de dissociação, foi realizada uma curva de dissociação a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de  $0,025\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ . No software Design & Analysis 2.6.0, o módulo de análise utilizado para o experimento foi *Standard curve*.

Quadro 4 - Compilação de informações suplementares sobre os ensaios, sinapomorfias, linhagens monitoradas e as sequências de nucleotídeos de primers e sondas.

NOME DO ENSAIO	SINAPOMORFIAS/ MUTAÇÕES-ALVO	PRINCIPAL LINHAGEM MONITORADA	PERÍODO EM QUE CIRCULOU	TIPO DE ENSAIO	KIT DE PCR UTILIZADO	PRIMERS E SONDAS
<b>ORF1ADEL9</b>	Também chamada ORF1a:9del, é a mutação NSP1: K141del, S142del, F143del	VOC Ômicron (BA.4)	Maio a outubro de 2022	Dupla- sonda	Mastermix do Kit Molecular SARS-CoV-2 EDX	<b>&gt;ORF1a_del9_686_BA4_F</b> ACGGTAATAAAGGAGCTGGTGG <b>&gt;ORF1a_del9_686_BA4_R</b> GGATCAGTGCCAAGCTCGTC <b>&gt;ORF1a_wt_686_BA_P1</b> SUN/CGGCGCCGA/ZEN/TCTAAAGTCA <b>&gt;ORF1a_del9_686_BA4_P2</b> FAM/CGGCGCCGA/ZEN/TCTAGACTT
<b>ORF7A DEL244</b>	ORF7a: 244del	VOC Ômicron (BE.9)	Outubro de 2022 a março de 2023	Curva de dissociação	GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, no. A6001)	<b>&gt;Av4_SARS-CoV-2_92_LEFT</b> CACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGTAC <b>&gt;Av4_SARS-CoV-2_92_RIGHT</b> GTTCAAGTGAGAACCAAAAGATAATAAGC
<b>SPIKE INS12</b>	SPIKE: 12ins	VOI JN.1	Novembro de 2023 a fevereiro de 2024	Curva de dissociação	GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, no. A6001)	<b>&gt;Artic5.3.2_SARS-CoV-2_400_70_LEFT_0</b> TTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGT <b>&gt;Artic5.3.2_SARS-CoV-2_400_69_RIGHT_0</b> AGTCCTGAGTTGAATGTAAACTGAG

#### 4.6 Avaliação de desempenho

Os ensaios foram validados analiticamente utilizando resultados de NGS como padrão-ouro para confirmação das linhagens/clados. Foram realizados os cálculos de Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), especificidade, sensibilidade e acurácia. A comparação entre os resultados dos ensaios com os dados de sequenciamento (padrão-ouro) foi realizada pelo teste de *McNemar*. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados em linguagem R.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

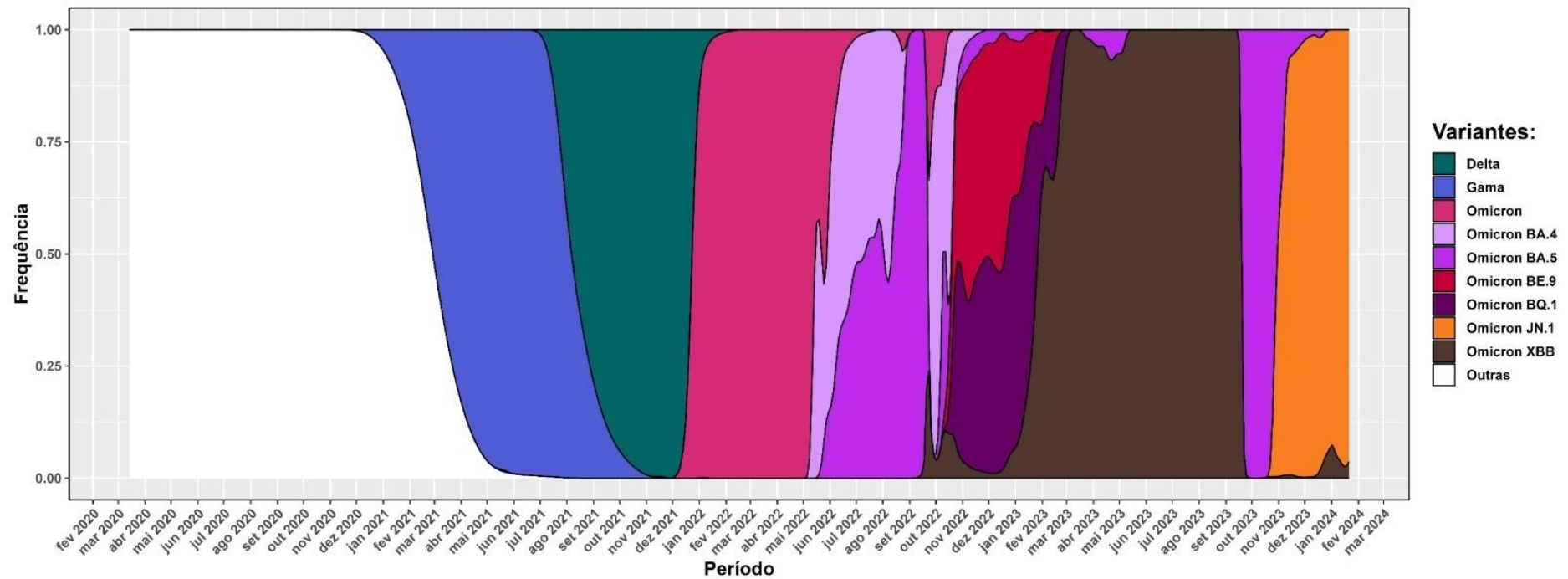
#### 5.1 Avaliação exploratória epidemiológica

No período de 01 de março de 2020 a 31 de janeiro de 2024 no Ceará (n total = 11.462), as linhagens selvagens e não-VOC de SARS-CoV-2, denominadas como Outras (B.1, B.1.1, B.1.1.1, B.1.1.33, B.1.177, B.1.212, B.1.1.529, N.9 e P.2) circularam entre 14 de março de 2020 até 29 de maio de 2021. Alguns meses depois, a VOC Gama começou sua circulação em janeiro de 2021 e, posteriormente, a VOC Delta iniciou sua circulação em julho de 2021, ambas deixando de serem detectadas no final de 2021 e início de 2022, dando lugar, oportunamente, à introdução da VOC Ômicron (BA.1-like).

A VOC Ômicron se manteve preponderante durante todo o período do estudo, suscitando a subsequente emergência de sublinhagens dessa variante. Prevalentemente, entre maio de 2022 a novembro de 2023, introduziu-se a sublinhagem BA.4 da VOC Ômicron, que co-circulou com a sublinhagem BA.5 pelo mesmo período. No final de 2022 e início de 2023, duas sublinhagens da BA.5 iniciaram sua circulação, a BE.9 e BQ.1, de outubro de 2022 a fevereiro de 2023, responsáveis pelo possível aumento no número de casos observados nesse momento. As sublinhagens recombinantes da BA.2, chamadas XBB-like também surgiram em meados do mesmo período, permeando novembro de 2022 a dezembro de 2023, porém também co-circulando com a linhagem JN.1, introduzida em novembro de 2023 até janeiro de 2024 (**Figura 6**).



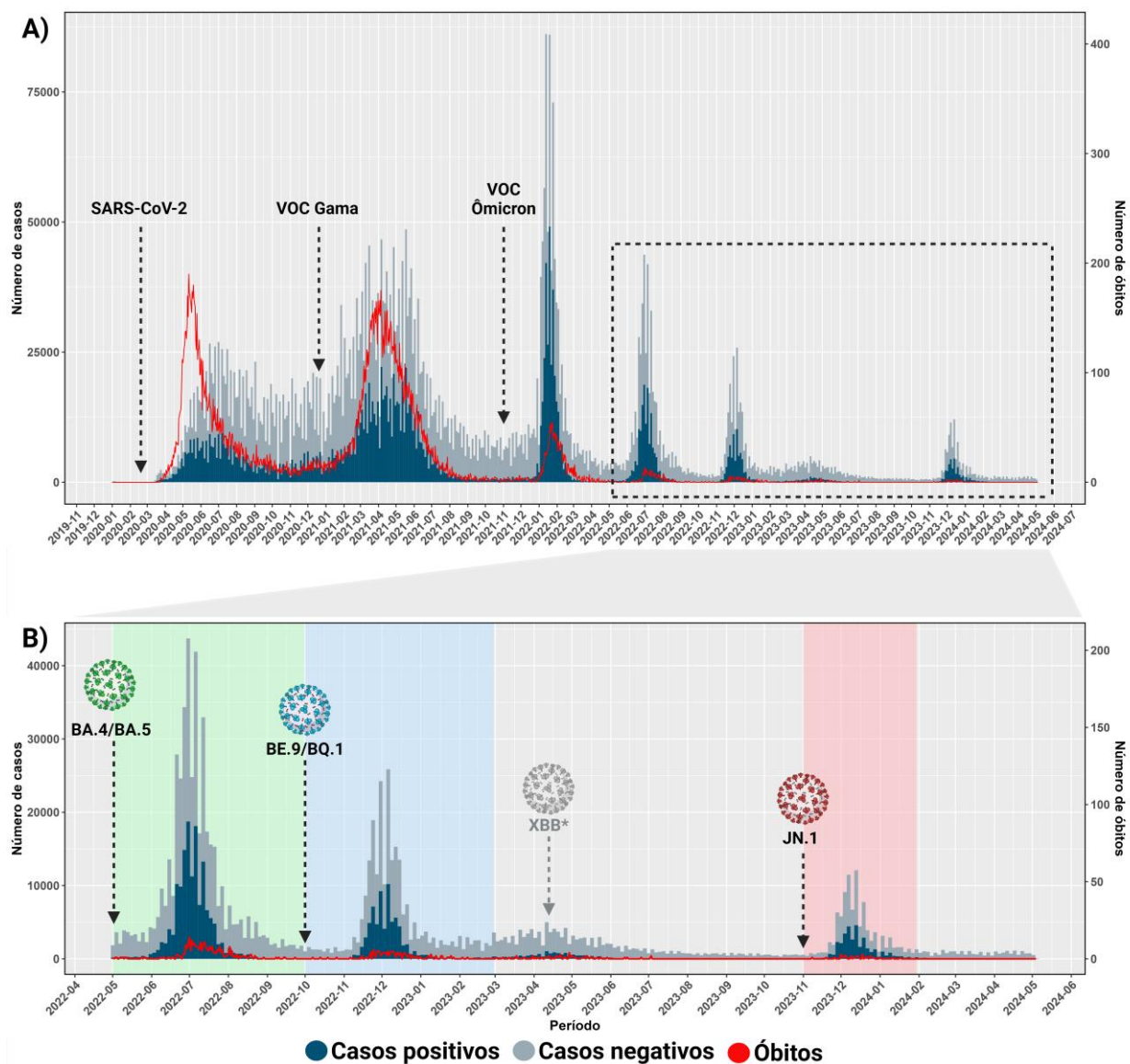
Figura 6 - Circulação de variantes da COVID-19 registrados pelo GISAID (<https://gisaid.org/>) no estado do Ceará



**Legenda:** No eixo X observa-se o período das sequências genômicas distribuídos por data de coleta desde 01 de março de 2020 até 31 janeiro de 2024. O eixo Y apresenta a frequência do quantitativo de sequências das principais variantes de SARS-CoV-2, separados em: verde para Delta, azul para Gama, rosa para Ômicron, lilás BA.4, lilás-escuro para BA.5, vermelho para BE.9, roxo para BQ.1, laranja para JN.1, marrom para XBB e branco para Outras.

A emergência de variantes de preocupação, como a VOC Gama, VOC Ômicron e suas sublinhagens resultaram em aumentos significativos do número de casos e óbitos (Banho *et al.*, 2022; Buss *et al.*, 2021; Callaway e Ledford, 2021; Tegally *et al.*, 2022). Com base nos levantamentos realizados no presente estudo, o Ceará obteve um total de 1.661.340 casos confirmados para COVID-19 até maio de 2024, registrados por diferentes laboratórios do estado. O número de casos negativos e o número de óbitos nesse mesmo período foram, respectivamente, 3.498.025 e 28.261 no total. Os padrões de elevação do número de casos representam as respectivas ondas pandêmicas: primeira onda, no início de 2020, referente a introdução de SARS-Cov-2 no estado, segunda onda, que ocorreu no início de 2021 referente ao surgimento da Variante de preocupação (VOC) Gama (P.1-like) e a terceira onda, que teve sua origem entre o final de 2021 e o início de 2022, referente à VOC Ômicron (BA.1-like). Os períodos subsequentes foram caracterizados pela ocorrência de surtos de casos associados a emergência de sublinhagens da VOC Ômicron (em especial BA.5 e BE.9) e a VOI JN.1, atrelado a um elevado número de subnotificações. A sublinhagem recombinante XBB não se mostrou predominante no estado do Ceará (Silva *et al.*, 2024), o que pode estar associado à resposta imunológica desencadeada pela sublinhagem BE.9. Assim como observado em estudos anteriores, as sucessivas exposições da população ao patógeno, acrescentando-se a introdução de vacinas, imunizantes e antivirais específicos, pode acarretar uma população com proteção relativa maior em relação a uma nova linhagem que surge (Wu *et al.*, 2021). Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para avaliação da evolução recente de SARS-CoV-2 em resposta à pressão imune (Meijers *et al.*, 2023) **(Figura 7)**. Posterior à observação da circulação das linhagens de SARS-CoV-2 e à variação do número de casos e óbitos ao longo do ano, observa-se que as características virais de cada linhagem podem estar associadas aos respectivos padrões das ondas pandêmicas e à eficácia das medidas protetoras contra o vírus, tais como um maior escape vacinal atribuído à certas linhagens e/ou a uma maior resistência a antivirais administrados.

Figura 7 - Número de casos de COVID-19 registrados pelo IntegraSUS (<https://integrasus.saude.ce.gov.br/>) no estado do Ceará



**Legenda:** Observado no segmento A) para todo o período amostral de novembro de 2020 a maio de 2024 e no segmento B) para o período amostral de maio de 2022 a maio de 2024. No eixo X, observa-se a data de coleta das amostras distribuídas por mês, desde 2020 até 2024. O eixo Y primário (à esquerda) apresenta o quantitativo de casos diagnosticados como positivos (em azul) ou negativos (em cinza) para COVID-19, enquanto o eixo Y secundário (à direita) apresenta o quantitativo de óbitos confirmados (em vermelho). Em B), os períodos amostrais das sublinhagens da Ômicron associadas aos maiores números de casos foram coloridos, distinguindo o período da BA.4/BA.5 em verde (maio a outubro de 2022), BE.9/BQ.1 em azul (outubro a março de 2023) e VOI JN.1 em vermelho (novembro a janeiro de 2024).

Nessa perspectiva, a gravidade da doença causada por vírus respiratórios, em especial SARS-CoV-2, pode evoluir para as chamadas síndromes respiratórias agudas graves (SRAGs), que são caracterizadas por agravos à síndrome gripal. Essa síndrome é frequentemente acompanhada pelo agravamento relativo a hospitalizações em unidades

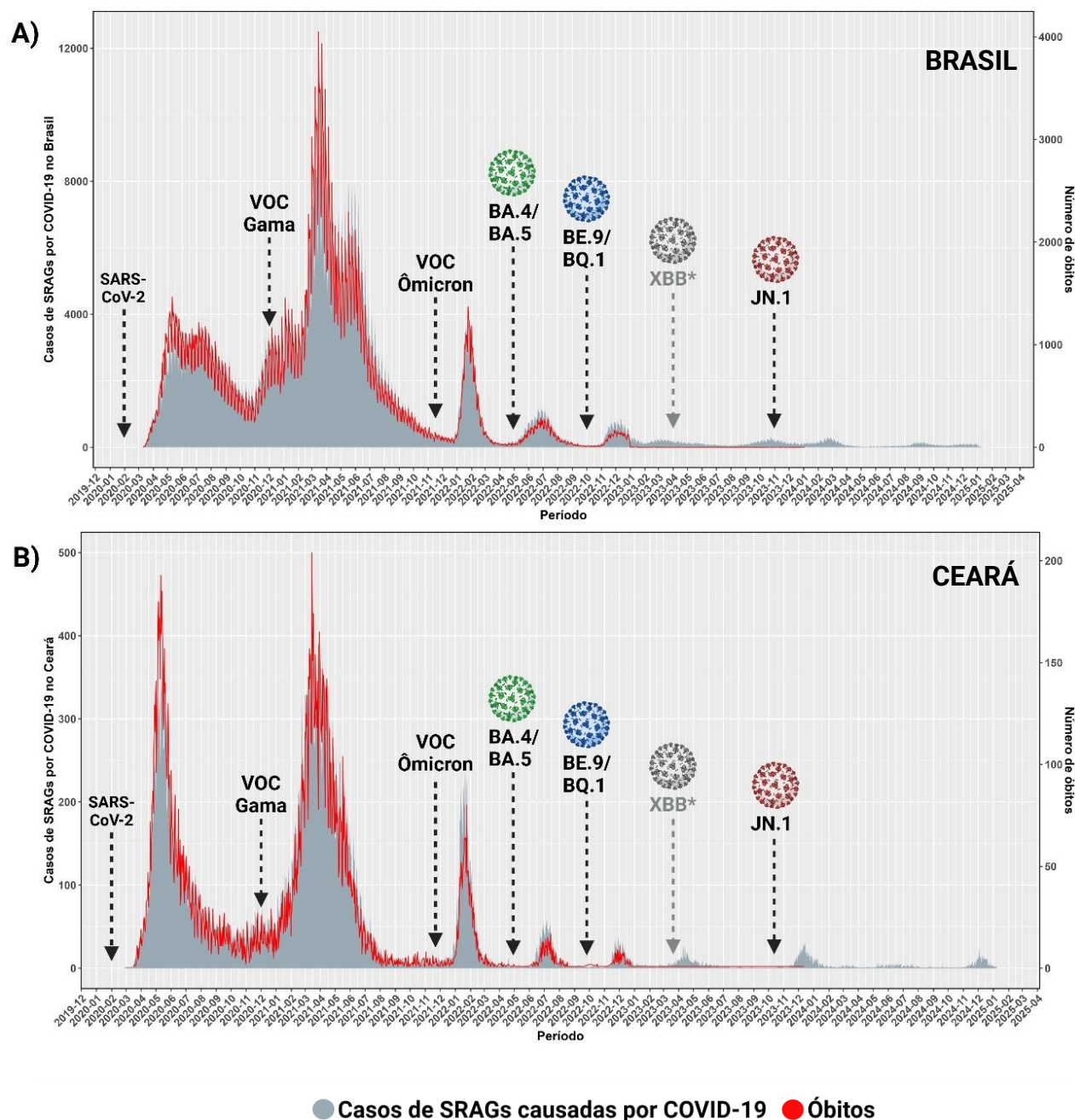
de internação ou em UTIs (Unidades de Terapia Intensiva). Com a introdução do vírus SARS-CoV-2 no Brasil, foram notificadas as primeiras SRAGs causadas por este novo coronavírus, no início de 2020 (**Figura 8A**). Após a emergência da VOC Gama, novos casos de SRAGs passaram a ser notificados no início de 2021 no Brasil, com aumento significativo de ocorrências em relação ao início de 2020, estabelecendo o maior pico de casos registrado em 15 de março de 2021, com 10.761 notificações.

O estado do Ceará, em comparação com o Brasil, apresentou aparente semelhança entre os casos de SRAG ocorridos na 1ª e 2ª ondas pandêmicas, como observado no segmento B, porém a segunda onda teve um período maior de casos notificados em relação a primeira (**Figura 8B**). Com a emergência da VOC Ômicron no país, um novo surto de casos foi iniciado, todavia, com menor aumento quando comparado às ondas anteriores. Essa observação pode ser relacionada à intensa campanha de imunização que ocorreu nesse período, tanto no Brasil quanto no Ceará, possivelmente explicando o padrão encontrados em ambos os gráficos.

Nas primeiras ondas pandêmicas é observado um crescimento no número de óbitos proporcional ao número de hospitalizações, porém o mesmo padrão não é observado nas ondas posteriores. Para os surtos associados às sublinhagens da VOC Ômicron (BA.4, BA.5, BE.9, BQ.1, XBB) e VOI JN.1, nota-se uma tendência de decréscimo do número de hospitalizações por SRAGs notificadas e um encurtamento da base da curva de casos, transcrevendo-se em uma menor faixa temporal de ocorrência das síndromes. O padrão observado em cada uma das emergências das sublinhagens estudadas neste trabalho é que, após o pico de casos de uma linhagem, há uma redução no número de casos. Em seguida, ocorre um aumento no número de casos e óbitos com o surgimento de novas linhagens.

Ao todo, foram notificadas 2.089.674 casos e 622.706 óbitos no Brasil em decorrência de SRAGs causadas por COVID-19 durante o período de 2020 a 2024, enquanto no Ceará foram notificados 74.211 casos e 26.185 óbitos durante o mesmo período. Isso torna o Ceará detentor de 3,7% do total de casos e óbitos ocorridos no Brasil.

Figura 8 - Número de casos de SRAGs hospitalizados por COVID-19 registrados pelo OpenDaraSUS (<https://opendatasus.saude.gov.br/>) no Brasil e no estado do Ceará

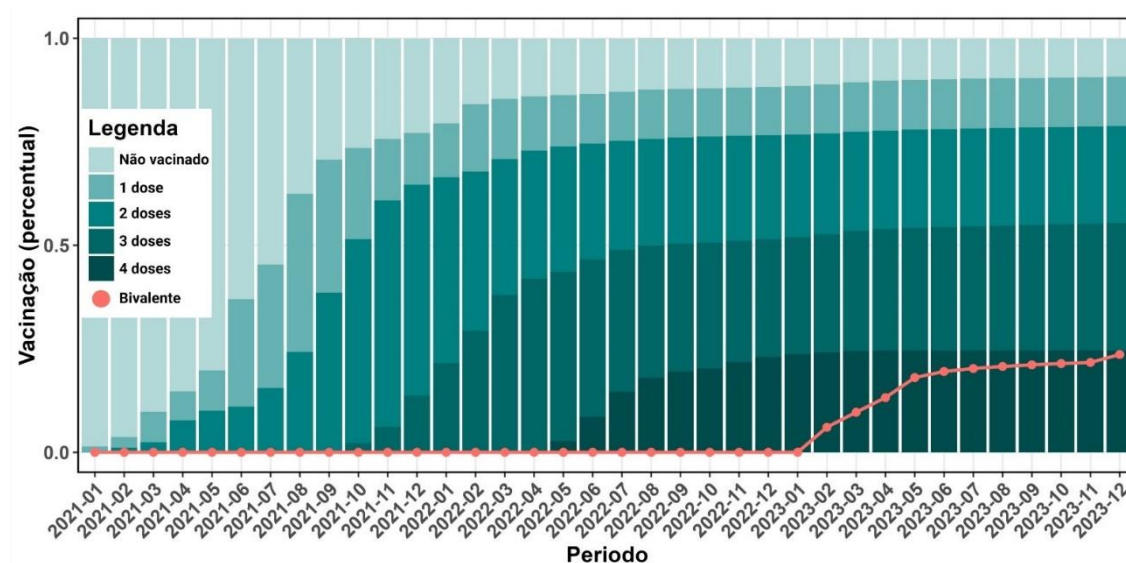


**Legenda:** Brasil observado no segmento A), e o Ceará, observado no segmento B). No eixo X observa-se a data de coleta das amostras distribuídas por mês, desde 2020 até 2023. O eixo Y primário (à esquerda) apresenta o quantitativo de casos de SRAGs notificados, enquanto o eixo Y secundário (à direita) apresenta o quantitativo de óbitos confirmados, representados, respectivamente, por azul e por vermelho.

No Ceará, a vacinação contra a COVID-19 teve início em 18 de janeiro de 2021, seguindo o Plano Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde. Nesta data, o estado começou a aplicar as primeiras doses da vacina *Coronavac*, desenvolvida pelo laboratório chinês Sinovac em parceria com o Instituto Butantan (Alencar *et al.*, 2021). Este foi um marco importante na luta contra a pandemia no estado e em todo o Brasil. De

acordo com informações do LocalizaSUS, em junho de 2021, mais de 25% da população do Ceará já havia recebido pelo menos uma dose da vacina. Até agosto do mesmo ano, esse número aumentou para 50%, com quase 25% da população tendo recebido a dose de reforço. Esses dados são relevantes para entender por que, entre agosto e dezembro de 2021, o Ceará não experimentou uma onda significativa da pandemia, mesmo com a presença da variante Delta. Além disso, em 2022, apesar do surgimento da variante Ômicron e do aumento acentuado de casos, não houve uma crise no número de óbitos, o que pode ser atribuído ao progresso na imunização com as doses adicionais, juntamente à vacina Bivalente, com início em fevereiro de 2023 (**Figura 9**).

Figura 9 - Imunização vacinal da população do Ceará por percentual de doses aplicadas ao longo do tempo disponibilizados pelo governo (<https://infoms.saude.gov.br>).



**Legenda:** No eixo X observa-se o mês de aplicação da vacina, desde 2021 até 2023. O eixo Y demonstra o percentual da cobertura vacinal população.

## 5.2 Identificação de assinaturas moleculares

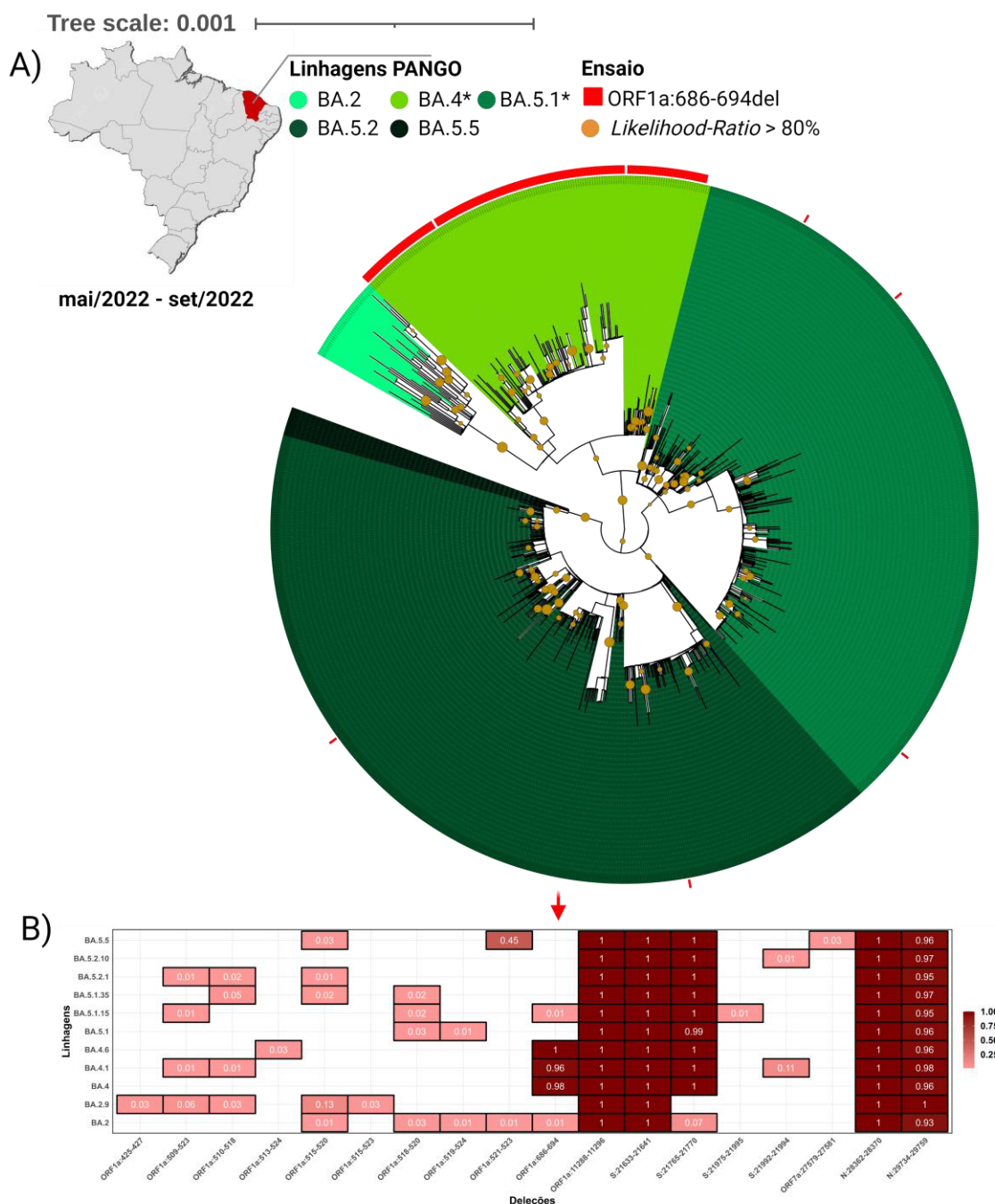
### 5.2.1 Assinaturas moleculares identificadas de SARS-CoV-2

As sequências do Ceará utilizadas na construção do mapa genômico permitiram mapear a frequência das mutações definidoras de cada linhagem estudada. Na região do gene ORF1a (nucleotídeos 686-694), foi identificada uma deleção de 9 nucleotídeos na proteína NSP6 (S106del, G107del, F108del) em 100%, 98% e 96% das sequências das sublinhagens BA.4 (BA.4.6, BA.4, BA.4.1, respectivamente) e em 1% ou menos das

outras sublinhagens da VOC Ômicron (BA.2 e BA.5.1.15), não sendo detectada nas demais sublinhagens BA.5. Outras deleções não apresentaram frequência significativa nem exclusividade na sublinhagem BA.4, o que as tornou candidatas pouco robustas para ensaios de genotipagem visando sua identificação. Ainda que a deleção na região ORF1a não seja exclusiva da BA.4, sua prevalência mais elevada nessa sublinhagem, em comparação com outras, enfatiza a escolha dessa região como um marcador preferencial para a diferenciação em ensaios de genotipagem (**Figura 10**).



Figura 10 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre maio e setembro de 2022.

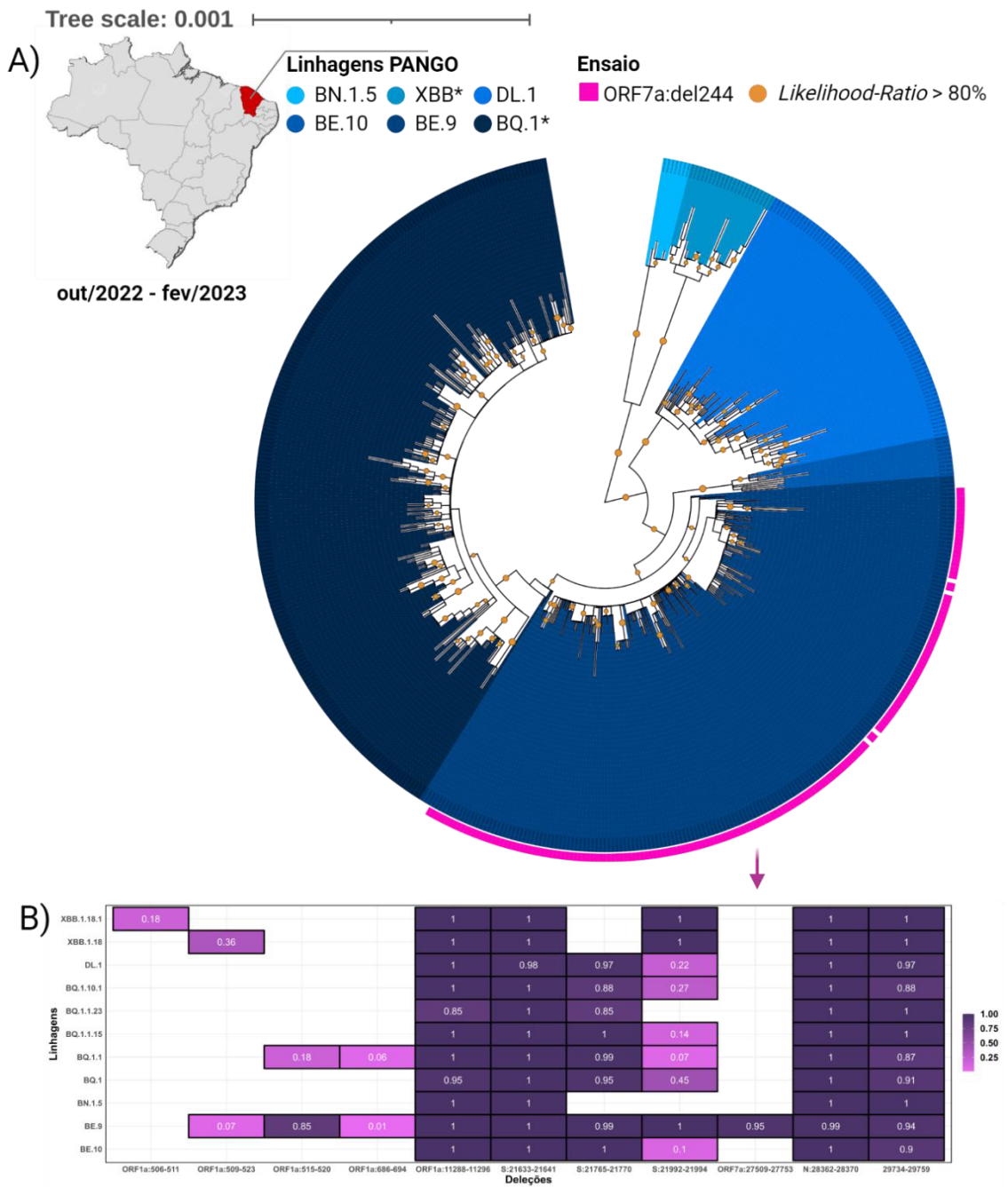


**Legenda:** Em (A) a análise filogenética representa parte da dinâmica de circulação do período amostral e a proximidade filogenética entre as linhagens contempladas. Em (B) o *heatmap* representa o percentual de deleções presentes em cada linhagem, com sua respectiva posição genômica em nucleotídeos. A sinapomorfia ORF1a: 686-694del em destaque representa o melhor padrão evolutivo observado para o desenvolvimento do ensaio de diferenciação entre BA.4-like e as outras linhagens co-circulantes no período.



Na região genômica da ORF1a:515-520, foi observada uma deleção de 5 nucleotídeos presente em 85% das sequências da BE.9, não sendo exclusiva, no entanto, para essa sublinhagem, já que essa mutação também esteve presente em 18% das sequências da BQ.1.1. Por outro lado, na região genômica da ORF7a:27.509-27.753, foi observada uma deleção de 244 nucleotídeos em 95% das sublinhagens BE.9, ausente em todas as outras linhagens circulantes concomitantes, em especial na BQ.1, uma linhagem de alta prevalência no período. Essa deleção, exclusiva e de alta frequência na BE.9, confirmou-se como uma sinapomorfia característica, diferenciando claramente a BE.9 das demais linhagens circulantes no período, incluindo BQ.1, BQ.1.1, BQ.1.1.15, BQ.1.1.23, BQ.1.10.1, BN.1.5, BE.10, DL.1, XBB.1.18 e XBB.1.18.1 (**Figura 11**).

Figura 11 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre outubro de 2022 e fevereiro de 2023.



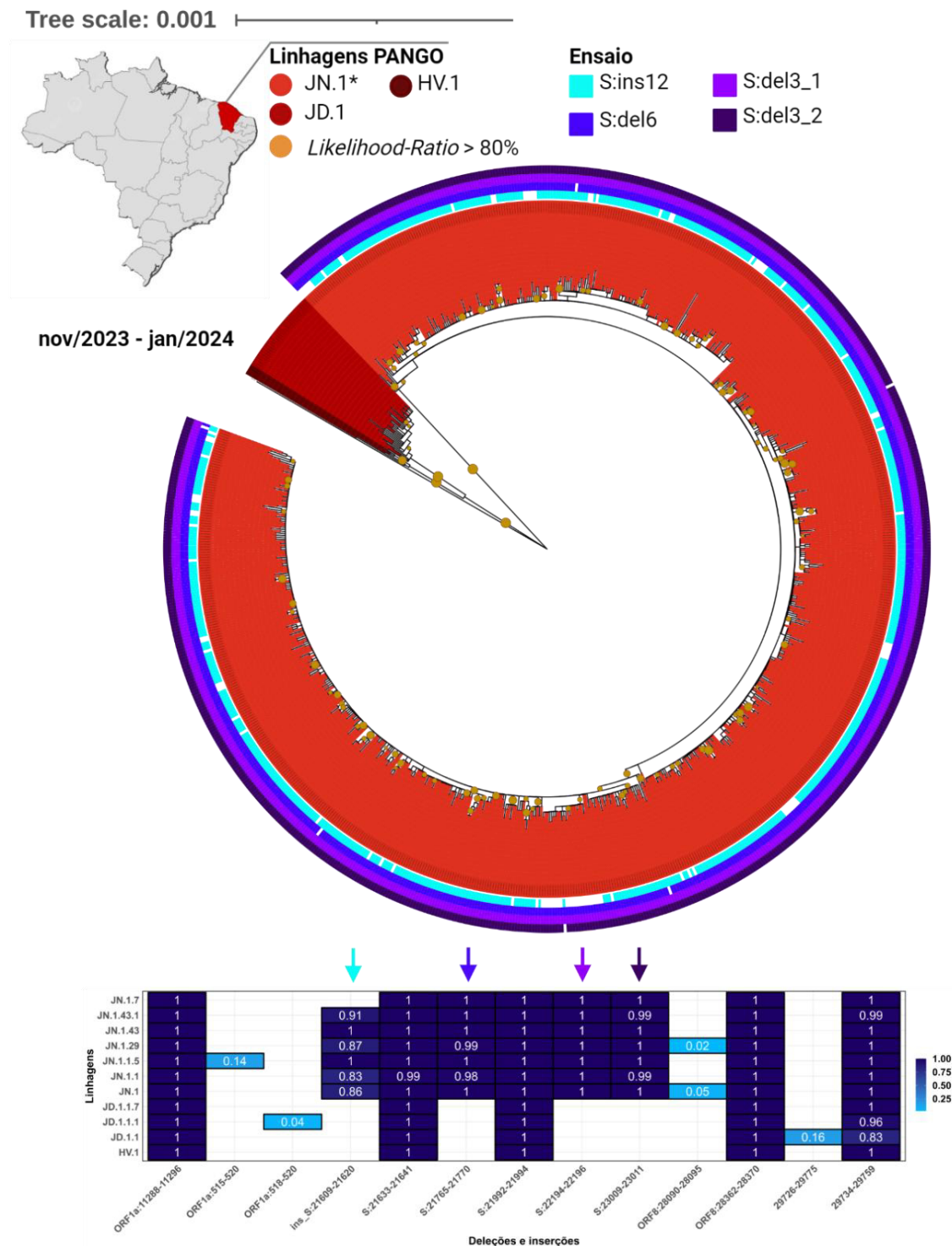
**Legenda:** Em (A) a análise filogenética representa parte da dinâmica de circulação do período amostral e a proximidade filogenética entre as linhagens contempladas. Em (B) o *heatmap* representa o percentual de deleções presentes em cada linhagem, com sua respectiva posição genômica em nucleotídeos. A sinapomorfia ORF7a: del244: 27.509-27.748 em destaque representa o melhor padrão evolutivo observado para o desenvolvimento do ensaio de diferenciação entre BE.9 e as outras linhagens co-circulantes no período.

Na região da Spike, dos pares de base 21.609 a 21.620, foi verificada uma inserção de 12 nucleotídeos (21609: TCATGCCGCTGT) em todas as linhagens JN.1, exceto na JN.1.7 e nas demais sublinhagens circulantes no início de 2024 (JD.1.1, JD.1.1.7, JD.1.1.1 e HV.1). A frequência dessa inserção na Spike variou entre 83-91% nas sequências de JN.1, JN.1.1, JN.1.29, JN.1.43.1, enquanto JN.1.43 e JN.1.1.5 apresentaram essa inserção de forma invariável em 100% das sequências.

O mapa genômico referente a esse período também identificou, por sua vez, deleções na região da Spike, com enfoque para S:22.194-22.196, identificadas em 100% das linhagens da JN.1; a deleção S:21.765-21.770, presente em 100% das JN.1 e em 98% a 99% das JN.1.1 e JN.1.29; e a deleção S:23.009-23.011, detectada em 100% das JN.1 e em 99% das JN.1.1 e JN.1.43.1. Tanto a inserção quanto as deleções na Spike foram frequentes nas linhagens JN.1 e ausentes ou raras nas linhagens co-circulantes (JD.1.1, JD.1.1.1, JD.1.1.7 e HV.1), evidenciando a capacidade dessas mutações de distinguir eficazmente as linhagens JN.1 das demais (**Figura 12**).

Ainda que as deleções definidoras tenham sido observadas em alta frequência nas linhagens JN.1, a inserção de 12 nucleotídeos na região Spike foi escolhida para nortear os ensaios de RT-qPCR. Em se tratando de simplificação do protocolo laboratorial e custo-benefício para os ensaios, especialmente em ambientes com recursos limitados, a utilização da técnica de curva de dissociação para RT-qPCR, baseada na temperatura de Melting ( $T_m$ ) é vantajosa para a identificação rápida e precisa das linhagens, sem a necessidade de customização de sondas marcadas. De tal modo, a utilização de inserções maiores como alvo permite a utilização destes testes baseados na diferença de tamanho de amplicon e de  $T_m$ , sendo uma técnica especialmente útil em cenários com recursos limitados ou quando há necessidade de resultados rápidos (Hashemipetroudi *et al.*, 2018; Pryor e Wittwer, 2006).

Figura 12 - Mapa genômico das principais linhagens co-circulantes entre novembro de 2023 e janeiro de 2024.



**Legenda:** Em (A) a análise filogenética representa parte da dinâmica de circulação do período amostral e a proximidade filogenética entre as linhagens contempladas. Em (B) o *heatmap* representa o percentual de inserções e deleções presentes em cada linhagem, com sua respectiva posição genômica. A sinapomorfia Spike: ins12: 21.609-21.620 em destaque representa o melhor padrão evolutivo observado para o desenvolvimento do ensaio de diferenciação entre JN.1-like e as outras linhagens co-circulantes no período.

As análises filogenéticas presentes nesse contexto auxiliaram na complementação dos resultados obtidos por meio da avaliação da prevalência, enriquecendo a compreensão dos percentuais de cada sinapomorfia. Foi observado que algumas amostras desprovidas dos padrões sinapomórficos foram agrupadas no mesmo ramo filogenético de amostras com padrões similares. Isso sinaliza que a ausência desses padrões pode estar associada a possíveis falhas de sequenciamento ou a presença de mutações privadas. Isso reforça a natureza distintiva dessas mutações-chave como marcadores de linhagem, corroborando assim para fidedignidade dos percentuais obtidos nos *heatmaps*. Essas árvores filogenéticas também proporcionaram uma representação visual e quantitativa das sequências circulantes durante o período analisado, de modo que linhagens pouco presentes se refletem em uma menor distribuição no período amostral.

As assinaturas moleculares identificadas no estudo refletem a dinâmica evolutiva do SARS-CoV-2 no Ceará, com a sucessão de diferentes linhagens e o surgimento de novas variantes. A identificação dessas assinaturas permitiu o desenvolvimento de ensaios de genotipagem para as principais sublinhagens da VOC Ômicron, como BA.4, BA.5, BE.9 e BQ.1, e para VOI JN.1. Esses ensaios moleculares representam uma ferramenta poderosa para complementar a vigilância genômica convencional, permitindo a detecção rápida e precisa de variantes de interesse, como demonstrado por estudos anteriores de outros pesquisadores (e.g., Corman *et al.*, 2020).

### **5.3 Avaliação de desempenho**

#### **5.3.1 Ensaio para VOC Ômicron (sublinhagem BA.4)**

Das 902 amostras analisadas, 18,6% (n = 168) foram identificados como sublinhagem BA.4 e 56% (n = 505) como sublinhagem não-BA.4, muito provavelmente BA.5, por ser a sublinhagem mais prevalente no período. A quantidade de inconclusivos foi 25,4% (n = 229).

A determinação de linhagens pelo padrão-ouro NGS foi comparada com o resultado de linhagens obtidas pelo ensaio, obtendo a concordância de 98,33% (n = 589/599), revelando 589 amostras concordantes e 10 amostras discordantes. Os valores para sensibilidade, especificidade, acurácia (concordância), Valor preditivo positivo (VPP), Valor preditivo negativo e a Razão de verossimilhança para o teste positivo estão na **tabela 1**.

Tabela 1 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular ORF1a\_del9\_286.

NOME DO ENSAIO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	ACURÁCIA	VPP	VPN	MCNEMAR (P-VALOR)
ORF1A_DEL9	98,69%	98,20%	98,33%	94,96%	99,54%	0,1374

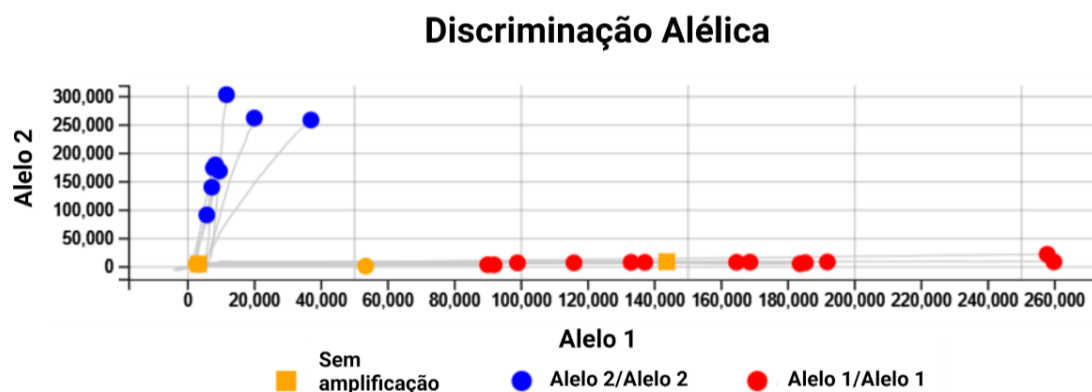
Esses resultados revelam que a sensibilidade e especificidade deste ensaio superou a sensibilidade média de 86% e a especificidade média de 95% do RT-qPCR diagnóstico realizado pela rede de laboratórios de saúde pública do Brasil (Ministério da Saúde, 2022). Isso revela que este ensaio obteve parâmetros como sensibilidade e especificidade comparáveis aos ensaios diagnósticos, apresentando, também, alta concordância com o padrão-ouro de classificação de linhagens.

Essa observação se deve à alta sensibilidade e reprodutibilidade dos ensaios com duas sondas de hibridização, uma vez que anelam especificamente às regiões de interesse, detectando dois alvos em uma única reação, e oferecem uma segunda camada de verificação dos resultados (Dutta *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2013). Quando a sonda FAM anela especificamente à região da deleção de 9 nucleotídeos e exibe fluorescência, infere-se que a linhagem é BA.4; quando a sonda VIC anela especificamente à região sem a deleção e exibe fluorescência, infere-se que a linhagem é não-BA.4. Esse método provavelmente contribui para a maior especificidade observada, mas também implica em um custo mais elevado (Tao *et al.*, 2022).

Semelhantemente, Fontana e colaboradores realizaram um ensaio de RT-qPCR com sondas específicas e observaram valores de sensibilidade, especificidade e concordância entre 96-99%, resultado que concorda com os parâmetros encontrados no ensaio para BA.4 (Fontana-Maurell *et al.*, 2023).

O desempenho desse ensaio evidencia a qualidade da estratégia de monitoramento de variantes por meio de ensaios de genotipagem direcionados às sinapomorfias definidoras de linhagens, proporcionando aplicabilidade devido a vigilância do cenário epidemiológico, incremento do custo-benefício e da velocidade em relação à técnica de NGS e, por conseguinte, ampliação do número amostral e aproximação do real cenário de casos (**Figura 13**).

Figura 13 - Gráfico representativo do ensaio de genotipagem ORF1a\_del9\_286, desenvolvido para detecção da sublinhagem BA.4 da VOC Ômicron.



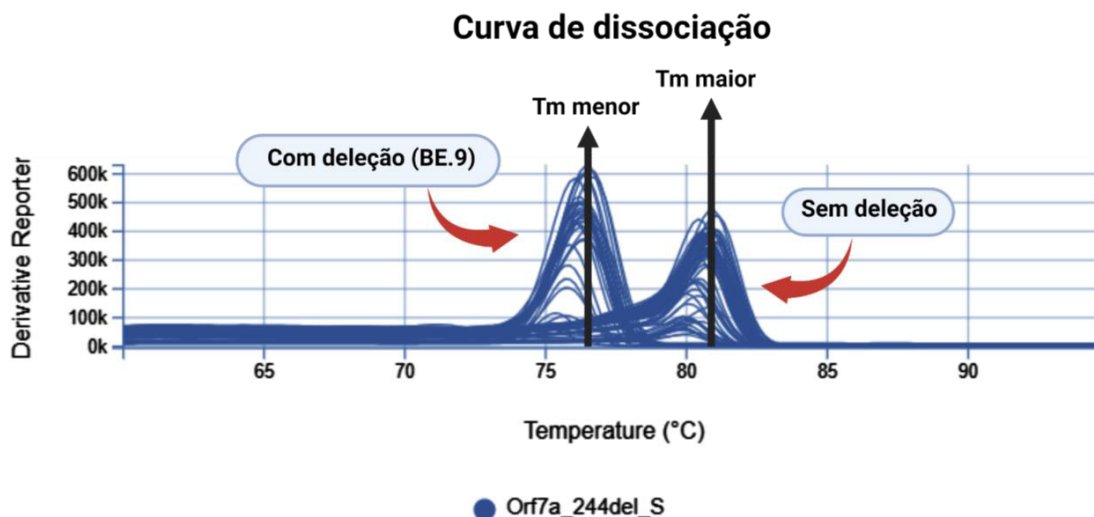
**Legenda:** O fluoróforo FAM é responsável pela marcação do Alelo 2 no eixo Y (“mutante”), representativo da deleção característica dessa sublinhagem, enquanto VIC é responsável pela marcação do Alelo 1, no eixo X, para representação das linhagens sem deleção (*wild type*).

A validação estatística foi realizada a partir da prova de McNemar, buscando uma comparação estatisticamente significativa entre as duas variáveis não categóricas (resultado da linhagem e a concordância). A partir do valor chi quadrado de 2,2069 e o P-valor de 0,1374, pode-se avaliar que o teste de McNemar não apresentou significância estatística da diferença entre os grupos, indicando que, resultados de genotipagem do ensaio concordam com os resultados de sequenciamento.

### 5.3.2 Ensaio para VOC Ômicron (sublinhagem BE.9)

Das 2.418 amostras analisadas, 31% ( $n = 750$ ) das curvas foram correspondentes ao grupo BE.9 e 36,8% ( $n = 890$ ) ao grupo não-BE.9, e 32,2% ( $n = 778$ ) inconclusivas. As curvas de dissociação para a sublinhagem BE.9 exibiram amplificação a uma temperatura média de fusão ( $T_m$ ) de  $76,42 \pm 0,84^\circ\text{C}$ , acompanhada por níveis de fluorescência variando entre 200 e 300k. Por sua vez, as sublinhagens inferidas como não-BE.9 apresentaram uma temperatura média de fusão de  $80,77 \pm 0,55^\circ\text{C}$ , com uma faixa mais ampla de intensidade de fluorescência, variando de 200 a 400k. Na **Figura 14**, essa observação, evidenciada pela menor  $T_m$  para BE.9 e a maior  $T_m$  para não-BE.9, está alinhada com pesquisas anteriores, que indicam que amplicons mais longos tendem a apresentar temperaturas de fusão ( $T_m$ ) mais altas em comparação com os mais curtos (Gudnason et al., 2007).

Figura 14 - Gráfico representativo da curva de dissociação obtida no ensaio ORF7a\_244del.



**Legenda:** Este ensaio tem como alvo a deleção de 244 pares de bases na região ORF7a do genoma do SARS-CoV-2, uma característica definidora das linhagens BE.9. As amostras atribuídas à designação 'BE.9' estão destacadas à esquerda exibindo valores de  $T_m$  mais baixos ( $76,42 \pm 0,84^\circ\text{C}$ ), enquanto as amostras 'não-BE.9', evidenciadas à direita apresentaram valores de  $T_m$  mais altos ( $80,77 \pm 0,55^\circ\text{C}$ ).

O gráfico representativo das curvas de dissociação demonstrou uma separação distinta entre os grupos BE.9 e não-BE.9. Esses achados são congruentes com o desenho experimental do ensaio, pois a menor extensão do amplicon nos grupos BE.9, devido à deleção de 244 bases que reduz seu tamanho, requer uma menor temperatura de dissociação da dupla fita de DNA para atingir sua temperatura de *melting*. Da mesma forma, o amplicon sem a deleção exibe maior extensão, visível nos grupos não-BE.9, sugerindo que a dissociação necessita de uma temperatura mais elevada para desnaturar o material genético e atingir a temperatura de *melting* (Pryor e Wittwer, 2006).

Foi observada uma concordância de 89,7% ( $n = 252/281$ ), evidenciando 252 amostras concordantes e 29 amostras discordantes. Assim como apresentado para o ensaio ORF1a\_del9\_286, os valores para sensibilidade, especificidade, acurácia (concordância), Valor preditivo positivo (VPP), Valor preditivo negativo e a Razão de verossimilhança para o teste positivo estão na **tabela 2**.

Tabela 2 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular ORF7a\_244del.



NOME DO ENSAIO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	ACURÁCIA	VPP	VPN	MCNEMAR (P-VALOR)
ORF7a_224del	89,8%	89,6%	89,7%	82,2%	94,2%	0,1138

Neste ensaio, a sensibilidade superou a média observada em testes de RT-PCR diagnóstico (~86%), embora a especificidade tenha ficado abaixo da média esperada (<95%) (Ministério da Saúde, 2022). Essa diferença pode ser explicada pela ocorrência de amplificação inespecífica, na qual o fluoróforo intercalante BRYT Green se liga a qualquer material genético de fita dupla, incluindo sequências contaminantes ou dímeros de primers. Esse fenômeno pode resultar na detecção equivocada de sinal de fluorescência, gerando resultados falso-positivos (Zhang *et al.*, 2015).

Segundo Juul e colaboradores (2022), os ensaios baseados em curva de dissociação apresentam valores de especificidade de pelo menos 90%, semelhantes aos observados no ensaio para detecção da sublinhagem BE.9. Isso sugere que, embora esses ensaios sejam sensíveis, podem apresentar variações na especificidade, possivelmente devido à geração de resultados falso-positivos (Juul *et al.*, 2022).

Embora o ensaio ORF7a\_244del tenha apresentado sensibilidade e especificidade inferiores em comparação ao ORF1a\_del9\_286, ele representa uma alternativa de menor custo, utilizando reagentes mais acessíveis, como o BRYT Green, um fluoróforo intercalante amplamente utilizado e de baixo custo (Tao *et al.*, 2022). Essa vantagem financeira pode ser particularmente relevante em contextos de vigilância em larga escala ou em regiões com recursos limitados.

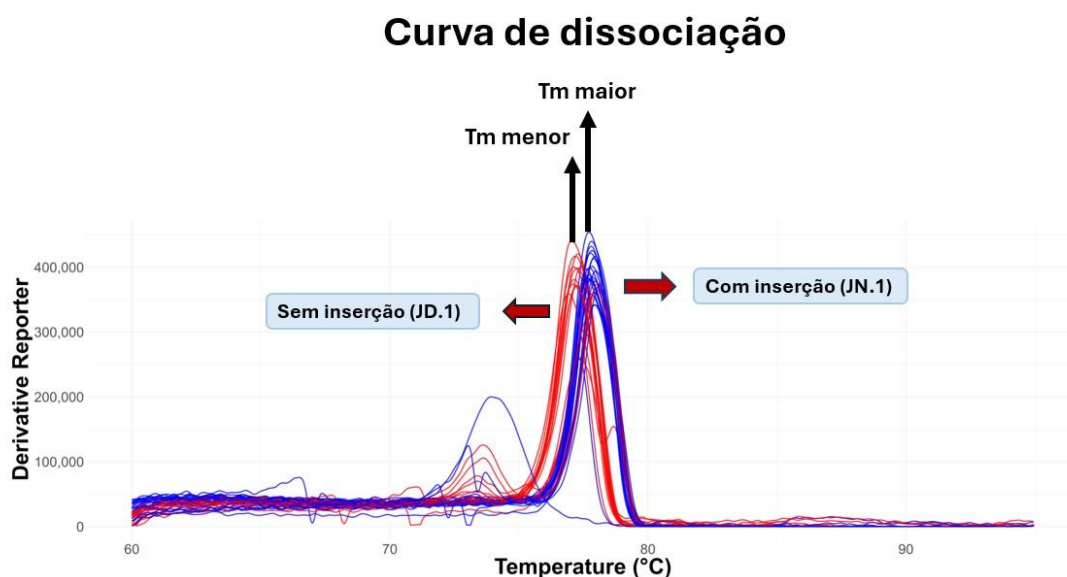
Para validação estatística da comparação entre os resultados dos ensaios ORF7a\_244del de curva de dissociação com os dados de sequenciamento (padrão-ouro), o teste de McNemar não apresentou significância estatística da diferença entre os grupos, com qui-quadrado de 2,5 e p-valor igual a 0,1138. Esse resultado evidencia que ambas as técnicas não apresentaram diferenças estatísticas nas suas análises, inferindo que os resultados do ensaio concordam com os resultados de sequenciamento.

### 5.3.3 Ensaio para VOI JN.1

Das 41 amostras analisadas, 87,8% (36/41) foram conclusivas e 12,2% foram inconclusivas (5/41). Das conclusivas, 61,1% eram amostras JN.1 e 38,9% foram amostras não JN.1. Como observado na **figura 15**, as curvas de dissociação para a sublinhagem JN.1, apenas para as amostras conclusivas, apresentaram  $T_m$  de  $77,84 \pm 0,13^\circ\text{C}$ , apresentando níveis de fluorescência entre 350k e 450k. As curvas para as sublinhagens de JD.1, também conclusivas, apresentaram  $T_m$  de  $77,2 \pm 0,14^\circ\text{C}$ , com nível de fluorescência em 430k.

Assim como observado para o ensaio de curva de dissociação da sublinhagem BE.9, as curvas de JN.1 e JD.1 seguiram o mesmo padrão de diferenciação. Enquanto as amostras da linhagem JN.1 apresentaram uma tendência de curva mais à direita, com  $T_m$  maior, as linhagens JD.1 revelaram uma tendência de curvas mais à esquerda, com  $T_m$  menor. Esse resultado está relacionado com a tendência de variantes de maior tamanho, como as variantes com inserção (JN.1), apresentarem maior  $T_m$ , e as de menor tamanho, como variantes sem inserção (JD.1), exibirem menor tamanho (Pryor e Wittwer, 2006).

Figura 15 - Gráfico representativo da curva de dissociação obtida no ensaio *Spike\_ins12*.



**Legenda:** Este ensaio tem como alvo a inserção de 12 pares de bases na região Spike do genoma do SARS-CoV-2, uma característica definidora das linhagens JN.1. As amostras atribuídas à designação 'JD.1' estão destacadas à esquerda exibindo valores de  $T_m$  mais baixos ( $77,26 \pm 0,18^\circ\text{C}$ ), enquanto as amostras 'JN.1',

evidenciadas à direita apresentaram valores de  $T_m$  mais altos ( $77,64 \pm 0,80^\circ\text{C}$ ). Ambos os grupos são derivados de amostras clínicas de diagnóstico,

De acordo com a **tabela 3**, os indicadores de validação do ensaio apresentaram valores satisfatórios para a técnica (Ministério da Saúde, 2022). No entanto, a literatura aponta que, em ensaios baseados em curva de dissociação, a especificidade tende a ser inferior à sensibilidade, o que contrasta com os resultados observados para o ensaio S\_INS12 (Juul et al., 2022, Costa, 2023). Esse achado ressalta a importância de validações adicionais com um maior número de amostras para confirmar a robustez do ensaio.

A validação estatística pelo teste de McNemar revelou que não houve significância estatística da diferença entre os grupos “linhagens identificadas pelo ensaio” e “linhagens identificadas por NGS”, apresentando qui-quadrado de 0,5 e p-valor igual a 0,4795, o que sugere concordância entre os resultados de genotipagem e os resultados de sequenciamento.

Tabela 3 - Indicadores para estudo de validação de testes diagnósticos ou de rastreamento aplicadas ao ensaio molecular S\_INS12.

NOME DO ENSAIO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	ACURÁCIA	VPP	VPN	MCNEMAR (P-VALOR)
S_INS12	91,6%	100%	94,4%	100%	85,7%	0.4795

O ensaio de genotipagem para a variante de interesse (VOI) JN.1, baseado na detecção da inserção *Spike\_ins12*, demonstrou a capacidade de identificar essa variante emergente. A detecção de inserções como marcadores moleculares é uma estratégia importante para o monitoramento da evolução viral, como destacado por outros pesquisadores (Holmes *et al.*, 2021).

#### ***5.3.4 Abordagem integrativa de vigilância genômica com ensaios de genotipagem dirigidos a alvos sinapomórficos***

A investigação de assinaturas moleculares permite o monitoramento do conjunto viral circulante durante surtos em populações humanas e animais, desempenhando um

papel crucial tanto na adoção de medidas não farmacológicas de intervenção – como distanciamento social, uso de máscaras, higienização das mãos e superfícies, ventilação adequada, isolamento e quarentenas – quanto na definição de políticas de saúde para o enfrentamento de epidemias e pandemias. Essa abordagem é aplicável tanto em contextos antrópicos quanto zoonóticos, como no monitoramento de vírus emergentes de origem animal com potencial de transmissão para humanos, exemplificado por patógenos como SARS-CoV-2, influenza A (H1N1) e influenza aviária (H5N1). A vigilância genômica integrada, aliada a ensaios de genotipagem direcionados a alvos sinapomórficos, possibilita a identificação precoce de variantes virais, a compreensão de sua dinâmica de transmissão e a avaliação de riscos associados à emergência de novas linhagens. Dessa forma, essa estratégia fortalece a capacidade de resposta a surtos, contribuindo para a mitigação de impactos na saúde pública e na economia.

Além das abordagens de vigilância genômica baseadas em WGS, a complementação por metodologias de fácil descentralização, como ensaios de RT-qPCR direcionados a assinaturas moleculares, oferece vantagens significativas. Entre elas, destacam-se o maior custo-benefício associado à técnica, a aplicação eficiente na triagem de amostras, o aumento do número de testes realizados e a obtenção de maior representatividade dos dados epidemiológicos. Adicionalmente, esses ensaios permitem a análise de amostras com distintas cargas virais, garantindo maior sensibilidade, e são compatíveis com diversos meios de transporte para amostras clínicas. Essa flexibilidade torna os ensaios de RT-qPCR viáveis para implementação em sistemas de unidades de saúde, laboratórios de diagnóstico e centros de vigilância regionais, ampliando a capacidade de monitoramento e resposta a surtos.

A partir dos resultados encontrados na identificação das assinaturas moleculares de frequência considerável nas linhagens de interesse, com respectiva ausência de tais assinaturas em outras linhagens co-circulantes, os ensaios revelam seu caráter discriminatório. O reposicionamento dos ensaios moleculares já descritos e validados também se torna uma possibilidade, à medida que as mutações em linhagens que encerraram sua circulação podem convergir de forma independente em alterações semelhantes nas linhagens atuais (Costa, 2023).

Os ensaios apresentaram resultados satisfatórios em relação aos parâmetros de desempenho avaliados, como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo

(VPP), valor preditivo negativo (VPN) e teste de McNemar. No entanto, embora de custo mais elevado, os ensaios baseados em dupla-sonda oferecem uma segurança adicional na análise e interpretação dos resultados, em comparação com ensaios que utilizam apenas curvas de melting. Estes últimos podem apresentar limitações, como a amplificação de contaminantes, formação de dímeros de *primers* ou falhas de amplificação, especialmente quando não há otimização adequada do ensaio ou ausência de controles internos (Zhang *et al.*, 2015). Por outro lado, os ensaios baseados em curvas de dissociação tendem a ser mais econômicos, além de proporcionarem economia de tempo e aproveitamento de insumos pré-existentes. Isso ocorre devido ao reposicionamento de primers para detecção de sinapomorfias já conhecidas e à utilização de reagentes já disponíveis na rotina laboratorial, permitindo a implementação de um método praticamente em tempo real.

Ressalta-se, portanto, que estratégias baseadas em ensaios de genotipagem e inferência por RT-qPCR atuam como uma abordagem complementar menos laboriosa e demorada em comparação ao uso de sequenciamento de nova geração (NGS). Esses ensaios apresentam custos de implementação, processamento e análise reduzidos quando comparados ao NGS (Pinkhover *et al.*, 2022). Além de auxiliar no monitoramento efetivo do cenário epidemiológico à nível populacional, devido à rápida identificação das variantes e controle da transmissão da infecção (Vidya *et al.*, 2021).

Em períodos pandêmicos, a exacerbação do número de casos e a necessidade de medidas rápidas para orientar o tratamento dos pacientes fazem com que o diagnóstico clínico seja complementado de forma crucial pela vigilância epidemiológica. Com a epidemiologia, obtém-se a magnitude da disseminação da doença, através do número de casos confirmados e suspeitos, a propagação da doença por meio das taxas de incidência (novos casos) e prevalência (indivíduos afetados na população), a distribuição geográfica dos casos, o perfil demográfico dos casos (idade, sexo, comorbidades), a taxa de ocupação de leitos, os dados de cobertura vacinal e eficácia da vacina, além da capacidade de diagnóstico e identificação de surtos por meio do quantitativo de testes realizados. Essas variáveis permitem direcionar recursos e estratégias as regiões mais afetadas, identifica os grupos de risco e investiga necessidade de atualização vacinal (Ma *et al.*, 2024; Ministério da Saúde, 2024).

Já em períodos interepidêmicos, a vigilância se torna mais contínua, com foco no monitoramento de tendências e padrões ao longo do tempo, buscando a prevenção e

preparação para possíveis surtos futuros. Essa abordagem visa o monitoramento de variantes e a identificação precoce do agente patogênico, permitindo uma resposta rápida caso ocorra um aumento nos casos. Durante o período entre epidemias, pode-se avaliar a relação das variantes circulantes com a eficácia das vacinas e seu escape imunológico, auxiliando na possibilidade de atualizações das vacinas ou reforços. Cada variante permite a adaptação das medidas de saúde pública e das estratégias de vacinação para mitigar a propagação do vírus.

Um exemplo emblemático foi observado com a variante Ômicron, cujas mutações demonstraram capacidade de enfraquecer a resposta das células T a células infectadas e escapar de anticorpos neutralizantes gerados por infecções prévias ou vacinação. Essas mutações de evasão imunológica, amplamente documentadas na literatura, destacaram a importância do desenvolvimento de vacinas que induzam a produção de anticorpos neutralizantes, especialmente direcionados à proteína Spike do SARS-CoV-2. Contudo, a emergência de novas variantes trouxe à tona o desafio das mutações na Spike, que podem aumentar a transmissibilidade e, simultaneamente, reduzir a neutralização por anticorpos.

Nesse contexto, o monitoramento genômico, particularmente das variantes de preocupação (VOCs) e variantes de interesse (VOI), como a Ômicron e suas sublinhagens, e posteriormente a JN.1, desempenha um papel central na identificação de novas mutações e na compreensão de seu impacto na transmissibilidade, severidade e escape imunológico. Essa vigilância contínua é essencial para orientar a atualização de vacinas, a formulação de políticas de saúde e a preparação para futuras ondas de infecção, garantindo respostas ágeis e eficazes diante de patógenos em constante evolução.

## **6 CONCLUSÃO**

O estudo conduzido foi de grande importância para entender o cenário epidemiológico em constante mudança no Ceará, durante a pandemia e pós-pandemia da COVID-19. Assim como para investigar a possível associação entre as distintas linhagens/variantes de vírus respiratórios, como o SARS-CoV-2, e o número de notificações de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG).

O perfil dos padrões moleculares, na forma de mutações-chave definidoras de linhagem, permitiu ampliar a detecção e o monitoramento de distintas sublinhagens de interesse. A validação dos ensaios de genotipagem molecular e sua aplicação representou uma importante forma de incrementar o número de amostras para as linhagens circulantes

em 2022 e anos posteriores. A elevada especificidade e sensibilidade dos ensaios, juntamente com sua concordância com os resultados de NGS, demonstraram validação satisfatórios e correspondentes à testes diagnósticos já estabelecidos e capaz de se igualar com sequenciamento genômico.

A reemergência e co-circulação de vírus respiratórios, reforçam a importância de uma vigilância genômica ativa e contínua, dado que muitos patógenos têm uma dinâmica sazonal bem definida. Em contraste, o SARS-CoV-2 apresenta um comportamento menos previsível, em parte devido à influência de fatores como novas variantes e campanhas de vacinação. Esse monitoramento constante permite a identificação de padrões sazonais e a antecipação de novas ondas de infecção, possibilitando a implementação de estratégias de controle mais eficazes para mitigar o impacto na saúde pública.

Observou-se a possível influência das sublinhagens no cenário epidemiológico do novo coronavírus no Ceará, na qual a cada nova emergência, o número de casos tende a aumentar. No agravamento desses casos, consequentemente acarretando Síndrome Respiratória, foi observado que as curvas de SRAGs notificadas seguem um padrão semelhante às curvas do aumento do número de casos para COVID-19, denotando, possivelmente, que distintas linhagens podem ser responsáveis por diferentes evoluções de agravamento da doença COVID-19 (cura e óbito).

Ressalta-se que a formação em Biotecnologia foi fundamental para a condução deste estudo, permitindo a aplicação de técnicas avançadas de biologia molecular, como a genotipagem por RT-qPCR e a análise de dados genômicos através da bioinformática, além da interpretação de padrões moleculares e mutações-chave. Essa base técnica e científica foi essencial para a validação dos ensaios, a análise de resultados e a integração de dados epidemiológicos e moleculares, contribuindo para uma compreensão mais profunda da dinâmica viral e para a proposição de estratégias de vigilância e controle mais eficientes.

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os vírus respiratórios são os mais frequentes agentes etiológicos responsáveis por causar doenças em humanos, com substancial impacto na morbidade e mortalidade da população em todo o mundo. Diversas famílias de vírus respiratórios, como influenza,

vírus sincicial respiratório, parainfluenza, metapneumovírus, rinovírus, coronavírus, adenovírus e bocavírus, estão bem adaptadas à transmissão pessoa a pessoa e circulam de forma endêmica, epidêmica ou pandêmica (Boncristiani, Criado e Arruda, 2009).

O modelo experimental desenvolvido neste trabalho, que integra análises de bioinformática para a construção de árvores filogenéticas e gráficos de frequência de mutações, aliado ao uso de ensaios de RT-qPCR para identificação e caracterização de variantes, pode ser adaptado e aplicado à vigilância molecular de outros vírus respiratórios. Por exemplo, no caso do vírus influenza, mesmo sendo segmentado, é possível utilizar abordagens semelhantes para monitorar a diversidade genética de cepas circulantes, identificar mutações associadas à evasão imunológica ou aumento da transmissibilidade, e inferir linhagens por meio de ensaios moleculares direcionados.

Além disso, essa metodologia pode ser estendida para outros patógenos de importância clínica, como o vírus sincicial respiratório e o metapneumovírus, permitindo a detecção precoce de variantes emergentes e a avaliação de sua relevância epidemiológica.

Programas globais de vigilância genômica, como os desenvolvidos para o SARS-CoV-2, são essenciais para detectar rapidamente ameaças infecciosas emergentes e orientar respostas de saúde pública (Tosta *et al.*, 2023). O sequenciamento genômico completo, combinado com técnicas de RT-qPCR direcionadas para mutações específicas, representa uma ferramenta poderosa para a caracterização de linhagens e a reconstrução filogenética, contribuindo para a vigilância epidemiológica e o controle de surtos.

Portanto, a aplicação dessa metodologia a outros patógenos respiratórios pode ampliar a capacidade de monitoramento e resposta a doenças infecciosas, fortalecendo a preparação global para futuras epidemias e pandemias.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, Z.; LI, M.; WANG, X. **Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 11 set. 2020.

ABUYADEK, R. *et al.* Combined epidemiology and genetic sequencing surveillance in the era of COVID-19 pandemic; Abu Dhabi experience, United Arab Emirates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 109, 1 abr. 2023.



ALENCAR, C. H. *et al.* High Effectiveness of SARS-CoV-2 Vaccines in Reducing COVID-19-Related Deaths in over 75-Year-Olds, Ceará State, Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 3, p. 129, 13 jul. 2021.

AO, D. *et al.* The rapid rise of SARS-CoV-2 Omicron subvariants with immune evasion properties: XBB.1.5 and BQ.1.1 subvariants. **MedComm**, v. 4, n. 2, 15 abr. 2023.

BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280–294, 1 fev. 2022.

BAI, Z. *et al.* **The sars-cov-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation** *Viruses* MDPI AG, , 1 jun. 2021.

BANHO, C. A. *et al.* Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city. **Communications Medicine**, v. 2, n. 1, p. 41, 13 abr. 2022.

BARDHAN, M. *et al.* Emerging zoonotic diseases and COVID-19 pandemic: global Perspective and Indian Scenario. **Annals of Medicine & Surgery**, v. 85, n. 8, p. 3997–4004, ago. 2023.

BIVINS, A. *et al.* **Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance** *Water Research* Elsevier Ltd, , 15 set. 2021.

BONCRISTIANI, H. F.; CRIADO, M. F.; ARRUDA, E. Respiratory Viruses. *Em: Encyclopedia of Microbiology*. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 500–518.

BRLEK, P. *et al.* Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives. **Cells**, v. 13, n. 6, p. 504, 13 mar. 2024.

BUCHY, P. *et al.* **COVID-19 pandemic: lessons learned from more than a century of pandemics and current vaccine development for pandemic control** *International Journal of Infectious Diseases* Elsevier B.V., , 1 nov. 2021.

BUSS, L. F. *et al.* Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. **Science**, v. 371, n. 6526, p. 288–292, 15 jan. 2021.

BYRNE, J. P.; HAYS, J. N. **Epidemics and Pandemics**. Santa Barbara, California: Greenwood, 2021. v. 1

CALLAWAY, E.; LEDFORD, H. How bad is Omicron? What scientists know so far. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 197–199, 9 dez. 2021.

CAMARGO, C. H. *et al.* **Um ano de pandemia da COVID-19: diversidade genética do SARS-CoV-2 no Brasil A year of the COVID-19 pandemic: genetic diversity of SARS-COV-2 in Brazil**BEPA. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br>>.

CHEN, K. W. K.; TSUNG-NING HUANG, D.; HUANG, L. M. **SARS-CoV-2 variants – Evolution, spike protein, and vaccines***Biomedical Journal*Elsevier B.V., , 1 ago. 2022.

CHEN, K.-W. K.; TSUNG-NING HUANG, D.; HUANG, L.-M. SARS-CoV-2 variants – Evolution, spike protein, and vaccines. **Biomedical Journal**, v. 45, n. 4, p. 573–579, ago. 2022.

COMUNIDADE DE SAÚDE, P. **O surgimento da variante JN.1 do SARS-CoV-2 levanta preocupações com o aumento da transmissibilidade e evasão imunológica.**

CORMAN, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020.

CORREA, A. M. S. *et al.* **Revisiting the rules of life for viruses of microorganisms***Nature Reviews Microbiology*Nature Research, , 1 ago. 2021.

COSTA, T. DE O. **Vigilância genômica de sars-cov-2 na cidade de Fortaleza: caracterização de variantes e fortalecimento do monitoramento epidemiológico**Fortaleza, 2023.

DAVIES, N. G. *et al.* Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Science**, v. 372, n. 6538, 9 abr. 2021.

DUTTA, D. *et al.* COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. **Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 1503, 20 jun. 2022.

DYE, C. **After 2015: Infectious diseases in a new era of health and development** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Royal Society, , 19 jun. 2014.

FARIA, L.; ALVAREZ, R. E. C.; SANTOS, L. A. DE C. Desigualdades socioeconômicas na América Latina e Caribe: o futuro pós-pandemia para a formação profissional na saúde. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 30, n. suppl 1, 2023.

FLERLAGE, T. *et al.* **Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract** *Nature Reviews Microbiology* Nature Research, , 1 jul. 2021.

FONKWO, P. N. **Pricing infectious disease The economic and health implications of infectious diseases**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/>>.

FONTANA-MAURELL, M. *et al.* A straightforward one-step strategy for SARS-CoV-2 diagnosis and screening of variants of concern: a multicentre study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 118, 2023a.

\_\_\_\_\_. A straightforward one-step strategy for SARS-CoV-2 diagnosis and screening of variants of concern: a multicentre study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 118, 2023b.

FORLEO-NETO, E. *et al.* **Influenza** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. [s.l: s.n.].

GANGAVARAPU, K. *et al.* Outbreak.info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. **Nature Methods**, v. 20, n. 4, p. 512–522, 23 abr. 2023.

GARCIA, L. P.; DUARTE, E. Epidemiology and Health Services: The trajectory of the Brazilian National Health System Journal. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 20, n. 7, p. 2081–2090, 3 jul. 2015.

GARDY, J. L.; LOMAN, N. J. **Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 2018a.

\_\_\_\_. **Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system***Nature Reviews Genetics*Nature Publishing Group, , 2018b.

GARTEN, R. J. *et al.* Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197–201, 10 jul. 2009.

GIOVANETTI, M. *et al.* Genomic epidemiology reveals how restriction measures shaped the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **medRxiv**, p. 2021.10.07.21264644, 2021.

GOMES, E. **Conceitos e ferramentas da epidemiologia**. [s.l: s.n.].

GRASSLY, N. C.; FRASER, C. **Seasonal infectious disease epidemiology***Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*Royal Society, , 7 out. 2006.

HAN, Y. *et al.* Optimization and performance evaluation of double-stranded probe in real-time PCR. **Analytical Biochemistry**, v. 650, p. 114711, ago. 2022.

HARVEY, W. T. *et al.* **SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape***Nature Reviews Microbiology*Nature Research, , 1 jul. 2021.

HASHEMIPETROUDI, S. H. *et al.* Assessment of DNA contamination in RNA samples based on ribosomal DNA. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 131, 22 jan. 2018.

HILT, E. E.; FERRIERI, P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. **Genes**, v. 13, n. 9, p. 1566, 31 ago. 2022.

HOLMES, E. C. *et al.* The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4848–4856, set. 2021.

HOSCH, S. *et al.* Genomic Surveillance Enables the Identification of Co-infections With Multiple SARS-CoV-2 Lineages in Equatorial Guinea. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 4 jan. 2022.

HSIEH, Y.-C. *et al.* Influenza Pandemics: Past, Present and Future. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2006.

JACOBS, J. L.; HAIDAR, G.; MELLORS, J. W. COVID-19: Challenges of Viral Variants  
Keywords. **Annual Review of Medicine** Downloaded from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).  
**Guest**, v. 32, p. 53, 2025.

JAHIRUL ISLAM, M. *et al.* **A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites***Immunobiology*Elsevier GmbH, , 1 jan. 2023.

JERONIMO, P. M. C. *et al.* Evolutionary deletions within the SARS-CoV-2 genome as signature trends for virus fitness and adaptation. **Journal of Virology**, v. 98, n. 1, 23 jan. 2024.

JONES, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.

JUUL, S. *et al.* Validation and advantages of using novel RT-qPCR melting curve analysis assays for the identification of SARS-CoV-2 variants. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 13069, 29 jul. 2022.

KARCIOGLU, O. (ED.). **New COVID-19 Variants - Diagnosis and Management in the Post-Pandemic Era**. [s.l.] IntechOpen, 2024.

KOSTRZEWSKI, J. Epidemiology: A guide to teaching methods. [pesquisa.bvsalud.org](http://pesquisa.bvsalud.org), 1973.

KRAMMER, F. *et al.* Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 3, 28 jun. 2018.

LEUNG, N. H. L. **Transmissibility and transmission of respiratory viruses***Nature Reviews Microbiology*Nature Research, , 1 ago. 2021.

LI, Y. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10340, p. 2047–2064, maio 2022.

LIMAYE, S. *et al.* Circulation and evolution of SARS-CoV-2 in India: let the data speak. [mdpi.com](http://mdpi.com) S Limaye, SM Kasibhatla, M Ramtirthkar, M Kinikar, MM Kale, U Kulkarni-Kale*Viruses*, 2021•[mdpi.com](http://mdpi.com), 2021.

MA, K. C. *et al.* Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants: Circulation of Omicron XBB and JN.1 Lineages — United States, May 2023–September 2024. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 73, n. 42, p. 938–945, 24 out. 2024.

MARKOV, P. V. *et al.* **The evolution of SARS-CoV-2** *Nature Reviews Microbiology* Nature Research, , 1 jun. 2023.

MCMILLEN, T. *et al.* The spike gene target failure (SGTF) genomic signature is highly accurate for the identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 variants. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18968, 8 nov. 2022.

MEIJERS, M. *et al.* Population immunity predicts evolutionary trajectories of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 186, n. 23, p. 5151- 5164.e13, nov. 2023.

MEYEROWITZ, E. A. *et al.* **Transmission of sars-cov-2: A review of viral, host, and environmental factors** *Annals of Internal Medicine* American College of Physicians, , 1 jan. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Entenda as diferenças entre RT-PCR, antígeno e autoteste.**

\_\_\_\_. **Guia de Vigilância Integrada da Covid-19, Influenza e Outros Vírus Respiratórios de Importância em Saúde Pública.**

\_\_\_\_. **Diagnosticar para Cuidar - Estratégia Nacional de Vigilância Epidemiológica e Laboratorial.**

MORSE, S. S. *et al.* **Zoonoses 3 Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis** *www.thelancet.com*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)>.

MOTA, E.; TEIXEIRA, M. G. Vigilância Epidemiológica e a pandemia da Covid-19 no Brasil: elementos para entender a resposta brasileira e a explosão de casos e mortes. **Saúde em Debate**, v. 44, n. spe4, p. 130–145, 2020.

MUSTAFA, M.; MAKHAWI, A. What Learned from Omicron Sub-Variants BQ.1 and BQ.1.1. 24 out. 2022.

NORONHA, K. V. M. DE S. *et al.* Pandemia por COVID-19 no Brasil: análise da demanda e da oferta de leitos hospitalares e equipamentos de ventilação assistida segundo diferentes cenários. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 6, 2020.

NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e–663, 15 jun. 2000.

OPAS. Orientação para vigilância de variantes do SARS-CoV-2: orientação provisória. p. 1, 9 ago. 2021.

OPAS, O. P.-A. DA S. **Sequenciamento genômico do SARS-CoV-2. Guia de implementação para máximo impacto na saúde pública. 8 de janeiro de 2021.** [s.l.] Pan American Health Organization, 2021.

OU, C.-Y. *et al.* Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. **Science**, v. 256, n. 5060, p. 1165–1171, 22 maio 1992.

PARRA-LUCARES, A. *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 Variants in the World: How Could This Happen? **Life**, v. 12, n. 2, p. 194, 28 jan. 2022.

PEREIRA. Epidemiologia: teoria e prática. **pesquisa.bvsalud.org**MG **Pereira Epidemiologia: teoria e prática, 2001**•**pesquisa.bvsalud.org**, [s.d.].

PETERSEN, E. *et al.* **Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics****The Lancet Infectious Diseases**Lancet Publishing Group, , 1 set. 2020.

PINKHOVER, N. P. *et al.* **SARS-CoV-2 Variant Surveillance Using Tandem Targeted RT-PCR-based Genotyping Assays and Whole Genome Sequencing**, 1 fev. 2022.

PIRET, J.; BOIVIN, G. **Pandemics Throughout History****Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., , 15 jan. 2021.

PRYOR, R. J.; WITTEWER, C. T. Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis. *Em: Clinical Applications of PCR. Methods in Molecular Biology.* Humana Press ed. New Jersey: Humana Press, 2006. v. 336p. 19–32.

RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 1 nov. 2020.

RANDALL, K. *et al.* **How did we get here: What are droplets and aerosols and how far do they go? A historical perspective on the transmission of respiratory infectious diseases****Interface Focus**Royal Society Publishing, , 12 out. 2021.

REDE GENÔMICA, F. Lineages are defined as entities/organisms that share a common ancestor and show similar mutations. 2022.

REDONDO, N. *et al.* **SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns****Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 7 jul. 2021a.

\_\_\_\_\_. **SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns****Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 7 jul. 2021b.

RICARDO VALVERDE. **Fiocruz Genomic Network identifies the appearance of a new Omicron variant.**

RISTORI, M. V. *et al.* **Emerging Microorganisms and Infectious Diseases: One Health Approach for Health Shared Vision****Genes**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2024.

ROBISHAW, J. D. *et al.* **Genomic surveillance to combat COVID-19: challenges and opportunities****The Lancet Microbe**Elsevier Ltd, , 1 set. 2021.

ROUX, A. V. D. Social Epidemiology: Past, Present, and Future. **Annual Review of Public Health** Downloaded from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org). Guest, v. 38, p. 42, 2025.

SCHOEMAN, D.; GORDON, B.; FIELDING, B. C. Coronaviruses. *Em: Encyclopedia of Infection and Immunity*. [s.l.] Elsevier, 2022. v. 2p. 241–258.

SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. **Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention****Viruses**MDPI AG, , 1 fev. 2021.



SIBAI, M. *et al.* Development and evaluation of an RT-qPCR for the identification of the SARS-CoV-2 Omicron variant. **Journal of Clinical Virology**, v. 148, p. 105101, mar. 2022.

SILVA, A. *et al.* **Nota Técnica sobre Vigilância Genômica do SARS-CoV-2 no Ceará (Rastreamento e monitoramento da circulação de variantes de preocupação)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://viralflow.github.io/>>.

SILVA, S. J. R. DA *et al.* **Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned** **ACS Infectious Diseases** American Chemical Society, , 9 set. 2022.

SIMMONDS, P. *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 11, p. 2391–2399, 1993.

SIMONSEN, L. **The global impact of influenza on morbidity and mortality**. [s.l: s.n.].

SINGH, B. B.; GAJADHAR, A. A. Role of India's wildlife in the emergence and re-emergence of zoonotic pathogens, risk factors and public health implications. **Acta Tropica**, v. 138, p. 67–77, 2014.

SPICUZZA, L. *et al.* An update on lateral flow immunoassay for the rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies. **AIMS Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 375–401, 2023.

TAMURA, T. *et al.* Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 2800, 16 maio 2023.

TAO, Y. *et al.* Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 5–6, p. 2207–2218, 26 mar. 2022.

TAUBENBERGER, J. K.; KASH, J. C. **Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation** **Cell Host and Microbe** Cell Press, , 17 jun. 2010.

TEGALLY, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, 15 abr. 2021.

\_\_\_\_\_. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. **Nature Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1785–1790, 27 set. 2022.

TIAN, D. *et al.* The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 30 nov. 2021.

\_\_\_\_\_. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 6, p. 2376–2383, 11 jun. 2022.

TORRES MUNGUÍA, J. A. *et al.* A global dataset of pandemic- and epidemic-prone disease outbreaks. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022.

TOSTA, S. *et al.* Global SARS-CoV-2 genomic surveillance: What we have learned (so far). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 108, p. 105405, mar. 2023.

UMUNNAKWE, C. N. *et al.* Evaluation of a commercial SARS-CoV-2 multiplex PCR genotyping assay for variant identification in resource-scarce settings. **PLoS ONE**, v. 17, n. 6 June, 1 jun. 2022.

VIDYA, N. *et al.* S Gene Target Failure (SGTF) in Commercial Multiplex RT-PCR assay as indicator to detect SARS-CoV-2 VOC B.1.1.7 lineage in Tamil Nadu, India, 16 dez. 2021.

VOGELS, C. B. F. *et al.* Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. **PLoS Biology**, v. 19, n. 5 May, 1 maio 2021.

VORA, N. M. *et al.* Interventions to Reduce Risk for Pathogen Spillover and Early Disease Spread to Prevent Outbreaks, Epidemics, and Pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. E1–E9, 1 mar. 2023.

WANG, C. C. *et al.* Airborne transmission of respiratory viruses. **Science**, American Association for the Advancement of Science, , 27 ago. 2021.

WANG, HANNAH *et al.* Multiplex SARS-CoV-2 Genotyping Reverse Transcriptase PCR for Population-Level Variant Screening and Epidemiologic Surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 8, 19 jul. 2021.

WANG, HUANYU *et al.* Mutation-Specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike L452R Mutation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 8, 19 jul. 2021.

WISSING, M. H. *et al.* **Virus–Host Cell Interplay during Hepatitis E Virus Infection****Trends in Microbiology**Elsevier Ltd, , 1 abr. 2021.

WRIGHT, K. E. *et al.* **Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Clinical Samples by PCR****JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**. [s.l: s.n.].

WU, J. *et al.* SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1813, 22 mar. 2021.

YEUNG, P. S.-W. *et al.* Evaluation of a Rapid and Accessible Reverse Transcription-Quantitative PCR Approach for SARS-CoV-2 Variant of Concern Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 5, 18 maio 2022.

ZAAS, A. K. *et al.* **A Host-Based RT-PCR Gene Expression Signature to Identify Acute Respiratory Viral Infection**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

ZHANG, H. *et al.* Comparison of High-Resolution Melting Analysis, Sanger Sequencing and ARMS for KRAS Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical Laboratory**, v. 61, n. 03+04/2015, 2015.

ZHANG, J. *et al.* **Structure of SARS-CoV-2 spike protein****Current Opinion in Virology**Elsevier B.V., , 1 out. 2021.

ZHANG, L. *et al.* Comparison of High-Resolution Melting Analysis, TaqMan Allelic Discrimination Assay, and Sanger Sequencing for Clopidogrel Efficacy Genotyping in Routine Molecular Diagnostics. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 5, p. 600–606, set. 2013.

ZHANG, S. *et al.* Evolutionary trajectory and characteristics of Mpox virus in 2023 based on a large-scale genomic surveillance in Shenzhen, China. **Nature Communications** , v. 15, n. 1, 1 dez. 2024.

ZHU, Z.; FODOR, E.; KEOWN, J. R. **A structural understanding of influenza virus genome replication** *Trends in Microbiology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2023.

ZIEGLER, T. *et al.* **Global Influenza Surveillance and Response System: 70 years of responding to the expected and preparing for the unexpected** *The Lancet* Elsevier B.V., , 24 set. 2022.

ZIMERMAN, R. A. *et al.* Comparative Genomics and Characterization of SARS-CoV-2 P.1 (Gamma) Variant of Concern From Amazonas, Brazil. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 15 fev. 2022.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise Epidemiológica e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. **e-SUS Notifica: Manual de Instruções**. Brasília, DF: MS, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/e-sus-notifica-manual-de-instrucoes/view>. Acesso em: 31 jan. 2025.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **IntegraSUS: plataforma de transparência da gestão pública de saúde do Ceará**. Fortaleza: Secretaria da Saúde, 2025. Disponível em: <https://integrasus.saude.ce.gov.br/>. Acesso em: 22 fev. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica n.º 14/2022 - CGGRIPE/DEIDT/SVS/MS. **Atualização da Nota Técnica n.º 10/2022 - CGGRIPE/DEIDT/SVS/MS, que trata sobre atualizações das recomendações e orientações sobre a covid-19 no âmbito da vigilância epidemiológica**. Brasília, DF: MS, 2022f. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/notas-tecnicas/2022/sei\\_ms-0030035449-nt-14-cggripe-atualizacoes-ve-covid-19.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/notas-tecnicas/2022/sei_ms-0030035449-nt-14-cggripe-atualizacoes-ve-covid-19.pdf/view). Acesso em: 31 jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica: Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela**

**Doença pelo Coronavírus - Covid-19 (versão 4).** Publicado em 20 de janeiro de 2022. Brasília, DF: MS, 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/view>. Acesso em: 31 jan. 2025.

**CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** COVID-19 Testing: What You Need to Know. Atlanta, USA: CDC, 2023c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/covid/testing/>. Acesso em: 31 jan. 2025.

CDC. (2009). CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A (H1N1). **Centers for Disease Control and Prevention.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de Vigilância Genômica do SARS-CoV-2: uma abordagem epidemiológica e laboratorial.** Brasília, DF: MS, 2023h. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/comunicacao/guia-de-vigilancia-genomica-do-sars-cov-2-uma-abordagem-epidemiologica-elaboratorial/view>. Acesso em: 31 jan. 2025.