

REVISTA MÉDICA VALDECILLA

Importancia de la vigilancia activa en la detección de variantes de SARS-CoV-2: experiencia en el servicio de Microbiología

Mónica Gozalo Margüello, Silvia Velasco de la Fuente, Sergio García Fernández, Jesús Rodríguez Lozano, Inmaculada Concepción Pérez del Molino Bernal, Daniel Pablo Marcos, Jesús Agüero Balbín, Jorge Calvo Montes.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla – IDIVAL. Santander.

INTRODUCCIÓN

En un intento de poner orden en el universo viral, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) se encarga de clasificar a los virus en órdenes, familias, subfamilias, géneros y especies. Para llevar a cabo su trabajo, se basan en la comparación de las secuencias genéticas de cada nuevo miembro a incorporar.

Actualmente, se prefiere el uso del término linaje porque da una idea más dinámica que la de pertenecer a una estructura jerárquica estática. Un linaje, o variante, es una agrupación de secuencias asociadas a un suceso epidemiológico. La inclusión de un virus en un linaje depende de aspectos como el área geográfica en el que se disemina, la similitud de sus secuencias, el contenido en genes comunes y el conjunto de mutaciones que comparten, así como de las características estructurales de la partícula viral¹.

La pandemia provocada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, un ‘clado’ o subtipo dentro de la familia Coronaviridae (familia que recibe este nombre por la característica forma de las proteínas de su superficie), género Betacoronavirus, subgénero Sarbecovirus, especie virus relacionado con síndrome respiratorio agudo severo o SARS², ha provocado la generación de decenas de miles de secuencias genéticas del virus, permitiendo localizar cambios en su estructura que ayudan a predecir su evolución y la respuesta a tratamientos antivirales y a vacunas.

Actualmente hay publicadas más de 700.000 secuencias completas o parciales del virus en la base de datos de GISAID (<https://gisaid.org>) y este número continúa creciendo.

ESTRUCTURA MOLECULAR DEL SARS-COV-2

El SARS-CoV-2 es un virus ARN. La estructura del virus consiste en una nucleocápside y una envoltura externa. La nucleocápside protege el material genético del virus y es donde se encuentra la proteína N. En la envoltura externa se encuentran las 3 proteínas estructurales principales: la proteína S, la proteína E y la proteína M (**figura 1**). La proteína S (de spike, espícula en inglés) es la encargada de la unión del virus al ACE-2, receptor de la célula huésped. Es por tanto, una molécula clave en la entrada del virus en las células del ser humano y por ello es una de las dianas más importantes para el desarrollo de antivirales y vacunas. La proteína E (proteína de envoltura) participa en el ensamblaje y liberación del virus. Y la proteína M (proteína de membrana) mantiene la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside³.

Los genes que codifican estas proteínas (N, E y S), junto con los que codifican la polimerasa viral (ORF1a/ORF1b) son las dianas que habitualmente se emplean en los sistemas de diagnóstico molecular mediante RT-PCR para la detección de la COVID-19 en las muestras clínicas. Si bien la aparición de nuevas variantes de SARS-CoV-2, con modificaciones en estos genes, podrían ocasionar dificultades en su detección, la mayoría de las pruebas comerciales de PCR utilizan más de una diana genómica, por lo que resulta poco probable que no se detecten estos casos (falsos negativos).

VIGILANCIA GENÓMICA DEL SARS-COV-2

Durante la pandemia se han descrito numerosas variantes del SARS-CoV-2 que muestran diferencias

genéticas con la secuencia original del virus. Algunas de estas variantes son de interés para la Salud Pública, y en principio se denominan VUI (de sus siglas en inglés ‘variants under investigation’), las cuales pueden pasar a denominarse VOC (de sus siglas en inglés ‘variants of concern’) si se demuestra que pueden disminuir la efectividad de las vacunas o hacer que se prolongue la pandemia al favorecer la transmisibilidad del virus.

Al comienzo de la pandemia se constituyó en España el consorcio SeqCovid-Spain, liderado por el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), que cual está formado por una red de laboratorios en la que está incluido el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, a través del Servicio de Microbiología. El principal objetivo del consorcio es detectar de forma precoz la circulación de las diferentes variantes del virus mediante secuenciación genómica, y determinar la incidencia de dichas variantes en la población.

El envío sistemático, aleatorio, de muestras positivas para SARS-CoV-2 al IBV, así como al Centro Nacional de Microbiología (CNM), nos permite la caracterización clínico-epidemiológica de las variantes genéticas de SARS-CoV-2 que circulan en las distintas áreas geográficas de nuestro país, así como la identificación de las características fenotípicas y genotípicas que puedan influir en factores como la capacidad de transmisión o la efectividad de la vacuna⁴ (**tabla 1**).

VARIANTES DE INTERÉS

La principal mutación que apareció en los primeros meses fue la D614G en la proteína S que coexistió con la cepa original, siendo el origen del linaje B europeo que acabó desplazando a cepa original de Wuhan. A comienzos del verano de 2020 se describió una mutación en el gen S del virus, la A222V, que caracterizó a la variante 20A.EU1, procedente de España. Esta fue la causante de grandes brotes en Europa, convirtiéndose en la variante mayoritaria en ese momento (linaje B.1.177)⁵. Posteriormente se han ido describiendo diferentes mutaciones, siendo, hasta el momento actual, la N501Y y E484K las más relevantes, ya que están presentes en algunas de las variantes de interés. El hecho de que estén apareciendo de manera independiente en diferentes linajes parece indicar que confieren una ventaja adaptativa al virus. Continuamente se van describiendo nuevas variantes, aunque, por ahora, las principales variantes de preocupación pertenecen a los linajes B.1.1.7, B.1.351 y B.1.1.28.

Variante británica (Linaje B.1.1.7, 20I/501Y.V1 o VOC 202012/01)

El 14 de diciembre de 2020, Reino Unido declaró un aumento de la incidencia de SARS-CoV-2 en algunas regiones de su país asociada a una nueva variante del virus, que se ha denominado VOC 202012/01 o B.1.1.7, que parece conllevar una mayor transmisibilidad (es decir, una transmisión más eficiente y rápida) y, por ello, condicionar un aumento de la incidencia de casos de COVID-19, si bien los primeros informes no han encontrado evidencia que sugiera que la variante tenga algún impacto en la gravedad de la enfermedad o la eficacia de la vacuna^{6,13,14}.

La variante británica presenta 28 cambios en su genoma completo, cuando se compara con el virus Wuhan original, destacando 7 mutaciones y 2 delecciones en el gen S. La principal, la mutación N501Y, se sitúa en uno de los residuos de contacto de la proteína S con el receptor del virus ACE2. Una delección en las posiciones 69-70 en la proteína S se ha relacionado con escapes inmunitarios en pacientes inmunodeprimidos y con el aumento *in vitro* de la infectividad viral¹⁵. Esta delección afecta también a la sensibilidad de algunas técnicas moleculares (RT-PCR) que detectan únicamente el gen S7, lo cual supone una ventaja desde el punto de vista de la vigilancia epidemiológica ya que la ausencia de amplificación del gen S en muestras positivas para otras dianas es utilizado como cribado para detectar esta nueva variante.

La variante B.1.1.7 se ha detectado en varias Comunidades Autónomas españolas, incluida Cantabria, donde ya constituye más del 70% de las cepas analizadas de forma aleatoria (figura 2).

Variante sudafricana (Linaje B.1.351 o 20H/501Y.V2)

Esta variante tiene múltiples mutaciones en el gen S, incluidas K417N, E484K y N501Y. Pero, a diferencia del linaje B.1.1.7, esta variante no contiene la delección en la posición 69-70.

La variante B.1.351 se identificó por primera vez en Sudáfrica a principios de octubre de 2020, y en Zambia a fines de diciembre de 2020, momento en el que parecía ser la variante predominante en el país. Ya se han descrito casos en, al menos, 48 países. En España se han detectado dos casos esporádicos y 8 brotes que han implicado a 55 personas, 22 de los cuales se han confirmado por secuenciación⁸.

Actualmente no hay evidencia que sugiera que esta variante tenga algún impacto en la gravedad de la enfermedad, aunque existe alguna evidencia que indica que una de las mutaciones, la E484K, puede

afectar la neutralización por algunos anticuerpos polyclonales y monoclonales^{9,10}.

Variante brasileña (Linaje B.1.1.28, P1 o 20J/501Y-V3)

La variante P.1 es una rama del linaje B.1.1.28 descrita por primera vez por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas en Japón en cuatro viajeros procedentes de Brasil.

Esta variante contiene tres mutaciones en el dominio de unión al receptor de proteína S: K417T, E484K y N501Y.

Existe evidencia que sugiere que algunas de las mutaciones en la variante P.1 pueden afectar a su transmisibilidad y perfil antigenico, lo que puede modificar la capacidad de los anticuerpos generados a través de una infección natural previa o mediante la vacunación para reconocer y neutralizar el virus¹².

En Manaos, la ciudad más grande de la región amazónica, ya constituía el 42% de los especímenes secuenciados desde finales de diciembre¹¹. Actualmente, ya ha sido detectada en 26 países, incluida España con un total de 15 casos⁸.

Otras variantes

En España se ha detectado la circulación esporádica de otras variantes (P.2, B.1.525, P.1.429, C.16), sin embargo se desconoce cuál puede ser su repercusión en aspectos tales como la transmisibilidad o la evasión de la respuesta inmune. No obstante, la combinación de mutaciones que presentan o su expansión a nivel local en ciertas localizaciones hacen recomendable su seguimiento⁸.

SITUACIÓN EN CANTABRIA

Como ya se ha mencionado anteriormente, desde el comienzo de la pandemia se ha llevado a cabo una monitorización de las variantes circulantes en la región a través de la secuenciación de cepas de SARS-CoV-2 representativas de todos los ámbitos en los que se ha detectado el virus (centros de salud, servicios de urgencias, hospitalización en áreas COVID, UCI). Además, desde enero de 2021 se está realizando diariamente una búsqueda activa, entre los nuevos positivos, de la variante británica y, desde inicios de marzo, de la mutación E484K, presente en las variantes brasileña y sudafricana. Para la variante británica se está realizando un cribado previo a la secuenciación mediante una RT-PCR multiplex que tiene como dianas los genes ORF1, N y S. Una ausencia en la amplificación del gen S (S-gene Target Failure o SGTF) es altamente sugestivo de la presen-

cia de la variante B.1.1.7, aunque no exclusivo. Para detectar la mutación E484K se realiza una RT-PCR mediante la tecnología de discriminación alélica.

Desde el Servicio de Microbiología, y en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica, hemos adquirido el compromiso de secuenciar el 2% de todas las muestras por semana para conseguir el objetivo marcado por el Ministerio de Sanidad.

Por otra parte, y en el marco del proyecto SeqCOVID-Spain, se han enviado para su secuenciación un total de 697 muestras. De estas, 353 han sido procesadas y 294 (83.29%) han sido secuenciadas con éxito según el criterio de calidad mínimo establecido (se ha leído al menos el 90% del genoma del virus). En cuanto a las muestras enviadas al CNM, ya han sido procesadas 26 de las 45 muestras enviadas, y han sido secuenciadas con éxito 15 de esas 26 (57.7%).

Los datos obtenidos de esas secuencias nos han permitido ver la evolución de las diferentes variantes circulantes a lo largo de la pandemia. Así, podemos ver cómo durante la primera ola (marzo-mayo de 2020), además del linaje predominante B.1 ("brote italiano") se observaron otras muchas variantes menores (A, A.2, A.2.3, A.5, B.1.1.162, B.1.1.144, B.1.157, B.1.223). Posteriormente, a partir de junio de 2020, estas variantes fueron sustituidas por la B.1.177, hasta diciembre de 2020, momento en el que empieza a circular la variante B.1.1.7, que es en el momento actual la cepa mayoritaria circulante en Cantabria, detectándose en más del 70% de las muestras analizadas de forma aleatoria (**figura 3**).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de la vigilancia activa de las variantes circulantes de SARS-CoV-2 muestran la importancia de la vigilancia de infecciones emergentes así como del estudio de su evolución molecular y filogenética con el fin de definir e implementar rápidamente medidas de contención efectivas que intenten evitar la aparición de variantes de escape, responsables de la transmisión mantenida del virus.

BIBLIOGRAFIA

1. Rambaut A et al. A Dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol* 5, 1403-1407 (2020)
2. Walker PJ et al. Changes to virus taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses (2019). *Arch Virol* 164, 2417-2429 (2019)
3. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866(10):165878. doi:10.1016/j.bbadiis.2020.165878

4. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Circulación de VOC 202012/01 (B.1.1.7) y otras variantes de SARS-CoV-2 de interés para la salud pública en España. Evaluación Rápida de Riesgo, Madrid, 15 de enero 2021.
5. Hodcroft EB, Zuber M, Nadeau S, Crawford KHD, Bloom JD, Veesler D, Vaughan TG, Comas I, Candelas FG, Stadler T, Neher RA. Emergence and spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. medRxiv [Preprint]. 2020 Nov 27:2020.10.25.20219063. doi: 10.1101/2020.10.25.20219063.
6. Public health England. Investigation of novel SARS-CoV-2 variant Variant of Concern 202012/01. Technical briefing 4 [Internet]. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/952490/Variant_of_Concern_VOC_202012_01_Technical_Briefing_4_England.pdf
7. Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England | medRxiv [Internet]. [citado 13 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.24.20248822v1>
8. Actualización de la situación epidemiológica de las variantes de importancia en salud pública enEspaña. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20210312.pdf
9. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. 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 [Internet]. 22 de diciembre de 2020 [citado 19 de enero de 2021]; 2020.12.21.20248640. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.21.20248640>
10. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, Lambson BE, de Oliveira T, Vermeulen M, van der Berg K, Rossouw T, Boswell M, Ueckermann V, Meiring S, von Gottberg A, Cohen C, Morris L, Bhiman JN, Moore PL. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. Nat Med. 2021 Mar 2. doi: 10.1038/s41591-021-01285-x.
11. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings [Internet]. Virological. 2021 [citado 13 de enero de 2021]. Disponible en: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586?s=08>
12. Wang P, Wang M, Yu J, Cerutti G, Nair MS, Huang Y, Kwong PD, Shapiro L, Ho DD. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. bioRxiv [Preprint]. 2021 Mar 2:2021.03.01.433466. doi: 10.1101/2021.03.01.433466.
13. Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England [Internet]. CMMID Repository. 2020 [citado 22 de enero de 2021]. Disponible en: <https://cmmid.github.io/topics/covid19/uk-novel-variant.html>
14. Shi PY, Xie X, Zou J, Fontes-Garfias C, Xia H, Swanson K, Cutler M, Cooper D, Menachery V, Weaver S, Dermotter P. Neutralization of N501Y mutant SARS-CoV-2 by BNT162b2 vaccine-elicited sera. Res Sq [Preprint]. 2021 Jan 13:rs.3.rs-143532. doi: 10.1203/rs.3.rs-143532/v1.
15. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, Duprex WP. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. Science. 2021 Mar 12; 371(6534):1139-1142. doi: 10.1126/science.abf6950.

INFORMACIÓN ADICIONAL

Figura 1: Representación esquemática del SARS-CoV-2 (Naqvi AAT et al.)

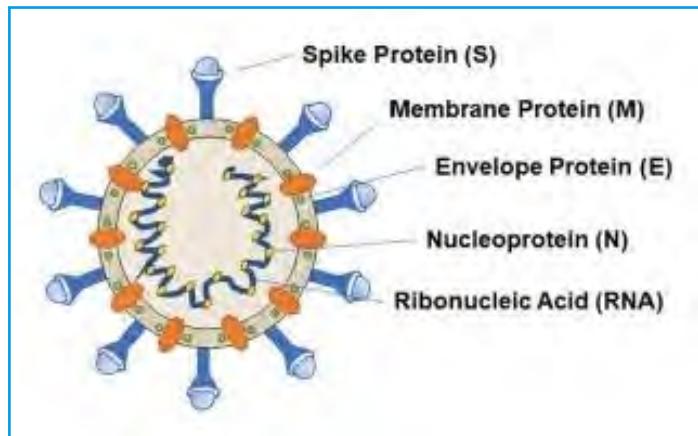
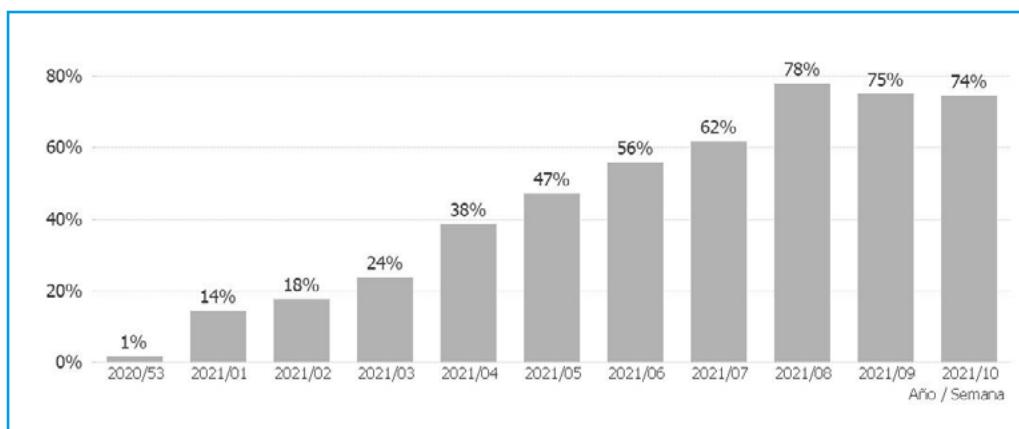
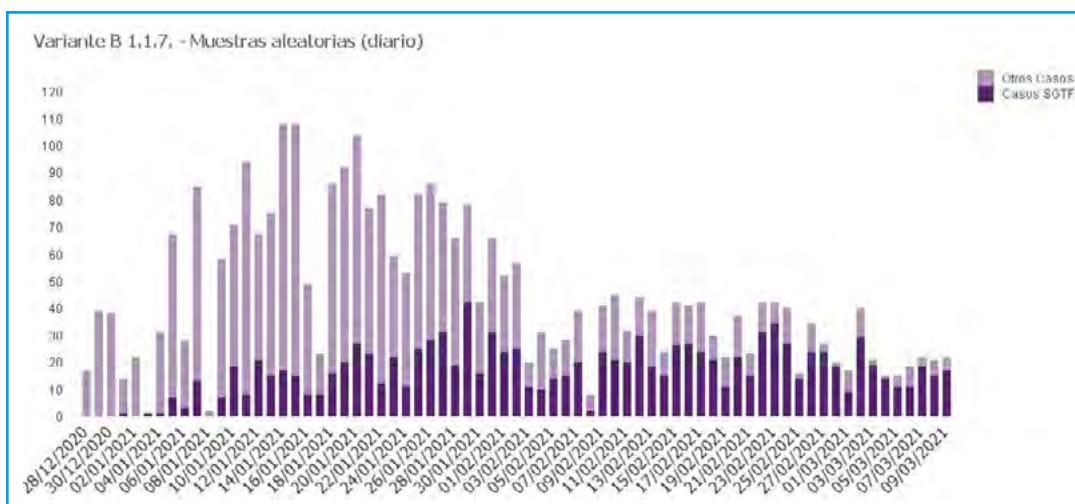


Figura 2: Porcentaje de casos con S-gene target failure (SGTF) de muestras aleatorias en Cantabria**Figura 3: Evolución de la variante B.1.1.7 en Cantabria****Tabla 1: ¿Por qué la vigilancia de variantes se SARS-CoV-2 es importante para la salud pública?**

Aumento en la transmisibilidad: aumento en el número de casos y por lo tanto en la presión sobre el sistema asistencial.
Aumento en la gravedad y/o letalidad
Disminución de la susceptibilidad a agentes terapéuticos
Escape a la respuesta inmune adquirida tras infección natural o generada por algunas vacunas y respuesta a anticuerpos monoclonales.
Descenso en la efectividad de las medidas de salud pública de prevención y control, o de las técnicas diagnósticas y terapéuticas disponibles