

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução
Programa de Pós-Graduação em Genética

Joice do Prado Silva

**DINÂMICA DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 NO BRASIL E SEU IMPACTO NAS
TAXAS DE TRANSMISSÃO E SEVERIDADE DA COVID-19**

Belo Horizonte

2023

Joice do Prado Silva

**DINÂMICA DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 NO BRASIL E SEU IMPACTO NAS TAXAS
DE TRANSMISSÃO E SEVERIDADE DA COVID-19**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador (a): Dr. Renato Santana de Aguiar

Co-orientador (a): Dra. Danielle Alves Gomes Zauli

Belo Horizonte

2023

043

Silva, Joice do Prado.

Dinâmica de variantes de Sars-Cov-2 no Brasil e seu impacto nas taxas de transmissão e severidade da Covid-19 [manuscrito] / Joice do Prado Silva. – 2023.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador (a): Dr. Renato Santana de Aguiar. Co-orientador (a): Dra. Danielle Alves Gomes Zauli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. COVID-19. 3. SARS-CoV-2. 4. Genoma. 5. Gravidade do Paciente. I. Aguiar, Renato Santana de. II. Zauli, Danielle Alves Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	334/2023 entrada
Joice do Prado Silva	1º/2021 CPF: 124.940.776-13

Às nove horas do dia **17 de março de 2023**, reuniu-se, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**DINÂMICA DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 NO BRASIL E SEU IMPACTO NAS TAXAS DE TRANSMISSÃO E SEVERIDADE DA COVID-19**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Renato Santana de Aguiar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Renato Santana de Aguiar	UFMG	000.086.336-06	APROVADA
Fernando Rosado Spilki	Universidade Feevale	900.034.700-91	APROVADA
Francisco Pereira Lobo	UFMG	012.273.736-94	APROVADA
Danielle Alves Gomes Zauli	Instituto Hermes Pardini	031.966.536-41	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 17 de março de 2023.

Renato Santana de Aguiar

Fernando Rosado Spilki

Francisco Pereira Lobo

Danielle Alves Gomes Zauli



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 17/03/2023, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Alves Gomes Zauli, Usuário Externo**, em 17/03/2023, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Rosado Spilki, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo, Professor do Magistério Superior**, em 23/03/2023, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2150458** e o código CRC **FE23C9F1**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"DINÂMICA DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 NO BRASIL E SEU IMPACTO NAS TAXAS DE TRANSMISSÃO E SEVERIDADE DA COVID-19"

Joice do Prado Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Renato Santana de Aguiar
UFMG

Fernando Rosado Spilki
Universidade Feevale

Francisco Pereira Lobo
UFMG

Belo Horizonte, 17 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 17/03/2023, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Alves Gomes Zauli, Usuário Externo**, em 17/03/2023, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Rosado Spilki, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Pereira Lobo, Professor do Magistério Superior**, em 23/03/2023, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2150718** e o código CRC **31A447F3**.

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, de estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de um sonho.

Primeiramente, agradeço aos meus pais Graça e Jones, por me proporcionarem um ambiente de criatividade e fertilidade mental em meio às dificuldades da vida. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço e todos os obstáculos que passaram para que eu pudesse chegar aqui e, principalmente, pelo amor incondicional.

À minha família, em especial à minha tia Cida. Obrigada por acreditarem no meu sonho e sempre me motivarem a seguir em frente. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Santana de Aguiar. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, pela pessoa e profissional que é. Sou eternamente grata por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses anos. Sem a sua orientação, apoio e confiança nada disso seria possível.

À minha co-orientadora, Dra. Danielle Alves Gomes Zauli, minha inspiração. Agradeço pelo apoio incondicional e por todos os ensinamentos que transcendem os limites do Mestrado. Obrigada pela sua amizade e pela confiança depositada em mim. Serei sempre grata por toda contribuição para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Grupo Pardini, em especial ao setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço por todos os recursos disponibilizados para a conclusão desta pós-graduação. Obrigada por fazer parte da minha trajetória desde a época do meu estágio, até agora como pesquisadora. Trabalhar com vocês é a realização de um antigo sonho!

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Aline, Cris, Luige e Fred, que desde o início estavam envolvidos no projeto e contribuíram enormemente na minha formação. Obrigada pelo companheirismo, pelo trabalho em equipe e amizade construída ao longo destes anos. Tenho aprendido muito com vocês!

Por fim, mas não menos importante, à Deus. Agradeço por estar sempre comigo, me guiando, iluminando cada passo e me abençoando. Obrigada por me dar fé e força necessária, sem nunca desistir. Obrigada por todas às pessoas que o Senhor colocou no meu caminho durante esta trajetória e por permitir uma experiência leve.

“Coloque Deus em todos os seus planos e Ele se encarregará de fazer tudo dar certo.”

Provérbios 16:3

RESUMO

A pandemia de COVID-19 causou impactos imensuráveis na saúde e no sistema socioeconômico em todo o mundo. A identificação e caracterização de variantes de preocupação (VOCs) e variantes de interesse (VOIs) de SARS-CoV-2 são fundamentais para compreender a dinâmica do vírus e sua implicação nas taxas de transmissão e severidade dos casos de COVID-19. Nesse sentido, o Observatório de Vigilância Genômica de COVID-19 (OviGen-BR) foi idealizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Minas Gerais (LBI-UFMG), Grupo Pardini, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), Ministério de Ciência e Tecnologia e Rede Corona-Ômica MCTI (Rede Vírus-MCTI) em caráter nacional com o objetivo de monitorar a dinâmica das variantes de SARS-CoV-2, principalmente em momentos de mudanças no cenário epidemiológico, com aumento no número médio de casos de COVID-19 no país. Desta forma, nesta dissertação realizamos a vigilância genômica e epidemiológica de SARS-CoV-2 em dois diferentes cenários de aumento de casos de COVID-19. A primeira etapa contou com 7.549 amostras investigadas para o diagnóstico molecular (RT-qPCR) de COVID-19 oriundas de 15 capitais brasileiras (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Campo Grande, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Alegre, Porto Velho, Rio de Janeiro, Salvador e São Paulo) no período de abril a outubro de 2021, correspondente à segunda onda de COVID-19. A segunda etapa, continuação do projeto, contou com 291.571 amostras investigadas para o diagnóstico molecular de COVID-19 proveniente de 12 capitais brasileiras (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Velho, Rio de Janeiro e São Paulo) no período de agosto de 2021 a março de 2022, correspondente à terceira onda de COVID-19. As amostras foram genotipadas para identificação das mutações definidoras das variantes circulantes de SARS-CoV-2, além do sequenciamento do genoma completo. Para avaliar o potencial de transmissibilidade das VOCs circulantes, os valores de *cycle threshold* (Ct), que se correlacionam inversamente proporcional à carga viral, foram avaliados no período de dominância de cada variante. Os resultados obtidos demonstram que a VOC Delta foi detectada pela primeira vez em junho/2021 e levou dezesseis semanas para substituir a Gama com introdução a partir da região sudestes do país. Com a emergência da VOC Ômicron, a VOC Delta foi substituída em apenas três semanas, mostrando o seu poder de transmissão correspondente ao maior pico de COVID-19 desde o início da pandemia no Brasil. Em adição, a VOC Delta demonstrou uma maior taxa de transmissão comparado a VOC Gama, no entanto, inferiores às taxas de transmissão da VOC Ômicron. Embora a VOC Ômicron tenha apresentado maiores índices em relação ao número de casos, ela não foi associada ao aumento de internação e severidade da COVID-19 mostrando a importância dos

programas de vacinação na prevenção dos casos graves de COVID-19. Este trabalho reforça a importância dos programas de vigilância em nível nacional.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; variantes; vigilância genômica; transmissão; severidade.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has had immeasurable impacts on health and the socioeconomic system worldwide. The identification and characterization of variants of concern (VOCs) and variants of interest (VOIs) of SARS-CoV-2 are fundamental to understanding the dynamics of the virus and its implication in transmission rates and severity of COVID-19 cases. In this sense, the COVID-19 Genomic Surveillance Observatory (OviGen-BR) was designed in collaboration with the Laboratory of Integrative Biology of the Federal University of Minas Gerais (LBI-UFMG), Pardini Group, Ezequiel Dias Foundation (FUNED), Secretary of State for Health of Minas Gerais (SES-MG), City Hall of Belo Horizonte (PBH), Ministry of Science and Technology and, Corona-Ômica Network MCTI (Virus Network-MCTI) on a national basis to monitor the dynamics of SARS-CoV-2 variants, mainly in times of changes in the epidemiological scenario with an increase in the average number of COVID-19 cases in the country. Thus, in this dissertation, we performed genomic and epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 in two different scenarios of increasing cases of COVID-19. The first stage was carried out with 7,549 samples investigated for the COVID-19 molecular diagnosis (RT-qPCR) from 15 Brazilian capitals (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Campo Grande, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Alegre, Porto Velho, Rio de Janeiro, Salvador, and São Paulo) from April to October 2021, corresponding to the second wave of COVID-19. The second stage, a continuation of the project, was carried out with 291,571 samples investigated for the COVID-19 molecular diagnosis from 12 Brazilian capitals (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Velho, Rio de Janeiro, and São Paulo) from August 2021 to March 2022, corresponding to the third wave of COVID-19. The samples were genotyped to identify the defining mutations of circulating SARS-CoV-2 variants, in addition to whole genome sequencing. To assess the transmissibility potential of circulating VOCs, the cycle threshold (Ct) values, which correlate inversely proportionally to the viral load, were evaluated in the period of dominance of each variant. The results obtained demonstrate that the Delta VOC was detected for the first time in June/2021 and it took sixteen weeks to replace the Gamma with the introduction from the Southeast region of the country. With the emergence of Omicron VOC, the Delta VOC was replaced in just three weeks, showing its transmission power corresponding to the biggest peak of COVID-19 since the beginning of the pandemic in Brazil. In addition, Delta VOC demonstrated a higher transmission rate compared to Gamma VOC, however, lower than the transmission rates of Omicron VOC. Although VOC Omicron had higher rates concerning the number of cases, it was not associated with increased hospitalization and severity of COVID-19, showing the importance of vaccination programs in preventing severe cases of COVID-19. This work reinforces the importance of surveillance programs at the national level.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; variants; genomic surveillance; transmissibility; severity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética dos coronavírus humanos.....	18
Figura 2: Linha do tempo indicando os períodos de relevância na descoberta dos coronavírus humanos.....	19
Figura 3: Representação esquemática do genoma e partícula viral de SARS-CoV-2.	20
Figura 4: Representação esquemática do ciclo replicativo de SARS-CoV-2.....	23
Figura 5: Total de casos confirmados por milhão de habitantes.....	25
Figura 1 - Capítulo I: Schematic representation of study sampling.....	33
Figura 2 - Capítulo I: Most prevalent severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants detected in Brazil by genotyping analysis.....	34
Figura 3 - Capítulo I: Maximum likelihood inference tree to confirm lineage classification using a reference dataset.....	35
Figura 4 - Capítulo I: Comparative analysis of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) cycle threshold (Ct) values between Gamma and Delta dominated periods.....	36
Figura 5 - Capítulo I: Symptoms/clinical tests occurrence in Delta (case) and Gamma (control) groups in Coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients from six different capitals of Brazil.....	37
Figura 1 - Capítulo II: Descriptive analysis of the study design.....	48
Figura 2 - Capítulo II: Monitoring of Delta and Omicron VOCs in Brazil.....	49
Figura 3 - Capítulo II: Phylogenetic reconstruction of SARS-CoV-2 during the fourth wave of SAR-CoV-2 in Brazil.....	50
Figura 4 - Capítulo II: Comparative analysis of RT-qPCR Ct values between Delta and Omicron SARS-CoV-2 VOCs dominance periods.....	51
Figura 5 - Capítulo II: Forest Plot of effect sizes measured between Omicron (case) and Delta (control) groups in COVID-19 patients.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de 16 proteínas não estruturais (nsps) de SARS-CoV-2, sua localização no genoma e respectivas funções	21
Tabela 2: Exemplos de variantes de SARS-CoV-2 classificadas como VOCs ou VOIs pela OMS.	28

ABREVIATURAS

2019-nCov - 2019 *novel* Coronavirus

69del - Deleção dos aminoácidos 69 e 70 no gene S

ACE2 - *Angiotensin-converting enzyme 2*

CD - Domínio conector

CH - Hélice central

COVID-19 - Coronavirus *disease* 2019

CT - Cauda citoplasmática

Ct – *Cycle Threshold*

CTD - Domínio C-terminal

DMVs - Vesículas de membrana dupla

E - Envelope

ER – Retículo Endoplasmático

ERGIC - Compartimento intermediário ER-Golgi

FMV - Variantes monitoradas anteriormente

FP - Peptídeo de fusão

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HCoV-229E - *Human Coronavirus - 229E*

HCoV-HKU1 - *Human Coronavirus – HKU1*

HCoV-NL63 - *Human Coronavirus – NL63*

HCoV-OC43 - *Human Coronavirus – OC43*

HR1 - *Repetição heptad 1*

HR2 - *Repetição heptad 2*

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

kDa - Kilodalton

LBI-UFMG - Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Minas Gerais

M - Membrana

MERS-CoV - *Coronavirus Middle east respiratory syndrome*

N - Nucleocapsídeo

NGS - Sequenciamento massivo de última geração

NPIs - Intervenções Não Farmacêuticas

nsps – Proteínas não estruturais

NTD - Domínio N-terminal

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF1a - *Open Reading Frame 1a*

ORF1b - *Open Reading Frame 1b*

OVIGen - Observatório de Vigilância Genômica de SARS-CoV-2

pp1a – Poliproteína 1a

pp1ab - Poliproteína 1ab

PBH - Prefeitura de Belo Horizonte

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (quantitativa)

R0 - Número básico de reprodução

RaTG13 - *Rhinolophus affinis* Tongguan 2013

RBD - *Receptor-binding domain*

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

Rede Vírus-MCTI - Ministério de Ciência e Tecnologia e Rede Corona-Ômica

RNA - Ácido ribonucleico

Rt - Número de reprodução específico

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa

S – *Spike*

S1 – Subunidade 1 da proteína S

S2 - Subunidade 2 da proteína S

SARS - *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SARS-CoV - *Coronavirus Severe acute respiratory syndrome*

SARS-CoV-2 - *Coronavirus Severe acute respiratory syndrome 2*

SES-MG - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais

sg-mRNAs - RNAs subgenômico mensageiro

sgRNAs - RNAs subgenômico

SGTF - *Spike gene target failure*

TM - Domínio transmembranar

TMPRSS2 - Serino protease transmembrana tipo II

VOC - Variante de preocupação

VOI - Variante de interesse

VUM - Variante sob monitoramento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Coronavírus e SARS-CoV-2.....	18
1.2. Estrutura e Genoma viral.....	20
1.3. Ciclo Replicativo de SARS-CoV-2.....	22
1.4. Patogenicidade de SARS-CoV-2.....	24
1.5. Pandemia COVID-19.....	24
1.6. Evolução de SARS-CoV-2.....	26
1.7. Vigilância Genômica.....	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivos Gerais.....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
4. CAPÍTULO I – Artigo: Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program	32
5. CAPÍTULO II – Manuscrito: Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil	47
6. CAPÍTULO III – Divulgação de resultados aos órgãos de saúde pública e sociedade	64
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	81
Anexo I – Produção científica relacionadas à tese neste interstício.....	81
Anexo II - Resumos publicados em anais de congressos.....	83
Anexo III – Confirmação de submissão do manuscrito.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Coronavírus e SARS-CoV-2

Os coronavírus são vírus pertencentes à subfamília *Orthocoronavirinae* da família *Coronaviridae* (ordem *Nidovirales*). Os *Orthocoronavirinae* são divididos nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, sendo os dois primeiros os principais responsáveis por infectar mamíferos e, os dois últimos responsáveis principalmente pela infecção em aves (Figura 1)¹. Desde a sua primeira descrição até os dias atuais, sete coronavírus foram descritos como capazes de infectar humanos, são eles: HCoV-229E e HCoV-NL63 (membros do gênero *Alphacoronavirus*), HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV e mais recentemente o SARS-CoV-2 (membros do gênero *Betacoronavirus*)².

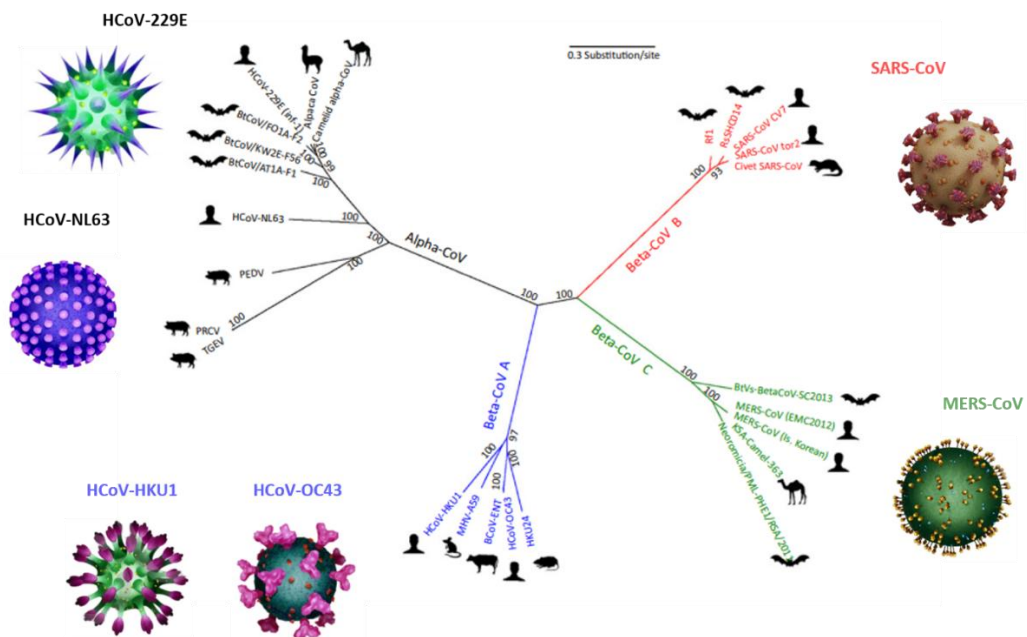


Figura 1: Reconstrução filogenética de genoma completo de coronavírus de mamíferos. Os Alphacoronavirus estão representados pela cor preta onde encontram-se os coronavírus HCoV-229E e HCoV-NL63. Os Betacoronavirus estão subdivididos nos grupos A (azul), B (vermelho) e C (verde), no qual estão inclusos os coronavírus HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV. As ilustrações de animais ao lado de cada linhagem representam os possíveis principais reservatórios de cada vírus (adaptado de Forni D. et al, 2017)².

Os primeiros coronavirus humanos, HCoV-229E e HCoV-OC43, foram descobertos na década de 60 (Figura 2). Estas linhagens foram conhecidas como causadores de doenças leves das vias respiratórias superiores. Adiante, em 2002-2003, os primeiros casos da Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS) causada por SARS-CoV foram relatados na China³. O vírus se espalhou rapidamente para

países da América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia ocasionando a primeira epidemia por coronavírus. Aproximadamente 8000 casos e 800 mortes foram documentados⁴. Neste período, diversas medidas de restrição foram adotadas para diminuir a transmissão humano-para-humano. Em conjunto, iniciativas de rastreamento de vírus por sequenciamento foram empregadas, o que contribuiu para a descoberta dos vírus HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 em 2004 e 2005, respectivamente. Os sintomas causados por esse vírus eram similares a de um resfriado comum. Em 2012, a emergência de MERS-CoV no Oriente Médio causou uma segunda epidemia com mais de 2500 casos documentados e uma taxa de mortalidade de 36%, a maior taxa de uma infecção causada por coronavírus⁵. A epidemia associada a alta taxa de mortalidade causou grande preocupação a nível global visto que o surto poderia se disseminar. No entanto, a epidemia não se intensificou, embora casos esporádicos ocorreram durante um período⁶.

Em dezembro de 2019, diversos casos de pneumonia de origem desconhecida foram relatados na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei na China⁷. Similar aos sintomas provocados por SARS-CoV na epidemia de 2002-2003, esses pacientes apresentavam sintomas como febre, tosse, dispneia e infiltrado inflamatório pulmonar. Em janeiro de 2020, o primeiro genoma completo foi sequenciado através de um isolado viral de amostra de lavado bronco-alveolar de um paciente com pneumonia severa^{7,8}. Deste modo, foi identificado o sétimo coronavírus humano nomeado primeiramente como 2019-nCov e posteriormente como SARS-CoV-2 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)⁹, uma vez que o sequenciamento do genoma completo revelou identidade de sequência de 79,5% com o genoma de SARS-CoV¹⁰.

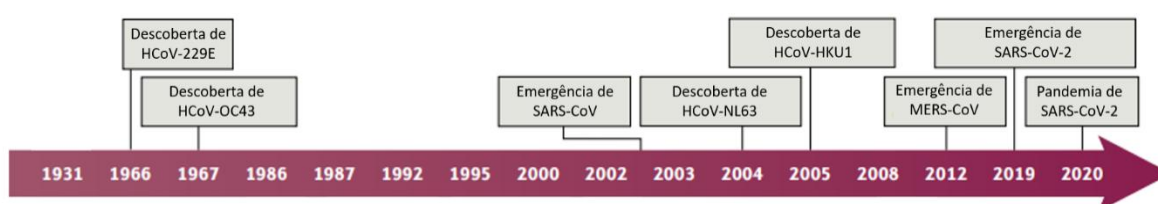


Figura 2: Linha do tempo indicando os períodos de relevância na descoberta dos coronavírus humanos. Os primeiros coronavírus humanos descobertos foram HCoV-229E e HCoV-OC43, em 1966 e 1967, respectivamente. Em 2002, SARS-CoV foi descrito e responsável por uma epidemia com um grande número de infectados. Os vírus HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 foram identificados em sequência nos anos de 2004 e 2005, respectivamente. MERS-CoV foi responsável pela segunda epidemia causada por coronavírus em 2012. Até que, em 2019, SARS-CoV-2 foi descrito e rapidamente causou a pandemia COVID-19 em 2020 (adaptado de V'kovski, P. et al, 2021)⁵.

1.2. Estrutura e Genoma viral

SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de aproximadamente 60 a 140 nm de diâmetro composto por uma camada bilipídica, quatro proteínas estruturais, proteínas do *spike* (S), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), um conjunto de proteínas não estruturais (nsps) e proteínas acessórias¹¹. A proteína S é dividida nas subunidades S1 e S2 na qual é responsável pela mediação da entrada do vírus na célula hospedeira a partir do reconhecimento dos receptores celulares. Por intermediar o contato do vírus com as proteínas receptoras da célula hospedeira, a proteína S se torna um importante alvo imunológico¹². O genoma de SARS-CoV-2, envolto pela proteína N, possui um tamanho médio de 30kb e, com exceção do gene que codifica a proteína S, a identidade nucleotídica é altamente conservada dentre os outros coronavírus (Figura 3)¹¹.

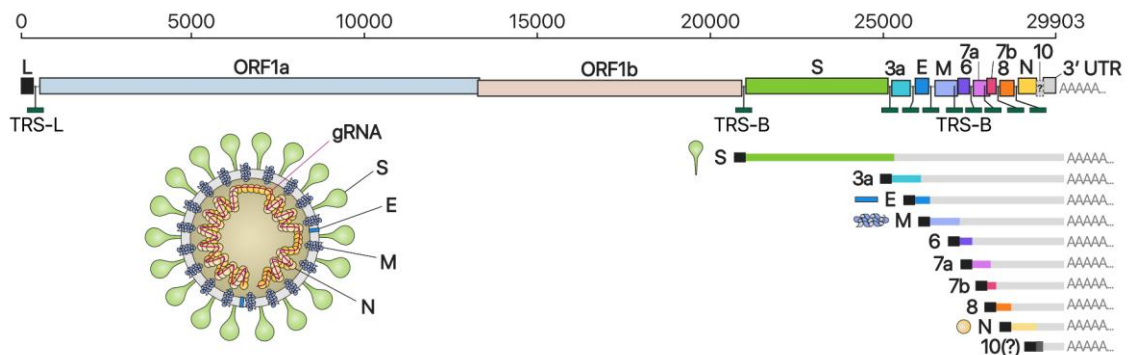


Figura 3: Representação esquemática do genoma e partícula viral de SARS-CoV-2. Os primeiros dois terços do RNA genômico (gRNA) é composto pelos genes ORF1ab, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA, seguido pelos genes que codificarão as proteínas estruturais e acessórias S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N, e 10, na ordem, além das sequências reguladoras de transcrição (TRSs) (adaptado de Kim et al, 2020)¹³.

A primeira região genômica do vírus é composta pelos genes ORF1a e ORF1b que juntamente codificarão 16 nsps (nsp1 a nsp16), incluindo a nsp12 que abriga a atividade da enzima replicase RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Tabela 1). Na sequência, encontram-se os genes responsáveis pela codificação das proteínas estruturais virais, são elas: proteínas S, E, M e N. Em adição, o genoma de SARS-CoV-2 é conhecido por apresentar genes codificadores de pelo menos 6 proteínas acessórias que estão intercaladas entres os genes estruturais (3a, 6, 7a, 7b, 8 e 10). Além de regiões 5' e 3'UTRs não codificadoras, mas que possuem importante sequências e estruturas regulatórias da transcrição, replicação genômica e controle da tradução¹⁴.

Tabela 1: Lista de 16 proteínas não estruturais (nsps) de SARS-CoV-2, sua localização no genoma e respectivas funções^{10,15}.

Gene	nsp	Função
ORF1a	nsp1	Medeia o processamento e a replicação do RNA
	nsp2	Modula a via de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira
	nsp3	Separação de proteínas traduzidas
	nsp4	Contém domínio transmembranar 2 (TM2) e medeia a interação com membranas celulares
	nsp5	Participa do processamento de poliproteínas durante a replicação viral
	nsp6	Domínio transmembranar que restringe a expressão do autofagossomo
	nsp7	Estabiliza a nsp8 pela formação de um complexo
	nsp8	Forma complexo com a nsp7 e catalisa a síntese de iniciadores de RNA
	nsp9	Proteína de ligação à ácidos nucleicos
	nsp10	Crítico para a metilação de cap de RNAs mensageiros virais
ORF1b	nsp11	Função desconhecida
	nsp12	Contém a replicase RdRp para replicação viral
	nsp13	Interage com nsp8 e nsp12 e regula a atividade da helicase
	nsp14	Atividade de exonuclease
	nsp15	Atividade de endoribonuclease
	nsp16	Atividade de 2'-Oribose metiltransferase

As proteínas estruturais desempenham papel fundamental na montagem da partícula viral, mas também estão relacionadas com o ciclo replicativo do vírus. A proteína S (~150 kDa) é uma glicoproteína que medeia a entrada do vírus na célula hospedeira através da sua fusão com a membrana celular hospedeira¹⁶. Ela é subdividida em duas unidades funcionais, incluindo as subunidades S1 e S2. A subunidade S1 é composta pelo domínio de ligação ao receptor (do inglês *receptor-binding domain*, RBD) e pelo domínio N-terminal (NTD). A subunidade S2 é composta pelo peptídeo de fusão (FP), repetição *heptad 1* (HR1), hélice central (CH), domínio conector (CD), repetição *heptad 2* (HR2), domínio transmembranar (TM) e cauda citoplasmática (CT). As funções das subunidades S1 e S2 é realizar a ligação do vírus ao receptor do hospedeiro e fundir as membranas virais e das células hospedeiras, respectivamente¹⁰.

A proteína M (~25–30 kDa) é uma proteína estrutural de 222 aminoácidos, sendo considerada a mais abundante dentre todas as outras proteínas estruturais dos coronavírus¹⁷. Ela possui três domínios trans-membranas e dará conformação ao envelope viral. A proteína M funciona como um dímero e pode se apresentar como duas conformações diferentes, promovendo assim a curvatura da membrana e sua ligação ao nucleocapsídeo. Outras funções da proteína M já foram descritas, tal como a interação com a proteína S necessária para sua retenção no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) durante o ciclo de replicação do vírus¹⁶.

A proteína E (~8–12 kDa) é uma proteína trans-membrana que possui atividade de canal iônico, sendo considerada a de menor tamanho comparado as outras proteínas estruturais. Durante o ciclo replicativo viral, sua expressão é abundante na célula infectada para assim, participar da montagem e liberação do vírus da célula hospedeira. A proteína E possui um papel importante na maturação de SARS-CoV-2¹⁸. Alguns estudos indicaram que os coronavírus sem a presença da proteína E possuíam títulos virais reduzidos, sugerindo então uma maturação incompleta¹⁹.

Por fim, a proteína N (~45-60 kDa) é formada por dois domínios, um NTD e um domínio C-terminal (CTD)²⁰. Ela possui papel essencial de ligação ao ácido nucleico do vírus formando o capsídeo viral. Em adição, a proteína N também está envolvida em algumas etapas do ciclo replicativo como montagem e liberação do vírus da célula hospedeira¹⁶.

1.3. Ciclo Replicativo de SARS-CoV-2

O ciclo replicativo de SARS-CoV-2 envolve basicamente quatro etapas: (i) ligação e entrada do vírus na célula hospedeira, (ii) expressão do complexo da replicase, (iii) replicação e transcrição e (iv) montagem e liberação de partícula viral (Figura 4). A ligação e entrada do vírus ocorre pelo contato do RBD – localizado na subunidade S1 da proteína S – com o receptor de membrana enzima conversora de angiotensina 2 (do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2) da célula hospedeira^{11,21}. Outras proteínas presentes na célula hospedeira como serino protease transmembrana tipo II (TMPRSS2), catepsina L e furina, também são responsáveis pela endocitose do vírus através de sua capacidade de clivarem a subunidade S2 da proteína S com posterior desnudamento – degradação do capsídeo para liberação do RNA viral no citoplasma celular²².

Por apresentar fita de RNA de sentido positivo, o material genético viral é diretamente traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira. As regiões ORF1a e ORF1b são as primeiras proteínas a serem traduzidas que codificarão as poliproteínas pp1a e pp1ab, respectivamente. Essas poliproteínas são responsáveis pela expressão de dezesseis proteínas não estruturais e do complexo da replicase²¹. As replicases darão início a etapa de replicação, direcionando a produção de RNAs subgenômico (sgRNAs) – fitas de RNA de

sentido negativo complementar a fita de RNA de sentido positivo. Os sgRNAs, por sua vez, servirão de molde para a produção de diversas cópias de RNAs subgenômico mensageiro (sg-mRNAs) que serão traduzidos no retículo endoplasmático (ER) para a produção de proteínas virais. As proteínas estruturais seguem para o ERGIC para posterior montagem da partícula viral e liberação da célula infectada por exocitose²³.

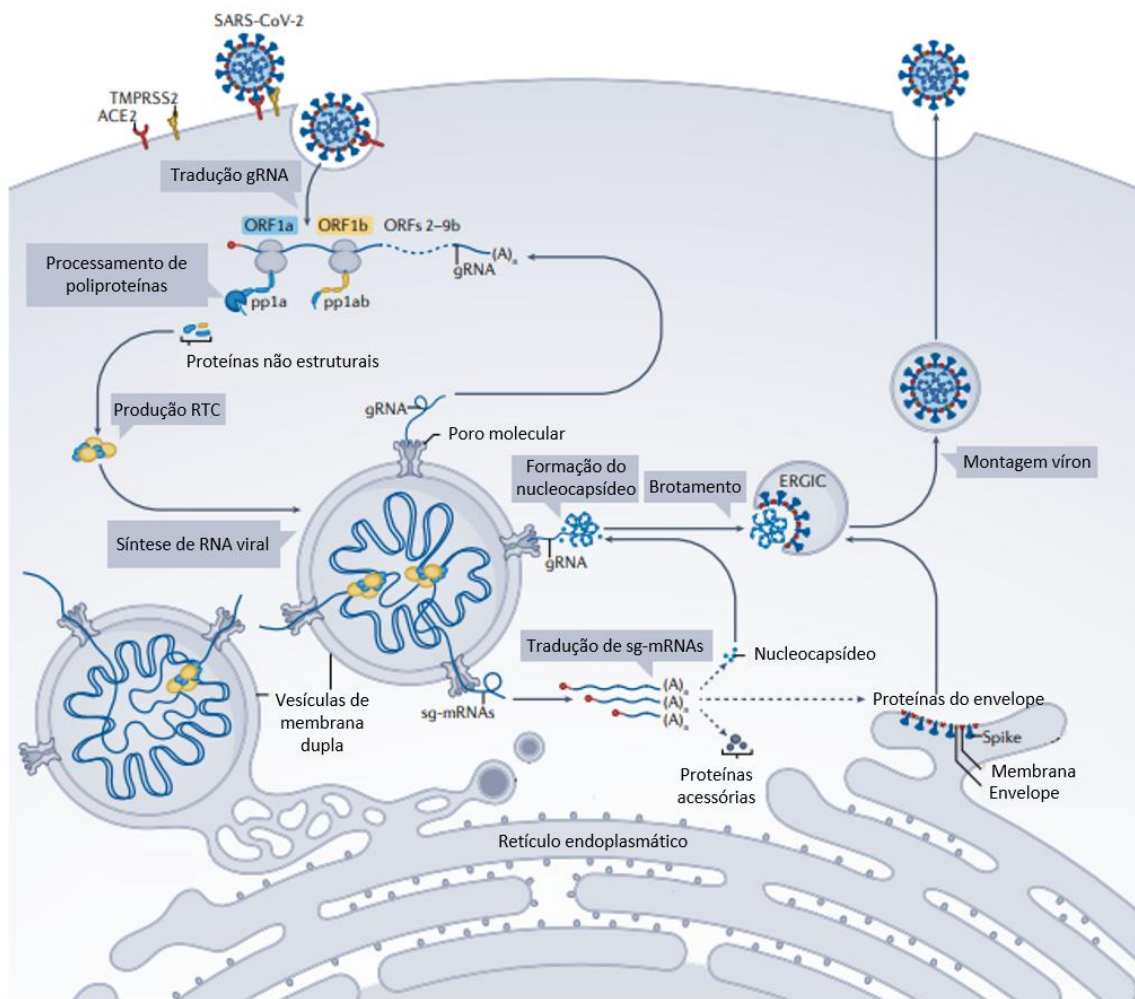


Figura 4: Representação esquemática do ciclo replicativo de SARS-CoV-2. O ciclo se inicia pela ligação da porção RBD da proteína Spike ao seu receptor, ACE2. A entrada eficiente na célula hospedeira também depende de fatores como, a clivagem do sítio S1/S2 pela TMPRSS2, e/ou catepsina e furina. O genoma do vírus é liberado no citoplasma, onde é traduzido para a geração da replicase viral (ORF1ab). As poliproteínas (pp1a e pp1b) são clivadas por uma protease codificada pelo vírus em nsps, incluindo a RdRp. A replicação começa em vesículas de membrana dupla (DMVs) induzidas por vírus derivadas do ER. O genoma de fita positiva serve como molde para RNA de fita negativa de comprimento total e sgRNA. A tradução de sgRNA resulta tanto em proteínas estruturais e acessórias que são inseridas no ERGIC para a montagem do vírion. Finalmente, genomas de RNA de sentido positivo subsequentes são incorporados em vírions recém-sintetizados, que são secretados pela membrana plasmática (adaptado de Kim, D. et al, 2020)¹³.

1.4. Patogenicidade de SARS-CoV-2

A patogenicidade de SARS-CoV-2 está fortemente relacionada ao seu ciclo replicativo, biodisponibilidade de receptores e proteases na célula hospedeira, concentração de carga viral transmissível, sistema imunológico do hospedeiro, entre outros fatores. A transmissão viral de pessoa pra pessoa se dá principalmente pelo contato do vírus com as vias respiratórias superiores por gotículas infectadas que são expelidas durante a fala, espirros, tosse, contato com superfícies contaminadas, entre outras²⁴. Outra possível rota de transmissão é a via fecal-oral, já que há relatos da presença de RNA de SARS-CoV-2 em amostras de fezes de pacientes com doença de coronavírus 2019 (COVID-19)²⁵. O sistema respiratório é o principal alvo de tropismo de SARS-CoV-2, através de células epiteliais alveolares²⁶. Este tropismo é explicado pela alta expressão de ACE2 e TMPRSS2, receptores de entrada do vírus nas células do pulmão. Fatores como, a presença de um sítio único de clivagem para a furina na junção S1 e S2 no RBD, a presença de mutações específicas como a D614G no gene *spike*, e outros, foram descritos como responsáveis por aumentar eventos e eficiência de transmissão entre humanos, indicando uma maior infectividade viral²⁷⁻²⁹.

Ainda que o período de incubação do vírus tenha se modificado ao longo de sua evolução, o período médio ocorre entre 4-5º dia após infecção. Os sintomas relacionados a doença podem variar dependendo de condições como idade, presença ou não de comorbidades e outros. Embora grande parte dos indivíduos infectados sejam assintomáticos, os sintomas típicos da COVID-19 incluem febre, tosse seca, fadiga, dispneia, diarreia, náusea além das síndromes coagulatórias²⁴. Embora ACE2 e TMPRSS2 sejam expressos principalmente em células do pulmão, eles também são expressos abundantemente nos enterócitos (intestino), e, em menores níveis no fígado, coração, tecido adiposo, e outros. Consequentemente, a COVID-19 também pode desencadear doenças extrapulmonares, incluindo sintomas gastrointestinais, lesões cardíacas, renais e hepáticas agudas, e outros³⁰. Os sintomas mais severos geralmente começam aproximadamente uma semana após o início dos sintomas, incluindo insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos e óbito. A taxa geral de mortalidade de casos de COVID-19 é de aproximadamente 1%. Cerca de 3 a 20% de infectados requerem hospitalização, e, em média 10 a 30% podem evoluir para manifestações graves e críticas³¹.

1.5. Pandemia COVID-19

A pandemia de COVID-19 alcançou dados catastróficos no Brasil e em todo o mundo. Em 31 de Dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi reportada sobre a ocorrência de casos de pneumonia de agente etiológico desconhecido na China. Com aproximadamente 20 dias após a identificação do primeiro caso de SARS-CoV-2 em Wuhan, a OMS declarou que o surto do novo coronavírus constituía uma Emergência de Saúde

Pública³². O número de casos confirmados avançou exponencialmente na província de Hubei, em cidades vizinhas e em diferentes continentes. Após o vírus ter sido reportado em 197 países, em 30 de março de 2020 a COVID-19 foi caracterizada como uma pandemia pela OMS³³. Atualmente, as estatísticas indicam mais de 700 milhões de casos confirmados e mais de 6 milhões de mortes por todo mundo, dados substancialmente maiores do que as epidemias causadas pelos demais coronavírus descritos (Figura 5)³⁴.

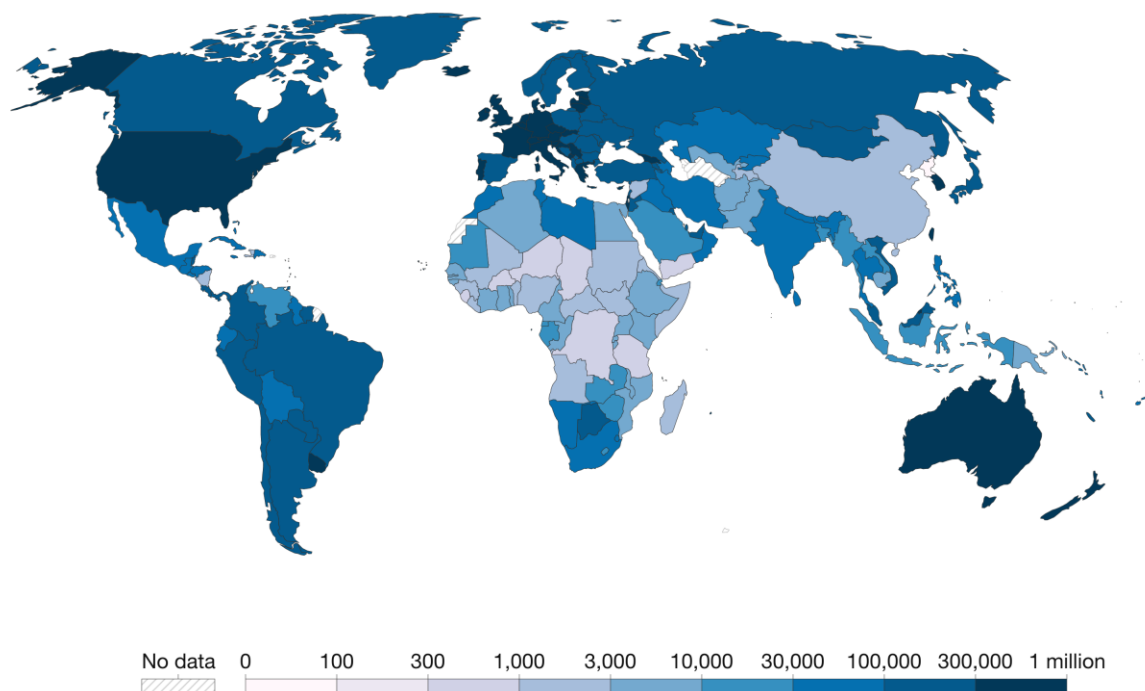


Figura 5: Total de casos confirmados por milhão de habitantes. O mapa inclui dados cumulativos ao redor do mundo até a data 21 de janeiro de 2023. Os casos estão representados em escala de azul com a intensidade da cor associada aos maiores números de casos em determinada região (adaptado de Ritchie et al, 2020)³⁵.

Em 26 de fevereiro de 2020 na cidade de São Paulo, o Brasil teve seu primeiro caso confirmado a partir de um indivíduo com histórico de viagem para Itália, epicentro de infecções por SARS-CoV-2 naquela época, notificado pelo nosso grupo de pesquisa³⁶. Os casos continuaram alcançando grandes proporções gerando impactos não apenas em níveis epidemiológicos mas também sociais, econômicos e políticos³⁷. Estratégias para mitigação da disseminação do vírus como a adoção de Intervenções Não Farmacêuticas (NPIs) foram implementadas. Algumas dessas intervenções incluíam o uso de máscaras, isolamento social, fechamento de comércio e escolas, entre outros³⁸. Em partes, essas estratégias desaceleraram a disseminação viral, mas não foi suficiente para bloquear a transmissão por completo. De acordo com dados recentes, mais de 100 introduções internacionais de vírus foram observadas no Brasil, contribuindo assim para o aumento de alcance da

disseminação³⁶. Outras medidas de combate contra o SARS-CoV-2 foram delineadas. O investimento frequente em pesquisa e tecnologia permitiu com que vacinas contra a COVID-19 fossem produzidas em uma velocidade nunca vista antes. A campanha de vacinação contra a COVID-19 no Brasil teve início em 17 de janeiro de 2021. Inicialmente, a sua distribuição ocorreu de acordo com as estimativas populacionais de cada grupo prioritário (pessoas com mais de 60 anos de idade, imunocomprometidos, profissionais da saúde, por exemplo) até o completo acesso à toda população³⁹. A disponibilidade de mais vacinas, o avanço da vacinação na população, e o reforço de doses resultou consideravelmente na queda dos picos de infecção e no número de mortes contribuindo com grandes efeitos para o combate à doença⁴⁰. Atualmente no Brasil, mais de 399 milhões de doses foram aplicadas, 91,5% de população foram vacinados com a primeira dose e 85,8% foram completamente vacinados (duas doses ou mais)⁴¹.

1.6. Evolução de SARS-CoV-2

Em algumas décadas atrás, os vírus de RNA foram reconhecidos como altamente mutáveis, o que permite grande adaptabilidade e rápida evolução dos genomas de RNA. Diversos fatores, incluindo a taxa de mutação viral, o número de partículas virais geradas durante o ciclo replicativo na célula, os impactos da mutação na dinâmica viral dentro e entre os hospedeiros individuais, e outros, são fatores determinantes para a fixação e acúmulo de mutações no genoma viral. Conseqüentemente, essas condições contribuem para o surgimento e disseminação de novas variantes^{42,43}.

Estudos comparativos do genoma de SARS-CoV-2 demonstraram alta similaridade (aproximadamente 96%) com sequências do vírus SARS-CoV encontrado em morcegos (RaTG13), coletado na província de Yunnan, China⁴⁴. Mutações genômicas ocorrem como um mecanismo natural durante o ciclo replicativo viral, através do processo de replicação e possível recombinação. Com base neste e outros estudos, foi possível estimar que o tempo de divergência entre as duas sequências estaria numa faixa de 18 e 71,4 anos. Sugere-se então que possíveis eventos de recombinação durante a evolução do vírus SARS-CoV contribuíram para a emergência de SARS-CoV-2⁴⁵.

Estudos mais recentes indicaram que a taxa de mutação de SARS-CoV-2 é pelo menos 49–67% mais alta do que as taxas estimadas anteriormente, alcançando um valor de $1,5-1,7 \times 10^{-3}$ substituições/nucleotídeo/ciclo. Essa capacidade de mutação viral é um recurso importante para a manutenção do vírus além de ser um impulsionador para a diversidade de variantes de SARS-CoV-2⁴⁶. A partir deste conhecimento e, para facilitar a identificação entre a comunidade científica, Rambaut e colaboradores, 2020⁴⁷ propuseram um conjunto de regras para a nomenclatura das diferentes linhagens do SARS-CoV-2 que deveriam seguir os seguintes critérios: *“(a) os novos genomas devem exibir um ou mais nucleotídeos de diferença*

dos ramos ancestrais; (b) novos clados devem possuir 5 genomas independentes com cobertura genômica > 95%; (c) os genomas dentro de um novo clado devem exibir pelo menos uma troca nucleotídica conservada; e (d) um valor de bootstrap > 70% para o nó definidor da linhagem". Surgiram-se então duas principais linhagens conhecidas como linhagens A e B. Análises de sequências da linhagem B demonstraram a presença da mutação não sinônima D614G no gene S, na qual conferia maior transmissibilidade viral⁴⁸.

Diante da necessidade de se entender mais sobre a diversidade e evolução de SARS-CoV-2, diversos trabalhos de vigilância genômica foram realizados em todo o mundo. No Brasil, um estudo de 427 genomas coletados no período de 24 de dezembro de 2019 a 30 de abril de 2020, publicado pelo nosso grupo de pesquisa, revelou a presença de três clados: Clado 1, predominante em São Paulo, Clado 2, com sequências de 16 estados do Brasil e Clado 3, predominante no estado Ceará, todos descendentes da linhagem B. Esses dados indicaram que a transmissão comunitária já estava estabelecida no Brasil naquela época³⁶. Posteriormente, sequências do Clado 1 e 2 foram classificadas como linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33 pela nomenclatura Pangolin (ferramenta computacional para classificação de linhagens de SARS-CoV-2), respectivamente⁴⁹.

Com o rápido avanço da pandemia somado ao afrouxamento das medidas de restrição, o Brasil teve sua segunda onda de infecção. Em novembro-dezembro de 2020, Faria e colaboradores⁵⁰, em conjunto com o nosso grupo de pesquisa, a partir de 184 genomas coletados em Manaus caracterizaram uma nova linhagem de SARS-CoV-2 (descendente da linhagem B.1.1.28) nomeada linhagem Gama (P.1). Ainda descrevemos que esta linhagem possui uma taxa de transmissibilidade maior (entre 1,7 e 2,4X), comparado a outras linhagens circulantes na região. Esta análise foi possível devido a análise dos valores de *cycle threshold* (Cts) de amostras positivas para SARS-CoV-2, obtidos por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), que se correlacionam inversamente a carga viral. Em fevereiro de 2021, com um curto intervalo de tempo após sua primeira descrição, a linhagem Gama foi responsável pela infecção de mais de 3 milhões de indivíduos e aproximadamente 30.000 mortes chegando a ser a linhagem majoritária em todos os casos de COVID-19 no Brasil⁵¹.

O aumento nas taxas de transmissão e casos impulsionou a evolução de diferentes variantes ao longo do tempo com o surgimento de diversas mutações no genoma de SARS-CoV-2. Grande parte dessas mutações estão localizadas na proteína S e geralmente conferem uma vantagem adaptativa ao vírus como por exemplo, resistência a anticorpos neutralizantes, aumento de afinidade do vírus pelo receptor celular do hospedeiro e, conseqüentemente maior transmissão viral, entre outros. Como exemplo, as mutações D614G, N501Y, e outras, que foram associadas ao aumento de transmissibilidade^{29,52}.

Portanto, do ponto de vista clínico-epidemiológico, essas mutações desempenham um importante papel no processo infeccioso.

Diante da emergência de novas linhagens que representavam um risco aumentado para a saúde pública global, a OMS adotou classificações de acordo com o conjunto de mutações que cada linhagem possuía e o que elas representavam: Variantes de preocupação (VOC), Variantes de interesse (VOI), Variantes sob monitoramento (VUM) e Variantes monitoradas anteriormente (FMV)⁵³. Os critérios para classificação incluem uma ou mais das seguintes alterações: *“aumento da transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia de COVID-19; ou aumento da virulência ou alteração na apresentação clínica da doença; ou diminuição da eficácia das medidas de saúde pública e sociais ou diagnósticos, vacinas, terapêuticas disponíveis.”*⁵⁴. Foram classificadas no grupo das VOC as variantes Alfa (B.1.1.7), identificada inicialmente no Reino Unido, Beta (B.1.351), descoberta na África do Sul, Gama (B.1.1.28.1), originária do Brasil (Manaus), Delta (B.1.617.2), identificada na Índia, e por último a Ômicron (B.1.1.529) (Tabela 2). No grupo das VOI encontram-se as variantes Eta (B.1.525), detectada em diversos países, Epsilon (B.1.427/B.1.429), identificada nos Estados Unidos da América (Califórnia), Zeta (B.1.1.28.2), originária do Brasil (Rio de Janeiro), Kapa (B.1.617.1) detectada na Índia, Lambda (C.37), originária do Peru, entre outras⁵⁵.

Tabela 2: Exemplos de variantes de SARS-CoV-2 classificadas como VOCs ou VOIs pela OMS⁵³.

Nomenclatura OMS	Nomenclatura Pangolin	Mutações definidoras (Spike)	Região de identificação	Classificação OMS
Alfa	B.1.1.7	69del, N501Y	Reino Unido	VOC
Beta	B.1.351	K417N, E484K, N501Y	África do Sul	VOC
Gama	P.1	K417T, E484K, N501Y	Brasil/Japão	VOC
Delta	B.1.617.2	L452R, P681R	Índia	VOC
Ômicron	B.1.1.529	N501Y, K417N	Diversos	VOC
Eta	B.1.525	69del, E484K	Diversos	VOI
Epsilon	B.1.427/B.1.429	L452R, W152C, S13I	Estados Unidos	VOI
Zeta	P.2	E484K	Brasil	VOI
Kapa	B.1.617.1	L452R, E484Q, P681R	Índia	VOI
Lambda	C.37	L452Q, F490S	Peru	VOI

1.7. Vigilância Genômica

A pandemia da COVID-19 representou um grande desafio em níveis epidemiológicos, socioeconômicos e políticos. A urgência de se obter informações sobre SARS-CoV-2, suas

rotas de transmissão, patogenicidade e severidade, escape vacinal e dinâmicas de substituição das variantes impulsionou a implementação de diversos programas de vigilância genômica do SARS-CoV-2⁵⁶. As iniciativas de vigilância epidemiológica do vírus permitiram o rápido compartilhamento de conhecimento entre diferentes comunidades científicas em todo o mundo e contribuíram inclusive com o estabelecimento de bancos de dados específicos de SARS-CoV-2 de acesso livre como o GISAID que foi extremamente útil no curso da pandemia. Atualmente, o GISAID conta com mais de 14 milhões de sequências de SARS-CoV-2 depositadas por todo o mundo. Dessas, nosso grupo contribuiu com mais de 6.000 sequências oriundas do nosso país⁵⁴.

O sequenciamento massivo de última geração (NGS) tem sido uma ferramenta muito importante na vigilância genômica para a identificação de microrganismos emergentes, bem como para a elucidação dos mecanismos de evolução de SARS-CoV-2 que até então eram pouco conhecidos⁵⁷. Em conjunto com análises filogenéticas, epidemiológicas e de filogeografia esta técnica é capaz de integrar dados genômicos a dados clínicos, de mobilidade e transmissibilidade para modelar padrões de evolução, rotas de transmissão e, conseqüentemente a dispersão geográfica de SARS-CoV-2. Além do NGS, a identificação de mutações definidoras de cada linhagem de SARS-CoV-2 pela Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) acelerou o programa de vigilância genômica de SARS-CoV-2 para laboratórios com mínima estrutura de biologia molecular permitindo uma ampla cobertura na identificação das variantes virais e seu impacto no curso da COVID-19⁵⁸. Nesse sentido, a busca da deleção dos aminoácidos 69 e 70 no gene S (69del) que causa a assinatura de falha no alvo do gene S (do inglês *spike gene target failure*, SGTF) em conjunto com outras mutações definidoras permite a rápida caracterização e diferenciação de variantes circulantes em dado momento⁵⁹. O método de detecção SGTF foi uma das estratégias utilizadas neste estudo. A 69del ocorre na região exata da proteína S avaliada pelo kit TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR (Thermo Fisher). Salienta-se que a falha de amplificação causada pela deleção não inviabiliza o diagnóstico de COVID-19 visto que o kit detecta mais duas outras regiões genômicas do SARS-CoV-2 (N e ORF1ab). Em um outro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, um método rápido de genotipagem por qPCR de baixo custo e sensível usando a tecnologia RhAmp (IDT Technologies) foi desenvolvido para identificar as variantes emergentes circulantes naquela época no Brasil (Alfa, Gama e P.2) pelas mutações K417T, E484K e N501Y⁶⁰. Assim, o monitoramento contínuo de eventuais alterações no genoma viral é fundamental para compreensão do curso da pandemia, bem como para determinar métodos e estratégias de controle para contenção da disseminação viral⁵⁶.

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 deixou marcos históricos em todo o mundo. SARS-CoV-2 foi descoberto inicialmente na China e rapidamente se espalhou por todos os continentes trazendo grandes impactos à saúde pública. O aparecimento de mutações é um evento natural dentro do processo de evolução viral e, conseqüentemente contribui para que novas variantes de SARS-CoV-2 com vantagens adaptativas venham emergindo. Essas vantagens podem estar relacionadas com uma maior transmissibilidade ou capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro. A VOC Gama foi um grande exemplo disso no Brasil e, devido a vigilância genômica, foi possível detectá-la pela primeira vez de maneira rápida e eficiente. Estratégias de vigilância genômica tem sido conduzidas em diversos países e, diante da necessidade da geração de conhecimento a respeito do vírus, o Observatório de Vigilância Genômica de SARS-CoV-2 (OVIGen) foi idealizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Minas Gerais (LBI-UFMG), Grupo Pardini, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), Ministério de Ciência e Tecnologia e Rede Coronavírica MCTI (Rede Vírus-MCTI)⁶¹. Trata-se de uma iniciativa de vigilância genômica com o objetivo de monitorar as variantes do SARS-CoV-2 em âmbito estadual e nacional. A integração dos dados gerados pelo sequenciamento do vírus e dados clínico-epidemiológicos também foi um fator de grande importância e impulsionou o uso de banco de dados únicos em todo o mundo. O GISAID é uma iniciativa científica global criada em 2008 que fornece acesso aberto a dados genômicos de diferentes vírus, incluindo SARS-CoV-2⁵⁴. Atualmente, o Brasil encontra-se no décimo segundo lugar no ranking de países com mais sequências de vírus depositadas, atingindo 212.157 sequências. Enquanto, o primeiro lugar do ranking possui mais de 4,5 milhões de sequências depositadas. Essa discrepância reforça a importância das iniciativas de vigilância genômica e epidemiológica nacional como mecanismos para o monitoramento de variantes (em especial as VOCs), geração de conhecimento técnico e científico para apoiar o desenvolvimento de protocolos diagnósticos, apoio no desenvolvimento de vacinas e melhor entendimento da evolução molecular e os padrões epidemiológicos do SARS-CoV-2. Dessa forma, a contínua e ampla vigilância genômica viral é importante para auxiliar as políticas de saúde pública nas medidas eficazes de contenção da disseminação viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estabelecer um programa de Vigilância Genômica de SARS-CoV-2 (OviGen-BR) em escala nacional na elucidação da dinâmica das variantes virais e seus impactos na transmissão e desfechos clínicos da COVID-19.

3.2. Objetivos Específicos

- Implementar um programa de Vigilância Genômica (OVIGen-MG) em escala estadual com a colaboração entre a UFMG, Grupo Pardini, SES-MG, FUNED e PBH.
- Realizar a vigilância genômica de SARS-CoV-2 em escala estadual (OVIGen-MG) e nacional (OVIGen-BR) durante os cenários epidemiológicos de aumento do número de casos e/ou severidade da COVID-19.
- Integrar dados clínicos, epidemiológicos e genômicos virais para entendimento da introdução, transmissão e dispersão do vírus, além da sua relação com a severidade da COVID-19.
- Comunicação aos órgãos de saúde pública e sociedade em geral dos resultados encontrados através do OvigenMG e BR para a tomada de decisões com relação ao controle da transmissão de COVID-19, locais a serem monitorados e possível aumento de casos graves e internações em hospitais referências.

4. CAPÍTULO I – Artigo: Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program

Neste capítulo apresentamos o artigo intitulado “*Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program*” aceito e publicado na revista *Viruses* (fator de impacto: 5,818) que descreve um programa de vigilância genômica realizado 7.549 amostras de 15 diferentes capitais brasileiras (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Campo Grande, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Alegre, Porto Velho, Rio de Janeiro, Salvador e São Paulo) entre abril e outubro de 2021 durante a introdução da variante Delta no país, sua substituição pela variante Gama, avaliação de carga viral e diferenças na apresentação de sintomas.

Contribui ativamente nesse artigo nas seguintes etapas: recrutamento e prospecção das amostras, extração do RNA viral, ensaios de genotipagem por RT-qPCR e sequenciamento do genoma viral, curadoria e análise de dados, além da escrita do artigo.











Revista: Viruses

Fator de Impacto: 5,818

Link de acesso: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/5/847> - doi: 10.3390/v14050847

Article

Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program

Joice P. Silva ¹ , Aline B. de Lima ¹ , Luige B. Alvim ¹ , Frederico S. V. Malta ¹ , Cristiane P. T. B. Mendonça ¹ , Paula L. C. Fonseca ² , Filipe R. R. Moreira ³ , Daniel C. Queiroz ² , Jorge G. G. Ferreira ², Alessandro C. S. Ferreira ¹, Renan P. Souza ² , Renato S. Aguiar ^{2,*}  and Danielle A. G. Zauli ^{1,*}

- ¹ Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; joice.silva@grupopardini.com.br (J.P.S.); alinebrito.lima@grupopardini.com.br (A.B.d.L.); luige.alvim@grupopardini.com.br (L.B.A.); frederico.malta@grupopardini.com.br (F.S.V.M.); cristiane.brito@grupopardini.com.br (C.P.T.B.M.); alessandro.ferreira@grupopardini.com.br (A.C.S.F.)
- ² Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; camargos.paulaluize@gmail.com (P.L.C.F.); dcqbioufmg@gmail.com (D.C.Q.); ferreira_jgg@yahoo.com (J.G.G.F.); renanpedra@gmail.com (R.P.S.)
- ³ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-971, Brazil; filipe.moreira@biologia.ufrj.br
- * Correspondence: santanamt@gmail.com (R.S.A.); danielle.zauli@grupopardini.com.br (D.A.G.Z.)



Citation: Silva, J.P.; de Lima, A.B.; Alvim, L.B.; Malta, F.S.V.; Mendonça, C.P.T.B.; Fonseca, P.L.C.; Moreira, F.R.R.; Queiroz, D.C.; Ferreira, J.G.G.; Ferreira, A.C.S.; et al. Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program. *Viruses* **2022**, *14*, 847. <https://doi.org/10.3390/v14050847>

Academic Editors: Luis Martinez-Sobrido and Fernando Almazan Toral

Received: 3 February 2022
Accepted: 17 March 2022
Published: 20 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has caused immeasurable impacts on the health and socioeconomic system. The real-time identification and characterization of new Variants of Concern (VOCs) are critical to comprehend its emergence and spread worldwide. In this sense, we carried out a national epidemiological surveillance program in Brazil from April to October 2021. Genotyping by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and sequencing were performed to monitor the dynamics and dissemination of VOCs in samples from 15 federative units. Delta VOC was first detected on June 2021 and took sixteen weeks to replace Gamma. To assess the transmissibility potential of Gamma and Delta VOCs, we studied the dynamics of RT-qPCR cycle threshold (Ct) score in the dominance period of each variant. The data suggest that Delta VOC has a higher transmission rate than Gamma VOC. We also compared relevant symptom patterns in individuals infected with both VOCs. The Delta-infected subjects were less likely to have low oxygen saturation or fatigue, altered results on chest computed tomography, and a propensity for altered X-rays. Altogether, we described the replacement of Gamma by Delta, Delta enhanced transmissibility, and differences in symptom presentation.

Keywords: SARS-CoV-2; variants; epidemiologic surveillance; COVID-19; transmission; symptoms

1. Introduction

According to the latest data from the World Health Organization (WHO), there are currently more than 450 million confirmed cases and approximately six million deaths caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), defined as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic [1]. Viruses from the Coronaviridae family, such as SARS-CoV-2, are viruses enveloped that present spicules projected from its surface with the appearance of small crowns, giving the name of Coronavirus. They have large genomes for RNA viruses (26 to 30 kb) which is possible due to the exonuclease activity of Nsp14 protein responsible for proofreading the RNA during replication, which maintains genome stability and a mutation rate of $\sim 10^{-6}$ mutations/site/cycle [2–4]. Over time, the emergence and fixation of mutations resulted in new SARS-CoV-2 variants leading to adaptation of the new coronavirus to human hosts and vaccination scenario [5,6].

Experience accumulated in preventing and treating COVID-19 through virological, immunological, epidemiological, and clinical investigations have provided relevant knowledge for confronting the pandemic. However, the emergence of new fast-spreading variants of SARS-CoV-2 has caused great concern about drug and vaccine development [7]. Currently, the WHO designated five Variants of Concern (VOCs) [8], including Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), and more recently, Omicron (B.1.1.529) [9]. These variants present mutations in Spike protein, especially in the Receptor Binding Domain (RBD) region, that have been shown to reduce recognition by neutralizing antibodies *in vitro*. Some of these variants have already been associated with relevant clinical-epidemiological changes and a major impact on global public health, such as increased viral transmissibility and virulence [6,10]. In this sense, identifying and characterizing emerging variants that may threaten public health constitute a critical piece of epidemiological surveillance.

Epidemiological surveillance comprises the systematic collection, analysis, and interpretation of health data that helps target strategies to combat crises caused by infectious diseases [11,12], such as the COVID-19 pandemic. Thus, SARS-CoV-2 epidemiological surveillance initiatives have enabled rapid knowledge shared between different scientific communities worldwide. These initiatives allowed the establishment of specific SARS-CoV-2 databases [13] that accelerated vaccine development [14]. Several regional initiatives have also emerged in Brazil to collect information associated with the COVID-19 pandemic [10,15–17]. However, due to its enormous territorial extension, a national unified genomic surveillance system is urgent to expand and connect the regional data in real-time. In this context, this work aims to present the results of SARS-CoV-2 variants monitoring in the Brazilian territory to contribute to the national epidemiological surveillance system. Our analysis explored SARS-CoV-2 variants circulating in Brazil, transmissibility potential, and symptomatology from April to October 2021.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

The study was divided into three main topics: (i) Genomic surveillance by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) genotyping analysis and whole-genome sequencing; (ii) transmissibility analysis between Gamma and Delta VOCs by measuring RT-qPCR cycle threshold (Ct) score and; (iii) meta-analysis of the symptomatology dynamics between Gamma and Delta VOCs. The samples were collected from 15 Brazilian capitals: Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Campo Grande, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Alegre, Porto Velho, Rio de Janeiro, Salvador, and São Paulo from April to October 2021. The Research Ethics Committee approved this study (CAAE-33202820.7.1001.5348). The authorization allows access to epidemiological and viral data with exemption to the consent form in samples from regular viral diagnosis.

2.2. Genomic Surveillance by RT-qPCR Genotyping Analysis and Whole-Genome Sequencing

2.2.1. Genotyping Analysis of SARS-CoV-2 Variants by RT-qPCR

Nasopharyngeal swab samples were randomly selected between 20 April and 31 October 2021. RT-qPCR confirmed the SARS-CoV-2 diagnosis in Hermes Pardini Institute, a prominent Brazilian diagnostic company that performs COVID-19 tests across all 27 Brazilian federative units. We included positive samples for SARS-CoV-2 with a Ct \leq 30. The total RNA was extracted by KingFisher Flex System instrument (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) using the MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The genotyping of SARS-CoV-2 was performed using TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) with specific primers and probes targeting the VOCs defining mutations, according to frequencies of variants in the evaluated time. We selected a set of seven non-synonymous viral spike protein mutations: K417T (A22812C), K417N (G22814T), L452R (T22917C), E484K (G23012A), E484Q (G23013C), N501Y (A23063T), and

P681R (C23604G). The assays were performed by real-time quantitative PCR with the iTaq Universal Probes One-Step kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each reaction was performed using 4.5 μ L of RNA, five μ L of iTaq universal probes reaction mix (2 \times), 0.25 μ L of iScript advanced reverse transcriptase, and 0.25 μ L of specific SNP probe (40 \times ; TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel) in a final volume of 10 μ L. The amplification/genotyping reaction followed the cycling conditions: 50 °C for 10 min; 95 °C for 3 min; 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min; 60 °C for 1 min. The results were plotted on moving average graphs using the ggplot2 [18] and zoo [19] packages of the R program (R version 4.1.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Datasets and codes used are available on Supplementary File S1.

2.2.2. SARS-CoV-2 Genome Sequencing

We conducted whole-genome SARS-CoV-2 sequencing in all positive samples with Ct \leq 30 showing an unexpected spike mutation profile on the RT-qPCR genotyping. Viral RNA was amplified by RT-qPCR using the QIAseq SARS-CoV-2 Primer Panel V1 (QIAGEN, Hilden, Germany) and ARTIC V3 multiplex primer set as previously described [16]. The library was constructed using the QIAseq FX DNA Library Prep kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with v3 cartridges (600 cycles) following the manufacturer's instructions. For each sample processing step (cDNA synthesis, viral genome amplification, and library preparation), negative controls were included in each batch of samples. All consensus genome sequences characterized in this study have been deposited on GISAID and are publicly available (Supplementary Table S1).

2.2.3. Viral Genome Assembly

The pipeline for sequencing data processing was performed as previously described [17], which includes: (i) Filtering and trimming reads and adapters using fastp v.0.20.1 [20]; (ii) mapping the sequences with the reference genome (NCBI RefSeq SARS-CoV-2; accession number: NC_045512) with Bowtie2 v2.4.2 [21]; (iii) sorting and indexing the mapped files with SAMtools v1.12 [22]; (iv) variant calling and consensus genome inference using the BCFtools v1.12; and (v) mask sites with depth less than 10 \times with BEDtools v2.30.0. Sequences with less than 70% coverage were removed from the analysis [23].

2.2.4. Lineage Classification and Phylogenetic Analysis

The consensus genomes were classified in Pango lineages using pangolin tool v3.1.17 [24] and NextClade web application v.1.7.0 [25]. Phylogenetic analysis was performed to confirm the classification and contextualize the new sequences generated in our study. We constructed a reference dataset ($n = 281$) with representative genomes of SARS-CoV-2 available in the GISAID EpiCoV database [13] that comprised genomes generated in this study ($n = 69$) and Brazilian references ($n = 212$), SARS-CoV-2 sequences deposited in the period of April to October 2021 (acknowledgments is available in Supplementary Table S2). The dataset was aligned using MAFFT v7.480 [26], and the phylogenetic inference was performed with IQTREE [27] with the maximum likelihood method under the GTR + F + I + G4 nucleotide substitution model [28,29]. The support value of the branches was evaluated using the Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio (SH-aLRT) test with 1000 replicates. Dataset and script are available on Supplementary File S2.

2.3. Transmissibility Analysis by Measuring Ct Values

To assess the transmissibility potential of SARS-CoV-2 variants and investigate the dominance relationship between Gamma and Delta VOCs, we studied the dynamics of RT-qPCR Ct score in samples from Brazilian capitals. RT-qPCR tests provide semi-quantitative results in the form of Ct values, which are inversely correlated with log₁₀ viral loads and have been used to establish differences in transmissibility among viral lineages [15,17,30].

Ct data were evaluated from 61,815 patients who had positive RT-qPCR results for SARS-CoV-2 RNA, collected in 15 Brazilian capitals between 1 April and 31 October 2021. The Ct values were obtained from the amplification of three distinct viral targets (N, ORF1ab, and S genes of SARS-CoV-2), in addition to internal process control used here as a virus-independent variable (MS2), with the TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to manufacture's instructions. Samples were anonymized and categorized into Gamma or Delta groups when a given lineage exhibited frequency above 90% at the time of collection to estimate differences in the distribution of Ct values in periods dominated by different VOCs. The dominance period was defined for each capital: Belém (Gamma: 1 April 2021–16 June 2021; Delta: 1 October 2021–31 October 2021), Belo Horizonte (Gamma: 4 January 2021–31 July 2021; Delta: 1 September 2021–31 October 2021), Brasília (Gamma: 4 January 2021–15 June 2021; Delta: 1 September 2021–31 October 2021), Fortaleza (Gamma: 4 January 2021–15 July 2021; Delta: 1 October 2021–31 October 2021), Goiânia (Gamma: 4 January 2021–15 July 2021; Delta: 16 September 2021–31 October 2021), Palmas (Gamma: 4 January 2021–15 June 2021; Delta: 16 September 2021–31 October 2021), Porto Alegre (Gamma: 4 January 2021–15 July 2021; Delta: 1 September 2021–31 October 2021), Porto Velho (Gamma: 4 January 2021–15 June 2021; Delta: 16 October 2021–31 October 2021), Rio de Janeiro (Gamma: 4 January 2021–15 June 2021; Delta: 16 August 2021–31 October 2021), and São Paulo (Gamma: 4 January 2021–15 July 2021; Delta: 16 September 2021–31 October 2021). Data from periods with intermediate frequency and data from capitals in which the Delta VOC did not reach the established dominance cut-off were not analyzed. The lineage effect on the Ct score was estimated at the national level and for each capital using a linear regression model, and results were plotted on graphs using the ggplot2 [18] packages of the R software (R version 4.1.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Dataset and code used are available on Supplementary File S3.

2.4. Symptomatology Meta-Analysis

Data available in the Severe Acute Respiratory Syndrome (SRAG) database (<https://opendatasus.saude.gov.br/dataset/bd-srag-2021>, accessed on 11 November 2021) were explored to assess patterns of relevant symptoms from 1 April to 31 October 2021. We selected 9814 registries that simultaneously met the following criteria: (i) samples from unvaccinated individuals, (ii) confirmation of COVID-19 diagnosis by RT-qPCR, and (iii) complete registration information. Records were collected from 15 Brazilian capitals, and the data were divided into two main groups Gamma (control) and Delta (case) groups. Each group was composed of patients' clinical data corresponding to the period in which the variant represented at least 90% of the other variants in the capital. We were able to retrieve the following clinical data: fever, cough, sore throat, O₂ saturation, fatigue, dyspnea, respiratory distress, diarrhea, vomiting, abdominal pain, loss of smell, loss of taste, need for ventilatory support, altered computed tomography of chest result, altered X-ray of chest result, intensive care unit (ICU) admission, and death. The meta-analysis (random and common effects) and the heterogeneity among capitals were calculated using the meta-package in R software (R version 4.1.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Dataset and code used are available on Supplementary File S4.

3. Results

3.1. Change in the Dominance Profile of SARS-CoV-2 Variants in Brazil Territory

According to the availability and the pre-established criteria, 7549 samples were evaluated from 15 different Brazilian capitals between April and October 2021. Belo Horizonte was the capital with largest number of samples in this study ($n = 1820$), followed by Rio de Janeiro ($n = 1097$), São Paulo ($n = 1093$), Porto Alegre ($n = 759$), Brasília ($n = 725$), Goiânia ($n = 471$), Fortaleza ($n = 401$), Belém ($n = 297$), Palmas ($n = 288$), Campo Grande ($n = 198$), Porto Velho ($n = 155$), Salvador ($n = 70$), Macapá ($n = 65$), Manaus ($n = 60$), and Boa Vista ($n = 50$). Our sampling represented all regions of Brazil, covering 55.56% (15/27)

of Brazilian State Capitals (Figure 1A). The sample representativeness was assessed with a cartogram (Figure 1B), which showed that the Midwest and Southeast regions had the highest sampling rates (number of samples/population size of each region) compared to the other areas studied.

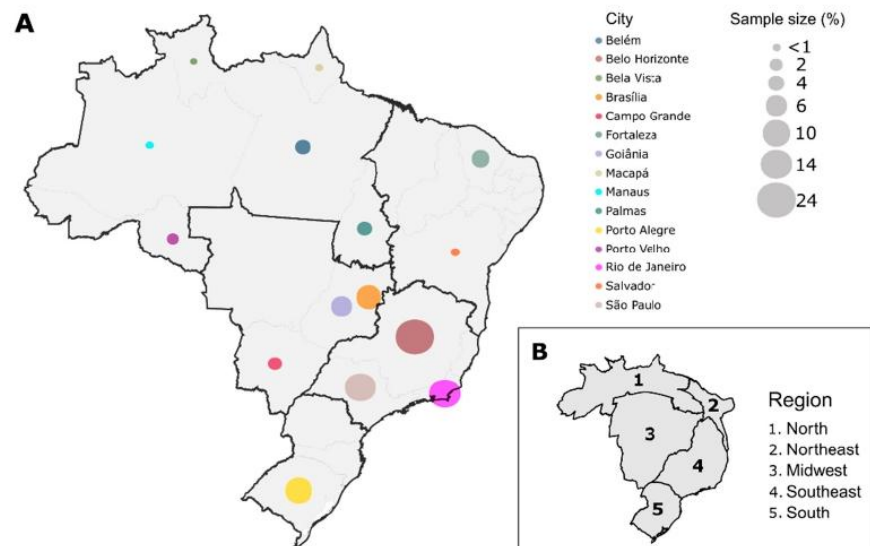


Figure 1. Schematic representation of study sampling. (A) Samples from 15 different capitals of Brazil, representing the five regions (North, Northeast, Midwest, Southeast, and South) were included in our study. In total, 7549 samples were analyzed and the proportion of samples for each capital is represented by the size of the colored circles. Each color represents a different capital; (B) Cartogram of the sampling representativeness according to the population size of each Brazilian region.

According to our data, between April and July 2021, Gamma VOC was the most prevalent variant among all evaluated capitals (Figure 2A). On 1 June 2021 (epidemiological week 22), the Delta VOC was detected for the first time in Rio de Janeiro, followed by Brasília (Midwest region), São Paulo, and Belo Horizonte (both Southeast region) (Figure 2B). Subsequently, at least one case was observed in all five regions of Brazil. The spread of Delta VOC promoted a change in the variant's dominance profile: the case number of Gamma VOC decreases in contrast to the Delta VOC expansion (Figure 2C,D). In the second half of August, Delta VOC became prevalent, comprising more than 60% of coexisting variants in Rio de Janeiro (95.31%; 61/64), São Paulo (87.67%; 64/73), Belo Horizonte (82.14%; 69/84), Porto Alegre (75.76%; 25/33), Fortaleza (63.63%; 7/11), and Goiânia (60%; 27/45). In October 2021, the Delta VOC frequency reached at least 90% of cases in Belém and Fortaleza, while in Belo Horizonte, Brasília, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Alegre, Porto Velho, Rio de Janeiro, Salvador, and São Paulo reached at 99% (Figure 2D).

Besides the Gamma and Delta VOCs, other lineages were also detected but with a low frequency (Figure 2A). The Alpha VOC was identified with an average frequency of 1.76% in April 2021, only in Belo Horizonte, Brasília, and São Paulo. This lineage continued to circulate between these capitals from May to July 2021, but the frequency did not exceed 8%. In August 2021, the Alpha VOC was also identified in the capitals Goiânia, Palmas, and Porto Alegre, with an average frequency of 1.58%. In the following month, there was only one case of the Alpha VOC in Porto Alegre (0.55%), and it was not detected in any of the capitals in October (Supplementary Figure S1). In parallel, we identified the Zeta lineage only in the first three months of the study, corresponding to April, May, and June 2021. Its maximum frequency was 7.69% (1/13) in the Palmas capital in April. (Supplementary Figure S1).

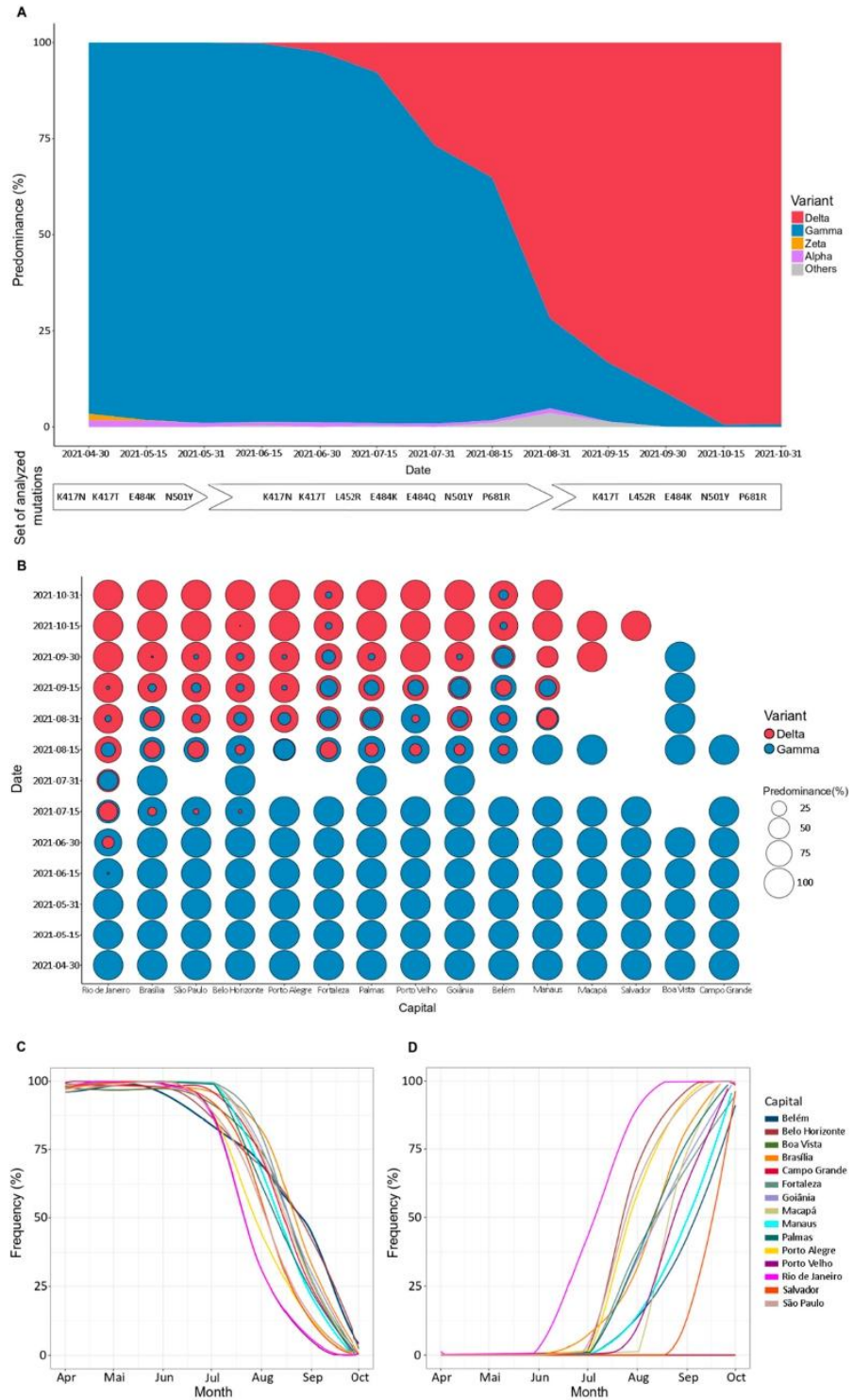


Figure 2. Most prevalent severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants detected in Brazil by genotyping analysis. (A) Gamma (blue) and Delta (red) were the main variants detected in the period evaluated. In the first months of monitoring, Gamma was predominant but gradually replaced by Delta. Other variants, such as Alpha (purple) and Zeta (yellow), were also

detected at low frequency. All samples that could not be classified by genotyping were labeled as “Others” (gray) and selected for sequencing analysis. White tags indicate the analyzed mutations set, considering the expected frequencies of the variants in the evaluated time; (B) Each capital presented a slope of increase in new cases by Delta while Gamma cases decay. Rio de Janeiro was the first capital where Delta was detected (early June) and replaced Gamma entirely (last September). In other capitals, such as Fortaleza and Belém, the emergence of Delta was late, and the complete replacement of Gamma by Delta was not observed in the period evaluated. Blank spaces indicate the absence of samples in a particular capital within the specified time; (C) Gamma was the most prevalent variant among all evaluated capitals up to July 2021; (D) Delta was detected for the first time in June 2021, in Rio de Janeiro. Initially, Delta spread through the Southeast and Midwest regions and, subsequently, for all Brazilian macro-regions, promoting a change in the genotypic profile until then observed, becoming predominant in the second half of August.

During the study, 2% of samples showed a different genotypic profile from the expected mutations panel, indicating the possibility of new variants not yet described. Thus, these different profiles were classified as “others” (Supplementary Figure S1) and submitted to SARS-CoV-2 whole-genome sequencing.

3.2. Sequencing Metrics, Classification, and Phylogeny

In total, 69 samples with a non-characteristic genotypic profile by RT-qPCR genotyping were sequenced and characterized in this study. Median genome coverage of 95.71% (73.39 to 99.82%) and sequencing depth of $944.4 \times -2508.8 \times$ (median: $957.5 \times$). The sequences, initially analyzed by Pangolin and NextClade tools, were classified as Gamma (P.1) (91.30%; 63/69), Alpha (B.1.1.7) (1.45%; 1/69), P.4 (1.45%; 1/69), and Delta (B.1.617.2) (5.79%; 4/69). Sequencing metrics and the pangolin/nextclade classification are available in Supplementary Table S3. We performed a maximum likelihood phylogeny to corroborate the data found in Pangolin and Nextclade classification. Our phylogenetic analysis confirmed that the novel genomes were correctly classified among VOCs Alpha, Gamma, Delta, and variant P.4 (Figure 3).

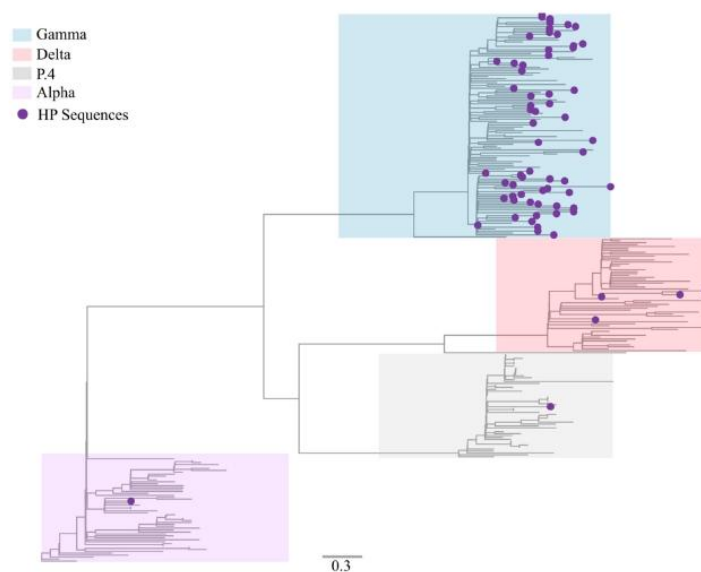


Figure 3. Maximum likelihood inference tree to confirm lineage classification using a reference dataset. The genomes generated in our study ($n = 69$) are highlighted with purple circles. Lineages Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), and P.4 are highlighted in violet, blue, red, and gray, respectively.

3.3. Delta VOC Induces a Decay in Ct Values Compared with Gamma VOC

To explore the dominance dynamics among the main SARS-CoV-2 VOCs in Brazil and to verify whether transmissibility was associated with induction of higher viral load in the upper respiratory tract, we evaluated the RT-qPCR Ct values in periods dominated by Gamma or Delta VOCs. In this sense, the dataset was categorized as Gamma group ($n = 40,845$) or Delta group ($n = 7539$), depending on which variant was dominant. The period of dominance was arbitrarily defined for each variant displaying frequency above 90%. Samples from periods in which there was no dominant VOC were excluded.

The period marked by the increasing frequency of Delta VOC is associated with lower median Ct values than the Gamma-dominated period. Median Ct values for the Gamma Period: 17.12 (N), 16.96 (ORF1ab), 17.23 (S), 25.63 (MS2). Median Ct values for the Delta period: 16.80 (N), 16.61 (ORF1ab), 16.53 (S), 25.25 (MS2). Comparative linear regression analysis at national level revealed a statistically significant negative correlation between Delta VOC and Ct value for the three viral targets analyzed (N: $p < 0.001$, $\beta = -0.853 \pm 0.075$; ORF1ab: $p < 0.001$, $\beta = -0.964 \pm 0.076$; S: $p < 0.001$, $\beta = -1.258 \pm 0.075$) (Figure 4A–C). A small effect was observed for the control target gene (MS2: $p < 0.001$, $\beta = -0.387 \pm 0.039$) due to a large number of analyzed data (Figure 4D). However, we observed a stronger correlation between the virus-related genes (N, S, and ORF1ab) and the effects of Ct values presenting in Delta infections. The data suggested Ct value reduction associated with Delta frequency increase. Therefore, subjects infected with Delta VOC presented higher viral loads in the upper respiratory tract at most Brazilian capitals (Supplementary Table S4).

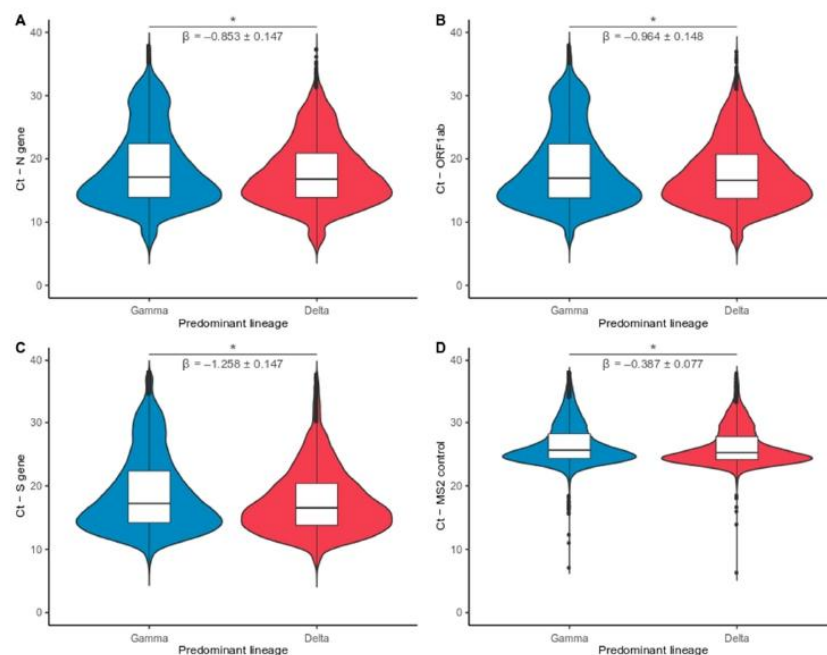


Figure 4. Comparative analysis of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) cycle threshold (Ct) values between Gamma and Delta dominated periods. Violin plots displaying the distribution of Ct data for different Variants of Concern (VOCs) for three viral targets and internal control: (A) N gene; (B) ORF1ab; (C) S gene; and (D) MS2 control. Sample groups were input as Gamma (blue) and Delta (Red) when the variant exhibited frequency above 90%. Statistical comparison between periods denotes that Delta VOC induces higher viral loads in the upper respiratory tract than Gamma VOC infection. Internal control (MS2) had an effect two–three fold smaller on Ct decrement than reported for all viral targets. Asterisks indicate a significant statistical association between imputed viral lineages and Ct values (linear model: $p < 0.001$). * $p < 0.05$.

3.4. Effect of SARS-CoV-2 Variants on Symptomatology and Clinical Data

Meta-analysis of the individual results by each capital using the extracted data from the Brazilian SRAG database indicated that individuals in the Delta group were less likely to have low oxygen saturation (Odds Ratio—OR: 0.63; 95% CI: 0.47–0.84) or fatigue (OR: 0.65; 95% CI: 0.48–0.88) than those present in the Gamma group (Figure 5A,B). There was no statistical difference between the two groups for the other symptoms such as fever, cough, respiratory discomfort, sore throat, dyspnea, diarrhea, vomiting, abdominal pain, loss of taste, and loss of smell (Supplementary Figure S2). Regarding clinical examinations, individuals in the Delta group were also less likely to have altered results on chest computed tomography (OR: 0.17; 95% CI: 0.04–0.71) (Figure 5C) and a propensity for altered x-rays when compared to patients in the group of previously circulating lineage (Supplementary Figure S2). In addition, an increased chance of being admitted to intensive care was also observed in the Delta variant group (OR: 1.38; 95% CI: 1.05–1.82) (Figure 5D), but no increase for mechanical ventilation or death was detected (Supplementary Figure S2).

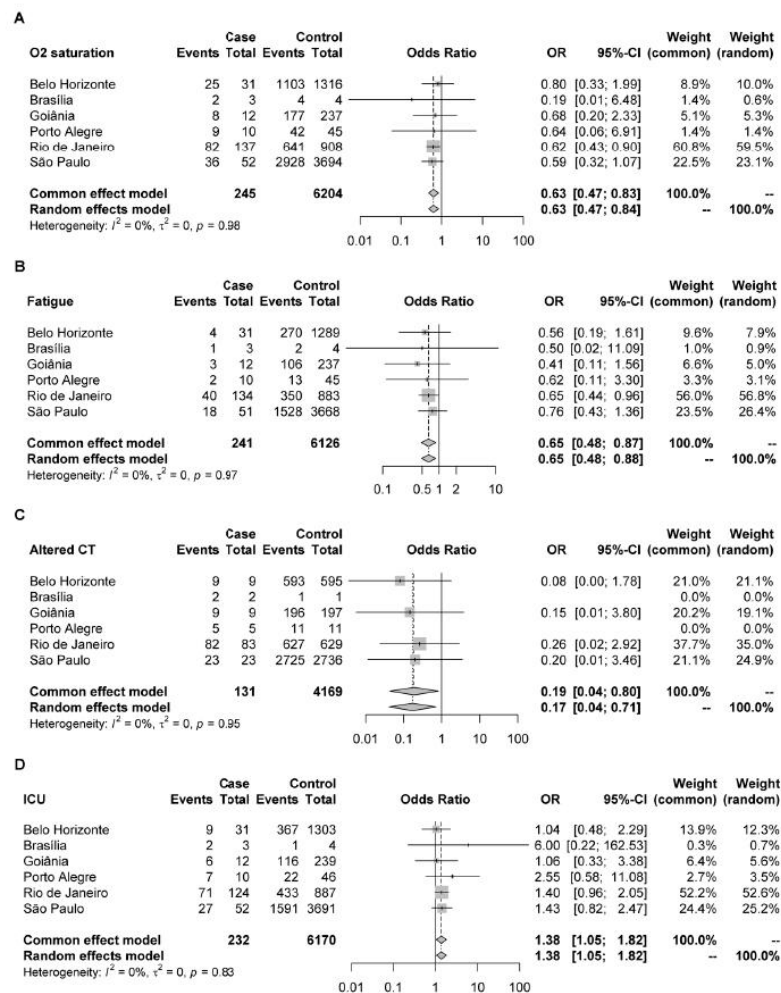


Figure 5. Symptoms/clinical tests occurrence in Delta (case) and Gamma (control) groups in Coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients from six different capitals of Brazil. The Forest plot describes the observations for: (A) O₂ saturation; (B) fatigue; (C) altered chest computed tomography; (D) intensive care unit (ICU) admission.

4. Discussion

Since December 2019, the world has faced one of the most challenging infectious diseases in decades [31]. The SARS-CoV-2 has spread worldwide, causing significant socioeconomic and health impacts on a global scale [32]. In Brazil, the devastating effects of the pandemic were no different. Brazil is the largest country in Latin America, with continental dimensions that pose challenges of comparable sizes, such as the difficulty of adopting unitary policies to confront and monitor the COVID-19 pandemic [33]. These problems can be better managed with national epidemiologic surveillance programs, which provide data that allow preventive and effective public health policies. In this context, we evaluated the epidemiological dynamics of SARS-CoV-2 variants from 15 different Brazilian capitals between April and October 2021.

The rapid description of new variants is one of the advantages of epidemiological surveillance [34]. An example was the Gamma VOC identification, first detected in Amazonas in late November 2020, which contributed to the health system's collapse in early 2021. This variant spread rapidly across the country and was responsible for the second wave of infections, turning Brazil into the epicenter of the COVID-19 in the first trimester of 2021 [10,35]. Less than two months were sufficient for Gamma VOC to replace the parental lineage and turn the predominant SARS-CoV-2 variant in Brazil [15]. In our data, Gamma VOC was predominant up to mid-July. The first Delta VOC was detected in the Rio de Janeiro capital in June. One month later, this variant was also detected in other capitals, such as Belo Horizonte, Brasília, and São Paulo. A study using random sequencing of samples from patients with COVID-19 described that community transmission of the Delta in Rio de Janeiro possibly started in June, corroborating the results found in our study [36]. Our results demonstrated that the Delta VOC had become the predominant variant in several capitals such as Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Belém, Porto Alegre (considering the 90% predominance cut-off) in September 2021.

Although Gamma (P.1) and Delta (B.1.617.2) were the main strains detected in our study, the circulation of low-frequent variants, such as Alpha (B.1.1.7), Zeta (P.2), and P.4 was also identified by RT-qPCR genotyping strategy. A total of four circulating lineages were identified by genome sequencing, in which the VOC Gamma was the main one identified. This result is consistent with the period of our study and the prevalence of this variant in Brazil. Moreover, the variants identified in our study are compatible with that reported worldwide [37,38]. The phylogenetic analysis revealed great genomic diversity among the sequences by identifying five sublineages of VOC Gamma and two sublineages of VOC Delta. Approximately 80% of the sequences have non-synonymous mutations in the S gene correlated with increased transmissibility and pathogenicity, such as D614G [39] and N501Y mutations [40].

The replacement of circulating variants by Delta VOC has been well documented [41,42]. Current evidence supports that this variant is more infectious and has a higher transmissibility rate when compared with Alpha and Beta VOCs, even in individuals with natural or vaccine-induced immunity [43–45]. However, studies comparing the transmissibility of Delta and Gamma VOCs are limited, and the mechanisms by which these events occur are not entirely established. Thus, to verify the differences in the potential transmissibility between these variants, we evaluated the dynamics of viral loads measured from RT-qPCR Ct values. Our results confirm the hypothesis that the Delta VOC is more transmissible than the Gamma VOC and suggest that this advantage is likely due to an increase in viral load in the upper respiratory tract as described in other studies [45–47]. This fact can be observed through the data comparison by linear regression in the dominated periods by the different VOCs at the national level, which indicated an association between increased frequency of Delta VOC and drops in Ct values (range $\beta = -0.853$ to -1.258 ; $p < 0.001$). The data also showed that random variations during the RT-qPCR diagnostics tests were detected in the analysis. A significant decay on Ct values measured for the MS2 endogenous control target was observed ($\beta = -0.387$; $p < 0.001$). At the same time, these small random fluctuations incur an effect two–three fold less than the one reported for viral targets, not being enough

to mischaracterize the differences of Ct obtained for the distinct VOCs. Recent reports on the epidemiological dynamics of SARS-CoV-2 variants have shown that transmission fitness advantages shaped the evolution of viral variants over time in diverse Brazilian states [10,17,48]. Our findings agree with these studies and help explain the substitution process for Delta over Gamma VOC at the national level. Thus, considering the Ct analysis data and other works that reinforced the increased transmissibility potential of the Delta variant [49,50], we expected that the replacement time of the Gamma variant by the Delta variant would be shorter, which, however, was not observed. One hypothesis may be related to the progress of the vaccination campaign. In Brazil, when Gamma VOC emerged, the vaccination campaign had not yet started. In September 2021, when Delta VOC became prevalent, approximately 71% of the population was vaccinated with at least the first dose, while only 43% were fully vaccinated [51]. Studies have indicated that large-scale vaccination effectively decreases virus transmission and, consequently, decreases the number of cases [52]. It can be seen when comparing the number of COVID-19 cases in January (around 69,000 cases/day) and September 2021 (near 14,000 cases/day) [53]. Thus, although there was a more transmissible variant in circulation in September, the increase of cases was not observed, reinforcing the protective effect of vaccines on the population.

According to symptomatology meta-analysis, we observed a reduction of symptoms such as fatigue and oxygen saturation in the Delta group and fewer altered exams on computed tomography (CT) and X-ray. Similar results were found in a recent study that considered the changes on the Delta-variant COVID-19 children's chest CT milder than the original strain [54]. However, our results suggested an increase in ICU admission in the Delta group compared to the Gamma group. In another study [55], no difference was observed in the proportion of death, mechanical ventilation, or ICU admission between Delta and pre-Delta patients. Nonetheless, the pre-Delta group was not well characterized concerning the variants' predominance. Several differences in the clinical manifestations of COVID-19 have been reported, mainly related to the emergence of new variants. COVID-19 could be classified as a multisystemic disorder and not only a respiratory disease [56], so the increase in ICU admission can be justified by other systemic complications that are not evaluated in our database. Another limitation of SRAG database was the unavailability of unvaccinated hospitalized individual data in all evaluated capitals in this study, especially in the period of the Delta variant predominance, as long the vaccination program progressed.

Furthermore, another challenge of this work was the difficulty in collecting samples from all Brazilian capitals within the eligibility criteria. These barriers are commonly faced by initiatives that propose to carry out epidemiological surveillance in a country with continental proportions.

5. Conclusions

Our study described the replacement of Gamma by Delta VOCs, followed by increasing transmissibility and respiratory symptoms associated between April to October 2021 in Brazil.

Over two years of the COVID-19 pandemic, the disease was marked by moments of acceleration or slowing transmission, which may be directly related to the predominant VOC and the vaccination rate. Since each VOC has different virulence capabilities, the clinical signs caused by them can also differ. Therefore, we must be aware of these changes, especially about emerging variants such as the Delta variant and, more recently, the Omicron VOC. In this sense, the emergence and rapid dominance of the Omicron VOC in a short period of time after our evaluation only reinforce the importance of genomic and epidemiological vigilance initiatives as mechanisms to monitor SARS-CoV-2 variants.

Finally, the epidemiological surveillance system described here has the potential to be expanded to monitor new variants. This strategy can provide subsidies to health authorities to implement effective control strategies to prevent COVID-19 transmission.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14050847/s1>. File S1: Dataset and scripts used in genotyping analysis of SARS-CoV-2 variants. File S2: Dataset and code used in lineage classification and phylogenetic analysis. File S3: RT-qPCR Ct data and script used in this study; File S4: Symptomatology data and the script used in meta-analysis. Figure S1: Circulating variants detected with a low frequency. Figure S2: Others symptoms/clinical tests occurrence in Delta (case) and Gamma (control) groups in COVID-19 patients from six different capitals of Brazil. Table S1: GISAID access number for consensus genome sequences characterized in this study. Table S2: GISAID acknowledgment table. Table S3: Metadata, sequencing statistics, and lineage classification for all samples characterized through genome sequencing. Table S4: Lineage effect on Ct value at the national level and for each capital using a linear regression model.

Author Contributions: J.P.S., A.B.d.L., L.B.A., F.S.V.M. and C.P.T.B.M. carried out most of the experiments. D.C.Q. and J.G.G.F. prepared samples for sequencing. P.L.C.F. and F.R.R.M. performed the data sequencing analysis and phylogeny. J.P.S., A.B.d.L., L.B.A., F.S.V.M., C.P.T.B.M. and D.A.G.Z. drafted the manuscript. R.P.S., R.S.A., F.S.V.M., A.C.S.F. and D.A.G.Z. participated in the design and conceived the study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grupo Pardini S/A in collaboration with CNPq (R.S.A.: 312688/2017-2 and 439119/2018-9; R.P.S.: 310627/2018-4), MEC/CAPES 118 (14/2020—23072.211119/2020-10), FINEP (0494/20 01.20.0026.00), UFMG-NB3, FINEP n^o 1139/20 (RSA), FAPEMIG (R.P.S.: APQ-00475-20) and FAPERJ (R.S.A. 202.922/2018). We acknowledge support from the Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP affiliated to RedeVirus/MCTI (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of ASSOCIACAO PRO ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO (protocol no. CAAE: 33202820.7.1001.5348, 21 July 2020).

Informed Consent Statement: Research protocol was approved without informed consent in accordance with Brazilian National Health Council's Resolution 510/2016. All samples were residual COVID-19 clinical diagnostic samples de-identified before receipt by the researchers.

Data Availability Statement: All generated genome sequences have been deposited on GISAID (IDs: EPI_ISL_6500240, EPI_ISL_6500295, EPI_ISL_9383777 to EPI_ISL_9383784, EPI_ISL_9383786 to EPI_ISL_9383804, and EPI_ISL_9383806 to EPI_ISL_9383846).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO World Health Organization—Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 10 March 2022).
2. Gorbalenya, A.E.; Enjuanes, L.; Ziebuhr, J.; Snijder, E.J. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **2006**, *117*, 17–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Vasilarou, M.; Alachiotis, N.; Garefalaki, J.; Beloukas, A.; Pavlidis, P. Population Genomics Insights into the First Wave of COVID-19. *Life* **2021**, *11*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Telenti, A.; Arvin, A.; Corey, L.; Corti, D.; Diamond, M.S.; García-Sastre, A.; Garry, R.F.; Holmes, E.C.; Pang, P.S.; Virgin, H.W. After the pandemic: Perspectives on the future trajectory of COVID-19. *Nature* **2021**, *596*, 495–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Otto, S.P.; Day, T.; Arino, J.; Colijn, C.; Dushoff, J.; Li, M.; Mechai, S.; Van Domselaar, G.; Wu, J.; Earn, D.J.D.; et al. The origins and potential future of SARS-CoV-2 variants of concern in the evolving COVID-19 pandemic. *Curr. Biol.* **2021**, *31*, R918–R929. [[CrossRef](#)]
7. Zhou, W.; Wang, W. Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: Challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 226. [[CrossRef](#)]
8. World Health Organization (W.H.O). Tracking SARS-CoV-2 Variants. Available online: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (accessed on 27 December 2021).
9. World Health Organization Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. Available online: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (accessed on 27 December 2021).

10. Faria, N.R.; Mellan, T.A.; Whittaker, C.; Claro, I.M.; Candido, D.d.S.; Mishra, S.; Crispim, M.A.E.; Sales, F.C.S.; Hawryluk, I.; McCrone, J.T.; et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* **2021**, *372*, 815–821. [[CrossRef](#)]
11. Burrell, C.J.; Howard, C.R.; Murphy, F.A. Control, Prevention, and Eradication. *Fenner White's Med. Virol.* **2017**, 205–216. [[CrossRef](#)]
12. Wolitski, R.J.; Janssen, R.S.; Holtgrave, D.R.; Peterson, J.L. *The Public Health Response to the HIV Epidemic in the United States*, 4th ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2004; ISBN 9780080471969.
13. Khare, S.; Gurry, C.; Freitas, L.; Schultz, M.B.; Bach, G.; Diallo, A.; Akite, N.; Ho, J.; TC Lee, R.; Yeo, W.; et al. GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Wkly.* **2021**, *3*, 1049–1051. [[CrossRef](#)]
14. Lurie, N.; Saville, M.; Hatchett, R.; Halton, J. Developing COVID-19 Vaccines at Pandemic Speed. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1969–1973. [[CrossRef](#)]
15. Naveca, F.G.; Nascimento, V.; de Souza, V.C.; Corado, A.d.L.; Nascimento, F.; Silva, G.; Costa, Á.; Duarte, D.; Pessoa, K.; Mejía, M.; et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1230–1238. [[CrossRef](#)]
16. Candido, D.S.; Claro, I.M.; de Jesus, J.G.; Souza, W.M.; Moreira, F.R.R.; Dellicour, S.; Mellan, T.A.; du Plessis, L.; Pereira, R.H.M.; Sales, F.C.S.; et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science* **2020**, *369*, 1255–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Moreira, F.R.R.; D'arc, M.; Mariani, D.; Herlinger, A.L.; Schiffler, F.B.; Rossi, Á.D.; Leitão, I.D.C.; Miranda, T.D.S.; Cosentino, M.A.C.; Tôrres, M.C.D.P.; et al. Epidemiological dynamics of SARS-CoV-2 VOC Gamma in Rio de Janeiro, Brazil. *Virus Evol.* **2021**, *7*, veab087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wickham, H. *Elegant Graphics for Data Analysis: Ggplot2*; Springer: Cham, Switzerland, 2008; Volume XVI, 260p. [[CrossRef](#)]
19. Zeileis, A.; Grothendieck, G. Zoo: S3 infrastructure for regular and irregular time series. *J. Stat. Softw.* **2005**, *14*. [[CrossRef](#)]
20. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. [[CrossRef](#)]
21. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [[CrossRef](#)]
24. O'Toole, Á.; Scher, E.; Underwood, A.; Jackson, B.; Hill, V.; McCrone, J.T.; Colquhoun, R.; Ruis, C.; Abu-Dahab, K.; Taylor, B.; et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evol.* **2021**, *7*, veab064. [[CrossRef](#)]
25. Aksamentov, I.; Roemer, C.; Hodcroft, E.; Neher, R. Nextclade: Clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *J. Open Source Softw.* **2021**, *6*, 3773. [[CrossRef](#)]
26. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Minh, B.Q.; Schmidt, H.A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M.D.; von Haeseler, A.; Lanfear, R. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 1530–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yang, Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *J. Mol. Evol.* **1994**, *39*, 306–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tavaré, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life Sci.* **1986**, *17*, 57–86.
30. Hay, J.A.; Kennedy-Shaffer, L.; Kanjilal, S.; Lennon, N.J.; Gabriel, S.B.; Lipsitch, M.; Mina, M.J. Estimating epidemiologic dynamics from cross-sectional viral load distributions. *Science* **2021**, 373. [[CrossRef](#)]
31. Morens, D.M.; Fauci, A.S. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell* **2020**, *182*, 1077–1092. [[CrossRef](#)]
32. Nicola, M.; Alsaifi, Z.; Sohrabi, C.; Kerwan, A.; Al-Jabir, A.; Iosifidis, C.; Agha, M.; Agha, R. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int. J. Surg.* **2020**, *78*, 185–193. [[CrossRef](#)]
33. Rocha, R.; Atun, R.; Massuda, A.; Rache, B.; Spinola, P.; Nunes, L.; Lago, M.; Castro, M.C. Effect of socioeconomic inequalities and vulnerabilities on health-system preparedness and response to COVID-19 in Brazil: A comprehensive analysis. *Lancet Glob. Heal.* **2021**, *9*, e782–e792. [[CrossRef](#)]
34. van Dorp, C.H.; Goldberg, E.E.; Hengartner, N.; Ke, R.; Romero-Severson, E.O. Estimating the strength of selection for new SARS-CoV-2 variants. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7239. [[CrossRef](#)]
35. Nonaka, C.K.V.; Gräf, T.; Barcia, C.A.d.L.; Costa, V.F.; de Oliveira, J.L.; Passos, R.d.H.; Bastos, I.N.; de Santana, M.C.B.; Santos, I.M.; de Sousa, K.A.F.; et al. SARS-CoV-2 variant of concern P.1 (Gamma) infection in young and middle-aged patients admitted to the intensive care units of a single hospital in Salvador, Northeast Brazil, February 2021. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *111*, 47–54. [[CrossRef](#)]
36. Lamarca, A.P.; de Almeida, L.G.P.; da Silva Francisco Junior, R.; Cavalcante, L.; Machado, D.T.; Brustolini, O.; Gerber, A.L.; Guimarães, A.P.d.C.; Policarpo, C.; da de Oliveira Silva, G.; et al. Genomic Surveillance Tracks the First Community Outbreak of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) Variant in Brazil. *J. Virol.* **2021**, *96*, JVI-01228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ostrov, D.A.; Knox, G.W. Emerging mutation patterns in SARS-CoV-2 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *586*, 87–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Harvey, W.T.; Carabelli, A.M.; Jackson, B.; Gupta, R.K.; Thomson, E.C.; Harrison, E.M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; Peacock, S.J.; et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 409–424. [CrossRef] [PubMed]
39. Volz, E.M.; Hill, V.; McCrone, J.T.J.T.; Price, A.; Jorgensen, D.; O’Toole, Á.; Southgate, J.; Johnson, R.; Jackson, B.; Nascimento, F.F.; et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell* **2021**, *184*, 64–75.e11. [CrossRef] [PubMed]
40. Leung, K.; Shum, M.H.H.; Leung, G.M.; Lam, T.T.Y.; Wu, J.T. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Eurosurveillance* **2020**, *26*, 2002106. [CrossRef] [PubMed]
41. Singh, J.; Rahman, S.A.; Ehtesham, N.Z.; Hira, S.; Hasnain, S.E. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1131–1133. [CrossRef] [PubMed]
42. Tegally, H.; Wilkinson, E.; Althaus, C.L.; Giovanetti, M.; San, J.E.; Giandhari, J.; Pillay, S.; Naidoo, Y.; Ramphal, U.; Msomi, N.; et al. Rapid replacement of the Beta variant by the Delta variant in South Africa. *medRxiv* **2021**, preprint. [CrossRef]
43. Daggpunar, J. Interim estimates of increased transmissibility, growth rate, and reproduction number of the COVID-19 B.1.617.2 variant of concern in the United Kingdom. *medRxiv* **2021**, preprint. [CrossRef]
44. Lopez Bernal, J.; Andrews, N.; Gower, C.; Gallagher, E.; Simmons, R.; Thelwall, S.; Stowe, J.; Tessier, E.; Groves, N.; Dabrera, G.; et al. Effectiveness of COVID-19 Vaccines against the B.1.617.2 (Delta) Variant. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 585–594. [CrossRef]
45. Luo, C.H.; Morris, C.P.; Sachithanandham, J.; Amadi, A.; Gaston, D.; Li, M.; Swanson, N.J.; Schwartz, M.; Klein, E.Y.; Pekosz, A.; et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta Variant is Associated with Higher Infectious Virus Loads Compared to the Alpha Variant in both Unvaccinated and Vaccinated Individuals. *medRxiv* **2021**, preprint. [CrossRef]
46. Bolze, A.; Cirulli, E.T.; Luo, S.; White, S.; Cassens, T.; Jacobs, S.; Nguyen, J.; Ramirez, J.M.; Sandoval, E.; Wang, X.; et al. Rapid displacement of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 by B.1.617.2 and P.1 in the United States. *medRxiv* **2021**, preprint. [CrossRef]
47. Earnest, R.; Uddin, R.; Matluk, N.; Renzette, N.; Siddle, K.J.; Loreth, C.; Adams, G.; Tomkins-Tinch, C.H.; Petrone, M.E.; Rothman, J.E.; et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA. *medRxiv* **2021**, preprint. [CrossRef]
48. Naveca, F.G.; Nascimento, V.; Souza, V.; Corado, A.D.L.; Nascimento, F.; Mejia, M.; Brandão, M.J.; Viana, A.; Benzaken, A.S.; Silva, G.; et al. The SARS-CoV-2 variant Delta displaced the variants Gamma and Gamma plus in Amazonas, Brazil. Available online: <https://virological.org/t/the-sars-cov-2-variant-delta-displaced-the-variants-gamma-and-gamma-plus-in-amazonas-brazil/765> (accessed on 27 December 2021).
49. Singanayagam, A.; Hakki, S.; Dunning, J.; Madon, K.J.; Crone, M.A.; Koycheva, A.; Derqui-Fernandez, N.; Barnett, J.L.; Whitfield, M.G.; Varro, R.; et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: A prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, 183–195. [CrossRef]
50. CDC Center for Disease Control and Prevention Delta Variant: What We Know About the Science. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/delta-variant.html> (accessed on 17 December 2021).
51. Our World in Data. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations—Statistics and Research. Available online: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations> (accessed on 17 December 2021).
52. Thanh Le, T.; Andreadakis, Z.; Kumar, A.; Gómez Román, R.; Tollefsen, S.; Saville, M.; Mayhew, S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 305–306. [CrossRef] [PubMed]
53. Ministério da Saúde. Brasil Painel Coronavírus. Available online: <https://covid.saude.gov.br/> (accessed on 17 December 2021).
54. Cheng, Q.R.; Fan, M.X.; Hao, J.; Hu, X.C.; Ge, X.H.; Hu, Z.L.; Li, Z. Chest CT features of children infected by B.1.617.2 (Delta) variant of COVID-19. *World J. Pediatr.* **2021**, *2*, 3–8. [CrossRef] [PubMed]
55. Taylor, C.A.; Patel, K.; Pham, H.; Whitaker, M.; Anglin, O.; Kambhampati, A.K.; Milucky, J.; Chai, S.J.; Kirley, P.D.; Alden, N.B.; et al. Severity of Disease Among Adults Hospitalized with Laboratory-Confirmed COVID-19 Before and During the Period of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Predominance—COVID-NET, 14 States, January–August 2021. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 1513–1519. [CrossRef]
56. Nayak, B.; Lal, G.; Kumar, S.; Das, C.J.; Saraya, A.; Shalimar, A. Host Response to SARS-CoV2 and Emerging Variants in Pre-Existing Liver and Gastrointestinal Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 1030. [CrossRef]

5. **CAPÍTULO II – Manuscrito: Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil**

Neste capítulo apresentamos o manuscrito intitulado “*Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil*” submetido à revista *Viruses* (fator de impacto: 5,818) que descreve a continuação de um programa de vigilância genômica realizado em 291.571 amostras em 12 capitais brasileiras (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Velho, Rio de Janeiro e São Paulo) durante o maior pico de aumento de casos de COVID-19 no Brasil e introdução da variante Ômicron. Além disso identificamos a sua substituição pela variante Delta em cada capital e no Brasil de uma forma geral, além da avaliação de carga viral geral entre os pacientes e sua relação com as taxas de transmissão e diferenças na apresentação de sintomas e desfecho clínico da COVID-19.

Contribui ativamente nesse artigo nas seguintes etapas: desenho do estudo, recrutamento e prospecção das amostras, extração do RNA viral, ensaios de RT-qPCR e sequenciamento genômico viral, curadoria e análise de dados e escrita do artigo.

Revista: Viruses

Fator de Impacto: 5,818

Link de acesso: Submetido em 01/03/2023 – Código de submissão: viruses-2286911

Article

Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil

Joice do P. Silva¹, Aline B. de Lima¹, Luige B. Alvim², Frederico S. V. Malta¹, Cristiane P. T. B. Mendonça¹, André H. B. de Carvalho¹, Jéssica S. H. Rios¹, Paula L. C. Fonseca³, Daniel C. Queiroz³, Luíza C. G. de A. e Santos³, Alessandro C. S. Ferreira¹, Renan P. Souza³, Renato S. Aguiar^{3,4*}, Danielle A. G. Zauli^{1*}

¹ Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Instituto Hermes Pardini; Belo Horizonte 31270-901, Brazil; joyce.silva@grupopardini.com.br (J.P.S.); alinebrito.lima@grupopardini.com.br (A.B.L.); frederico.malta@grupopardini.com.br (F.S.V.M.); cristiane.brito@grupopardini.com.br (C.P.T.B.M.); andre.carvalho@grupopardini.com.br (A.H.B.C.); jessica.rios@grupopardini.com.br (J.S.H.R.); alessandro.ferreira@grupopardini.com.br (A.C.S.F.); danielle.zauli@grupopardini.com.br (D.A.G.Z.)

² Departamento de Produtos e Inovação, Instituto Hermes Pardini; Belo Horizonte 31270-901, Brazil; luige.alvim@grupopardini.com.br (L.B.A.)

³ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; camargos.paulaluzize@gmail.com (P.L.C.F.); dcqbioufmg@gmail.com (D.C.Q); luizagdossantos@hotmail.com (L.C.G.A.S.); renanpedra@gmail.com (R.P.S.); santanarnt@gmail.com (R.S.A.)

⁴ Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil; santanarnt@gmail.com (R.S.A.)

* Correspondence: santanarnt@gmail.com (R.S.A.); danielle.zauli@grupopardini.com.br (D.A.G.Z.)

Abstract: The introduction of SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs) in Brazil has been associated with major impacts on the epidemiological and public health scenario. In this study, 291,571 samples were investigated for SARS-CoV-2 variants from August/2021 to March/2022 (highest peak of positive cases) in four geographical regions of Brazil. To identify the frequency, introduction, and dispersion of SARS-CoV-2 variants in 12 Brazilian capitals, VOCs defining spike mutations were identified in 35,735 samples through genotyping and viral genome sequencing. Omicron VOC was detected in late November 2021 and replaced the Delta VOC in approximately 3.5 weeks. We estimated viral load differences in the upper respiratory tract between SARS-CoV-2 Delta and Omicron through the evaluation of the RT-qPCR cycle threshold (Ct) score in 77,262 samples. Were observed a lower viral load in patients infected by Omicron VOC compared to Delta VOC. Analyzes of clinical outcomes in 17,586 patients across the country indicated that individuals infected with Omicron were less likely to need ventilatory support. The results of our study reinforce the importance of surveillance programs at national level and showed the introduction and faster dispersion of Omicron over Delta VOC in Brazil, without increasing in the numbers of severe cases of COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, variants, epidemiologic surveillance, COVID-19, viral load, symptoms.

1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In the last three years, SARS-CoV-2 has infected almost 757 million people and was responsible for over 6 million deaths worldwide [1]. Brazil reported more than 36 million cases and about 698 thousand deaths [2]. Nonetheless, the vaccination programs demonstrated high efficiency to combat SARS-CoV-2 infection and dissemination [3,4].

To monitor new SARS-CoV-2 variants according to the potential impact concerning virus spread, disease severity, vaccines performance, diagnostic tools, and others, the World Health Organization (WHO) created the Variants of Interest (VOIs), Variants of Concern (VOCs), Variants under Monitoring (VUMs) and Formerly Monitored Variants

(FMVs) classifications [5]. While VOIs, VUMs, and, FMVs have unclear impacts on human health [6], the VOCs are associated with immune escape and have the potential for higher transmissibility and virulence [7,8]. So far, the WHO has designated five VOCs: Alpha (B.1.1.7) [9]; Beta (B.1.351) [10]; Gamma (P.1) [11,12]; Delta (B.1.617.2) [13] and Omicron (B.1.1.529) [14], identified in the United Kingdom, South Africa, Brazil, India, and South Africa, respectively. The VOCs establishment has also been responsible for upsurges in cases and deaths in Brazil [15], for example, the health system's collapse observed in Manaus in early 2021 by Gamma VOC [11,16], the increase in the number of severe cases due to Delta VOC in mid-2021 [17], and finally, the rise in the number of cases due to Omicron VOC that promoted the two last waves of COVID-19 in 2022 [18].

The Omicron VOC, first reported in November 2021 [19,20], contains at least 32 mutations in the spike protein (10 especially in the receptor-binding domain), which represents twice as many as the Delta variant [21]. One of the main mutations is the 69-70 deletion which prevents the oligonucleotide probe in some RT-qPCR kits from binding to its target sequence, leading to what has been called S gene target failure (SGTF) and is therefore considered a marker for Omicron detection [22]. Nowadays, several Omicron sub lineages were detected, including BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.2.12.1, BA.4, and BA.5. Indeed, several Omicron recombinants have been reported more recently. According to previous studies, Omicron may be less severe than other VOCs. However, it displays higher humoral immunity evasion and rapid dissemination ability [23,24]. Although cases attributed to Omicron VOC are generally classified by health authorities as milder, it is important to maintain continuous epidemiological surveillance, since more aggressive variants may emerge and need to be identified as quickly as possible.

Thus, several scientific initiatives around the world have been contributing to the generation of information about the COVID-19 pandemic situation. These data include monitoring of prevalent variants, incidence, number of deaths, description of mutations, the clinical relevance of variants, vaccination impact, and other aspects [25–28]. In this context, our group created a SARS-CoV-2 variants-monitoring initiative in Brazil that recently described the replacement of Gamma by Delta SARS-CoV-2 VOCs, between April and October 2021 [25]. Hence, the present study aimed to evaluate the transition of Delta to Omicron SARS-CoV-2 VOCs in Brazilian territory from August 2021 to March 2022, symptomatology features, and viral load in a new scenario of increasing rates of transmission of COVID-19.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

This study was approved by the Research Ethics Committee (CAAE-33202820.7.1001.5348) with the exemption of the individual participants' consent form to investigate virus whole genome sequences. Data analysis included descriptive sample profile, genomic surveillance of SARS-CoV-2 by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) genotyping analysis and whole-genome sequencing, determination of Omicron VOC viral load by measuring RT-qPCR cycle threshold (Ct) score and, a meta-analysis of the symptomatology dynamics of Omicron VOC.

2.2. Genomic surveillance by RT-qPCR genotyping and whole-genome sequencing

2.2.1. Descriptive sample profile and SARS-CoV-2 variants genotyping by RT-qPCR

A total of 210,941 nasopharyngeal swab samples were evaluated by the SARS-CoV-2 diagnostic test by RT-qPCR performed in the Pardini Group laboratory. Total viral RNA isolation were performed as previously described and RT-qPCR was performed by the TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions, for evaluation of three distinct viral targets: N, ORF1ab, and S genes [25]. The samples were collected from 12 Brazilian capitals: Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Brasília, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Palmas, Porto Velho, Rio

de Janeiro, and São Paulo from August 29, 2021, to March 5, 2022, corresponding to 35/2021 to 09/2022 epidemiological weeks. The data were then categorized into positive and negative results. The positive samples were grouped by sex (male and female) and age cluster (0 to 9 years; 10 to 19 years; 20 to 29 years; 30 to 39 years; 40 to 49 years; 50 to 59 years and ≥ 60 years). The SARS-CoV-2 variants genotyping in this study were performed according to SGTF detection method [22]. SGTF were considered only in samples with CT values <26 for any other viral gene (N and ORF1ab) to exclude samples with SGTF profile due lower viral input on primary samples. Therefore, SGTF samples were named Omicron, and non-SGTF samples were named Delta, according to the expected frequencies of variants in the evaluated time. The results were plotted on moving average graphs using the ggplot2 [29] package of the R program (R version 4.1.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The datasets and codes used are available in Supplementary File S1.

2.2.2. SARS-CoV-2 Genome Sequencing

Viral genome sequencing was performed on 109 SARS-CoV-2 positive samples with Ct value <26 . Nucleic acids were extracted using MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Sequencing libraries were prepared by QIAseq FX DNA Library Prep kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and ARTIC V4.0 multiplex primer set to Delta or ARTIC V4.1 multiplex primer set to Omicron. Genomes were sequenced on the MiSeq platform (Illumina, California, USA) with v3 cartridges (600 cycles) following the manufacturer's instructions. For each sample processing steps (cDNA synthesis, viral genome amplification, and library preparation) a negative control was included.

2.2.3. Viral Genome Assembly

Raw sequence data files were processed using the pipeline ViralUnit, as described previously [30]. Briefly, reads were filtered and trimmed using Trimmomatic (minimum read quality score of 30) [31]. The remaining reads were mapped to the reference SARS-CoV-2 genome (NCBI GenBank accession NC_045512) using Minimap2 [32], with unmapped reads discarded. Mapping files were then indexed and sorted with SAMtools v1.12 [33]. To infer the consensus genome sequences, BCFtools v1.12 [34] was used. Finally, BEDtools v2.30.0 [35] was used to mask low-depth sites ($<10\times$ coverage). To ensure the accuracy of variant calls only genomes with $>70\%$ genome coverage were included. All consensus genome sequences characterized in this study have been deposited on GISAID and are publicly available (Supplementary Table S1).

2.2.4. Lineage classification and phylogenetic analysis

The consensus sequences were classified using the Pangolin tool v.4.1.3 [36] and the NextClade web application v.2.3.0 [37]. A dataset ($n = 1,640$) containing public reference genomes classified by Nextstrain [38] as Omicron lineages ($n = 1,531$) (acknowledgments is available in Supplementary Table S2) and genomes generated in this study ($n = 109$) was aligned using Minimap2 [32]. A Maximum Likelihood phylogeny was inferred using the IQ-tree program v2.0.3 [39] under the GTR+F+I+G4 model to corroborate the classification generated by Pangolin and NextClade [40]. The support value of the branches was evaluated using the Bootstrap test with 1000 pseudoreplicates. The dataset and script are available on Supplementary File S2.

2.3. Ct value and viral load

The RT-qPCR test Ct values were used to assess the viral load differences in the upper respiratory tract between SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants. In this approach, the Ct score is inversely proportional to the amount of viral load available in the biological

samples, suggesting the transmission rates associated with the variants evaluated [12,41,42].

Data from 77,262 SARS-CoV-2 positive patients collected between August 29, 2021, and March 5, 2022, in 12 Brazilian capitals were evaluated. The Ct values for N and ORF1ab viral targets were obtained as described previously [25]. To estimate differences in the distribution of Ct values in periods dominated by different VOCs, the data were anonymized and categorized into Delta or Omicron groups. Each group included only the Ct value of the epidemiological weeks when a given lineage exhibited frequency above 90% at the time of collection. The dominance period was defined for each capital and period intermediate frequency, those that do not reach the dominance cut-off, were not analyzed (Supplementary Table S3).

The variant effect on the Ct score was estimated at the national level and for each capital using a linear regression model and the median Ct difference between groups was assessed using the Student's T-test. The statistical analyses were conducted as implemented in the R software and results were plotted using the ggplot2 packages (R version 4.2.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The dataset and code used are available in Supplementary File S3 [29].

2.4. Symptomatology meta-analysis

The Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) database was used to obtain clinical data of hospitalized patients with suspected COVID-19 in Brazil in the evaluated period [43]. A total of 17,586 patients records with SARS-CoV-2 positive RT-qPCR results and with complete registration information from 10 Brazilian capitals (Belém, Belo Horizonte, Boa Vista, Fortaleza, Goiânia, Macapá, Manaus, Porto Velho, Rio de Janeiro and, São Paulo) were selected. The groups were clustered according to the periods in which Omicron (case) and Delta (control) VOCs had a minimum prevalence of 90% in each capital. The meta-analysis (random and common effects) and the heterogeneity among capitals were calculated for the following clinical data: need for ventilatory support, intensive care unit (ICU) admission, and death [25]. Then, the same analysis was performed separating the data into two groups: vaccinated (at least one dose) and unvaccinated individuals, to verify the contribution of the vaccination on the disease outcome. The statistical analysis was performed using the R software (R version 4.1.3; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The dataset and code are available in Supplementary File S4.

3. Results

3.1. The Rapid Replacement and Establishment of Omicron VOC in Brazilian territory

After the evaluation of 291,571 nasopharyngeal swab samples from patients tested for routine COVID-19 by RT-qPCR, 77,262 samples had a positive confirmed diagnosis. Belo Horizonte was the capital with the highest number of samples ($n = 49,149$; positive rate = 23.97%), followed by Rio de Janeiro ($n = 6,590$; positive rate = 31.16%), São Paulo ($n = 4,909$; positive rate = 36.76%), Goiânia ($n = 3,248$; positive rate = 25.32%), Brasília ($n = 3,149$; positive rate = 27.68%), Belém ($n = 3,112$; positive rate = 39.17%), Porto Velho ($n = 3,059$; positive rate = 37.59%), Palmas ($n = 1,509$; positive rate = 29.73%), Macapá ($n = 1,131$; positive rate = 44.79%), Manaus ($n = 590$; positive rate = 32.49%), Boa Vista ($n = 468$; positive rate = 36.42%), and Fortaleza ($n = 348$; positive rate = 34.18%) (Figure 1A). The Midwest and Southeast regions had the highest sampling rates (number of samples/population size in each region) concerning the other studied areas (Figure 1B). The number of women with positive results (57.6%) was higher than men (42.4%) in all capitals and age clusters, with an exception for 0 to 9 years old group (Figure 2C). People ranging from 20 to 49 years old represented the group with the highest index of positivity (64.1%; 49,501/77,262). There were no large fluctuations between the proportion of male and female individuals by Brazilian capital (Figure 2D).

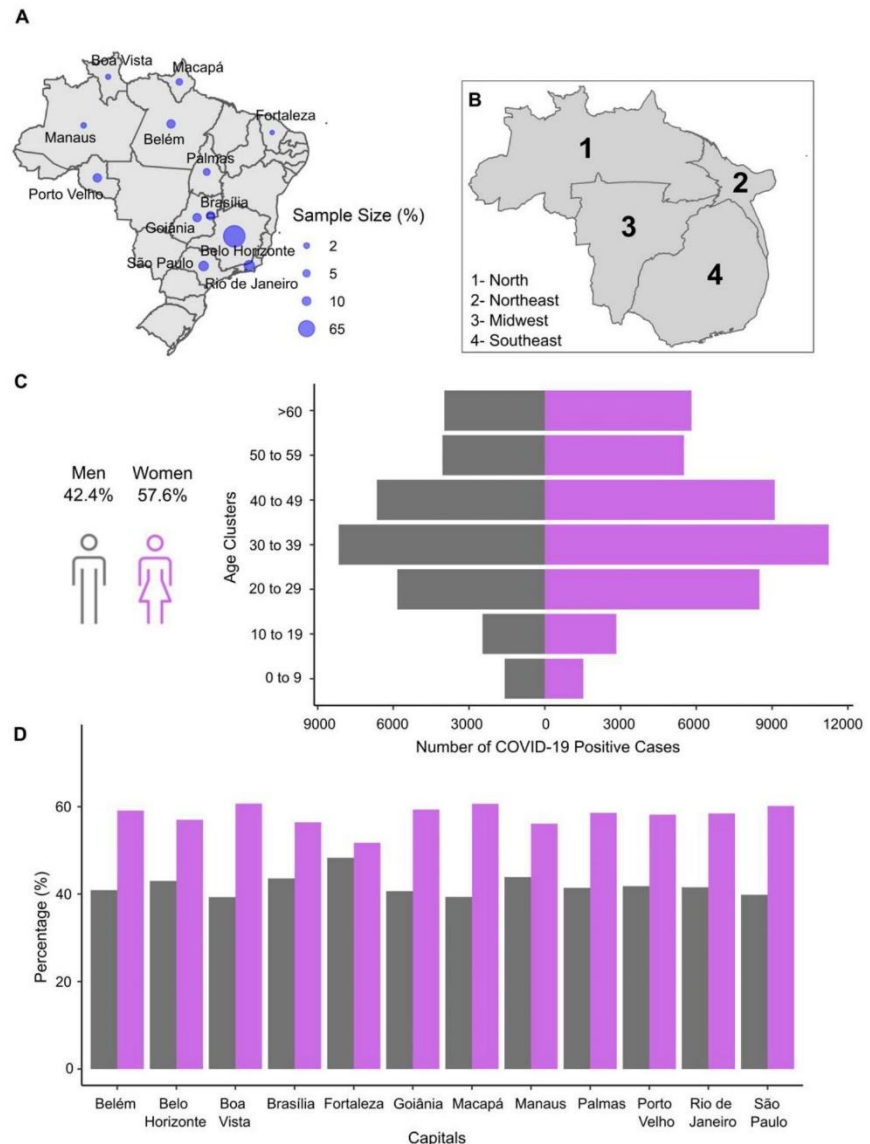


Figure 1. Descriptive analysis of the study design. (A) Twelve capitals distributed along four macroregions of Brazil were included in this study. A total of 77,262 samples with positive confirmed COVID-19 diagnosis were evaluated. The blue circle size represents the proportion of positive samples in each capital; (B) the Cartogram of sample representativeness according to the population of each Brazilian region; (C) Sex and age profile of the study sample (data were grouped by sex and age clusters); and (D) Sex profile by Brazilian capital of the study sample. The grey and magenta bars correspond to men's and women's records, respectively.

We used SGTF profile to identify possible Omicron samples. For that, we only considered positive RT-qPCR samples with CT values <26 for any viral gene (N and ORF1ab) using the TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit. With this strategy we guarantee that the SGTF profile was due mutations 69/70 position in the S gene ruling the influence of lower viral input on primary samples in our analyses. This analysis comprised a final dataset of 35,735 positive samples.

203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217

In the first week of study monitoring (epidemiological week 35), it was observed that Delta VOC (non-SGTF) was already predominant (>90% frequency) in all evaluated capitals, which remained until mid-December/21 (epidemiological week 50) (Figure 2A). Although we detected a remnant of SGTF-positive samples since epidemiological week 36 in Belo Horizonte, the exponential increase of SGTF-positive cases (Omicron VOC) only occurred after epidemiological week 49. This increase in the number of cases of infected individuals resulted in the rapid establishment and predominance of Omicron VOC to detriment of Delta VOC decreasing (Figure 2B). The rise of Omicron cases occurred first in the Southeast region (São Paulo, Rio de Janeiro, and Belo Horizonte), and Goiânia (Midwest region) capitals, where Omicron became predominant in mid-December 2021. On the other hand, in Fortaleza (Northeast region), Brasília (Midwest region), Belém, Boa Vista, Macapá, Manaus, Palmas, and Porto Velho (all in the North region), the rise of Omicron cases occurred slowly, reaching the predominance in January 2022, between epidemiological weeks 1-2 (Figure 2C).

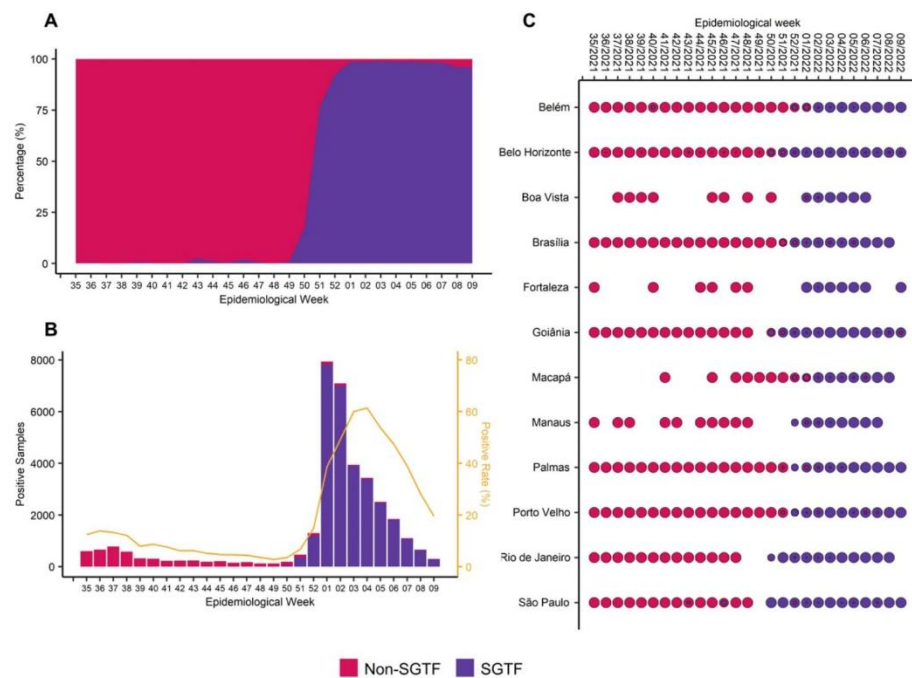


Figure 2. Monitoring of Delta and Omicron VOCs in Brazil. Delta and Omicron variants were represented by red and dark purple colors respectively. (A) Percentage of non-SGTF and SGTF samples per epidemiological week in 35,735 samples across Brazil. (B) Absolute numbers of non-SGTF and SGTF profiles in the positive RT-PCR samples per epidemiological week and positive rate; (C) Transition period between non-SGTF and SGTF samples by capital and epidemiological week. Blank spaces indicate the absence of samples in a particular capital within the specified epidemiological week.

3.2. Sequencing metrics, classification, and phylogeny

During the study monitoring, samples were randomly selected and directed to whole-genome sequencing to confirm the variant detected by the SGTF method (0.31%; 109/35,735). The median genome coverage was 87.6% (63.2 to 98.5%) and the median sequencing depth of 2,749.97x (1,028.22 to 5,239.48x). The sequences were initially analyzed by Pangolin and NextClade tools. Of these, 84 (77.1%) genomes were classified belonging to BA.1 clade: BA.1 (53); BA.1.1 (11); BA.1.1.16 (1); BA.1.1.18 (1); BA.1.14 (1); BA.1.14.1 (7);

BA.1.14.2 (1); BA.1.15 (1); BA.1.16 (3); BA.1.22 (4); BA.1.7 (1), while 25 (22.9%) genomes were classified as BA.2 clade: BA.2 (24) and BA.2.3 (1). Sequencing metrics and Pangolin/Nextclade classification are available in Supplementary Table S4. To corroborate the results found in Pangolin/Nextclade classification, we performed a maximum likelihood analysis. Our phylogenetic reconstruction confirmed the Pango/NextClade for all samples analyzed (Figure 3).

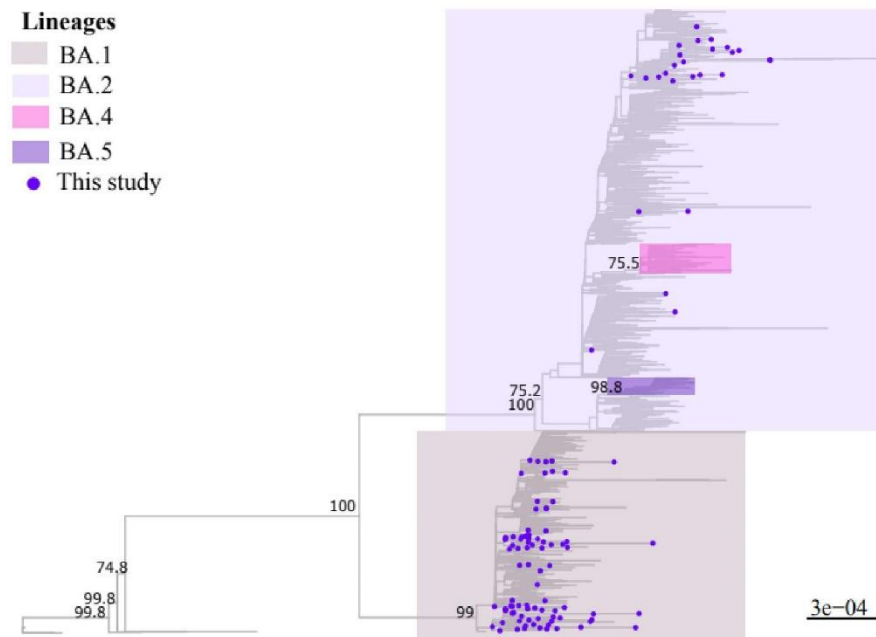


Figure 3. Phylogenetic reconstruction of SARS-CoV-2 during the fourth wave of SAR-CoV-2 in Brazil (epidemiological weeks 35/2021 to 09/2022). The dataset was constructed based on the genomes used by Nextclade as reference for Omicron classification ($n = 1531$). Maximum likelihood phylogenetic tree inferred from our dataset to confirm lineage classification. Purple tip shapes indicate genomes generated in our study ($n = 109$). Node values correspond to bootstrap values. The clades corresponding to the variants BA.1, BA.2, BA.4, and BA.5 are highlighted in gray, lilac, pink, and purple, respectively.

3.3. Omicron-infected individuals present lower viral load in the upper respiratory tract

To determine whether the spread of the Omicron VOC was related to the induction of high viral load in the upper respiratory tract compared to the Delta VOC, we distributed positive RT-qPCR Ct values obtained from infected patients in two groups considering the dominant variant in the studied period. The final dataset consisted of 72,885 samples distributed in the Omicron group ($n = 63,420$) or Delta group ($n = 9,465$).

Comparative analysis by linear regression indicated that the Omicron VOC induces an increase in Ct values in the studied viral targets ($N: \beta = 1.114$, 95% CI = ± 0.125 , $p < 0.001$; ORF1ab: $\beta = 1.304$, 95% CI = ± 0.124 ; $p < 0.001$). While the median Ct in the Omicron group was 18.94 (N) and 19.07 (ORF1ab), the Delta group had lower values, 17.51 (N) and 17.40 (ORF1ab) (Figure 4A and 4C). A residual effect was also inferred for the MS2 exogenous control target (Median Ct: Omicron = 25.58, Delta = 24.97; $\beta = 0.267$, 95% CI = ± 0.064 , $p < 0.001$); however, its effect is almost 5-fold smaller than that calculated for the viral targets (N gene and ORF1ab) (Figure 4E). The Omicron VOC effect on viral load can be followed in Ct values time series along epidemiological weeks (Figure 4B, 4D, and 4F). This trend was observed in most of the Brazilian capitals suggesting lower viral loads of Omicron

VOC assigned positive in the upper respiratory tract compared with Delta VOC (Supplementary Table S5).

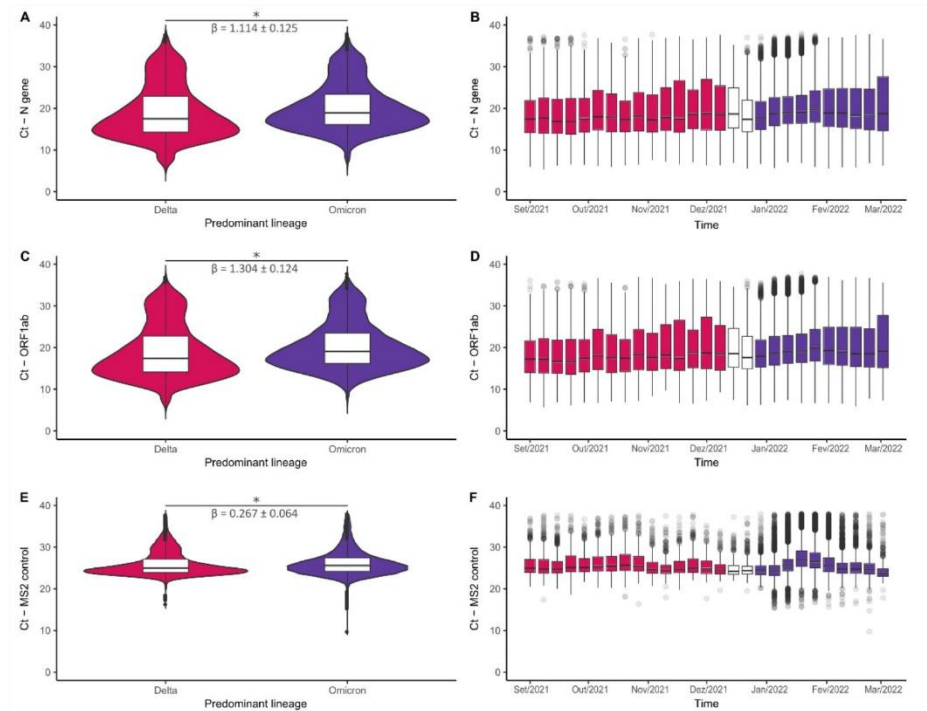


Figure 4. Comparative analysis of RT-qPCR Ct values between Delta and Omicron SARS-CoV-2 VOCs dominance periods. Colors represent the dominant variant, with a frequency above 90% in the analyzed period, being Delta (red) or Omicron (dark purple). Violin plots displaying the distribution of Ct data according to the predominant lineage for the viral targets gene N (A) and ORF1ab (C), and the MS2 internal process control (E). Boxplots display Ct values variation along epidemiological weeks comprised in the study period (29 August 2021 - 5 March 2022) for the viral targets gene N (B), ORF1ab (D), and MS2 internal control (F). Statistical comparison between periods denotes that Omicron VOC might be associated with lower viral loads in the upper respiratory tract than Delta VOC infection. * $p < 0.001$.

3.4 Effect of SARS-CoV-2 variants on symptomatology and clinical data

To explore symptomatologic features from hospitalized patients with suspected COVID-19, we evaluated data from the Brazilian SRAG database in periods dominated by Delta or Omicron VOCs. Three clinical data were accessed: the need for ventilatory support (16,316 patients), ICU admission (16,381 patients), and death (16,258 patients). The meta-analysis results showed that the need for ventilatory support was less frequent in the Omicron group (Odds Ratio—OR: 0.50; 95% CI: 0.43–0.59) than in the Delta group (Figure 5A). There was no statistically significant difference between the Omicron and Delta groups regarding the frequency of ICU admissions and death (Odds Ratio—OR: 0.83; 95% CI: 0.68–1.01 and OR: 1.23; 95% CI: 0.87–1.73, respectively) (Figure 5B and 5C).

280
281
282
283

284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296

297
298
299
300
301
302
303
304
305
306

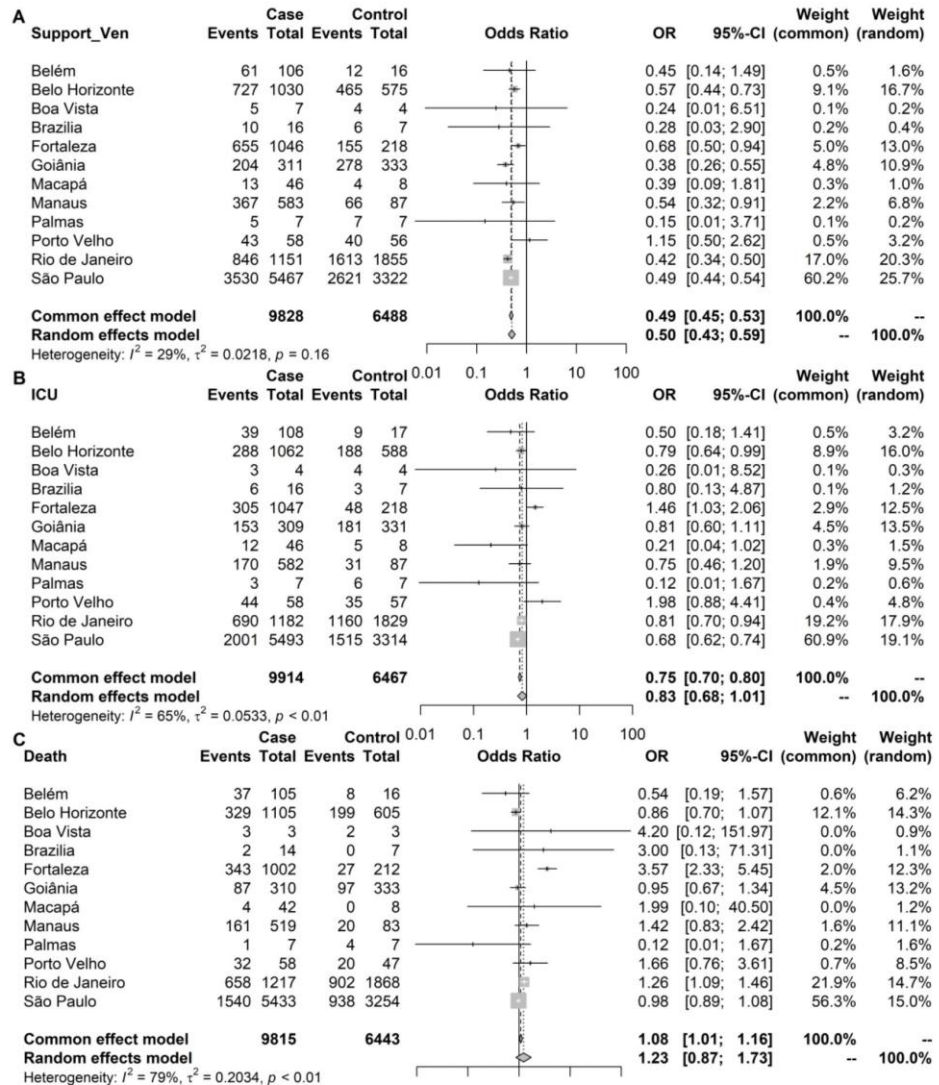


Figure 5: Forest Plot of effect sizes measured between Omicron (case) and Delta (control) groups in COVID-19 patients for: (A) Need for ventilatory support: 9,828 cases and 6,488 controls; (B) Intensive care unit admission: 9,914 cases and 6,467 controls; and (C) Death: 9,815 cases and 6,443 controls, in a meta-analysis of 10 different Brazilian capitals according to the periods in which Omicron (case) and Delta (control) VOCs had a minimum prevalence of 90% in each capital.

4. Discussion

From the onset of the pandemic, epidemiologic surveillance programs have allowed the monitoring of viral spread and VOCs emergence, being one of the forefronts of the COVID-19 combat around the world [44]. Since the beginning of the pandemic, Brazil has been affected by different COVID-19 infection waves, generally related to the introduction and circulation of a new variant, capable of altering the speed of transmission of the disease [45]. As seen in early 2022, the exponential increase of SARS-CoV-2 positive cases in Brazil [2] was due to the Omicron VOC introduction, first detected in São Paulo on November 30, 2022 [14,46].

Recently, our surveillance program described the introduction of Delta VOC in Brazil on June 1, 2021, in Rio de Janeiro and its rapid expansion in Brazilian territory, which

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

reached more than 90% of predominance sixteen weeks later [25]. According to these previous data, Delta VOC was already predominant in all the evaluated Brazilian capitals in epidemiological week 35/2021 [25]. Our results presented here, corroborated with our previous results suggesting that Delta VOC was the most representative variant until epidemiological week 50/2021 in most capitals in Brazil. The arrival of Omicron VOC caused another important change in the epidemiological scenario, culminating in the replacement of the Delta variant by Omicron in approximately 3,5 weeks (Figure 2A), faster than what was observed during Gamma-Delta [6].

Considering the emergence period of the Omicron variant and its introduction in Brazil, we identified in our data its arrival in epidemiological week 49 in Belo Horizonte, on a sample collected on date 2021/12/10. In the following epidemiological week, we observed a dispersion of Omicron VOC in other capitals, such as Brasília, Goiânia, Rio de Janeiro, and São Paulo. Our results showed that the Southeast (Belo Horizonte, Rio de Janeiro e São Paulo) and Midwest (Goiânia) regions were the first affected by Omicron VOC reaching a predominance plateau in mid-December 2021. These cities comprise the main Brazil gateways for foreigners, which may explain the Omicron VOC arrived first in these locations [47]. The other evaluated regions (North and Northeast) reached a plateau shortly afterward, in January 2022.

The SGTF detection method used in this study allowed the identification of SGTF samples from epidemiological week 36 onwards. The SGTF samples identified before epidemiological week 49 possibly indicate the presence of the Alpha VOC, as previously described [25]. The Omicron (sublineages BA.1, BA.4, and BA.5) and Alpha VOCs share the 69-70 deletion in the Spike protein that prevents the oligonucleotide probe from binding to its target sequence, leading to what has been termed SGTF [22]. Due the highly accuracy of SGTF method, this strategy was widely used for monitoring these variants [5,22]. Although the Omicron and Alpha VOCs share this similarity, historically Alpha has remained at a low proportion among the circulating variants in Brazil and without overlapping dates or epidemiological weeks [6]. In contrast, the entry of the Omicron variant in the country caused an expressive increase in the number of cases, coinciding with an increase in the proportion of SGTF variants detected (Figures 2A and 2B). Although we observed that the Omicron VOC viral load is smaller than Delta VOC, the significant increase in the cases number can be explained by superspreading events such as Christmas and New Year's celebration, in addition to the drop in the use of protective measures [48].

In early February 2022, the BA.2 sublineage, which lacks the 69-70 deletion, was inserted in Brazil [49]. In this period, we also identified a trace of this underlining that was included in the non-SGTF group. The SARS-CoV-2 variants and sublineages were detected in a subset by whole-genome sequencing. Our phylogenetic reconstruction indicated that the most representative variant of the dataset was Omicron VOC BA.1, followed by Omicron VOC BA.2 in the analyzed period. These data corroborate with the emergence of variants reported in Brazil and worldwide, in the evaluated period [14,50]. Nevertheless, although the BA.2 sublineage was reported on February 8, 2022, in São Paulo [51], in our study it was detected on February 7, 2022, in Belo Horizonte. Thus, we were able to demonstrate the introduction of this sublineage, before it was primarily reported [51]. This finding reinforces the importance of genomic surveillance for monitoring emerging variants.

Enhanced transmissibility has been related to higher viral load in the upper respiratory tract, as described for the previous Alpha and Delta VOCs [52,53]. The Omicron VOC is known to have higher infectivity than other variants [14,54], having quickly spread and established in Brazil, replacing the Delta VOC in a shorter time than other transitions previously. This phenomenon could be associated with a high viral load in patients infected with the Omicron VOC. To test this hypothesis, we evaluated the dynamics of viral loads measured from RT-qPCR Ct values.

Linear regression modeling showed a higher Ct value for patients infected by Omicron compared to patients infected by the Delta VOC, indicating a significant correlation

between increased frequency of Omicron VOC and decreased viral load. Our analysis also showed a slight increase in Ct value for the internal control (MS2), detecting the existence of random variations during the RT-qPCR diagnostics tests, although its effect is approximately 5-fold less than calculated for viral targets. However, we observed lower Ct values associated with higher viral loads in RT-qPCR tests performed in early January 2022 coinciding with superspreading events, with no variance in the MS2 exogenous Cts values in the same period. Those dates agree with the introduction of BA.1 Omicron sub-variant explained the third wave of COVID-19 during this period, showing the highest number of cases and transmission in Brazil [2,44]. Our findings are consistent with recent reports suggesting that the increased transmissibility of Omicron VOC is not due to a high viral load in the upper respiratory tract [55–57]. It is probably related to other mechanisms than higher viral excretion, such as increased affinity to the receptor of human cells and decreased sensitivity to immunity due to the many mutations of the spike protein, [54,58,59].

It was also suggested that the Omicron VOC has a lower virulence when compared with the Delta VOC [60]. To assess this tendency, we evaluated records from hospitalized patients from the Brazilian SRAG database in periods dominated by Delta or Omicron VOCs. The clinical data evaluated from COVID-19 patients showed that the Omicron VOC had less or equal severity than the Delta VOC. This result agrees with data from previous studies that also described severe cases decrease by Omicron VOC infection [61–63].

5. Conclusion

Brazil was marked by different epidemiological scenarios, with four waves of COVID-19 infection, reaching a large proportion in the number of infections and deaths. These waves were always attached to the emergence of new VOCs that allowed the maintenance and circulation of the virus in the country. In this way, the establishment of monitoring activities and characterization of circulating variants is important for the development of public health strategies that can be employed to contain the COVID-19 pandemic.

The results of this study represented the continuity of a SARS-CoV-2 national surveillance program. Here we described the monitoring study between August 2021 and March 2022 that detected the introduction and fast establishment of Omicron VOC in Brazil in late 2021. The continental dimensions of the country and different public health policies represent challenges in tracking the evolution and dissemination of VOCs. Nevertheless, our program was able to generate data that could provide support to public authorities, which would contribute to controlling strategies of the COVID-19 pandemic, reinforcing the importance of the creation and maintenance of nationwide surveillance programs, not only to SARS-CoV-2 but also to other infectious diseases.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at www.mdpi.com/xxx/s1, File S1: Dataset and scripts used in the genotyping analysis of SARS-CoV-2 variants; File S2: Dataset and code used in lineage classification and phylogenetic analysis; File S3: RT-qPCR Ct data and script used in this study; File S4: Symptomatology data and the script used in meta-analysis; Figure S1: Symptomatology analysis in Omicron (case) and Delta (control) groups in COVID-19 patients vaccinated from ten different capitals of Brazil; Figure S2: Symptomatology analysis in Omicron (case) and Delta (control) groups in COVID-19 patients unvaccinated from ten different capitals of Brazil; Table S1: GISAID access number for consensus genome sequences characterized in this study; Table S2: GISAID acknowledgment table; Table S3: Delta and Omicron VOCs dominance periods in each capital; Table S4: Metadata, sequencing statistics, and lineage classification for all samples characterized through genome sequencing; Table S5: Lineage effect on Ct value at the national level and for each capital using a linear regression model.

Author Contributions: J.P.S., A.B.L., L.B.A., F.S.V.M., and C.P.T.B.M. carried out most of the experiments. D. C. Q. and L.C.G.A.S. prepared samples for sequencing. P.L.C.F. performed the data sequencing analysis and phylogeny. J.P.S., A.B.L., L.B.A., F.S.V.M., C.P.T.B.M., A.H.B.C., J.S.H.R. and

D.A.G.Z. drafted the manuscript. R.P.S., R.S.A., A.C.S.F., and D.A.G.Z participated in the design and conceived the study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Grupo Pardini S/A in collaboration with CNPq (R.S.A.: 312688/2017-2 and 439119/2018-9; R.P.S.: 310627/2018-4), MEC/CAPES 118 (14/2020 - 23072.211119/2020-10), FINEP (0494/20 01.20.0026.00), UFMG-NB3, FINEP nº 1139/20 (RSA), FAPEMIG (R.P.S.: APQ-00475-20) and FAPERJ (R.S.A 202.922/2018). We acknowledge support from the Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP affiliated to RedeVirus/MCTI (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- World Health Organization WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 23 February 2023).
- Ministério da Saúde Painel Coronavírus Available online: <https://covid.saude.gov.br/> (accessed on 11 December 2022).
- Thanh Le, T.; Andreadakis, Z.; Kumar, A.; Gómez Román, R.; Tollefsen, S.; Saville, M.; Mayhew, S. The COVID-19 Vaccine Development Landscape. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 305–306, doi:10.1038/d41573-020-00073-5.
- Sobczak, M.; Pawliczak, R. Factors That Affect the COVID-19 Pandemic in Summer 2022 Compared to Summer 2021. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, doi:10.3390/ijerph191912561.
- World Health Organization Tracking SARS-CoV-2 Variants Available online: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (accessed on 13 December 2022).
- Alcantara, L.C.J.; Nogueira, E.; Shuab, G.; Tosta, S.; Fristch, H.; Pimentel, V.; Souza-Neto, J.A.; Coutinho, L.L.; Fukumasu, H.; Sampaio, S.C.; et al. SARS-CoV-2 Epidemic in Brazil: How the Displacement of Variants Has Driven Distinct Epidemic Waves. *Virus Res.* **2022**, *315*, doi:10.1016/j.virusres.2022.198785.
- Thakur, V.; Bhola, S.; Thakur, P.; Patel, S.K.S.; Kulshrestha, S.; Ratho, R.K.; Kumar, P. Waves and Variants of SARS-CoV-2: Understanding the Causes and Effect of the COVID-19 Catastrophe. *Infection* **2022**, *50*, 309–325, doi:10.1007/s15010-021-01734-2.
- Zeng, B.; Gao, L.; Zhou, Q.; Yu, K.; Sun, F. Effectiveness of COVID-19 Vaccines against SARS-CoV-2 Variants of Concern: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Med.* **2022**, *20*, 1–15, doi:10.1186/s12916-022-02397-y.
- Volz, E.; Mishra, S.; Chand, M.; Barrett, J.C.; Johnson, R.; Geidelberg, L.; Hinsley, W.R.; Laydon, D.J.; Dabrera, G.; O’Toole, Á.; et al. Assessing Transmissibility of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England. *Nature* **2021**, *593*, 266–269, doi:10.1038/s41586-021-03470-x.
- Tegally, H.; Wilkinson, E.; Giovanetti, M.; Iranzadeh, A.; Fonseca, V.; Giandhari, J.; Doolabh, D.; Pillay, S.; San, E.J.; Msomi, N.; et al. Detection of a SARS-CoV-2 Variant of Concern in South Africa. *Nature* **2021**, *592*, 438–443, doi:10.1038/s41586-021-03402-9.
- Faria, N.R.; Mellan, T.A.; Whittaker, C.; Claro, I.M.; Candido, D. da S.; Mishra, S.; Crispim, M.A.E.; Sales, F.C.S.; Hawryluk, I.; McCrone, J.T.; et al. Genomics and Epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 Lineage in Manaus, Brazil. *Science* (80-.). **2021**, *372*, 815–821, doi:10.1126/science.abh2644.
- Naveca, F.G.; Nascimento, V.; de Souza, V.C.; Corado, A. de L.; Nascimento, F.; Silva, G.; Costa, Á.; Duarte, D.; Pessoa, K.; Mejía, M.; et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, Was Driven by the Persistence of Endemic Lineages and P.1 Emergence. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1230–1238, doi:10.1038/s41591-021-01378-7.
- Cherian, S.; Potdar, V.; Jadhav, S.; Yadav, P.; Gupta, N.; Das, M.; Rakshit, P.; Singh, S.; Abraham, P.; Panda, S. Sars-Cov-2 Spike Mutations, L452r, T478k, E484q and P681r, in the Second Wave of Covid-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1–11, doi:10.3390/microorganisms9071542.

14. Viana, R.; Moyo, S.; Amoako, D.G.; Tegally, H.; Scheepers, C.; Althaus, C.L.; Anyaneji, U.J.; Bester, P.A.; Boni, M.F.; Chand, M.; et al. Rapid Epidemic Expansion of the SARS-CoV-2 Omicron Variant in Southern Africa. *Nature* **2022**, *603*, 679–686, doi:10.1038/s41586-022-04411-y. 475–477
15. Tao, K.; Tzou, P.L.; Nouhin, J.; Gupta, R.K.; de Oliveira, T.; Kosakovsky Pond, S.L.; Fera, D.; Shafer, R.W. The Biological and Clinical Significance of Emerging SARS-CoV-2 Variants. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *22*, 757–773, doi:10.1038/s41576-021-00408-x. 478–480
16. Nonaka, C.K.V.; Gräf, T.; Barcia, C.A. de L.; Costa, V.F.; de Oliveira, J.L.; Passos, R. da H.; Bastos, I.N.; de Santana, M.C.B.; Santos, I.M.; de Sousa, K.A.F.; et al. SARS-CoV-2 Variant of Concern P.1 (Gamma) Infection in Young and Middle-Aged Patients Admitted to the Intensive Care Units of a Single Hospital in Salvador, Northeast Brazil, February 2021. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *111*, 47–54, doi:10.1016/j.ijid.2021.08.003. 481–484
17. Taylor, C.A.; Patel, K.; Pham, H.; Whitaker, M.; Anglin, O.; Kambhampati, A.K.; Milucky, J.; Chai, S.J.; Kirley, P.D.; Alden, N.B.; et al. Severity of Disease Among Adults Hospitalized with Laboratory-Confirmed COVID-19 Before and During the Period of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Predominance — COVID-NET, 14 States, January–August 2021. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 1513–1519, doi:10.15585/mmwr.mm7043e1. 485–488
18. Kupferschmidt, Kai; Vogel, G. *Science*. 2021, pp. 1304–1306. 489
19. S. Kannan, P. Shaik Syed Ali, A.S. Omicron (B.1.1.529) – Variant of Concern – Molecular Profile and Epidemiology: A Mini Review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2021**, *49*, W431–W437, doi:10.26355/eurrev_202112_27653. 490–492
20. World Health Organization Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern Available online: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (accessed on 23 February 2023). 493–495
21. Li, B.; Lu, X.; McAndrews, K.M.; Kalluri, R. Mutations in the Spike RBD of SARS-CoV-2 Omicron Variant May Increase Infectivity without Dramatically Altering the Efficacy of Current Multi-Dosage Vaccinations. *bioRxiv* **2021**, 2021.12.08.471688. 496–498
22. McMillen, T.; Jani, K.; Robilotti, E. V.; Kamboj, M.; Babady, N.E. The Spike Gene Target Failure (SGTF) Genomic Signature Is Highly Accurate for the Identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 Variants. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–8, doi:10.1038/s41598-022-21564-y. 499–501
23. Zhou, Y.; Zhi, H.; Teng, Y. The Outbreak of SARS-CoV-2 Omicron Lineages, Immune Escape, and Vaccine Effectivity. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, doi:10.1002/jmv.28138. 502–503
24. Focosi, D.; McConnell, S.; Casadevall, A. The Omicron Variant of Concern: Diversification and Convergent Evolution in Spike Protein, and Escape from Anti-Spike Monoclonal Antibodies. *Drug Resist. Updat.* **2022**, *65*, 100882, doi:10.1016/j.drug.2022.100882. 504–506
25. Silva, J.P.; de Lima, A.B.; Alvim, L.B.; Malta, F.S.V.; Mendonça, C.P.T.B.; Fonseca, P.L.C.; Moreira, F.R.R.; Queiroz, D.C.; Ferreira, J.G.G.; Ferreira, A.C.S.; et al. Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program. *Viruses* **2022**, *14*, doi:10.3390/v14050847. 507–509
26. Francis, A.I.; Ghany, S.; Gilkes, T.; Umakanthan, S. Review of COVID-19 Vaccine Subtypes, Efficacy and Geographical Distributions. *Postgrad. Med. J.* **2022**, *98*, 389–394, doi:10.1136/postgradmedj-2021-140654. 510–511
27. Menezes, D.; Fonseca, P.L.C.; de Araújo, J.L.F.; Souza, R.P. de SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Brazil: A Systematic Review with Scientometric Analysis. *Viruses* **2022**, *14*, doi:10.3390/v14122715. 512–513
28. Koelle, K.; Martin, M.A.; Antia, R.; Lopman, B.; Dean, N.E. The Changing Epidemiology of SARS-CoV-2. *Science (80-.)*. **2022**, *375*, 1116–1121, doi:10.1126/science.abm4915. 514–515
29. Wickham, H. Elegant Graphics for Data Analysis: Ggplot2. *Appl. Spat. Data Anal. with R* **2008**, 21–54. 516

30. Moreira, F.R.R. ViralUnity Available online: <https://github.com/filiperomero2/ViralUnity> (accessed on 25 December 2022). 517
518
31. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170. 519
520
32. Li, H. Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 3094–3100, doi:10.1093/bioinformatics/bty191. 521
522
33. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352. 523
524
525
34. Li, H. A Statistical Framework for SNP Calling, Mutation Discovery, Association Mapping and Population Genetical Parameter Estimation from Sequencing Data. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2987–2993, doi:10.1093/bioinformatics/btr509. 526
527
528
35. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842, doi:10.1093/bioinformatics/btq033. 529
530
36. O’Toole, Á.; Scher, E.; Underwood, A.; Jackson, B.; Hill, V.; McCrone, J.T.; Colquhoun, R.; Ruis, C.; Abu-Dahab, K.; Taylor, B.; et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evol.* **2021**, *7*, 1–9, doi:10.1093/ve/veab064. 531
532
533
37. Aksamentov, I.; Roemer, C.; Hodcroft, E.; Neher, R. Nextclade: Clade Assignment, Mutation Calling and Quality Control for Viral Genomes. *J. Open Source Softw.* **2021**, *6*, 3773, doi:10.21105/joss.03773. 534
535
38. Hadfield, J.; Megill, C.; Bell, S.M.; Huddleston, J.; Potter, B.; Callender, C.; Sagulenko, P.; Bedford, T.; Neher, R.A. NextStrain: Real-Time Tracking of Pathogen Evolution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 4121–4123, doi:10.1093/bioinformatics/bty407. 536
537
538
39. Minh, B.Q.; Schmidt, H.A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M.D.; Von Haeseler, A.; Lanfear, R.; Teeling, E. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *37*, 1530–1534, doi:10.1093/molbev/msaa015. 539
540
541
40. Yang, Z. Maximum Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA Sequences with Variable Rates over Sites: Approximate Methods. *J. Mol. Evol.* **1994**, *39*, 306–314, doi:10.1007/BF00160154. 542
543
41. Moreira, F.R.R.; D’Arc, M.; Mariani, D.; Herlinger, A.L.; Schiffler, F.B.; Rossi, Á.D.; Leitão, I.D.C.; Miranda, T.D.S.; Cosentino, M.A.C.; Tôrres, M.C.D.P.; et al. Epidemiological Dynamics of SARS-CoV-2 VOC Gamma in Rio de Janeiro, Brazil. *Virus Evol.* **2021**, *7*, doi:10.1093/ve/veab087. 544
545
546
42. Hay, J.A.; Kennedy-Shaffer, L.; Kanjilal, S.; Lennon, N.J.; Gabriel, S.B.; Lipsitch, M.; Mina, M.J. Estimating Epidemiologic Dynamics from Cross-Sectional Viral Load Distributions. *Science (80-.).* **2021**, *373*, doi:10.1126/science.abh0635. 547
548
549
43. Ministério da Saúde SRAG - Banco de Dados de Síndrome Respiratória Aguda Grave Available online: <https://opendatasus.saude.gov.br/dataset/srag-2021-e-2022> (accessed on 28 September 2022). 550
551
44. Centers for Disease Control and Prevention About COVID-19 Epidemiology Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/about-epidemiology/index.html> (accessed on 28 December 2022). 552
553
554
45. World Health Organization COVID-19: Variants Available online: <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/covid-19/information/covid-19-variants> (accessed on 28 December 2022). 555
556
557
46. Governo do Estado de São Paulo São Paulo Confirma Os Dois Primeiros Casos Da Variante Ômicron No Brasil 558

- Available online: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/noticias-coronavirus/sp-confirma-os-dois-primeiros-casos-da-variante-omicron-no-brasil/> (accessed on 28 December 2022). 559
560
47. Viana, P. Aeroportos Mais Movimentados Do Brasil Available online: <https://www.aeroflap.com.br/veja-quais-foram-os-aeroportos-mais-movimentados-do-brasil-no-inicio-de-2022/> (accessed on 23 February 2023). 561
562
48. Aragão, D.P.; Dos Santos, D.H.; Mondini, A.; Gonçalves, L.M.G. National Holidays and Social Mobility Behaviors: Alternatives for Forecasting Covid-19 Deaths in Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, doi:10.3390/ijerph182111595. 563
564
565
49. Kimura, I.; Yamasoba, D.; Tamura, T.; Nao, N.; Suzuki, T.; Oda, Y.; Mitoma, S.; Ito, J.; Nasser, H.; Zahradnik, J.; et al. Virological Characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 Subvariants, Including BA.4 and BA.5. *Cell* **2022**, *185*, 3992–4007.e16, doi:10.1016/j.cell.2022.09.018. 566
567
568
50. Dhawan, M.; Priyanka; Choudhary, O.P. Emergence of Omicron Sub-Variant BA.2: Is It a Matter of Concern amid the COVID-19 Pandemic? *Int. J. Surg.* **2022**, *99*, 106581, doi:10.1016/j.ijisu.2022.106581. 569
570
51. Valente, J. Brazil Confirms First Case of Omicron Subvariant Available online: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/en/saude/noticia/2020-02/brazil-confirms-first-case-coronavirus> (accessed on 28 December 2022). 571
572
573
52. Teyssou, E.; Delagrèverie, H.; Visseaux, B.; Lambert-Niclot, S.; Brichler, S.; Ferre, V.; Marot, S.; Jary, A.; Todesco, E.; Schnuriger, A.; et al. The Delta SARS-CoV-2 Variant Has a Higher Viral Load than the Beta and the Historical Variants in Nasopharyngeal Samples from Newly Diagnosed COVID-19 Patients. *J. Infect.* **2021**, *83*, e1–e3, doi:10.1016/j.jinf.2021.08.027. 574
575
576
577
53. Kidd, M.; Richter, A.; Best, A.; Cumley, N.; Mirza, J.; Percival, B.; Mayhew, M.; Megram, O.; Ashford, F.; White, T.; et al. S-Variant SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Is Associated With Significantly Higher Viral Load in Samples Tested by TaqPath Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.* **2021**, *223*, 1666–1670, doi:10.1093/infdis/jiab082. 578
579
54. Yuasa, S.; Nakajima, J.; Takatsuki, Y.; Takahashi, Y.; Tani-Sassa, C.; Iwasaki, Y.; Nagano, K.; Sonobe, K.; Yoshimoto, T.; Nukui, Y.; et al. Viral Load of SARS-CoV-2 Omicron Is Not High despite Its High Infectivity. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 5543–5546, doi:10.1002/jmv.27974. 581
582
583
55. Sentis, C.; Billaud, G.; Bal, A.; Frobert, E.; Bouscambert, M.; Destras, G.; Josset, L.; Lina, B.; Morfin, F.; Gaymard, A. SARS-CoV-2 Omicron Variant, Lineage BA.1, Is Associated with Lower Viral Load in Nasopharyngeal Samples Compared to Delta Variant. *Viruses* **2022**, *14*, 919, doi:10.3390/v14050919. 584
585
586
56. Puhach, O.; Adea, K.; Hulo, N.; Sattonnet, P.; Genecand, C.; Iten, A.; Jacquérior, F.; Kaiser, L.; Vetter, P.; Eckerle, I.; et al. Infectious Viral Load in Unvaccinated and Vaccinated Individuals Infected with Ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 1491–1500, doi:10.1038/s41591-022-01816-0. 587
588
589
57. Laitman, A.M.; Lieberman, J.A.; Hoffman, N.G.; Roychoudhury, P.; Mathias, P.C.; Greninger, A.L. The SARS-CoV-2 Omicron Variant Does Not Have Higher Nasal Viral Loads Compared to the Delta Variant in Symptomatic and Asymptomatic Individuals. *J. Clin. Microbiol.* **2022**, *60*, 21–23, doi:10.1128/jcm.00139-22. 590
591
58. Iketani, S.; Liu, L.; Guo, Y.; Liu, L.; Chan, J.F.W.; Huang, Y.; Wang, M.; Luo, Y.; Yu, J.; Chu, H.; et al. Antibody Evasion Properties of SARS-CoV-2 Omicron Sublineages. *Nature* **2022**, *604*, 553–556, doi:10.1038/s41586-022-04594-4. 592
593
594
595
59. Hong, Q.; Han, W.; Li, J.; Xu, S.; Wang, Y.; Xu, C.; Li, Z.; Wang, Y.; Zhang, C.; Huang, Z.; et al. Molecular Basis of Receptor Binding and Antibody Neutralization of Omicron. *Nature* **2022**, *604*, 546–552, doi:10.1038/s41586-022-04581-9. 596
597
598
60. Nyberg, T.; Ferguson, N.M.; Nash, S.G.; Webster, H.H.; Flaxman, S.; Andrews, N.; Hinsley, W.; Bernal, J.L.; Kall, M.; Bhatt, S.; et al. Comparative Analysis of the Risks of Hospitalisation and Death Associated with SARS-CoV- 599
600

- 2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) Variants in England: A Cohort Study. *Lancet* **2022**, *399*, 1303–1312, doi:10.1016/S0140-6736(22)00462-7. 601
602
61. Menni, C.; Valdes, A.M.; Polidori, L.; Antonelli, M.; Penamakuri, S.; Nogal, A.; Louca, P.; May, A.; Figueiredo, J.C.; Hu, C.; et al. Symptom Prevalence, Duration, and Risk of Hospital Admission in Individuals Infected with SARS-CoV-2 during Periods of Omicron and Delta Variant Dominance: A Prospective Observational Study from the ZOE COVID Study. *Lancet* **2022**, *399*, 1618–1624, doi:10.1016/S0140-6736(22)00327-0. 603
604
605
606
62. Kim, M.K.; Lee, B.; Choi, Y.Y.; Um, J.; Lee, K.S.; Sung, H.K.; Kim, Y.; Park, J.S.; Lee, M.; Jang, H.C.; et al. Clinical Characteristics of 40 Patients Infected With the SARS-CoV-2 Omicron Variant in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **2022**, *37*, 6–10, doi:10.3346/JKMS.2022.37.E31. 607
608
609
63. Wolter, N.; Jassat, W.; Walaza, S.; Welch, R.; Moultrie, H.; Groome, M.; Amoako, D.G.; Everatt, J.; Bhiman, J.N.; Scheepers, C.; et al. Early Assessment of the Clinical Severity of the SARS-CoV-2 Omicron Variant in South Africa: A Data Linkage Study. *Lancet* **2022**, *399*, 437–446, doi:10.1016/S0140-6736(22)00017-4. 610
611
612
613

6. CAPÍTULO III – Divulgação de resultados aos órgãos de saúde pública e sociedade

Neste capítulo apresentamos a divulgação aos órgãos de saúde pública e sociedade em geral dos resultados encontrados através do OvigenMG e BR para a tomada de decisões com relação ao controle da transmissão de COVID-19, locais a serem monitorados e possível aumento de casos graves e internações em hospitais referências.

- OViGen – Observatório de Vigilância Genômica



Ações de enfrentamento à COVID-19

OViGen – Observatório de Vigilância Genômica

[Retornar](#)

O surgimento de variantes e a dispersão do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) permanecem como grandes desafios às políticas de saúde pública para o enfrentamento da pandemia de COVID-19 no Estado de Minas Gerais. Tais variantes já foram associadas a mudanças clínico-epidemiológicas relevantes como: maiores cargas virais durante a infecção, maior gravidade da manifestação da COVID-19 e mesmo, maior chance de óbito. As variantes mais significativas na realidade brasileira até o momento são: alfa, originalmente identificada no Reino Unido; gama, originalmente identificada em Manaus; zeta, originalmente descrita no Rio de Janeiro e, mais recentemente, a delta, originalmente identificada na Índia.

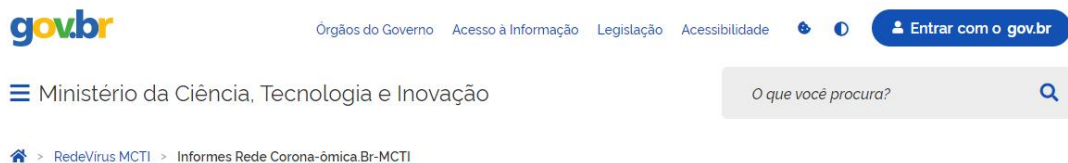
Em uma parceria entre o Laboratório de Biologia Integrativa (LBI) do ICB e Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina (NUPAD) ambos da UFMG. Secretaria de Saúde de Minas

Minas Gerais

- [Comunicado 0020 \(04 de Abril de 2023\)](#)
- [Comunicado 0019 \(13 de fevereiro de 2023\)](#)
- [Comunicado 0018 \(12 de dezembro de 2022\)](#)
- [Comunicado 0017 \(18 de outubro de 2022\)](#)
- [Comunicado 0016 \(18 de julho de 2022\)](#)
- [Comunicado 0015 \(23 de junho de 2022\)](#)
- [Comunicado 0014 \(09 de maio de 2022\)](#)
- [Comunicado 0013 \(25 de abril de 2022\)](#)

Link de acesso: <http://pggenetica.icb.ufmg.br/acoesCOVID/ovigen.php>

- Informes Rede Corona-ômica.Br - MCTI



Informes Rede Corona-ômica.Br-MCTI



Informe vigilância Genômica -



Variante Delta é encontrada nas



Monitoramento de diferentes variantes

Link de acesso: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/coronavirus/informes-rede-coronaomicabr-mcti>

- Mundo Pardini - Boletim Semanal COVID-19

The screenshot shows the top navigation bar of the Grupo Pardini website. The logo 'GRUPO PARDINI' is on the left, with 'INVESTIDORES' below it. On the right, there are links for 'SITE INSTITUCIONAL' and 'ENGLISH', and a search bar with the text 'Faça sua busca aqui...'. Below the navigation bar is a dark banner with the text 'Apresentações e Comunicados'. Underneath the banner, there is a breadcrumb trail: 'Você está em: Hermes Pardini > Apresentações e Comunicados > Boletim Semanal'. To the right of the breadcrumb trail are icons for font size adjustment (A+, A-) and a star icon. Below this is the heading 'BOLETIM SEMANAL' with a dropdown menu set to '2022'. The main content area lists two items:

- 05/04/2022 Mundo Pardini - Boletim Semanal COVID-19 - 38ª Edição
- 29/03/2022 Mundo Pardini - Boletim Semanal COVID-19 - 37ª Edição

Link de acesso:

<https://hermespardini.riprisma.com/list.aspx?idCanal=XWjCsGgojj0NuhuHQqZ35g==&linguagem=pt&ano=2022>

7. DISCUSSÃO

A pandemia de COVID-19 causou danos catastróficos de ordem de saúde pública, epidemiológica, socioeconômica e política em escala global. A evolução de SARS-CoV-2 acompanhada pela sua rápida disseminação por todos os continentes assolou milhões de pessoas^{62,63}. O Brasil está entre os países mais afetados pela pandemia COVID-19. O primeiro caso de infecção por SARS-CoV-2 no Brasil foi registrado em 25 de fevereiro de 2020 e, por ser o maior país da América Latina, o número de casos e mortes teve um aumento rápido e contínuo⁶⁴. Assim, iniciativas de vigilância epidemiológica que buscam o rastreamento do vírus, bem como o entendimento sobre sua dinâmica, evolução e dispersão viral são papéis fundamentais para adoção de estratégias de contenção da pandemia⁶⁵. Desse modo, este projeto visou avaliar dinâmica de variantes de SARS-CoV-2 no Brasil e seu impacto nas taxas de transmissão e severidade dos casos de COVID-19.

Diversas abordagens para o rastreamento de SARS-CoV-2 foram empregadas por toda a comunidade científica ao longo da pandemia de COVID-19. O sequenciamento do genoma completo por NGS permitiu a rápida identificação de SARS-CoV-2, o estabelecimento das mutações definidoras, além de contribuir para estudos robustos de filogenia e filogeografia^{66,67}. O conhecimento acerca das mutações definidoras de cada variante, permitiu o rápido desenvolvimento de testes de RT-qPCR que possui inúmeras vantagens como alta sensibilidade e especificidade, técnica menos laboriosa e baixo custo comparado a outras metodologias^{68,69}. Neste presente projeto, um conjunto de mutações definidoras foram selecionadas pela tecnologia de sondas TaqMan para a identificação das variantes circulantes no Brasil no período avaliado (abril/2021 a março/2023), o que permitiu o rastreio de possíveis variantes ainda não descritas, confirmadas por NGS.

Segundo nossos dados, foi possível a identificação de duas ondas de infecção por COVID-19, que de acordo com os dados epidemiológicos, coincidiram com a segunda e terceira onda no primeiro trimestre de 2021 e dezembro/2022, respectivamente⁵¹. A variante Gama, foi reportada pela primeira vez no estado do Amazonas em final de novembro de 2020 e se espalhou por todo o Brasil em um curto intervalo de tempo, trazendo grandes impactos à saúde pública e caracterizando a segunda onda de infecções⁵⁰. Sua rápida disseminação pode se explicar pelo fato de que esta variante apresenta um conjunto de 17 mutações sendo que, três delas presentes na proteína S (K417T, E484K e N501Y) estão associadas ao aumento da ligação ao receptor humano ACE2⁷⁰. Verificamos em nosso estudo que essa variante foi prevalente no Brasil até meados de julho de 2021. Em paralelo, identificamos a introdução da variante Delta no Brasil, que foi primeiramente detectada na Índia em outubro de 2020, anteriormente a primeira descrição da variante Gama. Esta, por ser uma variante de

origem brasileira, se disseminou em território nacional mais rapidamente. Alguns estudos indicaram que a transmissão comunitária da VOC Delta ocorreu no Rio de Janeiro e possivelmente tenha começado em junho, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo onde mostramos a importância da região sudeste nos casos de importação nos demais estados brasileiros^{71,72}. Observamos também que a VOC Delta atingiu uma predominância acima de 90% em setembro de 2021 em diversas capitais do Brasil como Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Belém e Porto Alegre.

Nossos resultados mostraram a ocorrência das variantes Alfa (B.1.1.7) e Zeta (P.2) em menor frequência no período de abril a julho de 2021. A variante Alfa foi identificada primeiramente no Reino Unido em dezembro de 2020. Essa variante possui um conjunto de 17 mutações, das quais oito encontram-se na proteína S, que medeia a ligação e a entrada do SARS-CoV-2 nas células humanas^{73,74}. Ainda assim, essa variante teve sua introdução no Brasil, mas não se fixou em território nacional, com taxas de infecção inferiores a 10% entre os pacientes positivos para COVID-19⁷⁵. A introdução e disseminação da VOC Gama no Brasil ocorreu logo em seguida à introdução da VOC Alfa. A competição entre variantes pelo nicho de indivíduos propensos é esperada, sugerindo uma desvantagem de aptidão viral. Caso similar ocorreu na Índia, onde a VOC Alfa foi dominante até o surgimento da variante Kappa⁷⁶. Outros fatores podem explicar o não estabelecimento da VOC Alfa no Brasil como o background genético brasileiro e sua suscetibilidade à infecção pelo SARS-CoV-2. Grande parte dos casos de Alfa evidenciados neste trabalho foram encontrados em regiões com alta taxa de migração entre brasileiros oriundos dos Estados Unidos. A linhagem Zeta foi identificada pela primeira vez no Rio de Janeiro, em outubro de 2020⁷⁷, embora Lamarca e colaboradores, 2021 estimaram que sua origem tenha sido em fevereiro de 2020⁷⁸. Nossas análises filogenéticas, realizadas em um grupo de amostras, confirmaram as classificações realizadas por genotipagem por RT-qPCR, além da identificação da nova linhagem P.4 oriunda do estado de São Paulo e identificada agora na cidade de Aracaju (Sergipe) mostrando a sua disseminação. Apesar disso, ela não se espalhou no Brasil ficando restrita nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo⁵⁴.

No cenário da pandemia, o número de casos de infecções por COVID-19 reduziu significativamente à medida em que intervenções não farmacológicas e farmacológicas tais como o distanciamento social, o uso de máscaras e a implementação de vacinas foram melhor estabelecidas^{79,80}. Entretanto, no final de 2021, eventos de campanhas, como passeatas e carreatas, festas de final de ano e a redução/desleixo no uso de NPIs favoreceram a manutenção do crescimento exponencial de casos positivos em 2020/2021⁵¹. Em novembro deste ano, o mundo se deparou com a emergência de mais uma variante, a variante Ômicron. Esta variante foi primeiramente reportada na África do Sul, mas também em diversos outros países, e causou grande preocupação as autoridades públicas diante do conjunto de

mutações que ela carrega consigo^{81,82}. Os eventos de superdispersão viral como os citados acima ocorreram na mesma época de emergência da VOC Ômicron e contribuiu para sua disseminação em todo o mundo. Estes eventos estão associados a emergência de novas variantes e aumento das taxas de transmissão^{83,84}.

Dentre as mais de 50 mutações presentes na variante Ômicron, 36 delas encontram-se na proteína S, sendo a deleção do aminoácido 69/70 responsável pela falha de detecção do gene S (SGTF) no kit de diagnóstico utilizado neste trabalho⁸⁵. A 69del ocorre na região exata da proteína S avaliada pelo kit TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR (Thermo Fisher). Salieta-se que a falha de amplificação causada pela deleção não inviabiliza o diagnóstico de COVID-19 visto que o kit detecta mais duas outras regiões genômicas do SARS-CoV-2 (N e ORF1ab). Utilizando este critério, amostras com SGTF puderam ser, portanto, utilizadas como marcador da variante Ômicron⁸⁶. Essa e outras mutações também presentes estão relacionadas com uma maior infectividade, maior capacidade de evadir o sistema imune e outros^{29,52}.

De acordo com os resultados deste estudo, enquanto que a VOC Delta se tornou predominante em dezesseis semanas, nossos resultados indicaram que com apenas três semanas a VOC Ômicron, descrita no Brasil no final de novembro de 2021⁸⁷, se tornou predominante em todas as capitais avaliadas, sugerindo uma maior transmissibilidade. Esses dados corroboraram com os resultados encontrados em outros estudos^{87,88}. A emergência da VOC Ômicron no Brasil foi acompanhada por uma nova mudança no cenário epidemiológico, caracterizado pela terceira onda de infecções por COVID-19⁵¹, e essa ampla transmissão em todo o mundo causou o subsequente aumento esperado da diversidade viral de SARS-CoV-2⁸⁹. Esses dados foram demonstrados também em nosso trabalho, pelas nossas análises filogenéticas que demonstraram a presença das sublinhagens Ômicron BA.1 em maior proporção, seguido da Ômicron BA.2. Esses dados corroboram com o surgimento de variantes notificadas no Brasil e no mundo, no período avaliado⁸⁷.

As evidências de que a variante Delta é mais transmissível que a variante Gama, assim como a variante Ômicron possui uma maior infectividade comparado a todas as outras variantes está bem documentado⁹⁰. A transmissibilidade viral aumentada foi relacionada à carga viral mais alta no trato respiratório superior, conforme descrito anteriormente para as VOCs Alfa e Delta^{91,92}. Diante do aumento exponencial no número de casos causados pela VOC Ômicron e sua substituição à VOC Delta em um tempo menor do que outras transições anteriores, houve indícios de que esta variante seria também mais transmissível^{88,93}. Esse fenômeno pode estar associado a uma alta carga viral em pacientes infectados com a VOC Ômicron. Assim, para avaliar estas hipóteses e verificar as diferenças no potencial de transmissibilidade entre as variantes Gama, Delta e Ômicron, avaliamos a dinâmica das cargas virais medidas a partir dos valores de Ct obtidos por RT-qPCR.

A partir dos dados de carga viral obtidos pelos valores de Ct de 61.815 pacientes com resultados positivos de RT-qPCR para SARS-CoV-2, nossos resultados confirmam a hipótese de que a VOC Delta é mais transmissível do que a VOC Gama e sugere que essa vantagem provavelmente se deve a um aumento da carga viral no trato respiratório superior, conforme descrito em outros estudos. Este fato pode ser observado através da comparação dos dados encontrados neste estudo por regressão linear nos períodos dominados pelas diferentes VOCs em nível nacional, o que indicou uma associação entre aumento da frequência de VOC Delta e quedas nos valores de Ct (valores médios de Ct para o período de dominância Gama: 17,12 (N), 16,96 (ORF1ab) e 17,23 (S); valores médios de Ct para o período de dominância Delta: 16,80 (N), 16,61 (ORF1ab) e 16,53 (S)). À vista que a VOC Delta era mais transmissível, esperava-se que ela se tornasse predominante em um curto intervalo de tempo⁹⁴. No entanto, isso não foi o observado. Uma hipótese poderia estar relacionada ao avanço da campanha de vacinação⁹⁵. No Brasil, quando surgiu a VOC Gama, a campanha de vacinação ainda não havia iniciado. Em setembro de 2021, quando VOC Delta se tornou prevalente, aproximadamente 71% da população foi vacinada com pelo menos a primeira dose, enquanto apenas 43% foram totalmente vacinados⁹⁶. Estudos indicam que a vacinação em larga escala diminui efetivamente a circulação do vírus e, conseqüentemente, diminui o número de casos⁹⁷. Assim, embora houvesse uma variante mais transmissível em circulação no mês de setembro, o aumento de casos não foi observado, reforçando o efeito protetor das vacinas na população.

Em contraste, a modelagem de regressão linear realizado em 77.262 pacientes com resultados positivos de RT-qPCR para SARS-CoV-2, mostrou um valor de Ct mais alto para pacientes infectados por Ômicron em comparação com pacientes infectados pela variante Delta (valores médios de Ct para o período de dominância Ômicron: 18,94 (N) e 19,07 (ORF1ab); valores médios de Ct para o período de dominância Delta: 17,51 (N) e 17,40 (ORF1ab)), indicando uma correlação significativa entre aumento da frequência de VOC Ômicron e diminuição da carga viral. Esses resultados são consistentes com estudos recentes sugerindo que o aumento da transmissibilidade da VOC Ômicron não se deve a uma alta carga viral no trato respiratório superior⁹⁸⁻¹⁰⁰. Provavelmente está relacionado a outros mecanismos além da maior excreção viral, como aumento da afinidade ao receptor de células humanas e conseqüentemente sua maior afinidade pelo parênquima pulmonar ao invés do trato respiratório superior, e diminuição da sensibilidade à imunidade devido às muitas mutações da proteína S^{101,102}. As taxas de transmissão são também calculadas pelos valores de R0 (número básico de reprodução) e Rt (número de reprodução específico). No entanto, nosso conjunto de dados suportam os resultados encontrados por valores de Ct. Ainda assim, estas análises podem ser influenciadas pelo dia de coleta em relação a viremia e pela qualidade de coleta.

A patogênese de SARS-CoV-2 oferece *insights* sobre sintomatologia, transmissão e suscetibilidade individual¹⁰³. Clinicamente, a infecção por COVID-19 possui gravidade clínica variada, sendo dividida em doença leve, moderada, grave e crítica. Essas divisões variam de acordo com a presença do comprometimento pulmonar, o grau deste comprometimento e a necessidade de ventilação mecânica ou sinais de choque séptico^{104,105}. Alguns trabalhos relataram uma maior virulência da VOC Delta comparado a VOC Gama⁹⁰. Por outro lado, estudos relataram que a VOC Ômicron tem uma menor virulência quando comparado com a VOC Delta^{106,107}. Para avaliar essa hipótese, em nossa meta-análise da sintomatologia, avaliamos os registros de pacientes hospitalizados obtidos do banco de dados SRAG em períodos dominados por VOCs Gama ou Delta (9.814 registros) e também em períodos dominados pelas VOCs Delta ou Ômicron (17.586 registros).

Os resultados encontrados indicaram redução de sintomas como fadiga e saturação de oxigênio em pacientes possivelmente infectados com a variante Delta e menos exames alterados na tomografia computadorizada (TC) e no raio-X. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo que considerou as alterações na TC de tórax de crianças mais leves em pacientes infectados com a VOC Delta do que com a cepa original¹⁰⁸. No entanto, nossos dados sugeriram também um aumento na internação em UTI no grupo Delta em comparação ao grupo Gama. A COVID-19 pode ser classificada como um distúrbio multissistêmico e não apenas uma doença respiratória, portanto o aumento de internações em UTI pode ser justificado por outras complicações sistêmicas que não são avaliadas em nosso banco de dados. Confirmando nossa hipótese, os dados mostraram que a VOC Ômicron tinha gravidade menor ou igual a VOC Delta. Este resultado está em concordância com os dados de estudos anteriores que também descreveram diminuição de casos graves por infecção da VOC Ômicron^{109,110}. A campanha de vacinação no Brasil teve grande contribuição na redução dos casos graves e severos. Portanto, mesmo com o grande aumento no número de casos pela Ômicron não foi observado o aumento no número de casos graves. Destaca-se que uma das maiores limitações do banco de dados utilizado foi a indisponibilidade de dados de pacientes internados, no período de predominância da variante Delta, à medida que o programa de vacinação avançava, mas principalmente no período de predominância da variante Ômicron.

Um grande desafio deste trabalho foi a dificuldade de coletar amostras de todas as capitais brasileiras dentro dos critérios de elegibilidade. Essas barreiras são comumente enfrentadas por iniciativas que se propõem a realizar vigilância epidemiológica em um país de proporções continentais. Os valores de positividade encontrados entre as regiões foram maiores no Sudeste. Diante da localização de nosso grupo de pesquisa (Minas Gerais), temos um viés do tamanho amostral por estar mais concentrado nesta região. Estes valores foram maiores que a média nacional pois esse não é um estudo de base populacional, mas sim de

peças sintomáticas visto que as amostras são provenientes de um laboratório de diagnóstico. Destaca-se que estudos populacionais envolvendo indivíduos sintomáticos e assintomáticos devem ser estimulados para o cálculo das taxas de incidência reais. Ainda assim, nosso estudo tentou englobar as cinco macrorregiões brasileiras, para uma visão nacional abrangente do cenário epidemiológico. Programas de vigilância genômica devem ser continuamente realizados principalmente em épocas de diminuição de casos para avaliar as variantes que porventura possam emergir com possíveis mutações de resistência. Esses trabalhos são de extrema importância e guiaram, por exemplo, o estabelecimento de novas gerações de vacinas.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo, demonstramos a dinâmica das variantes de SARS-CoV-2 circulantes no Brasil e seu período de transição. A variante Gama, responsável pela segunda onda de infecções, foi prevalente no Brasil até meados de julho de 2021 até ser substituída pela variante Delta. Por sua vez, a variante Delta no qual evidenciou ser mais transmissível e virulenta, levou aproximadamente dezesseis semanas para se tornar prevalente no território nacional. Com a emergência da variante Ômicron, impulsionada pela incorporação de novas mutações e acompanhada pelo aumento exponencial no número de casos, o Brasil enfrentou a terceira onda de infecções por COVID-19. Demonstramos ainda padrões relacionados a transmissibilidade e sintomatologia das principais variantes circulantes no Brasil, no período avaliado. Desse modo, nosso estudo destaca a importância do monitoramento contínuo das variantes de SARS-CoV-2, bem como seus processos de evolução dinâmica que podem favorecer o surgimento de novas variantes e a sua disseminação na população. Esses dados são papéis fundamentais para impulsionar respostas de saúde pública, rastrear variantes emergentes e assim auxiliar no combate a pandemia. Este trabalho, realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Integrativa da UFMG e Grupo Pardini, reforça a importância das colaborações entre o setor público e privado na geração de conhecimento para a adoção de estratégias de enfrentamento da COVID-19 em nosso país e programas de vigilância genômica viral. Os resultados foram compilados em um artigo publicado e um segundo submetido na revista *Viruses*: “*Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program*” e “*Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil*”, respectivamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
2. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* 2017;25(1):35-48. doi:10.1016/j.tim.2016.09.001
3. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91-98. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1953-1966. doi:10.1056/NEJMoa030781
5. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
6. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. *Virol J.* 2015;12(1):1-21. doi:10.1186/s12985-015-0439-5
7. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/nejmoa2001017
8. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
9. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
10. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(November):1-17. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
11. Yao H, Song Y, Chen Y, et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell.* 2020;183(3):730-738.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.09.018
12. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. *Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation.*; 2019. <https://www.science.org>
13. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 2020;181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011
14. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):540. doi:10.1080/22221751.2020.1737364
15. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins.

- 2022;65(2):280-294.
16. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020;42(1):3-11.
 17. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2020;1866(10):165878. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165878
 18. Ortego J, Escors D, Laude H, Enjuanes L. Generation of a Replication-Competent, Propagation-Deficient Virus Vector Based on the Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Genome. *J Virol.* 2002;76(22):11518-11529. doi:10.1128/jvi.76.22.11518-11529.2002
 19. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature.* 1984;308(5961):751-752. doi:10.1038/308751a0
 20. de Haan CAM, Rottier PJM. Molecular Interactions in the Assembly of Coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2005;64(January):165-230. doi:10.1016/S0065-3527(05)64006-7
 21. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20. doi:10.1038/s41580-021-00418-x
 22. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
 23. Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z
 24. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270-284. doi:10.1038/s41579-022-00713-0
 25. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med.* 2020;382(10):929-936. doi:10.1056/nejmoa2001191
 26. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004
 27. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(21). doi:10.1073/pnas.2003138117
 28. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 2020;78(4):779-784.e5. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.022
 29. Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *SSRN Electron J.* 2020;(January). doi:10.2139/ssrn.3657338

30. Li M, Li L, Zhang Y, Wang X. An Investigation of the Expression of 2019 Novel Coronavirus Cell Receptor Gene ACE2 in a Wide Variety of Human Tissues. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1)(45):1-7. <https://doi.org/>
31. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;324(8):782-793. doi:10.1001/jama.2020.12839
32. WHO. *Public Health Emergency of International Concern (PHEIC)*.; 2020.
33. OPA/OMS. Histórico da pandemia de COVID-19. Organização Pan-Americana da Saúde. Published 2021. <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>
34. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO. Published 2023. Accessed January 31, 2023. <https://covid19.who.int/>
35. Mathieu E, Ritchie H, Rodés-guirao L, et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Published online 2023:1-6.
36. Candido DS, Claro IM, de Jesus JG, et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science* (80-). 2020;369(6508):1255-1260. doi:10.1126/SCIENCE.ABD2161
37. Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in brazil and establishment of a coordinated task network. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115(12):1-8. doi:10.1590/0074-02760200342
38. Chan LYH, Yuan B, Convertino M. COVID-19 non-pharmaceutical intervention portfolio effectiveness and risk communication predominance. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-88309-1
39. World Health Organization. COVID-19 vaccines. WHO. Published 2023. Accessed March 7, 2023. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines>
40. Altmann DM, Boyton RJ. COVID-19 vaccination: The road ahead. 2022;1132(March):1127-1132.
41. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Ministério da Saúde. Published 2023. Accessed March 7, 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/pni>
42. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:409-433. doi:10.1146/annurev.micro.41.1.409
43. Mahy BWJ. The Evolution and Emergence of RNA Viruses. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):899-899. doi:10.3201/eid1605.100164
44. Li X, Zai J, Zhao Q, et al. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2020;92(6):602-611.

- doi:10.1002/jmv.25731
45. Singh D, Yi S V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Exp Mol Med*. 2021;53(4):537-547. doi:10.1038/s12276-021-00604-z
 46. Morales AC, Rice AM, Ho AT, et al. Causes and Consequences of Purifying Selection on SARS-CoV-2. *Genome Biol Evol*. 2021;13(10):1-17. doi:10.1093/gbe/evab196
 47. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. 2020;5(11):1403-1407. doi:10.1038/s41564-020-0770-5
 48. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020;182(4):812-827.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.06.043
 49. Resende PC, Delatorre E, Gräf T, et al. Evolutionary Dynamics and Dissemination Pattern of the SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.33 During the Early Pandemic Phase in Brazil. *Front Microbiol*. 2021;11(February):1-14. doi:10.3389/fmicb.2020.615280
 50. Nuno R. Faria, Thomas A. Mellan, Charles Whittaker IMC, Darlan da S. Candido, Swapnil Mishra, Myuki A. E. Crispim FCSS, Iwona Hawryluk, John T. McCrone, Ruben J. G. Hulswit LAMF, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science (80-)*. 2021;372(May):815-821.
 51. MS M da S. Painel Coronavírus. Ministério da Saúde. Published 2022. <https://covid.saude.gov.br/>
 52. Liu Y, Liu J, Plante KS, et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*. 2022;602(7896):294-299. doi:10.1038/s41586-021-04245-0
 53. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. WHO. Published 2023. Accessed October 7, 2022. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
 54. GISAID. GISAID - Submission Tracker Global. Accessed October 7, 2022. <https://gisaid.org/submission-tracker-global/>
 55. WHO. COVID-19 weekly epidemiological update. *World Heal Organ*. 2022;(58):1-23. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>
 56. Lo SW, Jamroz D. Genomics and epidemiological surveillance. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(9):478. doi:10.1038/s41579-020-0421-0
 57. ScienceDirect. Metagenomics. Accessed October 7, 2022. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/metagenomics>
 58. Hu T, Li J, Zhou H, Li C, Holmes EC, Shi W. Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. *Brief Bioinform*. 2021;22(2):631-641. doi:10.1093/bib/bbaa386
 59. Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and

- immune escape. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(7):409-424. doi:10.1038/s41579-021-00573-0
60. Emmanuel V, Geddes V, Moreira F, et al. A novel RT-qPCR assay for detection of SARS-CoV-2 variants based on RhAmp technology (IDT technologies). Published online 2021. doi:10.17504/protocols.io.buf2ntqe
 61. OViGen – Observatório de Vigilância Genômica. Programa de Pós-Graduação em Genética - ICB - UFMG. Accessed October 9, 2022. <http://pggenetica.icb.ufmg.br/acoesCOVID/ovigen.php>
 62. Li J, Lai S, Gao GF, Shi W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;600(7889):408-418. doi:10.1038/s41586-021-04188-6
 63. Li R, Pei S, Chen B, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science (80-).* 2020;368(6490):489-493. doi:10.1126/science.abb3221
 64. Rocha R, Atun R, Massuda A, et al. Effect of socioeconomic inequalities and vulnerabilities on health-system preparedness and response to COVID-19 in Brazil: a comprehensive analysis. *Lancet Glob Heal.* 2021;9(6):e782-e792. doi:10.1016/S2214-109X(21)00081-4
 65. Chen Z, Azman AS, Chen X, et al. Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. *Nat Genet.* 2022;54(4):499-507. doi:10.1038/s41588-022-01033-y
 66. Brito AF, Semenova E, Dudas G, et al. Global disparities in SARS-CoV-2 genomic surveillance. *Nat Commun.* 2022;13(1):7003. doi:10.1038/s41467-022-33713-y
 67. Goswami C, Sheldon M, Bixby C, et al. Identification of SARS-CoV-2 variants using viral sequencing for the Centers for Disease Control and Prevention genomic surveillance program. *BMC Infect Dis.* 2022;22(1):1-12. doi:10.1186/s12879-022-07374-7
 68. Peterson SW, Lidder R, Daigle J, et al. RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69–70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples. *Sci Total Environ.* 2022;810(January):151283. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151283
 69. Yaniv K, Ozer E, Shagan M, et al. Direct RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 variants of concern (Alpha, B.1.1.7 and Beta, B.1.351) detection and quantification in wastewater. *Environ Res.* 2021;201(January):111653. doi:10.1016/j.envres.2021.111653
 70. Banho CA, Sacchetto L, Campos GRF, et al. Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city. *Commun Med.* 2022;2(1):1-11. doi:10.1038/s43856-022-00108-5
 71. Lamarca AP, de Almeida LGP, da Silva Francisco R, et al. Genomic Surveillance Tracks the First Community Outbreak of the SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) Variant in Brazil.

- Subbarao K, ed. *J Virol.* 2022;96(2):1-3. doi:10.1128/JVI.01228-21
72. Giovanetti M, Fonseca V, Wilkinson E, et al. Replacement of the Gamma by the Delta variant in Brazil: Impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. *Virus Evol.* 2022;8(1):1-6. doi:10.1093/ve/veac024
 73. Galloway SE, Paul P, Maccannell DR, Johansson MA. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(3):95-99. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2>
 74. Shen X, Tang H, McDanal C, et al. SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited by ancestral spike vaccines. *Cell Host Microbe.* 2021;29(4):529-539.e3. doi:10.1016/j.chom.2021.03.002
 75. Moreira FRR, Bonfim DM, Zauli DAG, et al. Epidemic spread of sars-cov-2 lineage b.1.1.7 in Brazil. *Viruses.* 2021;13(6). doi:10.3390/v13060984
 76. Pascarella S, Ciccozzi M, Zella D, et al. SARS-CoV-2 B.1.617 Indian variants: Are electrostatic potential changes responsible for a higher transmission rate? *J Med Virol.* 2021;93(12):6551-6556. doi:10.1002/jmv.27210
 77. Voloch CM, da Silva Francisco R, de Almeida LGP, et al. Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol.* 2021;95(10):1-5. doi:10.1128/jvi.00119-21
 78. da Silva MS, Demoliner M, Hansen AW, et al. Early detection of sars-cov-2 p.1 variant in southern brazil and reinfection of the same patient by p.2. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2021;63:1-8. doi:10.1590/S1678-9946202163058
 79. Ferguson NM, Laydon D, Nedjati-Gilani G, et al. Report 13: Estimating the number of infections and the impact of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 in 11 European countries. *Imp Coll COVID-19 Response Team.* 2020;(March). <https://doi.org/10.25561/77482>.
 80. Mader S, Rüttenauer T. The Effects of Non-pharmaceutical Interventions on COVID-19 Mortality: A Generalized Synthetic Control Approach Across 169 Countries. *Front Public Heal.* 2022;10(April):1-8. doi:10.3389/fpubh.2022.820642
 81. Petersen E, Ntoumi F, Hui DS, et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B.1.1.529) - highlights Africa's research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. *Int J Infect Dis.* 2022;114(January):268-272. doi:10.1016/j.ijid.2021.11.040
 82. Khandia R, Singhal S, Alqahtani T, et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic. *Environ Res.* 2022;209(January):112816. doi:10.1016/j.envres.2022.112816

83. Frieden TR, Lee CT. Identifying and Interrupting Superspreading Events—Implications for Control of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(6):1059-1066. doi:10.3201/eid2606.200495
84. Althouse BM, Wenger EA, Miller JC, et al. Superspreading events in the transmission dynamics of SARS-CoV-2: Opportunities for interventions and control. *PLoS Biol.* 2020;18(11):1-13. doi:10.1371/journal.pbio.3000897
85. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol.* 2022;94(6):2376-2383. doi:10.1002/jmv.27643
86. McMillen T, Jani K, Robilotti E V., Kamboj M, Babady NE. The spike gene target failure (SGTF) genomic signature is highly accurate for the identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 variants. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-8. doi:10.1038/s41598-022-21564-y
87. Alcantara LCJ, Nogueira E, Shuab G, et al. SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. *Virus Res.* 2022;315(March). doi:10.1016/j.virusres.2022.198785
88. Naveca FG, Nascimento V, Souza V, et al. The dissemination of the Omicron variant in the highly seroprevalent Amazonas state , Brazil , is associated with a rapid upsurge of SARS-CoV-2 cases. *Virological.* Published 2023. Accessed February 1, 2023. <https://virological.org/t/the-dissemination-of-the-omicron-variant-in-the-highly-seroprevalent-amazonas-state-brazil-is-associated-with-a-rapid-upsurge-of-sars-cov-2-cases/785>
89. Weng S, Shang J, Cheng Y, et al. Genetic differentiation and diversity of SARS-CoV-2 Omicron variant in its early outbreak. *Biosaf Heal.* 2022;4(3):171-178. doi:10.1016/j.bsheal.2022.04.004
90. Tegally H, Wilkinson E, Althaus CL, et al. Rapid replacement of the Beta variant by the Delta variant in South Africa. *medRxiv.* Published online 2021:2021.09.23.21264018. doi:<https://doi.org/10.1101/2021.09.23.21264018>
91. Luo CH, Morris CP, Sachithanandham J, et al. Infection with the SARS-CoV-2 Delta Variant is Associated with Higher Infectious Virus Loads. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci.* Published online 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34462756><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC8404894>
92. Earnest R, Uddin R, Matluk N, et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England , USA. *medRxiv.* 2021;2021. doi:10.1101/2021.10.06.21264641
93. Araf Y, Akter F, Tang Y dong, et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol.*

- 2022;94(5):1825-1832. doi:10.1002/jmv.27588
94. Singanayagam A, Hakki S, Dunning J, et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(2):183-195. doi:10.1016/S1473-3099(21)00648-4
 95. Painel Vacinômetro. Accessed October 8, 2022. <https://coronavirus.saude.mg.gov.br/vacinometro>
 96. Our World in Data. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. Published 2023. Accessed February 1, 2023. <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>
 97. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):305-306. doi:10.1038/d41573-020-00073-5
 98. Sentis C, Billaud G, Bal A, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant, Lineage BA.1, Is Associated with Lower Viral Load in Nasopharyngeal Samples Compared to Delta Variant. *Viruses.* 2022;14(5):919. doi:10.3390/v14050919
 99. Puhach O, Adea K, Hulo N, et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated individuals infected with ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2022;28(7):1491-1500. doi:10.1038/s41591-022-01816-0
 100. Laitman AM, Lieberman JA, Hoffman NG, Roychoudhury P, Mathias PC, Greninger AL. The SARS-CoV-2 Omicron Variant Does Not Have Higher Nasal Viral Loads Compared to the Delta Variant in Symptomatic and Asymptomatic Individuals. *J Clin Microbiol.* 2022;60(4):5-7. doi:10.1128/jcm.00139-22
 101. Yuasa S, Nakajima J, Takatsuki Y, et al. Viral load of SARS-CoV-2 Omicron is not high despite its high infectivity. *J Med Virol.* 2022;94(11):5543-5546. doi:10.1002/jmv.27974
 102. Iketani S, Liu L, Guo Y, et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature.* 2022;604(7906):553-556. doi:10.1038/s41586-022-04594-4
 103. Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ.* 2020;371:1-6. doi:10.1136/bmj.m3862
 104. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;383(18):1757-1766. doi:10.1056/nejmcp2009249
 105. National Institute of Health. Treatment Guidelines: Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection. NIH. Published 2022. Accessed February 1, 2023. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
 106. Martins M, do Nascimento GM, Nooruzzaman M, et al. The Omicron Variant BA.1.1 Presents a Lower Pathogenicity than B.1 D614G and Delta Variants in a Feline Model of SARS-CoV-2 Infection. Gallagher T, ed. *J Virol.* 2022;96(17):1-19. doi:10.1128/jvi.00961-22

107. Brüssow H. COVID-19: Omicron – the latest, the least virulent, but probably not the last variant of concern of SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol.* 2022;15(7):1927-1939. doi:10.1111/1751-7915.14064
108. Cheng QR, Fan MX, Hao J, et al. Chest CT features of children infected by B.1.617.2 (Delta) variant of COVID-19. *World J Pediatr.* 2022;18(1):37-42. doi:10.1007/s12519-021-00484-3
109. Ren SY, Wang WB, Gao RD, Zhou AM. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. *World J Clin Cases.* 2022;10(1):1-11. doi:10.12998/wjcc.v10.i1.1
110. Chen J, Wang R, Gilby NB, Wei GW. Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *J Chem Inf Model.* 2022;62(2):412-422. doi:10.1021/acs.jcim.1c01451

ANEXOS

Anexo I – Produção científica relacionadas à tese neste interstício.

- Candido, Darlan S. Claro, Ingra M. De Jesus, Jaqueline G. Souza, William M. Moreira, Filipe R. R. Dellicour, Simon Mellan, Thomas A. Du Plessis, Louis Pereira, Rafael H. M. Sales, Flavia C. S. Manuli, Erika R. Thézé, Julien Almeida, Luiz Menezes, Mariane T. Voloch, Carolina M. Fumagalli, Marcilio J. Coletti, Thaís M. Da Silva, Camila A. M. Ramundo, Mariana S. Amorim, Mariene R. Hoeltgebaum, Henrique H. Mishra, Swapnil Gill, Mandev S. Carvalho, Luiz M. Buss, Lewis F. , Prete, Carlos A. Ashworth, Jordan Nakaya, Helder I. Peixoto, Pedro S. Brady, Oliver J. Nicholls, Samuel M. Tanuri, Amilcar Rossi, Átila D. Braga, Carlos K. V. Gerber, Alexandra L. De C. Guimarães, Ana Paula Gaburo, Nelson Alencar, Cecila Salette Ferreira, Alessandro C. S. Lima, Cristiano X. Levi, José Eduardo Granato, Celso Ferreira, Giulia M. Francisco, Ronaldo S. Granja, Fabiana Garcia, Marcia T. Moretti, Maria Luiza Perroud, Mauricio W. Castiñeiras, Terezinha M. P. P. Lazari, Carolina S. Hill, Sarah C. De Souza Santos, Andreza Aruska Simeoni, Camila L. Forato, Julia Sposito, Andrei C. Schreiber, Angelica Z. Santos, Magnun N. N. De Sá, Camila Zolini Souza, Renan P. Resende-Moreira, Luciana C. Teixeira, Mauro M. Hubner, Josy Leme, Patricia A. F. Moreira, Rennan G. Nogueira, Maurício L. **Brazil-Uk Centre For Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics And Epidemiology (Cadde) Genomic Network** Ferguson, Neil M. Costa, Silvia F. Proenca-Modena, José Luiz Vasconcelos, Ana Tereza R. Bhatt, Samir Lemey, Philippe Wu, Chieh-Hsi Rambaut, Andrew Loman, Nick J. Aguiar, Renato S. Pybus, Oliver G. Sabino, Ester C. Faria, Nuno Rodrigues ; Evolution and Epidemic Spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science JCR*, V. 369, P. 1255-1260, 2020.
- Moreira, Filipe R. R. ; Bonfim, Diego M. ; Zauli, Danielle A. G.; **Silva, Joice P.** ; Lima, Aline B. ; Malta, Frederico S. V. ; Ferreira, Alessandro C. S. ; Pardini, Victor C. ; Magalhães, Wagner C. S. ; Queiroz, Daniel C. ; Souza, Rafael M. ; Geddes, Victor E. V. ; Costa, Walyson C. ; Moreira, Rennan G. ; Faria, Nuno R. ; Voloch, Carolina M. ; Souza, Renan P. ; Aguiar, Renato S. . Epidemic Spread of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in Brazil. *Viruses-Basel JCR*, V. 13, P. 984, 2021.
- Faria, Nuno R. Mellan, Thomas A. Whittaker, Charles Claro, Ingra M. Candido, Darlan Da S. Mishra, Swapnil Crispim, Myuki A. E. Sales, Flavia C. S. Hawryluk, Iwona Mccrone, John T. Hulswit, Ruben J. G. Franco, Lucas A. M. Ramundo, Mariana S. De Jesus, Jaqueline G. Andrade, Pamela S. Coletti, Thais M. Ferreira, Giulia M. Silva, Camila A. M. Manuli, Erika R. Pereira, Rafael H. M. Peixoto, Pedro S. Kraemer, Moritz U. G. Gaburo, Nelson Camilo, Cecilia

Da C. Hoeltgebaum, Henrique , Souza, William M. Rocha, Esmeria C. De Souza, Leandro M. De Pinho, Mariana C. Araujo, Leonardo J. T Malta, Frederico S. V. De Lima, Aline B. **Silva, Joice Do P.** Zauli, Danielle A. G. Ferreira, Alessandro C. De S. Schnekenberg, Ricardo P Laydon, Daniel J. Walker, Patrick G. T. Schlüter, Hannah M. Dos Santos, Ana L. P. Vidal, Maria S. Del Caro, Valentina S. Filho, Rosinaldo M. F. Dos Santos, Helem M. Aguiar, Renato S. Proença-Modena, José L. Nelson, Bruce Hay, James A. Monod, Mélodie Miscouridou, Xenia Coupland, Helen Sonabend, Raphael Vollmer, Michaela Gandy, Axel Prete, Carlos A. Nascimento, Vitor H. Suchard, Marc A. Bowden, Thomas A. Pond, Sergei L. K. Wu, Chieh-Hsi Ratmann, Oliver Ferguson, Neil M. Dye, Christopher Loman, Nick J. Lemey, Philippe Rambaut, Andrew Fraiji, Nelson A. Carvalho, Maria Do P. S. S. Pybus, Oliver G. Flaxman, Seth Bhatt, Samir Sabino, Ester C. ; Genomics and Epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 Lineage in Manaus, Brazil. *Science JCR*, V. Eabh26, P. Eabh2644, 2021.

- Alves, Hugo José De Araújo, João Locke Ferreira Fonseca, Paula Luize Camargos Moreira, Filipe Romero Rebello Bonfim, Diego Menezes Queiroz, Daniel Costa Miguita, Lucyene De Souza, Rafael Marques Geddes, Victor Emmanuel Viana Costa, Walyson Coelho Oliveira, Jaqueline Silva De Medeiros, Eva Lídia Arcoverde Souza, Carolina Senra Alves De Saliba, Juliana Wilke Menezes, André Luiz Oliveira, Eneida Santos De Adelino, Talita Emile Ribeiro Guimaraes, Natalia Rocha Ribeiro, Adriana Aparecida Moreira, Rennan Garcias Zauli, Danielle Alves Gomes **Silva, Joice Do Prado** Malta, Frederico Scott Varella Ferreira, Alessandro Clayton De Souza Silva, Ana Valesca Fernandes Gilson , Alfenas-Zerbini, Poliane Souza, Flavia Oliveira De Sabino, Adriano De Paula Xavier, Laura Do Amaral Carobin, Natália Virtude Carvalho, Alex Fiorini De Lourenço, Karine Lima Teixeira, Santuza Maria Ribeiro Fernandes, Ana Paula Salles Moura Fonseca, Flavio Guimarães Da Abrahão, Jônatas Santos Iani, Felipe Campos De Melo Rodrigues, Rodrigo Araújo Lima Souza, Renan Pedra De Aguiar, Renato Santana; Monitoring The Establishment of VOC Gamma In Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study. *Viruses-Basel JCR*, V. 14, P. 2747, 2022.

- Fonseca, Paula L C Moreira, Filipe R R De Souza, Rafael M Guimarães, Natália R Carvalho, Nara O Adelino, Talita E R Alves, Hugo J Alvim, Luige B Candido, Darlan S Coelho, Helena P Costa, Alana V B Costa, Walyson C De Carvalho, Alex F De Faria, Bruna W F De Lima, Aline B De Oliveira, Eneida S De Souza, Carolina S A De Souza, Fernanda G Dias, Rillery C Geddes, Victor E V Godinho, Igor P Gonçalves, Alessandro L Lourenço, Karine L Magalhães, Rubens D M Malta, Frederico S V , Medeiros, Eva L A Mendes, Fernanda S Mendes, Pedro H B De P Mendonça, Cristiane P T B Menezes, Andre L Menezes, Diego Menezes, Mariane T Miguita, Lucyene Moreira, Rennan G Peixoto, Renata B Queiroz, Daniel

C Ribeiro, Adriana A Ribeiro, Ana Paula De B Saliba, Juliana W Sato, Hugo, **Silva, Joice Do P**, Silva, Natiely P Faria, Nuno R Teixeira, Santuza M R Da Fonseca, Flávio G Fernandes, Ana Paula S M Zauli, Danielle A G Januario, José Nélio De Oliveira, Jaqueline S Iani, Felipe C De M De Aguiar, Renato S De Souza, Renan P ; Tracking The Turnover of SARS-CoV-2 Vocs Gamma to Delta in a Brazilian State (Minas Gerais) with a High-Vaccination Status. *Virus Evolution* **JCR**, V. 1, P. 1, 2022.

- De Menezes, Mariane Talon ; Moreira, Filipe Romero Rebello ; Whittaker, Charles ; Santos, Franciele Martins ; Queiroz, Daniel Costa ; Geddes, Victor ; Fonseca, Paula Luize Camargos ; De Jesus, Jaqueline Góes ; Mendes-Oliveira, Franciane ; Reis-Souza, Valquíria ; Santos, Bibiana ; Zauli, Danielle Alves Gomes ; De Lima, Aline Brito ; De Brito Mendonça, Cristiane ; Alvim, Luige Biciati ; **Do Prado Silva, Joice** ; Malta, Frederico Scott Varella ; De Souza Ferreira, Alessandro Clayton ; Faria, Nuno R. ; Sabino, Ester Cerdeira ; Aguiar, Renato Santana . Dynamics of Early Establishment of SARS-CoV-2 VOC Omicron Lineages in Minas Gerais, Brazil. *Viruses-Basel* **JCR**, V. 15, P. 585, 2023.

Anexo II - Resumos publicados em anais de congressos

- **Do Prado Silva, Joice**; Lima, Aline B. ; Alvim, Luige B. ; Malta, Frederico S. V. ; Mendonça, Cristiane P. T. B. ; Fonseca, Paula L. C. ; Souza, Renan P. ; Aguiar, Renato S. ; Zauli, Danielle A. G. . Spread Dynamic of SARS-CoV-2 Variants and Related Alterations in the Transmission Rates: a National Scale Study. In: Congresso Brasileiro De Genética Médica, 2022, Curitiba. Cbgm 2022, 2022.

Anexo III – Confirmação de submissão do manuscrito

RESEARCH

CORONAVIRUS

Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil

Darlan S. Candido^{1,2*}, Ingra M. Claro^{2,3*}, Jaqueline G. de Jesus^{2,3*}, William M. Souza^{4*}, Filipe R. R. Moreira^{5*}, Simon Dellicour^{6,7*}, Thomas A. Mellan^{8*}, Louis du Plessis¹, Rafael H. M. Pereira⁹, Flavia C. S. Sales^{2,3}, Erika R. Manuli^{2,3}, Julien Théze¹⁰, Luiz Almeida¹¹, Mariane T. Menezes⁵, Carolina M. Voloch⁵, Marcilio J. Fumagalli⁴, Thaís M. Coletti^{2,3}, Camila A. M. da Silva^{2,3}, Mariana S. Ramundo^{2,3}, Mariene R. Amorim¹², Henrique H. Hoeltgebaum¹³, Swapnil Mishra⁸, Mandev S. Gill⁷, Luiz M. Carvalho¹⁴, Lewis F. Buss², Carlos A. Prete Jr.¹⁵, Jordan Ashworth¹⁶, Helder I. Nakaya¹⁷, Pedro S. Peixoto¹⁸, Oliver J. Brady^{19,20}, Samuel M. Nicholls²¹, Amílcar Tanuri⁵, Átala D. Rossi⁵, Carlos K. V. Braga⁹, Alexandra L. Gerber¹¹, Ana Paula de C. Guimarães¹¹, Nelson Gaburo Jr.²², Cecila Salete Alencar²³, Alessandro C. S. Ferreira²⁴, Cristiano X. Lima^{25,26}, José Eduardo Levi²⁷, Celso Granato²⁸, Giulia M. Ferreira²⁹, Ronaldo S. Francisco Jr.¹¹, Fabiana Granja^{12,30}, Marcia T. Garcia³¹, Maria Luiza Moretti³¹, Mauricio W. Perroud Jr.³², Terezinha M. P. P. Castilheiras³³, Carolina S. Lazari³⁴, Sarah C. Hill^{1,35}, Andreza Aruska de Souza Santos³⁶, Camila L. Simeoni¹², Julia Forato¹², Andrei C. Sposito³⁷, Angelica Z. Schreiber³⁸, Magnun N. N. Santos³⁸, Camila Zolini de Sá³⁹, Renan P. Souza³⁹, Luciana C. Resende-Moreira⁴⁰, Mauro M. Teixeira⁴¹, Josy Hubner⁴², Patricia A. F. Leme⁴³, Rennan G. Moreira⁴⁴, Mauricio L. Nogueira⁴⁵, Brazil-UK Centre for Arbovirus Discovery, Diagnosis, Genomics and Epidemiology (CADDE) Genomic Network, Neil M. Ferguson⁸, Silvia F. Costa^{2,3}, José Luiz Proença-Modena¹², Ana Tereza R. Vasconcelos¹¹, Samir Bhatt⁸, Philippe Lemey⁷, Chieh-Hsi Wu⁴⁶, Andrew Rambaut⁴⁷, Nick J. Loman²¹, Renato S. Aguiar³⁹, Oliver G. Pybus¹, Ester C. Sabino^{2,3,†}, Nuno Rodrigues Faria^{1,2,8,†}

Brazil currently has one of the fastest-growing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) epidemics in the world. Because of limited available data, assessments of the impact of nonpharmaceutical interventions (NPIs) on this virus spread remain challenging. Using a mobility-driven transmission model, we show that NPIs reduced the reproduction number from >3 to 1 to 1.6 in São Paulo and Rio de Janeiro. Sequencing of 427 new genomes and analysis of a geographically representative genomic dataset identified >100 international virus introductions in Brazil. We estimate that most (76%) of the Brazilian strains fell in three clades that were introduced from Europe between 22 February and 11 March 2020. During the early epidemic phase, we found that SARS-CoV-2 spread mostly locally and within state borders. After this period, despite sharp decreases in air travel, we estimated multiple exportations from large urban centers that coincided with a 25% increase in average traveled distances in national flights. This study sheds new light on the epidemic transmission and evolutionary trajectories of SARS-CoV-2 lineages in Brazil and provides evidence that current interventions remain insufficient to keep virus transmission under control in this country.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a novel beta-coronavirus with a 30-kb genome that was first reported in December 2019 in Wuhan, China (1, 2). SARS-CoV-2 was declared a public health emergency of international concern on 30 January 2020. As of 12 July 2020, there were >12.5 million cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) and 561,000 deaths globally (3). The virus can be classified into two main phylogenetic lineages, A and B, which spread from Wuhan before strict travel restrictions were enacted (4, 5) and now cocirculate around the world (6). The case fatality ratio of SARS-CoV-2 infection has been estimated at between 1.2 and 1.6% (7–9), with substantially higher ratios in those >60 years of age (8). Some estimates suggest that 18 to 56% of SARS-CoV-2 transmission is from asymptomatic or presymptomatic individuals (10–13), complicating epidemiological assessments and public health efforts to curb the pandemic.

Challenges of real-time assessment of transmission

Although the SARS-CoV-2 epidemics in several countries, including China, Italy, and Spain, have been brought under control through nonpharmaceutical interventions (NPIs) (3), the number of SARS-CoV-2 cases and deaths in Brazil continues to increase (14) (Fig. 1A). As of 12 July 2020, Brazil had reported 1,800,827 SARS-CoV-2 cases, the second-largest number in the world, and 70,398 deaths. More than one-third of the cases (34%) in Brazil are concentrated in the southeast region, which includes São Paulo city (Fig. 1B), the world's fourth-largest conurbation, where the first case in Latin America was reported on 25 February 2020 (15). Diagnostic assays for SARS-CoV-2 molecular detection were widely distributed across the regional reference centers of the national public health laboratory network from 21 February 2020 on (16, 17). However, several factors, including delays in reporting, changes in notification, and heterogeneous access to testing across populations,

obfuscate the real-time assessment of virus transmission using SARS-CoV-2 case counts (15). Consequently, a more accurate measure of SARS-CoV-2 transmission in Brazil is the number of reported deaths caused by severe acute respiratory infections (SARIs), which is provided by the Sistema Único de Saúde (SUS) (18). Changes in the opportunity for SARS-CoV-2 transmission are strongly associated with changes in average mobility (18–20) and can typically be measured by calculating the effective reproduction number, R , defined as the average number of secondary infections caused by an infected person. $R > 1$ indicates a growing epidemic, whereas $R < 1$ is needed to achieve a decrease in transmission.

We used a Bayesian semimechanistic model (21, 22) to analyze SARI mortality statistics and human mobility data to estimate daily changes in R in São Paulo city (12.2 million inhabitants) and Rio de Janeiro city (6.7 million inhabitants), the largest urban metropolises in Brazil (Fig. 1, C and D). NPIs in Brazil consisted of school closures implemented between 12 and 23 March 2020 across the country's 27 federal units/states and store closures implemented between 13 and 23 March 2020. In São Paulo city, schools started closing on 16 March 2020 and stores closed 4 days later. At the start of the epidemics, we found $R > 3$ in São Paulo and Rio de Janeiro and, concurrent with the timing of state-mandated NPIs, R values fell close to 1.








Mobility-driven changes in R

Analysis of R values after NPI implementation highlights several notable mobility-driven features. There was a period immediately after NPIs, between 21 and 31 March 2020, when R was consistently <1 in São Paulo city (Fig. 1C). However, after this initial decrease, the R value for São Paulo rose to >1 and increased through time, a trend associated with increased population mobility. This can be seen in the Google transit stations index, which rose from -60 to -52% , and by a decrease in the social isolation index from 54 to 47%. By 4 May 2020, we estimate $R = 1.3$ [95% Bayesian credible interval (BCI): 1.0 to 1.6] in both São Paulo and Rio de Janeiro cities (table S1). However, we note that there were instances in the previous 7 days when the 95% credible intervals for R included values <1 , drawing attention to the fluctuations and uncertainty in the estimated R for both cities.

Early sharing of genomic sequences, including the first SARS-CoV-2 genome, Wuhan-Hu-1, released on 10 January (23), has enabled unprecedented global levels of molecular testing for an emerging virus (24, 25). However, despite the thousands of virus genomes deposited on public access databases, there is a lack of consistent sampling structure and there are limited data from Brazil (26–28), which

Editorial

Epidemic Spread of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in Brazil

Filipe R. R. Moreira ¹, Diego M. Bonfim ², Danielle A. G. Zauli ³, Joice P. Silva ³, Aline B. Lima ³, Frederico S. V. Malta ³, Alessandro C. S. Ferreira ³, Victor C. Pardini ³, Wagner C. S. Magalhães ², Daniel C. Queiroz ², Rafael M. Souza ², Victor E. V. Geddes ², Walyson C. Costa ², Rennan G. Moreira ⁴, Nuno R. Faria ^{5,6,7}, Carolina M. Voloch ¹, Renan P. Souza ² and Renato S. Aguiar ^{2,8,*}

- ¹ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-971, Brazil; filipe.moreira@biologia.ufrj.br (F.R.R.M.); carolvoloch@gmail.com (C.M.V.)
- ² Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; t.menezes.diego@gmail.com (D.M.B.); wcmagalhaes@gmail.com (W.C.S.M.); dcqbioufmg@gmail.com (D.C.Q.); raf.marques.20@gmail.com (R.M.S.); victor.geddes@gmail.com (V.E.V.G.); costa_52@hotmail.com (W.C.C.); renanpedra@gmail.com (R.P.S.)
- ³ Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; danielle.zauli@grupopardini.com.br (D.A.G.Z.); joice.silva@grupopardini.com.br (J.P.S.); alinebrito.lima@grupopardini.com.br (A.B.L.); fredericosvm@gmail.com (F.S.V.M.); alessandro.ferreira@grupopardini.com.br (A.C.S.F.); Victor.pardini@grupopardini.com.br (V.C.P.)
- ⁴ Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; rennangm@gmail.com
- ⁵ Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London W2 1PG, UK; nfaria@ic.ac.uk
- ⁶ Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 21941-971, Brazil
- ⁷ Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 4BH, UK
- ⁸ Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro 22281-100, Brazil
- * Correspondence: santanarnt@gmail.com



Citation: Moreira, F.R.R.; Bonfim, D.M.; Zauli, D.A.G.; Silva, J.P.; Lima, A.B.; Malta, F.S.V.; Ferreira, A.C.S.; Pardini, V.C.; Magalhães, W.C.S.; Queiroz, D.C.; et al. Epidemic Spread of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in Brazil. *Viruses* **2021**, *13*, 984. <https://doi.org/10.3390/v13060984>

Received: 31 March 2021

Accepted: 21 May 2021

Published: 26 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The emergence of diverse lineages harboring mutations with functional significance and potentially enhanced transmissibility imposes an increased difficulty on the containment of the SARS-CoV-2 pandemic [1–6]. In Brazil, six such lineages cocirculate, one originally from the UK (B.1.1.7) [1], one original from South Africa (B.1.351) [2], and four that emerged within different regions of the country, P.1 (Manaus) [3], P.2 (Rio de Janeiro) [4], N.9 (São Paulo) [5], and N.10 (Maranhão) [6]. While reports on the spread of some of these lineages to other Brazilian regions exist, e.g., [7], a single report on two cases of lineage B.1.1.7 in São Paulo has been published [8], and the extent of its geographic spread is currently unknown. Therefore, we conducted a genomic epidemiology study focused on characterizing the dissemination of this lineage in a national context.

2. Materials and Methods

Samples were obtained from the Hermes Pardini Institute (HP), a large Brazilian diagnostic company that performs on average 240,000 COVID-19 tests per month across all Brazilian states. Among other mutations, B.1.1.7 carries the Spike 69/70 deletion leading to the S gene target failure (SGTF) [9] reported in the Thermo Fisher's COVID-19 assay, used by HP since May 2020. Thus, we retrospectively filtered our dataset for positive samples presenting N gene amplification (Cycle threshold < 30) and SGTF. Among 294,560 samples screened between October 2020 and January 2021, we obtained 25 that met our criteria, collected between 4 January and 24 January 2021 in 8 out of 27 states scattered across four out of the five Brazilian geopolitical regions: northeast (Bahia, Sergipe), central-west (Mato Grosso), southeast (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, and São Paulo) and south (Paraná). Amplified fragments spanning the whole genome of SARS-CoV-2

RESEARCH

CORONAVIRUS

Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil

Nuno R. Faria^{1,2,3,4*}†, Thomas A. Mellan^{1,2}†, Charles Whittaker^{1,2}†, Ingra M. Claro^{3,5}†, Darlan da S. Candido^{3,4}†, Swapnil Mishra^{1,2}†, Myuki A. E. Crispim^{6,7}, Flavia C. S. Sales^{3,5}, Iwona Hawryluk^{1,2}, John T. McCrone⁸, Ruben J. G. Hulswit⁹, Lucas A. M. Franco^{3,5}, Mariana S. Ramundo^{3,5}, Jaqueline G. de Jesus^{3,5}, Pamela S. Andrade¹⁰, Thais M. Coletti^{3,5}, Giulia M. Ferreira¹¹, Camila A. M. Silva^{3,5}, Erika R. Manuli^{3,5}, Rafael H. M. Pereira¹², Pedro S. Peixoto¹³, Moritz U. G. Kraemer¹⁴, Nelson Gaburo Jr.¹⁴, Cecilia da C. Camilo¹⁴, Henrique Hoeltgebaum¹⁵, William M. Souza¹⁶, Esmeria C. Rocha^{3,5}, Leandro M. de Souza^{3,5}, Mariana C. de Pinho^{3,5}, Leonardo J. T. Araujo¹⁷, Frederico S. V. Malta¹⁸, Aline B. de Lima¹⁸, Joice do P. Silva¹⁸, Danielle A. G. Zauli¹⁸, Alessandro C. de S. Ferreira¹⁸, Ricardo P. Schneckenberg¹⁹, Daniel J. Laydon^{1,2}, Patrick G. T. Walker^{1,2}, Hannah M. Schlüter¹⁵, Ana L. P. dos Santos²⁰, Maria S. Vidal²⁰, Valentina S. Del Caro²⁰, Rosinaldo M. F. Filho²⁰, Helem M. dos Santos²⁰, Renato S. Aguiar²¹, José L. Prouença-Modena²², Bruce Nelson²³, James A. Hay^{24,25}, Mélodie Monod¹⁵, Xenia Miscouridou¹⁵, Helen Coupland¹², Raphael Sonabend^{1,2}, Michaela Vollmer^{1,2}, Axel Gandy¹⁵, Carlos A. Prete Jr.²⁶, Vitor H. Nascimento²⁶, Marc A. Suchard²⁷, Thomas A. Bowden⁹, Sergei L. K. Pond²⁸, Chieh-Hsi Wu²⁹, Oliver Ratmann¹⁵, Neil M. Ferguson^{1,2}, Christopher Dye⁴, Nick J. Loman³⁰, Philippe Lemey³¹, Andrew Rambaut⁸, Nelson A. Fraiji^{6,32}, Maria do P. S. S. Carvalho^{6,33}, Oliver G. Pybus^{4,34}†, Seth Flaxman¹⁵†, Samir Bhatt^{1,2,35*}†, Ester C. Sabino^{3,5*}†

Cases of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in Manaus, Brazil, resurged in late 2020 despite previously high levels of infection. Genome sequencing of viruses sampled in Manaus between November 2020 and January 2021 revealed the emergence and circulation of a novel SARS-CoV-2 variant of concern. Lineage P.1 acquired 17 mutations, including a trio in the spike protein (K417T, E484K, and N501Y) associated with increased binding to the human ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) receptor. Molecular clock analysis shows that P.1 emergence occurred around mid-November 2020 and was preceded by a period of faster molecular evolution. Using a two-category dynamical model that integrates genomic and mortality data, we estimate that P.1 may be 1.7- to 2.4-fold more transmissible and that previous (non-P.1) infection provides 54 to 79% of the protection against infection with P.1 that it provides against non-P.1 lineages. Enhanced global genomic surveillance of variants of concern, which may exhibit increased transmissibility and/or immune evasion, is critical to accelerate pandemic responsiveness.

Brazil has experienced high mortality during the COVID-19 pandemic, recording >300,000 deaths and >13 million reported cases, as of March 2021. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection and disease burden have been highly variable across the country, with the state of Amazonas in north Brazil being the worst-affected region (1). Serological

surveillance of blood donors in Manaus, the capital city of Amazonas and the largest city in the Amazon region, has suggested >67% cumulative attack rates by October 2020 (2). Similar but slightly lower seroprevalences have also been reported for cities in neighboring regions (3, 4). However, the level of previous infection in Manaus was clearly not sufficient to prevent a rapid resurgence in SARS-CoV-2

transmission and mortality there during late 2020 and early 2021 (5), which has placed substantial pressure on the city's health care system.

Here, we show that the second wave of infection in Manaus was associated with the emergence and rapid spread of a new SARS-CoV-2 lineage of concern, named lineage P.1. The lineage carries a distinctive constellation of mutations (table S1), including several that have been previously determined to be of virological importance (6–10) and that are located in the spike protein receptor binding domain (RBD), the region of the virus involved in recognition of the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) cell surface receptor (11). Using genomic data, structure-based mapping of mutations of interest onto the spike protein, and dynamical epidemiology modeling of genomic and mortality data, we investigated the emergence of the P.1 lineage and explored epidemiological explanations for the resurgence of COVID-19 in Manaus.

Identification and nomenclature of the P.1 lineage in Manaus

In late 2020, two SARS-CoV-2 lineages of concern were discovered through genomic surveillance, both characterized by sets of notable mutations: lineage B.1.351, first reported in South Africa (12), and lineage B.1.1.7, detected in the UK (13). Both variants have transmitted rapidly in the countries where they were discovered and spread to other regions (14, 15). Analyses indicate that B.1.1.7 has higher transmissibility and causes more severe illness as compared with those of previously circulating lineages in the UK (1, 16, 17).

After a rapid increase in hospitalizations in Manaus caused by severe acute respiratory infection (SARI) in December 2020 (Fig. 1A), we focused ongoing SARS-CoV-2 genomic surveillance (2, 18–22) on recently collected samples from the city (supplementary materials, materials and methods, and table S2). Before this, only seven SARS-CoV-2 genome sequences from Amazonas were publicly available (SARS-CoV-2 was first detected in Manaus

¹MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, School of Public Health, Imperial College London, London, UK. ²The Abdul Latif Jameel Institute for Disease and Emergency Analytics (J-IDEA), School of Public Health, Imperial College London, London, UK. ³Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK. ⁵Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁶Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia, Manaus, Brazil. ⁷Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia, Manaus, Brazil. ⁸Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK. ⁹Division of Structural Biology, Wellcome Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, UK. ¹⁰Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ¹¹Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil. ¹²Institute for Applied Economic Research-Ipea, Brasília, Brazil. ¹³Institute of Mathematics and Statistics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ¹⁴DB Diagnósticos do Brasil, São Paulo, Brazil. ¹⁵Department of Mathematics, Imperial College London, London, UK. ¹⁶Virology Research Centre, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ¹⁷Laboratory of Quantitative Pathology, Center of Pathology, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil. ¹⁸Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte, Brazil. ¹⁹Nuffield Department of Clinical Neurosciences, University of Oxford, Oxford, UK. ²⁰CDL Laboratório Santos e Vidal, Manaus, Brazil. ²¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ²²Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. ²³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil. ²⁴Department of Epidemiology, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, MA, USA. ²⁵Center for Communicable Disease Dynamics, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, MA, USA. ²⁶Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ²⁷Department of Biomathematics, Department of Biostatistics, and Department of Human Genetics, University of California, Los Angeles, CA, USA. ²⁸Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Temple University, Philadelphia, PA, USA. ²⁹Mathematical Sciences, University of Southampton, Southampton, UK. ³⁰Institute for Microbiology and Infection, University of Birmingham, Birmingham, UK. ³¹Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium. ³²Diretoria Clínica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil. ³³Diretoria da Presidência, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil. ³⁴Department of Pathobiology and Population Sciences, The Royal Veterinary College, London, UK. ³⁵Section of Epidemiology, Department of Public Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

†These authors contributed equally to this work. ‡These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Email: n.faria@imperial.ac.uk (N.R.F.); samir.bhatt@sund.ku.dk (S.B.); sabinoec@usp.br (E.S.C.)

Article

Monitoring the Establishment of VOC Gamma in Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study

Hugo José Alves ^{1,†}, João Locke Ferreira de Araújo ^{1,†}, Paula Luize Camargos Fonseca ^{1,†}, Filipe Romero Rebello Moreira ^{2,†}, Diego Menezes Bonfim ¹, Daniel Costa Queiroz ¹, Lucyene Miguita ³, Rafael Marques de Souza ¹, Victor Emmanuel Viana Geddes ¹, Walyson Coelho Costa ¹, Jaqueline Silva de Oliveira ⁴, Eva Lídia Arcoverde Medeiros ⁴, Carolina Senra Alves de Souza ⁵, Juliana Wilke Saliba ⁵, André Luiz Menezes ⁶, Eneida Santos de Oliveira ⁶, Talita Emile Ribeiro Adelino ⁷, Natalia Rocha Guimaraes ⁷, Adriana Aparecida Ribeiro ⁷, Rennan Garcias Moreira ⁸, Danielle Alves Gomes Zauli ⁹, Joice do Prado Silva ⁹, Frederico Scott Varella Malta ⁹, Alessandro Clayton de Souza Ferreira ¹, Ana Valesca Fernandes Gilson Silva ¹⁰, Poliane Alfenas-Zerbini ¹¹, Flavia Oliveira de Souza ¹¹, Adriano de Paula Sabino ¹², Laura do Amaral Xavier ¹², Natália Virtude Carobin ¹², Alex Fiorini de Carvalho ¹³, Karine Lima Lourenço ¹³, Santuza Maria Ribeiro Teixeira ¹³, Ana Paula Salles Moura Fernandes ¹³, Flavio Guimarães da Fonseca ¹³, Jônatas Santos Abrahão ¹⁴, Felipe Campos de Melo Iani ⁷, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues ¹⁴, Renan Pedra de Souza ^{1,*} and Renato Santana Aguiar ^{1,15,*}



Citation: Alves, H.J.; de Araújo, J.L.F.; Fonseca, P.L.C.; Moreira, F.R.R.; Bonfim, D.M.; Queiroz, D.C.; Miguita, L.; de Souza, R.M.; Geddes, V.E.V.; Costa, W.C.; et al. Monitoring the Establishment of VOC Gamma in Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study. *Viruses* **2022**, *14*, 2747. <https://doi.org/10.3390/v14122747>

Academic Editors: Marta Giovanetti and Luiz Carlos Junior Alcantara

Received: 27 October 2022

Accepted: 28 November 2022

Published: 9 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ² Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil
 - ³ Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁴ Subsecretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte 31585-200, Brazil
 - ⁵ Pan American Health Organization-PAHO, Brasília 70312-970, Brazil
 - ⁶ Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte 30130-040, Brazil
 - ⁷ Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte 30510-010, Brazil
 - ⁸ Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁹ Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte 30140-070, Brazil
 - ¹⁰ Escola de Saúde Pública de Betim, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Betim, Betim 32600-412, Brazil
 - ¹¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brazil
 - ¹² Laboratório de Institucional de Pesquisa em Biomarcadores, LINBIO, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ¹³ Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31310-260, Brazil
 - ¹⁴ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31279-901, Brazil
 - ¹⁵ Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro 22281-100, Brazil
- * Correspondence: renanpedra@gmail.com (R.P.d.S.); santanarnt@gmail.com (R.S.A.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Since its first identification in Brazil, the variant of concern (VOC) Gamma has been associated with increased infection and transmission rates, hospitalizations, and deaths. Minas Gerais (MG), the second-largest populated Brazilian state with more than 20 million inhabitants, observed a peak of cases and deaths in March–April 2021. We conducted a surveillance study in 1240 COVID-19-positive samples from 305 municipalities distributed across MG's 28 Regional Health Units (RHU) between 1 March to 27 April 2021. The most common variant was the VOC Gamma (71.2%), followed by the variant of interest (VOI) zeta (12.4%) and VOC alpha (9.6%). Although the predominance of Gamma was found in most of the RHUs, clusters of Zeta and Alpha variants were observed. One Alpha-clustered RHU has a history of high human mobility from countries with

Tracking the turnover of SARS-CoV-2 VOCs Gamma to Delta in a Brazilian state (Minas Gerais) with a high-vaccination status

Paula L. C. Fonseca,^{1,†} Filipe R. R. Moreira,^{2,3,†} Rafael M. de Souza,^{1,†} Natália R. Guimarães,⁴ Nara O. Carvalho,⁵ Talita E. R. Adelino,⁴ Hugo J. Alves,¹ Luíge B. Alvim,⁶ Darlan S. Candido,^{7,8} Helena P. Coelho,⁹ Alana V. B. Costa,⁴ Walyson C. Costa,¹ Alex F. de Carvalho,⁹ Bruna W. F. de Faria,¹⁰ Aline B. de Lima,⁶ Eneida S. de Oliveira,¹⁰ Carolina S. A. de Souza,¹¹ Fernanda G. de Souza,¹ Rillery C. Dias,¹ Victor E. V. Geddes,¹ Igor P. Godinho,⁹ Alessandro L. Gonçalves,¹ Karine L. Lourenço,⁹ Rubens D. M. Magalhães,⁹ Frederico S. V. Malta,⁶ Eva L. A. Medeiros,¹² Fernanda S. Mendes,⁵ Pedro H. B. de P. Mendes,⁴ Cristiane P. T. B. Mendonça,⁶ Andre L. Menezes,¹⁰ Diego Menezes,¹ Mariane T. Menezes,² Lucyene Miguita,¹³ Rennan G. Moreira,¹⁴ Renata B. Peixoto,¹⁵ Daniel C. Queiroz,¹ Adriana A. Ribeiro,⁴ Ana Paula de B. Ribeiro,⁴ Juliana W. Saliba,¹¹ Hugo I. Sato,^{9,8} Joice do P. Silva,^{1,6} Natiely P. Silva,⁵ Nuno R. Faria,^{2,7,8} Santuza M. R. Teixeira,⁹ Flávio G. da Fonseca,⁹ Ana Paula S. M. Fernandes,⁹ Danielle A. G. Zauli,⁶ José Nélito Januario,⁵ Jaqueline S. de Oliveira,¹² Felipe C. de M. Iani,^{4,*} Renato S. de Aguiar,^{1,16,*}† and Renan P. de Souza^{1,*}†

¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ²MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, J-IDEA, Imperial College London, Exhibition Rd, South Kensington, London SW7 2BX, UK, ³Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Fundacao Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, Belo Horizonte 30510-010, Minas Gerais, Brazil, ⁵Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico-Nupad/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena 189, Centro, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil, ⁶Instituto Hermes Pardini, Av. das Nações 2448, Distrito Industrial, Vespasiano 33201003, Minas Gerais, Brazil, ⁷Department of Zoology, University of Oxford, 11a Mansfield Rd, Oxford OX13SZ, UK, ⁸Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 470, Jardim América, São Paulo 05403000, São Paulo, Brazil, ⁹Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Rua Professor José Vieira de Mendonça 770, Engenho Nogueira, Belo Horizonte 31310260, Minas Gerais, Brazil, ¹⁰Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, Av. Afonso Pena 2336, Funcionários, Belo Horizonte 30130-040, Minas Gerais, Brazil, ¹¹Pan American Health Organization—PAHO, Av. Das Nações SEN, Asa Norte, Brasília 70312970, Brazil, ¹²Subsecretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Rodovia Papa João Paulo II 4143. Edifício Minas Gerais, Cidade Administrativa, Serra verde, Belo Horizonte 31630900, Minas Gerais, Brazil, ¹³Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ¹⁴Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ¹⁵Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil and ¹⁶Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro 22281100, Rio de Janeiro, Brazil

†These authors share the senior authorship.

‡These first authors contributed equally to this article.

§<https://orcid.org/0000-0001-5180-9983>

¶<https://orcid.org/0000-0002-3629-8529>

*Corresponding authors: E-mail: santanarnt@gmail.com; renanpedra@gmail.com

Abstract

The emergence and global dissemination of Severe Acute Respiratory Syndrome virus 2 (SARS-CoV-2) variants of concern (VOCs) have been described as the main factor driving the Coronavirus Disease 2019 pandemic. In Brazil, the Gamma variant dominated the epidemiological scenario during the first period of 2021. Many Brazilian regions detected the Delta variant after its first description and documented its spread. To monitor the introduction and spread of VOC Delta, we performed Polymerase Chain Reaction (PCR) genotyping and genome sequencing in ten regional sentinel units from June to October 2021 in the State of Minas Gerais (MG). We documented the introduction and spread of Delta, comprising 70 per cent of the cases 8 weeks later. Comparing the viral loads of the Gamma and Delta dominance periods, we provide additional evidence that the latter is more transmissible. The spread and dominance of Delta did not culminate in the increase in cases and deaths, suggesting that the vaccination may have restrained the epidemic growth. Analysis of 224 novel Delta genomes revealed that Rio de Janeiro state was the primary source for disseminating this variant in the state of MG. We present the establishment of Delta, providing evidence of its enhanced transmissibility and showing that this variant shift did not aggravate the epidemiological scenario in a high immunity setting.

Key words: Genomic surveillance; phylogeny; phylogeography; viral lineages; vaccines.














© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Article

Dynamics of Early Establishment of SARS-CoV-2 VOC Omicron Lineages in Minas Gerais, Brazil

Mariane Talon de Menezes ¹, Filipe Romero Rebello Moreira ^{1,2}, Charles Whittaker ², Franciele Martins Santos ³, Daniel Costa Queiroz ³, Victor Geddes ³, Paula Luize Camargos Fonseca ³, Jaqueline Góes de Jesus ^{4,5}, Franciane Mendes-Oliveira ⁴, Valquíria Reis-Souza ⁴, Bibiana Santos ⁶, Danielle Alves Gomes Zauli ⁷, Aline Brito de Lima ⁷, Cristiane de Brito Mendonça ⁷, Luige Biciati Alvim ⁷, Joice do Prado Silva ⁷, Frederico Scott Varella Malta ⁷, Alessandro Clayton de Souza Ferreira ⁷, Nuno R. Faria ^{2,4,8}, Ester Cerdeira Sabino ^{4,5} and Renato Santana Aguiar ^{1,3,9,*}

- ¹ Laboratory of Molecular Virology, Institute of Biology, Department of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil
- ² MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, Imperial College London, London SW7 2BX, UK
- ³ Laboratory of Integrative Biology, Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270, Brazil
- ⁴ Institute of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 04023, Brazil
- ⁵ Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 04023, Brazil
- ⁶ Mendelics Genomic Analysis, São Paulo 04023, Brazil
- ⁷ Pardini Group, Research and Development Department, Belo Horizonte 31270, Brazil
- ⁸ Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX3 7BN, UK
- ⁹ D'OR Institute of Research and Teaching, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil
- * Correspondence: santanarnt@gmail.com



Citation: de Menezes, M.T.; Moreira, F.R.R.; Whittaker, C.; Santos, F.M.; Queiroz, D.C.; Geddes, V.; Fonseca, P.L.C.; de Jesus, J.G.; Mendes-Oliveira, F.; Reis-Souza, V.; et al. Dynamics of Early Establishment of SARS-CoV-2 VOC Omicron Lineages in Minas Gerais, Brazil. *Viruses* **2023**, *15*, 585. <https://doi.org/10.3390/v15020585>

Academic Editor: Alexandre Hassanin

Received: 27 December 2022

Revised: 21 January 2023

Accepted: 24 January 2023

Published: 20 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Brazil is one of the nations most affected by Coronavirus disease 2019 (COVID-19). The introduction and establishment of new virus variants can be related to an increase in cases and fatalities. The emergence of Omicron, the most modified SARS-CoV-2 variant, caused alarm for the public health of Brazil. In this study, we examined the effects of the Omicron introduction in Minas Gerais (MG), the second-most populous state of Brazil. A total of 430 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) samples from November 2021 to June 2022 from Belo Horizonte (BH) city were sequenced. These newly sequenced genomes comprise 72% of all previously available SARS-CoV-2 genomes for the city. Evolutionary analysis of novel viral genomes reveals that a great diversity of Omicron sublineages have circulated in BH, a pattern in-keeping with observations across Brazil more generally. Bayesian phylogeographic reconstructions indicate that this diversity is a product of a large number of international and national importations. As observed previously, São Paulo state is shown as a significant hub for viral spread throughout the country, contributing to around 70% of all viral Omicron introductions detected in MG.

Keywords: Omicron; SARS-CoV-2; genomic surveillance; variants of concern; viral evolution

1. Introduction

The emergence and global spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was the driver of one of the largest global health crises of the century, accounting for more than 6 million deaths worldwide (<https://covid19.who.int/>, accessed on 11 January 2023). Brazil was one of the countries impacted most by the Coronavirus disease 2019 (COVID-19), with disproportionately high numbers of cases and deaths (9.5% and 10.4% of the total, respectively, while the country harbors 2.7% of the global population) [1]. The first case of COVID-19 in the country occurred in late February 2020 in São Paulo state [2], later spreading to all other regions of the nation through multiple virus international introductions [3]. To date, SARS-CoV-2 has caused more than



CBGM 2022
 XXXIII Congresso Brasileiro de
GENÉTICA MÉDICA
 28 SET a 01 OUT | 2022

CERTIFICADO

Certificamos que

**JOICE DO PRADO SILVA, ALINE BRITO DE LIMA, LUIGE BICIATI ALVIM, FREDERICO SCOTT VARELLA MATA, CRISTIANE PINHEIRO
 TOSCANO DE BRITO MENDONÇA, PAULA LUIZE CAMARGOS FONSECA, RENAN PEDRA DE SOUZA, RENATO SANTANA DE
 AGUIAR, DANIELLE ALVES GOMES ZAULI**

Participou(aram) do XXXIII Congresso Brasileiro de Genética Médica, realizado no período de 28 de setembro a 01 de outubro de 2022, em Curitiba - PR.

Na qualidade de AUTORES do trabalho aprovado para : SPREAD DYNAMIC OF SARS-COV-2 VARIANTS AND RELATED ALTERATIONS IN THE
 TRANSMISSION RATES: A NATIONAL SCALE STUDY

Curitiba, 1 de outubro de 2022.

Código de Autenticação: ZCGZPJ



Verifique a autenticidade em www.e-certif.com.br


Tênis Maria Félix
 Presidente da SBGM


Salmo Raskin
 Presidente do Congresso

PROMOÇÃO



SBGM
 Sociedade Brasileira
 de Genética Médica





susy@mdpi.com em nome de Editorial Office <viruses@mdpi.com>

Danielle Zauli; Joice Silva; Aline Brito de Lima; Luige Alvim; Frederico Malta; Cristiane Brito; Andre Carvalho; + 7 -

qua 01/03

[Viruses] Manuscript ID: viruses-2286911 - Submission Received

Removemos as quebras de linha extras desta mensagem.

Dear Dr. Zauli,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Viruses

Manuscript ID: viruses-2286911

Type of manuscript: Article

Title: Epidemiological surveillance reveals the rise and establishment of the Omicron SARS-CoV-2 variant in Brazil

Authors: Joice do Prado Silva, Aline Brito de Lima, Luige Biciati Alvim, Frederico Scott Varella Malta, Cristiane Pinheiro Toscano Brito Mendonça, André Henrique Barbosa de Carvalho, Jéssica Silqueira Hickson Rios, Paula

Luize Camargos Fonseca, Daniel Costa Queiroz, Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos, Alessandro Clayton de Souza Ferreira, Renan Pedra de Souza, Renato Santana de Aguiar *, Danielle Alves Gomes Zauli *

Received: 1 March 2023

E-mails: joice.silva@grupopardini.com.br, alinebrito.lima@grupopardini.com.br, luige.alvim@grupopardini.com.br, frederico.malta@grupopardini.com.br, cristiane.brito@grupopardini.com.br,andre.carvalho@grupopardini.com.br, jessica.rios@grupopardini.com.br, camargos.paulaluize@gmail.com, dcbiufmg@gmail.com, luizagossantos@hotmail.com, alessandro.ferreira@grupopardini.com.br,renanpedra@gmail.com, santanarnt@gmail.com, danielle.zauli@grupopardini.com.br

Submitted to section: SARS-CoV-2 and COVID-19,

https://www.mdpi.com/journal/viruses/sections/SARS-CoV-2_and_COVID-19

You can follow progress of your manuscript at the following link (login

required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/103b81dc1b7ab3626cce6a475d74b252

The following points were confirmed during submission:



susy@mdpi.com em nome de Editorial Office <viruses@mdpi.com>

Danielle Zauli; Joice Silva; Aline Brito de Lima; Luige Alvim; Frederico Malta; Cristiane Brito; Andre Carvalho; + 7 -

qua 01/03

[Viruses] Manuscript ID: viruses-2286911 - Submission Received

Removemos as quebras de linha extras desta mensagem.

1. Viruses is an open access journal with publishing fees of 2600 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/viruses/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Viruses editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission.

(Please refer to the Rights & Permissions website:

<https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Viruses editorial office at viruses@mdpi.com

Kind regards,

Viruses Editorial Office

St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland

E-Mail: viruses@mdpi.com