

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 27/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FELIPE ALLAN DA SILVA DA COSTA

**Análise da dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2
no período de pré-vacinação em massa na cidade de Botucatu-SP**

Araraquara

2022

FELIPE ALLAN DA SILVA DA COSTA

**Análise da dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2
no período de pré-vacinação em massa na cidade de Botucatu-SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Biologia Molecular.

Orientador: Profº. Drº. Jayme Augusto Souza Neto

Coorientadora: Profª. Drª. Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Profº. Drº. Carlos Magno Castelo Branco

Fortaleza

Araraquara

2022

C837a Costa, Felipe Allan da Silva da.
Análise da dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2 no período de pré-vacinação em massa na cidade de Botucatu-SP / Felipe Allan da Silva da Costa. – Araraquara: [S.n.], 2022.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Biologia Molecular.

Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto.
Coorientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto.
Coorientador: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

1. SARS-CoV-2. 2. Variantes do SARS-COV-2. 3. Epidemiologia Molecular. I. Souza-Neto, Jayme Augusto de, orient. II. Grotto, Rejane Maria Tommasini, coorient. III. Fortaleza, Carlos Magno Castelo Branco, coorient. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise da dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2 no período de pré-vacinação em massa na cidade de Botucatu-SP

AUTOR: FELIPE ALLAN DA SILVA DA COSTA

ORIENTADOR: JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO

COORIENTADORA: REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO

COORIENTADOR: CARLOS MAGNO CASTELO BRANCO FORTALEZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. MARIA CAROLINA QUARTIM BARBOSA ELIAS-SABBAGA (Participação Virtual)
Departamento de Parasitologia / Instituto Butantã de São Paulo

Dra. KAREN INGRID TASCA (Participação Virtual)
Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Araraquara, 27 de setembro de 2022

A minha mãe Luciene, a minha Tia Elaine e a minha irmã Maria Eduarda por todo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao apoio financeiro e emocional da minha família, especialmente minha mãe Luciene, minha tia Elaine e minha irmã Maria Eduarda, mulheres inspiradoras que não mediram esforços para que eu chegasse e concluísse essa etapa da minha vida.

Ao meu namorado Tiago Rodrigo Beloti por todo apoio, amor e carinho durante essa jornada.

Agradeço ao povo brasileiro por contribuir para o suporte e manutenção das bolsas de estudo, sobretudo àquelas implementadas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a qual fui contemplado.

Ao professor e orientador Jayme Augusto Souza Neto pela sua atenção, compreensão e respeito desde o início, além de se mostrar bem acessível e dedicado ao meu aprendizado. Também agradeço pela oportunidade concedida em estagiar no laboratório no Treinamento Técnico, que foi de suma importância para eu descobrir o amor pela área.

A minha coorientadora Professora e Doutora Rejane Maria Tommasini Grotto por estar presente durante todo processo deste trabalho e me incentivar a continuar na área da pesquisa. Ao meu orientador Professor e Doutor Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza por auxiliar nas análises epidemiológicas e bioestatísticas, processos fundamentais no andamento dessa pesquisa.

Por último e não menos importante, agradeço as pessoas do Laboratório de Genômica Funcional & Microbiologia de Vetores da Unesp de Botucatu-SP por contribuírem e participarem ativamente dos experimentos e desenvolvimento desta pesquisa. Meu muito obrigado, Patrícia Akemi Assato, Drielle Baptista Dos Santos Figueiredo, Tassia Turini e Leonardo Nazario de Moraes por todo aparato no desenvolvimento deste trabalho e apoio emocion

RESUMO

Após a circulação das Variantes de Preocupação (VOC) do SARS-CoV-2, Alpha, Beta, Gamma, Delta e a atual predominante Ômicron, e a ampla cobertura vacinal, houve uma drástica redução nos números de óbitos por Covid-19. Em maio de 2021, o município de Botucatu-SP foi palco de uma pesquisa que avaliou a efetividade da Vacina COVID-19 Recombinante/Fiocruz® contra variantes do SARS-CoV-2, possibilitando a imunização de mais de 60 mil pessoas em um único dia. **Objetivos:** O objetivo central do presente estudo foi avaliar a dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2 antes da vacinação massiva que ocorreu em Botucatu, além de relacioná-las às características clínicas da doença. **Metodologia:** Foram selecionadas aleatoriamente 400 amostras positivas para SARS-CoV-2, referentes as 4 Semanas Epidemiológicas (SE 16, 17, 18 e 19 de 2021) que antecederam o dia da vacinação. O Sequenciamento de Nova Geração foi utilizado para produzir as sequências e determinar as variantes. **Resultados:** Foram geradas 371 sequências de alta qualidade. Dessas sequências, 98,4% eram da VOC Gamma, enquanto 1,3% eram da VOC Alpha e 0,3% eram da Variante de Interesse Zeta. Durante as 4 SE as linhagens de Gamma P.1 e P.1.14 foram as mais frequentes. A linhagem P.1 foi mais frequente tanto em homens quanto em mulheres e nas pessoas mais jovens e nos adultos (0-59 anos). Não houve correlação entre as variantes e a presença de comorbidades, tampouco entre elas e os quadros clínicos moderados e graves da Covid-19 ou óbito. Entretanto, P.1 foi mais frequente do que P.1.14 em pessoas que apresentaram algum sintoma da Covid-19. Não houve diferença entre os valores de PCR em tempo real (C_T) para essas linhagens. Nas análises filogenéticas, foi possível observar um pequeno agrupamento de 9 amostras de P.1.14 contendo as mutações em ORF1a: M584V e A3620V, até então, não encontradas em nenhuma sequência dessa sublinhagem. **Conclusão:** A alta predominância de P.1 e P.1.14 em um cenário pré-vacinação em massa pode nos fornecer *insights* sobre a evolução e a epidemiologia molecular do SARS-CoV-2 e suas VOCs. Dessa forma ressaltamos a importância da vigilância genômica do SARS-CoV-2, que pode ajudar a subsidiar as tomadas de decisões dos setores públicos e manejo da Covid-19.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Variantes do SARS-CoV-2; Epidemiologia Molecular.

ABSTRACT

After the circulation of the Variants of Concern (VOC) of SARS-CoV-2, Alpha, Beta, Gamma, Delta and the current predominant Ômicron, and the wide vaccine coverage, there was a drastic reduction in the numbers of deaths by Covid-19. In May 2021, the municipality of Botucatu-SP was the scene of a survey that evaluated the effectiveness of the Vaccine COVID-19 Recombinant/Fiocruz® against variants of SARS-CoV-2, enabling the immunization of more than 60,000 people in a single day. Objectives: The main objective of the present study was to evaluate the temporal and epidemiological dispersion of the SARS-CoV-2 variants before the massive vaccination that took place in Botucatu, in addition to relating them to the clinical characteristics of the disease. Methodology: 400 samples positive for SARS-CoV-2 were randomly selected, referring to the 4 Epidemiological Weeks (SE 16, 17, 18 and 19 of 2021) that preceded the day of vaccination. Next Generation Sequencing was used to generate the sequences and determine the variants. Results: 371 high quality sequences were generated. Of these sequences, 98.4% were from VOC Gamma, while 1.3% were from VOC Alpha and 0.3% were from Variant of Interest Zeta. During the 4 SEs, the Gamma P.1 and P.1.14 strains were the most frequent. Lineage P.1 was more frequent in both men and women and in younger people and adults (0-59 years). There was no correlation between the variants and the presence of comorbidities, nor between them and the moderate and severe clinical conditions of Covid-19 or death. However, P.1 was more frequent than P.1.14 in people who had some symptoms of Covid-19. There was no difference between real-time PCR (CT) values for these strains. In the phylogenetic analyses, it was possible to observe a small grouping of 9 P.1.14 samples containing the mutations in ORF1a: M584V and A3620V, until then, not found in any sequence of this subline. Conclusion: The high prevalence of P.1 and P.1.14 in a pre-mass vaccination scenario may provide us with insights into the evolution and molecular epidemiology of SARS-CoV-2 and its VOCs. In this way, we emphasize the importance of SARS-CoV-2 genomic surveillance, which can help support public sector decision-making and the management of Covid-19.

Keywords: SARS-CoV-2; SARS-CoV-2 variants; Molecular Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição temporal das variantes do SARS-CoV-2 nas SE 16, 17, 18 e 19 de 2021 no município de Botucatu-SP.	28
Figura 2: Distribuição das sublinhagens da VOC do SARS-CoV-2 Gamma nas SE 16, 17, 18 e 19 de 2021 no município de Botucatu-SP. O valor de p (*) indica a significância estatística encontrada, indicando a maior proporção de P.1 quando comparada com P.1.14 na SE 16	30
Figura 3: Proporção das variantes do SARS-CoV-2 encontradas através das SE 16, 17, 18 e 19 de 2021 em relação ao total de casos positivos de cada SE, representados pela linha preta.	31
Figura 4: Linhagens encontradas pela Rede Butantan de Alerta Pandêmico de Variantes SARS-CoV-2 durante a vigilância genômica do SARS-CoV-2 nas SE 16, 17, 18 e 19 de 2021.	32
Figura 5: Departamentos Regionais de Saúde (DRS) do estado de São Paulo.	33
Figura 6: Frequências das linhagens P.1 e P.1.14 nas DRS que circulam o município de Botucatu, incluindo a DRS da capital São Paulo.	34
Figura 7: Distribuição das variantes do SARS-CoV-2 de acordo com cada gênero. O valor de p (*) indica a significância estatística encontrada nas frequências de P.1 quando comparada com a sublinhagem P.1.14.	36
Figura 8: Frequência das variantes do SARS-CoV-2 distribuídas em diferentes grupos de acordo com as faixas etárias. O "n" indica o número total de amostras sequenciadas em cada grupo. O valor de p (*) indica a significância estatística.	37
Figura 9: Frequências das variantes do SARS-CoV-2 entre as pessoas com diferentes tipos de comorbidades. O "n" indica o número de participantes deste estudo que convivem com determinada comorbidade.	38
Figura 10: Árvore filogenética com as amostras de Botucatu-SP coletadas antes da vacinação em massa destacadas em amarelo.	40
Figura 11: Árvore filogenética destacando o clado 20B contendo todas as 371 amostras do presente estudo realizado em Botucatu-SP nas SE 16, 17, 18 e 19 de 2021.	41
Figura 12: Árvore filogenética contendo apenas as linhagens de Gamma. Dentro do triângulo vermelho em destaque, estão as sequências da sublinhagem P.1.14 agrupadas no clado contendo a substituição em ORF1a:S2947N. As outras amostras são majoritariamente P.1.	42

Figura 13: Ramo da árvore da sublinhagem P.1.14 que contém a mutação em ORF1a:S2947N.43

Figura 14: Trecho da árvore filogenética destacando o ramo com amostras deste estudo que se agruparam no ramo contendo as substituições em ORF1a: M584V e A3620V.44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de amostras positivas e sequenciadas nas SE selecionadas do estudo. Encontram-se também a quantidade de genomas que passaram em todos os testes de qualidade e as plataformas de sequenciamento.	25
Tabela 2: Relação das comorbidades importantes para Covid-19 encontradas neste estudo e a quantidade de participantes que convivem com essas doenças.....	27
Tabela 3: Proporção da distribuição das variantes do SARS-CoV-2 do total de sequências produzidas em cada gênero.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA – DNA Complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

Covid-19 - Doença Pelo Coronavírus de 2019

DRS – Departamentos Regionais de Saúde

ECA-2 – Enzima Conversora da Angiotensina 2

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

GISAID - Iniciativa Global de Compartilhamento de Dados de Influenza Aviária

HC – Hospital das Clínicas

HCFMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

MERS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

nsp – Proteína não Estrutural

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF - Quadro de Leitura Aberto

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pM – Picomolar

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RBD – Domínio de Ligação ao Receptor

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-qPCR - Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SE – Semana Epidemiológica

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VOC – Variante de Preocupação

VOI – Variante de Interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	18
1.1.1 Geral.....	18
1.1.2 Específicos	18
2 METODOLOGIA.....	20
2.1 Seleção das amostras para o estudo	20
2.2 Obtenção das amostras positivas para SARS-CoV-2	20
2.3 Extração de RNA e confirmação da presença do SARS-CoV-2 por RT-qPCR	20
2.4 Preparo das bibliotecas e Sequenciamento do Genoma do SARS-CoV-2	21
2.4.1 Preparo das bibliotecas e sequenciamento Illumina.....	21
2.4.1.1 Fluxo de bioinformática - Illumina.....	22
2.4.2 Preparo das bibliotecas e sequenciamento ION Torrent	22
2.4.2.1 Fluxo de bioinformática – <i>Ion Torrent</i>	23
2.5 Análise estatísticas dos Resultados.....	23
2.6 Análises Filogenéticas	24
3 RESULTADOS	25
3.1 Amostras sequenciadas e qualidade do sequenciamento.....	25
3.2 Descrição dos dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos participantes do estudo	26
3.3 Distribuição temporal das variantes do SARS-CoV-2 antes da vacinação em massa em Botucatu	28
3.3.1 Distribuição das sublinhagens de Gamma do SARS-CoV-2 nas SE 16, 17, 18 e 19 de 2021	29
3.4 Comparação das frequências das linhagens do SARS-CoV-2 da cidade de Botucatu-SP com o estado de São Paulo	31
3.5 Distribuição das variantes do SARS-CoV-2 de acordo com os gêneros	34
3.6 Distribuição das variantes do SARS-COV-2 em diferentes faixas etárias	36
3.7 Associação das linhagens do SARS-CoV-2 com comorbidades.....	37
3.8 Associação das linhagens do SARS-CoV-2 com a situação clínica e vacinal dos participantes	39
3.9 Análises Filogenéticas	39
4 DISCUSSÃO	45

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus são vírus envelopados com uma fita simples de RNA de sentido positivo em seu genoma e podem infectar diversos animais, inclusive seres humanos. Estes vírus podem causar infecções respiratórias variando de brandas a graves, como é o exemplo dos Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Estes vírus causaram surtos de casos em 2002-2003 e 2012, respectivamente (ZHONG et al., 2003; ZAKI et al., 2012).

Em dezembro de 2019, foram registrados casos de uma pneumonia de origem desconhecida em Wuhan, na capital da província de Hubei na China, onde a maioria dos pacientes sintomáticos estavam ligados a um mercado atacadista de frutos do mar e animais da cidade (WUHAN MUNICIPAL HEALTH COMMISSION, 2019). Após a investigação epidemiológica e etiológica desses surtos, pesquisadores isolaram e identificaram um novo coronavírus, provisoriamente denominado 2019- nCoV (ZHU et al., 2020), atualmente designado como SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) (GORBALENYA et al., 2020). Mesmo após a implementação das medidas de contenção, o vírus se espalhou rapidamente por todo mundo. No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a pandemia da Covid-19 (Doença Pelo Coronavírus de 2019), alertando que os números de infectados e mortes deveriam subir em vários países (WHO, 2020a).

Até o presente momento (08/09/2022) foram notificados à OMS 603.711.760 casos positivos e 6.484.136 óbitos causados pela Covid-19 no mundo. No Brasil o cenário também foi profundamente impactado. Até agora foram registrados 34.477.539 casos e 684.425 mortes (WHO, 2022b).

O genoma do SARS-CoV-2 possui aproximadamente 30 mil bases (Lu et al., 2020) incluindo 14 quadros de leitura abertos (ORFs). A maioria das ORFs codificam 16 proteínas não estruturais (nsp 1 a 16) que fazem parte do processo de replicação viral. O restante das ORFs codifica 5 proteínas acessórias (ORF3, ORF4a, ORF4b, ORF5 e ORF8) e também as quatro proteínas estruturais básicas, que incluem as proteínas de envelope (E), de membrana (M), de nucleocapsídeo (N) e a proteína spike (S) (NAQVI et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

A proteína S é de suma importância para o processo infeccioso, mediando a ligação do vírus ao receptor celular, a Enzima Conversora da Angiotensina II (ECA2). A proteína S se liga à ECA2 por meio do domínio de ligação ao receptor (RBD), presente na

subunidade S1 da proteína S. Após isso, ocorre a fusão da subunidade S2 à membrana celular (HARRISON; LIN; WANG, 2020; CEVIK et al., 2020).

Assim como outros vírus, o SARS-CoV-2 também sofre diversas mutações em seu genoma. Estudos do genoma do SARS-CoV-2 têm demonstrado a ocorrência de mutações em diferentes isolados em todo mundo. Essas mutações se concentram principalmente no gene codificador da proteína S, sendo o RBD considerado como um *hotspot* mutacional (SHEIK et al., 2020; VAN DORP et al., 2020). Outros locais de variações e *hostpots* mutacionais no genoma do vírus têm sido descritos (WANG et al., 2020), como é o exemplo do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (PACHIETTI et al., 2020).

Essas mutações que ocorrem no genoma do SARS-CoV-2 bem como em outros vírus, podem resultar em fenótipos distintos aos das primeiras linhagens. Tais fenótipos podem apresentar alterações na epidemiologia do vírus, na sua transmissibilidade, no tropismo celular, na patologia ou no percurso da doença, no escape imunológico ou podem até mesmo dificultar as ferramentas de diagnóstico. Essas mutações, ao longo do tempo, também podem gerar novas linhagens do vírus - também conhecidas como variantes - e são determinantes no percurso evolutivo viral (VIGNUZZI et al., 2006; VIGNUZZI; ANDINO, 2008; COMBE; SANJUÁN, 2014; DUFFY, 2018; LESBON et al., 2021).

A OMS definiu dois grupos de variantes de acordo com a relevância médica para a saúde pública. O primeiro grupo constitui as Variantes de Interesse do SARS-CoV-2 (VOI), as quais devem possuir alterações fenotípicas ou mutações no genoma, em relação ao vírus de referência, que resultam em alterações de aminoácidos. As manifestações fenotípicas devem resultar em impactos na epidemiologia, antigenicidade ou virulência e também sobre os diagnósticos, terapias e vacinas. Além disso, uma VOI também deve ser considerada causadora de múltiplos casos ou ainda, ser avaliada como uma VOI pela OMS e o Grupo de Trabalho de Evolução do Vírus SARS-CoV-2 (WHO, 2021c).

Um outro grupo de variantes de interesses epidemiológicos são as Variantes de Preocupação do SARS-CoV-2 (VOC). Essas variantes, além de serem VOI, também devem estar associadas ao aumento da transmissibilidade ou agravamento na epidemiologia da Covid-19; ao aumento da virulência do patógeno ou alteração do quadro clínico da doença; e aos impactos negativos sobre as medidas sociais adotadas no enfrentamento da pandemia, no diagnóstico, no tratamento da doença e na eficácia das vacinas. Além disso, também pode ser avaliada como uma VOC pela OMS juntamente com o Grupo de Trabalho de Evolução do Vírus SARS-CoV-2 (WHO, 2021c).

As VOC do SARS-CoV-2 até o momento são: Alpha, Beta, Gama, Delta e Omicron. Juntas, estão associadas a maiores taxas de transmissibilidade e ao escape imunológico de vacinas ou de soros convalescentes. Essas questões causam bastante preocupação devido a ameaça da eficácia das vacinas, bem como o surgimento de novas ondas de contágio por causa das variantes que podem escapar da neutralização desencadeada por infecções anteriores. Sobre a relação entre variantes e diferentes aspectos clínicos da Covid-19 ainda não se tem uma confirmação clara (RAMAN; PATEL; RANJAN, 2021; LAZAREVIC et al., 2021; ALEEM; SAMAD; SLENKER, 2021; BOEHM et al., 2021; PAPANIKOLAOU et al., 2022).

Em relação à eficácia das vacinas contra as VOCs do SARS-CoV-2, estudos têm demonstrado bons resultados dos imunizantes disponíveis, entretanto alguns pontos são importantes de serem levantados. A VOC Alpha mostrou reduções significativas na neutralização por soros de vacinados pela BNT162b2 (BioNTech-Pfizer), variando de 1,5x a 6,7x (BATES et al., 2021; COLLIER et al., 2021; GARCIA-BELTRAN et al., 2021; KUZMINA et al., 2021). Quanto a eficácia clínica, os resultados foram muito positivos para a vacina ChAdOx1-nCov-19 - AZD1222 (AstraZeneca). Esse imunizante demonstrou uma eficácia contra a VOC Alpha de 81% para casos sintomáticos e 73% contra hospitalizações (NASREEN et al., 2021).

A variante Beta, em especial, causou grande preocupação acerca do escape imunológico. Estudos têm demonstrado reduções nos títulos de neutralização de soros vacinados variando de 4,2x até 41,2x (ANICHINI et al., 2021; DEJNIRATTISAI et al., 2021; GARCIA BELTRAN et al., 2021; WALL et al., 2021). A eficácia clínica contra essa VOC também foi significativamente menor (< 50%) para a vacina NVX-CoV2373 (Novavax) (CALLAWAY; MALLAPATY, 2021; NOVAVAX, 2021a).

Para Gamma, a redução dos títulos de neutralização em soros vacinados pela BNT162b2 (Pfizer) varia de 2,3x a 6,7x (GARCIA-BELTRAN et al., 2021; LUSTIG et al., 2021). E a eficácia clínica pelo mesmo imunizante, chegou a 89% contra casos sintomáticos e 95% contra hospitalizações e óbitos (NASREEN et al., 2021). Os títulos de neutralização contra a VOC Delta a partir de soros vacinados pela BNT162b2 (BioNTech-Pfizer) também foram reduzidos, em 1,54x até 5,8x (PLANAS et al., 2021; WALL et al., 2021). A eficácia clínica dessa vacina contra Delta chegou até 88% contra casos sintomáticos (BERNAL et al., 2021a; NASREEN et al., 2021). Por um outro lado, a eficácia clínica da vacina ChAdOx1-nCov-19 - AZD1222 (AstraZeneca) contra Delta foi menor, chegando a 67% contra casos sintomáticos (BERNAL et al., 2021b).

No caso da mais recente VOC, a Omicron, uma alta capacidade de resistência a anticorpos naturais ou induzidos tem sido observada. A redução da neutralização dessa variante, quando comparada com Delta, foi reduzida de 12 a 44 vezes em pacientes convalescentes ou indivíduos vacinados com o imunizante BNT162b2 (BioNTech-Pfizer). Quando se trata de imunização heteróloga, induzida por ChAdOx1-nCov-19 - AZD1222 (AstraZeneca) e BNT162b2 (BioNTech-Pfizer) ou três doses da BNT162b2 (BioNTech-Pfizer), uma maior eficácia é notada. Mesmo nesses cenários, a VOC Omicron ainda assim exibe maior capacidade de fuga imunológica do que Delta (HOFFMANN et al., 2022).

Embora vários estudos tenham demonstrado reduções nos títulos de neutralização dos anticorpos induzidos por vacinas contra as variantes do SARS-CoV-2, os imunizantes disponíveis atualmente têm demonstrado excelentes resultados de eficácia e eficiência. Estes resultados estão refletidos principalmente na redução do número de hospitalizações e vidas perdidas pela Covid-19 (EMBORG et al., 2021; HAAS et al., 2021; HUANG et al., 2022; RASHEDI et al., 2022).

Ainda nesse sentido sobre a eficácia dos imunizantes, mais recentemente, o município de Botucatu, localizado no interior do estado de São Paulo no Brasil, foi palco de um importante estudo direcionado à eficácia da vacina ChAdOx1-nCov-19 - AZD1222 (AstraZeneca) sobre as variantes do SARS-CoV-2. Esse estudo está sendo conduzido em parceria da Unesp (Universidade Estadual Paulista) com a Universidade de Oxford, com o Ministério da Saúde, com a Prefeitura de Botucatu, com a Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) e também com o Instituto Bill e Melinda Gates. O estudo se iniciou com a vacinação em massa no dia 16 de maio de 2021. A meta era vacinar 60 mil moradores, entretanto foram alcançadas mais de 66 mil pessoas, incluindo os estudantes da Unesp que residem na cidade (PREFEITURA DE BOTUCATU, 2021a).

Até a data inicial da aplicação da vacina, Botucatu acumulava mais de 12 mil casos confirmados e 207 óbitos (PREFEITURA DE BOTUCATU, 2022b). Números bastante expressivos, onde o número de casos positivos já representava aproximadamente 8% do total de habitantes. Nesse estudo, foram incluídos os moradores de Botucatu com idade entre 18 e 60 anos. As pessoas com mais de 60 anos de idade já tinham iniciado algum tipo de esquema vacinal e continuaram sendo imunizadas de acordo com o Plano Nacional de Imunização. As pessoas com idade inferior a 18 anos ainda não possuíam aprovação para receberem as doses de vacinas, entretanto, foram incluídas no Plano Nacional de Imunização por volta de junho de 2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Esse cenário de surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 resistentes juntamente com o estudo da efetividade de uma vacina sobre essas variantes no município de Botucatu, deixou algumas questões importantes a serem discutidas. Como por exemplo, qual ou quais as variantes do SARS-CoV-2 predominavam no contexto pré-vacinação? A predominância dessas variantes pode estar associada a diferentes grupos de pessoas de acordo com sexo, idade e presença de comorbidades? As variantes ou mutações no genoma viral se correlacionam com a gravidade da Covid-19?

O atual contexto da emergência de novas variantes do SARS-CoV-2 e o agravamento da pandemia da Covid-19 torna urgente a necessidade de esforços de vigilância genômica robustos. O sequenciamento genômico, o compartilhamento em tempo real desses dados e o estudo das alterações no genoma viral, além de orientar o entendimento do percurso evolutivo do SARS-CoV-2, podem subsidiar as tomadas de decisões sobre o manejo da Covid-19. Esses estudos podem, por exemplo, contribuir com os esforços aprimorados de cobertura vacinal, com a distribuição de anticorpos monoclonais e outras terapias, com as decisões públicas sobre as medidas restritivas, etc.

Pensando nessas questões, o objetivo central do nosso estudo se concentra na avaliação da dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2 no cenário de pré-vacinação em massa no município de Botucatu-SP.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar a dispersão temporal e epidemiológica das variantes do SARS-CoV-2 no período de pré-vacinação em massa no município de Botucatu-SP.

1.1.2 Específicos

Analisar a prevalência das variantes do SARS-CoV-2 nas quatro Semanas Epidemiológicas (SE 16, 17, 18 e 19 de 2021) que antecedem o dia de vacinação em massa em Botucatu-SP.

Investigar a prevalência das linhagens do SARS-CoV-2 em pacientes que convivem com alguma comorbidade e em pacientes pertencentes a diferentes faixas etárias e gêneros.

Correlacionar as variantes do SARS-CoV-2 com os diferentes espectros clínicos da Covid-19 – casos sintomáticos e assintomáticos, leves ou moderados, graves e óbitos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados sugerem que a Variante de Preocupação (VOC) do SARS-CoV-2 Gamma (incluindo a linhagem P.1 e a sublinhagem P.1.14) foi predominante antes da vacinação massiva que ocorreu em Botucatu-SP com o imunizante ChAdOx1-nCov-19 - AZD1222 (AstraZeneca), especificamente no período entre 18 de abril e 15 de maio de 2021 (Semanas Epidemiológicas 16, 17, 18 e 19). A VOC Alpha e a Variante de Interesse (VOI) Zeta foram registradas, porém em baixa escala.

Ao comparar as frequências das linhagens P.1 e P.1.14, no que diz respeito a distribuição epidemiológica, a linhagem P.1 foi significativamente mais frequente tanto em homens quanto em mulheres. Essa mesma variante também foi a mais frequente entre jovens e adultos (0-59 anos), enquanto entre os idosos, P.1 e P.1.14 foram estatisticamente semelhantes nas frequências. Não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências de P.1 e P.1.14 entre as pessoas que convivem com uma ou mais comorbidades.

A variante P.1 foi mais frequente do que P.1.14 nas pessoas com algum tipo de sintoma da Covid-19. Além disso, não houve diferença estatística nos valores de C_T entre as linhagens P.1 e P.1.14. Nenhuma dessas variantes foram associadas com os quadros clínicos (leve, moderado e grave) da Covid-19 ou óbitos. A variante P.1 foi significativamente mais prevalente do que a P.1.14 nos 28 participantes que tomaram o imunizante CoronaVac, enquanto nenhuma diferença foi observada entre os imunizados com a vacina da Astrazeneca (20 pessoas).

Quanto a filogenia das sequências encontradas antes da vacinação massiva em Botucatu, as sequências de P.1 ficaram mais dispersas pelo grande clado de Gamma enquanto P.1.14 ficou agrupada no clado contendo a substituição em ORF1a: S2947N. Ainda dentro deste clado, encontramos 9 sequências contendo as substituições em ORF3a: K67N e T223I e até o momento da escrita deste manuscrito, nenhuma sequência de P.1.14 com essas substituições foram encontradas na plataforma do CovSpectrum.

Nesse sentido, a alta predominância da VOC Gamma, incluindo suas linhagens P.1 juntamente com P.1.14 em um cenário pré vacinação em massa pode nos fornecer insights sobre a evolução e epidemiologia molecular do SARS-CoV-2 e de suas VOCs emergentes. Dessa forma ressaltamos a importância da vigilância genômica do SARS-CoV-2 que pode ajudar a subsidiar as tomadas de decisões dos setores públicos no manejo da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ADAMOSKI, D. et al. "SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants Surge in Curitiba, Southern Brazil, and Its Impact on Overall COVID-19 Lethality." **Viruses** v. 14, n. 4, p. 809, 2022. doi: 10.3390/v14040809.
- ALEEM A; AKBAR SAMAD, AB, SLENKER, AK. "Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)." 2021. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022, Jan. May 12, 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>.
- ANICHINI, G. et al. "Neutralizing antibody response of vaccinees to SARS-CoV-2 variants." **Vaccines** v. 9, n. 5, 517, 2021.
- BATES, T. et al. "Neutralization of SARS-CoV-2 variants by convalescent and BNT162b2 vaccinated serum." **Nature communications** v. 12, n. 1, p. 1-7, 2021. doi: 10.1038/s41467-021-25479-6.
- BERNAL, J. et al. "Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant." **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 7, p. 585-594, 2021b. doi: 10.1056/NEJMoa2108891.
- BERNAL, J. et al. "Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study." **BMJ** v. 373, n. 1088, 2021a. doi: 10.1136/bmj.n1088.
- BOEHM, E. et al. "Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic." **Clinical Microbiology and Infection** v. 27, n. 8, p. 1109-1117, 2021. doi: 10.1016/j.cmi.2021.05.022.
- CALLAWAY, E.; MALLAPATY, S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. **Nature**. v. 590, n. 7844, p. 17, 2021. doi: 10.1038/d41586-021-00268-9.
- CAMPBELL, F. et al. "Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021." **Eurosurveillance** v. 26, n. 24, :2100509, 2021. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509.

CEVIK, M. et al. "Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2." *BMJ* v. 371, m3862, 2020. doi: 10.1136/bmj.m3862.

CHAKRABORTY, C.; BHATTACHARYA, M.; SHARMA, A. "Present variants of concern and variants of interest of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: their significant mutations in S-glycoprotein, infectivity, re-infectivity, immune escape and vaccines activity." **Reviews in Medical Virology** v. 32, n. 2, e2270, p. 1-14, , 2021. <https://doi.org/10.1002/rmv.2270>.

COLLIER, D. et al. "Sensitivity of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 to mRNA vaccine-elicited antibodies." *Nature* v. 593, p. 136–141, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03412-7>.

COMBE, M.; SANJUAN, R. "Variation in RNA virus mutation rates across host cells." **PLoS pathogens** v. 10, n. 1, e1003855, 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1003855.

COUTINHO, R. et al. "Model-based estimation of transmissibility and reinfection of SARS-CoV-2 P. 1 variant." **Communications Medicine** v. 1, 48, p.1-8, 2021. [|https://doi.org/10.1038/s43856-021-00048-6](https://doi.org/10.1038/s43856-021-00048-6).

DAVIES, N. et al. "Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England." *Science* v. 372, n. 6538, eabg3055, 2021. doi: 10.1126/science.abg3055.

DEJNIRATTISAI, W. et al. "Antibody evasion by the Brazilian P. 1 strain of SARS-CoV-2." **BioRxiv**, March 15, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.12.435194>.

DEMOLINER, M. et al. "Predominance of SARS-CoV-2 P. 1 (Gamma) lineage inducing the recent COVID-19 wave in southern Brazil and the finding of an additional S: D614A mutation." **Infection, Genetics and Evolution** v. 96, 105134, 2021. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105134.

DUFFY, S. "Why are RNA virus mutation rates so damn high?." **PLoS biology**, v. 16, n. 8, e3000003, 2018. doi: 10.1371/journal.pbio.3000003.

EMBORG, H-D. et al. "Vaccine effectiveness of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine against RT-PCR confirmed SARS-CoV-2 infections, hospitalisations and mortality in prioritised risk groups." **MedRxiv**, June 2, 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.27.21257583>.

FANG, X. et al. "Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: a systematic review and meta-analysis." **AGING** (albany NY) v. 12, n. 13, 12493–12503, 2020. doi: 10.18632/aging.103579.

FREITAS, A. et al. "The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P. 1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study." **The Lancet Regional Health-Americas**, v. 1, Sept, 1, 2021. doi: 10.1016/j.lana.2021.100021.

FROME, E.; KUTNER, M.; BEAUCHAMP, J. "Regression analysis of Poisson-distributed data." **Journal of the American Statistical Association** v. 68, n. 344, p. 935-940, 1973.

GARCIA-BELTRAN; WILFREDO F., et al. "Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity." **Cell**, v. 184, n. 9, p. 2372-2383, e9, Mar., 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.013.

GAYMARD, A. et al. "Early assessment of diffusion and possible expansion of SARS-CoV-2 Lineage 20I/501Y. V1 (B. 1.1. 7, variant of concern 202012/01) in France, January to March 2021." **Eurosurveillance** v. 26, n. 9, 2100133, 2021. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.9.2100133.

GIDARI, A. et al. "Cross-neutralization of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 and P. 1 variants in vaccinated, convalescent and P. 1 infected." **Journal of Infection** v. 83, n. 4, p.467-472, 2021. doi: 10.1016/j.jinf.2021.07.019.

GIOVANETTI, M. et al. Replacement of the Gamma by the Delta variant in Brazil: impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. **Virus evolution**, v. 8, n. 1, p. veac024, 2022. doi: 10.1093/ve/veac024

GIOVANETTI, M. et al. "Genomic epidemiology reveals how restriction measures shaped the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil." **MedRxiv**, Oct. 14, 2021b. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.07.21264644>

GORBALENYA, AE. et al. The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat Microbiol** v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020. Doi: <https://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

HAAS, E. et al. "Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data." **The Lancet** v. 397, n. 10287, p. 1819-1829, May, 5, 2021. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00947-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00947-8).

HADFIELD, J. et al. NextStrain: Real-time tracking of pathogen evolution. **Bioinformatics**. v. 34, n. 23, p. 4121-4123, 2018. doi: [10.1093/bioinformatics/bty407](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407).

HAITAO, T. et al. "COVID-19 and sex differences: mechanisms and biomarkers." **Mayo Clinic Proceedings**. v. 95, n. 10, p. 2189-2203, 2020. doi: [10.1016/j.mayocp.2020.07.024](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.07.024).

HARRISON, A.; LIN, T.; WANG, P. "Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis." **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020. doi: [10.1016/j.it.2020.10.004](https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004).

HOFFMANN, M. et al. "The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic." **Cell** v. 185, n. 3, p. 447-456, e11, 2022. doi: [10.1016/j.cell.2021.12.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.032).

HUANG, Z. et al. "A review of the safety and efficacy of current COVID-19 vaccines." **Frontiers of Medicine** v. 16, n. 1, p. 39-55, 2022. 1-17. doi: [10.1007/s11684-021-0893-y](https://doi.org/10.1007/s11684-021-0893-y).

IKETANI, S. et al. "Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages." **Nature** v. 604, n. 7906, p. 553-556, 2022. doi: [10.1038/s41586-022-04594-4](https://doi.org/10.1038/s41586-022-04594-4).

INSTITUTO BUTANTAN. Boletim Epidemiológico da Rede de Alerta das Variantes do SARS-COV-2: Ilhabela-SP: Instituto Butantan, 2021. Disponível em: https://butantan.gov.br/assets/arquivos/Covid/Boletim_epidemiologico/20_06_21_Relat%C3%B3rio_Sequenciamento_Ilhabela.pdf. Acessado em: 11/03/2022 às 16:25

JAIN, V.; YUAN, J-M. "Predictive symptoms and comorbidities for severe COVID-19 and intensive care unit admission: a systematic review and meta-analysis." **International Journal of Public Health** v. 65, n. 5, p. 533-546, 2020. doi: [10.1007/s00038-020-01390-7](https://doi.org/10.1007/s00038-020-01390-7).

KING, K. et al. "SARS-CoV-2 variants of concern Alpha and Delta show increased viral load in saliva." **Plos one** v. 17, n. 5, e0267750, 2022. doi: 10.1371/journal.pone.0267750. eCollection 2022.

KUZMINA, A. et al. "SARS-CoV-2 spike variants exhibit differential infectivity and neutralization resistance to convalescent or post-vaccination sera." **Cell host & microbe** v. 29, n. 4, p. 522-528.e2, 2021. doi: 10.1016/j.chom.2021.03.008.

LAMARCA, A. et al. "Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P. 1 lineage and diversification within P. 2 clade in Brazil." **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 15, n. 10, e0009835, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009835>.

LAZAREVIC, I. et al. "Immune Evasion of SARS-CoV-2 Emerging Variants: What Have We Learnt So Far?." **Viruses** v. 13, n. 7, 1192, 2021. doi: 10.3390/v13071192.

LESBON, J. et al. "Nucleocapsid (N) gene mutations of SARS-CoV-2 can affect real-time RT-PCR diagnostic and impact false-negative results." **Viruses** v. 13, n. 12, 2474, 2021. doi: 10.3390/v13122474.

LIMA, A. et al. "SARS-COV-2 Genomic Monitoring in the State of SÃO PAULO UNVEILS TWO EMERGING AY. 43 SUBLINEAGES." **Journal of Medical Virology**, v.94, n. 7, p. 3394-3398, 2022. doi: 10.1002/jmv.27674.

LU, R. et al. "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding." **The lancet** v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).

LUSTIG, Y. et al. "Neutralising capacity against Delta (B. 1.617. 2) and other variants of concern following Comirnaty (BNT162b2, BioNTech/Pfizer) vaccination in health care workers, Israel." **Eurosurveillance** v. 26, n. 26, p. 2100557. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.26.2100557, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a covid-19. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/plano-nacional-de-operacionalizacao-da-vacinacao-contracovid-19.pdf>. Acessado em: 14/06/2022.

NAQVI, A. et al. "Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach." **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease** v. 1866, n. 10, 165878, 2020. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.

NASREEN, S. et al. "Effectiveness of COVID-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe outcomes with variants of concern in Ontario." **Nature Microbiology** v. 7, n. 3, p.379-385, 2022. doi: 10.1038/s41564-021-01053-0.

NAVECA, F. et al. 'COVID-19 in Amazonas, Brazil, was Driven by the Persistence of Endemic Lineages and P.1 Emergence', **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230-1238, 2021a. doi: 10.1038/s41591-021-01378-7.

NAVECA (b), F. et al. "Emergence and spread of SARS-CoV-2 P. 1 (Gamma) lineage variants carrying Spike mutations Δ 141-144, N679K or P681H during persistent viral circulation in Amazonas, Brazil." **Image** v. 420, n. 784, p. 75-77, 2021b.

NAVECA, F., et al. "The SARS-CoV-2 variant Delta displaced the variants Gamma and Gamma plus in Amazonas, Brazil." 2021c. <https://virological.org/t/the-sars-cov-2-variant-delta-displaced-the-variants-gamma-and-gamma-plus-in-amazonas-brazil/765>.

NAVECA, F. et al. "Spread of Gamma (P. 1) sub-lineages carrying Spike mutations close to the furin cleavage site and deletions in the N-terminal domain drives ongoing transmission of SARS-CoV-2 in Amazonas, Brazil." **Microbiology spectrum** v. 10, n. 1, e0236621, 2022d. doi: 10.1128/spectrum.02366-21.

NIID Japan. Brief report: New variant strain of sars-cov-2 identified in travelers from Brazil. coronavirus disease 4. <https://www.niid.go.jp/niid/en/2019-ncov-e/10108-covid19-33-en.html> 2021.

NOVAVAX. Novavax Announces Positive Data from Three Complementary Studies of COVID-19 Beta (B.1.351) Variant Strain Vaccine. Jun., 11, 2021. <https://ir.novavax.com/2021-06-11-Novavax-Announces-Positive-Data-from-Three-Complementary-Studies-of-COVID-19-Beta-B-1-351-Variant-Strain-Vaccine>.

OSTROV, D. "Structural consequences of variation in SARS-CoV-2 B. 1.1. 7." **Journal of cellular immunology** v. 3, n. 2, p. 103-108, 2021. doi: 10.33696/immunology.3.085.

PACHETTI, M. et al. "Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant." **Journal of Translational Medicine** v. 18, Article number: 179, 2020. doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>.

PAPANIKOLAOU, V. et al. "From Delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants." **Gene** (2022): 146134.

PLANAS, D. et al. "Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization." **Nature** 596.7871 (2021): 276-280.

PLITNICK, J. et al. "Whole-genome sequencing of SARS-CoV-2: assessment of the Ion Torrent AmpliSeq panel and comparison with the Illumina MiSeq ARTIC protocol." **Journal of clinical microbiology** 59.12 (2021): e00649-21.

POUWELS, K. et al. "Effect of Delta variant on viral burden and vaccine effectiveness against new SARS-CoV-2 infections in the UK." **Nature medicine** 27.12 (2021): 2127-2135.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BOTUCATU (a). 2021. Botucatu terá vacinação em massa no dia 16 de maio. 2021a. Disponível em: <https://www.botucatu.sp.gov.br/portal/noticias/0/3/22909/botucatu-tera-vacinacao-em-massa-no-dia-16-de-maio/#:~:text=A%20Prefeitura%20de%20Botucatu%2C%20com,a%20Covid%2D19%20em%20Botucatu>. Acesso em: 28/02/2022 às 13:44.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BOTUCATU (b). 2021. Coronavírus. Disponível em: <https://www.botucatu.sp.gov.br/portal/vigilancia-epidemiologica/3/coronavirus/>. Acessado em: 12/08/2022.

RAMAN, R.; PATEL, K.; RANJAN, K. COVID-19: unmasking emerging SARS-CoV-2 variants, vaccines and therapeutic strategies. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 993, 2021.

RASHEDI, R. et al. "COVID-19 vaccines mix-and-match: The concept, the efficacy and the doubts." **Journal of Medical Virology** 94.4 (2022): 1294-1299.

SATORRA, A.; BENTLER P. "A scaled difference chi-square test statistic for moment structure analysis." **Psychometrika** 66.4 (2001): 507-514.

SHEIKH, J. et al. Emerging genetic diversity among clinical isolates of SARS-CoV-2: Lessons for today. **Infection, genetics and evolution**, v. 84, p. 104330, 2020.

SINAN. Calendário Epidemiológico de 2021. 2021. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/calendario-epidemiologico-2020/43-institucional/171-calendario-epidemiologico-2021>. Acessado em: 16/03/2021 às 15:02

SLAVOV (a) S., et al. "Genomic monitoring unveil the early detection of the SARS-CoV-2 B. 1.351 (beta) variant (20H/501Y. V2) in Brazil." **Journal of Medical Virology** 93.12 (2021): 6782-6787.

SLAVOV (b) S. et al. "Genomic monitoring of the SARS-CoV-2 B1. 1.7 (WHO VOC Alpha) in the Sao Paulo state, Brazil." **Virus Research** 308 (2022): 198643.

SORAAS, A. et al. "Breakthrough infections with the omicron and delta variants of SARS-CoV-2 result in similar re-activation of vaccine-induced immunity." **medRxiv** (2022).

TREGONING, J. et al. "Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape." **Nature Reviews Immunology** v. 21, n. 10, p. 626-636, 2021. doi: 10.1038/s41577-021-00592-1.

TSANKOV, B. et al. "Severe COVID-19 infection and pediatric comorbidities: a systematic review and meta-analysis." **International Journal of Infectious Diseases** v. 103, p. 246-256, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.163>.

VAN DORP, L. et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 83, 104351, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104351>.

VENKATRAJA, B.; SRILAKSHMINARAYANA, G.; KUMAR, B. "The Dominance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 B. 1.617 and Its Sublineages and Associations with Mortality during the COVID-19 Pandemic in India between 2020 and 2021." **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 106, n.1, 142-149, 2022. doi: 10.4269/ajtmh.21-0812.

VIALA, V. et al. "The divergent pattern of SARS-CoV-2 variant predominance and transmission dynamics in the Brazilian island of Ilhabela." **Viruses** v. 14, n.7, p. 1481, 2022. doi: 10.3390/v14071481.

VIGNUZZI, M.; WENDT, E.; ANDINO, R. "Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity." **Nature medicine** v. 14, n. 2, p. 154-161, 2008. doi: 10.1038/nm1726.

VIGNUZZI, M. et al. "Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population." **Nature** v. 439, n. 7074, p. 344-348, 2006. doi: 10.1038/nature04388.

VIVEIROS, A. et al. "Sex differences in COVID-19: candidate pathways, genetics of ACE2, and sex hormones." **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology** v. 320, n. 1, H296-H304, 2021. doi: 10.1152/ajpheart.00755.2020.

VOLZ, E. et al. "Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England." **Nature** v. 593, n. 7858, p. 266-269, 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03470-x.

WALL, E. et al. "Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B. 1.617. 2 and B. 1.351 by BNT162b2 vaccination." **The Lancet** v. 397, n.10292, p. 2331-2333, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01290-3.

WANG, C. et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV- 2 and variation analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 667-674, 2020. doi: 10.1002/jmv.25762.

WANG, L. et al. "COVID infection rates, clinical outcomes, and racial/ethnic and gender disparities before and after Omicron emerged in the US." **MedRxiv** Feb 22;2022.02.21.22271300. 2022. doi: 10.1101/2022.02.21.22271300.

WHO. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. March, 2020a. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>. Acesso em 28/02/2020 às 12:48.

WHO. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Situation Dashboard. 2022b. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 07/04/2022 às 15:27.

WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological update - 25 February 2021c. 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update>. Acesso em: 28/02/2022 às 12:42.

WINK, P. et al. "Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 Lineages Indicates Early Circulation of P. 1 (Gamma) Variant of Concern in Southern Brazil." **Microbiology spectrum** v. 10, n.1, e01511-21, 2022. <https://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01511-21>.

WUHAN MUNICIPAL HEALTH COMMISSION. Report of clustering pneumonia of unknown etiology in Wuhan City. Wuhan Municipal Health Commission, 2019. <http://wjw.wuhan.gov.cn/front/web/showDetail/2019123108989>. Opens in new tab. Acesso em 11/04/2020 às 05:00.

ZAKI, A. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, 2012. doi: 10.1056/NEJMoa1211721.

ZHANG, Y-Z. HOLMES, Edward C. "A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2." **Cell** v. 181, n. 2, p. 223-227, 2020. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.035.

ZHONG, N. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **The Lancet**, v. 362, n. 9393, p. 1353-1358, 2003. doi: 10.1016/s0140-6736(03)14630-2.

ZHU, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-733. 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.