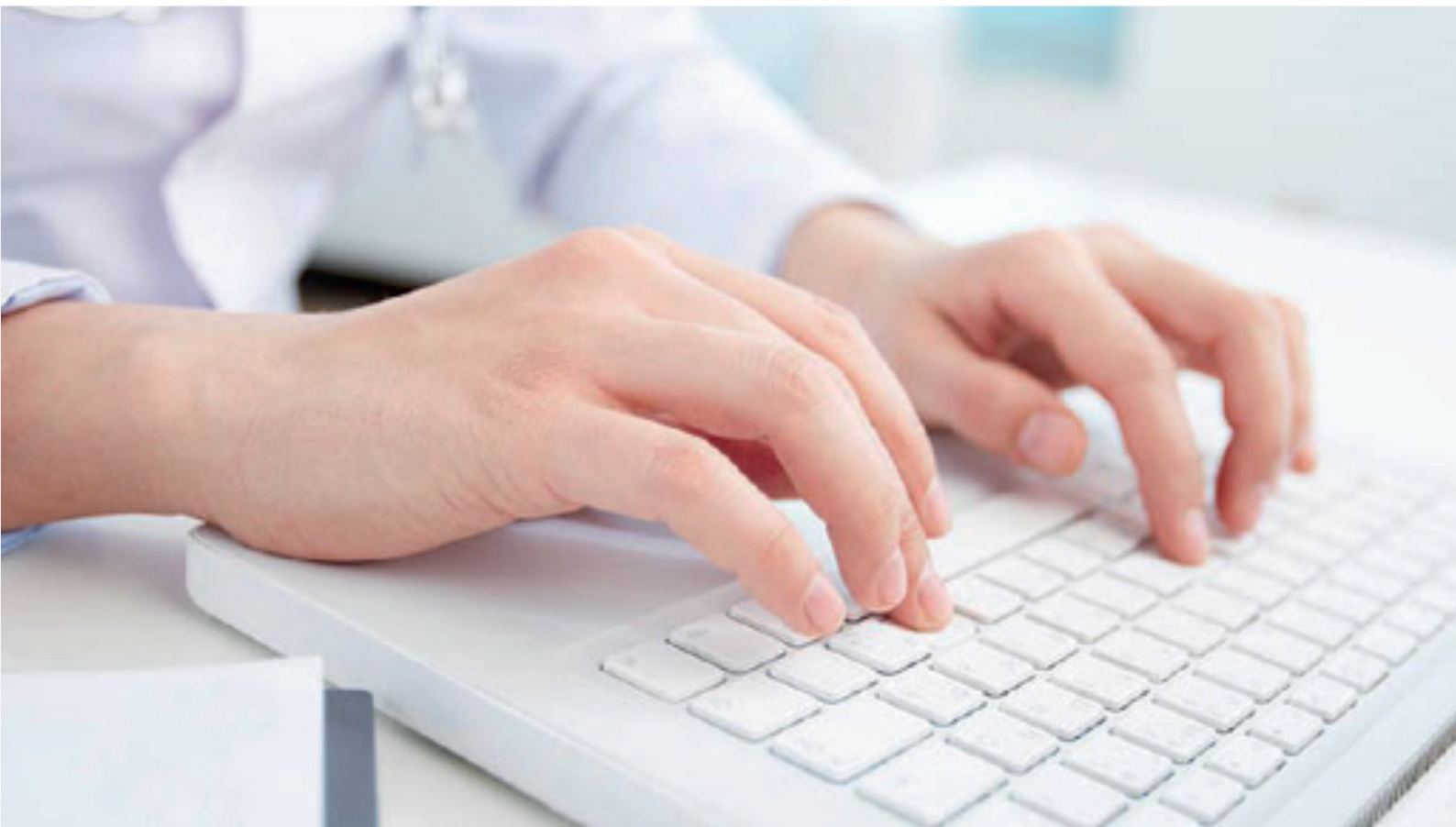


INFORME TÉCNICO N° 3:

**ACTUALIZACIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA  
GENÓMICA DE LOS BROTES DE  
SARS-COV-2 EN RIVERA Y TREINTA Y TRES,  
URUGUAY**





## INFORME TÉCNICO N° 3: 21 | 07 | 2020

# ACTUALIZACIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA GENÓMICA DE LOS BROTES DE SARS-COV-2 EN RIVERA Y TREINTA Y TRES, URUGUAY

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 brotes de SARS-CoV-2 en las ciudades de Rivera y Treinta y Tres.

### 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

#### 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 14 nuevas secuencias de SARS CoV-2: cinco obtenidas de pacientes diagnosticados en el departamento de Rivera entre el 21 de mayo y el 5 de junio, y nueve obtenidas de pacientes diagnosticados en el departamento de Treinta y Tres entre el 18 y el 28 de junio de 2020 (Tabla 1). Las mismas fueron combinadas con otras secuencias ya disponibles de estos departamentos resultando en un total de 19 secuencias virales provenientes de Rivera entre el 5 de mayo y el 5 de junio, y 25 secuencias provenientes de



Treinta y Tres entre el 18 y el 28 de junio. Entre las muestras analizadas se encuentran las secuencias virales de los primeros individuos diagnosticados (**Paciente 0**) en Rivera (5 de mayo de 2020) y Treinta y Tres (18 de junio de 2020).

## Tabla 1

### Descripción de las muestras, su clasificación filogenética y la tecnología de secuenciación utilizada para la secuenciación

ID	Laboratorio	Ciudad	Ct <sup>1</sup>	Fecha	Clasificación <sup>2</sup>	Tecnología
M8	CENUR Litoral Norte-UdelaR	Rivera	20	21/05	B.1.1	Minion/IonTorrent
M9	CENUR Litoral Norte-UdelaR	Rivera	26	21/05	B.1.1	IonTorrent
M72	Campus Tacuarembó	Rivera	12.9	05/06	B.1.1	Minion
M73	Campus Tacuarembó	Rivera	27.8	05/06	B.1.1	Minion
M79	CENUR Litoral Norte-UdelaR	Rivera	22.1	03/06	B.1.1	Minion
<b>M49</b>	Sanatorio Americano	Treinta y Tres		18/06	B.1.1	Minion
M85	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	37.2	22/06	B.1.1	Minion
M87	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	19.2	25/06	B.1.1	Minion
M91	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	17.8	26/06	B.1.1	Minion
M93	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	22.1	26/06	B.1.1	Minion
M94	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	25.9	27/06	B.1.1	Minion
M95	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	31.9	27/06	B.1.1	Minion
M97	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	19.7	28/06	B.1.1	Minion
M98	Sanatorio Americano	Treinta y Tres	26.8	28/06	B.1.1	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>). En rojo está marcada la secuencia del Paciente 0 de Treinta y Tres.



## 2. Análisis filogenético

La clasificación genética de las secuencias de SARS-CoV-2 de Rivera y Treinta y Tres por el programa Pangolin (<https://github.com/hCoV-2019/pangolin>) indicó que todas las secuencias virales pertenecían al linaje B.1.1, el mismo previamente encontrado en las muestras de estos departamentos. El análisis genético permitió comprobar que todas las nuevas secuencias uruguayas tienen las dos mutaciones aminoacídicas características del clado prevalente en Brasil (B.1.1.BR): una mutación en la proteína de la Nucleocápside y otra en la proteína ORF6.

Para investigar si las cepas B.1.1.BR obtenidas a partir de las nuevas muestras de Rivera y Treinta y Tres corresponden a las mismas redes de transmisión previamente detectadas en estos departamentos o si son el producto de nuevas introducciones virales independientes del clado B.1.1.BR en Uruguay, realizamos un análisis filogeográfico bayesiano con todas las secuencias de Sudamérica que componen este clado. El análisis filogeográfico nos permite observar que todas las nuevas muestras de SARS-CoV-2 de Rivera y Treinta y Tres corresponden a las mismas cadenas de transmisión previamente identificadas, no existiendo por tanto evidencias de dispersión local de nuevas variantes virales ([Figura 1](#)).

La introducción del virus B.1.1.BR en Rivera ocurrió probablemente a inicios de mayo (4/05: 30/04-05/05), por lo tanto, unos pocos días antes de la detección del [Paciente 0](#) el 05/05. La secuencia viral obtenida del [Paciente 0](#) se posicionó muy cercana a la raíz del cluster filogenético ([Figura 2](#)), lo que sugiere que el [Paciente 0](#) fue quien dio inicio al brote detectado en Rivera. Todas las secuencias virales del brote Rivera, incluida la del [Paciente 0](#), presentan las cuatro mutaciones únicas descritas anteriormente: A2276G (ORF1ab: I671V), C18252T (ORF1ab: mutación sinónima), G24872T (S: V1104L), C28093T (ORF8: S67F).

La introducción del virus B.1.1.BR en Treinta y Tres ocurrió probablemente a finales de mayo (31/05: 19/05-09/06), por lo tanto, 15-20 días antes de la diagnóstico del [Paciente 0](#) el 18/06. A diferencia de lo observado en Rivera, la secuencia viral obtenida del [Paciente 0](#) de Treinta y Tres aparece en una posición interna dentro del clúster filogenético y distante a la raíz del mismo ([Figura 2](#)). Esto sugiere que el [Paciente 0](#) de Treinta y Tres no fue quien dio origen al brote detectado en ese departamento, sino que el brote se originó algunos días antes de la infección del [Paciente 0](#).



De acuerdo con nuestras estimaciones, el **Paciente 0** de Treinta y Tres probablemente se infectó alrededor del 11/06, consistente con el registro epidemiológico de los primeros síntomas del paciente el día 15/06 y su posterior diagnóstico el día 18/06. Otra evidencia que indicia que el **Paciente 0** Treinta y Tres no fue el origen del brote proviene del análisis de las mutaciones características de los virus secuenciados. Todas las secuencias del brote en Treinta y Tres presentan tres mutaciones características en las posiciones: A5089G (ORF1ab: mutación sinónima), C8293T (ORF1ab: mutación sinónima) y C28775T (N: P168S). Durante los primeros diez días de diseminación del virus en Treinta y Tres, aparecieron otras dos mutaciones adicionales: primero la mutación C15108T (ORF1ab: mutación sinónima) y luego la mutación A22720G (S: mutación sinónima) (**Figura 2**). El **Paciente 0** de Treinta y Tres fue infectado por un virus que contiene las cinco mutaciones, y no por la variante ancestral con tres mutaciones que dio origen al brote.

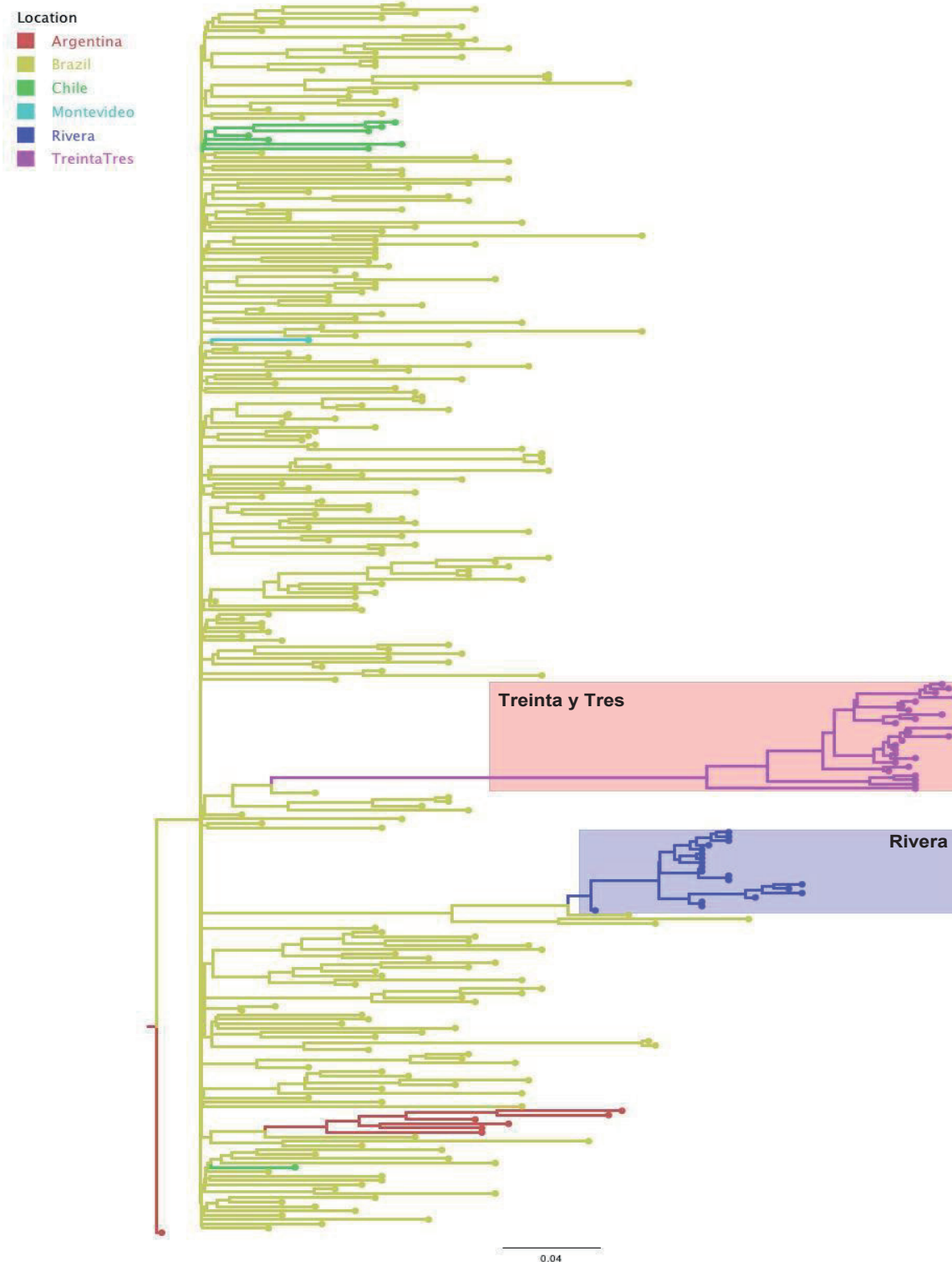


Figura 1. Árbol filogeográfico de 283 secuencias de SARS-CoV-2 del clado B.1.1.BR que circula en Sudamérica. El color de las ramas se corresponde con la ubicación más probable de su nodo parental, como se indica en la leyenda arriba a la izquierda. Los clados uruguayos formados por las cepas de los departamentos de Rivera (n = 19) y Treinta y Tres (n = 25) se resaltan con recuadros.

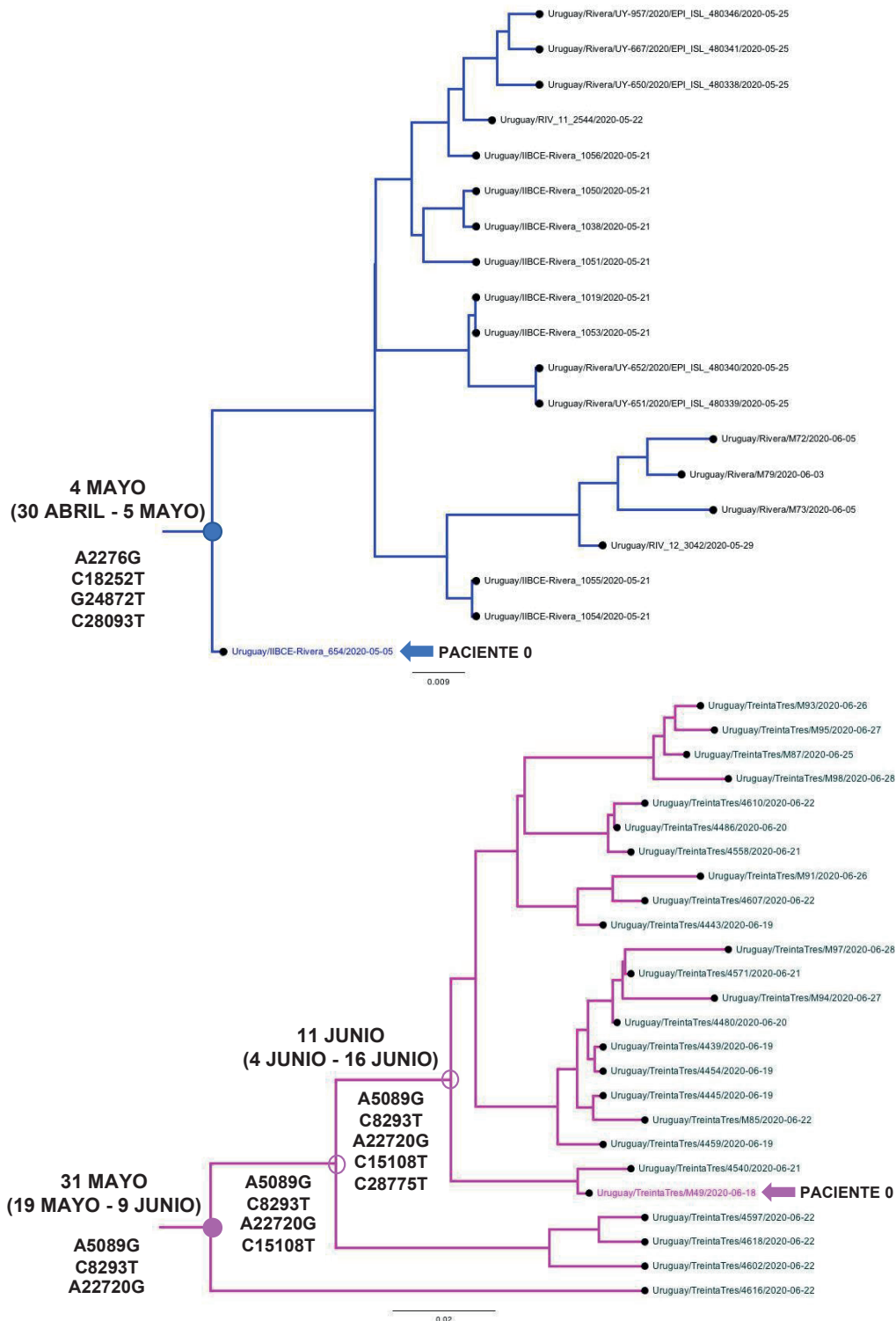


Figura 2. Imagen ampliada de los linajes de SARS-CoV-2 uruguayos de Rivera y Treinta y Tres identificados en el árbol filogenético de la Figura 1. Aquellas secuencias correspondientes al Paciente 0 (primer caso identificado) en cada departamento se destacan con una flecha. Las fechas probables de transmisión y las mutaciones aminoacídicas acumuladas durante la dispersión de cada clado en Uruguay están indicadas en las ramas internas correspondientes.



## CONCLUSIONES GENERALES

- Las 14 nuevas secuencias de Rivera y Treinta y Tres analizadas pertenecen al linaje B.1.1.BR de alta prevalencia en Brasil.
- Todas las nuevas muestras de SARS-CoV-2 de Rivera y Treinta y Tres corresponden a las mismas cadenas de transmisión previamente identificadas, no existiendo por tanto evidencias de dispersión local de nuevas variantes virales.
- Todas las 19 secuencias de SARS-CoV-2 B.1.1.BR de Rivera analizadas hasta el momento de este informe se originaron a partir de un único **caso índice** inicial que llega al departamento desde Brasil a inicios de mayo.
- El primer individuo detectado en Rivera el 5 de mayo (**Paciente 0**) fue probablemente el **caso índice** que dio origen al brote que se propagó en la ciudad por al menos durante un mes, ya que las últimas secuencias obtenidas el 5 de junio derivan de la misma cadena de contagio (red de transmisión) del **Paciente 0**.
- Todas las 25 secuencias de SARS-CoV-2 B.1.1.BR de Treinta y Tres analizadas hasta el momento de este informe se originaron a partir de un único **caso índice** inicial que llega al departamento probablemente desde Brasil entre la última semana de mayo y la primera semana de junio.
- El **Paciente 0** detectado en Treinta y Tres el 18 de junio no corresponde al **caso índice** que dio origen al brote que se propagó en la ciudad. Nuestros análisis indican que el **Paciente 0** se habría infectado en Treinta y Tres unos diez días después de iniciado el brote.
- La fecha de inicio del brote y la diversidad observada entre las secuencias de Treinta y Tres sugieren que el virus circuló de forma críptica (silenciosa) en el departamento por 15-20 días antes de la detección del primer caso sintomático el día 18 de junio, lo que demuestra el enorme desafío que representa la detección temprana de la circulación local del SARS-CoV-2.





- Creemos que esta información es muy valiosa para la toma de decisiones sobre el manejo de la pandemia de COVID-19 en el marco de la situación de emergencia sanitaria actual y alerta contra la injusta estigmatización de los primeros casos diagnosticados en un determinado brote.

## **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-bbmui6w>]. 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], 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]. 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 especialmente 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.

## **RESUMEN PUBLICABLE**

### **Nuevas secuenciaciones de genomas de los brotes en las ciudades de Rivera y Treinta y Tres**

La reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de secuencias genéticas del virus permite la caracterización de procesos de diseminación viral a nivel espacial y temporal, así como la identificación y seguimiento de redes (o “clusters”) de transmisión locales del virus. De esta forma, la secuenciación de genomas virales combinada con datos epidemiológicos proporciona información relevante para la reconstrucción del origen y seguimiento de brotes locales.

El objetivo principal del presente trabajo ha sido describir en mayor profundidad la epidemiología molecular de los brotes de SARS-CoV-2 identificados en las ciudades de Rivera y Treinta y Tres durante los meses de mayo y junio de 2020, respectivamente. Para alcanzar dicho propósito hemos secuenciado el genoma del virus SARS-CoV-2 de 14 nuevas muestras: cinco obtenidas de pacientes diagnosticados en el departamento de Rivera entre el 21 de mayo y el 5 de junio, y nueve obtenidas de pacientes diagnosticados en el departamento de Treinta y Tres entre el 18 y el 28 de junio. Las mismas fueron combinadas con otras secuencias ya disponibles de estos departamentos, resultando en un total de 19 secuencias virales provenientes de Rivera entre



el 5 de mayo y el 5 de junio, y 25 secuencias provenientes de Treinta y Tres entre el 18 y el 28 de junio. Entre las muestras analizadas se encuentran las secuencias virales de los primeros individuos diagnosticados (**Paciente 0**) en Rivera (5 de mayo) y Treinta y Tres (18 de junio).

### Los análisis realizados permitieron obtener las siguientes conclusiones:

- Las 14 nuevas secuencias de Rivera y Treinta y Tres analizadas pertenecen al linaje B.1.1.BR de alta prevalencia en Brasil.
- Todas las nuevas muestras de SARS-CoV-2 de Rivera y Treinta y Tres corresponden a las mismas cadenas de transmisión previamente identificadas, no existiendo por tanto evidencia de dispersión local de nuevas variantes virales.
- Las 19 secuencias de SARS-CoV-2 B.1.1.BR de Rivera analizadas se originaron a partir de un único **caso índice** que llega al departamento desde Brasil a inicios de mayo.
- El **Paciente 0** de Rivera detectado el 5 de mayo fue probablemente el **caso índice** que dio origen al brote que se propagó en la ciudad por al menos durante un mes, ya que las últimas secuencias obtenidas el 5 de junio derivan de la misma cadena de contagio (red de transmisión) del **Paciente 0**.
- Las 25 secuencias de SARS-CoV-2 B.1.1.BR de Treinta y Tres analizadas se originaron a partir de un único **caso índice** inicial que llega al departamento desde Brasil probablemente entre la última semana de mayo y la primera semana de junio.
- El **Paciente 0** de Treinta y Tres detectado el 18 de junio **no fue** el **caso índice** que dio origen al brote que se propagó en la ciudad. Nuestros análisis indican que el **Paciente 0** se habría infectado en Treinta y Tres unos diez días después de iniciado el mismo.
- Creemos que esta información es muy valiosa para la toma de decisiones sobre el manejo de la pandemia de COVID-19 en el marco de la situación de emergencia sanitaria actual, pues demuestra el enorme desafío que representa la detección temprana de la circulación



comunitaria del SARS-CoV-2 y alerta contra la injusta estigmatización de los primeros casos diagnosticados en un determinado brote.

**Este informe fue redactado en base al trabajo hecho por las personas que pertenecen a las instituciones que se mencionan a continuación:**

### **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

#### **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