

Reporte nº2 – Patagonia – 13 de julio de 2020

Consortio interinstitucional para la Secuenciación del genoma y estudios genómicos de SARS-CoV-2 (Proyecto PAIS)

Este reporte muestra el trabajo realizado en el nodo de secuenciación más austral de nuestro Consorcio, conformado por el Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET), el Hospital Regional de Ushuaia y la Universidad Nacional de Tierra del Fuego (UNTDF) ubicados en la ciudad de Ushuaia, provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. El equipo de trabajo de este nodo está conformado por los Dres. Santiago Ceballos, Ivan Gramundi, Cristina Nardi y Fernando Gallego, con la colaboración del Dr. Daniel Fernández en el análisis de datos.

Los laboratorios y centros de salud que aportaron muestras y los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes, así como aportaron a la discusión de los resultados aquí presentados son:

1. Laboratorio de Salud Pública de Tierra del Fuego y Laboratorio de Hospital Regional (Ushuaia, provincia de Tierra del Fuego): Ivan Gramundi, Manuel M Boutureira, Gabriel A. Castro, Carina De Roccis.
2. Laboratorio Central de Neuquén, Ministerio de Salud (Neuquén, provincia de Neuquén): Luis Pianciola, Melina Mazzeo, Beatriz Carolina Pinto, María Cecilia Ziehm.
3. Laboratorio MICROBIOM (General Roca, provincia de Río Negro): Silvana Cecchi.

En esta etapa del trabajo se buscó cumplir con el primer objetivo propuesto en el proyecto PAIS, que es identificar los linajes virales presentes en nuestro país que han ingresado a través de los pacientes con antecedente de viaje a zonas afectadas e identificar el establecimiento de clusters de transmisión locales. Para ello el periodo de análisis en esta etapa corresponde a los primeros meses del brote en Argentina, **marzo y abril**, más tres casos de mayo de relevancia epidemiológica de Tierra del Fuego.

En cuanto a la situación epidemiológica de la Nación sobre los Decretos Nacionales relativos al ASPO:

- 12 de marzo de 2020. Argentina (DNU 260_2020) declara la Emergencia Sanitaria
- 16 de marzo de 2020. DNU 274_2020 Prohibición ingreso extranjeros
- 20 de marzo de 2020. DNU 297_2020 Aislamiento Social Obligatorio
- 31 de marzo de 2020. DNU 325_2020 Prorroga DNU 297 hasta 12 abril
- 1 de abril de 2020. DNU 331_2020 Prorroga DNU 274 Ingreso extranjeros
- 11 de abril de 2020. DNU 355_2020 Prorroga ASPO hasta 26 abril.
- 11 de abril de 2020. DNU 365_2020 Prorroga DNU 331
- 13 de abril de 2020. DNU 367_2020 Enfermedad de carácter profesional no listada

En el caso de la provincia de Tierra del Fuego

- El ASPO estricto se extendió hasta el 23 de mayo de 2020.

En el caso de la provincia de Neuquén los Decretos Provinciales relativos al ASPO:

- 26 de marzo de 2020. LEY 3230 -Emergencia Sanitaria
- 18 de marzo de 2020. Decreto 366-20 Declaración de Emergencia y crea Comité
- 18 de marzo de 2020. Decreto 368-20 Fija Multa por Aislamiento Obligatorio
- 18 de marzo de 2020. Decreto 371/20 Suspende Plazos Administrativos y teletrabajo

- 22 de marzo de 2020. Decreto 390/20 Horarios de Atención al Público
- 27 de marzo de 2020. Decreto 412/20 Horarios Comercio y Día Domingo
- 1 de abril de 2020. Decreto 426/20 Prorroga el Dec 371 hasta el 12 de abril
- 3 de abril de 2020. Decreto 429/20 Prórroga Dec 412 hasta 5 de abril
- 7 de abril de 2020. Decreto 463/20 Protector Facial y Uso de Barbijos en Servicios Esenciales
- 10 de abril de 2020. Decreto 478/20 Uso Obligatorio de Protector Facial Hogareño
- 11 de abril de 2020. Decreto 479/20 Prórroga Aislamiento hasta 26 de abril
- 20 de abril de 2020. Decreto 496/20 Establece restricciones de circulación en puentes carreteros interprovinciales entre la ciudad de Neuquén y Cipolletti
- 22 de abril de 2020. Decreto 500/20 Excepción suspensión de plazos a todos los trámites y procedimientos administrativos relativos a la emergencia declarada por la Ley Provincial 3230 y
- Decreto Provincial No 366/20, Leyes Nacionales 20.680 de Abastecimiento y 24.240 de Defensa del Consumidor y Ley Provincial 2268 y modificatorias de adhesión a la Ley 24.240
- 26 de abril de 2020. Decreto 510/20 Prórroga ASPO hasta el 10 de mayo (Decretos provinciales N° 371/20, N° 390/20, N° 412/20, N° 426/20, N° 479/20 y N° 500/20)

Situación epidemiológica de las regiones patagónicas analizadas:

En la provincia de **Tierra del Fuego, A e IAS**, se notificaron hasta el 1° de junio de 2020, un total de 136 casos confirmados por RT-PCR en tiempo real de SARS-CoV-2 productor de la Covid-19. La ciudad de Ushuaia presentó un total de 126 casos, en tanto que en la ciudad de Río Grande hubo 10 casos hasta ese momento. A partir de la información epidemiológica, se planteó la hipótesis de que las introducciones en ambas ciudades habrían sido independientes entre sí, y no estarían relacionadas.

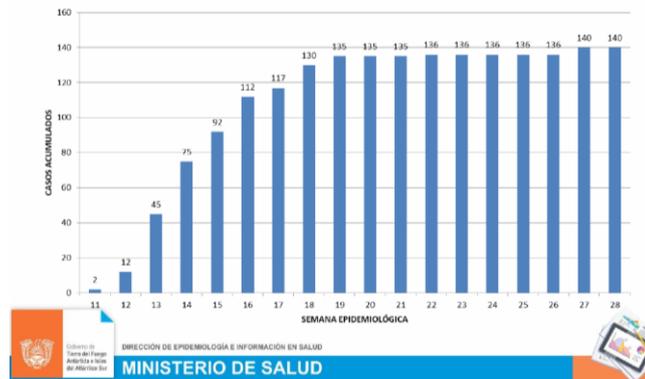
El primer caso confirmado por PCR en la provincia se dio en la ciudad de Ushuaia, en una persona que había regresado de viaje desde Francia el 04/03/2020. La muestra correspondiente a esta persona fue tomada el día 10/03/2020. Posteriormente a este caso, el día 16/03/2020 comienza la aparición de nuevos casos, que podrían tener relación con la persona que estuvo en Francia. A partir de ese momento comenzó un aumento en la cantidad de casos detectados en simultáneo en distintos conglomerados, que posteriormente fueron definidos epidemiológicamente (*cluster* epidemiológicos), donde no se pudo establecer con claridad la cadena de contagio, ni el origen de los casos en los distintos conglomerados. Debido a esta situación, se estableció en una primera instancia que hubo transmisión comunitaria.

Luego de haber hecho una investigación epidemiológica más exhaustiva se encontró que la transmisión de la gran mayoría de los casos fue en *cluster* epidemiológicos por contacto estrecho con casos confirmados y no por transmisión comunitaria como se pensó en una primera instancia. En ese sentido, se lograron identificar 12 *cluster* epidemiológicos y un grupo de 14 personas para las cuales no fue posible establecer un nexo epidemiológico claro.

En la ciudad de Río Grande hubo 10 casos confirmados que aparecieron en un período relativamente corto de tiempo entre el 29/03/2020 y el 06/04/2020.

En las siguientes imágenes se muestra la situación epidemiológica por localidad y por número de casos confirmados acumulados de la provincia de Tierra del Fuego hasta la semana epidemiológica 28.

CASOS CONFIRMADOS COVID-19 EN TDF ACUMULADOS POR SEMANA EPIDEMIOLÓGICA N=140



Fuente: Reporte Sala de Situación de Salud COVID-19 SE 28. Dirección de Epidemiología en Información en Salud. Ministerio de Salud. Provincia de Tierra del Fuego, A e IAS.

Para el caso de la provincia de **Neuquén** en el período entre el 10 de marzo y 28 de abril el total de casos confirmados de la Covid-19 con domicilio declarado en la provincia del Neuquén fue de 110. Los siguientes gráficos resumen la información.

Casos notificados con residencia declarada en la provincia del Neuquén según clasificación epidemiológica.

COVID- 19 Resumen de situación en la provincia del Neuquén hasta el 30/04/2020 a las 20 hs.

Casos reportados con residencia declarada en la provincia de Neuquén según clasificación epidemiológica.

En estudio	Confirmados	Descartados	Total de casos reportados
8	110	653	771

Casos confirmados con residencia declarada en la provincia del Neuquén. (n=110)

Distribución de casos confirmados y tasa x 10000 hab. por localidad.



Fuente: Reporte epidemiológico N°59. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. Provincia del Neuquén.

La provincia de **Río Negro** registraba al 30 de abril 228 casos positivos de la Covid-19. La mayor cantidad de casos se habían presentado en la ciudad de Bariloche (77), seguido por Choele Choel (41) y Lamarque (20).

Fuente: parte de la secretaría de Políticas Públicas de Salud de Río Negro.

Descripción del muestreo:

Todas las muestras que se analizaron corresponden a extractos de ARN obtenidos de hisopados nasofaríngeos confirmados para la Covid-19 por la técnica de referencia de RT-PCR en tiempo real y que cumplieran con una carga viral medida en valores de Ct que debía estar por debajo de 30. Esto implica que podría suceder que se esté subestimando la diversidad de linajes sobre todo de los casos que son independientes entre sí y no tienen ningún nexo con clusters epidemiológicos identificados.

-Para el caso de la provincia de Tierra del Fuego:

Se seleccionaron entre 1 y 3 casos confirmados por cada *cluster* epidemiológico de acuerdo al tamaño de los mismos y 7 casos sin nexo epidemiológico con el fin de representar la totalidad de los casos. Cuando fue posible, se seleccionó el caso índice de cada *cluster* según indicado por el análisis epidemiológico.

De los 12 *cluster* epidemiológicos identificados con 122 casos en total se seleccionaron un total de 24 muestras, mientras que de los 12 casos sin nexo se seleccionaron un total de 7 para secuenciar.

-Para el caso de las provincias de Neuquén y Río Negro:

Se seleccionaron 26 muestras pertenecientes a personas con resultados de hisopados nasofaríngeos confirmados para la Covid-19, por Laboratorio Central de la provincia del Neuquén, con residencia en la provincia de Neuquén y Río Negro. Corresponden a personas cuyo diagnóstico confirmatorio se realizó en el periodo comprendido entre 13/03/2020 y 28/04/2020. Los criterios de selección fueron: el antecedente de viaje a zonas de transmisión viral (exterior y otras provincias de Argentina), el antecedente de contacto con un caso confirmado previamente, o la mala evolución clínica con o sin fallecimiento del paciente.

En las siguientes tablas se muestran los casos confirmados por localidad y por *cluster* epidemiológico identificados y el número de muestras seleccionadas para secuenciar.

Muestras confirmadas para Covid19 y secuenciadas según Localidad de residencia			Clusters identificados y muestras secuenciadas.			
Periodo 10 de marzo al 28 de abril de 2020			Periodo 10 de marzo al 28 de abril 2020			
Localidad	Residencia	N° Confirmadas	N° Secuenciadas	Cluster	N° Confirmadas	N° Secuenciadas
Centenario		3		Cipolletti NQN-Sanatorio RN	15	4
Cipolletti		16	3	Cutral Co-Ph	8	1
Cutral Co-PH		8	1	Gral Roca	1	1
Gral. Roca		1	1	Las Lajas-Zapala	34	4
Gral. Fernandez Oro		2		Loncopue	42	4
Las Lajas		26	2	Plottier-Viaje RD	4	2
Loncopue		42	4	SMA-Viaje España-	2	1
Neuquen		40	9	SMA-Viaje Brasil	4	1
Plottier		4	1	VLA-Viaje Brasil	4	1
Rada Tilly		1		NQN-Aeropuerto	7	1
SMA		9	2	Fuera de Cluster	47	6
Villa El Chocon		1		Total	168	26
VLA		6	1			
Vista Alegre		1				
Zapala		8	2			
Total		168	26			

Fuente: Laboratorio Central. Provincia del Neuquen

Resultados obtenidos

Se obtuvieron un total **57** secuencias de SARS-CoV-2 (profundidad promedio ~500X) provenientes de muestras clínicas de pacientes con la Covid-19 distribuidos en tres provincias de la Patagonia Argentina: 22 secuencias de Neuquén, 4 secuencias de Río Negro y 31 secuencias de Tierra del Fuego.

Estas secuencias serán subidas a la base de datos internacional GISAID una vez concluidos los análisis pertinentes relativos a esta etapa, mientras tanto estarán disponibles en un repositorio local.

Linajes

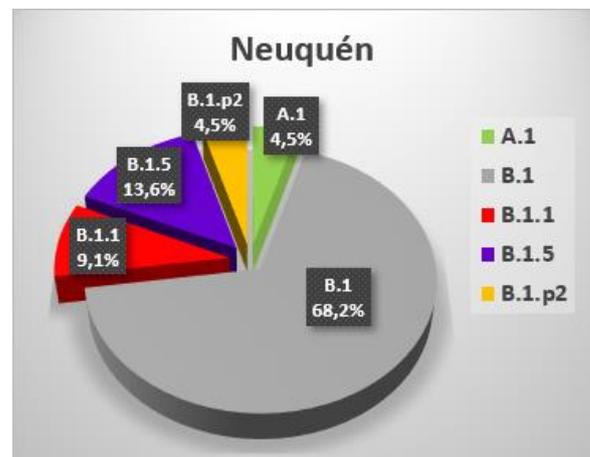
Las secuencias del genoma de SARS-CoV-2 obtenidas a partir de individuos infectados de distintos países han sido clasificadas, de acuerdo con cambios nucleotídicos y su agrupamiento filogenético, en dos linajes principales (denominados con letras A y B) y varios linajes internos (A.1-A.p7 y sus subgrupos, o B.1-B.16 y sus subgrupos), según la última actualización de la clasificación (Lineages versión 2020-05-19 v.2) (Rambaut y col., 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046086>).

Para la asignación rápida de linajes se utilizaron los programas Pangolin COVID-19 Lineage Assigner y Covidex. Ambas herramientas permiten determinar el linaje, la primera a través una asignación filogenética *on line* usando secuencias de referencia (<https://pangolin.cog-uk.io/>), y la segunda, a través de la identificación de patrones complejos mediante *machine learning* (<https://sourceforge.net/projects/covidex/>), desarrollada por el Dr. Marco Cacciabue integrante del Nodo Bioinformático del Consorcio.

Posteriormente el Nodo de Evolución del Consorcio y en particular el grupo de Evolución Viral de la Cátedra de Virología de la FFyB-UBA, liderado por la Dra. Carolina Torres, y con especial participación de las Dras. Laura Mojsiejczuk y María Dolores Blanco Fernández, realizaron los análisis filogenéticos necesarios para poder confirmar los linajes inicialmente asignados a las secuencias. En general, hubo correlación entre los resultados de los dos programas de asignación de linajes rápidos y la obtenida por métodos filogenéticos.

Finalmente, se reunieron los integrantes del Nodo de Evolución con los grupos de las provincias implicadas para realizar la discusión e interpretación de los resultados obtenidos que se detallan a continuación.

Distribución de linajes encontrados en cada provincia:



Análisis filogenético

Tierra del Fuego (TDF)

- Mediante análisis filogenético se determinó que las secuencias de la provincia de TDF pertenecieron al linaje B.1 (o sus (sub)linajes derivados), que ya fue descrito para las secuencias de Argentina reportadas previamente (n=37) y que posee amplia distribución mundial.
- En particular, las secuencias correspondieron a los linajes B.1, B.1.1.1, B.1.8 y B.1.3 (Figura 1 y Figuras 4-6).
- La mayoría de las secuencias de TDF pertenecieron al linaje B.1.1.1 (54,8%), para el que se observaron, al menos, dos introducciones independientes en la provincia. Si bien algunas de las secuencias se relacionan filogenéticamente con secuencias de distintos países de los cinco continentes, en otros casos formaron grupos que podrían representar *clusters* de circulación local dentro de la provincia. Algunos de estos grupos correlacionan con información epidemiológica relevada (casos con nexos epidemiológico conocido), evidenciado por la formación de grupos monofiléticos de alto soporte (D0006, D0007, D0008). Sin embargo, también cabe destacar que en otros casos se evidenciaron múltiples orígenes para infecciones que se pensaban relacionadas.
- El linaje B.1 se encontró en el 38,7% de las secuencias incluidas en el análisis, con al menos tres introducciones independientes: la mayoría de las secuencias se agruparon con secuencias de Francia sin una clara diversificación interna, mientras que las restantes secuencias B.1 se relacionaron con virus de otros países.
- Se observó una única introducción del linaje B.1.3 (3,2% de las secuencias estudiadas), reportado principalmente en América del Norte, aunque presentó un ancestro común más cercano con otras secuencias argentinas obtenidas previamente.
- Del mismo modo, se observó una única introducción del linaje B.1.8 (3,2% de las secuencias estudiadas), lo que constituye el primer reporte de este linaje en nuestro país, cuya circulación se encuentra principalmente asociada a Europa.

Por lo tanto, en la Provincia de Tierra del Fuego se evidenció la presencia de cuatro linajes virales y al menos siete introducciones independientes del SARS-CoV-2. Se observaron algunos grupos que podrían indicar la formación de clusters de transmisión local y a su vez, cadenas de transmisión por fuera de los nexos epidemiológicos registrados, posiblemente indicativo de circulación comunitaria en el período estudiado. A su vez se detectaron casos aislados considerados importados que presentaron relación con los antecedentes de viaje a zonas afectas con circulación comunitaria establecida (referidos por los pacientes estudiados).

Neuquén (NQN)

- Mediante análisis filogenético se determinó que la mayoría de las secuencias de NQN (n=21) pertenecieron al linaje B.1 (o sus (sub)linajes derivados), ya descrito para las secuencias de Argentina

reportadas previamente (n=37) y que posee amplia distribución mundial, y sólo una secuencia correspondió al linaje A.1, que ha sido descrito en América del Norte, Europa y Oceanía.

- En particular, para el caso del linaje B, las secuencias correspondieron a los linajes B.1, B.1.1, B.1.5 y B.1.p2 (Figura 1 y Figuras 3-6).

- La mayoría de las secuencias de la provincia de NQN pertenecieron al linaje B.1 (68,2%), para el que se observaron, al menos, cuatro introducciones independientes en la provincia. Si bien algunas de las secuencias se relacionan filogenéticamente con secuencias de distintos países de los cinco continentes, en otros casos formaron grupos que podrían representar cluster de circulación local dentro de la provincia. Algunos de estos grupos correlacionan con información epidemiológica relevada (casos con nexo epidemiológico conocido), evidenciado por la formación de grupos monofiléticos con alto soporte estadístico (D0044 y D0048) junto con secuencias de países a los cuales los pacientes tenían antecedente de viaje. Otros como el clado formado por las 11 secuencias: D0036, D0037, D0040, D0042, D0050-D0056 corresponden a dos cluster epidemiológicos distintos descritos (Brote Loncopué y brote Las Lajas) que podrían compartir un ancestro común, posiblemente relacionado con la cercanía geográfica entre ambas localidades y/o por tener relación directa con secuencias provenientes de Chile, de donde existen datos de posibles nexos epidemiológicos con ese país.

- El linaje B.1.1 se encontró en el 9,1% de las secuencias incluidas en el análisis, con dos introducciones independientes. Una de ellas comparte un ancestro común con un clado monofilético con alto soporte de secuencias previamente reportadas por nuestro grupo sumadas a otras reportadas recientemente en nuestro país (D0045) (Figura 5). Ese grupo de secuencias había sido propuesto en el informe anterior como un posible cluster de circulación viral comunitaria en CABA. De hecho, el paciente del que proviene esta secuencia de NQN refirió haber viajado a Brasil y luego haber permanecido en CABA, confirmando por nexo epidemiológico la posibilidad de que hubiera adquirido la infección en este último sitio. La otra introducción corresponde a un individuo que refiere haber viajado a España (D0035) (Figura 5).

- Se observaron dos introducciones diferentes del linaje B.1.5 (13,6% de las secuencias estudiadas). Una se relaciona con dos secuencias que se asocian en un clado monofilético bien soportado y confirman nexo epidemiológico de historial de viaje en conjunto a zona turística del Caribe. No se han reportado aún secuencias relacionadas provenientes de la zona turística referida como para confirmar el nexo geográfico. La segunda introducción de este linaje pertenece a un paciente con historial de viaje a España y se encuentra relacionada con secuencias de distintos orígenes/cosmopolita (Figura 6).

- Por último, una única secuencia se clasificó como perteneciente al linaje A.1 (4,5%) (Figuras 1-2) y proviene de un paciente que participó en una convención internacional, llevada a cabo en GBA a principios de marzo. Además, se encontró una secuencia clasificada como B.1.p2 (4,5%), correspondiente a un trabajador aeroportuario, este linaje ha mostrado circulación en América del Norte y se trata de un grupo monofilético con alto soporte. Este sería el primer reporte de ambos linajes en nuestro país.

Por lo tanto, en la provincia de Neuquén se evidenció la presencia de cinco linajes virales y al menos diez introducciones independientes del SARS-CoV-2. Se observaron algunos grupos que podrían indicar la formación de clusters de transmisión local, algunos clusters epidemiológicos que podrían estar relacionados entre sí y a su vez casos aislados considerados importados que presentaron relación con los antecedentes de viaje a zonas afectas con circulación comunitaria establecida (referidos por los pacientes estudiados).

Río Negro (RN)

- Mediante análisis filogenético se determinó que las cuatro secuencias de RN pertenecieron al linaje B.1 (o sus (sub)linajes derivados), en particular tres corresponden al linaje B.1.1 y una al B.1.
- Respecto del único caso que pertenece al linaje B.1 (D0047) no se pudo establecer su nexo epidemiológico de contagio. Sin embargo, el análisis filogenético muestra una estrecha relación con secuencias de Chile y otros casos de la provincia vecina de NQN. Este paciente constituyó el caso índice de un brote en un Sanatorio de Cipolletti, RN, en el cual se infectó un trabajador de salud del mismo (D0052) pero residente de ciudad de NQN, así como otros casos (D0053 y D0054) también residentes de ciudad de NQN pero que habrían adquirido la infección en el Sanatorio de RN o por contacto con algún paciente atendido en el Sanatorio mencionado.
- El linaje B.1.1 se encontró en tres de las secuencias de RN, que por relaciones filogenéticas y nexo epidemiológico corresponden a tres introducciones distintas a la provincia. Una sin nexo epidemiológico descrito hasta la fecha (D0059) que constituyó el primer paciente positivo de General Roca sin nexo epidemiológico, mientras que las otras dos (D0032 y D0033) se asocian con secuencias de países europeos a donde los pacientes habían referido viaje o por contacto directo con alguien que había regresado de viaje de Europa.

Por lo tanto, en la provincia de Río Negro se determinaron dos linajes y cuatro introducciones independientes del SARS-CoV-2 (sobre cuatro muestras analizadas). Asimismo, el estudio de los genomas virales permitió evidenciar la circulación viral entre dos ciudades cercanas, como Neuquén y Cipolletti, posiblemente debida a las intensas relaciones sociales, comerciales y laborales entre ellas.

Los resultados de asignación de los linajes se presentan de una manera gráfica en la siguiente figura que fue realizada por Agustín María Pardo y Claudio Schuster, integrantes del Nodo Bioinformático del Consorcio.

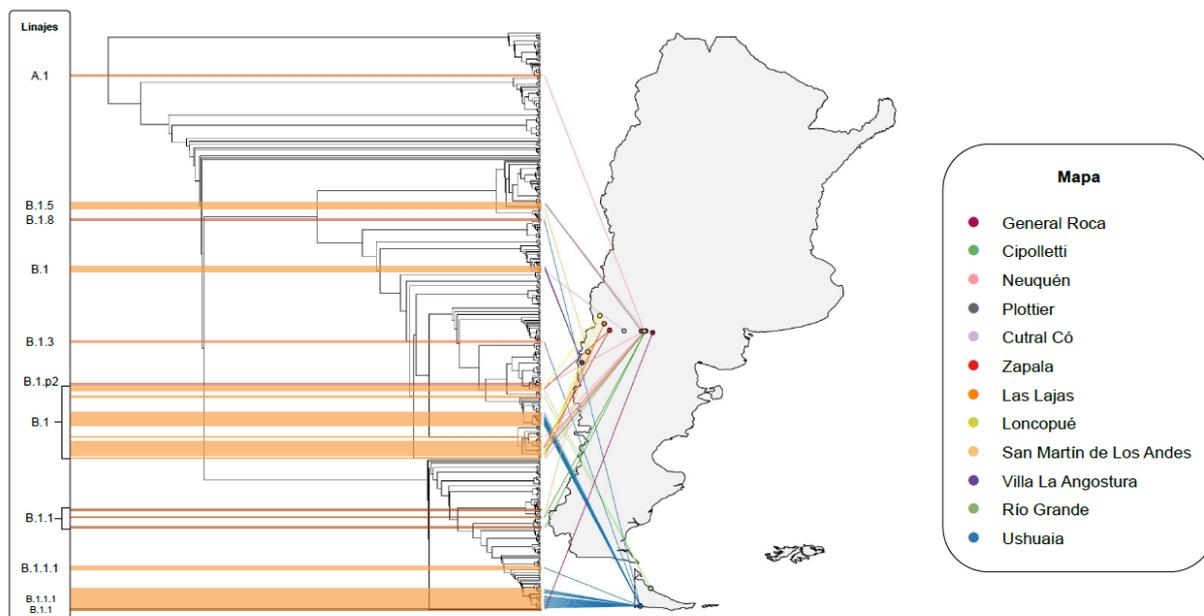


Figura 1. Árbol Filogenético de secuencias genómicas de SARS-CoV-2 provenientes de las Provincias de Neuquén, Río Negro y Tierra del Fuego, otras secuencias argentinas y referencias de linajes. El árbol filogenético fue creado mediante el programa IQ-TREE v2.0.6 (<http://www.iqtree.org/>) e integrado con el mapa a partir de la librería de R, phytools (<http://www.phytools.org/>). Cada secuencia está conectada por una línea coloreada respecto a su ciudad de procedencia (Cuadro derecho, "Mapa"). Los linajes de las secuencias obtenidas a través de los análisis filogenéticos mostrados en la Figuras 2-6 se los resaltó sobre las ramas del árbol de la izquierda con tonos anaranjados (Cuadro izquierdo, "Linajes").

Figura 2. Árbol filogenético del linaje A de SARS-CoV-2.

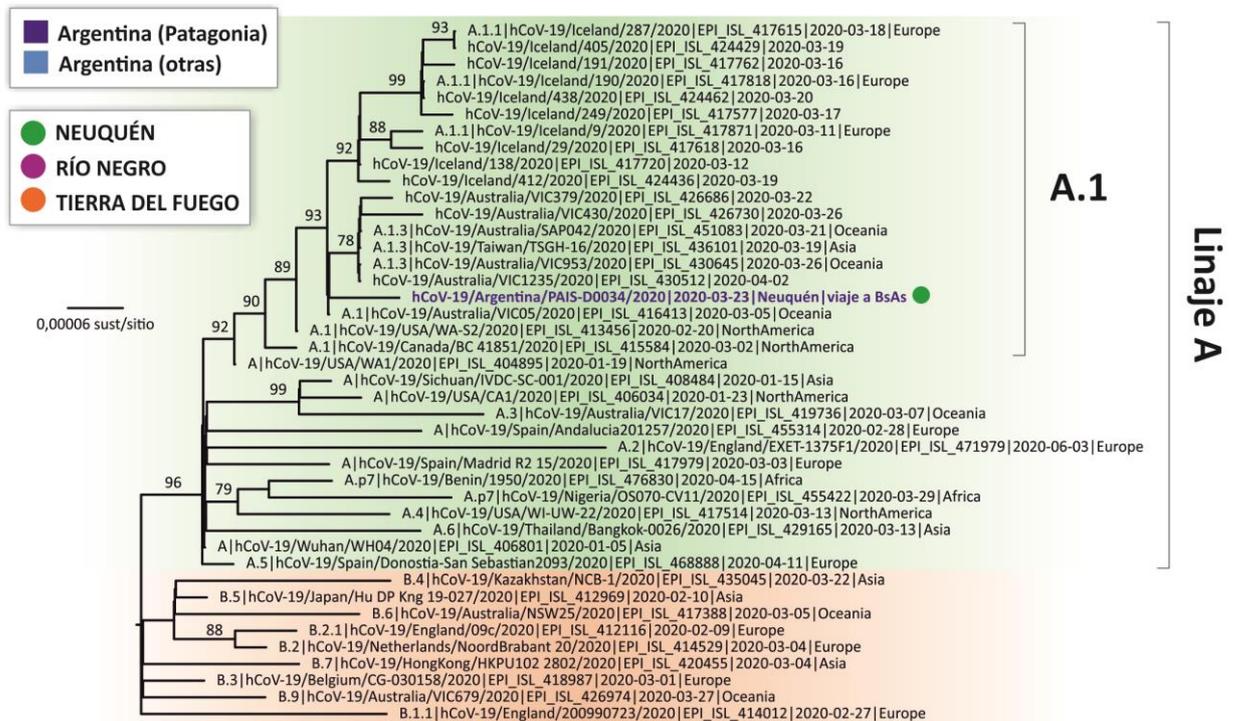


Figura 2. Árbol filogenético del linaje A de SARS-CoV-2, construido como se indica en el Anexo. Se utilizaron secuencias de linaje B para enraizar el árbol y sobre las ramas se indica el valor de soporte correspondiente al método de *Ultrafast Bootstrap Approximation* (sólo se indican valores mayores o iguales al 70 %).

Figura 3. Árbol filogenético del linaje B de SARS-CoV-2.

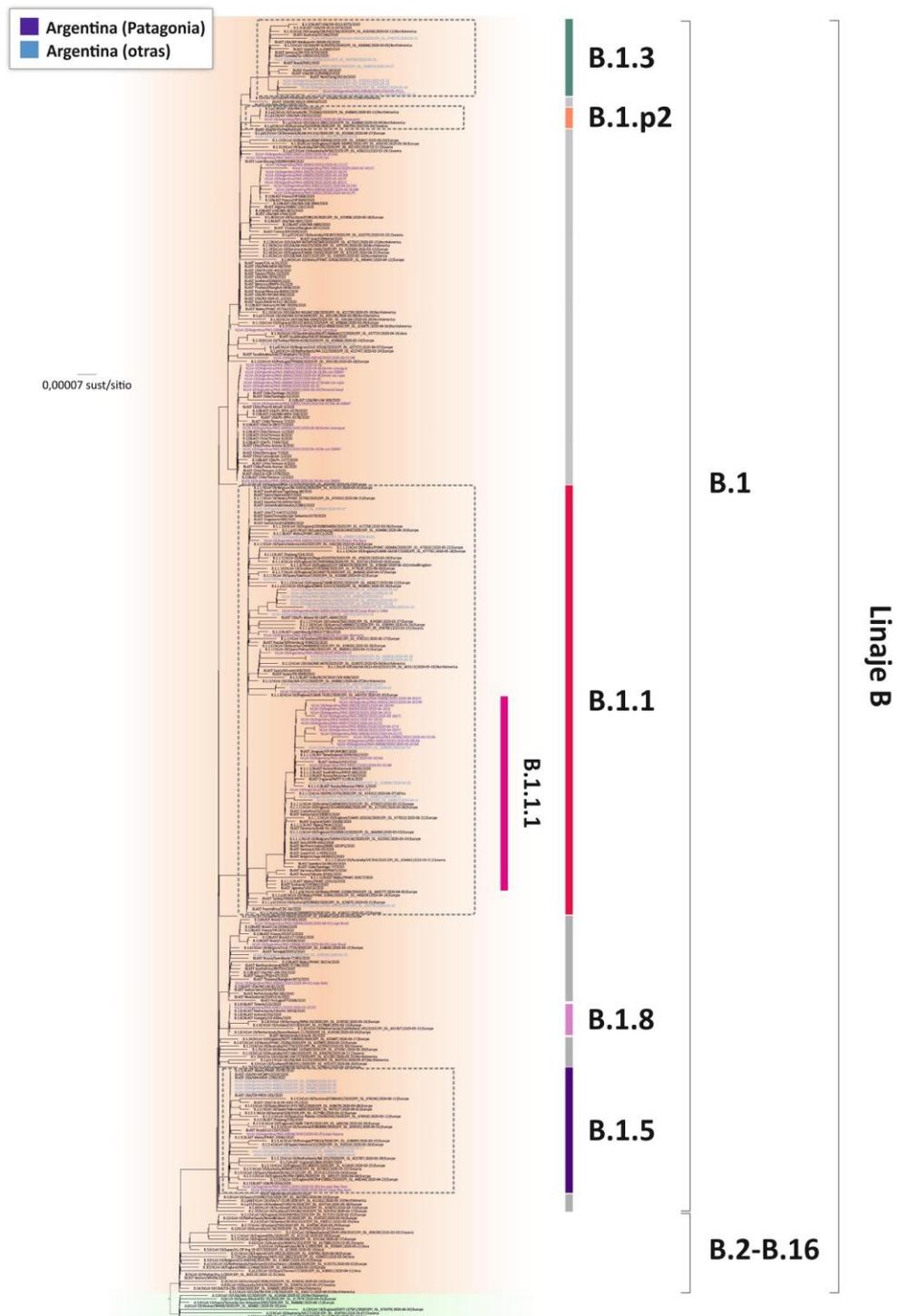


Figura 3. Árbol filogenético del linaje B de SARS-CoV-2, construido como se indica en el Anexo. Se utilizaron secuencias de linaje A para enraizar el árbol. Con corchetes y barras se indican los (sub)linajes derivados del linaje B que serán ampliados en la Figura 4 (linaje B.1), Figura 5 (linaje B.1.1) y Figura 6 (linajes B.1.p2, B.1.3, B.1.5 y B.1.8).

PROYECTO ARGENTINO INTERINSTITUCIONAL DE GENÓMICA DE SARS-CoV-2

Figura 4. Árbol filogenético del linaje B.1 de SARS-CoV-2.

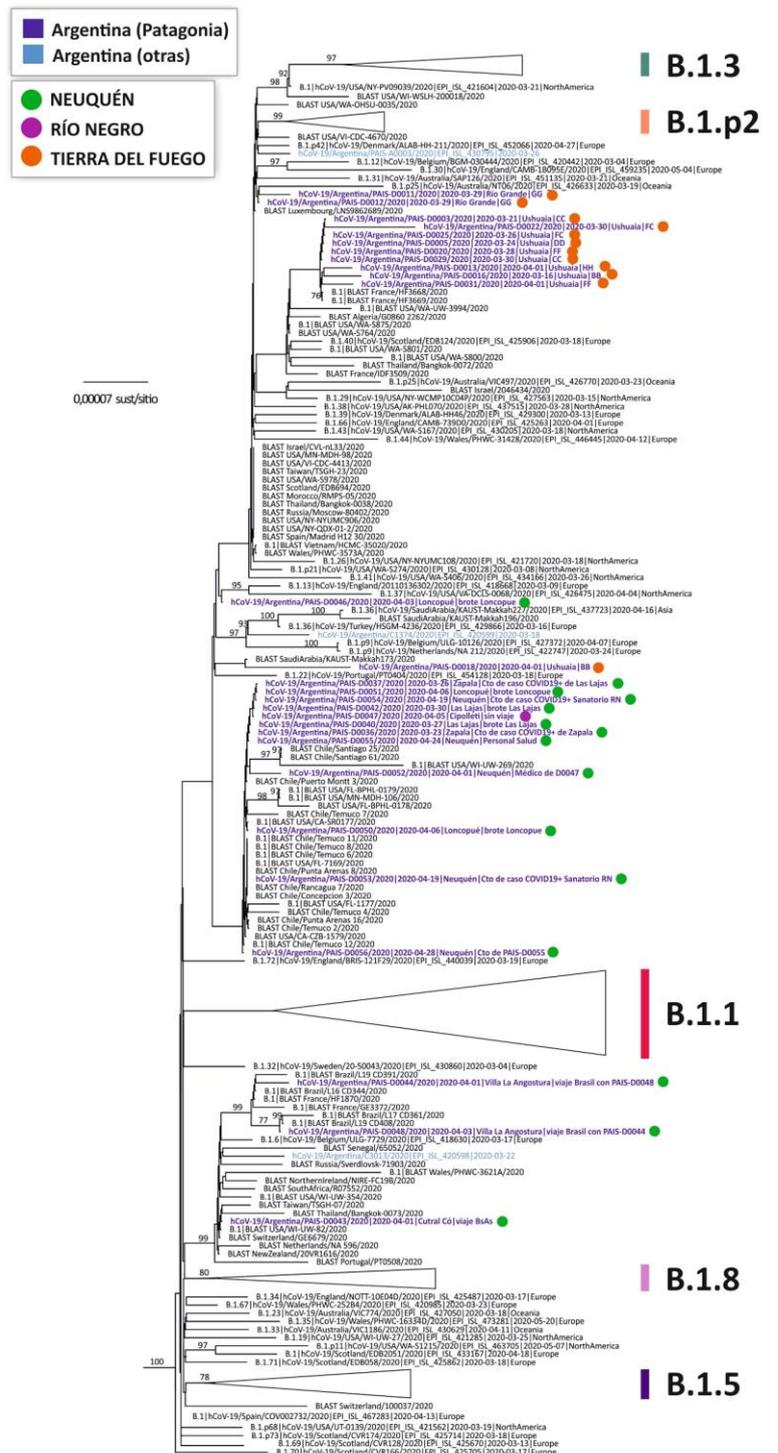


Figura 4. Árbol filogenético del linaje B.1 de SARS-CoV-2 (subárbol de la Figura 3). Sobre las ramas se indica el valor de soporte correspondiente al método de *Ultrafast Bootstrap Approximation* (sólo se indican valores mayores o iguales al 70 %). A fines de mejor visualización, se colapsaron los grupos ampliados en la Figura 5 (linaje B.1.1) y Figura 6 (linajes B.1.p2, B.1.3, B.1.5 y B.1.8).

Figura 6. Árbol filogenético de los linajes B.1.p2, B.1.3, B.1.5 y B.1.8 de SARS-CoV-2.

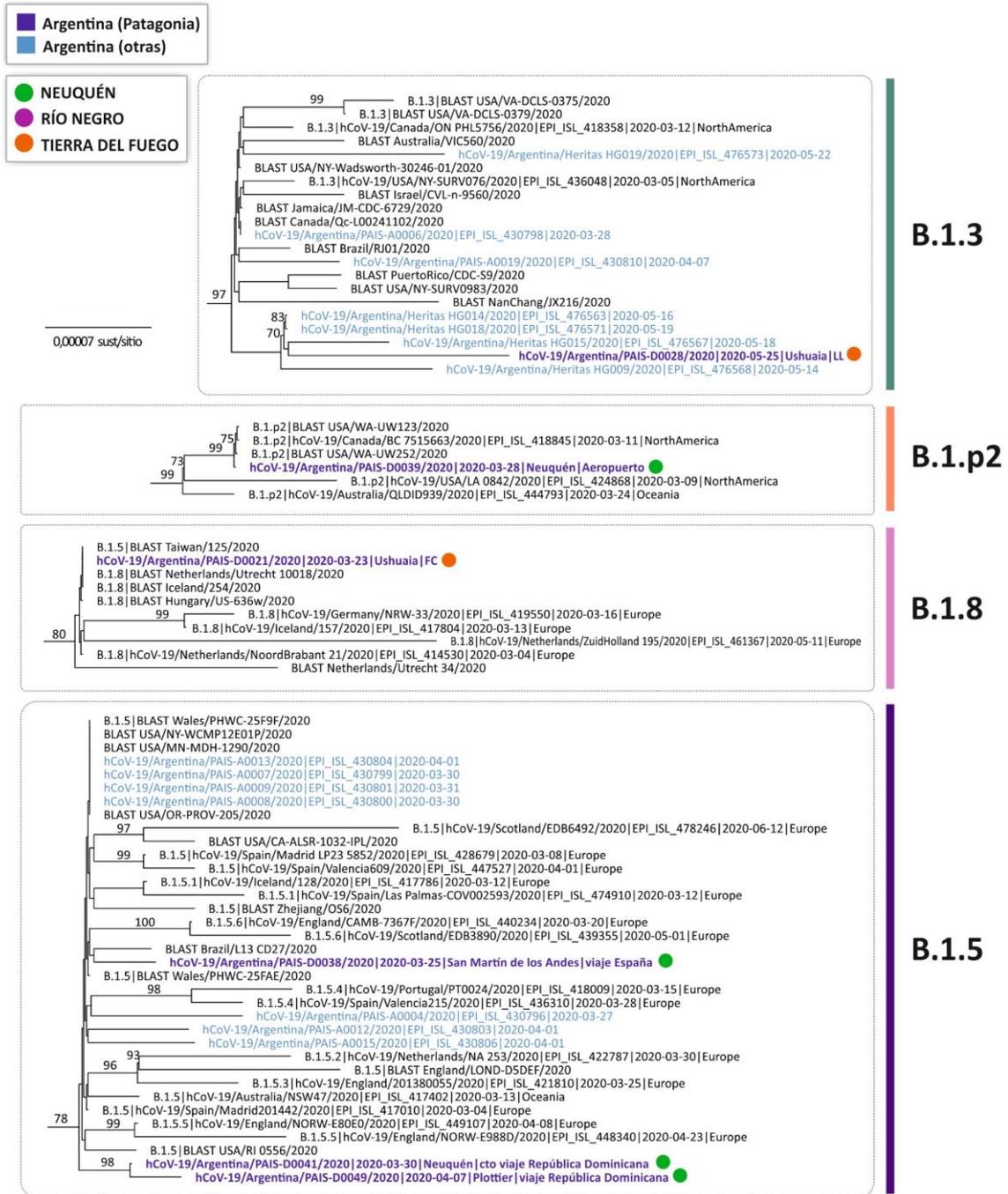


Figura 6. Árbol filogenético de los linajes B.1.p2, B.1.3, B.1.5 y B.1.8 de SARS-CoV-2 (subárbol de la Figura 3). Sobre las ramas se indica el valor de soporte correspondiente al método de *Ultrafast Bootstrap Approximation* (sólo se indican valores mayores o iguales al 70%).

Análisis de mutaciones en los genomas virales de SARS-CoV-2 reportadas en este informe que podrían afectar la detección por los métodos diagnósticos moleculares disponibles en el mercado.

Dado que existe gran diversidad de métodos moleculares disponibles en el país para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 -cada uno con sondas y cebadores específicos localizados en diferentes regiones del genoma-, se analizó la presencia de mutaciones en dichas regiones. Este análisis se pudo realizar sólo para aquellos métodos que tienen la información disponible (análisis realizado por la Licenciada Stephanie Goya, parte del Nodo Central del Consorcio).

Se analizaron los cebadores y sondas de los siguientes test:

- Protocolo de Charité, Berlin. Genes reconocidos: E y RdRp (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2)
- Protocolo de The University of Hong Kong. Genes blanco: N y RdRp. (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4)
- Protocolo de CDC Estados Unidos. Gen reconocido: N (regiones N1 y N2) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>)
- Protocolo de CDC China. Genes blanco: ORF1ab y N (http://ivdc.chinacdc.cn/kvjz/202001/t20200121_211337.html)
- Protocolo de Ministry of Public Health, Tailandia. Gen reconocido: N (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.pdf?sfvrsn=42271c6d_4)
- Protocolo de National Institute of Infectious Diseases, Tokio, Japón. Gen blanco: N (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/method-niid-20200123-2.pdf?sfvrsn=fbf75320_7)
- Protocolo de Institut Pasteur, Paris. Genes blanco: E y RdRp. (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2)

Se reconocieron las secuencias nucleotídicas de los cebadores y sondas utilizando el algoritmo blastn a través de la aplicación de un script desarrollado en general por el nodo bioinformático del Consorcio y en particular la herramienta desarrollada por Ezequiel Sosa. Se registraron las mutaciones encontradas en los genomas argentinos reportados en este informe con respecto a la cepa de referencia hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019:

- En la secuencia D0026 la mutación nucleotídica g29229a se localiza en la región de detección de la sonda del test de CDC Estados Unidos (región N2) como de la sonda del test de Japón (gen N).
- En las secuencias D0002, D0004, D0008, D0009, D0010, D0014, D0017, D0019, D0023, D0026, D0027, D0032, D0045, D0059, D0060 se detectó la mutación ggg28881-28883acc que se localiza en la región de detección de un cebador de CDC China (gen N).
- En la secuencia D0045 se detectó la mutación t29148c que se localiza en la región de detección de un cebador del test de Hong Kong (gen N).

Cabe aclarar que la presencia de estas mutaciones no implica necesariamente una baja en la sensibilidad de dichos métodos.

Detalle de las sustituciones no sinónimas (cambios aminoacídicos) en las proteínas codificadas en los genomas obtenidos a partir de los casos patagónicos

Para determinar las sustituciones no sinónimas en comparación con la cepa de referencia hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 se utilizó un script desarrollado en conjunto por el Nodo Bioinformático y en particular la herramienta desarrollada por José Matías Irazoqui. En la mayoría de las secuencias recuperadas, se observa presencia de las mutaciones S/D614G -previamente asociada a una mayor infectividad in vitro- (Korber et al., *BioRxiv* April 30, 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.104885>) y NSP12 (RdRp)/P323L -con un potencial poder mutagénico mayor del SARS-CoV-2 por estudios bioinformáticos- (Eskier D et al, May 20, 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.104885>). **Sin embargo, no se ha demostrado aún su relevancia in vivo.** Estas mutaciones son características del linaje B y circulan con una muy alta prevalencia a nivel mundial, por lo que su presencia en Argentina confirma la persistencia de las mutaciones en el linaje en su introducción al país. Por otro lado, en un único caso (D0034, linaje A) se observó presencia de la mutación NS8_L84S, previamente asociada con baja patogenicidad mediante estudios in vitro (Yao H, et al. *medRxiv* April 14, 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20060160>).

Este análisis fue realizado por la Dra. Paula Aulicino integrante del Nodo de Evolución del Consorcio.

Alcances del análisis

Este estudio preliminar será confirmado utilizando herramientas de análisis más exhaustivas, pero también más demandantes de tiempo de procesamiento de datos. Sin embargo, los resultados aquí expuestos tienen la importancia de aportar más evidencia a las hipótesis de trabajo propuestas, en un tiempo corto, valor fundamental cuando la epidemia está aún en desarrollo.

Conclusiones generales

En este informe se analizaron el 20% de los casos de la provincia de Tierra del Fuego (período comprendido entre el 04 de marzo y el 25 de mayo) y el 23% de los casos de la provincia de Neuquén (período comprendido entre el 10 de marzo y el 28 de abril). Durante este período se observaron múltiples introducciones en cada provincia y la posible formación de clusters de transmisión local en las distintas regiones. Sin embargo, si bien en algunos casos se observaron los mismos linajes entre las provincias o regiones patagónicas analizadas, éstos tendrían orígenes independientes y una evolución particular en cada región geográfica.

ANEXO

Análisis filogenéticos

Las secuencias de Argentina fueron analizadas junto con secuencias de referencia de distintos linajes (<https://github.com/hCoV-2019/pangolin>) y secuencias con mejor score de alineamiento por BLAST (contra la base de datos de GISAID al 07-07-2020). Se intensificó la representación de secuencias de distintos países en los linajes donde se ubican las secuencias de Argentina. Los alineamientos se construyeron con el programa MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) con parámetros por *default*. El modelo evolutivo apropiado se seleccionó con ModelFinder ([Kalyanamoorthy et al., 2017, https://doi.org/10.1038/nmeth.4285](https://doi.org/10.1038/nmeth.4285)). Los análisis filogenéticos se realizaron por Máxima Verosimilitud con el programa IQ-TREE v.2.0.6 (Minh y col., 2020, <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>) y Ultrafast bootstrap Approximation como método para evaluar la confiabilidad (10000 réplicas) (Hoang y col., 2018, <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>).

Nota

Este informe no solo busca mostrar los resultados de las secuencias provenientes de una región de nuestro país, obtenidos por el Nodo de Secuenciación más austral del Consorcio, sino que intenta reflejar la forma de trabajo interdisciplinaria propuesta en el proyecto. Por lo que los datos reportados resultan de la interacción de distintos nodos como los de secuenciación, el bioinformático, de evolución y el invaluable aporte de los epidemiólogos de cada lugar. Intenta demostrar que las diferentes áreas se pueden enriquecer mutuamente cuando se trabaja en equipo. Asimismo, muestra la posibilidad de tener centros de secuenciación genómica descentralizados en distintas regiones del país que están e irán generando habilidades a través de la interacción mutua a medida que este proyecto avance.

En cada análisis particular se informaron los autores participantes, sin embargo, es importante remarcar que si bien hay personas individuales que tienen una autoría especial en varios pasos, cada análisis o secuenciación ha tenido consensos generales discutidos en distintas reuniones por lo que en definitiva todos los integrantes de este Consorcio son autores. Por lo que a continuación se listan todos los integrantes del mismo.

Consorcio del Proyecto PAIS (Proyecto Argentino Interinstitucional de genómica de SARS-CoV2)

Nodo Central: grupo de investigación del Laboratorio de Virología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG), dirigido por la Dra. Mariana Viegas, Investigador Responsable del proyecto.

Equipo de trabajo: Mariana Viegas; Laura Valinotto; Mercedes Nabaes; Stephanie Goya; Mónica Natale; Silvina Lusso.

Nodos de secuenciación:

1- Laboratorio de Virología HNRG (CABA), Equipo NextSeq

Equipo de trabajo: Laura Valinotto; Mariana Viegas; Mercedes Nabaes; Stephanie Goya; Mónica Natale; Silvina Lusso.

2- Biocódices (CABA), Equipo MiSeq

Equipo de trabajo: Hernan Dopazo, Jeremias Zubrzycki; Juan Manuel Berros

- 3- IABIMO-INTA Castelar (Provincia de Buenos Aires), Equipo MiSeq
Equipo de trabajo: Andrea Fabiana Puebla, Andrea Verónica Peralta, Marisa Diana Farber, Ana Julia Distéfano, Marianne Graziel Muñoz Hidalgo, Norma Paniego, Mónica Fass, Viviana Cecilia Pedroarias, Sebastián Asurmendi
- 4- HRU, UNTDF y CADIC-CONICET (Provincia de Tierra del Fuego), Equipo MiSeq
Equipo de trabajo: Santiago Ceballos, Ivan Gramundi, Cristina Nardi, Fernando Gallego,
- 5- EEA Rafaela del INTA-CONICET (Provincia de Santa Fe), Equipo Minlon
Equipo de trabajo: María Florencia Eberhardt, Cecilia Camussone, Matías Irazoqui, Ariel Amadío.
- 6- Laboratorio Central de Neuquén (Ministerio de Salud) (Provincia de Neuquén), Equipo MiSeq
Equipo de trabajo: Melina Leonor Mazzeo, Luis Alfredo Pianciola
- 7- IPAVE-CIAP-INTA (Provincia de Córdoba), Equipo Minlon
Equipo de trabajo: Franco Fernández, Humberto Debat

Nodos bioinformáticos:

- 1. IQUBICEN - CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) - Grupo Marcelo Martí
Equipo de trabajo: Marcelo Martí, Agustín Pardo, Claudio Schuster.
- 2. IQUBICEN e IC - CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) - Grupo Adrián Turjanski.
Equipo de trabajo: Adrián Turjanski, Darío Fernández Do Porto, Florencia Castello, Federico Serral, Ezequiel Sosa, Jonathan Zaiat.
- 3. IABIMO-CICVyA-INTA-CONICET (Provincia de Buenos Aires). Equipo de trabajo: Maximo Rivarola, Sergio Gonzalez, Paula del Carmen Fernández, Sofia Bengoa Luoni, Diego Zavallo, Marco Cacciabue, Laura Lozano Calderón.
- 4. Biocódices (CABA). Equipo de trabajo: Hernán Dopazo, Jeremias Zubrzycki, Juan Manuel Berros
- 5. Laboratorio de Virología HNRG (CABA). Equipo de trabajo: Stephanie Goya.
- 6. EEA Rafaela-INTA-CONICET (Provincia de Santa Fe). Equipo de trabajo: Ariel Amadio, Matías Irazoqui.
- 7. Cátedra de Virología de Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (CABA). Equipo de trabajo: Andrés Culasso.
- 8. Laboratorio Central de Neuquén (Ministerio de Salud) (Provincia de Neuquén). Equipo de trabajo: Carolina Pintos.
- 9. HRU, UNTDF y CADIC-CONICET (Provincia de Tierra del Fuego). Equipo de trabajo: Santiago Ceballos, Ivan Gramundi.

Nodos de evolución:

- 1. Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (CABA): Mariana Viegas, Stephanie Goya, Mercedes Nabaes
- 2. Cátedra de Virología de Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (CABA): Carolina Torres, Andrés Culasso, Laura Mojsiejczuk, María Dolores Blanco Fernandez, Débora Marccone, Viviana Mbayed, Rodolfo Campos, Lucia Vicenta Cavallaro
- 3. Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, UVEM. Hospital Garrahan (CABA): Paula Aulicino
- 4. INTA-IABIMO-Evolución (CABA): Guido König, Laura Lozano Calderón
- 5. FCEN-UBA / IQUBICEN CONICET (CABA): Darío Do Porto, Agustín Pardo, Claudio Schuster
- 6. HRU, UNTDF y CADIC-CONICET (Provincia de Tierra del Fuego): Santiago Ceballos, Iván Gramundi
- 7. Laboratorio Central de Neuquén (Ministerio de Salud) (Provincia de Neuquén): Carolina Pintos
- 8. IPAVE-CIAP-INTA (Provincia de Córdoba): Humberto Debat