

Reporte N°14: Vigilancia activa de variantes de SARS-CoV-2 en la Provincia de Córdoba. Actualización al 8/2/2021.

Parte A: Caracterización genómica de muestras de la Provincia de Córdoba entre abril de 2020 y enero de 2021.

Parte B: Vigilancia activa de variantes mediante implementación de protocolo de secuenciación parcial.

RESUMEN

Parte A:

Se realizó la secuenciación del **genoma completo** de SARS-CoV-2 a partir de **93** muestras de la **provincia de Córdoba** correspondientes al periodo comprendido entre **abril de 2020** y **enero de 2021**.

Las secuencias obtenidas fueron asignadas a 6 linajes: **B.1.499 (48,4%)**, **N.3 (39,8%)**, **B.1 (3,2%)**, **B.1.1.33 (4,3%)**, **B.1.1.222 (3,2%)** y **B.1.2 (1,1%)**. Los linajes observados coinciden con los reportados previamente en Córdoba y otras regiones del país desde el inicio de la pandemia. **Hasta el momento y con la estrategia de muestreo empleada, no se ha detectado en la provincia de Córdoba a las variantes 501Y.V1 (Reino Unido), 501Y.V2 (Sudáfrica), 501Y.V3 (Manaos, Brasil) o P.2 (Río de Janeiro).**

Parte B:

Se implementó la estrategia de **secuenciación parcial** de la región del genoma que codifica para la **proteína Spike (S)** a fin de **comenzar desde el mes de febrero la vigilancia epidemiológica molecular activa de variantes de SARS-CoV-2** circulantes en la **provincia de Córdoba**.

Hasta la fecha, se secuenció una muestra correspondiente a un viajero procedente de Brasil que **no presentó las mutaciones características de ninguna de las variantes de interés**.

La emergencia de variantes virales es un proceso natural de la evolución de los virus. Sin embargo, cuando éstas se presentan con cambios genéticos en regiones implicadas en la interacción con el receptor celular o en el reconocimiento de anticuerpos específicos, es necesario evaluar el posible impacto de esos cambios genéticos sobre la propagación viral, la capacidad de causar enfermedad más severa o la respuesta a la vacunación.

Durante las últimas semanas cuatro variantes virales del SARS-CoV-2 han llamado la atención de la comunidad científica y de los gobiernos nacionales:

- La **variante VOC 202012/01** o **variante 501Y.V1 (linaje B.1.1.7)**, cuya muestra más antigua fue detectada en el Reino Unido el 20/09/2020 (Rambaut y col., 2020a). Esta variante ya ha sido reportada al día 08 de febrero de 2021 en 75 países, incluidos Argentina, Brasil, Chile, Ecuador y Perú, dentro de América del Sur. En nuestro país se reportó esta variante el 15 de enero con la descripción del caso de un argentino residente en Reino Unido con antecedentes de viaje a Austria y Alemania que arribó asintomático desde Frankfurt a finales de diciembre del 2020. (<http://pais.qb.fcen.uba.ar/files/reportes/pais-reporte12.pdf>).
- La **variante VOC 202012/02** o **variante 501Y.V2 (linaje B.1.351)**, detectada en Sudáfrica desde el 08/10/2020 (Tegally y col., 2020). Esta variante ha sido reportada en 32 países hasta el momento, sin reportes de su introducción a América del Sur.
- La **variante VOC-202101/02** o **variante 501Y.V3 (linaje P.1)**, derivado del linaje B.1.1.28), cuya muestra más temprana corresponde al día 04/12/2020, **detectada en Manaos, Brasil**, y en Japón (Faria y col., 2021) que ya ha sido detectada en 14 países, incluyendo Brasil, Colombia y Perú en el continente americano. En Argentina, el día 8 de febrero de 2021 se informó la detección de esta variante en dos muestras de viajeros provenientes de Brasil, por parte de la ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”.
- La **variante VUI-202101/01 (linaje P.2)**, derivado del linaje B.1.1.28), detectada en **Río de Janeiro, Brasil**, principalmente desde octubre de 2020 (Voloch y col., 2020). Actualmente, esta variante ha sido detectada en 17 países, incluida la República Argentina.

Las variantes 501Y.V1 (Reino Unido), la 501Y.V2 (Sudáfrica) y 501Y.V3 (Manaos, Brasil) han sido recientemente asociadas a una mayor tasa de transmisión o a un drástico aumento de su prevalencia en corto tiempo. Sólo en el caso de la variante 501Y.V1

(Reino Unido) se observó en análisis preliminares una posible asociación con mayor riesgo relativo de muerte a los 28 días (NERVTAG, 2021) . Así mismo, existe evidencia que indicaría que la variante de Sudáfrica podría estar asociada a escape inmunológico y es posible que esta característica sea compartida por las variantes 501Y.V3 (Manaos) y eventualmente la P.2 (Río de Janeiro) dado que presentan mutaciones en común.

Para determinar la posible circulación de estas variantes en nuestro país, se requiere una vigilancia activa de las variantes genéticas del SARS-CoV-2, ya sea a través de la secuenciación del genoma completo, o mediante el análisis de secuencias parciales que incluyan marcadores genéticos de interés. Por lo tanto, el presente reporte corresponde al análisis de secuencias de muestras positivas para SARS-CoV-2 correspondientes a casos de la provincia de Córdoba. El mismo fue realizado por el Consorcio Argentino de Genómica de SARS-CoV-2, a través de los Nodos de Secuenciación de Córdoba del IPAVE-INTA-CIAP, el Laboratorio Central y Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba, y el Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba (InViV).

Parte A: Secuenciación de genoma completo de SARS-CoV-2 en muestras de la provincia de Córdoba.

Se obtuvieron un total 93 secuencias de SARS-CoV-2 provenientes de muestras clínicas de pacientes con la COVID-19 de distintas localidades de la provincia de Córdoba, obtenidas entre abril de 2020 y enero de 2021. El promedio de cobertura del genoma en las 93 secuencias obtenidas fue del 99,67% y la profundidad promedio ~879X.

Las secuencias del genoma de SARS-CoV-2 obtenidas a partir de individuos infectados de distintos países han sido clasificadas en linajes (Rambaut y col. 2020b). Para la asignación de estos linajes se utilizan métodos rápidos y métodos confirmatorios. Para la asignación rápida, se utilizaron los programas Pangolin COVID-19 Lineage Assigner (O'Toole y col. 2020) y Covidex (Cacciabue y col. 2020). Para la confirmación de la asignación se realizaron análisis filogenéticos.

Las secuencias obtenidas fueron clasificadas en 6 linajes: **B.1.499 (48,4%), N.3 (39,8%), B.1 (3,2%), B.1.1.33 (4,3%), B.1.1.222 (3,2%) y B.1.2 (1,1%)** (Figura 1). Los linajes observados coinciden con los reportados previamente en Córdoba y otras regiones del país desde el inicio de la pandemia.

El linaje **B.1.499** corresponde a un grupo de circulación local en Argentina, detectado inicialmente en marzo de 2020, con un 97% de sus secuencias provenientes de muestras de nuestro país.

Así mismo, se observaron algunas secuencias de **B.1.1.33**, linaje vinculado originalmente a Brasil. De este linaje deriva, al establecerse en el país, el linaje **N.3** (alias B.1.1.33.3), descrito originalmente en abril de 2020.

En Córdoba, no se detectaron secuencias de las variantes de interés 501Y.V1 (Reino Unido), 501Y.V2 (Sudáfrica), 501Y.V3 (Manaos, Brasil) o P.2 (Río de Janeiro).

Dado el contexto de emergencia de nuevas variantes con gran cantidad de cambios en la región codificante de la proteína S, se evaluó la presencia de las mutaciones en las secuencias obtenidas y no se encontraron los marcadores de interés asociados. Con respecto a mutaciones en la región RBD de especial importancia como blanco de terapias y vacunas, únicamente se observaron los SNPS **I402V** y **Q414R**, asociados a las secuencias asignadas al linaje B.1.1.33, del cual son marcadores.

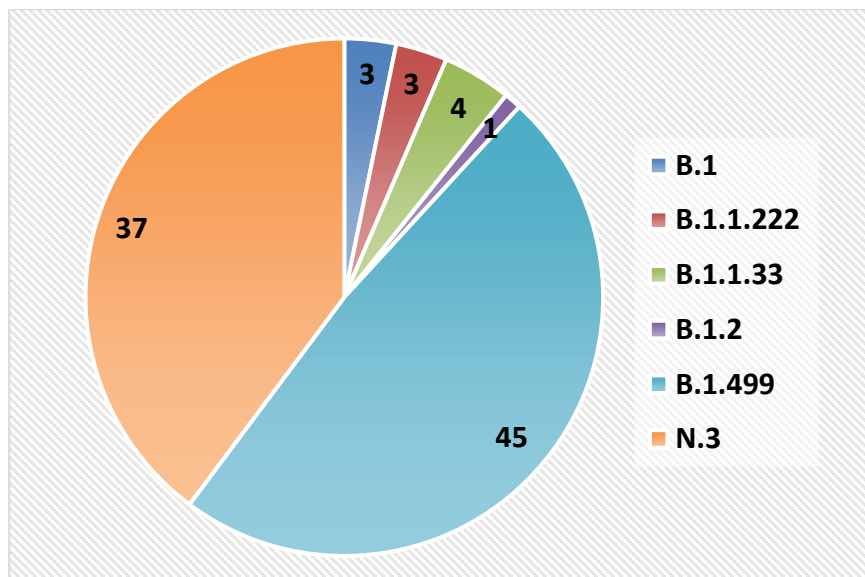


Figura 1. Asignación de los genomas de SARS-CoV-2 secuenciados en Córdoba de acuerdo con el sistema de clasificación de linajes de Rambaut y col. (2020). Los números corresponden al número absoluto de genomas asociados a los diversos linajes.

Parte B: Vigilancia activa mediante la estrategia de secuenciación parcial de SARS-CoV-2 en Córdoba.

Con el objetivo de continuar con la vigilancia activa de las variantes se implementó la estrategia de **secuenciación parcial** de la región del genoma que codifica para la **proteína Spike (S)** a fin de comenzar, desde el mes de febrero, la vigilancia epidemiológica molecular activa de variantes de SARS-CoV-2 circulantes en la provincia de Córdoba.

Hasta la fecha, se obtuvo la secuencia parcial de una muestra correspondiente al día 25/1/2021 de un individuo procedente de Brasil, la cual **no presentó ninguna de las mutaciones marcadoras de las variantes de interés.**

A partir de la fecha, se seleccionarán semanalmente muestras colectadas de pacientes con residencia en distintas localidades de la provincia y de viajeros provenientes del exterior. En el caso de detectar marcadores correspondientes a alguna de las variantes, se realizará la secuenciación del genoma completo para el análisis confirmatorio.

CONCLUSIÓN:

Mediante la implementación de una estrategia de vigilancia activa de las variantes de SARS-CoV-2 no se ha detectado hasta el momento en la provincia de Córdoba ninguna de las variantes de interés. La ausencia de su detección no implica que las mismas no estén presentes en el territorio, sin embargo, nuestros resultados sugieren que de haberse producido su ingreso y de existir su circulación, ésta sería en baja frecuencia y no dominante.

El Consorcio Argentino Interinstitucional de Genómica de SARS-CoV-2 continuará realizando la vigilancia molecular en tiempo real sobre los casos de circulación comunitaria con la estrategia planteada, a la par que seguirá caracterizando los genomas completos de SARS-CoV-2 que han circulado desde el inicio de la epidemia en diferentes regiones del país. Los resultados obtenidos permitirán determinar si estas variantes ingresaron antes de las medidas restrictivas de ingreso al país de individuos del extranjero, tomadas en las últimas semanas del 2020. Asimismo, la vigilancia molecular en tiempo real permitirá determinar la posible emergencia de nuevas variantes virales locales.

Materiales y Métodos

Muestras seleccionadas para este análisis:

En el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, durante el periodo comprendido entre 9/4/2020 y el 6/1/2021 se procesaron aproximadamente 526.000 muestras de hisopados orofaríngeos y/o saliva provenientes de personas con sospecha de la COVID-19 atendidas en toda la provincia. Del total de las muestras, 52.525 resultaron positivas para SARS-CoV-2 a través de qRT-PCR para los genes N y ORF1ab (kit DisCOVERY). Se seleccionaron un total de 1 muestra positiva para la secuenciación parcial del gen que codifica para la proteína S de SARS CoV-2, 93 muestras clínicas con cargas virales traducidas en valores de Ct menores o iguales a 28 para la secuenciación genómica con la tecnología de Minion Nanopore. Las muestras para secuenciar genomas completos de SARS-CoV-2 fueron colectadas a pacientes con residencia en las localidades de Córdoba Capital (**36**), Río Cuarto (**13**), Villa María (**6**), San Francisco (**5**), Río Tercero (**4**), Oncativo (**4**), Villa Dolores (**4**), Unquillo (**2**), Marcos Juárez (**2**), Monte Cristo (**1**), Oliva (**1**), General Deheza (**1**), Saldán (**1**), Santa Rosa de Calamuchita (**1**), La Falda (**1**), Alta Gracia (**1**), Las Varillas (**1**), Río Segundo (**1**), Monte Buey (**1**), Bell Ville (**1**), Río Ceballos (**1**), Arroyito (**1**), Jesús María (**1**), Monte Maíz (**1**), Corral de Bustos (**1**) y Colonia Caroya (**1**).

Estrategia de secuenciación empleada:

Para el caso de la secuenciación de genomas completos, en el Nodo del IPAVE-CIAP-INTA de Córdoba, se utilizó el protocolo de amplificación y secuenciación de ARTIC para MinION modificado (<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bbmuik6w>).

Para el caso de las secuencias parciales, debido a que las variantes buscadas presentan cambios no sinónimos marcadores en la proteína S (Spike), se decidió realizar la secuenciación parcial del gen que codifica para dicha proteína a través del método tradicional de Sanger, utilizando el protocolo de secuenciación recomendado por el CDC (https://github.com/CDCgov/SARS-CoV-2_Sequencing/blob/master/protocols/CDC-Comprehensive/CDC_SARS-CoV-2_Sequencing_200325-2.pdf) específicamente el amplión 29.

Las mutaciones en la proteína S características de las variantes se encuentran representadas en la Figura 2. Todas las variantes presentan cambios nucleotídicos en otras regiones del genoma, no alcanzados con esta estrategia.

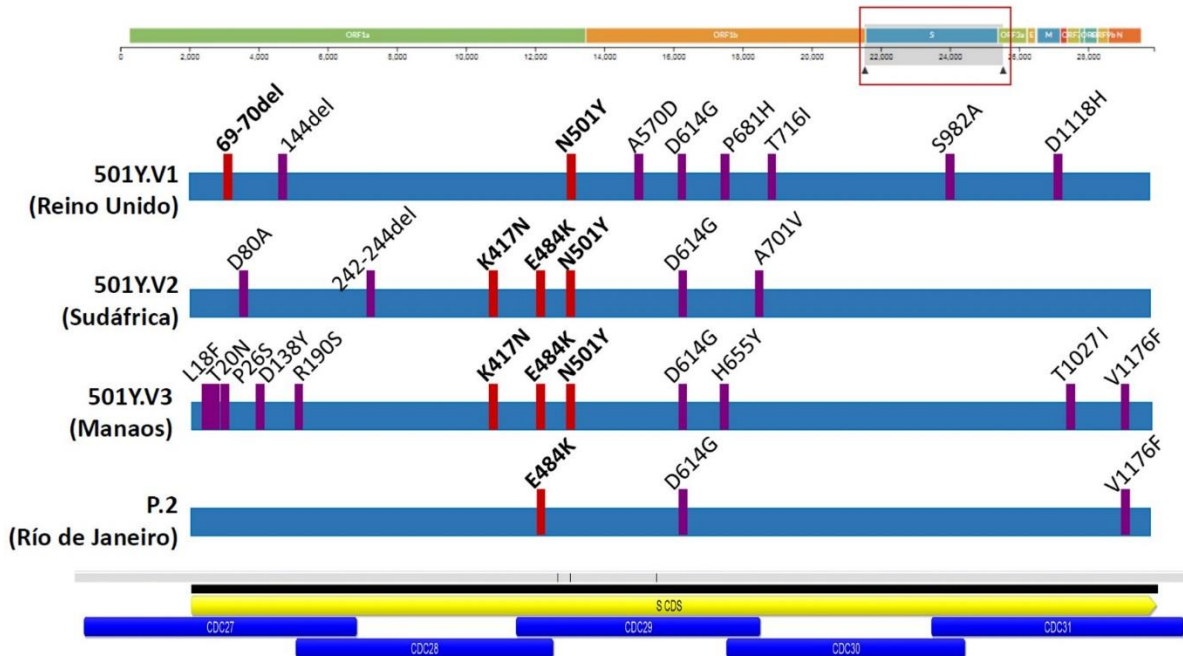


Figura 2. Secuencia del gen de la proteína Spike (S) (amarillo). Se muestran las mutaciones de las 4 variantes de preocupación (VOC). En azul, se observan los fragmentos solapados que se amplifican utilizando los primers propuestos por el CDC.

En la Figura 2 se muestra la secuencia del gen de la proteína Spike (amarillo), la estrategia de secuenciación a través de los cebadores propuestos por el CDC que abarcan la secuencia completa del gen de S en fragmentos solapados (azul) y las mutaciones marcadoras de la variante **VOC 202012/01 (Reino Unido)**, **variante 501Y.V2 (Sudáfrica)**, **variante 501Y.V3 (Manaos)** y **la P.2 (Río de Janeiro)**. Para cubrir los cambios característicos se seleccionó el fragmento CDC29, se amplificó en todas las muestras seleccionadas. La secuenciación de los amplicones se realizó en ambas direcciones utilizando el método de secuenciación con dideoxinucleótidos marcados en un secuenciador capilar ABI3500 XL (*Applied Biosystems*). Las secuencias fueron analizadas a través del programa SeqScape (*Applied Biosystems*) y comparadas con la cepa hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124-S). Los aminoácidos marcadores de Spike mencionados que no están siendo estudiados con esta estrategia son: 69-70del, 144del, S982A y D1118H de **VOC 202012/01** y K417N de **501Y.V2**.

Participantes en este reporte:

- **Nodo de secuenciación de Córdoba del IPAVE-INTA-CIAP:** Franco Fernández, Nathalie Marquez y Humberto Debat.
- **Nodo de secuenciación de EEA Rafaela-INTA-CONICET (Provincia de Santa Fe):** Matías Irazoqui, Ariel Amadio.
- **Nodos de toma y procesamiento de muestras clínicas, epidemiología y secuenciación parcial Sanger:**
 - 1-Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba:** Gabriela Barbás, Gonzalo Castro, Paola Sicilia y Laura López.
 - 2-Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba:** Viviana Ré y María Belén Pisano.
- **Nodo evolución:** Carolina Torres, Débora Marccone, Laura Mojsiejczuk, María Dolores Blanco Fernandez, Humberto Debat, Mariana Viegas.

Fondos: Proyecto IP COVID-19 N°08 y Focem COF 03/11 Covid-19.

Referencias:

Cacciabue y col. 2020. Covidex: an ultrafast and accurate tool for virus subtyping. <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.261347>.

NERVTAG note on B.1.1.7 severity. Publicado: 21 de enero de 2021. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/955239/NERVTAG_paper_on_variant_of_concern_VOC_B.1.1.7.pdf

O'Toole y col. 2020. Pangolin: lineage assignment in an emerging pandemic as an epidemiological tool. github.com/cov-lineages/pangolin

Rambaut y col. (2020a). Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Publicado: 18 de diciembre de 2020. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-theuk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>

Rambaut A y col. (2020b). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. Nature Microbiology DOI:[10.1038/s41564-020-0770-5](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5).

Tegally y col. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. medRxiv



**PROYECTO ARGENTINO INTERINSTITUCIONAL DE GENÓMICA
DE SARS-CoV-2**

2020:2020.12.21.20248640. DOI: [10.1101/2020.12.21.20248640](https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640)

Voloch y col. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil.
medRxiv 2020.12.23.20248598. DOI: [10.1101/2020.12.23.20248598](https://doi.org/10.1101/2020.12.23.20248598)