

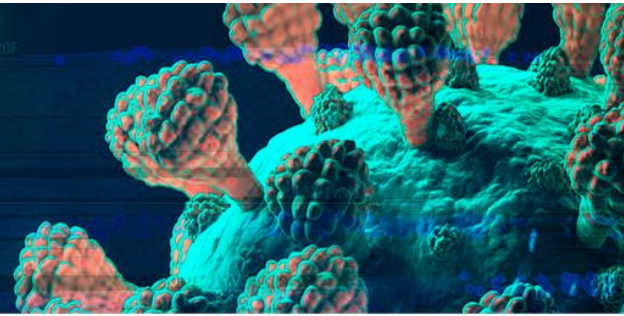
## RELATÓRIO TÉCNICO 2021/04

### REDE GENÔMICA FIOCRUZ / MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Emergência de uma nova Variante de Interesse (VOI) dentro da linhagem B.1.1.33 do SARS-CoV-2 circulando no Brasil, contendo a mutação E484K e múltiplas deleções no domínio amino (N) - terminal da proteína Spike.**

A epidemia de COVID-19 de 2021 no Brasil é dominada por diferentes linhagens que abrigam a mutação E484K no domínio de ligação ao receptor (RBD) presente na proteína Spike (S). Neste relatório técnico apresentamos uma nova Variante de Interesse (VOI) do SARS-CoV-2 que emergiu a partir da linhagem B.1.1.33, preliminarmente designada como linhagem N.10 (<https://github.com/cov-lineages/pango-designation/issues/40>). Além da mutação E484K, esta VOI exibe várias mutações não sinônimas e deleções adicionais definidoras de linhagem incluindo: quatro mutações (P9L, I210V, L212I e V445A) e três deleções ( $\Delta$ 141-144,  $\Delta$ 211 e  $\Delta$ 256-258) na proteína S (1); cinco mutações distribuídas nas proteínas NSP3, NSP5, NSP6 e nucleocapsídeo (N); e uma deleção de 4 nucleotídeos na proteína NS7b, levando a perda da fase de leitura e conseqüente truncamento da proteína. A linhagem N.10 provavelmente surgiu no final de dezembro de 2020 e compreende uma fração significativa (23%) dos casos positivos de SARS-CoV-2 sequenciados no estado brasileiro do Maranhão (região Nordeste) entre janeiro e fevereiro de 2021.

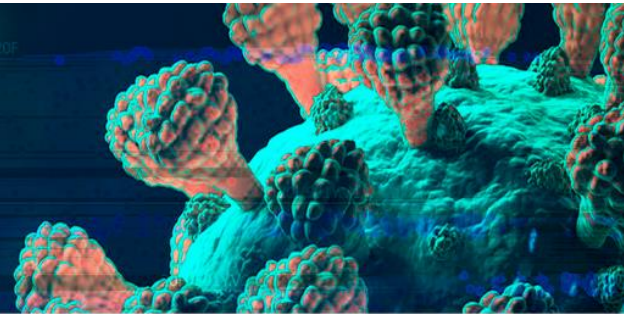
Diversas variantes do SARS-CoV-2 com a mutação E484K no RBD da proteína Spike (S) surgiram no Brasil e dominam a epidemia desde o final de 2020 (<https://www.genomahcov.fiocruz.br>). A Variante de Preocupação (VOC) P.1 e a VOI P.2 evoluíram da linhagem B.1.1.28 (2-5) enquanto a VOI N.9 evoluiu a partir da linhagem B.1.1.33 (6, 7). No levantamento genômico onde identificamos a linhagem N.9



(6), também encontramos duas sequências B.1.1.33 amostradas no estado brasileiro do Maranhão (região Nordeste) que abrigavam a mutação E484K e um conjunto de 3 deleções sequenciais na região N-terminal da proteína S, mas ramificada fora da linhagem N.9 (6). Para determinar se essas sequências faziam parte de uma nova linhagem emergente SARS-CoV-2, analisamos a diversidade genética dos SARS-CoV-2 que circulavam no Maranhão em 2021.

Um total de 73 amostras positivas para SARS-CoV-2 provenientes de pacientes do estado do Maranhão entre 1º de janeiro e 24 de fevereiro de 2021 foram sequenciadas pela Rede de Vigilância Genômica da Fiocruz. O perfil de mutações dos 73 genomas de SARS-CoV-2 identificou 70 sequências (96%) com mutação S: E484K que pertencem a quatro linhagens diferentes com base no sistema de classificação PANGO (8): P.1 (n = 26), P.2 (n = 15), N.9 (n = 13) e B.1.1.33 (n = 16). As sequências das linhagens B.1.1.33 e N.9 do estado do Maranhão obtidas foram combinadas com 891 genomas B.1.1.33 e 38 genomas N.9 completos e de alta qualidade de origem brasileira disponíveis no banco de dados EpiCoV da plataforma GISAID (<https://www.gisaid.org/>) em 31 de março 2021. A análise filogenética de máxima verossimilhança revelou que todas as 16 sequências B.1.1.33 (E484K) do Maranhão se agruparam em um ramo com alto suporte (aLRT = 100%) formando um clado monofilético que define uma nova linhagem preliminarmente designada como N.10 e que também compreende uma sequência amostrada no estado do Amapá (região Norte) em fevereiro de 2021. A análise da estrutura temporal revelou que a divergência da linhagem N.10 é maior do que de outras sequências B.1.1.33 e da VOI N.9. A reconstrução Bayesiana usando um modelo de relógio molecular estrito com uma taxa de substituição uniforme ( $8 - 10 \times 10^{-4}$  substituições/sítio/ano) conforme implementado no programa BEAST 1.10 (9) estimou a emergência da VOI N.10 em 21 de dezembro de 2020 (95%[HPD]: 4 de dezembro de 2020 - 1 de janeiro de 2021).

Esta nova VOI N.10 apresenta 14 mudanças genéticas definidoras de linhagem incluindo 10 mutações não sinônimas, três deleções *in frame* e uma deleção que altera a fase de leitura e trunca a proteína NS7b. Esta variante exibe oito mudanças genéticas definidoras de linhagem na proteína S sendo duas mutações no RBD (E484K e V445A) e duas mutações (I210V e L212I) e três deleções ( $\Delta$ 141-144,  $\Delta$ 211 e  $\Delta$ 256-258) no domínio amino (N) terminal (NTD). Várias destas alterações genéticas definidoras da



linhagem N.10 tem potenciais implicações fenotípicas. A mutação S:E484K foi identificada como uma das substituições mais importantes que podem contribuir para o escape imunológico (10-13). A mutação S:V445A está localizada em uma alça da Spike (posições 443-450) na região de ligação ao receptor que é alvo de muitos anticorpos neutralizantes anti-RBD e mutações nesse local podem conferir resistência parcial à capacidade de neutralização (11). As deleções NTD  $\Delta$ 141-144,  $\Delta$ 211 e  $\Delta$ 256-258 estão localizadas dentro ou perto das regiões de deleção recorrente (RDR) designadas como RDR2 (139-146), RDR3 (210-212) e RDR4 (242-248). O RDR2 e o RDR4 compõem o supersítio antigênico NTD e deleções nessas regiões conferem resistência à neutralização por anticorpos neutralizantes anti-NTD (1, 14, 15). Finalmente, a mutação Q70R no nucleocapsídeo está localizada em um epítipo de célula T específico (posições 66 a 74) para SARS-CoV-2 (16). Esses achados sugerem que a VOI N.10 aqui relatada pode ser parcialmente resistente à neutralização por anticorpos neutralizantes anti-RBD e anti-NTD e sua disseminação no Brasil deve ser acompanhada de perto.

Relatório técnico elaborado por Paola Cristina Resende<sup>1</sup> \*; Tiago Gräf<sup>2</sup> \*; Lídio Gonçalves Lima Neto<sup>3</sup>; Fabiano Vieira da Silva<sup>3</sup>; Anna Carolina Dias Paixão<sup>1</sup>; Luciana Appolinario<sup>1</sup>; Renata Serrano Lopes<sup>1</sup>; Ana Carolina da Fonseca Mendonça<sup>1</sup>; Alice Sampaio Barreto da Rocha<sup>1</sup>; Fernando Couto Motta<sup>1</sup>; Edson Delatorre<sup>4</sup> \*\*; Gabriel L Wallau<sup>5</sup> \*\*; Felipe G Naveca<sup>6</sup> \*\*; Gonzalo Bello<sup>7</sup> \*\*, Marilda Mendonça Siqueira<sup>1</sup> \*\* em nome da Rede de Vigilância Genômica Fiocruz COVID-19

\* Autores que compartilham a primeira autoria

\*\* Autores que autores compartilham a autoria sênior

1. Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (LVRS), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

2. Plataforma de Vigilância Molecular, Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA

3. Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Maranhão (LACEN-MA)

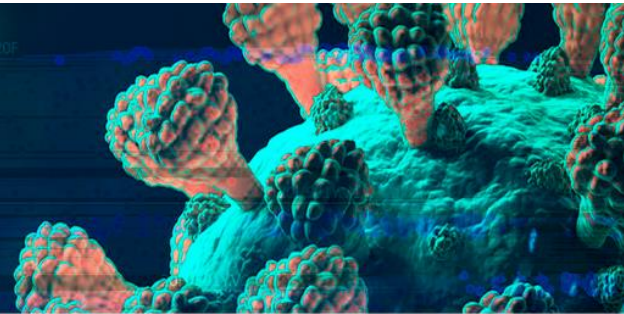
4. Departamento de Biologia. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Brasil.

5. Instituto Ageu Magalhães, Fiocruz-PE

6. Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA), Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz

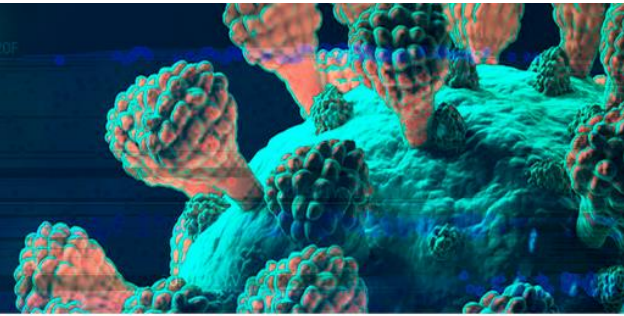
7. Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.





## REFERÊNCIAS

1. Resende PC, Naveca FG, Lins RD, Dezordi FZ, Ferraz MVF, Moreira EG, Coêlho DF, Motta FC, Paixão ACD, Appolinario L, Lopes RS, da Fonseca Mendonça AC, da Rocha ASB, Nascimento V, Souza V, Silva G, Nascimento F, Gonçalves Lima Neto L, Riediger I, Debur MdC, Leite AB, Mattos T, da Costa CF, Pereira FM, Khouri R, Bernardes AFL, Delatorre E, Gräf T, Mendonça Siqueira M, Bello G, Wallau GL. 2021. The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)-terminal domain of the Spike protein. medRxiv doi:10.1101/2021.03.19.21253946.
2. Fujino T, Nomoto H, Kutsuna S, Ujiie M, Suzuki T, Sato R, Fujimoto T, Kuroda M, Wakita T, Ohmagari N. 2021. Novel SARS-CoV-2 Variant Identified in Travelers from Brazil to Japan. Emerg Infect Dis 27.
3. Naveca F, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, Silva G, Costa A, Duarte D, Pessoa K, Mejía M, Brandão M, Jesus M, Gonçalves L, Costa C, Sampaio V, Barros D, Silva M, Mattos T, Pontes G, Abdalla L, Santos J, Arantes I, Dezordi F, Siqueira M, Wallau G, Resende P, Delatorre E, Gräf T, Gonzalo B. 2021. COVID-19 epidemic in the Brazilian state of Amazonas was driven by long-term persistence of endemic SARS-CoV-2 lineages and the recent emergence of the new Variant of Concern P.1. Research Square. doi:10.21203/rs.3.rs-275494/v1doi:10.21203/rs.3.rs-275494/v1.
4. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DdS, Mishra S, Crispim MAE, Sales FC, Hawryluk I, McCrone JT, Hulswit RJG, Franco LAM, Ramundo MS, de Jesus JG, Andrade PS, Coletti TM, Ferreira GM, Silva CAM, Manuli ER, Pereira RHM, Peixoto PS, Kraemer MU, Gaburo N, Camilo CdC, Hoeltgebaum H, Souza WM, Rocha EC, de Souza LM, de Pinho MC, Araujo LJT, Malta FSV, de Lima AB, Silva JdP, Zauli DAG, Ferreira ACdS, Schnekenberg RP, Laydon DJ, Walker PGT, Schlüter HM, dos Santos ALP, Vidal MS, Del Caro VS, Filho RMF, dos Santos HM, Aguiar RS, Modena JLP, Nelson B, Hay JA, Monod M, Miscouridou X, et al. 2021. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. medRxiv doi:10.1101/2021.02.26.21252554.
5. Voloch CM, da Silva Francisco R, Jr., de Almeida LGP, Cardoso CC, Brustolini OJ, Gerber AL, Guimaraes APC, Mariani D, da Costa RM, Ferreira OC, Jr., Covid19-Ufrj Workgroup LWACC, Frauches TS, de Mello CMB, Leitao IC, Galliez RM, Faffe DS, Castineiras T, Tanuri A, de Vasconcelos ATR. 2021. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. J Virol doi:10.1128/JVI.00119-21.
6. Resende PC, Gräf T, Paixão ACD, Appolinario L, Lopes RS, da Fonseca Mendonça AC, da Rocha ASB, Motta FC, Neto LGL, Khouri R, de Oliveira CI, Santos-Muccillo P, Bezerra JF, Teixeira DLF, Riediger I, do Carmo Debur M, Ribeiro-Rodrigues R, Leite AB, do Santos CA, Gregianini TS, Fernandes SB, Bernardes AFL, Cavalcanti AC, Miyajima F, Sachhi C, Mattos T, da Costa CF, Delatorre E, Wallau GL, Naveca FG, Bello G, Siqueira MM, . 2021. A potential SARS-CoV-2 variant of interest (VOI) harboring mutation E484K in the Spike protein was identified within lineage B.1.1.33 circulating in Brazil. bioRxiv doi:10.1101/2021.03.12.434969.
7. Resende PC, Delatorre, E., Gräf T., Mir D., Motta F.C., Appolinario L., Paixão A. C., Mendonça A. C., Ogrzewalska M., Caetano B., Wallau G. L., Docena



- C., Santos M. C., Ferreira J., Sousa Junior E., Silva S., Fernandes S., Vianna L. A., Souza L., Ferro J. F., Nardy V., Santos C., Riediger I., Debur M., Croda J., Oliveira, W, Abreu A., Bello G., Siqueira M. M. 2020. Evolutionary dynamics and dissemination pattern of the SARS-CoV-2 lineage B.1.1.33 during the early pandemic phase in Brazil. *Frontier in Microbiology* doi:10.3389/fmicb.2020.615280.
8. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole A, Hill V, McCrone JT, Ruis C, du Plessis L, Pybus OG. 2020. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol* doi:10.1038/s41564-020-0770-5.
  9. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4:vey016.
  10. Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Lanza K, Negron N, Ni M, Wei Y, Atwal GS, Murphy AJ, Stahl N, Yancopoulos GD, Kyratsous CA. 2020. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science* 369:1014-1018.
  11. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, Bloom JD. 2021. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* doi:10.1016/j.chom.2021.02.003.
  12. Wang P, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, Graham BS, Mascola JR, Chang JY, Yin MT, Sobieszczyk M, Kyratsous CA, Shapiro L, Sheng Z, Nair MS, Huang Y, Ho DD. 2021. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7 to Antibody Neutralization. *bioRxiv* doi:10.1101/2021.01.25.428137.
  13. Gangavarapu K, Alkuzweny M, Cano M, Haag E, Latif AA, Mullen JL, Rush B, Tsueng G, Zhou J, Andersen KG, Wu C, Su AI, Hughes LD. 2020. *outbreak.info*.
  14. Cerutti G, Guo Y, Zhou T, Gorman J, Lee M, Rapp M, Reddem ER, Yu J, Bahna F, Bimela J, Huang Y, Katsamba PS, Liu L, Nair MS, Rawi R, Olia AS, Wang P, Zhang B, Chuang GY, Ho DD, Sheng Z, Kwong PD, Shapiro L. 2021. Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite. *Cell Host Microbe* doi:10.1016/j.chom.2021.03.005.
  15. Chi X, Yan R, Zhang J, Zhang G, Zhang Y, Hao M, Zhang Z, Fan P, Dong Y, Yang Y, Chen Z, Guo Y, Zhang J, Li Y, Song X, Chen Y, Xia L, Fu L, Hou L, Xu J, Yu C, Li J, Zhou Q, Chen W. 2020. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science* 369:650-655.
  16. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih HR, Roerden M, Lubke M, Bauer J, Rieth J, Wacker M, Peter A, Horber S, Traenkle B, Kaiser PD, Rothbauer U, Becker M, Junker D, Krause G, Strengert M, Schneiderhan-Marra N, Templin MF, Joos TO, Kowalewski DJ, Stos-Zweifel V, Fehr M, Rabsteyn A, Mirakaj V, Karbach J, Jager E, Graf M, Gruber LC, Rachfalski D, Preuss B, Hagelstein I, Marklin M, Bakchoul T, Gouttefangeas C, Kohlbacher O, Klein R, Stevanovic S, Rammensee HG, Walz JS. 2021. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol* 22:74-85.