



INFORME DEL GTM¹ SOBRE VARIANTES DEL SARS-CoV-2 E IMPLICACIONES EN LOS PROGRAMAS DE VACUNACIÓN GLOBAL FRENTE A COVID-19.

Fecha: 23 febrero 2021

Estructura del informe

1. Resumen Ejecutivo
2. Recomendaciones
3. Qué son las variantes del SARS-CoV-2 y qué peligro representan
4. Variantes del SARS-CoV-2 que suscitan preocupación a nivel global
 - a. Variante Británica (B.1.1.7)
 - b. Variante Sudafricana (B.1.351)
 - c. Variante brasileña (P.1)
 - d. Otras variantes en expansión
5. Inmunidad T frente a coronavirus en relación con estrategias de vacunación
6. ¿Son las variantes de SARS-CoV-2 más resistentes a la acción de las vacunas? ¿Qué hacer?
7. Seguimiento en la población por secuenciación genómica
8. Sistema de representación y análisis de la información

¹ El Grupo de Trabajo Multidisciplinar (GTM) asesora y apoya al Ministerio de Ciencia e Innovación en materias científicas relacionadas con la COVID-19 y sus consecuencias futuras. El [GTM](#) está compuesto por: José M. Ordovás (Presidente), Mariano Esteban, Rocío García-Retamero, Beatriz González López-Valcárcel, Alfonso Gordaliza, Marco Inzitari, Pedro Jordano, Itziar de Lecuona, Laura M. Lechuga, Ramón López de Mántaras, José Molero, Agustín Portela, Diego Puga, José Javier Ramasco, Francisco Sánchez-Madrid y Alfonso Valencia. Enric Banda actúa como observador, y Maria Sol Serrano Alonso como secretaria. Todos los componentes del GTM colaboran de forma desinteresada con el Ministerio de Ciencia e Innovación. Agradecimiento especial a Carmen E. Gómez del Grupo de Poxvirus y Vacunas del CNB-CSIC por su activa participación en la elaboración del texto sobre variantes y las figuras. A Salvador Capella (BSC), Iñaki Comas (IBV-CSIC), Joaquín Dopazo (FPS) y Jordi Rambla (CRG-EGA), por compartir la organización de la información de los genomas virales. A Ewan Birney (EBI-EMBL) por la descripción del sistema de rastreo de variantes y secuenciación en Inglaterra. A Victoria Ruiz Serra, Camila Pontes y Rosalba Lepore (BSC) por la generación de las figuras de las estructuras de proteínas y la ayuda con las referencias.

9. Interpretación de las variantes por métodos computacionales

10. Bibliografía

1. Resumen Ejecutivo

Desde la aparición del SARS-CoV-2 en diciembre de 2019, todos los estudios sobre vacunas se han focalizado en la primera cepa aislada en Wuhan (China), que rápidamente se extendió por todos los países. Al tratarse de un virus ARN de 30.000 nucleótidos, era predecible que con el tiempo aparecieran mutantes que se mezclaran o prevalecieran entre los virus ya circulantes. Un año después estamos siendo expuestos a nuevas variantes debidas a mutaciones que han ido emergiendo en distintos países, con el resultado de una mayor transmisión y hospitalización, sobrecargando más al sistema sanitario. Con la introducción de los programas de vacunación se espera poder controlar a estas y otras variantes que puedan aparecer. No obstante, los datos obtenidos actualmente no son concluyentes, y de momento sugieren que las vacunas actuales mantienen la producción de anticuerpos neutralizantes frente a las variantes que han aparecido, aunque de menor intensidad que frente a la cepa parental (Wuhan). Queda pendiente por conocer el papel que la activación de las células T ejerce sobre dichas variantes. Así pues, existe un interés global en saber si las vacunas actuales sirven igualmente frente a las variantes que están siguiendo o si habría que producir nuevas vacunas, con el consiguiente coste económico, plazos de tiempo extendidos y hartazgo social. Científicos, OMS, asociaciones, empresas y gobiernos están diseñando las estrategias a seguir para la rápida detección y el mejor control de las variantes que puedan aparecer. En este informe del GTM se describen las variantes del SARS-CoV-2 actualmente en circulación en la población mundial, sus características, susceptibilidad frente a las vacunas actuales, planes de acción para su detección, evolución y **control** y, además, se proponen una serie de recomendaciones específicas.

2. Recomendaciones

- **Es fundamental mantener las medidas de prevención individual e intervenciones no farmacéuticas para mantener bajos los niveles de transmisión, tanto para evitar la propagación de variantes que ya existen, como para evitar la aparición local de nuevas variantes (como es el caso de la aparición independiente en múltiples sitios de la variante E484K).**
- **Las variantes del SARS-CoV-2 que se identifiquen con mayor virulencia y resistencia a la acción de las vacunas actuales representan un problema importante de salud global. Es necesario establecer criterios científicos que definan si estas variantes son más resistentes a la acción de las vacunas actuales que su parental (cepa de Wuhan) en distintos modelos experimentales animales.**
- **Es necesario hacer un seguimiento epidemiológico de la acción de las vacunas actuales sobre la población, identificando en los vacunados si se producen infecciones por variantes y su frecuencia.**

- Hay que establecer mediante métodos experimentales el papel de la respuesta inmune humoral (anticuerpos) y celular (linfocitos T) en la eficacia de las vacunas actuales frente a las distintas variantes del SARS-CoV-2.
- Es necesario incrementar las tasas de secuenciación de genomas virales en personas infectadas para determinar las posibles variantes que surgen en la población española, ahora que ya se ha confirmado la presencia de las variantes británica, sudafricana y brasileña en territorio nacional, y crear un circuito epidemiológico estable de recogida y procesado de muestras para secuenciación [1-3]. En este sentido es particularmente importante secuenciar todos los genomas virales sospechosos de fallo de tratamiento antiviral.
- Toda la información de los genomas virales debe ser pública y accesible sin restricciones. Apoyamos la carta presentada por numerosos científicos a este respecto [4] y pedimos que los proyectos de investigación hagan obligatorio la inclusión de las secuencias generadas en bases de datos de referencia para el campo y repositorios públicos y/o gubernamentales (p. ej. ELIXIR Core Data Resources, [5]).
- Se necesita completar lo antes posible el calendario de vacunación frente al SARS-CoV-2 en la población española para evitar la penetración y extensión de las variantes virales.
- Se debe llevar a cabo un esfuerzo en I+D dirigido al estudio de variantes del SARS-CoV-2, en términos de epidemiología, biología, bioinformática estructural, evolución, impacto social, y seguimiento, así como desarrollar vacunas modificadas que tengan un amplio espectro de acción frente a las distintas variantes.
- Se deben identificar y validar para la clínica compuestos terapéuticos eficaces (anticuerpos y antivirales) frente a las variantes del SARS-CoV-2.
- Debe ser atendido el estudio del origen de la epidemia con sus aspectos ecológicos íntimamente relacionados con la aparición de variantes y especificidades de huésped - en especial en el contexto del cambio climático.

3. Qué son las variantes del SARS-CoV-2 y qué peligro representan

Las variantes del coronavirus SARS-CoV-2 son aquellos virus que, al realizar la secuenciación genética a partir de muestras tomadas de pacientes, contienen una serie de mutaciones que se repiten en distintas muestras aisladas de personas infectadas, y que a su vez pueden prevalecer con características propias en la población sobre la cepa parental.

Todos los virus, y en particular aquellos cuyo genoma consiste en una molécula de ARN, mutan a medida que se van replicando en el interior de las células dianas como consecuencia de la tasa de error asociada a las distintas enzimas con actividad ARN polimerasa responsables de este proceso. El coronavirus SARS-CoV-2 no es una excepción, aunque cabe destacar que su tasa de mutación (10^{-3} mutaciones/residuo genómico/año) es menor que la de otros virus ARN (como por ejemplo el virus de la gripe) y esto se debe a que los miembros de esta familia codifican una exoribonucleasa 3'-5' que permite un proceso de replicación de alta fidelidad y un rango de variación tolerable [6]. Bien sea por un fenómeno de selección natural o por la vigilancia inmune a la que está sometido el virus en el organismo infectado, se generan una serie de **variantes virales** o **mutantes de escape** que pueden evolucionar manifestando un comportamiento diferente a sus ancestros. Las nuevas mutaciones que se producen pueden ser irrelevantes o, por el contrario, conferir al virus una ventaja adaptativa que modifique su tasa de transmisión,



rango de hospedador, virulencia, patogenicidad o reconocimiento antigénico, poniendo en riesgo la salud pública y la eficacia de las medidas preventivas y terapéuticas que se están empleando a nivel global para combatir la pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2.

4. Variantes del SARS-CoV-2 que suscitan preocupación a nivel global

En los últimos meses se ha conocido en varias regiones del mundo la presencia de variantes virales que en un corto período de tiempo han acumulado un número significativo de mutaciones y han desplazado a los virus ancestrales locales convirtiéndose en variantes dominantes, lo que ha generado una alarma a nivel global. Actualmente se está haciendo un seguimiento de vigilancia exhaustivo de 3 variantes virales de SARS-CoV-2 que suscitan preocupación: **VOC 202012/01 (B.1.1.7)**; **501 Y.V2 (B.1.351)** y **P.1 (B.1.1.28.1)**. Estas variantes acumulan una combinación de mutaciones, mayoritariamente en la proteína de la espícula (proteína S) del virus, que por su localización podrían favorecer su transmisibilidad, aumentar la gravedad de la enfermedad o producir una reducción en la eficacia de las vacunas y tratamientos que se están aplicando a nivel mundial.

a. Variante Británica (B.1.1.7)

La variante **VOC 202012/01 (B.1.1.7)**, conocida como la **variante Británica** por su detección por primera vez en el Reino Unido, se dio a conocer el 14 de diciembre de 2020 por las autoridades de ese país, que declararon un aumento de la incidencia de SARS-CoV-2 en el este y sureste de Inglaterra y área metropolitana de Londres asociada a una nueva variante del virus. La primera muestra en la que se pudo identificar dicha variante se remonta a septiembre de 2020. Desde entonces, se ha convertido en la variante predominante que circula en el Reino Unido. Se caracteriza por una transmisibilidad significativamente mayor, que ha contribuido a un aumento de la incidencia, las hospitalizaciones y la presión sobre el sistema sanitario desde la segunda quincena de diciembre de 2020. De hecho, los modelos matemáticos de genética de poblaciones sugieren que **se propaga un 56 % más rápido que otros linajes** [7]. Los estudios preliminares indicaban que VOC 202012/01 no está asociado con una gravedad de la infección significativamente diferente o que afecte de manera desproporcionada a ciertos grupos de edad más que los virus circulantes anteriores. Sin embargo, como resultado del aumento de la incidencia, en enero de 2021 el Reino Unido había informado de la mayor mortalidad diaria por COVID-19 desde el inicio de la pandemia [8]. Recientemente se ha publicado, sin revisión por pares, un estudio que estima un **35% (12-64%) mayor de riesgo de muerte** asociado con VOC 202012/01, sugiriendo que esta variante no solo es más transmisible, sino que también puede causar una enfermedad más grave [9].

VOC 202012/01 tiene como característica genética distintiva la **presencia de 23 mutaciones** respecto del virus SARS-CoV-2 que circulaba en el Reino Unido en el momento en el que se detectó la variante. De estas mutaciones 14 son no sinónimas (mutaciones puntuales con cambio de aminoácido): [T1001I, A1708D, I2230T] en ORF1ab; [N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H] en la proteína S; [Q27stop, R52I e Y73C] en ORF8 y [D3L y S235F] en la proteína N; 6 mutaciones son sinónimas (mutaciones puntuales sin cambio de aminoácido): [C913T, C5986T, C14676T, C15279T, T16176C] en el gen ORF1ab, y una en el gen M [T26801C] y 3 son deleciones (pérdida de una parte de la secuencia): [SGF 3675-3677del] en ORF1ab y [H69-



V70del, Y144] en la proteína S. No está claro cómo y dónde se originó esta variante, aunque la divergencia genética inusual del linaje B.1.1.7 **puede haber resultado, al menos en parte, de la evolución del virus en un individuo con infección crónica.** Aunque estas infecciones son raras, y la transmisión a partir de ellas presumiblemente es aún más rara, no es improbable dado el gran número de nuevas infecciones en curso [10]. Excluyendo las mutaciones sinónimas, el 47% de los cambios conocidos ocurren en la región que codifica para la proteína S. Esta proteína incluye la región de unión al receptor ACE2 (RBD) y representa el blanco fundamental de los anticuerpos neutralizantes, de ahí que sea el antígeno seleccionado e incluido en las vacunas que están siendo administradas por los diferentes países. Este hallazgo ha causado preocupación a nivel global ya que estas mutaciones, bien sean individualmente o en su conjunto, **pueden ocasionar cambios estructurales o a nivel de determinantes antigénicos en la proteína S** que: **i)** alteren su interacción con el receptor ACE2, modificando su eficiencia de infección en células humanas o incluso modificando su interacción con el receptor de otras especies favoreciendo la transmisión inter-especies ; **ii)** alteren su reconocimiento tanto por los anticuerpos como por las células T específicas que se generan bien durante la infección natural o mediante la vacunación, pudiendo incidir en la posibilidad de reinfección o en la efectividad de la vacunación o **iii)** alteren su reconocimiento por los anticuerpos que se transfieren de forma pasiva del plasma de pacientes convalecientes o monoclonales de diseño, comprometiendo la efectividad del tratamiento. **Las 3 mutaciones de VOC 202012/01 con mayor potencial para afectar el comportamiento biológico del virus son: N501Y, H69-V70del(Δ H69/V70) y P681H.** Datos experimentales y de modelaje sugieren que la mutación **N501Y aumenta la afinidad con la que la proteína S del SARS-CoV-2 se une al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE 2),** que media la entrada del virus en las células humanas, determinando la eficiencia de la infección y la transmisibilidad del virus [11]. La mutación **N501Y también se ha asociado con una mayor infectividad y virulencia** en el modelo de ratón y en hurones [12]. Una publicación reciente sin revisión por pares que usó la mutación N501Y como indicador de infección con la nueva variante VOC 202012/01 refiere cargas virales inferidas tres veces más altas en el grupo que la portaba, **sugiriendo una mayor transmisibilidad de esta variante** [13]. La función de la mutación **P681H** aún no está clara, pero se sitúa inmediatamente adyacente al sitio de escisión de la furina (FCS, de las siglas en inglés Furin Cleavage Site) presente en la proteína S. El FCS del SARS-CoV-2 no se encuentra en coronavirus estrechamente relacionados y se ha demostrado que **promueve la entrada en las células epiteliales respiratorias** [14]. Del mismo modo se ha visto que la inserción que genera el FCS en la proteína S de SARS-CoV-2 facilita su hidrólisis por la acción de la proteasa celular TMPRSS2 aumentando la fusión viral [15]. Tanto N501Y como P681H se han observado de forma independiente, pero hasta ahora no han aparecido en combinación. La Δ H69/V70 es una de las mutaciones recurrentes observadas en el dominio amino (N) terminal (NTD) de la proteína S [16,17] y está presente en múltiples linajes vinculada a varias mutaciones en el dominio RBD. Por ejemplo, surgió en el brote asociado al visón en Dinamarca en el contexto de la mutación Y453F, y en humanos en asociación con la mutación N439K, lo que explica su frecuencia relativamente alta en los datos de secuencias genómicas globales. In vitro, Δ H69/V70 favoreció un aumento de dos veces la infectividad mediada por la proteína S usando lentivirus pseudotipados [16]. Esta delección provoca una modificación en epítomos inmunodominantes situados en lazos o bucles variables dentro de NTD que son ampliamente reconocidos tanto por suero de pacientes convalecientes como de individuos vacunados, por lo que se confiere resistencia a la neutralización por dichos sueros. A

diferencia de las sustituciones, las eliminaciones no se pueden corregir en el proceso de replicación y esto puede acelerar la evolución adaptativa en el SARS-CoV-2.

Las Fig.1, 2 y 3 muestran la estructura de la proteína S y la localización de los aminoácidos H69/V70 (Fig.1), así como las dos posiciones críticas N501 y E484.

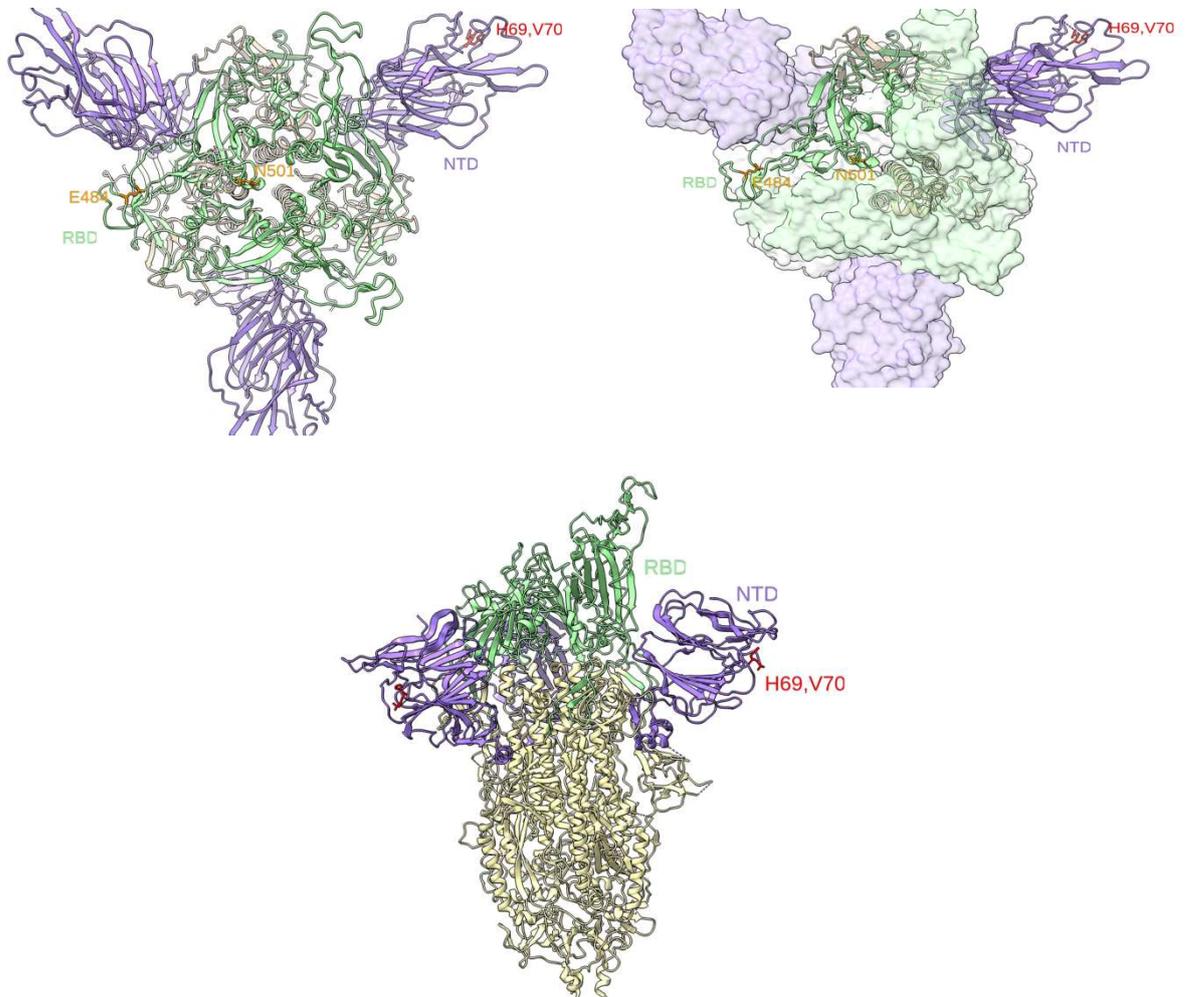


Fig. 1. Dos vistas de la estructura del trímero de la proteína S en su forma cerrada y una abierta indicando la localización de los aminoácidos H69/V70 y de las posiciones críticas N501 y E484.

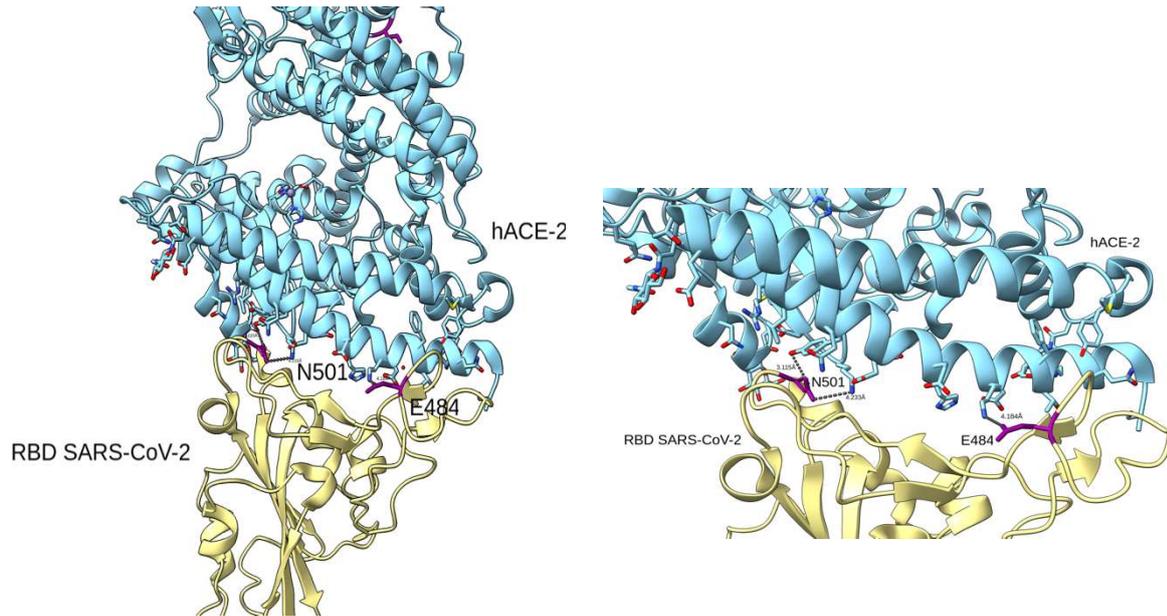
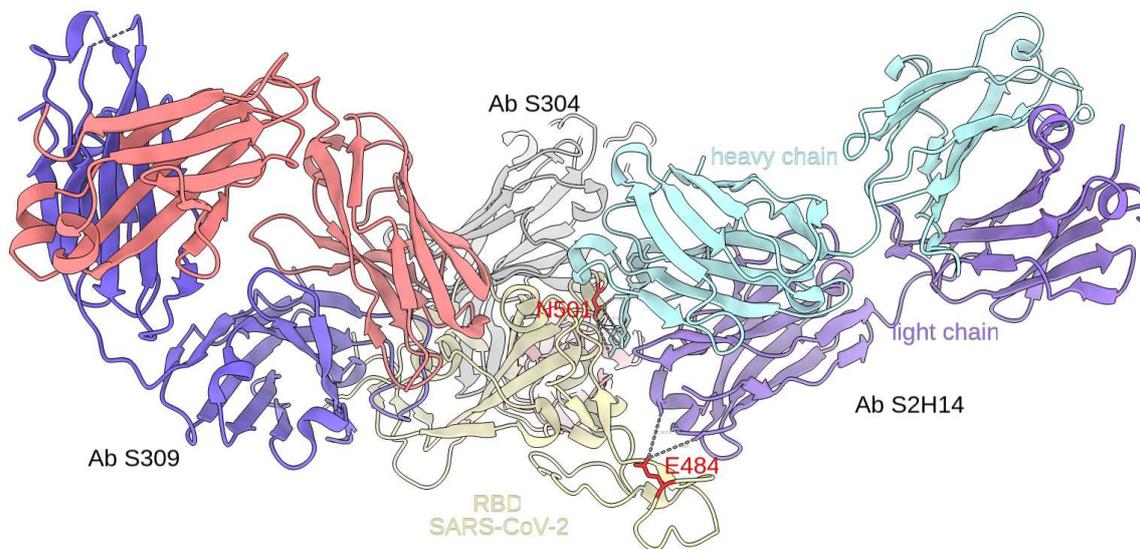


Fig. 2 Interacción del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S con el receptor humano ACE-2 mostrando la interacción directa con el receptor de las posiciones críticas: N501 y E484.



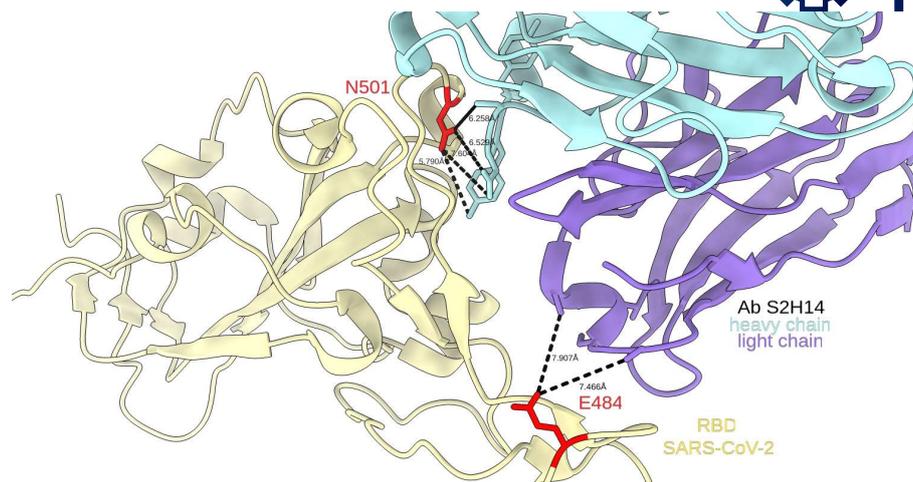


Fig. 3 Interacción del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S con dos anticuerpos mostrando la interacción directa con el receptor de las posiciones críticas: N501 y E484.

A fecha 3 de febrero de 2021, **80 países han informado de la presencia y depositado secuencias de virus** pertenecientes a esta estirpe en GISAID, una base de datos en línea sin fines de lucro para compartir genomas virales [18] (Figura 4).



Figura 4: Mapa de distribución global de la variante VOC 202012/01 (Fuente: GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)).

La rápida transmisión de VOC 202012/01 dentro y fuera del Reino Unido hace pensar que esta variante puede llegar a constituir la estirpe dominante responsable de los próximos contagios en Europa. Este hallazgo resalta la importancia de llevar a cabo un seguimiento epidemiológico riguroso incorporando estudios genéticos y virológicos en las zonas afectadas para evaluar más a fondo su transmisibilidad, la gravedad de la infección que produce, el riesgo de reinfección y el alcance que pudiera tener su propagación sobre la eficacia de las medidas preventivas y terapéuticas que se están adoptando a nivel global. En este sentido están saliendo a la luz los **primeros resultados que valoran el impacto de las mutaciones sobre la eficacia de las vacunas y tratamientos** que se están administrando. Un breve informe preliminar, ha descrito que los



sueros de 20 pacientes que recibieron la vacuna Pfizer neutralizaron el virus SARS-CoV-2 modificado en laboratorio con la mutación N501Y. Posteriormente, estos experimentos de neutralización se complementaron utilizando virus que contenían diferentes combinaciones de mutaciones (E484K+N501Y+D614G, o delección-69-70+N501Y+D614G); alguna de ellas, como E484K, está presente en las otras dos variantes de Sudáfrica y Brasil. El grado de neutralización de los sueros de pacientes convalecientes fue ligeramente menor para el virus que contiene las tres mutaciones (E484K+N501Y+D614G) que para los virus que contienen exclusivamente la mutación N501Y o la combinación delección Δ H69/V70+N501Y+D614G [19]. De forma similar, Collier y colaboradores no observaron una reducción en la capacidad de los sueros de los individuos vacunados con la misma vacuna (Pfizer) para inhibir el virus parental o el virus mutante en un ensayo de pseudovirus que incluía sólo tres mutaciones en la proteína S (N501Y, A570D, Δ H69/V70); sin embargo, usando un pseudovirus que posee todas las mutaciones descritas para la proteína S de la variante VOC 202012/01 se detectó una reducción en la efectividad de neutralización del virus por los sueros de los vacunados [20]. En 16 pacientes vacunados con la vacuna de Pfizer se observó que los sueros inmunes tenían títulos neutralizantes equivalentes frente a la variante de referencia y a la variante mutada [21]. Empleando también pseudovirus que poseen la batería de mutaciones descritas para la proteína S de la variante VOC 202012/01, Wang y colaboradores detectaron una reducción modesta de la actividad neutralizante tanto del plasma de pacientes convalecientes (2,7-3,8 veces) como del suero de individuos vacunados con las vacunas de Moderna y Pfizer (1,8-2 veces). También evaluaron un panel de 30 anticuerpos monoclonales dirigidos frente a los dominios NTD y RBD de la proteína S y observaron que la variante VOC 202012/01 es refractaria a la neutralización por la mayoría de mAbs que reconocen NTD y relativamente resistente a varios mAbs dirigidos frente a RBD, incluido dos que han sido aprobados para tratamiento en caso de emergencia [22]. Finalmente Wu y colaboradores no detectaron un impacto significativo en la capacidad neutralizante de sueros de sujetos humanos o primates no humanos (NHP) que recibieron la vacuna de Moderna frente a la variante VOC 202012/01 [23]. En general, aunque estos estudios in vitro tienen sus limitaciones, bien sea por la metodología, por el tamaño muestral o por evaluar sólo el componente humoral de la respuesta inmune, lo que indican en su conjunto es que **la efectividad de las vacunas que se están administrando es similar o moderadamente menor frente a la variante británica.**

Aparte de la proteína S, la mutación en ORF8 [Q27stop] observada en la variante VOC 202012/01 trunca la proteína ORF8 o la vuelve inactiva y, por lo tanto, permite que se acumulen más mutaciones en otras regiones. Al principio de la pandemia se aislaron múltiples virus con delecciones que conducían a la pérdida de la expresión de ORF8 en todo el mundo, incluido un gran grupo en Singapur. Estas delecciones se asociaron con una infección clínica más leve y menos inflamación post-infección; sin embargo, este grupo desapareció a finales de marzo después de que Singapur implementara con éxito medidas de control. En trabajos posteriores se descubrió que la delección de ORF8 tiene solo un efecto muy modesto sobre la replicación del virus en las células de las vías respiratorias primarias humanas en comparación con los virus sin la delección [24]. Otras variantes con la mutación E484K han sido identificadas en algunas regiones del Reino Unido, tales como VUI 202102/01 (A.23.1 con E484K) o la B.1.525 (VUI 2021 02/03) con 4 mutaciones en la proteína S (Q52R, E484K, Q677H, F888L). A nivel global, más de 4000 variantes han sido identificadas, pero la mayoría no supone preocupación alguna, y solo una pocas se

refieren como “variants of concern”, por producir efectos clínicos mas severos que la cepa parental de Wuhan.

b. Variante Sudafricana (B.1.351)

La segunda variante que ha suscitado preocupación a nivel mundial fue dada a conocer el 18 de diciembre de 2020 por las autoridades Sudafricanas y es la denominada **501Y.V2 (B.1.351)** o **variante Sudafricana**. La primera muestra en la que se pudo identificar esta variante se remonta al 8 de octubre de 2020 y desde el mes de noviembre ha desplazado las variantes circulantes en la región para convertirse en la variante dominante, lo que indica que pudiera tener una mayor capacidad de transmisión, sin que hubiera evidencia de mayor virulencia. La variante 501Y.V2 tiene como característica genética distintiva la **presencia de 12 mutaciones** no sinónimas y una delección. Aproximadamente el 77% de estas mutaciones se encuentran localizadas en la proteína S [L18F, D80A, D215G, LAL 242-244 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V] y las otras restantes en el ORF1a [K1655N], en la proteína E [P71L] y en la proteína N [T205I]. Al igual que con la variante británica, se valora la posibilidad de que pudiera **haber surgido**, entre otras causas, **a través de la evolución intra-hospedador en uno o más individuos con replicación viral prolongada**. Sin embargo, la alta incidencia de mutaciones que se acumulan dentro de dos de las regiones más inmunodominantes de la proteína S, como son el dominio NTD y RBD, sugiere que se ha originado como una variante de escape a la neutralización [25] y por consiguiente **la preocupación** sobre el efecto que pudieran tener las mutaciones **sobre la eficacia de las vacunas y los tratamientos es aún mayor que con la variante británica**.

A fecha 3 de febrero de 2021, 41 países han reportado y depositado secuencias de virus pertenecientes a esta estirpe en GISAID [18],(Figura 5).



Figura 5 Mapa de distribución global de la variante 501Y.V2 (Fuente: GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)).

La variante 501Y.V2 comparte con la variante VOC 202012/01 la mutación N501Y situada en el dominio RBD de la proteína S y esto le confiere un **aumento en su afinidad por el receptor ACE2** que puede incidir en su tasa de transmisibilidad; pero, **además**, en esta variante se suman **dos mutaciones en el mismo dominio (K417N y E484K)** que al parecer son **determinantes tanto para la interacción con el receptor como para evadir la neutralización**. La mutación E484K es poco común y está presente en <0,02% de las secuencias fuera de Sudáfrica. Existe evidencia de que E484K puede mejorar ligeramente la afinidad de unión del virus al receptor. Del mismo

modo, aunque el residuo K417 es un residuo único en SARS-CoV-2 que interacciona con ACE2 contribuyendo a una mayor afinidad del virus por el receptor, un estudio de escaneo mutacional sugiere que el cambio de K por N afecta mínimamente la afinidad de unión a ACE2 [11]. Por otra parte, un estudio de simulación de dinámica molecular revela que tanto la mutación E484K como N501Y aumentan la afinidad de la proteína S por el receptor ACE2 y E484K, en particular, conmuta la carga en la región del lazo flexible de RBD, lo que conduce a la formación de nuevos contactos favorables que pudieran aumentar la transmisibilidad. Por otra parte, **la combinación de las mutaciones E484K, K417N y N501Y** induce un cambio conformacional mayor que el inducido solo por la mutación N501Y, lo que le **permite escapar de forma más efectiva a la neutralización** [26]. Cabe destacar que el resto de las mutaciones que posee esta variante en la proteína S están situadas en el dominio NTD (L18F, D80A, D215G, LAL 242-244 del, R246I), específicamente dentro o en las cercanías de lazos variables que aceptan cambios de secuencia sin alterar la estructura de los dominios funcionales de la proteína y hacia donde se dirige también la reactividad de anticuerpos aislados de pacientes convalecientes o vacunados. Estudios preliminares, aún sin revisión por pares, destacan que la combinación de mutaciones en RBD y NTD afectan significativamente la neutralización de esta variante tanto por anticuerpos monoclonales dirigidos frente a estas regiones, como por suero inmune derivado de pacientes convalecientes o vacunados [22,23,27–30]. Los estudios que evalúan paneles de anticuerpos monoclonales potentes que han sido identificados frente a la proteína S indican que la variante 501Y.V2 es refractaria a ser neutralizada por los anticuerpos que reconocen el dominio NTD y que la combinación de mutaciones que se acumulan en el dominio RBD reducen o anulan la capacidad de neutralización de casi el 80% de los anticuerpos monoclonales que reconocen esta región [22,27,28]. En correspondencia con estos hallazgos, se ha descrito una reducción significativa en la capacidad de neutralización de anticuerpos policlonales derivados de pacientes convalecientes frente a la variante 501Y.V2, destacándose una eficacia superior en los que procedían de pacientes hospitalizados con una enfermedad más grave en comparación con aquellos que solo tenían síntomas leves [22,28–30]. Estos datos apuntan a una posible disminución en la eficacia de los tratamientos basados en anticuerpos monoclonales o policlonales así como un incremento de la tasa de reinfección en las regiones donde esta cepa se extienda de forma dominante.

Desde el punto de vista de la eficacia de las vacunas frente a la variante sudafricana, los resultados son más preocupantes que los que se han desvelado para la variante británica. Wang y colaboradores refieren que **la variante 501Y.V2 es notablemente más resistente a la neutralización por anticuerpos policlonales derivados de pacientes vacunados con las vacunas de Pfizer (~6,5 veces) o de Moderna (~8,6 veces)** [22]. Por su parte, Wu y colaboradores también encontraron una disminución significativa en la neutralización de la variante 501Y.V2 por los sueros de individuos o primates no humanos que fueron vacunados con ARNm-1273 (Moderna); sin embargo, los autores destacan que, a pesar de las disminuciones observadas, la media geométrica de los títulos de neutralización en sueros de vacunados contra la variante sudafricana se mantuvo en $\sim 1/300$, valor que consideran aún aceptable [23]. En otro estudio que evalúa las respuestas de anticuerpos y células B de memoria en una cohorte de 20 voluntarios que recibieron las vacunas de Moderna (mRNA-1273) o Pfizer (BNT162b2) detectaron que la actividad frente a las variantes de SARS-CoV-2 que poseen las mutaciones E484K o N501Y o la combinación K417N: E484K: N501Y se redujo en un margen pequeño pero



significativo [27]. Estos datos, aunque orientativos, reflejan una **disminución más acentuada de la eficacia de las vacunas y terapias basadas en anticuerpos frente a esta variante.**

Los datos más preocupantes se derivan de los resultados de los ensayos clínicos de eficacia que han dado a conocer en comunicado de prensa las compañías Novavax y Janssen en la región donde predomina esta variante sudafricana. La empresa de biotecnología **Novavax** publicó datos que mostraban que su vacuna contra el COVID-19, denominada NVX-CoV2373 y que incluye la **proteína S de la cepa original, ha demostrado una eficacia del 85,6% frente a la variante británica (95,6% frente a la cepa original)** en el ensayo de fase 3 que involucró a 15.000 participantes de entre 18 y 84 años en Reino Unido. Sin embargo, en el estudio fase 2b desarrollado **en Sudáfrica**, en el que participaron más de 4.400 pacientes **la eficacia en la población general fue del 49,4% frente a la variante 501Y.V2**, valores que ascienden a 60 % de eficacia para la prevención de la enfermedad COVID-19 leve, moderada y grave eliminando los pacientes VIH+ del cómputo general [31]. Este comunicado representa la **primera evidencia objetiva que demuestra una disminución significativa en la eficacia de una vacuna influenciada por la dominancia de una variante viral como la 501Y.V2**. Esta disminución se observa también con otras vacunas; así, Sudáfrica ha anunciado el día 7 de febrero de 2021 que deja de usar la vacuna de AstraZeneca por su baja eficacia. En el manuscrito no revisado del repositorio público MedRxiv [32] en el que se basa esta decisión se describe que 39 de 41 casos de fallo vacunal estaban infectados por esta variante y la eficacia contra variante era del 10% en un ensayo inicial.

Por su parte, la vacuna de **Janssen ha demostrado una eficacia del 72 %** en una sola dosis en el ensayo ENSEMBLE en **Estados Unidos** para prevenir el COVID-19 de moderado a grave a 28 días después de la vacunación. Sin embargo, estos valores se redujeron al **66% en América Latina** y al **57% en Sudáfrica**.

c. Variante brasileña (P.1)

La tercera variante de SARS-CoV-2 que suscita preocupación es la **P.1 (B.1.1.28.1)** conocida como **variante Brasileña**. Fue detectada por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón el 6 de enero de 2021 y se aisló de cuatro viajeros que llegaron a Tokio desde Amazonas, Brasil, el 2 de enero de 2021 en el control del aeropuerto. Posteriormente fue identificada en Brasil, donde mantiene una expansión creciente desde el mes de enero. De hecho, en Manaus, la ciudad más grande de la región amazónica, entre los meses de marzo y noviembre la variante P.1 no se detectaba, pasando a tener una **representación en el 42 % de los casos tipificados en diciembre y en el 85,4% de los casos tipificados en enero** [33]. Teniendo en cuenta que en esta ciudad alcanzó un 76% de seroprevalencia durante la ola de verano [34], resulta inesperado y preocupante el aumento abrupto del número de ingresos hospitalarios por COVID-19 en enero de 2021, 6 veces superior al que tuvo lugar en el mismo intervalo de tiempo en el mes de diciembre [35]. Aun no hay datos disponibles para confirmar si esta variante se asocia, como parece posible, a reinfecciones [36].

Esta nueva variante pertenece al linaje B.1.1.28 y presenta 17 mutaciones no sinónimas: [L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F] en la proteína S, [S1188L, K1795Q, E5665D] en ORF1ab, [E92K] en ORF8 y [P80K] en la proteína N; una delección: [SGF 3675-3677] en ORF1ab y 4 mutaciones sinónimas. **P.1 es la variante viral de SARS-CoV-2 que más mutaciones acumula en la proteína S (12 mutaciones)**, alguna de ellas compartidas

con la cepa británica y sudafricana [N501Y] y otras compartidas solo con la cepa sudafricana [L18F, K417T, E484K, D614G], las que como hemos descrito con anterioridad tienen importantes implicaciones en la transmisibilidad, tasas de reinfección y evasión de la inmunidad mediada por anticuerpos. De hecho se han comunicado casos de reinfección asociados a esta variante[37].

A fecha 3 de febrero de 2021, 10 países han comunicado y depositado secuencias de virus pertenecientes a esta estirpe en GISAID [18] (Figura 6).



Figura 6: Mapa de distribución global de la variante P.1 (B.1.1.28.1) (Fuente: GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)).

Aún queda mucho camino por recorrer en la investigación de esta y otras variantes que circulan en Brasil, aunque **es previsible, por el número de mutaciones que acumula en la proteína S, que sea igual de resistente o más que la variante sudafricana** a la acción neutralizante de los anticuerpos generados, bien sea por inmunidad natural, por vacunación o al ser administrados como terapia.

Una de las mutaciones más preocupantes desde el punto de vista de evasión de la respuesta inmune que comparten la variante brasileña P.1 (B.1.1.28.1) y la variante sudafricana 501Y.V2 (B.1.351) es la **E484K**. Recientemente un estudio, aún sin revisar por pares, evaluó el efecto de sueros de pacientes convalecientes o vacunados en función de su número de anticuerpos IgG frente a la proteína S sobre la neutralización del virus SARS-CoV-2 al que introdujeron la mutación E484K en el dominio RBD. La eficacia de la neutralización del suero se redujo en todos los casos (muestras de vacunación: 3,4 veces; IgG baja: 2,4 veces; IgG moderada: 4,2 veces e IgG alta: 2,6 veces). Para algunos de los sueros de donantes convalecientes con IgG baja o moderada, la caída en la eficiencia de neutralización resultó en valores ID50 similar a los de las muestras de control negativo, con baja o incluso ausencia de neutralización. Sin embargo, los sueros humanos con altos niveles aún pudieron neutralizar el virus con la mutación, indicando que es importante inducir a través de la vacunación los niveles más altos posibles de anticuerpos específicos para así mejorar la protección contra las variantes emergentes del SARS-CoV-2 [38]. Aunque este estudio no usa un virus que contenga toda la batería de mutaciones en la proteína S que acompañan a la mutación E484K en las diferentes variantes de SARS-CoV-2 para dar un estimado más realista de este efecto, deja claro que **es necesario optimizar los sistemas de vacunación para poder aumentar la posibilidad de contrarrestar la expansión de las nuevas variantes**. Esto se traduce en la necesidad de cumplir las pautas de vacunación de dosis establecidas y aprobadas para las diferentes formulaciones licenciadas, y a un mediano-largo

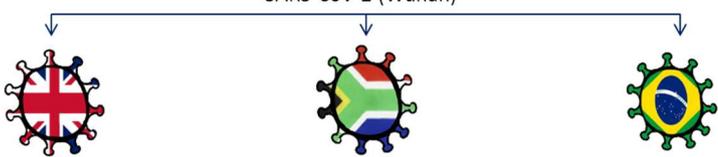
plazo, establecer protocolos combinados o “prime/boost” que involucren dos vacunas diferentes que garanticen la óptima estimulación de la respuesta inmune tanto humoral como celular [39].

Científicos de Brasil informaron el 14 de enero que CoronaVac, la vacuna contra el coronavirus de la farmacéutica china Sinovac, que tiene como principio el uso de virus inactivado, tiene una efectividad del 50,4%, según los últimos resultados del ensayo clínico realizado en Brasil y que se contradice con el 78% anunciado semanas atrás. Los datos se obtuvieron con pruebas realizadas a 12.508 voluntarios en el país, todos ellos profesionales de la salud en contacto directo con el coronavirus [40]. Quedaría por determinar si la eficacia de esta vacuna se mantiene en estos niveles (que rozan el umbral de aprobación) frente a las nuevas variantes que han comenzado a expandirse de forma dramática en el país en el último mes.

La Tabla 1 recoge un resumen de las principales características de las tres variantes descritas en las secciones precedentes.

Tabla 1: Principales características de las variantes virales emergentes de SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (Wuhan)



Variantes	VOC 20212/01 (B.1.1.7)	501 Y.V2 (B.1.351)	P.1 (B.1.1.28.1)
1ra detección	Septiembre de 2020	8 de Octubre de 2020	2 de enero de 2021
Lugar de detección	Reino Unido	Sudáfrica	Japón/Brasil
# Mutaciones en proteína S	8 mutaciones: N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H 2 deleciones: H69-V70del, Y144	9 mutaciones: L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V 1 deleción: LAL 242-244 del	12 mutaciones: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F
# Países con casos detectados	80	41	10
Presencia en España	Si	Si	Si
Riesgo potencial	-Mayor transmisibilidad -Mayor gravedad de la enfermedad -Reducción modesta en la efectividad de neutralización de sueros inmunes de pacientes convalecientes y vacunados	-Mayor transmisibilidad -Mayor tasa de reinfección -Reducción significativa en la efectividad de neutralización de sueros inmunes de pacientes convalecientes y vacunados	-Mayor transmisibilidad -Mayor tasa de reinfección -Reducción significativa en la efectividad de neutralización de sueros inmunes de pacientes convalecientes y vacunados

d. Otras variantes en expansión

En Estados Unidos, el país más afectado por la pandemia y con mayor incidencia de casos a nivel global, se ha comunicado en los últimos meses la presencia de todas las variantes anteriores; sin embargo, preocupa la expansión de la variante L452R detectada por primera vez en Dinamarca en marzo de 2020 y luego identificada en los EE.UU. El Departamento de Salud Pública de California, en coordinación con el condado de Santa Clara y la Universidad de California, anunció el 17 de enero de 2021 que la variante del SARS-CoV-2 L452R estaba siendo detectada con mayor frecuencia en varios condados del estado de California. La proporción de casos de COVID-19 asociados con esta variante aumentó del 3,8% en noviembre al 25% desde finales de diciembre hasta principios de enero. Sin embargo, se han secuenciado relativamente pocas muestras y la secuenciación no se realiza de manera uniforme en todo el estado, lo que dificulta hacer una estimación más precisa de la expansión de esta variante [41].

El 26 de enero de 2021, el conjunto de datos del COG-UK (secuencias totales 214,159) desveló la mutación E484K en 11 secuencias B.1.1.7. a la que han bautizado como **variante Kent**. El comité médico de los hospitales de París, advirtió que la variante Kent representa ahora hasta el 20% de las infecciones en la región de París, advirtiendo que las medidas actuales no son suficientes para frenar la propagación del virus del Reino Unido a Francia u otros países de Europa. La combinación de E484K con las mutaciones restantes que acumula la variante británica empeora las predicciones de eficacia que se han realizado tanto con sueros de pacientes convalecientes como con suero de pacientes vacunados, probablemente llegando a igualar los resultados obtenidos frente a la variante sudafricana. Esto ha acelerado la **decisión de muchas de las empresas que producen las vacunas actuales a plantearse la posibilidad de ajustar sus diseños para cubrir las variantes virales en circulación**. Sin embargo, **otras estrategias que incluyan diseños multivalentes** o que se focalicen en regiones conservadas de diferentes proteínas virales pudieran ser de gran relevancia desde el punto de vista profiláctico **para contrarrestar las variantes de escape** que se están generando tanto por la presión inmune como por las altas incidencias de infección que se producen a nivel global. Desde el punto de **vista terapéutico**, el uso de una **combinación de anticuerpos** dirigidos a diferentes regiones del virus o la exploración de la **estrategia llamada “mutagénesis letal”** (conseguir que el virus mute tanto que, al final, muera) pudieran ser alternativas que frenen la diversificación viral y el incremento en las tasas de mutación que estamos observando en la actualidad.

5. Inmunidad T frente a coronavirus en relación con estrategias de vacunación

Se ha observado que la inmunidad T frente a SARS-CoV-2 es relevante para el control de la viremia. El virus provoca una linfopenia que afecta tanto a células B como a células T, CD4 y CD8. Los estudios en individuos con síntomas moderados, severos y que han superado la infección demuestran que existe todo un rango de respuestas T frente al virus. Durante la infección aguda las células T presentan un alto grado de respuesta citotóxica, mientras que los convalecientes muestran una respuesta de tipo memoria. Cada vez es más claro que la inmunidad celular participa en la resolución de la COVID-19. Un estudio reciente ha observado la aparición de mutaciones en epítomos virales que se presentan en el contexto de MHC-I a células CD8. Esto puede representar una estrategia de evasión del virus frente al sistema inmune adaptativo. Las mutaciones detectadas no son frecuentes aún en la población, probablemente debido al reducido tiempo transcurrido [42]. En pacientes que han superado la infección o fueron asintomáticos con PCR positiva se ha observado que el nivel de células T CD4 y CD8 memoria-específicas y polifuncionales detectadas permanecen desde aproximadamente un mes tras la infección hasta, al menos, 6 meses después. Las células T dejan de reconocer algunos epítomos virales concretos, aunque su respuesta global sigue siendo robusta [43]. Esta misma conclusión se extrae de un estudio reciente que analiza el reconocimiento por parte de linfocitos T CD4+ y CD8+ de numerosos epítomos del SARS-CoV2 presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase II y clase I, respectivamente. Lo más destacable del estudio es que, frente a una localización más restringida de las regiones dominantes reconocidas por anticuerpos o por linfocitos T CD4, los epítomos reconocidos por los linfocitos CD8 están más dispersos y distribuidos uniformemente en varias proteínas virales [44]. Los linfocitos T citotóxicos reconocen un repertorio grande de epítomos de SARS-CoV-2 [45]. Sin embargo, una cuestión por explorar es si las mutaciones en epítomos individuales afectan al control inmune del virus por

parte de la inmunidad celular T. Esto es de especial importancia para las vacunas frente a proteínas individuales de SARS-CoV-2, que pueden generar respuestas frente a un número limitado de epítomos. Es plausible que los linfocitos T sean más refractarios que los anticuerpos a las amenazas de las variantes virales, al reconocer cada individuo un mínimo de 30-40 epítomos diferentes [44].

6. ¿Son las variantes de SARS-CoV-2 más resistentes a la acción de las vacunas y menos sensibles a los tratamientos? ¿Qué hacer?

Existen varias líneas de acción para establecer el papel que juegan las mutaciones introducidas en el genoma del SARS-CoV-2 sobre resistencia a la acción de las respuestas inmunes inducidas por las vacunas actuales, mayoritariamente dirigidas frente a la proteína S. Con esta finalidad, la comunidad científica, la OMS, y otras organizaciones han alertado de la **necesidad de establecer experimentalmente** ensayos que permitan valorar las características fenotípicas de las distintas variantes ya identificadas (y las venideras) y en particular su capacidad para escapar a la respuesta inmune desarrollada frente a una vacuna COVID-19. Las aproximaciones más relevantes a tener en cuenta son las siguientes: 1) valoración en modelos animales (ratones humanizados susceptibles al virus, hámster, hurón y macacos) sobre la virulencia de dichas variantes, determinando si su transmisión, replicación, afectación de órganos, morbilidad y mortalidad es la misma que la de la cepa parental de Wuhan; 2) determinación de la capacidad de neutralización de los sueros inmunes de sujetos vacunados con vacunas que ya están autorizadas en la Unión Europea (como las vacunas basadas en ARNm (Pfizer, Moderna), adenovirus (AstraZeneca) como las que están en desarrollo (Curevac, Janssen) y otras que están autorizadas en otras partes del mundo (Sinovac, Gamaleya); 3) determinar también en qué grado la respuesta celular T es capaz de controlar la infección en aquellos casos en que la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación no la controla; 4) seguimiento por los responsables de la vigilancia epidemiológica de cada país de la aparición de casos de COVID-19 producidos por una nueva variante en personal ya vacunado.

Aunque aún no hay datos firmes sobre el efecto protector de las vacunas actuales (ni de las que están en desarrollo) frente a las variantes, ya se comenta en los medios de comunicación que varias compañías farmacéuticas **estudian la producción de vacunas introduciendo las mutaciones observadas en las variantes** con la finalidad de cubrir ese escape inmune e **incrementar la acción neutralizante de sus vacunas**. La implicación es que se dispondría en el mercado de **nuevas vacunas de las mismas empresas fabricantes**, que podrían administrarse bien a aquellas personas ya vacunadas como dosis recuerdo, o a las que aún no hayan recibido la dosis vacunal. Estas nuevas vacunas modificadas en sus distintas plataformas supondrían **costes adicionales a los países** y podrían a su vez generar, debido a la presión selectiva del sistema inmune, variantes más resistentes y con mutaciones adicionales. Esperemos que esto no ocurra, pero en cualquier caso hay que **seguir vigilantes sobre la evolución del SARS-CoV-2**.

Ante esta inquietud creciente, la Agencia Europea de Medicamentos ha publicado en su página web [46] un documento que pone de manifiesto el problema e indica que en un breve plazo se publicará una guía de los requisitos a tener en cuenta para fabricar vacunas frente a las nuevas variantes.

Además del peligro de evasión de la vacuna, las nuevas mutaciones pueden conferir al virus resistencia a tratamientos antivirales. Un ejemplo es el de Remdesivir, un antiviral desarrollado contra el virus del Ébola, con actividad demostrada *in vitro* contra SARS-CoV-2 [47] y que se está usando de forma experimental en tratamiento a pacientes. Estudios recientes han vinculado algunas variantes en la *RNA-dependent RNA-polymerase* (correspondientes a los residuos F480; V557; F480+V553; F480+V557) con susceptibilidad reducida al Remdesivir (entre 2.4- y 6 veces menos) [48]. Recientemente se han comunicado casos de variantes emergentes (D484Y en la *RNA-dependent RNA-polymerase*) que confieren resistencia al tratamiento con Remdesivir en pacientes [49].

Es deseable que estos escenarios no ocurran, pero de hecho la emergencia de variantes que potencialmente pueden afectar a los sitios de unión a los fármacos antivirales y generar resistencias a tratamientos o escapes a las vacunas es continua [50] y refuerza la importancia de una vigilancia constante de la evolución del SARS-CoV-2 [51].

7. Seguimiento en la población por secuenciación genómica

Para poder detectar la aparición de nuevas variantes o la introducción de variantes diferentes a las que están en circulación en un país o región determinada, es imprescindible la ampliación en todo el mundo de las **labores de secuenciación genómica e intercambio de datos**, junto con una mayor colaboración científica que permita dar respuesta a incógnitas fundamentales, ya que la secuenciación de genomas completos es la única forma científica y práctica de garantizar la detección de nuevas variantes. Hasta ahora **se han compartido públicamente 481.489 secuencias**, lo que es una cifra asombrosa; sin embargo, la mayoría de ellas provienen de unos pocos países. La mejora de la cobertura geográfica de la secuenciación es esencial para que el mundo capte adecuadamente los cambios en el virus y establezca medidas alternativas. El aumento de la capacidad de secuenciación es un área de investigación prioritaria para la OMS. Para poder alcanzar este objetivo, se han establecido una serie de recomendaciones dentro de las que destaca la necesidad de disponer o de implementar una red de laboratorios con capacidad de secuenciación, integrados dentro del sistema de vigilancia epidemiológica que permitan generar información útil para la toma de decisiones de medidas de salud pública y asegurarse de que haya recursos disponibles para administrar un número creciente de solicitudes de detección y caracterización de muestras de COVID-19.

El Reino Unido ha desarrollado el esfuerzo de secuenciación más amplio y consistente con más de 200.000 genomas secuenciados y analizados (233,139 a fecha de 11 de enero de 2021). Es, por tanto, interesante analizar su funcionamiento y extraer algunas conclusiones para futuras implementaciones en nuestro país.

En UK la responsabilidad del rastreo de variantes está dividida entre las cuatro naciones. “Public Health England”, como organismo de salud pública, es responsable del plan de pruebas, rastreo y aislamiento en Inglaterra. Como los otros cuatro sistemas de salud, dispone de una base de datos para los resultados de las pruebas y el rastreo de contactos, a la que tienen acceso los equipos locales de protección de la salud. Una selección (en parte aleatoria, en parte de diseño) de muestras analizadas positivas se envía a “COG Genomics” [52], **el consorcio de genómica del Reino Unido, con integrantes tanto locales como nacionales.** El integrante individual más grande está en el **Wellcome Sanger Institute**, que secuencia entre el 60-70% de



las muestras, pero también hay una capacidad de secuenciación distribuida, a menudo asociada con los hospitales académicos. Todas las muestras secuenciadas deben depositarse en la **base de datos central de COG Genomics en CLIMB** [53]. Las muestras se envían con metadatos de nivel medio y un identificador de seguimiento anónimo. COG Genomics está facultado para realizar análisis directamente (sistema de nube CLIMB) y enviarlos a la base de datos abierta ENA y a GISAID con el conjunto de metadatos públicos acordados (un subconjunto de los metadatos que pueden mantenerse en CLIMB). Tanto los datos de fenotipos (en particular las pruebas), como los **datos de COG Genomics, se importan al Joint Biosecurity Center** [54] que proporciona un resultado considerado "versión única de la verdad" (por ejemplo, "Nowcast" de la prevalencia existente). En este entorno, el identificador de seguimiento anónimo de la parte genómica de COG puede combinarse con el componente fenotípico y de localización para tener un gráfico de contactos y variantes de modo sistemático. Adicionalmente, la información también se entrega a los equipos de epidemiología (SPI-M, parte de SAGE) que realizan tareas específicas de análisis que complementan el flujo principal sistemático de obtención de modelos semanales de rutina ejecutados por JBC.

Aunque el sistema está en pleno funcionamiento, no es perfecto y está evolucionando, incluyendo cambios de actores y responsabilidades para adaptarse a las nuevas situaciones. Las recomendaciones derivadas de esta experiencia incluyen:

- Es importante lograr el mayor nivel posible de agregación de datos, en el caso de UK, los cuatro sistemas de salud.
- El manejo de las placas de muestras que pasan de los centros de recogida a los de secuenciación donde son reorganizadas representa un punto crítico y un enorme esfuerzo logístico.
- El "flujo" de genómica y el "flujo" de prueba se mantienen separados debido a sus diferentes tiempos y flujos de procesamiento, pero tienen identificadores anónimos clave para permitir analizarlos conjuntamente.
- Los datos de genómica y su interpretación epidemiológica tienen un objetivo claro en la divulgación en publicaciones científicas en tiempos más largos a los que son requeridos para la detección y seguimiento de variantes en el sistema de salud. Ambas realidades son compatibles, pero no deben confundirse, ni oponerse.
- Es fundamental disponer de entornos de nube seguros para el análisis de datos. JBC opera un esquema de nube segura (también conocido como un entorno de investigación confiable) donde los investigadores acreditados disponen de todos los datos para el análisis.
- La puesta en marcha de un servicio de datos profesional (JBC) que soporta el flujo de datos de rutina es un componente esencial del sistema (JBC desarrolla funciones que son típicas de las bases de datos bioinformáticas – por ejemplo, el análisis de los sesgos de metadatos, gestión de fuentes de datos de baja calidad e imperfectos, gestión de datos duplicados característicos de los datos genómicos)

En España, el **Ministerio de Sanidad ha publicado un nuevo protocolo para potenciar la secuenciación del genoma del coronavirus**. Lo ha hecho a instancia de la Comisión Europea que ha indicado a **todos los países miembros que deben secuenciar al menos el 2% de sus muestras positivas**, esperando que con la reducción del número de casos este número sea equivalente al 5% de casos y pueda aumentarse hasta el 10% como objetivo preferible. Además, propone coordinar las distintas iniciativas de secuenciación, con el objetivo de establecer sistemas homologables de recogida de muestras, secuenciación y análisis [1-3]. Es de esperar que estas

iniciativas lleguen a representar un cambio tanto cualitativo como cuantitativo en el seguimiento de las nuevas variantes, además de servir para establecer las bases para futuras iniciativas de epidemiología viral basadas en secuenciación. El proyecto completo de recogida de muestras, identificación y anotación de datos clínicos, secuenciación, análisis y distribución de resultados, requiere una considerable infraestructura distribuida y coordinada, que en el caso del Reino Unido y Dinamarca ha sido posible gracias a la existencia de una red previa puesta a punto para sus proyectos de medicina genómica y la existencia de centros de secuenciación especializados. En particular, es relevante la aportación de las técnicas de secuenciación de fragmentos largos, que reducen el tiempo de secuenciación a unas pocas horas, siendo el paso limitante la obtención inicial de amplicones por PCR más que la propia secuenciación.

En España, los reactivos y el instrumental necesario para obtener un mapa completo del virus pueden suponer un coste de unos 200 euros por muestra y un tiempo de análisis entre siete y diez días. El ejemplo de UK demuestra la importancia que tiene para el control de variantes el acortar estos tiempos y como la organización del proceso puede reducir tiempos y costes. Para ello es necesario la coordinación logística entre los equipos en los hospitales y centros de secuenciación locales, con el soporte de centros de secuenciación con grandes recursos, y en todos ellos disponer además del personal técnico adecuado, puesto que el proceso de secuenciación e interpretación de variantes sigue siendo laborioso y técnicamente complejo.

A nivel organizativo, el documento de “Integración de la secuenciación genómica *en la vigilancia del SARS-CoV-2*” plantea la necesidad de incluir, como parte esencial de la vigilancia de la enfermedad COVID-19, los datos generados mediante secuenciación genómica de la circulación de variantes y su detección precoz en España [55]. El mencionado documento ha sido aprobado por la Ponencia de Alertas y por la Comisión de Salud Pública, y apuesta por **la creación de una Red de Laboratorios de Secuenciación** para cubrir las necesidades crecientes de secuenciación. **El Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) (CNM-ISCIII), coordina la red de laboratorios y declarará los casos al ECDC y OMS.**

La coordinación de esta red conlleva la integración y optimización de las capacidades de secuenciación disponibles en el país, para lo cual el CNM-ISCIII ha iniciado los contactos correspondientes. La estandarización de procedimientos, la creación de un repositorio común de secuencias con el objetivo de la vigilancia de las nuevas variantes del virus, y la integración de información genómica y epidemiológica, son otras de las principales funciones de la coordinación de esta red. Para ello es imprescindible la cooperación multidisciplinar entre los servicios de Salud Pública de las CCAA y los laboratorios.

En cuanto al esfuerzo de secuenciación, el CNM-ISCIII está escalando sus capacidades de secuenciación a la semana, actualmente en 200 secuencias, para poder alcanzar en breve las 700 secuencias semanales. Actualmente se ha depositado más de 600 secuencias en GISAD, de las que entre diciembre de 2020 y febrero de 2021, el 50% correspondían a la variante B.1.177, con alrededor del 55% de los casos estudiados y 30% pertenecían a la variante británica VOC 202012/01 (linaje B.1.1.7) (porcentajes no representativos dado el marcado sesgo de selección de las muestras, ya que muchos casos se han remitido a secuenciar por alta sospecha de la variante británica).

El proyecto SeqCOVID [56], un proyecto de investigación financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el CSIC, del que forman parte hospitales y laboratorios de todas las comunidades

autónomas, **aporta al GISAID el 86,3% de las secuencias procedentes de España.** Desde el comienzo del proyecto han compartido 6.230 secuencias, que representan el 1,3% del total de secuencias aportadas a GISAID a nivel global y el 0,21% del total de casos confirmados en España. El desarrollo de seqCOVID ha implicado la capacitación de los hospitales asociados al proyecto para secuenciar y compartir los resultados en un repositorio común, donde se puede monitorizar el nivel de desarrollo de cada centro, de cara a su integración en la red nacional de vigilancia epidemiológica.

Entre los proyectos a nivel regional cabe destacar el del sistema Andaluz de salud [57], que ha llevado a cabo la secuenciación de cerca de 1000 genomas virales ya depositados en la base de datos ENA y en la Base Poblacional de Salud [58], vinculadas a los datos clínicos de los pacientes, para posibles análisis secundarios en el futuro. Los genomas han sido seleccionados de forma proporcional a la distribución de población en Andalucía y recogidas en los 16 hospitales terciarios principales de la región [57]. Este proyecto ha generado un circuito clínico y una infraestructura que ha constituido las bases para una Instrucción [59] mediante la cual se han empezado a recoger desde principios de febrero unas 400 muestras semanales de coronavirus para su secuenciación, como parte del Sistema Integrado de Epidemiología Genómica de Andalucía [60], comunicando sus resultados al Ministerio de Sanidad siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Otros proyectos en Cataluña [61] y Galicia [62] contribuyen con cifras más pequeñas al conjunto global de secuencias disponibles.

Finalmente, es importante resaltar que secuenciar sistemáticamente es importante tanto para progresar en el conocimiento científico de la generación y progresión de las variantes, por ejemplo, para conocer la relación con el incremento de la presión de selección en enfermos grave o la posible recombinación de variantes en los mismos, como, más allá de las variantes actuales de SARS-CoV-2, para establecer las relaciones con el resto del ecosistema viral y establecer y detectar las epidemias en su origen.

8. Sistema de representación y análisis de la información

Tradicionalmente los virólogos han almacenado y organizado la información sobre genomas virales en el sistema de GISAID [18], convirtiéndolo en el sistema más común para la representación y gestión de la información. El software de Nextstrain [63] permite la representación de la divergencia filogenética y distribución geográfica, así como la instanciación para proyectos concretos (por ejemplo, ver las implementaciones en el Instituto de Biomedicina de Valencia IBV-CSIC [64] y Andalucía [65]).

Sin embargo, GISAID, adolece de algunos problemas graves. Por una parte, es un sistema cerrado del que no se puede extraer la información depositada, por otra parte, admite secuencias completas sin comprobar la calidad del ensamblaje del que derivan y no garantiza que se hayan ensamblado con un procedimiento estándar. Además, GISAID no contiene la información experimental original (datos en bruto de la secuenciación) lo que hace imposible detectar variantes menores en la población de virus secuenciadas.

Como alternativa a este sistema, el EMBL ha organizado entorno a la base de datos ENA [66] de secuencias genómicas del virus, el sistema completo para procesar datos de secuenciación de

modo homogéneo, garantizar su calidad, anotar variantes menores, y hacer accesibles de forma abierta las secuencias completas junto a los datos originales. Una iniciativa que tiene como objetivo tanto la accesibilidad como la garantía de la calidad de la información.

En este sentido, dos desarrollos son particularmente relevantes: ViralBeacon - el sistema de detección de información sobre la presencia de variantes en los genomas víricos así como la meta-información sobre el origen y características de las muestras - desarrollado por el CRG [67] y la implementación de un conjunto de flujo de trabajo computacionales - incluido el ensamblaje de los genomas virales- en la plataforma de análisis Galaxy [68], con una importante contribución europea.

El portal europeo COVID-19, promovido por el EMBL y ELIXIR [69], facilita el acceso a toda esta información así como a sistemas de análisis, de modo abierto y accesible, incluyendo más de 270,000 genomas virales. España como otros países europeos dispone de su propia instancia del portal europeo [70] para facilitar el acceso a las secuencias producidas en España así como la información y datos de los otros proyectos financiados por el Instituto de la Salud Carlos III (ISCIII) en investigación sobre COVID-19 (fondos COVID, [71]), y desarrollos de modo similar a los de otros países Europeos (por ejemplo, Suecia [72]).

9. Interpretación de las variantes por métodos computacionales

Para poder progresar en la interpretación de las consecuencias funcionales de las nuevas variantes es importante **disponer de las correspondientes estructuras tridimensionales de cada nueva variante detectada**. En este caso, principalmente de la proteína S de SARS-CoV-2. Dado que ya existen varias estructuras de la proteína nativa en varias conformaciones [73,74], debe resultar relativamente rápido obtener estructuras de las distintas variantes por técnicas de reemplazamiento molecular en el caso de la cristalografía o usando las obtenidas por microscopía electrónica, aunque mantener el ritmo y producir sistemáticamente estructuras para cada nueva variante (combinación de mutaciones) a medida que su número crezca, será un desafío.

Alternativamente, los métodos de biología computacional para predecir las consecuencias de las mutaciones en la estructura de la proteína S, i.e., simulaciones moleculares [75-77], métodos basados en aprendizaje como FoldX [78], son adecuados para predecir pequeños cambios puntuales, pero tienen problemas con los cambios estructurales producidos por un conjunto de variantes en una proteína. Por tanto, las nuevas variantes representan un problema complejo para los métodos computacionales actuales que pueden servir de guía a experimentos específicos, pero no son suficientes por sí solos para dar respuestas definitivas.

Además, la predicción de la estructura de las variantes es solo la primera parte del problema, que continúa con la predicción de la interacción de las nuevas estructuras con el receptor celular (o los otros potenciales receptores – [79,80]) o los distintos anticuerpos. El problema de la interacción entre proteínas es aún más complejo que la predicción de la estructura y los métodos de *docking* actuales son insuficientes – aún más cuando se trata de determinar diferencias cuantitativas en la capacidad de unión, p. ej. kcal de energía de unión [81].

Además de la interacción de la proteína S, otras de las proteínas del virus juegan un papel crucial en el mecanismo molecular de la infección viral. Por ejemplo, mutaciones en la *RNA-dependent-RNA polymerase* podrían reducir la fidelidad de la copia y hacer aparecer resistencias a tratamientos antivirales, un mecanismo descrito ya en otros virus [82]. La publicación del mapa de interacción de las proteínas del SARS_CoV-2 con las proteínas humanas [83] ha facilitado la construcción del mapa de la enfermedad de la COVID-19 por un consorcio internacional [84]. La disponibilidad de este mapa permite un abordaje terapéutico integral no solo basado en antivirales que bloqueen la entrada del virus, sino que actúen a distintos niveles del mecanismo de infección [85]. Pero también permite comprender en detalle, desde una perspectiva de biología de sistemas, las implicaciones que las mutaciones de otras proteínas virales pueden tener sobre el proceso de infección, así como sus consecuencias patológicas en procesos graves posteriores, como tormentas de citoquinas [86], coagulopatías [87], etc.

En definitiva, la predicción de las implicaciones de las variantes, y en concreto las predicciones de las consecuencias de las mutaciones para las interacciones de la proteína S representan un problema científico complejo que seguirá requiriendo investigación básica en biología y bioinformática estructural.

10. Bibliografía

1. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Detection-and-characterisation-capability-for-SARS-CoV-2-variants-EU%20EEA.pdf>
2. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_21_641
3. https://www.ciencia.gob.es/portal/site/MICINN/menuitem.edc7f2029a2be27d7010721001432ea0/?vgnnextoid=dbff2d30e88c7710VgnVCM1000001d04140aRCRD&vgnnextchannel=cf091f4368aef110VgnVCM1000001034e20aRCRD&lang_chosen=gl
4. <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00305-7>
5. <https://elixir-europe.org/platforms/data/core-data-resources>
6. Denison, M.R.; Graham, R.L.; Donaldson, E.F.; Eckerle, L.D.; Baric, R.S. Coronaviruses: An RNA Proofreading Machine Regulates Replication Fidelity and Diversity. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 270–279, doi:10.4161/rna.8.2.15013.
7. Davies, N.G.; Barnard, R.C.; Jarvis, C.I.; Kucharski, A.J.; Munday, J.; Pearson, C.A.B.; Russell, T.W.; Tully, D.C.; Abbott, S.; Gimma, A.; et al. Estimated Transmissibility and Severity of Novel SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 in England. *medRxiv* **2020**, 2020.12.24.20248822, doi:10.1101/2020.12.24.20248822.
8. Risk Related to the Spread of New SARS-CoV-2 Variants of Concern in the EU/EEA – First Update Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-risk-assessment-spread-new-variants-concern-eueea-first-update> (accessed on 28 January 2021).
9. Davies, N.G.; Jarvis, C.I.; Group, C.C.-19 W.; Edmunds, W.J.; Jewell, N.P.; Diaz-Ordaz, K.; Keogh, R.H. Increased Hazard of Death in Community-Tested Cases of SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01. *medRxiv* **2021**, 2021.02.01.21250959, doi:10.1101/2021.02.01.21250959.
10. Preliminary Genomic Characterisation of an Emergent SARS-CoV-2 Lineage in the UK Defined by a Novel Set of Spike Mutations - SARS-CoV-2 Coronavirus / NCoV-2019 Genomic Epidemiology Available online: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563> (accessed on 28 January 2021).

11. Starr, T.N.; Greaney, A.J.; Hilton, S.K.; Ellis, D.; Crawford, K.H.D.; Dingens, A.S.; Navarro, M.J.; Bowen, J.E.; Tortorici, M.A.; Walls, A.C.; et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell* **2020**, *182*, 1295–1310.e20, doi:10.1016/j.cell.2020.08.012.
12. Gu, H.; Chen, Q.; Yang, G.; He, L.; Fan, H.; Deng, Y.-Q.; Wang, Y.; Teng, Y.; Zhao, Z.; Cui, Y.; et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c Mice for Testing Vaccine Efficacy. *Science* **2020**, *369*, 1603–1607, doi:10.1126/science.abc4730.
13. Golubchik, T.; Lythgoe, K.A.; Hall, M.; Ferretti, L.; Fryer, H.R.; MacIntyre-Cockett, G.; Cesare, M. de; Trebes, A.; Piazza, P.; Buck, D.; et al. Early Analysis of a Potential Link between Viral Load and the N501Y Mutation in the SARS-COV-2 Spike Protein. *medRxiv* **2021**, 2021.01.12.20249080, doi:10.1101/2021.01.12.20249080.
14. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 779–784.e5, doi:10.1016/j.molcel.2020.04.022.
15. Meng, T.; Cao, H.; Zhang, H.; Kang, Z.; Xu, D.; Gong, H.; Wang, J.; Li, Z.; Cui, X.; Xu, H.; et al. The Insert Sequence in SARS-CoV-2 Enhances Spike Protein Cleavage by TMPRSS. *bioRxiv* **2020**, 2020.02.08.926006, doi:10.1101/2020.02.08.926006.
16. Kemp, S.A.; Harvey, W.T.; Lytras, S.; Consortium, T.C.-19 G.U. (COG-U.; Carabelli, A.M.; Robertson, D.L.; Gupta, R.K. Recurrent Emergence and Transmission of a SARS-CoV-2 Spike Deletion H69/V70. *bioRxiv* **2021**, 2020.12.14.422555, doi:10.1101/2020.12.14.422555.
17. McCarthy, K.R.; Rennick, L.J.; Nambulli, S.; Robinson-McCarthy, L.R.; Bain, W.G.; Haidar, G.; Duprex, W.P. Recurrent Deletions in the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Drive Antibody Escape. *bioRxiv* **2021**, 2020.11.19.389916, doi:10.1101/2020.11.19.389916.
18. <https://www.gisaid.org>
19. Xie, X.; Zou, J.; Fontes-Garfias, C.R.; Xia, H.; Swanson, K.A.; Cutler, M.; Cooper, D.; Menachery, V.D.; Weaver, S.; Dormitzer, P.R.; et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 Vaccine-Elicited Sera. *Nat Med* **2021**, doi:10.1038/s45191-021-01270-4
20. Collier, D.A.; Meng, B.; Ferreira, I.; Datir, R.; Collaboration, T.C.-N.B.C.-19; Temperton, N.; Elmer, A.; Kingston, N.; Graves, B.; McCoy, L.E.; et al. Impact of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Spike Variant on Neutralisation Potency of Sera from Individuals Vaccinated with Pfizer Vaccine BNT162b2. *medRxiv* **2021**, 2021.01.19.21249840, doi:10.1101/2021.01.19.21249840.
21. Muik, A.; Wallisch, A.-K.; Sängler, B.; Swanson, K.A.; Mühl, J.; Chen, W.; Cai, H.; Sarkar, R.; Türeci, Ö.; Dormitzer, P.R.; et al. Neutralization of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Pseudovirus by BNT162b2 Vaccine-Elicited Human Sera. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.18.426984, doi:10.1101/2021.01.18.426984.
22. Wang, P.; Liu, L.; Iketani, S.; Luo, Y.; Guo, Y.; Wang, M.; Yu, J.; Zhang, B.; Kwong, P.D.; Graham, B.S.; et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7 to Antibody Neutralization. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.25.428137, doi:10.1101/2021.01.25.428137.
23. Wu, K.; Werner, A.P.; Moliva, J.I.; Koch, M.; Choi, A.; Stewart-Jones, G.B.E.; Bennett, H.; Boyoglu-Barnum, S.; Shi, W.; Graham, B.S.; et al. mRNA-1273 Vaccine Induces Neutralizing Antibodies against Spike Mutants from Global SARS-CoV-2 Variants. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.25.427948, doi:10.1101/2021.01.25.427948.
24. Gamage, A.M.; Tan, K.S.; Chan, W.O.Y.; Liu, J.; Tan, C.W.; Ong, Y.K.; Thong, M.; Andiappan, A.K.; Anderson, D.E.; Wang, D.Y.; et al. Infection of Human Nasal Epithelial Cells with SARS-CoV-2 and a 382-Nt Deletion Isolate Lacking ORF8 Reveals Similar Viral Kinetics and Host Transcriptional Profiles. *PLOS Pathog.* **2020**, *16*, e1009130, doi:10.1371/journal.ppat.1009130.

25. Tegally, H.; Wilkinson, E.; Giovanetti, M.; Iranzadeh, A.; Fonseca, V.; Giandhari, J.; Doolabh, D.; Pillay, S.; San, E.J.; Msomi, N.; 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* **2020**, 2020.12.21.20248640, doi:10.1101/2020.12.21.20248640.
26. Nelson, G.; Buzko, O.; Spilman, P.; Niazi, K.; Rabizadeh, S.; Soon-Shiong, P. Molecular Dynamic Simulation Reveals E484K Mutation Enhances Spike RBD-ACE2 Affinity and the Combination of E484K, K417N and N501Y Mutations (501Y.V2 Variant) Induces Conformational Change Greater than N501Y Mutant Alone, Potentially Resulting in an Escape Mutant. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.13.426558, doi:10.1101/2021.01.13.426558.
27. Wang, Z.; Schmidt, F.; Weisblum, Y.; Muecksch, F.; Barnes, C.O.; Finklin, S.; Schaefer-Babajew, D.; Cipolla, M.; Gaebler, C.; Lieberman, J.A.; et al. mRNA Vaccine-Elicited Antibodies to SARS-CoV-2 and Circulating Variants. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.15.426911, doi:10.1101/2021.01.15.426911.
28. Wibmer, C.K.; Ayres, F.; Hermanus, T.; Madzivhandila, M.; Kgagudi, P.; Lambson, B.E.; Vermeulen, M.; Berg, K. van den; Rossouw, T.; Boswell, M.; et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 Escapes Neutralization by South African COVID-19 Donor Plasma. *bioRxiv* **2021**, 2021.01.18.427166, doi:10.1101/2021.01.18.427166.
29. Cele, S.; Gazy, I.; Jackson, L.; Hwa, S.-H.; Tegally, H.; Lustig, G.; Giandhari, J.; Pillay, S.; Wilkinson, E.; Naidoo, Y.; et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 Variants from Neutralization by Convalescent Plasma. *medRxiv* **2021**, 2021.01.26.21250224, doi:10.1101/2021.01.26.21250224.
30. Greaney, A.J.; Loes, A.N.; Crawford, K.H.D.; Starr, T.N.; Malone, K.D.; Chu, H.Y.; Bloom, J.D. Comprehensive Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain That Affect Recognition by Polyclonal Human Serum Antibodies. *bioRxiv* **2021**, 2020.12.31.425021, doi:10.1101/2020.12.31.425021.
31. Callaway, E.; Mallapaty, S. Novavax Offers First Evidence That COVID Vaccines Protect People against Variants. *Nature* **2021**, doi:10.1038/d41586-021-00268-9.
32. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.10.21251247v1>
33. Genomic Characterisation of an Emergent SARS-CoV-2 Lineage in Manaus: Preliminary Findings - SARS-CoV-2 Coronavirus / NCoV-2019 Genomic Epidemiology Available online: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manau-preliminary-findings/586> (accessed on 3 February 2021).
34. Buss, L.F.; Prete, C.A.; Abraham, C.M.M.; Mendrone, A.; Salomon, T.; Almeida-Neto, C. de; França, R.F.O.; Belotti, M.C.; Carvalho, M.P.S.S.; Costa, A.G.; et al. Three-Quarters Attack Rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a Largely Unmitigated Epidemic. *Science* **2021**, 371, 288–292, doi:10.1126/science.abe9728.
35. Sabino, E.C.; Buss, L.F.; Carvalho, M.P.S.; Prete, C.A.; Crispim, M.A.E.; Fraiji, N.A.; Pereira, R.H.M.; Parag, K.V.; Peixoto, P. da S.; Kraemer, M.U.G.; et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite High Seroprevalence. *The Lancet* **2021**, 0, doi:10.1016/S0140-6736(21)00183-5.
36. <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596>
37. SARS-CoV-2 Reinfection by the New Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil - SARS-CoV-2 Coronavirus / NCoV-2019 Genomic Epidemiology Available online: <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596> (accessed on 4 February 2021).
38. Jangra, S.; Ye, C.; Rathnasinghe, R.; Stadlbauer, D.; Group, P. study; Krammer, F.; Simon, V.; Martinez-Sobrido, L.; García-Sastre, A.; Schotsaert, M. The E484K Mutation in the SARS-CoV-2 Spike Protein Reduces but Does Not Abolish Neutralizing Activity of Human

- Convalescent and Post-Vaccination Sera. *medRxiv* **2021**, 2021.01.26.21250543, doi:10.1101/2021.01.26.21250543.
39. Ledford, H. Could Mixing COVID Vaccines Boost Immune Response? *Nature* **2021**, doi:10.1038/d41586-021-00315-5.
 40. Mallapaty, S. China COVID Vaccine Reports Mixed Results — What Does That Mean for the Pandemic? *Nature* **2021**, doi:10.1038/d41586-021-00094-z.
 41. COVID-19: Here's What We Know about the L452R Variant That Was Found in Humboldt County. *Times-Stand*. 2021.
 42. Agerer, B.; Koblischke, M.; Gudipati, V.; Smyth, M.; Popa, A.; Genger, J.-W.; Endler, L.; Florian, D.M.; Mühlgrabner, V.; Lercher, A.; et al. SARS-CoV-2 Escapes CD8 T Cell Surveillance via Mutations in MHC-I Restricted Epitopes. *bioRxiv* **2020**, 2020.12.18.423507, doi:10.1101/2020.12.18.423507.
 43. Breton, G.; Mendoza, P.; Hägglöf, T.; Oliveira, T.Y.; Schaefer-Babajew, D.; Gaebler, C.; Turroja, M.; Hurley, A.; Caskey, M.; Nussenzweig, M.C. Persistent Cellular Immunity to SARS-CoV-2 Infection. *J. Exp. Med.* **2021**, 218, doi:10.1084/jem.20202515.
 44. Tarke et al., *Cell Reports Med* 2, 100204 Feb 2021 (doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100204).
 45. Altmann, D.M.; Boyton, R.J. SARS-CoV-2 T Cell Immunity: Specificity, Function, Durability, and Role in Protection. *Sci. Immunol.* **2020**, 5, doi:10.1126/sciimmunol.abd6160.
 46. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-preparing-guidance-tackle-covid-19-variants>
 47. Martinot M, Jary A, Fafi-Kremer S, Leducq V, Delagreverie H, Garnier M, Pacanowski J, Mékinian A; Pirenne F, Tiberghien P, Calvez V, Humbrecht C, Marcelin AG, Lacombe K. Remdesivir failure with SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA-polymerase mutation in a B-cell immunodeficient patient with protracted Covid-19. *Clinical Infectious Diseases* 2020.
 48. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O'Toole Á, Haverkate M, Mollers M, Kamga SK, Schapendonk C, Pronk M, Lexmond P, van der Linden A, Bestebroer T, Chestakova I, Overmars RJ, van Nieuwkoop S, Molenkamp R, van der Eijk AA, GeurtsvanKessel C, Vennema H, Meijer A, Rambaut A, van Dissel J, Sikkema RS, Timen A, Koopmans M; Dutch-Covid-19 response team. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1405-1410.
 49. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O'Toole Á, Haverkate M, Mollers M, Kamga SK, Schapendonk C, Pronk M, Lexmond P, van der Linden A, Bestebroer T, Chestakova I, Overmars RJ, van Nieuwkoop S, Molenkamp R, van der Eijk AA, GeurtsvanKessel C, Vennema H, Meijer A, Rambaut A, van Dissel J, Sikkema RS, Timen A, Koopmans M; Dutch-Covid-19 response team. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1405-1410.
 50. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations. European Centre for Disease Prevention and Control. (Accessed 31/12, 2020, at <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-strategic-framework-integration-molecular-and-genomic-typing-european>.)
 51. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. (Accessed 31/12, 2020, at <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/expert-opinion-whole-genome-sequencing-public-health-surveillance>
 52. <https://www.cogconsortium.uk>
 53. <https://www.climb.ac.uk>
 54. <https://www.gov.uk/government/groups/joint-biosecurity-centre>
 55. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Integracion_de_la_secuenciacion_genomica-en_la_vigilancia_del_SARS-CoV-2.pdf

56. <http://www.seqcovid.csic.es>
57. <http://clinbioinfospa.es/projects/covseq/>
58. <https://www.sspa.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/profesionales/sistemas-de-informacion/base-poblacional-de-salud>
59. (1/2020 de la Secretaría General de Investigación, Desarrollo e Innovación en Salud de la Consejería de Salud y Familias de la Junta de Andalucía)
60. <http://clinbioinfospa.es/projects/siega/>
61. <http://www.irsicaixa.es>
62. <http://epicovigal.webs7.uvigo.es/>
63. <https://nextstrain.org/>
64. <http://seqcovid.csic.es/nextspain/>
65. <http://nextstrain.clinbioinfospa.es/andalucia-SARS-COV-2>
66. <https://www.ebi.ac.uk/ena/>
67. <https://covid19beacon.crg.eu/>
68. <https://covid19.galaxyproject.org/>
69. <https://www.covid19dataportal.org>
70. <https://www.covid19dataportal.es>
71. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/Biblioteca/Paginas/Proyectos_investigacion.aspx
72. <https://covid19dataportal.se>
73. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302622>
74. <https://advances.sciencemag.org/content/7/1/eabe5575>
75. [https://www.nature.com/articles/s41598-020-72404-w,](https://www.nature.com/articles/s41598-020-72404-w)
76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484578/>
77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7484587/>
78. <http://foldxsuite.crg.eu/>
79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7645279/>
80. <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00426-x>
81. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222344/ \)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222344/)
82. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, Masciovecchio C, Angeletti S, Ciccozzi M, Gallo RC, Zella D, Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine* 2020;18:1-9
83. Gordon, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2286-9 (2020).
84. Ostaszewski M, Mazein A, Gillespie ME, Kuperstein I, Niarakis A, Hermjakob H, Pico AR, Willighagen EL, Evelo CT, Hasenauer J, Schreiber F, Dräger A, Demir E, Wolkenhauer O, Furlong LI, Barillot E, Dopazo J, Orta-Resendiz A, Messina F, Valencia A, Funahashi A, Kitano H, Auffray C, Balling R, Schneider R. COVID-19 Disease Map, building a computational repository of SARS-CoV-2 virus-host interaction mechanisms. *Sci Data*. 2020 May 5;7(1):136.
85. Loucera C, Esteban-Medina M, Rian K, Falco MM, Dopazo J, Peña-Chilet M. Drug repurposing for COVID-19 using machine learning and mechanistic models of signal transduction circuits related to SARS-CoV-2 infection. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020;5:290.
86. Mehta, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* 395, 1033-1034
87. Connors, J. M. & Levy, J. H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* (2020) 135 (23): 2033–2040.,