



# Diversidade genética do novo coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19) em Portugal

Mais informações em <https://insaflu.insa.pt/covid19/>

## Relatório de situação

3 de Março de 2021

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA) analisou até à data **4346 sequências do genoma do novo coronavírus SARS-CoV-2**, obtidas de amostras colhidas em 75 laboratórios/hospitais/instituições representando 252 concelhos. Destas, 1318 e 303 sequências foram geradas nas instituições colaboradoras **Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC)** e **Institute of Biomedicine - iBiMED (Universidade de Aveiro)**, respectivamente.

Desde o último relatório de 5 de Fevereiro de 2021, foram analisadas mais **1085 sequências (Figura 1)**, incluindo:

- i) **861 sequências obtidas no âmbito da vigilância de periodicidade mensal com amostragem nacional que o INSA está a coordenar. A amostragem nacional de Fevereiro de 2021\* envolveu laboratórios distribuídos por 17 Distritos de Portugal continental e pelas duas Regiões Autónomas (Madeira e Açores), abrangendo um total de 152 concelhos.**
- ii) **27 amostras, enviadas para o INSA, no âmbito da solicitação do Ministério da Saúde por suspeita da presença de variantes de interesse, nomeadamente a 501Y.V2 (linhagem B.1.351, associada à África do Sul) e a 501Y.V3 (linhagem P.1, associada ao Brasil), ou de outros estudos específicos (ex., suspeitas de falha vacinal ou re-infecção).**
- iii) 197 sequências obtidas pelo Institute of Biomedicine - iBiMED (Universidade de Aveiro) de amostras colhidas entre 7 e 26 de Janeiro de 2021.



**Figura 1. Visão global da diversidade genética e dispersão geotemporal do vírus SARS-CoV-2 em Portugal.** Os diferentes genomas (representados por círculos no painel à esquerda) estão coloridos de acordo com a classificação de Clade e com a mesma tonalidade no mapa – o tamanho dos círculos no mapa é proporcional ao número de genomas sequenciados por concelho (consultar o site <https://insaflu.insa.pt/covid19/> para mais detalhes).

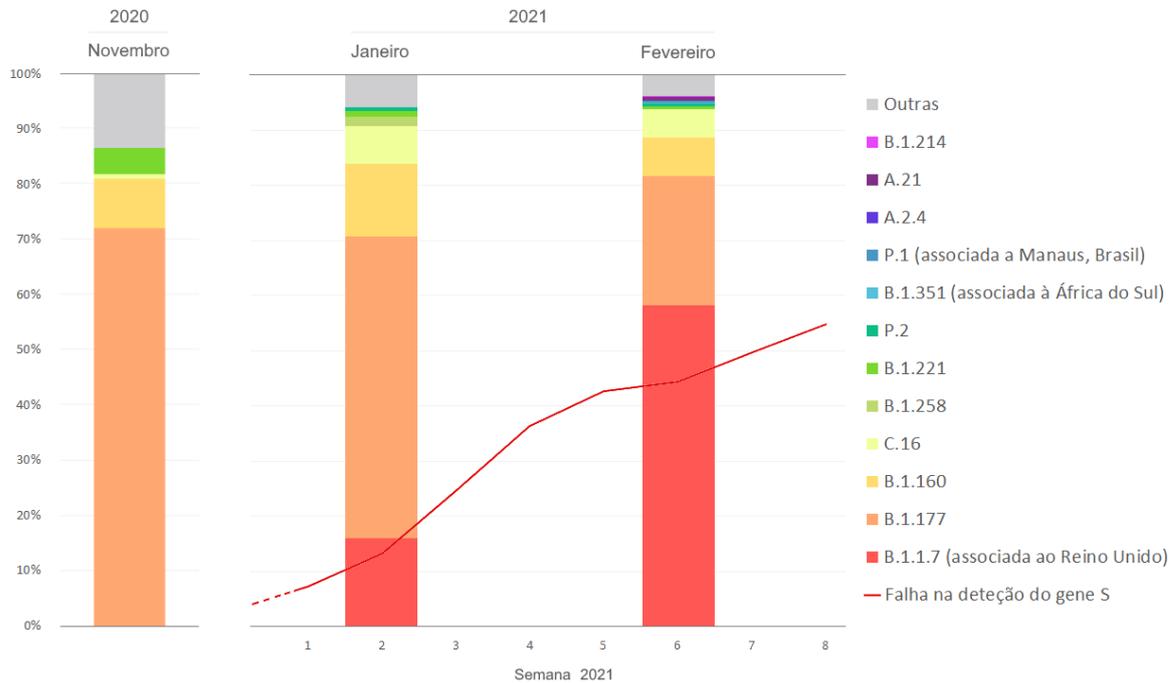
\* 90% destas amostras foram colhidas na semana ISO 6 (entre 8 e 14 Fevereiro) de 2021. Devido à impossibilidade de alguns laboratórios cumprirem exatamente o período da semana ISO, foram incluídas algumas amostras com datas fora deste intervalo. Isto permitiu garantir uma maior cobertura geográfica, sem comprometer as conclusões.



A Tabela seguinte apresenta a **frequência relativa das principais variantes genéticas do SARS-CoV-2 detectadas na amostragens nacionais de Janeiro e Fevereiro de 2021\***, bem como o **número total de sequências** dessas variantes detectadas até à data (n=4346). A **Figura 2** apresenta a **evolução da frequência relativa** dessas variantes desde **Novembro de 2020**, mantendo a correspondência de cores apresentada na Tabela 1.

Variante / linhagem	Frequência relativa na amostragem nacional, 2021		Total de sequências até à data (n = 4346)	CONTEXTO
	Janeiro (n=532)	Fevereiro (n=861)		
S: D614G+N501Y+H69del/V70del++ (clade 20I; VOC-202012/01; 501Y.V1; <b>linhagem B.1.1.7</b> )	16.0%	58.2%	749	- Esta variante apresenta múltiplas mutações na proteína Spike, potencialmente mediadoras de uma maior capacidade de transmissão. Foi detectada em Setembro no Reino Unido e, desde então, em múltiplos países. <a href="https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/SARS-CoV-2-variant-multiple-spike-protein-mutations-United-Kingdom.pdf">https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/SARS-CoV-2-variant-multiple-spike-protein-mutations-United-Kingdom.pdf</a>
S: D614G+A222V (clade "20E / EU1"; <b>linhagem e sub-linhagens B.1.177</b> )	54.7%	23.5%	1115	- Este cluster (sub-clade 20A.EU1) terá tido origem em Espanha (em meados de Junho), tendo revelado uma elevada disseminação a nível global. Hodcroft et, al, medRxiv. <a href="https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.25.20219063v2">https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.25.20219063v2</a>
S: D614G+S477N (sub-clade "20A.EU2"; <b>linhagem B.1.160</b> )	13.2%	7.0%	268	- A mutação S477N na Spike altera o domínio de ligação ao receptor ("RBD") ACE2, podendo aumentar a afinidade da ligação da Spike às células do hospedeiro. Starr et al, 2020, Cell. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420310035">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420310035</a>
S: D614G+L452R++ (sub-clade 20D; <b>linhagem C.16</b> )	6.8%	5.1%	103	- Esta variante apresenta a mutação L452R, a qual se prevê afectar o domínio de ligação da proteína Spike ao receptor ("RBD") ACE2, podendo mediar resistência a anticorpos neutralizantes. Li et al, 2020, Cell. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771</a>
S: D614G+N439Y+H69del/V70del (sub-clade 20A; sub-linhagens B.1.258)	1.7%	0.1%	21	- A mutação N439Y na Spike altera o domínio de ligação ao receptor ("RBD") ACE2, podendo aumentar a afinidade da ligação da Spike às células do hospedeiro e alterar a reconhecimento por anticorpos. Weisblum et al, 2020, Elife. <a href="https://elifesciences.org/articles/61312">https://elifesciences.org/articles/61312</a> ; Barnes et al, 2020, Nature <a href="https://www.nature.com/articles/s41586-020-2852-1">https://www.nature.com/articles/s41586-020-2852-1</a> ; Thomson et al, 2020, <a href="https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.04.355842v1">https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.11.04.355842v1</a>
S: D614G+S98F (sub-clade 20A; <b>linhagem B.1.221</b> )	1.1%	0.5%	34	- Esta variante apresentou maior frequência na Bélgica e Holanda, tendo já sido identificada em múltiplos países. Hodcroft et, al, medRxiv. <a href="https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.25.20219063v2">https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.25.20219063v2</a> ; <a href="https://github.com/emmahodcroft/cluster_scripts/blob/master/README.md#sn501">https://github.com/emmahodcroft/cluster_scripts/blob/master/README.md#sn501</a>
S: D614G+E484K++ (clade 20B; <b>linhagem P.2</b> )	0.6%	0.6%	15	Esta variante apresenta uma mutação no domínio de ligação ao receptor ("RBD") ACE2 da proteína Spike, a qual é potencialmente mediadora de resistência a anticorpos neutralizantes (S: E484K). Foi recentemente associada a casos de re-infecção no Brasil. Resende et al, 2021, virological. <a href="https://virological.org/t/spike-e484k-mutation-in-the-first-sars-cov-2-reinfection-case-confirmed-in-brazil-2020/584">https://virological.org/t/spike-e484k-mutation-in-the-first-sars-cov-2-reinfection-case-confirmed-in-brazil-2020/584</a>
S: D614G+N501Y+E484K++ (clade 20H; 501Y.V2; <b>linhagem B.1.351</b> )	0.0%	0.1%	5	- Esta variante apresenta múltiplas mutações na proteína Spike, potencialmente mediadoras de uma maior capacidade de transmissão (ex, S: N501Y) e de resistência a anticorpos neutralizantes (ex, S: E484K). Foi detectada pela primeira vez na África do Sul e, desde então, em múltiplos países. Tegally et al, 2020, medRxiv. <a href="https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.21.20248640v1">https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.21.20248640v1</a>
S: D614G+N501Y+E484K++ (clade 20J; 501Y.V3; <b>linhagem P.1</b> )	0%	0.4%	10	- Esta variante apresenta múltiplas mutações na proteína Spike, potencialmente mediadoras de uma maior capacidade de transmissão (ex. N501Y) e/ou evasão ao sistema imunitário (ex. E484K). Faria et al 2021 <a href="https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586">https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586</a>
S: del141-143+D614G+L452R+ins214-215RD>RAAGY (sub-clade 19B; <b>linhagem A.2.4</b> )	0.0%	0.0%	3	- Esta variante apresenta a mutação L452R, a qual se prevê afectar o domínio de ligação da proteína Spike ao receptor ("RBD") ACE2, podendo mediar resistência a anticorpos neutralizantes. Li et al, 2020, Cell. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771</a>
S: D614N+L452R (sub-clade 19B; <b>linhagem A.21</b> )	0.0%	0.6%	7	- Esta variante apresenta a mutação L452R, a qual se prevê afectar o domínio de ligação da proteína Spike ao receptor ("RBD") ACE2, podendo mediar resistência a anticorpos neutralizantes. Li et al, 2020, Cell. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0092867420308771</a>
S: D614G+N450K+Q414K+ins214R>RTDR (sub-clade 20A; <b>linhagem B.1.214</b> )	0.0%	0.2%	5	- Esta variante apresenta uma mutação (S:N450K) potencialmente mediadora de resistência a anticorpos neutralizantes. Liu et al, 2020, bioRxiv. <a href="https://doi.org/10.1101/2020.11.06.372037">https://doi.org/10.1101/2020.11.06.372037</a>
OUTRAS	5.9%	3.8%	2011	---

\* Devido à impossibilidade de alguns laboratórios cumprirem exatamente o período das semanas ISO 2 (Janeiro) e 6 (Fevereiro), foram incluídas algumas amostras com datas fora destas semanas. Isto permitiu garantir uma maior cobertura geográfica, sem comprometer as conclusões.



**Figura 2. Frequência relativa das variantes de interesse a circular em Portugal, de acordo com as amostragens nacionais de Novembro (2020), Janeiro (2021) e Fevereiro (2021).** As barras refletem a frequência relativa de diferentes variantes de interesse de SARS-CoV-2 identificadas no âmbito da vigilância de periodicidade mensal com **amostragem nacional por sequenciação** nos meses de Novembro (n=402; *detalhes no relatório de dia 23.12.2020*), Janeiro (n=532, dos quais 93% são relativos à semana 2\*; *detalhes no relatório de dia 05.02.2021*) e Fevereiro (n=861, dos quais 90% são relativos à semana 6\*). A curva a vermelho reflete a estimativa semanal da frequência da variante **B.1.1.7 (501Y.V1; VOC-202012/01) a partir de dados de falha na detecção do gene S por RT-PCR**, no âmbito do estudo de monitorização contínua desta variante em colaboração com a Direção Geral da Saúde e o laboratório Unilabs, Portugal (<https://virological.org/t/tracking-sars-cov-2-voc-202012-01-lineage-b-1-1-7-dissemination-in-portugal-insights-from-nationwide-rt-pcr-spike-gene-drop-out-data/600/10>).

\* Devido à impossibilidade de alguns laboratórios cumprirem exatamente o período das semanas ISO 2 (Janeiro) e 6 (Fevereiro), foram incluídas algumas amostras com datas fora destas semanas. Isto permitiu garantir uma maior cobertura geográfica, sem comprometer as conclusões.

## Principais destaques:

- A variante **501Y.V1 (VOC-202012/01; linhagem B.1.1.7)**, associada ao **Reino Unido**, foi **detetada por sequenciação com uma frequência relativa de 58.2% na amostragem nacional** de Fevereiro, 2021, mostrando um grande incremento relativamente à frequência de 16.0% observada em Janeiro. Esta clara tendência crescente **é concordante com a que foi estimada a partir dos dados de falha na detecção do gene S por RT-PCR para a mesma semana**, no âmbito do estudo de monitorização contínua desta variante em colaboração com a Direção Geral da Saúde e o laboratório Unilabs, Portugal (<https://virological.org/t/tracking-sars-cov-2-voc-202012-01-lineage-b-1-1-7-dissemination-in-portugal-insights-from-nationwide-rt-pcr-spike-gene-drop-out-data/600/10>).
- Foram detetados, até à data, **cinco casos da variante 501Y.V2 (linhagem B.1.351)**, associada à África do Sul, sendo que apenas **um caso desta variante foi detetado entre as 861 sequências** da amostragem nacional de Fevereiro, 2021. Esta observação sugere que **a circulação desta variante é ainda limitada em Portugal (0.1% na amostragem de Fevereiro)**.



- Para além de 7 casos previamente notificados (associados a uma única cadeia de transmissão), foram detetados mais **três casos da variante 501Y.V3 (P.1)** na amostragem de Fevereiro. Esta observação sugere que esta variante, primeiramente detetada no **Brasil**, nomeadamente na região de Manaus, Amazónia, apresenta uma circulação limitada em Portugal (0.4% na amostragem de Fevereiro).
- Contabilizam-se **15 casos associados à variante P.2**, também detetada inicialmente no Brasil e associada a casos de re-infeção. Relativamente ao último relatório, os **10 novos casos** identificaram-se tanto na análise de amostras suspeitas como no âmbito da amostragem aleatória de Fevereiro.
- A **variante** previamente identificada **com a mutação de interesse L452R na proteína Spike**, agora designada **C.16**, revelou uma **frequência relativa de 5.1% na amostragem de Fevereiro**, mostrando uma estabilização da sua frequência relativamente à amostragem de Janeiro, 2021. Mantém, no entanto, uma **ampla dispersão nacional**, tendo sido já detetada em 45 concelhos, abrangendo 11 distritos de Portugal continental e ambas as Regiões Autónomas (**Figura 2**).
- Para além da variante C.16, destaca-se ainda a deteção de **duas novas variantes também** com a mutação de interesse **L452R na proteína Spike (linhagens A.21 e A.2.4)**. A emergência independente desta mutação em diferentes variantes/linhagens corrobora a importância do seu papel biológico.
- **As actividades de vigilância laboratorial do SARS-CoV-2 continuarão em articulação com as autoridades de Saúde, mantendo especial foco na detecção de novas introduções e monitorização de variantes a suscitar particular interesse pela comunidade científica e autoridades de Saúde.**
- **Neste âmbito, destaca-se a recente publicação do Diário da República (Despacho n.º 331/2021 - Diário da República n.º 6/2021, Série II de 2021-01-11), a qual determina o reforço da vigilância laboratorial genética e antigénica do vírus SARS-CoV-2, sob coordenação do INSA.**



## NOTAS ADICIONAIS (também disponível em <https://insaflu.insa.pt/covid19/>)

### Objectivos gerais do estudo:

- Determinação dos **padrões de disseminação do vírus nas diferentes regiões de Portugal** e em diferentes grupos populacionais.
- Determinação dos perfis mutacionais do SARS-CoV-2 para **identificação e monitorização de cadeias de transmissão**, bem como **identificação de novas introduções do vírus** em Portugal.
- Prever o início da transmissão na comunidade e aferir o impacto das medidas de contenção, avaliando a **contribuição da transmissão local versus importações do vírus**.
- Determinação do **grau de variabilidade genética de antígenos ou alvos de fármacos antivirais** com possível impacto no desenvolvimento / eficiência de medidas profiláticas (vacinas) e terapêuticas, bom como **monitorização das mutações em alvos genéticos de testes de diagnóstico**.
- Determinação de possíveis **associações entre perfis genéticos (mutacionais)** do SARS-CoV-2 e **determinadas manifestações clínicas** (ex. diferentes graus severidade da COVID-19) ou diferente **capacidade de transmissão** do vírus.
- Estudar os **mecanismos evolutivos do vírus** e a sua relação com os perfis de disseminação em diferentes regiões de Portugal e em diferentes grupos populacionais.
- **Contribuir para a avaliação da relevância funcional e fenotípica** de mutações particulares.

### Métodos

- **Procedimento Pre-NGS:** adaptado da Artic Network (<https://artic.network/ncov-2019>, <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-bbmuik6w>)
- **Procedimento NGS:** Nextera XT e MiSeq (Illumina)
- **Dos "reads" às sequências do genoma:** [INSaFLU](#)
- **Das sequências do genoma à "filogeografia\*":** [Nextstrain](#) (mais detalhes sobre o método em <https://nextstrain.org/ncov> e <https://github.com/nextstrain/ncov>) e [Microreact](#).

*\* O posicionamento geográfico reflecte o local (Distrito – "Admin Division" ou Concelho – "Location") de residência ou, caso não exista informação, local de ocorrência ou da entidade que enviou a amostra.*

### Agradecimentos

- A todos os laboratórios nacionais que enviam amostras clínicas (suspeitas ou positivas para SARS-CoV-2) para o Laboratório Nacional de Referência da Gripe e outros vírus respiratórios do INSA.
- À Sara Hill e Nuno Faria (Universidade de Oxford) e Joshua Quick e Nick Loman (Universidade de Birmingham) por nos terem gentilmente cedido os primers usados no início deste estudo.
- Às equipas dos projectos [Nextstrain](#) e [Microreact](#) pela libertação de algumas ferramentas de bioinformática usadas neste estudo.
- Ao Miguel Pinheiro (iBiMED / Universidade de Aveiro) pelo seu trabalho na atualização da plataforma [INSaFLU](#) para o novo coronavírus SARS-CoV-2.
- À [Infraestrutura Nacional de Computação Distribuída \(INCD\)](#), por ter fornecido recursos computacionais para testar a plataforma INSaFLU. O INCD foi financiado pela FCT e FEDER sob o projeto 22153-01 / SAICT / 2016.

**Este estudo é co-financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e Agência de Investigação Clínica e Inovação Biomédica no âmbito da primeira e segunda "calls" do programa Research 4 COVID-19 (projectos 234 e 657, respectivamente).**