

Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brasil.

Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Dra. Rosemary Costa Pinto, Manaus, Amazonas, Brasil.

Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ

Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS)

Referência Nacional para Coronavírus do Ministério da Saúde e Regional para Organização Mundial de Saúde.

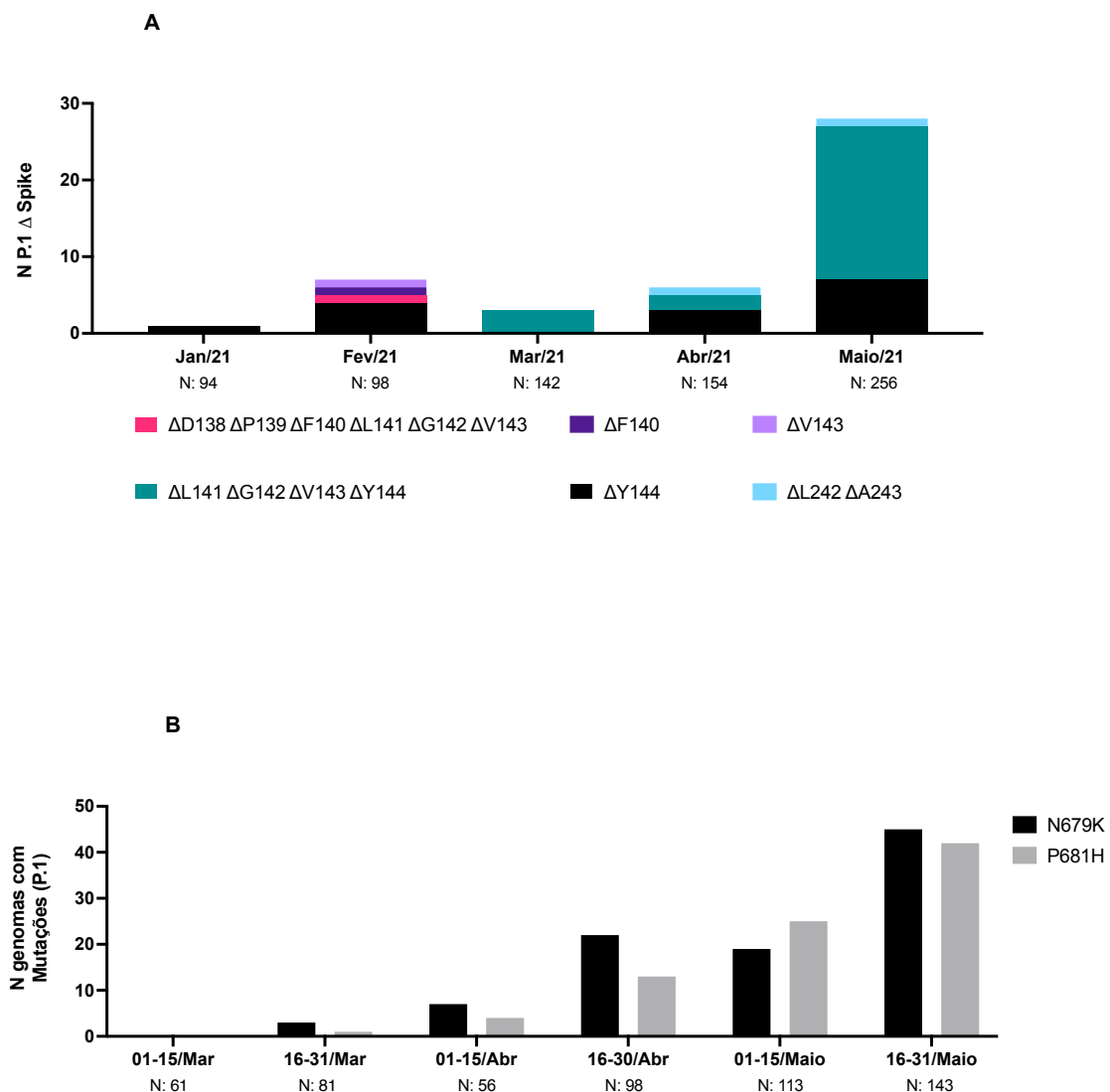
## **Relatório Técnico: Detecção de Mutações na Proteína Spike da Variante de Preocupação (VOC) P.1 (Gamma) do SARS-CoV-2 no Estado do Amazonas**

### **Laboratório de Origem: LACEN-AM**

O Amazonas foi um dos estados brasileiros mais afetados pela epidemia de COVID-19 e até 19 de junho de 2021, mais de 13.200 mortes haviam sido registradas. A epidemia de COVID-19 no Amazonas foi caracterizada por duas ondas de crescimento exponencial. A primeira começou em março de 2020, atingiu o pico no início de maio de 2020 e foi principalmente associada à introdução e disseminação das linhagens B.1.195 e B.1.1.28 [1]. A segunda onda epidêmica começou em dezembro de 2020 e atingiu o pico entre janeiro e fevereiro de 2021, sendo associada ao surgimento local e a rápida disseminação de uma nova Variante de Preocupação (VOC) do SARS-CoV-2 designada como linhagem P.1 [1,2] ou Gamma [3]. Desde meados de fevereiro de 2021, o número de mortes por SARS-CoV-2 caiu e, em seguida, permaneceu praticamente estável (média de 7 dias <20) período do início de maio até meados de junho de 2021. Apesar desta redução, o vírus continua circulando e centenas de casos novos são registrados diariamente.

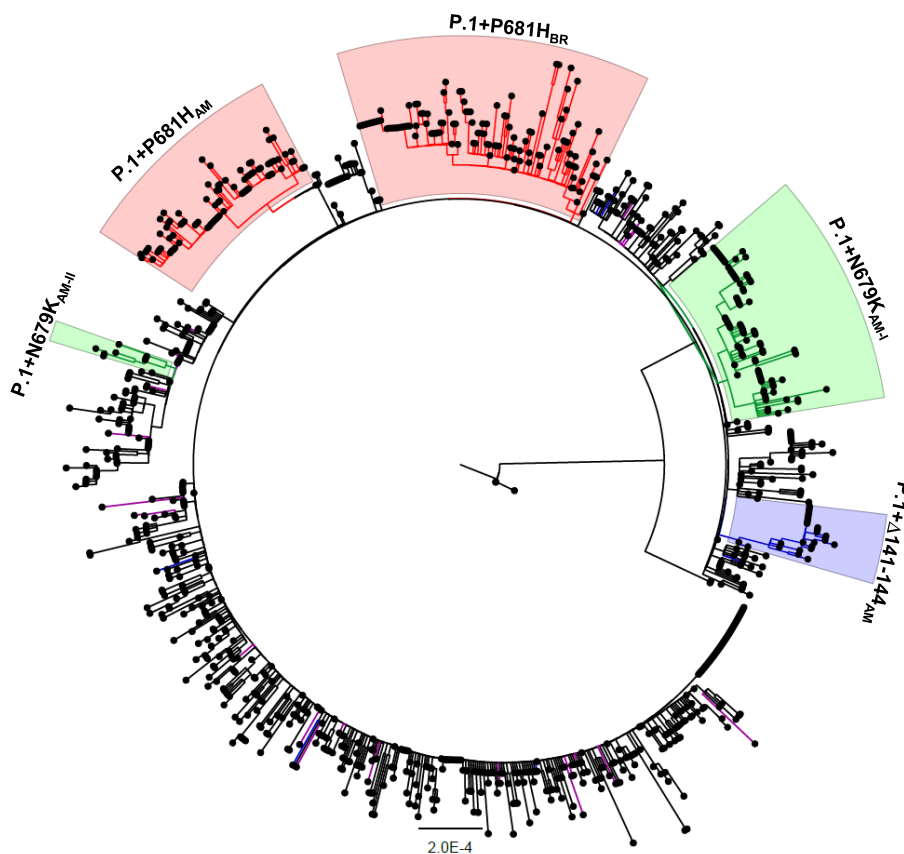
Neste estudo geramos e analisamos 744 genomas do SARS-CoV-2 de alta qualidade (<0,5% Ns) de amostras coletadas entre 01 de janeiro e 31 de maio de 2021 de indivíduos que vivem no Amazonas. As sequências foram geradas na FIOCRUZ Amazônia, que faz parte da Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM) e do consórcio Rede de Vigilância Genômica FIOCRUZ COVID-19 do Ministério da Saúde (<http://www.genomahcov.fiocruz.br/>).

Nosso levantamento confirma que a P.1 é a linhagem mais prevalente no Amazonas (99%, ou 744 de 752 genomas) no período analisado. Um segundo ponto importante é o aumento acentuado na frequência de variantes da P.1 com deleções no domínio NTD da *Spike* (NTDdel), ou com as mutações S: N679K ou S: P681H. As variantes P.1 + NTDdel aumentaram de menos de 10% em janeiro-abril, para 16% em maio de 2021. As sequências com deleção no loop N3 ( $\Delta$ L144,  $\Delta$ L141-144 e  $\Delta$ L139-144) foram muito mais frequentes que no loop N5 ( $\Delta$ L241-243). A variante P.1 +  $\Delta$ L141-144 exibiu o maior aumento na frequência durante maio de 2021 (Fig. 1A). As variantes P.1 + P681H e P.1 + N679K aumentaram de 0% na primeira quinzena de março para 27% e 32% na segunda quinzena de maio de 2021, respectivamente (Fig. 1B). Juntas, as variantes P.1 + NTDdel, P.1 + N679K e P.1 + P681H compõem 74% de todos os casos positivos de SARS-CoV-2 sequenciados no Amazonas na segunda metade de maio de 2021.

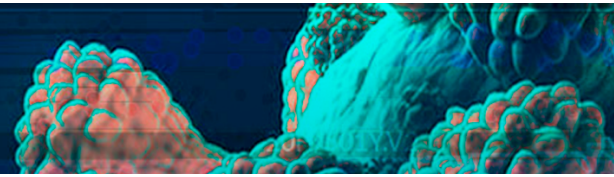


**Figura 1. Genomas da VOC P.1 com deleções (A) ou Mutações N679K e P681H (B) em função do tempo de aparecimento, no estado do Amazonas.**

Combinamos sequências de alta qualidade da P.1 geradas neste e em estudos anteriores com sequências P.1 + NTDdel ( $\Delta 144$ ,  $\Delta 143-144$  e  $\Delta 141-144$ ), sequências P.1 + P681H e P.1 + N679K detectadas em outros estados brasileiros que estavam disponíveis no banco de dados EpiCoV no GISAID (<https://www.gisaid.org/>) em 25 de junho de 2021. A análise filogenética de máxima verossimilhança (ML) mostrou que o as amostras com deleções (NTDdel) no loop N3 surgiram várias vezes durante a evolução da linhagem P.1 no Brasil. Além disso, esta análise revelou um clado monofilético com alto suporte (aLRT = 86%) designado como P.1 +  $\Delta 141-144_{AM}$  que compreende a maioria (n = 27/31, 88%) das sequências amazônicas com essa deleção no NTD (Fig. 2). A mutação S: N679K surgiu duas vezes dando origem a um clado principal P.1 + N679K<sub>AM-I</sub> (aLRT = 79%) que compreende a maioria das sequências (n = 90/97, 92,8%) do estado do Amazonas, bem como uma sequência detectada no estado do Rio de Janeiro, e um clado menor P.1 + N679K<sub>AM-II</sub> (aLRT = 78%) compreendendo sete sequências do Amazonas (Fig. 2). A mutação S: P681H também surgiu pelo menos duas vezes no Brasil, dando origem às linhagens P.1 + P681H<sub>AM</sub> (aLRT = 79%) e P.1 + P681H<sub>BR</sub> (aLRT = 74%) que compreendem todas as sequências amostradas no Amazonas (n = 85) e nos demais estados brasileiros (n = 122), respectivamente (Fig. 2).



**Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança contendo 1032 genomas P.1 e P.1-like, destacando os clados descritos nesse estudo.**



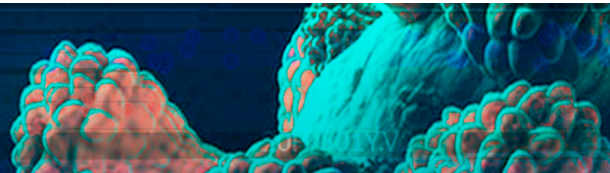
A maioria das sequências pertencentes aos clados P.1 +  $\Delta$ 141-144<sub>AM</sub> (96%), P.1 + P681H<sub>AM</sub> (78%), P.1 + N679K<sub>AM-I</sub> (79%) e P.1 + N679K<sub>AM-II</sub> (75%) foram amostradas na capital Manaus entre 12 de março e 31 de maio de 2021. As sequências P.1 + P681H<sub>BR</sub> foram amostradas em estados das regiões Sul (Paraná e Santa Catarina), Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás), Nordeste (Alagoas, Maranhão e Paraíba) e Norte (Pará e Tocantins) entre 12 de março e 06 de junho de 2021 e sua frequência entre as sequências de P.1 de fora do estado do Amazonas aumenta de 0% em fevereiro para 21% em junho de 2021.

A reconstrução filogenética bayesiana usando um modelo de relógio molecular estrito com uma taxa de substituição uniforme ( $8 - 10 \times 10^{-4}$  substituições / sítio / ano), estimou o surgimento da sublinhagem P.1 + N679K<sub>AM</sub> em 16 de fevereiro de 2021 (95% [HPD]: 16 de janeiro - 13 de março de 2021), sublinhagem P.1 + P681H<sub>BR</sub> em 27 de fevereiro de 2021 (95% HPD: 02 de fevereiro - 10 de março de 2021), sublinhagem P.1 + P681H<sub>AM</sub> em 06 de março de 2021 (95% HPD: 09 de fevereiro - 26 de março de 2021), e sublinhagem P.1 +  $\Delta$ 141-144<sub>AM</sub> em 06 de março de 2021 (95% HPD: 13 de fevereiro - 12 de março de 2021). A cidade de Manaus é a origem mais provável (PSP  $\geq$  0,74) dos clados P.1 +  $\Delta$ 141-144<sub>AM</sub>, P.1 + N679K<sub>AM-I</sub> e P.1 + P681H<sub>AM</sub>, enquanto o estado de São Paulo (PSP = 0,72) foi o epicentro mais provável do clado P.1 + P681H<sub>BR</sub>.

A VOC Gamma é sensível a anticorpos neutralizantes (NAb) direcionados contra o supersítio antigênico NTD. No entanto, o mapeamento de deleções NTD na região de deleção recorrente-2 (RDR-2), como a  $\Delta$ 141-144, demonstrou conferir resistência a esses anticorpos [4, 5]. Curiosamente, as deleções de NTD  $\Delta$ 141 e  $\Delta$ 142 estavam entre as mutações previstas de serem selecionadas para as VOCs do SARS-CoV-2, de acordo com um estudo recente [6]. Esses achados suportam que as variantes P.1 com deleções na NTD podem representar um mecanismo importante de evasão imunológica adicional da VOC P.1.

A Mutação S: P681H   imediatamente adjacente ao local de clivagem da furina S1 / S2 que   uma região de importância para a infec o e transmissão do SARS-CoV-2. Curiosamente, as muta es S: P681H e S: P681R surgiram nas VOCs Alpha e Delta, bem como em várias VOIs (AV.1, B.1.1.318, B.1.617.1, B.1.617.3 e P.3), alcançando uma prevalência mundial >70% entre as sequências SARS-CoV-2 amostradas em maio de 2021 (<https://outbreak.info/situation-reports#custom-report>). A evolu o convergente das muta es S: P681H / R em VOCs e VOIs que se espalham pelo mundo sugere uma vantagem adaptativa.

A Muta o S: N679K não foi identificada anteriormente como uma muta o preocupante. Em 25 de junho de 2021, o banco de dados EpiCov continha 2.585 sequências com essa muta o associada a múltiplas linhagens do SARS-CoV-2 encontradas predominantemente na Europa (n = 1.298) e na América do Norte (n = 1.129). O primeiro aparecimento desta muta o ocorreu nos EUA em 18 de março de 2020, mas 97% das sequências SARS-CoV-2 com a muta o S: N679K foram detectadas



a partir de novembro de 2020. Na Europa, a mutação S: N679K é encontrada junto com mutações preocupantes na proteína S das linhagens SARS-CoV-2 B.1.1.433 (S477R), AT.1 ( $\Delta$ 136-144, E484K e ins679GIAL) e B.1.258 ( $\Delta$ 69-70 e N439K) sendo também detectada esporadicamente em alguns genomas B.1.1.7 (n = 30) e P.1 (n = 19).

Outra mutação encontrada que teve um aumento em relação à outras nesse estudo foi a **H49Y**. Essa mutação foi primeiramente descrita em janeiro de 2020 na China e posteriormente encontrada nos EUA, Taiwan, Austrália e México [7], sendo que nesse último país é uma das três mutações mais observadas [8]. Um estudo conduzido no Japão demonstrou que a mutação H49Y está associada a um aumento na capacidade de entrada nas células hospedeiras [9].

Em resumo, nosso estudo confirma que a circulação persistente do SARS-CoV-2 após a segunda onda epidêmica de COVID-19 no estado do Amazonas tem sido associada à evolução contínua da VOC P.1, através da aquisição de deleções de NTD Spike ou mutações na junção S1 / S2 (N679K ou P681H). A rápida disseminação das variantes emergentes P.1 +  $\Delta$ 141-144<sub>AM</sub>, P.1 + N679K<sub>AM</sub>, P.1 + P681H<sub>AM</sub> e P.1 + P681H<sub>BR</sub> durante maio de 2021, sugere que essas sublinhagens de P.1 provavelmente continuarão se espalhando nos próximos meses no Amazonas e em outros estados brasileiros. Embora o surgimento dessas novas variantes virais não tenha sido associado a uma terceira onda epidêmica de COVID-19 no estado do Amazonas até agora, a transmissão comunitária de VOCs de segunda geração, que podem ser mais transmissíveis ou resistentes à neutralização do que a P.1 original merece atenção especial. Nossos resultados também destacam a necessidade urgente de abordar a eficácia dos soros de indivíduos infectados com P.1 e/ou vacinados, quanto a capacidade de neutralizar essas novas sublinhagens emergentes da VOC P.1.

Manaus, 30 de junho de 2021.

***Felipe Gomes Naveca***

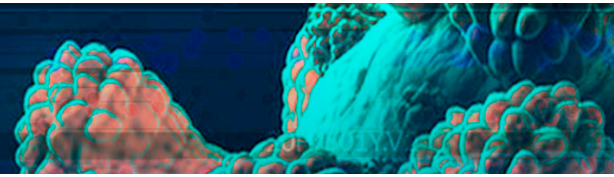
Pesquisador em Saúde Pública do ILMD / Fiocruz

*\*Em nome da Rede Genômica Fiocruz*

***Cristiano Fernandes da Costa***

Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

Dra. – Rosemary Costa Pinto



## REFERÊNCIAS

- 1) Naveca FG et al. Nat Med. 2021 May 25. doi: 10.1038/s41591-021-01378-7.
- 2) Faria NR et al. Science. 2021 May 21;372(6544):815-821. doi: 10.1126/science.abh2644.
- 3) Konings F et al. Nat Microbiol. 2021 Jul;6(7):821-823. doi: 10.1038/s41564-021-00932-w.
- 4) Wang R et al. Immunity. 2021 Jun 8:S1074-7613(21)00247-8. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.003.
- 5) McCarthy KR et al. Science. 2021 Mar 12;371(6534):1139-1142. doi: 10.1126/science.abf6950.
- 6) Cyrus MC et al medRxiv 2021.06.21.21259286; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.21.21259286>
- 7) Laha S et al. Infect Genet Evol. 2020 Nov;85:104445. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104445.
- 8) Sixto-López Y et al. Sci Rep. 2021 Feb 25;11(1):4659. doi: 10.1038/s41598-021-84053-8.
- 9) Ozono S et al. Nat Commun. 2021 Feb 8;12(1):848. doi: 10.1038/s41467-021-21118-2.

\*Membros da Rede Genômica Fiocruz que assinam esse documento

*Em ordem alfabética:*

Ágatha Costa

André Corado

Edson Delatorre

Fernanda Nascimento

Gabriel Luz Wallau

George Silva

Gonzalo Bello

Karina Pessoa

Luciana Gonçalves

Maria Júlia Brandão

Marilda Siqueira

Paola Cristina Resende

Tiago Gräf

Valdinete Nascimento

Victor Souza