

24 de agosto de 2020

INFORME TÉCNICO N° 4

Actualización de la epidemiología genómica de los casos de SARS-CoV-2 detectados en departamentos de frontera con Brasil durante el mes de julio de 2020

El presente informe es el producto del trabajo colaborativo entre varios grupos de científicos pertenecientes a instituciones nacionales y al Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz de Río de Janeiro, Brasil. En este informe presentamos una actualización de la epidemiología molecular de los casos de SARS-CoV-2 en las ciudades de frontera con Brasil durante el mes de julio de 2020.

Instituciones y grupos participantes

Institut Pasteur de Montevideo

- Unidad de Bioinformática

Sanatorio Americano

- Laboratorio de Biología Molecular

Universidad de la República-CENUR Litoral Norte-Sede Salto

- Unidad de Genómica y Bioinformática
- Laboratorio de Virología Molecular

Universidad de la República-CURE Este-Sede Rocha

- Laboratorio de Ecología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

- Departamento de Genómica

Campus Tacuarembó: INIA-Udelar-MGAP

- Laboratorio mixto DILAVE/MGAP-INIA-Udelar

Instituto Asistencial Colectivo (IAC) Treinta y Tres

Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - Rio de Janeiro – Brasil

- Laboratorio de AIDS e Inmunología Molecular

RESULTADOS

1. Clasificación primaria y metadatos de las secuencias

En el presente informe se analizaron 19 nuevas secuencias de SARS-CoV-2 de pacientes diagnosticados en las ciudades de Treinta y Tres, Rivera, Bella Unión, Artigas, Caraguatá, Río Branco, Chuy y Salto entre el 1 y el 27 de julio (**Tabla 1**). Entre las muestras analizadas se encuentran las secuencias virales de casos importados de Brasil detectados en las ciudades de Artigas y Caraguatá, así como de dos inmigrantes diagnosticados en Rivera y Chuy.

Tabla 1. Descripción de las muestras, su clasificación filogenética y la tecnología de secuenciación utilizada para la secuenciación.

ID	Laboratorio	Ciudad	Ct¹	Fecha	Clasificación²	Tecnología
M130	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	27	01/07	B.1.1.33	Minion
M132	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	24	01/07	B.1.1.33	Minion
M133	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	21	01/07	B.1.1.33	Minion
M135	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	18	02/07	B.1.1.33	Minion
M136	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	20	02/07	B.1.1.33	Minion
M166	Campus Tacuarembó	Caraguata (viaje Brasil)	22	06/07	B.1.1.33	Minion
M167	Campus Tacuarembó	Caraguata (viaje Brasil)	21	06/07	B.1.1.33	Minion
M119	Sanatorio Americano	Rivera	25	19/07	B.1.1.33	Minion
M154	CENUR Litoral Norte	Rivera	17	22/07	B.1.1.33	Minion
M155	CENUR Litoral Norte	Rivera	15	22/07	B.1.1.33	Minion
M170	Campus Tacuarembó	Rivera (Venezuela)	16	20/07	B.1.1.28	Minion
M146	CENUR Litoral Norte	Artigas (viaje Brasil)	12	08/07	B.1.1.28	Minion
M107	Sanatorio Americano	Artigas	27	09/07	B.1.1.28	Minion
M151	CENUR Litoral Norte	Bella Union	16	21/07	B.1.1.28	Minion
M152	CENUR Litoral Norte	Bella Union	15	22/07	B.1.1.28	Minion
M163	CENUR Litoral Norte	Bella Union	14	27/07	B.1.1.28	Minion
M157	CENUR Litoral Norte	Salto	25	24/07	B.1.1.28	Minion
M100	CURE Rocha	Chuy (Cuba)	18	17/07	B.1.1.28	Minion
M116	Sanatorio Americano	Río Branco	28	17/07	B.1.1.28	Minion

¹ Ct: ciclos de PCR en los que aparece señal del genoma viral estadísticamente significativa. A menor cantidad de ciclos, mayor carga viral en la muestra original. ² Clasificación genética usando el programa Pangolin (<https://github.com/hCoV-2019/pangolin>).

2. Análisis filogenético

La clasificación genética de las secuencias de SARS-CoV-2 por el programa Pangolin (<https://github.com/hCoV-2019/pangolin>) indicó que las secuencias virales pertenecían a los dos linajes B.1.1 mas prevalentes en Brasil:

- A)** 10 secuencias de Treinta y Tres, Rivera y Caraguatá pertenecen al linaje B.1.1.33 anteriormente descrito en los brotes de Rivera (mayo-junio 2020) y Treinta y Tres (junio 2020).
- B)** 9 secuencias de Artigas, Bella Unión, Rivera, Río Branco, Chuy y Salto pertenecen al linaje B.1.1.28 descrito por primera vez en Uruguay.

Para investigar si las cepas B.1.1.28 y B.1.1.33 detectadas en Uruguay corresponden a las mismas redes de transmisión o si son el producto de múltiples introducciones virales independientes, realizamos un análisis filogenético de Máxima Verosimilitud con todas las secuencias de Brasil y con secuencias de Rivera y Treinta y Tres (anteriormente secuenciadas) que componen esos clados. El análisis filogenético nos permite observar que las muestras de SARS-CoV-2 B.1.1.33 corresponden a cuatro introducciones virales independientes desde Brasil (**Figura 1**) mientras que las muestras de SARS-CoV-2 B.1.1.28 corresponden a cinco introducciones virales independientes desde Brasil (**Figura 2**).

En la **Figura 3** se presenta una visión mas detallada de cada una de las introducciones:

- A)** Todas las muestras de Treinta y Tres diagnosticadas los primeros días de julio pertenecen a la misma cadena de transmisión B.1.1.33 asociada al brote detectado el 18 de junio en esa ciudad.
- B)** Tres secuencias (casos de transmisión local) detectadas en la ciudad de Rivera entre los días 19 y 22 de julio pertenecen a una cadena de transmisión del clado B.1.1.33 diferente (denominada RIV-II) a la cadena que generó el brote de mayo y junio (denominada RIV-I). Los virus de las cadenas RIV-I y RIV-II se originaron a partir de virus relacionados que circulan en Rio Grande do Sul y que comparten una misma mutación sinapomorfica entre ellos.
- C)** Las secuencias detectadas en las ciudades de Artigas (inicio de julio) y Bella Unión (finales de julio) corresponden a introducciones independientes del clado B.1.1.28 en el departamento de Artigas. Uno de los casos de la ciudad de Artigas corresponde a un individuo que viajó a Porto Alegre y parece haber transmitido el virus a por lo menos otro individuo de la ciudad de Artigas. Todos los casos detectados en Bella Unión entre el 21 y el 27 de julio pertenecen a una misma cadena de transmisión así como un caso detectado en el departamento de Salto el día 24 de julio.
- D)** El caso detectado en Cerro Largo el día 17/07 y los casos importados detectados en inmigrantes que llegaron al Chuy el 17/07 y Rivera el 20/07 corresponden a distintas introducciones del clado B.1.1.28
- E)** Las dos secuencias de Caraguatá obtenidas de personas que llegaron a Uruguay desde la ciudad de Buzios, estado de Rio de Janeiro están relacionadas con variantes B.1.1.33 detectadas en Río de Janeiro, consistente con la información epidemiológica del registro de viaje.

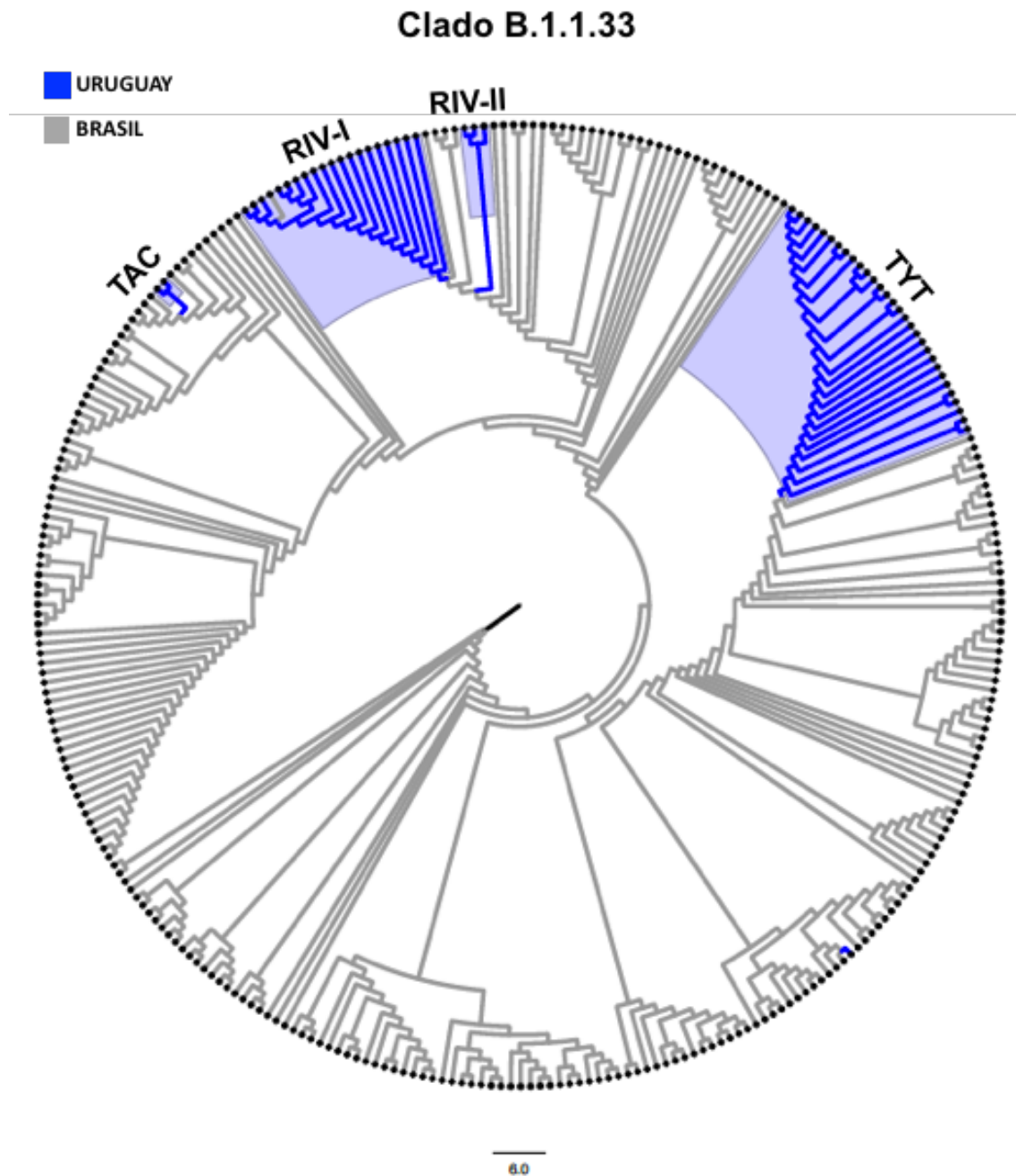


Figura 1. Árbol filogenético de 307 secuencias de SARS-CoV-2 del clado B.1.1.33 identificadas en Brasil y Uruguay. El color de las ramas se corresponde con el país de diagnóstico, como se indica en la leyenda arriba a la izquierda. Los clados uruguayos formados por las cepas de las ciudades de Rivera (RIV-I y RIV-II), Treinta y Tres (TYT) y Caraguatá (TAC) se resaltan con recuadros.

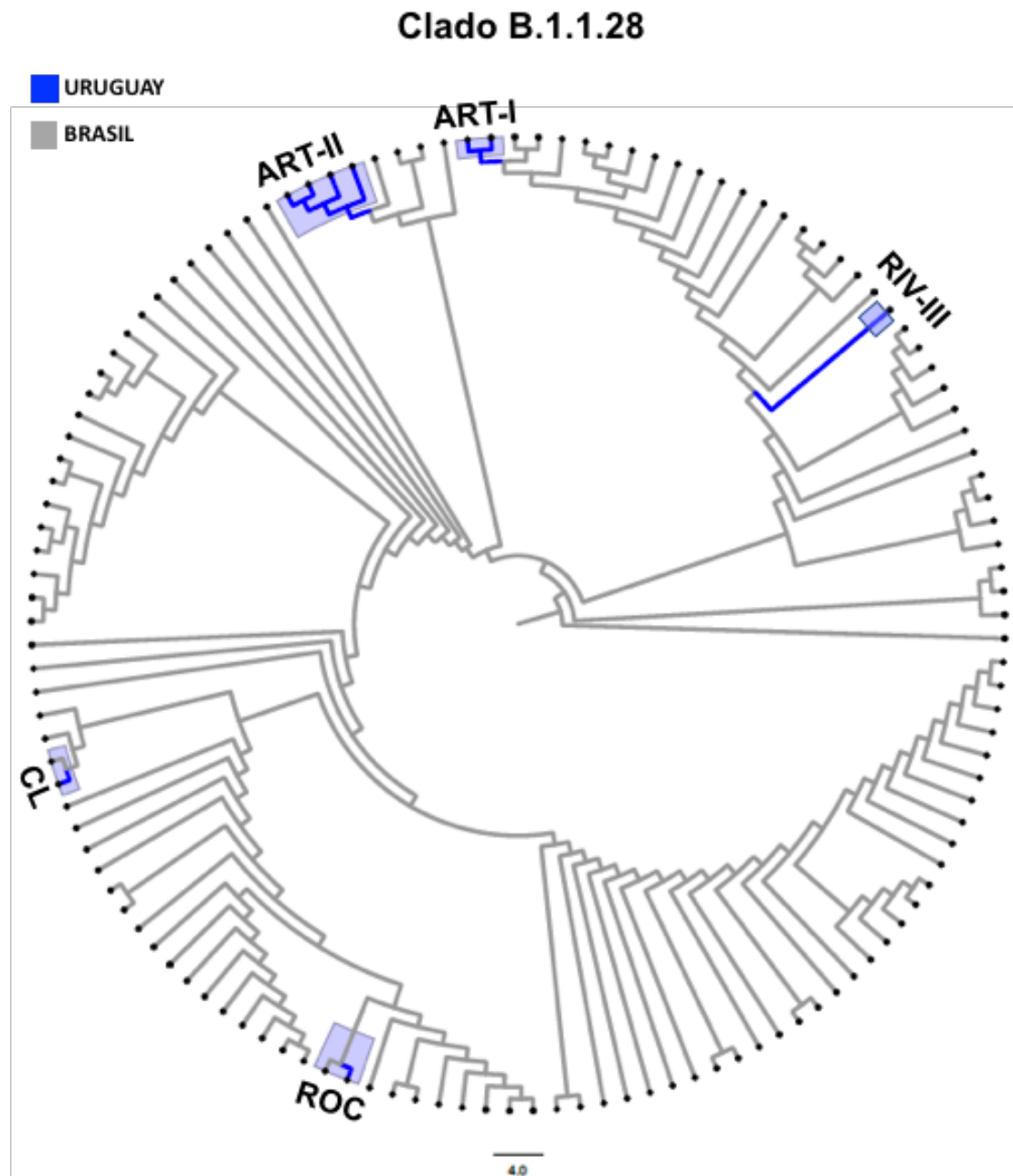


Figura 2. Árbol filogenético de 129 secuencias de SARS-CoV-2 del clado B.1.1.28 identificadas en Brasil y Uruguay. El color de las ramas se corresponde con el país de diagnóstico, como se indica en la leyenda arriba a la izquierda. Los clados uruguayos formados por las cepas de las ciudades de Artigas (ART-I), Bella Unión (ART-II), y las secuencias detectadas en Rivera (RIV-III), Río Branco (CL) y Chuy (ROC) se resaltan con recuadros.

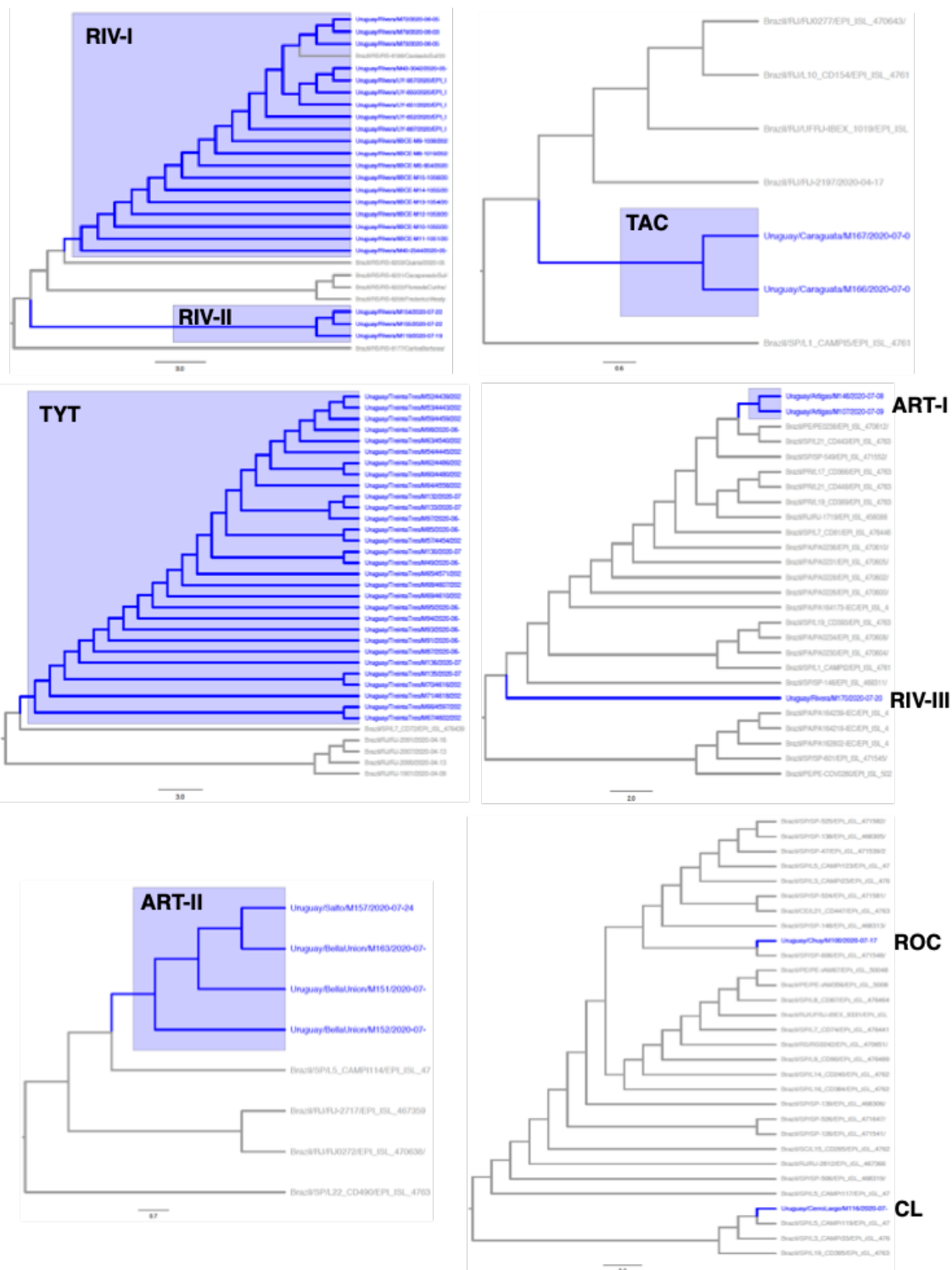


Figura 3 Imagen ampliada de los linajes de SARS-CoV-2 uruguayos y las secuencias brasileras más relacionadas identificados en los árboles filogenéticos de la Figuras 1 y 2. A la izquierda se representan los linajes con evidencias de transmisión comunitaria y a la derecha virus asociados a introducciones esporádicas o con transmisión local limitada.

CONCLUSIONES

- Las 29 nuevas secuencias de Rivera, Treinta y Tres, Artigas, Bella Unión, Cerro Largo, Chuy, Caraguatá y Salto identificadas en el mes de julio pertenecen a nueve introducciones independientes de los linajes B.1.1 de alta prevalencia en Brasil: cinco introducciones del linaje B.1.1.28 y cuatro introducciones del linaje B.1.1.33.
- De las nueve introducciones independientes al menos cuatro se transmitieron localmente: dos introducciones del linaje B.1.1.33 Rivera, una introducción del linaje B.1.1.33 en Treinta y Tres y una introducción del linaje B.1.1.28 en Bella Unión.
- Este es el primer registro oficial de introducción y diseminación local del linaje B.1.1.28 en Uruguay.
- Todas las nuevas muestras de SARS-CoV-2 de Treinta y Tres corresponden a la misma cadena de transmisión B.1.1.33 previamente identificada en junio.
- Tres nuevas secuencias de SARS-CoV-2 B.1.1.33 de Rivera detectadas en julio corresponden a una segunda cadena de transmisión local B.1.1.33 diferente a la cadena que originó el brote de mayo-junio. Los virus de ambas cadenas están relacionados a virus detectados en el estado de Rio Grande do Sul.
- Las muestras de SARS-CoV-2 de Artigas y Bella Unión analizadas en este informe se originaron a partir de dos introducciones independientes del linaje B.1.1.28 en el departamento de Artigas. La variante introducida en Bella Unión se dispersó localmente y también hacia el departamento de Salto.
- La única muestra analizada de Río Branco corresponde a un virus de la variante B.1.1.28 distinto al detectado en los otros departamentos. El análisis de otras muestras de este departamento sería necesario para confirmar la diseminación local de esta variante en Cerro Largo.
- Los casos importados de SARS-CoV-2 de Caraguatá, Rivera y Chuy corresponden a introducciones independientes de los linajes B.1.1.28 y B.1.1.33 en Uruguay.
- Esta información confirma la gran permeabilidad de la frontera Uruguay-Brasil y la frecuente introducción de variantes de SARS-CoV-2 en Uruguay desde Brasil.
- Estos resultados sugieren que los brotes detectados en Rivera y Bella Unión en el mes de agosto pueden ser resultado de la transmisión comunitaria de los clados RIV-II y ART-II detectados en julio, respectivamente, o de la introducción de nuevas variantes virales en estas ciudades.
- Implementar una vigilancia epidemiológica y molecular en tiempo real que permita la detección precoz de casos importados y de brotes locales es fundamental para mantener el control de la epidemia de SARS-CoV-2 en la región de frontera con Brasil.

CONCLUSIONES GENERALES

Todo esto sugiere que una diversidad cada vez mayor de variantes virales, está llegando al Uruguay desde Brasil.

METODOLOGIA

1. Secuenciación

Varios grupos de investigación a nivel mundial se encuentran realizando la caracterización de las cepas circulantes de SARS-CoV-2 mediante la tecnología de secuenciación Oxford Nanopore Technologies (ONT). ONT se caracteriza por la generación de secuencias largas, presentar protocolos de secuenciación sencillos y rápidos, tener un costo del equipo de secuenciación extremadamente bajo y por ser un instrumento muy pequeño y portable. Estas características hacen que esta tecnología se utilice en situaciones de brotes virales. En particular, la red ARTIC (ARTIC network <https://artic.network>), tiene como objetivo el desarrollo de un sistema basado en MinION (uno de los equipos de ONT) para procesar muestras de brotes virales y generar información epidemiológica en tiempo real que sea interpretable y procesable por los organismos de salud pública. En el contexto de la actual epidemia, ARTIC desarrolló e hizo público un protocolo para el secuenciado del virus SARS-CoV-2 [<https://artic.network/ncov-2019>, <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-bbmuik6w>]. Dicho protocolo está siendo ampliamente utilizado a nivel mundial y ha sido utilizado con éxito en Uruguay [doi: 10.1101/2020.05.09.086223]. El protocolo se basa en la amplificación del virus utilizando cebadores que generan 98 amplicones de 400pb cada uno y que se superponen a lo largo del genoma viral. Esta estrategia permite secuenciar muestras con poca carga viral o con ARN degradado. Derivado de este protocolo también surgió otro que ha sido utilizado con éxito en Brasil que permite la secuenciación del virus utilizando menos amplicones pero más largos [doi: 10.1101/2020.04.30.069039]. La muestra que se toma para el proceso de secuenciado es el propio hisopado nasal que se utiliza para el diagnóstico por RT-qPCR. El ARN obtenido del hisopado se convierte en cDNA en una primera etapa, para luego aplicar el protocolo de secuenciación.

2. Análisis de datos

2.1 Ensamblado de genomas.

Los datos crudos provenientes del MinION se analizaron con el pipeline propuesto por el Laboratorio de Connor en la Universidad de Boston (<http://www.connorlab.com/>) y con adaptaciones realizadas por Ignacio Ferrés (<https://github.com/iferres/ncov2019-artic-nf>) del Laboratorio de Genómica Microbiana del Institut Pasteur de Montevideo. Los diferentes programas para los análisis están embebidos en un sistema de procesamiento llamado Nextflow [doi:[10.1038/nbt.3820](https://doi.org/10.1038/nbt.3820)], que permite correr de forma simple y automatizada los pasos necesarios para obtener las secuencias de los genomas. El resultado de este procesamiento es la secuencia consenso ensamblada de la variante viral de cada paciente y sus métricas de calidad asociadas (cobertura del genoma, porcentaje de bases sin información, etc).

2.2. Clasificación

La clasificación de los linajes se realizó con el software Pangolin (<https://github.com/hCoV-2019/pangolin>), que se basa en los linajes definidos por Rambaut et al (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.17.046086v1>).

2.3 Análisis filogenéticos.

Para evaluar la epidemia de SARS-CoV-2 en Uruguay dentro de un contexto regional y global e inferir rutas de entrada a nuestro país, los análisis evolutivos incluyen además de las secuencias aquí generadas, subconjuntos representativos de las secuencias disponibles en la base de datos GISAID EpiCoV de los países de la región y del mundo [doi:[10.1002/gch2.1018](https://doi.org/10.1002/gch2.1018)]. Se incluyeron secuencias completas con > 90% de sitios sin ambigüedad y que tuvieran información de fecha completa (día-mes-año). Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v7 [doi: 10.1093/nar/gkf436] y se realizó un curado manual del alineamiento para corregir artefactos y regiones ambiguas. Se realizó un análisis filogenético por máxima verosimilitud (MV) utilizando el programa Fasttree v2.1. Los eventos de introducción de SARS-CoV-2 en Uruguay se definieron a través de la identificación de secuencias uruguayas que agrupan en el árbol de MV con secuencias de otros países. Los eventos de transmisión local se definieron a través de la identificación de grupos monofiléticos mayoritariamente compuestos

por secuencias uruguayas (>90%) en el árbol de MV. Los clusters monofiléticos locales y un subgrupo de secuencias globales relacionadas caracterizadas en el árbol de MV, se utilizaron para reconstruir la dinámica espacio-temporal de las transmisiones locales a través de inferencia filogenética bayesiana usando el modelo coalescente implementado en el paquete de software BEAST v1.10 [doi: 10.1093/ve/vey016].

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos particularmente al Laboratorio de Evolución Experimental de Virus a cargo de Gonzalo Moratorio, al Laboratorio de Genómica Microbiana a cargo de Gregorio Iraola y a la Unidad de Biología Molecular a cargo de Carlos Robello, todos del Institut Pasteur de Montevideo, por prestarnos sus instalaciones y compartirnos su experiencia, además de equipos, insumos plásticos y reactivos.

Agradecemos a las doctoras Gabriela Ortiz y Paula Aguerrebere del IAC, por su disposición y gran trabajo a la hora de contactar a los pacientes.