

## Reporte nº4 – Provincia de Córdoba –19 de agosto de 2020

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

En esta etapa del trabajo se buscó cumplir con el primer objetivo propuesto en el proyecto PAIS, que es identificar los linajes virales que han ingresado a través de los pacientes con antecedente de viaje a zonas afectadas, así como identificar el origen de los brotes descritos en la provincia de Córdoba, grupos que podrían establecerse y posteriormente asociarse a brotes de circulación local. Para ello el periodo de análisis en esta etapa corresponde a los primeros meses del brote en Argentina, desde el 22 de marzo al 15 de abril (SE 13 a SE 16) más tres casos del mes de julio de relevancia epidemiológica al momento del muestreo.

#### Situación epidemiológica durante el periodo de análisis:

##### Respecto de la situación epidemiológica de la Nación sobre los Decretos Nacionales relativos al Aislamiento Social Obligatorio (ASPO):

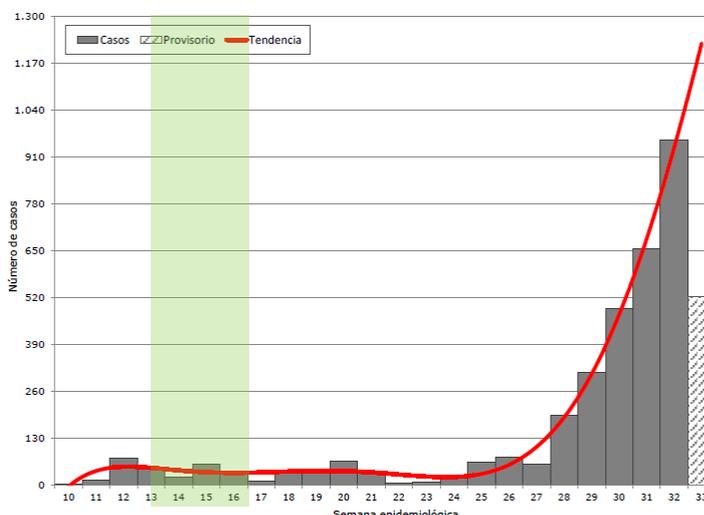
- 20 de marzo de 2020. DNU 297/2020 Determinación del Aislamiento Social Obligatorio (ASPO) estricto en todo el territorio argentino.
- 31 de marzo de 2020. DNU 325/2020 Prórroga DNU 297 hasta 12 abril
- 1 de abril de 2020. DNU 331/2020 Prórroga DNU 274 Ingreso extranjeros
- 11 de abril de 2020. DNU 355/2020 Prórroga ASPO hasta 26 abril.
- 11 de abril de 2020. DNU 365/2020 Prórroga DNU 331
- 26 de abril de 2020. DNU 408/2020. Prórroga ASPO hasta el 10 de mayo.

#### Situación epidemiológica de la provincia de Córdoba durante el periodo de análisis y Descripción del muestreo realizado

Respecto de las medidas del ASPO dispuestas por el Gobierno Nacional, la provincia hasta ese momento estaba adherida en su totalidad como el resto de las jurisdicciones del país.

A fecha del 15 de abril se notificó al sistema de vigilancia epidemiológica provincial un total de 4298 casos, de los cuales: 232 fueron confirmados y 3233 se descartaron, mientras que 833 se encontraban en estudio (<https://www.cba.gov.ar/informe-diario-de-casos-y-medidas/>).

Los tres Departamentos con mayor número de casos reportados en ese periodo fueron el de Córdoba con 77 casos, el departamento de Colón con 59 y el de San Martín con 24 casos. En el siguiente gráfico se muestran el número de casos confirmados, según semana epidemiológica (SE 10 a 33). Fuente: Ministerio de Salud de Córdoba y Reporte epidemiológico de Córdoba (REC 2.353 - 12 de agosto 2020). Asimismo, se resalta en verde el periodo de análisis que abarca este reporte.



### Antecedente geriátrico Saldán

Se incluyeron muestras de un brote asociado a un geriátrico de Saldán (departamento de Colón), en el cual un profesional de la salud que trabajaba allí y en otros consultorios médicos del área de Sierras Chicas fue diagnosticado con Covid-19 el 9 de abril. El profesional tenía antecedente de viaje a Chile. A raíz de esta situación, equipos del Ministerio de Salud desplegaron una estrategia de ampliación diagnóstica que incluyó testeos a las personas residentes, a trabajadores del lugar, a contactos estrechos, personal de salud local y otras personas. Se decidió analizar 4 casos provenientes de este brote con el objetivo de confirmar el origen único que refería la epidemiología.

A partir de los datos presentados y de la interacción con los laboratorios se procedió a realizar la selección de las muestras a estudiar.

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

1. Laboratorio Central, Ministerio de Salud (Córdoba, provincia de Córdoba): Gabriela Barbas y Gonzalo Castro, Paola Sicilia y Laura López.
2. Instituto de Virología “Dr.J.M.Vanella” Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba (provincia de Córdoba): Viviana Ré y María Belén Pisano.

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 cumplían con una carga viral medida en valores de Ct que debían estar por debajo de 30. Esto deja abierta la posibilidad de una subestimación de la diversidad de linajes, sobre todo de los casos que son independientes entre sí y no tienen ningún nexo con clusters epidemiológicos identificados.

Para la selección de las muestras se siguió el criterio de identificar los linajes virales que ingresaron a las provincias a través de personas con antecedente de viaje a zonas afectadas, así como aquellos brotes que pudieran estar marcando la instalación de circulación comunitaria.

Se seleccionaron un total de **22 muestras positivas para SARS-CoV-2** para secuenciar. Seis casos eran provenientes de la ciudad de Córdoba, 4 de Saldán, 2 de Bell Ville, 3 de Villa María, 3 de Villa Dolores, 1 de Brikman, y 3 sin datos. De los mismos, 15 tenían antecedentes de viaje al exterior.

El promedio de edad fue 53,1 años (mediana= 58 años). Trece eran mujeres y 9 hombres.

### **Secuenciación**

El nodo de secuenciación del Consorcio Interinstitucional para la secuenciación de SARS-CoV-2 implicado en este reporte fue el IPAVE-CIAP-INTA, ubicado en la ciudad de Córdoba. Este laboratorio posee un equipo Minlon-Nanopore. El equipo de trabajo está constituido por Franco Fernández y Humberto Debat.

En el proyecto PAIS se emplean dos tecnologías para la secuenciación de los genomas de SARS-CoV-2, Illumina (Secuenciación de 2da generación) y Nanopore (Secuenciación de 3ra generación). La tecnología Nanopore permite la secuenciación de moléculas simples de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sin la necesidad de amplificación previa vía PCR o marcado fluorescente de las moléculas, como si lo requieren las tecnologías de 2da generación. Esta tecnología ha desarrollado un sistema que emplea nanoporos conformados por proteínas del tipo porinas que atraviesan membranas sometidas a un campo eléctrico constante. Cuando las moléculas de ADN o ARN atraviesan dichos poros, se genera un cambio en la corriente eléctrica de la membrana, el cual puede ser medido y que permite conocer con buena precisión la composición de las moléculas que están atravesando dicho poro. Una de las ventajas de esta tecnología es la portabilidad ya que los dispositivos de secuenciación son de reducido tamaño (por ej MinION ~15cm de largo). Por otra parte, las muestras pueden ser procesadas rápidamente con requerimientos de infraestructura y de personal mínimos, a la vez que se pueden analizar los datos en tiempo real. Estas características hacen que sea una tecnología ideal para el monitoreo y la rápida identificación de virus y otros patógenos emergentes de importancia en Salud Pública. Este constituye el primer reporte del Consorcio con la metodología Minlon-Nanopore.

Se realizaron los controles necesarios para asegurar calidad en cada una de las corridas siguiendo el SOP “Validación de método de secuenciación de muestras de SARS-CoV-2” desarrollado para el Consorcio por la Unidad de Genómica del IABIMO-INTA Castelar.

### **RESULTADOS OBTENIDOS**

Se obtuvieron un total 22 secuencias de SARS-CoV-2 (profundidad promedio ~600X) provenientes de muestras clínicas de pacientes con la COVID-19 de la provincia de Córdoba. El promedio de cobertura del genoma en las 22 muestras fue del 98,49% con una mediana de 99,57%.

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.9 y sus subgrupos, o B.1-B.22 y sus subgrupos), según la última actualización de la clasificación (Lineages versión 2020-07-20) (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 online 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.

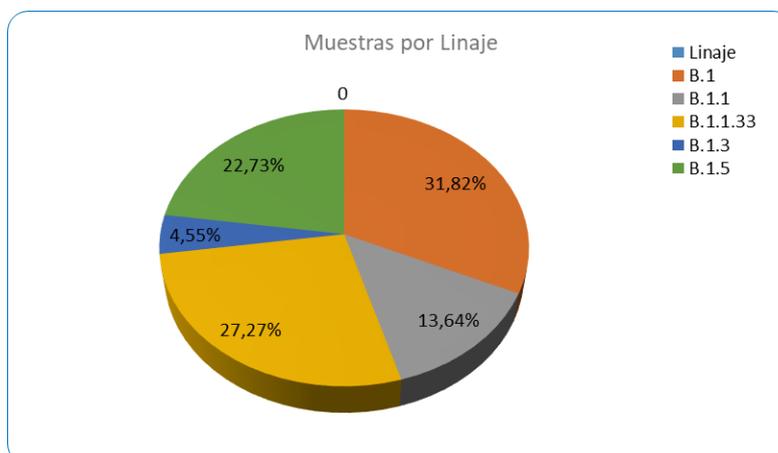
Posteriormente el Nodo de Evolución del Consorcio y en particular el grupo de Evolución Viral de la Cátedra de Virología de la FFyB-UBA, realizó los análisis filogenéticos necesarios para confirmar los linajes inicialmente asignados. Se observó una concordancia del 95.5 % con los métodos de asignación rápida de linajes.

A su vez, se realizaron análisis filogenéticos de cada linaje para evaluar la relación entre las secuencias provenientes de Córdoba y aquellas de otras localizaciones geográficas, como así también para identificar cadenas de transmisión asociadas a una fuente única de infección (detalles metodológicos en Anexo).

## Distribución de linajes encontrados

Mediante análisis filogenético se determinó que todas las secuencias de la provincia de Córdoba pertenecieron al linaje B.1 (o sus (sub)linajes derivados), que ya fue descrito para las secuencias de Argentina reportadas previamente y que posee amplia distribución mundial (En la figura suplementaria 1 1, se muestra el árbol filogenético que se obtuvo para clasificar en los distintos linajes a las secuencias obtenidas).

En particular, las secuencias de SARS-CoV-2 de las muestras de la provincia de Córdoba, que se muestran en el siguiente gráfico, correspondieron al linaje B.1 (31,8 %) y sus sublinajes B.1.1 (13,6 %), B.1.1.33 (27,3 %), B.1.3 (4,5 %) y B.1.5 (22,7 %).



## **Análisis filogenéticos**

### **Linaje B.1**

El linaje B.1 es el más representado en las secuencias de Córdoba (n=7) y provinieron de individuos con antecedentes de viaje. La evidencia filogenética actual indica que todas han sido introducciones independientes a la provincia (Figuras 1 y 2). En particular, se observó que:

- Una secuencia de una persona con antecedentes de viaje a Miami, Estados Unidos, se agrupó con un clado de secuencias de ese país.

- Cuatro secuencias de individuos con antecedentes de viaje se asociaron a un grupo de secuencias de Europa y Brasil. Dos de ellas, de individuos con antecedentes de viaje a Ushuaia, se intercalaron con secuencias de Europa, mientras que las otras dos secuencias de personas con registro de viaje a Brasil formaron un grupo interno con secuencias de ese país y de Francia, más dos secuencias obtenidas de pacientes de Neuquén reportadas previamente, también con antecedentes de viaje a Brasil.

- Una secuencia de una persona con antecedentes de viaje a República Dominicana se agrupó con una secuencia de Costa Rica.

- Otra secuencia de un individuo con antecedente de viaje a República Dominicana se entremezcló entre secuencias de distintos países.

#### **Linaje B.1.1**

Tres secuencias de Córdoba pertenecieron al linaje B.1.1 y todas se asociaron con viajes a los Estados Unidos (Figuras 1 y 3). Dos de ellas formaron un grupo y la secuencia restante se agrupó con una secuencia de Inglaterra con moderado soporte. Estos grupos se interrelacionaron con secuencias de varios países, incluidas secuencias previamente reportadas de Argentina.

El sistema de nomenclatura utilizado en este reporte indica una subclasificación de este linaje en sublinajes como el B.1.1.33, que se describe a continuación.

#### **Linaje B.1.1.33**

Las secuencias de Córdoba de este linaje provienen de individuos con antecedentes de viaje a Brasil (n=3) y de un brote en la Ciudad de Villa Dolores de principios del mes de julio (n=3) (Figuras 1 y 4). Particularmente, se observó que:

Las secuencias de individuos con antecedentes de viaje se intercalaron con secuencias de distintos países como Brasil, Chile, Estados Unidos y Australia, y representarían tres introducciones independientes a la provincia.

Las secuencias asociadas al brote de Villa Dolores formaron un grupo monofilético de alto soporte, lo que es compatible con una fuente común de contagio. Este grupo se encontró dentro del gran clado conformado por secuencias de la CABA y provincia de Buenos Aires reportado previamente y correspondiente a muestras de abril y mayo.

### **Linaje B.1.3**

Una sola secuencia de la provincia de Córdoba perteneció a este linaje, proveniente de un individuo con antecedentes de viaje a República Dominicana. Esta secuencia se relacionó a un grupo de secuencias de Estados Unidos y América Central (Figuras 1 y 5).

### **Linaje B.1.5**

Las secuencias de Córdoba de este linaje provienen de un individuo con antecedente de viaje a los Estados Unidos y de un brote en una institución de cuidados de adultos mayores de la Ciudad de Saldán (n=4) (Figuras 1 y 6). Particularmente, se observó que:

- La secuencia del individuo con antecedente de viaje se entremezcló con secuencias de Estados Unidos, de distintos países de Europa y de Argentina reportadas previamente.
- Las secuencias asociadas al brote de la Ciudad de Saldán formaron un grupo monofilético de alto soporte, lo que es compatible con una fuente común de contagio. Este grupo se encontró en forma basal al linaje B.1.5 y presenta 7 posiciones con nucleótidos marcadores únicos, con respecto al resto de las secuencias B.1.5. Algo interesante de destacar de este brote es que a pesar de que el caso índice tenía antecedente de viaje a Chile, las secuencias analizadas en este reporte no se asociaron a ninguna secuencia Chile reportada hasta el momento en las bases de datos.

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 la provincia de Córdoba, otras secuencias argentinas previamente reportadas por Consorcio PAIS y referencias de linajes. El árbol filogenético fue obtenido 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 (Cuadro izquierdo, "Linajes").

PROYECTO ARGENTINO INTERINSTITUCIONAL DE GENÓMICA DE SARS-CoV-2

Linaje B.1

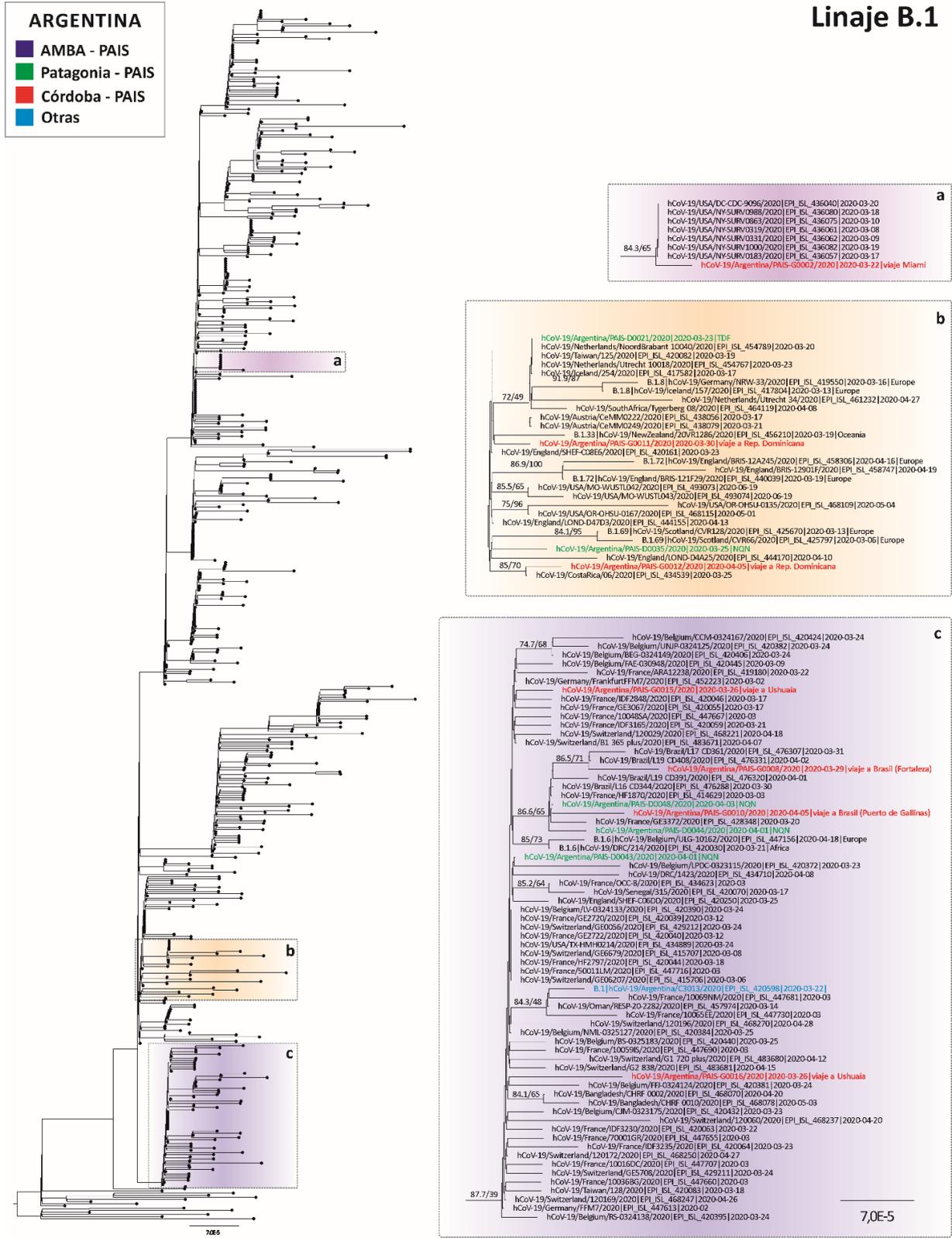


Figura 2. Árbol filogenético del linaje B.1 de SARS-CoV-2.

Linaje B.1.1

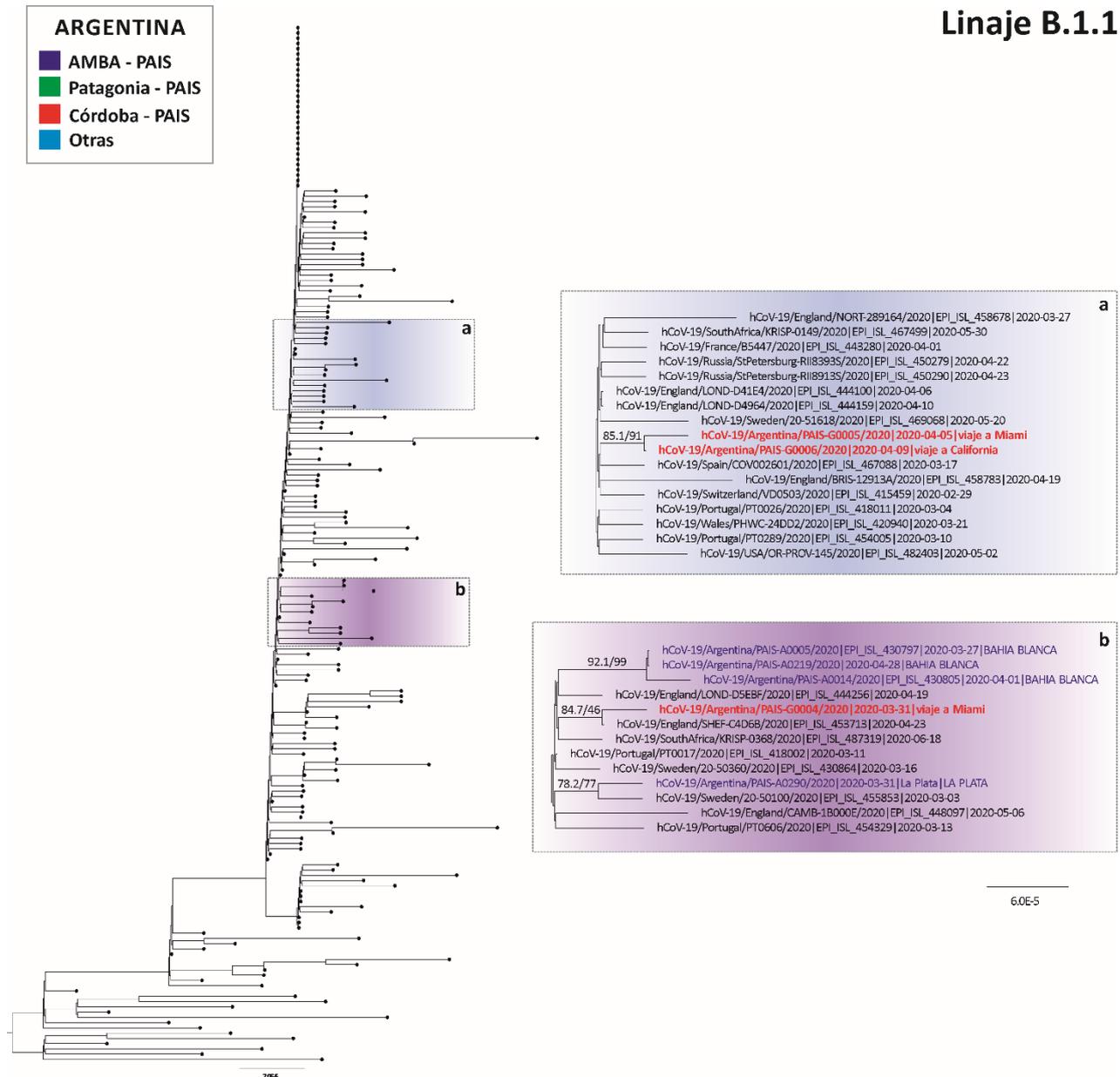


Figura 3. Árbol filogenético del linaje B.1.1 de SARS-CoV-2.

Linaje B.1.1.33

- ARGENTINA**
- AMBA - PAIS
  - Patagonia - PAIS
  - Córdoba - PAIS
  - Otras



Figura 4. Árbol filogenético del linaje B.1.1.33 de SARS-CoV-2.

Linaje B.1.3

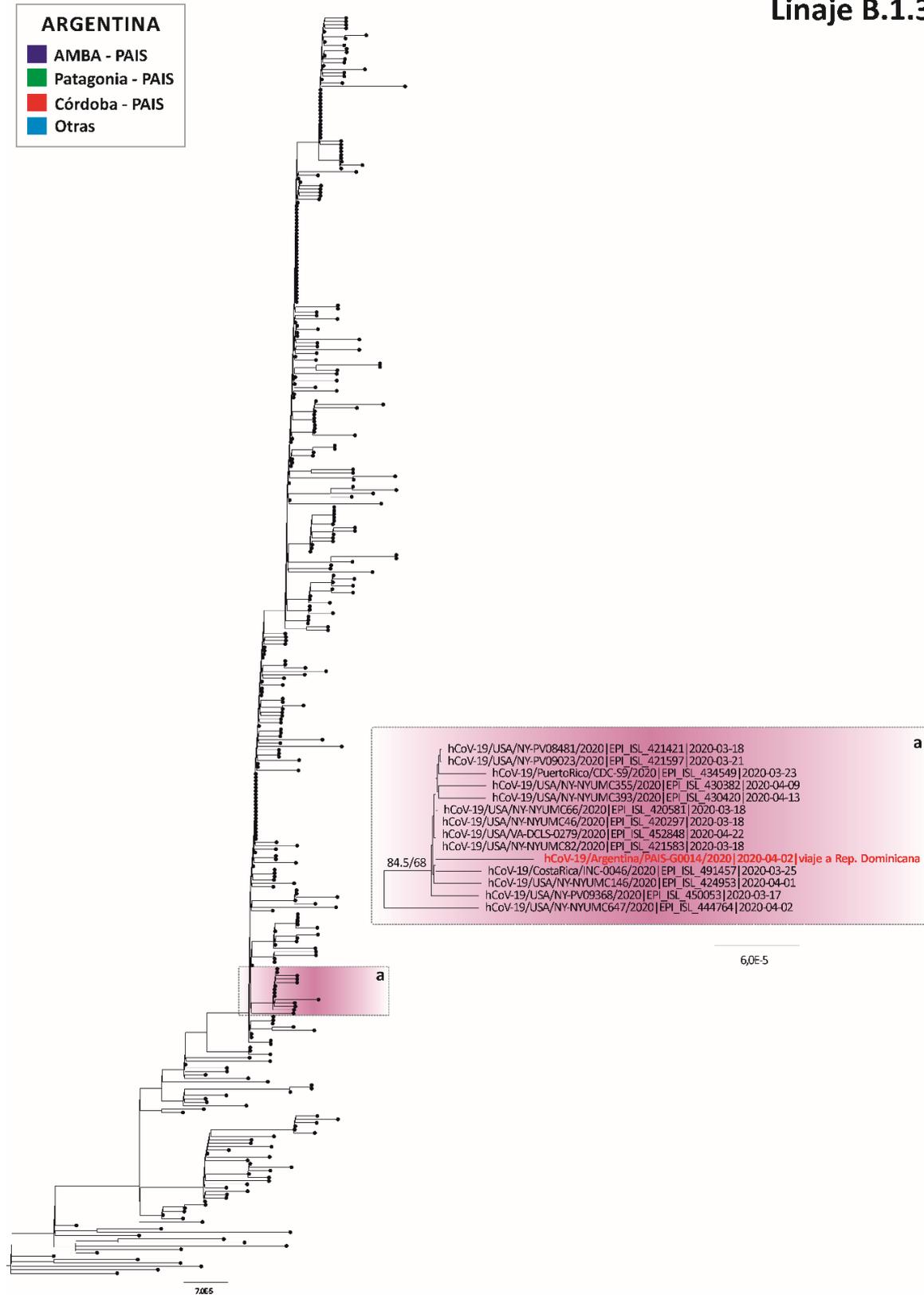


Figura 5. Árbol filogenético del linaje B.1.3 de SARS-CoV-2.

Linaje B.1.5

- ARGENTINA**
- AMBA - PAIS
  - Patagonia - PAIS
  - Córdoba - PAIS
  - Otras

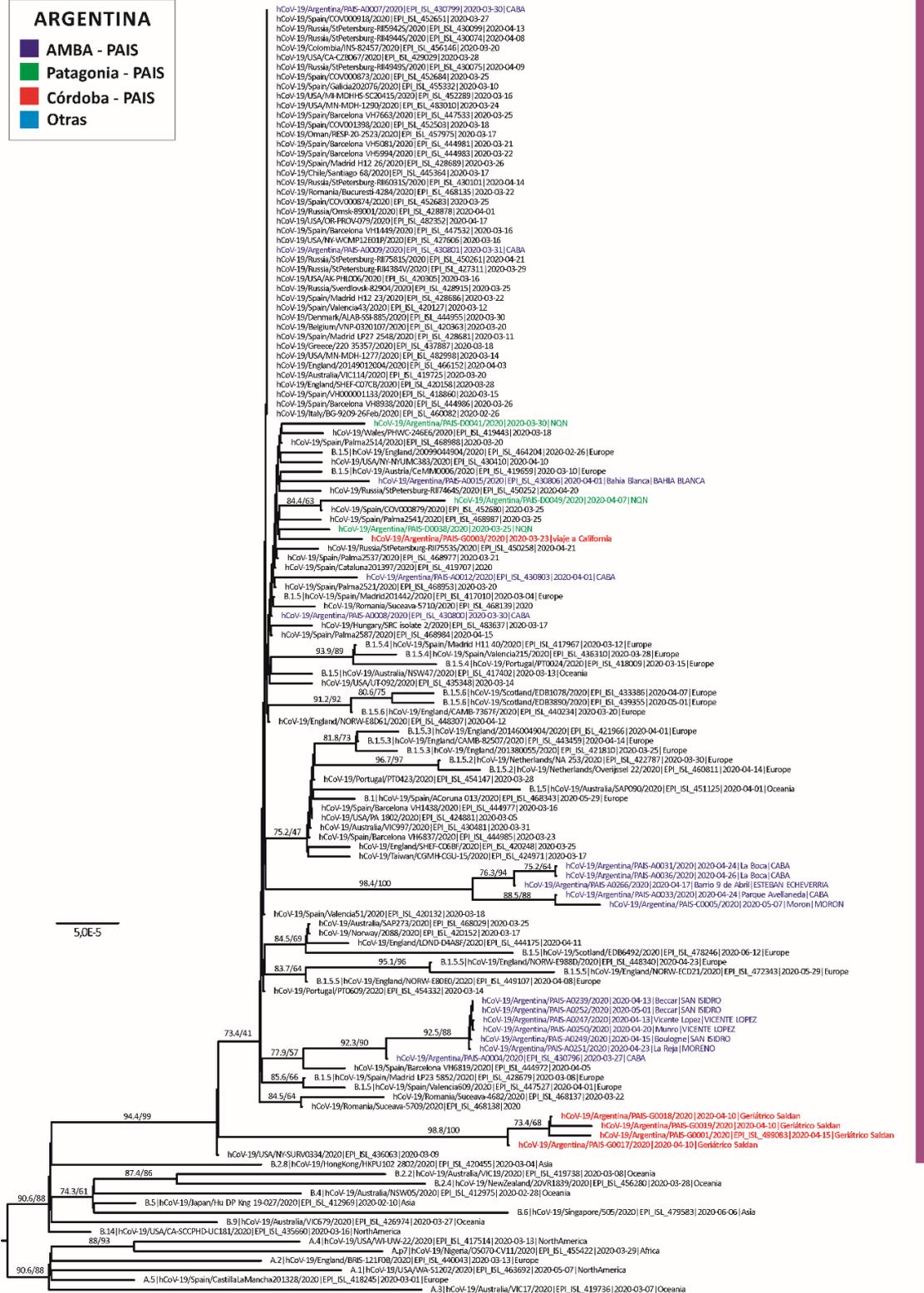


Figura 6. Árbol filogenético del linaje B.1.5 de SARS-CoV-2.

**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 Lic. Stephanie Goya, parte del Nodo Central del Consorcio).

Se analizaron los cebadores y sondas de los siguientes test:

- Protocolo de Charité, Berlín. Genes reconocidos: E y RdRp  
([https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2))
- Protocolo de The University of Hong Kong. Genes reconocidos: N y RdRp.  
([https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73\\_4](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 reconocidos: ORF1ab y N  
([http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.html](http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/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](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 reconocido: N  
([https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/method-niid-20200123-2.pdf?sfvrsn=fbf75320\\_7](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/method-niid-20200123-2.pdf?sfvrsn=fbf75320_7))
- Protocolo de Institut Pasteur, Paris. Genes reconocidos: 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](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))
- Protocolo de KiCqStart de Sigma-Aldrich. Gen reconocido: S  
(<https://www.sigmaldrich.com/covid-19/main-es.html>)

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 el Ing. Ezequiel Sosa. Se registraron las mutaciones encontradas en los genomas cordobeses reportados en este informe con respecto a la cepa de referencia hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019:

- Mutaciones en los cebadores y sondas del protocolo de The University of Hong Kong: En 6 genomas se detectó la mutación t29148c localizada en la región de detección del cebador sentido del gen N.
- Mutaciones en los cebadores y sondas del protocolo CDC China: En 9 genomas se detectó la mutación ggg28881-28883acc localizada en la región de detección del cebador sentido gen N.

Cabe aclarar que la presencia de estas mutaciones no implica necesariamente una disminución 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 las secuencias del GBA

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. Todos los genomas de SARS-CoV-2 poseen las mutaciones Spike/D614G -previamente asociada a una mayor infectividad in vitro- (*Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus, Cell, 2020, ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>*) y NSP12 (RdRp)/P323L -con un potencial poder mutagénico mayor del SARS-CoV-2 por estudios bioinformáticos- (Eskier D, Karakulah G, Suner A, Oktay Y. 2020. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. PeerJ 8:e9587 <https://doi.org/10.7717/peerj.9587>). **Sin embargo, no se ha demostrado aún su relevancia in vivo.** Estas mutaciones son características del linaje B.1 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.

Al analizar las 22 secuencias de Córdoba, se observó que 4 de ellas -todas vinculadas al brote del geriátrico de Saldán- mostraban un cambio en la posición nucleotídica 26.152 del gen ORF3A que se traduce en un codón stop prematuro en la posición 254 de la proteína accesoria NS3. Esto resulta en una proteína 21 aminoácidos más corta. NS3 es la más grande de las proteínas accesorias de SARS-CoV-2, y se postula que cumple un rol esencial para la replicación del virus (*Lu W, Xu K, Sun B. SARS Accessory Proteins ORF3a and 9b and Their Functional Analysis. Molecular Biology of the Sars-coronavirus:167-175.*). Sus funciones incluyen la formación de canales de potasio involucradas en la liberación de partículas virales, la regulación positiva de la expresión de fibrinógeno en las células epiteliales del hospedador, y la inducción de apoptosis, entre otras. (*Ren, Y., Shu, T., Wu, D. et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. Cell Mol Immunol 17, 881–883 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0485-9>*). Si bien se desconoce la importancia del cambio genotípico a nivel biológico, es evidente que el virus mantiene su capacidad replicativa y su infectividad, ya que la mutación es compartida por 4 casos con nexo epidemiológico. La detección de la mutación NS3\_G254 STOP en Córdoba representa el primer reporte de este cambio en virus SARS-CoV-2 de Argentina. Sin embargo, el mismo cambio se había reportado previamente en 19 secuencias de India (10), USA (5), Inglaterra (3), y Bangladesh (1). Su frecuencia en la base de datos GISAID es de 0,09%. Interesantemente, observamos que estas mismas 4 secuencias de SARS-CoV-2 pertenecientes al brote del geriátrico de Saldán mostraban un cambio en ORF6 (NS6\_L35F), único entre nuestras secuencias y entre 20.227 secuencias de SARS-CoV-2 que al día 11 de Agosto mostraron al menos un cambio aminoacídico respecto a la referencia Wuhan-Hu-1 según el análisis realizado con el software CovGLUE (<http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk/#/home>). La presencia de dos mutaciones de muy baja frecuencia en los mismos genomas sugiere fuertemente un evento de co-evolución.

En una de las secuencias de SARS-CoV-2 proveniente de una mujer de 71 años oriunda de la ciudad cordobesa de Bell Ville se observó una delección de 15 nucleótidos en la región genómica NSP1 del ORF1ab. Esta delección genómica se traduce en la ausencia de 5 aminoácidos en la proteína accesoria NSP1 entre las posiciones 82 y 86. En las bases de datos GISAID, las delecciones en esta región de la proteína NSP1 o “leader protein” no son infrecuentes, sugiriendo una alta plasticidad de la proteína NSP1 sin efectos deletéreos sobre su funcionalidad.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se observaron al menos 16 introducciones independientes del SARS-CoV-2 a la provincia de Córdoba y en todos los casos, excepto en el brote de la Ciudad de Villa Dolores, se pudo descartar una asociación con otras secuencias de Argentina. Esto es compatible con la información epidemiológica relevada para las muestras incluidas en el estudio, provenientes mayoritariamente de individuos con antecedentes de viaje al extranjero.

Todas las secuencias corresponden al linaje B.1 o sus derivados, lo que es compatible con la amplia distribución que presenta a nivel mundial y es congruente con lo observado anteriormente para Argentina y para la mayoría de los países de América del Sur.

La distribución de linajes observada en la provincia de Córdoba difiere de la hallada previamente para la CABA que presentó una mayor proporción de muestras con linaje B.1.3, mientras que éste fue minoritario en la provincia de Córdoba durante el período estudiado.

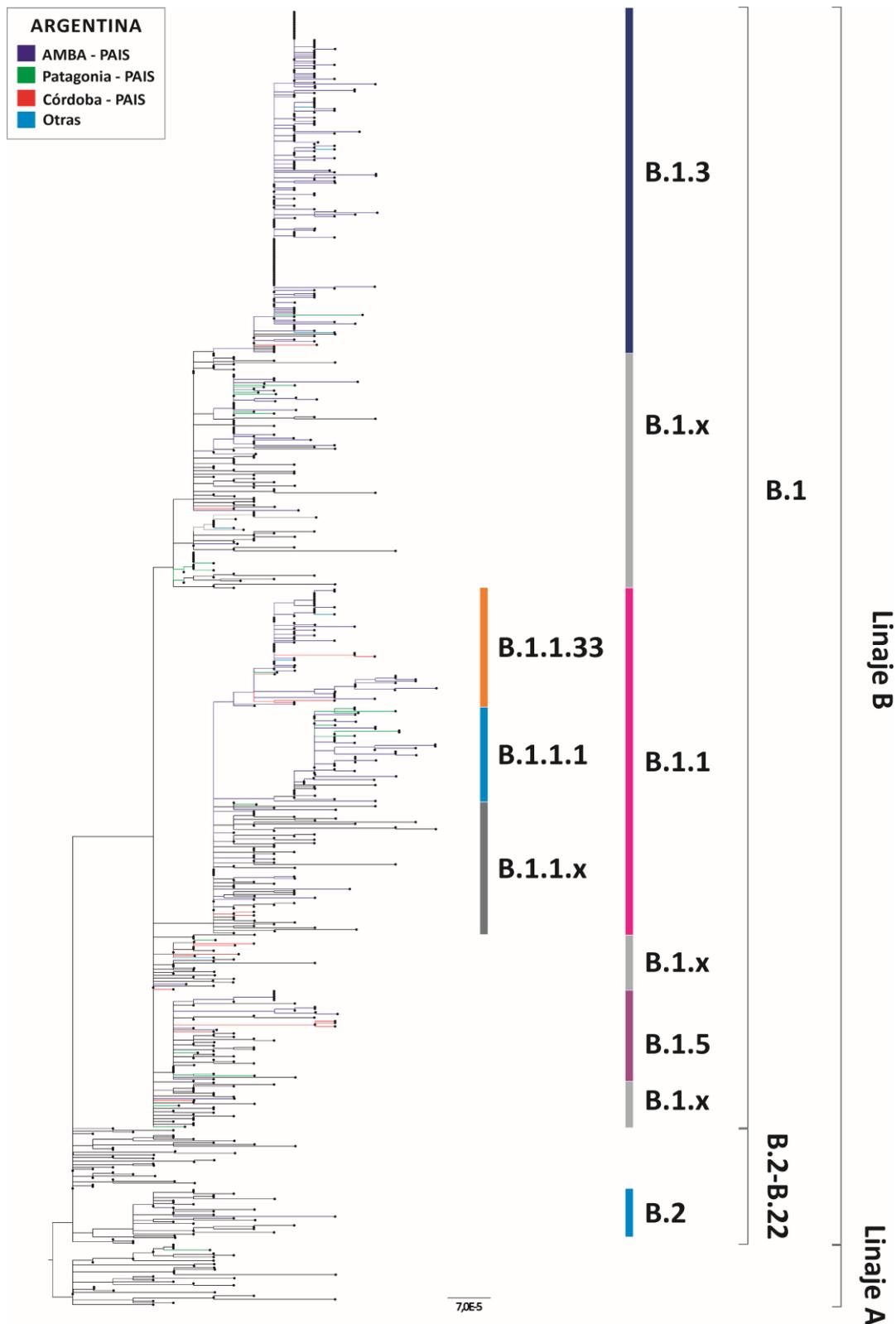
Para los dos brotes analizados se constató un origen viral único asociado con los linajes B.1.1.33 y B.1.5. Se requiere información de muestras relacionadas con los primeros casos para estudiar con mayor profundidad su origen y diversificación, como muestras más recientes para estudiar su posible establecimiento en la población de la provincia de Córdoba.

Dentro del linaje B.1.5, las 4 secuencias de SARS-CoV-2 pertenecientes a individuos del geriátrico de Saldán presentaban cambios únicos que podrían impactar en sus características biológicas. Sin embargo, por el momento solo revisten como hallazgos de vigilancia epidemiológica molecular y serán analizados en los siguientes períodos para estudiar su posible relevancia en nuestra población. Estos hallazgos y su relevancia merecen ser confirmados y estudiados en más detalle en estudios funcionales posteriores.

## 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 (entre 10-20 hits por secuencia query, contra la base de datos de GISAID al 21-07-2020). 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>) de acuerdo con criterio de Información Bayesiano y 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>). Se utilizaron los métodos de Ultrafast bootstrap Approximation (10000 réplicas) (Hoang y col., 2018, <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>) y SH-like approximate likelihood ratio test (1000 réplicas) (Guindon et al., 2010, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>) como métodos para evaluar la confiabilidad. En las ramas de los árboles (Figuras 2-6) se indican los valores de SH-like/UFB para los grupos relevantes.



**Figura suplementaria 1.** Árbol filogenético de linajes de SARS-CoV-2, construido como se indica en el texto del Anexo. El árbol se enraizó entre los linajes A y B. Con corchetes y barras se indican los (sub)linajes derivados del linaje B.

## 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 de la provincia de Córdoba, 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 y complementar del trabajo interdisciplinario colaborativo. Asimismo, muestra la posibilidad de tener centros de secuenciación genómica descentralizados en distintas regiones del país que 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 Minlon, Equipo NextSeq (Unidad de Investigación Traslacional, HNRG)

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 Minlon

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, Guido König.

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.

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

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 Marcone, 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 / IQUIBICEN 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