



SECRETARÍA DE ESTADO DE SANIDAD. DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD PÚBLICA
Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias



INTEGRACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN LA VIGILANCIA DEL SARS-CoV-2

22 de enero de 2020

Actualización 12 de febrero de 2020

Este documento ha sido aprobado por la Ponencia de Alertas y Planes de Preparación y Respuesta y por la Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial

Este protocolo está en revisión permanente en función de la evolución y nueva información que se disponga de la infección por SARS-CoV-2.

1. ANTECEDENTES

La biología del virus SARS-CoV-2, al igual que el resto de los virus, lleva implícita cambios constantes en su genoma a través de mutaciones, por lo que la aparición de variantes es un hecho esperado y no es en sí mismo un motivo de preocupación (1). La adaptación evolutiva y la diversificación de SARS-CoV-2 se ha ido observando a nivel global a lo largo de la pandemia. La mayoría de las mutaciones que surgen no proporcionan una ventaja selectiva al virus, ni tampoco cambios fenotípicos que impliquen alteraciones en el comportamiento o patrón de infección. Sin embargo, algunas mutaciones o combinaciones de mutaciones pueden proporcionar al virus una ventaja selectiva, como una mayor transmisibilidad a través de un aumento en la unión del receptor. Del mismo modo, existe preocupación acerca de la aparición de una variante que escape al efecto de los anticuerpos neutralizantes generados tras una infección previa o tras la vacunación, lo que podría condicionar casos de reinfección o pérdida de la eficacia vacunal. Por último, las variantes podrían asociarse con un descenso de la sensibilidad de determinadas técnicas diagnósticas, aunque la mayoría de estas técnicas utilizan varios genes diferentes para evitar este efecto.

En el verano 2020, la variante con la mutación D614G en la proteína S, con mayor capacidad de transmisión, se impuso a nivel global (2–7). En otoño, Dinamarca comunicó un brote importante en granjas de visones en las que se detectó una cepa de SARS-CoV-2 con mutaciones en la proteína S que hicieron temer por la propagación teórica de variantes con mayor capacidad de transmisión o virulencia o un menor efecto de los anticuerpos neutralizantes frente a las cepas que ya habían circulado; aunque finalmente ninguno de estos hechos pudo ser constatado (8). La introducción del virus en nuevas especies animales podría acelerar su evolución, lo que podría tener un impacto potencial en las estrategias de vigilancia y de control (9).

Del mismo modo, en diciembre de 2020 se ha detectado una nueva variante en el Reino Unido (RU) perteneciente al linaje B.1.1.7 (denominada VOC 202012/01) con mutaciones múltiples en el gen S de la proteína de la espícula y en otras regiones genómicas. Esta variante se ha extendido rápidamente por algunas regiones de RU y se ha detectado también en numerosos países a nivel mundial (10). A pesar de que esta variante no se ha relacionado con una mayor virulencia ni parece que escape del efecto del sistema inmune, sí hay evidencia importante de una mayor transmisibilidad y se ha puesto en relación con el aumento de la incidencia de casos de COVID-19 en el RU (10,11).

El 18 de diciembre de 2020 Sudáfrica anunció la detección de una nueva variante del linaje B.1.351 (denominada 20H/501Y.V2), debido a la mutación N501Y. Esta misma mutación está presente en la VOC 202012/01 aunque el análisis filogenético indica que es diferente a la variante 501Y.V2. Esta cepa desplazó al resto de variantes circulando en Sudáfrica desde el mes de noviembre, lo que indica que pudiera tener una mayor capacidad de transmisión sin que hubiera evidencia de mayor virulencia. A finales de diciembre, la variante se había detectado ya en 4 países (11).

Por su parte, Japón también ha notificado a principios de enero de 2021 una nueva variante en cuatro personas procedentes de la Amazonía brasileña. La nueva variante pertenece al linaje B.1.1.28.1 y presenta 12 mutaciones en la proteína de la espícula, entre ellas la mutación N501Y (como la variante británica y la sudafricana) y la mutación E484K (como la variante sudafricana y que se ha descrito previamente como una mutación de escape a la neutralización de anticuerpos monoclonales) (12). Brasil también ha informado de la presencia de esta nueva variante en varias secuencias (13 de 31) de la región de Manaus (en la Amazonía) (13) recogidas en la segunda mitad de diciembre del 2020, por lo que la dirección de transmisión se supone haya sido desde Brasil a Japón. En estos momentos se está estudiando el efecto de esta combinación sobre la transmisibilidad y la capacidad de neutralización de los anticuerpos (3).

La aparición de variantes que aumenten la transmisibilidad del virus, su virulencia o que escapen a la acción de los anticuerpos neutralizantes generados tras la infección natural o la vacuna, constituyen un problema de salud pública de primer orden que puede repercutir de forma importante en el control de la pandemia.

Por ello, el ECDC ha propuesto varias medidas de Salud Pública para contener la transmisión comunitaria de las variantes de interés(14):

- La detección precoz de la circulación de las variantes mediante secuenciación genómica en grupos diana y determinación de la incidencia de casos de dichas variantes en la población.
- Seguimiento de casos y contactos intensificado en personas con vínculos epidemiológicos conocidos con zonas donde estén circulando las variantes de interés de forma importante.
- Restricciones de viajes a zonas donde circule de forma importante una variante de interés y cuarentenas a personas que procedan de esas zonas.

El 19 de enero la Comisión Europea publicó un comunicado¹ instando a los países a incrementar la tasa de secuenciación ya que consideran que la actual no es suficiente para identificar la progresión de las variantes o detectar nuevas. Plantean que los Estados Miembros deben alcanzar la capacidad de secuenciar al menos el 5%, y preferiblemente el 10%, de los resultados positivos de las pruebas de COVID-19, minimizar los retrasos en los resultados y garantizar que estos datos se comparten de forma comparable.

2. INTEGRACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN EL SISTEMA DE VIGILANCIA

2.1 Objetivos

Los objetivos que debe perseguir la integración de la secuenciación en la vigilancia son:

1. Determinación de la incidencia de las variantes de interés para la salud pública en el conjunto de la población

¹ <https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2021/EN/COM-2021-35-F1-EN-MAIN-PART-1.PDF>

2. Identificación precoz de nuevas variantes de SARS-CoV-2 de interés para la salud pública que presenten:
 - Aumento de la transmisibilidad.
 - Aumento de la virulencia.
 - Sospechas de fallos vacunales, sospechas de reinfección u cualquier otro fenómeno de escape a la respuesta inmune
 - Cualquier otro cambio fenotípico que afecte al control epidemiológico que implique modificaciones de las intervenciones en salud pública.
3. Identificación de grupos vulnerables asociados a la infección por nuevas variantes.
4. Realizar estudios de filodinamia, con el objetivo de:
 - Caracterizar filodinámicamente un microorganismo y predecir su repercusión a nivel fenotípico, en cuanto a la transmisibilidad, patogenicidad y otras características.
 - Determinar el impacto de las nuevas variantes en los métodos de diagnóstico molecular, serológico o de detección de antígenos.
 - Determinar el impacto de las nuevas variantes frente a posibles tratamientos antimicrobianos.

2.2. Puntos clave a tener en cuenta en la integración de la secuenciación en los sistemas de vigilancia

Para la integración de la secuenciación genómica dentro del sistema de vigilancia epidemiológica se debe tener en cuenta:

- Se deberá establecer una Red de laboratorios de referencia que permita coordinar y desarrollar las capacidades de secuenciación:
 - a) Los centros participantes en esta vigilancia deberán estar coordinados por las autoridades sanitarias de salud pública. **Cada CC.AA. designará qué laboratorios formarán parte de esta Red.**
 - b) La **Red será coordinada** por el Ministerio de Sanidad en colaboración con el ISCIII. El Centro Nacional de Microbiología (CNM) del ISCIII actuará como nodo central de la red de laboratorios en lo referente a los aspectos científico-técnicos relacionados con la secuenciación (estandarización, armonización etc). Además, prestará apoyo para realizar la secuenciación y análisis bioinformático a aquellas CC.AA. que no dispongan de suficiente capacidad.
 - c) Para cumplir con los objetivos de vigilancia a nivel nacional e informar según establece la OMS y ECDC, al menos una parte representativa de las secuencias que se ajusten a criterios de calidad internacional se compartirán con el Centro Nacional de Microbiología según se establezca. El Centro Nacional de Microbiología será el responsable de la comunicación de los resultados de secuenciación a los organismos de vigilancia internacionales (OMS, ECDC). Los laboratorios que realicen secuenciación depositarán las secuencias de los virus en la base de datos internacional GISAID.

- La información generada debe tener como objetivo la toma de decisiones de salud pública, por lo que el sistema **debe garantizar una agilidad suficiente** entre la obtención de muestras y su secuenciación, siempre teniendo en cuenta las capacidades disponibles.
- La Red **dará respuesta a las necesidades que desde Salud Pública se establezcan**. En este sentido, en el momento actual las prioridades son la identificación y seguimiento de las variantes que circulan en nuestro país (punto 2.3) y además realizar el estudio de los casos y situaciones en las que se considera que una nueva variante de interés para la salud pública pudiera estar implicada (punto 2.4). En el marco de la Red se valorará la creación de un grupo técnico que apoye en la definición de las técnicas, protocolos y procedimientos que se van a utilizar para garantizar que los resultados sean comparables a nivel nacional.
- La capacidad de análisis bioinformático de las secuencias puede limitar la obtención de resultados, por lo que en determinadas situaciones puede diseñarse una estrategia de análisis abreviado, dirigido al análisis de determinadas dianas de especial relevancia (espícula, etc.).
- La base de datos SiViEs se adaptará para que se puedan introducir los resultados obtenidos de la secuenciación en cada uno de los casos en los que se realice. Las CC.AA adaptarán sus sistemas para poder introducir esta información.
- Cualquier laboratorio que realice la secuenciación tiene la obligación de enviar los resultados de este análisis a salud pública de la comunidad autónoma correspondiente, para garantizar la integración de la secuenciación con la información epidemiológica.

2.3. Identificación y seguimiento de las variantes circulantes en España

Para la identificación y seguimiento de las variantes circulantes en nuestro país, teniendo en cuenta la capacidad actual de los laboratorios y que la Red de laboratorios se encuentra todavía en desarrollo, se propone un procedimiento basado en los siguientes principios:

- a) Se realizará secuenciación completa.
- b) La secuenciación debe realizarse de forma planificada e incluyendo un número representativo de casos de todas las CC.AA.
- c) Se establecerá un laboratorio por CC.AA. (o varios en el caso de CC.AA. pluriprovinciales o aquellas con mayor población) con capacidad de realizar la secuenciación, o que se encargue de enviar las muestras a un laboratorio con capacidad para ello.
Coordinado por los responsables de salud pública, en cada CA se seleccionará un número de muestras de forma aleatoria y representativa de las muestras recibidas semanalmente con Ct<30, correspondiendo 80% de ellas a muestras procedentes de atención primaria (AP) y 20% de atención hospitalaria (AH). En esta selección se deberá tener en cuenta que no todas las muestras deben proceder del mismo origen (por ejemplo, formar parte de un mismo brote).
Aunque el objetivo es que de forma progresiva se llegue a los porcentajes de secuenciación propuestos por la Comisión Europea, en este momento se propone analizar un número de muestras que se sitúen alrededor del 1-2% de los casos

diagnosticados en cada CCAA, que deberán ir incrementándose según las capacidades de cada Comunidad. De forma orientativa, se presentan los números aproximados de muestras a secuenciar según las tasas de incidencia acumulada de la semana de la fecha de este informe en el Anexo 1.

2.4. Estudio de casos y situaciones en las que se sospeche la presencia de una variante de interés para la salud pública.

Además de la realización de la secuenciación de SARS-CoV-2 en un número representativo de casos, es importante detectar precozmente nuevas variantes de interés para la salud pública que ya son conocidas u otras nuevas que puedan aparecer. Por ello, se indicará la secuenciación de los siguientes casos y situaciones, que al igual que en el caso anterior será integrada a la información de SiViEs:

2.4.1 Sospecha de reinfección:

Personas que tuvieron una infección documentada por SARS-CoV-2 hace más de 90 días tal y como se establece en la definición de caso de reinfección de la Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19. Esta definición de caso de reinfección puede ir cambiando según se conozca más acerca de la misma.

2.4.2 Sospecha de nuevas variantes de interés para la salud pública Infección

En el momento actual las variables de interés incluyen la B.1.1.7 (Reino Unido), B.1.351 (Sudáfrica), variante P.1 (Brasil)

Se realizará secuenciación en aquellos casos confirmados con vínculos epidemiológicos (14 días previos) con lugares o ámbitos donde se haya descrito una alta incidencia de la variante B.1.351 o P.1.

La variante B.1.1.7 está ya presente en un amplio territorio europeo incluyendo a España, por lo que no estaría sujeta como las anteriores al vínculo epidemiológico territorial para su sospecha. En este sentido, una vez que una determinada variante se haya establecido en un territorio y exista una transmisión comunitaria continuada no será necesario secuenciar todos los casos sospechosos.

En los estudios de brotes asociados a estas variantes no será necesario secuenciar las muestras de todos los implicados sino una pequeña selección de las mismas para confirmar la transmisión de la misma. Una vez confirmada transmisión se asume que el brote está producido por la variante en cuestión.

En los casos sospechosos de estar causados por variantes emergentes de interés ya conocidas no será siempre necesaria la secuenciación completa. Puede ser suficiente con la secuenciación del gen (o los genes) que alberguen las mutaciones que definen a dicha variante.

La variante B.1.1.7 puede ser sospechada mediante el fallo en la amplificación del gen S en técnicas de RT-PCR que utilicen este gen como una de sus dianas. La falta de amplificación para este gen puede constituir un buen método de cribado para su posterior secuenciación. Dado el interés actual para conocer el grado de penetración de la variante B.1.1.7 en los diferentes territorios, podría establecerse un estudio de cribado en base a esta técnica de RT-PCR y secuenciar como prioritarias una muestra de las cepas obtenidas como sospechosas por dicha técnica. Hasta tener información consolidada es importante hacer estudios con muestras aleatorias del total de casos identificados para poder establecer la correlación entre estas técnicas basadas en la falta de amplificación del gen S y los resultados de la secuenciación.

También se incluirán muestras relacionadas con brotes en animales, con grupos específicos procedentes de países en situación de riesgo o con riesgo desconocido, o cualquier otra situación con interés para la salud pública.

2.4.3 Casos con sospecha de infección con variantes que escapan a la inmunidad

Casos con sospecha de fallo vacunal: personas que han recibido una pauta de vacunación completa y ha transcurrido hasta la fecha de inicio de síntomas el tiempo estipulado según cada vacuna para considerar que se han alcanzado títulos adecuados de anticuerpos.

Aunque no se considera fallo vacunal, se recomienda realizar también secuenciación en aquellas personas asintomáticas que en el momento del diagnóstico han recibido una pauta de vacunación completa y ha transcurrido el tiempo estipulado según cada vacuna para considerar que se han alcanzado títulos adecuados de anticuerpos.

Se considerará también en personas con infección confirmada por SARS-CoV-2 que reciben tratamiento con plasma de convaleciente o anticuerpos monoclonales y no responden al mismo.

En estos casos se realizará preferiblemente secuenciación completa.

2.4.4 Situaciones en las que se sospecha una alta transmisibilidad o virulencia

Brotes epidémicos con un número de casos secundarios por caso excepcionalmente alto (más de 5-6 por caso) o una proporción de casos graves anormalmente elevada en comparación con las observadas hasta ese momento o aumentos muy rápidos en la incidencia en un determinado territorio (más del 100% de incremento semanal, duplicación de los casos en 7 días) o agrupaciones de casos con una tasa de hospitalización o mortalidad superior a la esperada.

En estas situaciones no es necesario secuenciar todas las muestras sino una selección. De forma aproximada será suficiente con un 10% de las muestras, en los brotes puede ser suficiente con secuenciar 4 o 5 casos.

También puede considerarse en casos individuales con comportamiento clínico no esperado por su gravedad.

En estos casos se realizará preferiblemente secuenciación completa.

3 PROCEDIMIENTO DE LA TOMA Y ENVÍO DE MUESTRA

El procedimiento de la toma de muestra será el habitual para las muestras respiratorias ([toma y transporte de muestras para diagnóstico por PCR de SARS-CoV-2](#))

1. Se analizarán exudados nasofaríngeo (u otras muestras respiratorias cuando proceda) para realización de PCR y secuenciación.
2. Para el transporte, si es posible se recomienda utilizar un medio de transporte de virus **SIN sustancias inactivantes**. El envío de las muestras se hará siguiendo las instrucciones descritas en el anexo 1 del documento *Toma y transporte de muestras para diagnóstico por PCR de SARS-CoV-2*.
3. La secuenciación se realizará en los laboratorios designados en cada Comunidad autónoma o en su defecto, las muestras se enviarán al Centro Nacional de Microbiología o a los laboratorios de referencia que se designen. Las muestras que se envíen para secuenciar deben tener un Ct<30.

El envío al CNM se realizará por los métodos habituales, utilizando el código GIPI Programa de Vigilancia SARS-CoV-2. Según se indique desde Salud Pública de cada CCAA, la muestra secuenciada llevará asociado el identificador del caso de SiViEs o se establecerá el mecanismo que garantice la integración de los resultados con información epidemiológica.

El ECDC y la OMS han elaborado documentos técnicos que pueden servir de guía para la secuenciación (15,16).

ANEXO 1. Número orientativo de muestras a secuenciar proporcionales al número de casos semanales estimados según la incidencia acumulada.

CCAA	1% de los casos semanales	2% de los casos semanales
Andalucía	329	657
Aragón	50	101
Asturias	23	46
Baleares	36	71
Canarias	20	40
Cantabria	11	22
Castilla-La Mancha	110	221
Castilla y León	167	333
Cataluña	222	444
Ceuta	2	4
C. Valenciana	253	505
Extremadura	75	151
Galicia	95	189
Madrid	323	645
Melilla	4	8
Murcia	84	168
Navarra	15	31
País Vasco	49	98
La Rioja	20	40
TOTAL	1.887	3.774

*Los datos empleados para realizar los cálculos son los recogidos en el informe diario del CCAES con fecha 21/01/2021 consolidados a las 14:00 h.

4 BIBLIOGRAFÍA:

1. van Dorp L, Richard D, Tan C, Shaw L, Acman M, Balloux F. No evidence for increased transmissibility from recurrent mutations in SARS-CoV-2. Nature communications [Internet]. 25 de noviembre de 2020 [citado 23 de diciembre de 2020]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33239633/>
2. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. Cell [Internet]. 20 de agosto de 2020 [citado 25 de agosto de 2020];182(4):812-827.e19. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420308205>
3. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity | bioRxiv [Internet]. [citado 25 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.12.148726v1>
4. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant | bioRxiv [Internet]. [citado 25 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.04.187757v2>
5. The D614G mutation in the SARS-CoV2 Spike protein increases infectivity in an ACE2 receptor dependent manner | bioRxiv [Internet]. [citado 25 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.21.214932v1>
6. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 Spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity | medRxiv [Internet]. [citado 25 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.31.20166082v1>
7. The Spike D614G mutation increases SARS-CoV-2 infection of multiple human cell types | bioRxiv [Internet]. [citado 25 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.14.151357v2>
8. WHO | SARS-CoV-2 mink-associated variant strain – Denmark [Internet]. WHO. [citado 12 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/don/06-november-2020-mink-associated-sars-cov2-denmark/en/>
9. OIE - World Organisation for Animal Health. Preguntas y respuestas del Covid-19 (actualización 27.11.2020) [Internet]. [citado 14 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/informaciones-especificas-y-recomendaciones/preguntas-y-respuestas-del-nuevo-coronavirus-2019/>
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Threat Assessment Brief: Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom [Internet]. 2020 [citado 21 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant-united-kingdom>

11. SARS-CoV-2 Variants [Internet]. WHO. [citado 4 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/don/31-december-2020-sars-cov2-variants/en/>
12. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JCC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. bioRxiv [Internet]. 22 de julio de 2020 [citado 13 de enero de 2021];2020.07.21.214759. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.21.214759v1>
13. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings [Internet]. Virological. 2021 [citado 13 de enero de 2021]. Disponible en: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586?s=08>
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk related to spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA [Internet]. 2020 dic. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-risk-related-to-spread-of-new-SARS-CoV-2-variants-EU-EEA.pdf>
15. Sequencing of SARS-CoV-2 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2020 [citado 13 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/sequencing-sars-cov-2>
16. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health [Internet]. [citado 13 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240018440>