

Reporte N°11: Vigilancia activa de variantes de SARS-CoV-2 en el AMBA. Actualización al 12/01/2021.

Parte A: Caracterización genómica de muestras del AMBA informadas en los reportes N°9 y N°10.

Parte B: Vigilancia activa realizada sobre 67 nuevas muestras provenientes de la Ciudad de Buenos Aires entre el 28/12/2020 y el 04/01/2021, y Gran Buenos Aires entre el 26/10/20 y el 10/11/20 y entre el 14/12/2020 y el 05/01/2021.

RESUMEN

Parte A:

Se realizó la secuenciación de **genoma completo** de SARS-CoV-2 a partir de **3** muestras de la CABA y **1** muestra del GBA, correspondientes al mes de diciembre de 2020 en las cuales se había detectado **la mutación S_E484K** compatible con la **variante de Río de Janeiro**. Luego del análisis filogenético, se confirmó que **las 4 secuencias corresponden a la variante Río de Janeiro**, grupo derivado del linaje B.1.1.28. Asimismo, se destaca que las 5 secuencias de CABA y PBA de esta variante halladas hasta el momento en nuestro país no forman un grupo monofilético (ver figura). *Estos resultados indican que se produjeron múltiples introducciones al país de la variante Río de Janeiro, ocurridas al menos desde el mes de noviembre de 2020, y actualmente presentaría circulación local en baja frecuencia.*

Parte B:

Se realizó la **secuenciación parcial** de la región del genoma que codifica para la **proteína S** de **67** muestras de la CABA y del GBA. En ninguna de ellas se detectaron las mutaciones marcadoras de la variante **VOC 202012/01 (UK)**, ni de la variante **501Y.V2 (Sudáfrica)**. **Se detectó la mutación S_E484K, característica de la variante de Río de Janeiro, en una muestra proveniente de la CABA.**

Hasta el momento, sobre un total de 211 muestras analizadas a través de la vigilancia activa de variantes, no se ha detectado la presencia de las variantes VOC 202012/01 (UK) ni 501Y.V2 (Sudáfrica) en nuestro país.

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

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 tres variantes virales del SARS-CoV-2 han llamado la atención de la comunidad científica y de los gobiernos nacionales:

- La **variante VOC 202012/01** (linaje B.1.1.7) o variante **501Y.V1**, que fuera detectada por primera vez en el **Reino Unido** el 20/09/2020 (previamente nombrada “VUI 202012/01”, o informalmente denominada “nueva cepa”, “variante de Londres”, “variante UK”) (*Rambaut y col., 2020*). Esta variante ya ha sido reportada, al día 11 de enero de 2021, en 49 países incluidos Brasil y Chile, dentro de América del Sur.
- La **variante 501Y.V2** (linaje B.1.351), detectada en **Sudáfrica** desde el 08/10/2020, también conocida como “variante de Sudáfrica”, “variante SA” o “20C/501Y.V2 (South Africa variant)” (*Tegally y col., 2020*). A la fecha, esta variante ha sido reportada en 15 países hasta el momento, ninguno del continente americano.
- La **variante de Río de Janeiro** (derivada del linaje B.1.1.28), detectada en Río de Janeiro, Brasil, desde octubre de 2020 (*Voloch y col., 2020*). Actualmente, ya ha sido reportada esta variante en 9 países, incluida la República Argentina.

De estas tres variantes, hasta el momento, solo la VOC 202012/01 (Reino Unido) se asoció a una mayor tasa de transmisión. Las demás variantes continúan en investigación.

Es importante destacar que, si bien algunas variantes comparten cambios genéticos (como ser la mutación S_N501Y observada en las variantes VOC 202012/01 y la 501Y.V2, o la mutación S_E484K observada en las variantes 501Y.V2 y la de Río de Janeiro), **estas variantes virales tienen orígenes distintos, es decir, esos cambios comunes ocurrieron en eventos evolutivos independientes.**

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. El Consorcio Argentino de Genómica de SARS-CoV-2, a través de los Nodos de Secuenciación del IDICaL del INTA-CONICET de Rafaela (Provincia de Santa Fe) y del Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (CABA) en los reportes N° 9 y 10, presentó **la detección de la mutación S_E484K en cinco secuencias parciales del genoma de SARS-CoV-2 de muestras de CABA (n=4) y Gran Buenos Aires, Municipio de Almirante Brown (n=1), obtenidas entre el 14/12/2020 y el 26/12/2020** a partir de individuos sin vínculo epidemiológico entre sí, correspondientes a casos de circulación comunitaria.

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

La **mutación S_E484K** está presente en las variantes de Río de Janeiro (Brasil) y 501Y.V2 (Sudáfrica). El residuo 484 de la proteína S se encuentra localizado en el motivo de unión al receptor (RBM, por receptor binding motif) e interacciona directamente con el receptor humano hACE2 (Lan y col., 2020). Esta mutación se asoció con resistencia a la neutralización por anticuerpos monoclonales neutralizantes y sueros policlonales de convalecientes (*Weisblum y col., 2020; Liu y col., 2020, Greaney y col, Baum y col., 2020*).

Parte A: Secuenciación de genoma completo de SARS-CoV-2 en muestras con la mutación S_E484K previamente detectados en CABA y GBA

Mediante la **secuenciación del genoma completo del SARS-CoV-2** se confirmó que las cuatro muestras se asociaron con la variante de **Río de Janeiro**, compartiendo las 6 mutaciones típicas de esta variante reportadas por Voloch et al: **5'UTR_C100U, ORF8_C28253U, S_G23012A (S_E484K), N_G28628U (N_A119S), N_G28975U (N_M234I), y 3'UTR_C29754U**. En el gen que codifica para la proteína S, además de la mutación característica de la variante de Río de Janeiro (S_E484K), todas las secuencias presentaron la mutación S_V1176F (característica del linaje B.1.1.28). En una de las cuatro secuencias se encontró también la mutación S_T747A.

El **análisis filogenético** (Figura) **también** confirmó la pertenencia de las cuatro secuencias al linaje B.1.1.28, particularmente al *cluster* conformado por la variante de **Río de Janeiro**. Se destaca que las secuencias de esta variante halladas hasta el momento en CABA y GBA no forman un grupo monofilético. Esta situación es compatible con múltiples introducciones al país de la variante y una circulación previa al período informado dado su hallazgo en infecciones de transmisión comunitaria. Se estudiará en los próximos muestreos la formación de *clusters* de transmisión locales por esta variante.

Estos resultados indican que la variante Río de Janeiro presentó múltiples introducciones al país, ocurridas al menos desde el mes de noviembre de 2020, y actualmente presentaría circulación local en baja frecuencia.

En la siguiente página se muestra el árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud del linaje B.1.1.28 y su derivada “variante de Río de Janeiro” obtenido a partir del análisis de todas las secuencias de genomas completos de la variante disponibles en la base de datos GISAID al 11 de enero de 2021. Las secuencias están coloreadas según país de origen.

Linaje B.1.1.28 y variante Río de Janeiro

- PAIS
- Argentina
- Brasil
- Australia
- Canadá
- Estados Unidos
- Inglaterra
- Japón
- Noruega
- Singapur



variante Río de Janeiro

Linaje B.1.1.28

Parte B: Vigilancia activa en 67 nuevas secuencias parciales de SARS-CoV-2 de AMBA

Con el objetivo de continuar con la vigilancia activa de las variantes mencionadas a través de la secuenciación parcial del gen de la proteína Spike (S) del SARS-CoV-2, se analizaron un total de 67 secuencias parciales procedentes de muestras de la CABA (entre el 28/12/2020 y el 04/01/2021) y Gran Buenos Aires (GBA) (entre el 26/10/20 y el 10/11/20 y entre el 14/12/2020 y 05/01/2021). Todas las muestras correspondieron a casos de circulación comunitaria y en materiales y métodos se encuentra una descripción detallada de las mismas.

Resultados:

En ninguna de las 67 secuencias parciales de SARS-CoV-2 se observó la mutación S_N501Y característica de las variantes VOC202012/01 de UK o 501Y.V2 de Sudáfrica. Tampoco se encontraron los otros cambios propios de la variante VOC202012/01 en el gen S. Sin embargo, sí se observó la presencia de la mutación **S_E484K** en **una de 67 secuencias (muestra proveniente de CABA)**. La misma es una de las tres mutaciones marcadoras de la variante de Sudáfrica, y también se encuentra como única mutación del gen S en la variante de Río de Janeiro.

Conclusión:

La **vigilancia activa de las variantes de SARS-CoV-2 realizada entre el 14/12/20 y el 05/01/21, a través de la estrategia propuesta en nuestro Consorcio, permitió demostrar que sobre un total de 211 muestras secuenciadas de la CABA, GBA y ciudad de Santa Fe (39 del reporte N°9, 105 del reporte N°10 y 67 del reporte actual), no se ha detectado aún el conjunto de los cambios marcadores exclusivos de la proteína S de la variante VOC202012/01 (UK), ni de la variante 501Y.V2 (Sudáfrica). En seis muestras de la CABA o del GBA se detectó el cambio S_E484K compatible con la variante de Río de Janeiro. La pertenencia al grupo de esta variante ya fue confirmada a través de la secuenciación del genoma completo de 4 de las muestras mencionadas. En todos los casos correspondieron a circulación comunitaria en AMBA, posiblemente a partir de distintas introducciones al país.**

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 de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG), durante el periodo comprendido entre 28/12/2020 y el 04/01/2021 se procesaron 2.187 muestras de hisopados nasofaríngeos (HNF) provenientes de personas con sospecha de la COVID-19 atendidas en distintas Unidades Febriles de Urgencia (UFU) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Del total de las muestras, 370 resultaron positivas para SARS-CoV-2 a través de qRT-PCR para los genes N1 y N2 (CDC). Se seleccionaron un total de 53 muestras positivas en base a sus cargas virales traducidas en valores de Ct menores a 30 para la secuenciación parcial del gen que codifica para la proteína S de SARS CoV-2. De las mismas, 26 correspondieron a pacientes residentes de la CABA (barrios de Balvanera, Belgrano, Constitución, Liniers, Nuñez, Palermo, Parque Patricios, Recoleta, Retiro, San Cristóbal, San Telmo, Villa Devoto, Villa Gral Mitre y Villa Pueyrredón) y 27 muestras correspondieron a pacientes residentes en el Gran Buenos Aires (partidos de Avellaneda, Esteban Echeverría, Hurlingham, La Matanza, Lomas de Zamora, Malvinas Argentinas, Merlo, Quilmes, San Miguel, Tigre, Tres de Febrero y Vicente López).

En el caso del GBA, se tomó un caso particular a partir de la observación realizada por Unidad Covid-19 de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) responsable de la vigilancia en la zona de Quilmes, respecto a las variaciones en el porcentaje de positividad. Brevemente, en septiembre 2020 tuvieron frecuencias de detección de aproximadamente el 80 % que descendió a niveles del 40% para fines de noviembre y principios de diciembre. Pero a partir de la segunda semana de diciembre se notó un incremento abrupto de los porcentajes alcanzándose un 70,2% en la última semana de ese mes. Con el objetivo de poder analizar esta situación epidemiológica se seleccionaron al azar seis muestras correspondientes al periodo comprendido entre el 26/10/20 y el 10/11/20 como representantes del primer período y ocho muestras del período comprendido entre el 14/12/2020 y el 05/01/21 como representantes del aumento de casos. Correspondientes al primer periodo (26/10/20 al 10/11/20) se procesaron en la UNQ un total de 1195 muestras con un índice de positividad del 58,8% y durante el segundo período (14/12/20 al 05/01/21) se procesaron 1382 con 67,9% de positividad. La diferencia de positividad fue más notable si se considera que en la primera semana de diciembre la positividad era del 36,6% y en la primera semana de enero de 2021 este índice se incrementó hasta el 75,5%. La zona sobre la que se realiza la vigilancia por parte de la UNQ corresponde a una amplia región del primer cordón del

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

conurbano desde Don Bosco hasta Berazategui incluyendo todo Quilmes centro y Ezpeleta y desde Quilmes Oeste (camino Gral. Belgrano) hasta el Río de La Plata.

Estrategia de secuenciación empleada:

Para el caso de la secuenciación de genomas completos en el Nodo del IDICaL del INTA-CONICET de Rafaela, 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 del nodo de secuenciación del HNRG, 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).

Los cambios en la proteína S marcadores de la variante de UK (**VOC 202012/01**) son: S_69-70del, S_144del, S_N501Y, S_A570D, S_D614G, S_P681H, S_T716I, S_S982A, S_D1118H.

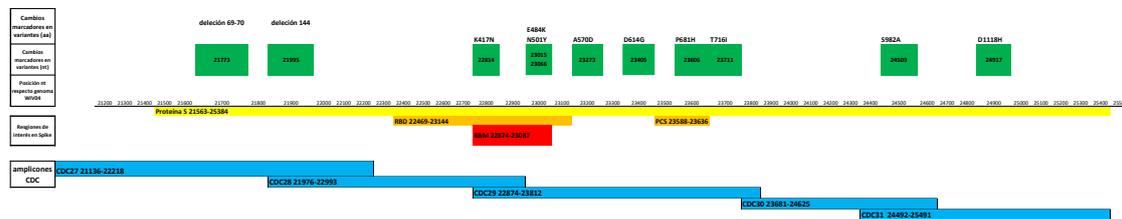
Las mutaciones en la proteína S marcadoras de la variante de Sudáfrica (**variante 501Y.V2**) son: S_K417N, S_E484K y S_N501Y.

La mutación en la proteína S característica de la **variante de Río de Janeiro** es S_E484K.

Todas las variantes presentan cambios nucleotídicos en otras regiones del genoma, no alcanzados con esta estrategia.

En la figura 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 (UK)**, **variante 501Y.V2 (SA)** y **la de Río de Janeiro** (verde). Para cubrir los cambios marcadores 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 (*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**.

PROYECTO ARGENTINO INTERINSTITUCIONAL DE GENÓMICA DE SARS-COV-2



Participantes en este reporte:

Nodo de secuenciación del IDICaL (Instituto de Investigaciones en la Cadena Láctea) del INTA-CONICET de Rafaela (Provincia de Santa Fe): María Florencia Eberhardt; Cecilia Camussone; Matías Irazoqui; Ariel Amadó.

Nodo secuenciación HNRG: Mercedes Nabaes; Laura Valinotto; Stephanie Goya; Mónica Natale; Silvina Lusso, Sofía Alexay; Mariana Viegas.

Nodo evolución: Carolina Torres, Paula Aulicino, Guido König, Humberto Debat, Mariana Viegas.

Nodos de toma y procesamiento de muestras clínicas: **Laboratorio del Hospital Interzonal General de Agudos “Evita” (Lanús, Provincia de Buenos Aires):** Isabel Desimone, Erica Luczak, Omar Grossi, Lorena Serrano, Alejandra Musto. **Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (CABA):** Alicia Mistchenko, Erica Grandis, María Cristina Alvarez López, María Elina Acevedo, Oscar Jacquez, Sofía Alexay, Mariángeles Barrera Fink, María Emilia Villegas, Raquel Barquez, Estela Chascón, Jorgelina Caruso, Karina Zacarías, Cristian Díaz, Oscar Luna, Cristian Turchiaro, Julián Cipelli, Guillermo Thomas, Carla Medina, Natalia Labarta. **Plataforma de Servicios Biotecnológicos; UTTIPP/PSB (Bernal, provincia de Buenos Aires):** Alejandro Castello; Hernán Farina; Sandra Goñi; Georgina Cardama; Norailys Lorenzo; Humberto Lamdan; Marcelo Mandile; Alejandra Zinni; Gustavo Bada; Carla Capobianco.

Fondos: Proyecto IP COVID-19 N°08 y COFECYT Federal SF-12 (ANPCyT).

Referencias:

Baum y col. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020;369(6506):1014-1018. DOI: [10.1126/science.abd0831](https://doi.org/10.1126/science.abd0831)

Greaney y col. Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *bioRxiv* DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.31.425021>

Lan y col. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220. DOI: [10.1038/s41586-020-2180-5](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5)

Liu y col. Landscape analysis of escape variants identifies SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *bioRxiv*. 2020:2020.2011.2006.372037. DOI: [10.1101/2020.11.06.372037](https://doi.org/10.1101/2020.11.06.372037)

Rambaut y col. 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>

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* 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)

Weisblum y col. Escape from neutralizing antibodies by SARSCoV-2 spike protein variants. *Elife*. 2020;9:e61312. DOI: [10.7554/eLife.61312](https://doi.org/10.7554/eLife.61312)