

Primer aislamiento y caracterización de la cepa prototipo del virus SARS-CoV-2 a inicios de la pandemia de la COVID-19 en el Perú

First isolation and characterization of the prototype strain of SARS-CoV-2 at the beginning of the COVID-19 pandemic in Peru

María P. García ^{1,a}, Miryam Palomino-Rodriguez ^{2,b}, Marcos Hernández ^{2,c}, Pamela Rios-Monteza ^{2,d}, Maribel Huaranga-Núñez ^{2,e}, Carolina Guevara ^{3,f}, Jannet Otárola ^{4,g}, C. Padilla-Rojas ^{5,h}, Orson Mestanza ^{5,i}, Ronnie Gustavo Gavilán ^{6,j}, Nancy Merino-Sarmiento ^{1,k}, Gabriel De Lucio-Burga ^{1,l}, César Cabezas ^{7,m}

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas Virales, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorios, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

³ Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, NAMRU-6. Lima, Perú

⁴ Laboratorio de Referencia Nacional de Cultivo Celular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

⁵ Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

⁶ Laboratorio de Referencia Nacional de Enteropatógenos, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

⁷ Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

^a Tecnólogo médico. ORCID: 0000-0002-2185-5038

^b Bióloga, doctora de ciencias. ORCID: 0000-0002-1236-4114

^c Biólogo, magister en ciencias biológicas. ORCID: 0000-0002-5158-0450

^d Bióloga. ORCID: 0000-0002-2488-4686

^e Tecnólogo médico. ORCID: 0000-0001-9247-4040

^f Bióloga, magister en microbiología. ORCID: 0000-0001-5112-6074

^g Bióloga. ORCID: 0000-0002-1482-7223

^h Biólogo. ORCID: 0000-0002-0562-0431

ⁱ Biólogo, magister en bioinformática. ORCID: 0000-0001-7268-0496

^j Biólogo, doctor en biología molecular. ORCID: 0000-0003-1437-5607

^k Tecnólogo médico. ORCID: 0000-0002-4935-063X

^l Biólogo. ORCID: 0000-0002-8565-4331

^m Médico infectólogo. ORCID: 0000-0001-5120-0713

An Fac med. 2023;84(1)/ DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i1.24134>.

Correspondencia:

María Paquita García Mendoza
pgarcia@ins.gob.pe

Recibido: 29 de noviembre 2022

Aprobado: 15 de enero 2023

Publicación en línea: 28 de febrero 2023

Conflicto de interés: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Fuente de financiamiento: Este estudio fue financiado por el Instituto Nacional de Salud (código de registro OC-026-20).

Contribuciones de los autores: Todos los autores participaron en la concepción, diseño del artículo y recogida de datos. Todos los autores participaron en la interpretación de los datos, redacción del manuscrito, crítica revisión del manuscrito y aprobación de la versión final. Asimismo, asumen la responsabilidad por lo publicado.

Citar como: García M, Palomino-Rodriguez M, Hernández M, Rios-Monteza P, Huaranga-Núñez M, Guevara C, et al. Primer aislamiento y caracterización de la cepa prototipo del virus SARS-CoV-2 a inicios de la pandemia de la COVID-19 en el Perú. An Fac med. 2023;84(1). DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i1.24134>

Resumen

Introducción: Actualmente los contagios por el virus del SARS-CoV-2 supera los 600 millones de casos en el mundo. **Objetivo:** Aislar y caracterizar el virus SARS-CoV-2 causante de la COVID-19 a inicios de la pandemia en el Perú. **Materiales y métodos:** Se realizó el aislamiento viral a partir de 20 muestras de hisopado nasal y faringeo positivas a SARS-CoV-2 por RT-PCR. El aislamiento se realizó en las líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y Vero E6, evaluando el efecto citopático, la presencia del virus por RT-PCR, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y posterior identificación por secuenciación genómica. Posteriormente, uno de los aislamientos de mayor circulación fue seleccionado y denominado cepa prototipo (PE/B.1.1/28549/2020), realizándose 10 pasajes sucesivos en células Vero ATCC CCL-81 para evaluar la dinámica de mutaciones. **Resultados:** Se observaron 11 aislamientos de virus por efecto citopático confirmándose por RT-PCR e IFI, de los cuales 6 fueron secuenciados identificándose los linajes B.1, B.1.1, B.1.1.1 y B.1.205, según el comité Pango de los genomas. La cepa prototipo corresponde a la variante B.1.1 y el análisis de las secuencias de los pasajes sucesivos mostró mutaciones a nivel de la proteína de la espiga (S) del virus, sin variación en la identidad del linaje. **Conclusiones:** Se aislaron 4 linajes en la línea celular Vero ATCC CCL-81. Los subcultivos en la misma línea celular muestran mutaciones en la proteína de la espiga, lo que indica mayor adaptabilidad a la célula hospedera y variación de la patogenicidad *in vitro*, comportamiento que le permite tener más éxito de supervivencia.

Palabras clave: Infecciones por Coronavirus; Betacoronavirus; Células Vero; Virulencia (fuente: DeCS BIREME).

Abstract

Introduction: Currently, infections caused by the SARS-CoV-2 virus exceed 600 million cases in the world. **Objective:** Isolation and characterization of the SARS-CoV-2 virus causing COVID-19 at the beginning of the pandemic in Peru. **Materials and methods:** Twenty nasal and pharyngeal swab samples were isolated from SARS-CoV-2 using two cell lines, Vero ATCC CCL-81 and Vero E-6; virus identification was performed by RT-PCR and the onset of cytopathic effect (CPE) was evaluated by indirect immunofluorescence and subsequent identification by genomic sequencing. One of the most widely circulating isolates were selected and named the prototype strain (PE/B.1.1/28549/2020). Then 10 successive passages were performed on Vero ATCC CCL-81 cells to assess mutation dynamics. **Results:** We detected 11 virus isolates by cytopathic effect, and subsequently confirmed by RT-PCR and indirect immunofluorescence. Of these, six were sequenced and identified as the lineages B.1, B.1.1, B.1.1.1, and B.1.205 according to the Pango lineage nomenclature. The prototype strain corresponded to lineage B.1.1. The analysis of the strains from the successive passages showed mutations mainly at in the spike (S) protein of the virus without variation in the identity of the lineage. **Conclusions:** Four lineages were isolated in the Vero ATCC CCL-81 cell line. Subcultures in the same cell line show mutations in the spike protein indicating greater adaptability to the host cell and variation in pathogenicity *in vitro*, a behavior that allows it to have more survival success.

Keywords: Coronavirus Infections; Betacoronavirus; Vero Cells; Virulence (Source: MeSH).

INTRODUCCIÓN

A fines de diciembre del 2019, en la ciudad de Wuhan en la República Popular de China, apareció el nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, el cual es la causa de la nueva enfermedad llamada COVID-19⁽¹⁾. Este nuevo virus respiratorio se extendió rápidamente a muchos países y causó casos de neumonía atípica, que en asociación con una serie de factores de riesgo, generaron casos de mayor severidad y mortalidad^(2,3). El 11 de marzo del 2020 la infección fue declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽⁴⁾.

En el Perú, el Instituto Nacional de Salud reportó el 6 de marzo del 2020 el primer caso confirmado de la COVID-19. A pesar de las estrictas medidas de inmovilización social adoptadas por el gobierno, los casos de infección por el SARS-CoV-2 fueron aumentando considerablemente, el mayor pico de infección de la primera ola fue en julio del 2020. El Perú fue el país con la mayor tasa de mortalidad per cápita en el mundo⁽⁵⁾.

Las constantes mutaciones genéticas del virus SARS-CoV-2 ha originado la aparición de diversas variantes que se han extendido por todo el mundo⁽⁶⁾, observándose una competencia evolutiva entre ellas, con el desplazamiento de una sobre otras. Dichas mutaciones son las responsables de los diversos picos de contagio observados en todos los países^(7,8). Según

su impacto en la salud pública, la OMS las ha clasificado en variantes de preocupación (VOC, por sus siglas en inglés) y variantes de interés (VOI, por sus siglas en inglés)⁽⁹⁾. Actualmente las variantes con bajos niveles de circulación o no detectadas son clasificadas como variantes de bajo monitoreo, mientras que ómicron pertenece a las VOC y VOI.

El Perú ha registrado cuatro olas; la primera en abril del 2020 generada por la variante B.1.1 como linaje predominante^(10,11); la segunda ola durante el primer semestre del 2021 fue causada por la variante lambda/gamma (C37/P1)⁽¹²⁾; la tercera ola en enero del 2022 fue causada por la variante ómicron, principalmente (BA.1/BA.2)^(12,13); y la cuarta ola en junio del 2022 fue causada por los sublinajes/subvariantes de ómicron (BA.4 y B.A.5)^(13,14).

El aislamiento, la tipificación, la caracterización del comportamiento del virus y la determinación de la respuesta humoral a la infección natural y a la vacuna son logros científicos derivados del conocimiento de la biología de los virus. Entre las aplicaciones del aislamiento del virus SARS-CoV-2 tenemos la elaboración de paneles de evaluación de la calidad para garantizar el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2; la evaluación de los principios activos con potencial terapéutico; y el desarrollo de diversos métodos de ensayo como las pruebas inmunoenzimáticas que detectan anticuerpos IgM e IgG, la prueba

de neutralización por reducción de placas (PRNT) para la titulación de los anticuerpos neutralizantes, y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de virus y anticuerpos totales. Por lo descrito, este estudio tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización el virus SARS-CoV-2 a partir de muestras de hisopado nasal y faríngeo obtenidas al inicio de la pandemia de la COVID-19 en el Perú.

MÉTODOS

Muestras

Para el aislamiento viral fueron seleccionadas 20 muestras de hisopado nasal y faríngeo con resultado positivo según el método de RT-PCR para SARS-CoV-2⁽¹⁵⁾. Se consideró valores de umbral de ciclo (Ct) menores a 30 para una carga viral adecuada⁽¹⁶⁾. Las muestras fueron recibidas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Virus Respiratorios (LRNVR) del Instituto Nacional de Salud (INS) (Lima-Perú) en abril del 2020. El resumen del aislamiento e identificación de la cepa prototipo se muestra en la figura 1.

Cultivo celular

Las líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y E6 se utilizaron para el aislamiento del virus de SARS-CoV-2^(17,18). Las células crecieron en medio esencial mínimo de Earle (EMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS, marca SIGMA) al 10% y

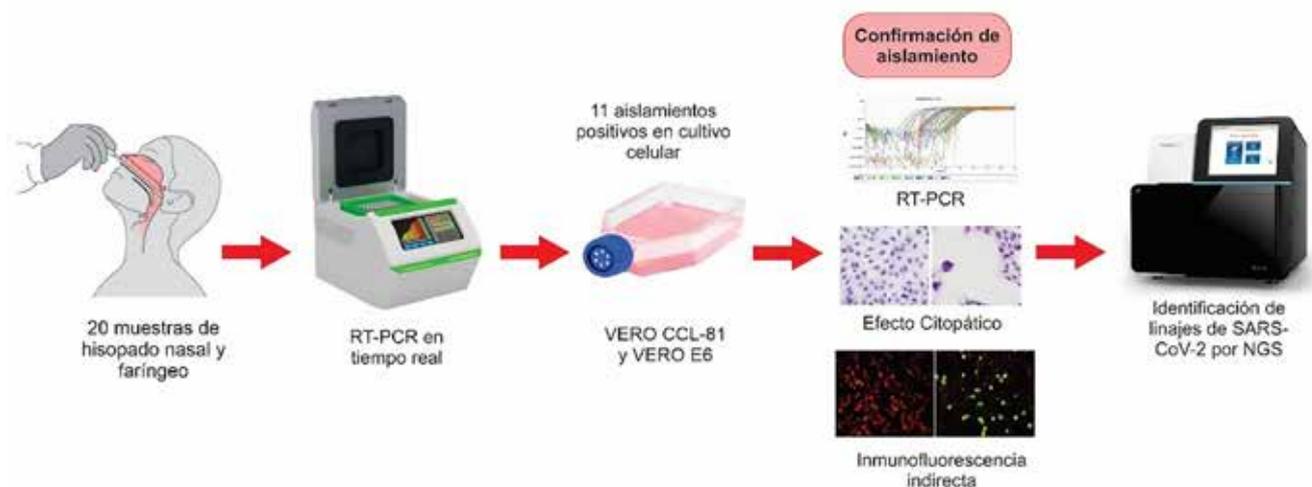


Figura 1. Resumen gráfico del aislamiento e identificación de la cepa prototipo (PE/B.1.1/28549/2020) de SARS-CoV-2 al comienzo de la pandemia en el Perú.

penicilina-estreptomomicina-anfotericina al 1%, se cultivó a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ (18).

Aislamiento y pasajes del virus SARS-CoV-2

El aislamiento del virus SARS-CoV-2 se realizó en las instalaciones del laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (NBS-3) del Laboratorio de Microbiología y Biomedicina del INS. Se siguieron los protocolos internacionales establecidos (19) y procedimientos institucionales para el aislamiento de virus respiratorios (20). Las muestras de hisopado positivas a SARS-CoV-2 fueron filtradas con membrana de poro de 0,22 µm e inoculadas en la línea celular Vero ATCC CCL-81 y E6 con 90% de confluencia de células, luego de 1 hora de adsorción viral a 37°C, se adicionaron 3 mL de medio EMEM con 2% SBF e incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Las células fueron observadas diariamente en microscopio invertido para detectar la aparición de efecto citopático, hasta siete días después de la infección (21,22). Los sobrenadantes se colectaron para la confirmación por RT-PCR, y las células adherentes se usaron para confirmación por IFI.

Titulación viral

La cuantificación del virus SARS-CoV-2 se realizó mediante el ensayo en placa. Se utilizaron placas de cultivo celular con fondo plano de 24 pocillos; las placas fueron sembradas con una suspensión celular de 2,5 x 10⁵/mL de células (Vero ATCC CCL-81) incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂ durante una noche para lograr una confluencia del 100% (23).

Las células fueron infectadas con el virus realizándose diluciones seriadas en base diez (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 60 min. Seguidamente se adicionó a cada pozo 1 mL de medio overlay (medio MEM 2X suplementado con L-glutamina a 2 nM), suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/mL de antibiótico y carboximetilcelulosa (CMC de SIGMA al 3% estéril). Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Después de 5 días, el medio fue retirado, las células se fijaron y colorearon con cristal violeta/formaldehído. Los títulos de SARS-CoV-2 fueron expresados como unidades formadoras de placas por mililitro

(UFP/mL) (24,25).

Pruebas de confirmación viral

Se colectó 200 µL del sobrenadante del cultivo, el cual fue inactivado a 56 °C y 450 rpm en termobloque durante 60 minutos (26). Luego fue transportado al laboratorio de nivel bioseguridad 2 (NBS-2). La extracción de RNA fue realizada utilizando el kit de extracción viral de ácido nucleico Zymo (China), a través del método de perlas magnéticas, siguiendo las instrucciones del fabricante (22,27). Las muestras de ARN purificadas se procesaron mediante RT-PCR. El proceso de amplificación se realizó utilizando el kit de un solo paso SuperScript™ IV (Invitrogen) siguiendo condiciones estandarizadas (15,28).

Prueba complementaria de inmunofluorescencia indirecta

Se desarrolló la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar el virus SARS-CoV-2 aislado en el cultivo celular. Se utilizó muestra de suero de un paciente en fase convaleciente (diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 por RT-PCR), caracterizada por la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), como fuente de anticuerpos policlonales al virus SARS-CoV-2.

A los 7 días posteriores a la infección de las células Vero ATCC CCL-81 y Vero E6, se colectó el sobrenadante y las células fueron lavadas y resuspendidas con PBS 1X. Se obtuvo una suspensión celular adecuada y se dispensaron en láminas para inmunofluorescencia, estas láminas fueron fijadas con acetona -20 °C/20 minutos; para la detección del virus se adicionó por duplicado 20 µL de una dilución de suero (suero control positivo, suero control negativo a dilución 1/20 en PBS), y control de diluyente PBS, se incubó en cámara húmeda a 37 °C/30 min, se lavó 2 veces con PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente; seguidamente, se agregó 20 µL de conjugado anti-IgG humano marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) + Azul de Evans (100X) en una dilución de (1/160) a todos los pocillos y se incubó en cámara húmeda a 37 °C/30 min protegidas de la luz, se lavaron 2 veces con PBS y se adicionó el líquido de montaje, pH 7,2 – 7,4 (22,27). La lectura se realizó en el microscopio de

fluorescencia, las láminas se pueden mantener hasta 24 h a 4 °C en la oscuridad. La interpretación se basa en la presencia de fluorescencia (positivo), la ausencia de fluorescencia se considera negativo.

Modelo de dinámica evolutiva *in vitro* y caracterización

Se utilizó el modelo de la dinámica de evolución viral propuesto por Wood (29), que sugiere 10 pasajes sucesivos en cultivo de la misma línea celular para conocer la adaptación del virus al nuevo entorno del huésped en relación a la virulencia. A partir del aislamiento de una de las muestras positivas, a la que denominamos cepa prototipo (PE/B.1.1/28549/2020), se le realizó 10 pasajes continuos en la línea celular Vero ATCC CCL-81. El cultivo del virus en cada pasaje fue observado hasta la aparición del efecto citopático (5 a 7 días). El sobrenadante fue colectado y centrifugado a 2000 rpm por 10 min a 4°C y se realizaron alícuotas para el análisis por titulación viral y secuenciación genómica

Secuenciación del genoma completo de aislados de SARS-CoV-2

Las muestras de los aislamientos y de los pasajes de la cepa prototipo (PE/B.1.1/28549/2020) del virus SARS-CoV-2, fueron extraídas con el kit de extracción de ADN/ARN viral por inmunomagnetismo MAGBEAD (ZymoBIOMICS) en la plataforma automatizada Opentrons OT-2. La preparación de la biblioteca se realizó utilizando la prueba COVIDSeq de Illumina y se secuenció en NextSeq 550 (Illumina®) siguiendo las instrucciones del fabricante (30)

Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas y la eliminación de la contaminación de las lecturas se realizó utilizando FastQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y Kraken2 v2.0.8 respectivamente (29). Las lecturas del filtro se asignaron a la secuencia de referencia NCBI (NC_045512) aislada de Wuhan a través del programa BWA v0.7.17 (31). La secuencia de consenso se obtuvo utilizando Samtools v.1.9 e IVAR v.1 (32,33). Finalmente, la anotación de secuencias consenso se realizó utilizando NextClade (<https://clades>).

nextstrain.org/), y la designación de linaje se definió utilizando el programa Pangolin v.3.1.2 (<https://pangolin.cog-uk.io/>). El resumen de mutaciones se calculó con el programa Snipit (<https://github.com/aineniarnh/snipit>) con edición manual, se utilizó como referencia el primer aislado. Los genomas fueron alineados con el programa MAFFT v7.310 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) contra la referencia del SARS-CoV-2 (NC_045512). El alineamiento múltiple fue usado para la inferencia filogenética de los aislados, esta fue calculada con el programa RaxML v8.2.12⁽³⁴⁾ con 1000 de bootstrap.

RESULTADOS

Aislamiento viral y efecto citopático

Se aisló el virus SARS-CoV-2 en las dos líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y Vero E6. La valoración de la infección viral se realizó por la observación del efecto citopático (ECP). Se observó replicación viral más rápida en células Vero ATCC CCL-81 que en Vero E6, desde el tercer día posterior a la infección. El ECP en células Vero ATCC CCL-81 se caracterizó por focos de células redondas en la superficie de la monocapa celular, expandiéndose a un desprendimiento gradual y homogéneo. Las células Vero E6 mostraron formación

de sincitios y desprendimiento solo en algunas muestras, con lento desarrollo del ECP a partir de los 3 días posteriores a la infección.

Se consideró a las células Vero ATCC CCL-81 como óptimas para el aislamiento del virus SARS-CoV-2, por presentar un fenotipo de replicación viral más homogéneo y característico. En la figura 2 se observa el ECP comparativo entre las células Vero ATCC CCL-81 y Vero E6 después de 3 y 5 días posteriores a la infección, con la misma muestra de hisopado nasal y faríngeo. Se observó las células redondas y los sincitios, respectivamente, comparado con la monocapa de las células control.

Confirmación del aislamiento por RT-PCR e IFI

Se confirmaron 11 (55,0%) aislamientos de 20 muestras de hisopado nasal y faríngeo por el método RT-PCR, a partir de los cultivos en la línea celular Vero ATCC CCL-81. Los valores de Ct de los aislamientos se encontraron en el rango de 11 a 14, indicando que hubo replicación viral en comparación al Ct inicial del RT-PCR diagnóstico (Ct<30).

La IFI confirmó los mismos 11 (55,0%) aislamientos en las 20 muestras de hisopado nasal y faríngeo, sin diferencias

entre las dos líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y Vero E6. La figura 3 muestra la identificación del aislamiento del virus SARS-CoV-2 por IFI en células Vero ATCC CCL-81, observándose las células control sin infección (rojas) y las células infectadas con el virus SARS-CoV-2 con fluorescencia (verde).

Se resalta la muestra con código 28549 cuyo aislamiento fue uno de los que presentaron menores valores de Ct, indicando alta carga viral, además de mostrar el ECP característico y confirmación por IFI. Esta fue seleccionada como cepa prototipo y denominada PE/B.1.1/28549/2020 (Tabla 1).

Secuenciación del genoma completo de muestras de SARS-CoV-2 y análisis filogenético

De las 11 muestras con aislamiento confirmado del virus SARS-CoV-2 se logró obtener el genoma completo de 6 muestras que fueron analizadas y clasificadas en 4 diferentes linajes PANGO (un B.1, un B.1.1, dos B.1.1.1 y dos B.1.205). El linaje de la cepa prototipo PE/B.1.1/28549/2020 corresponde al B.1.1 (Tabla 1). El análisis filogenético muestra las distancias genéticas entre los diferentes linajes aislados al inicio de la pandemia en comparación al basal NC_045512.2 (Figura 4).

Dinámica evolutiva *in vitro*

Los pasajes sucesivos de la cepa prototipo PE/B.1.1/28549/2020 muestra la adaptación del virus SARS-CoV-2 en la línea celular Vero ATCC CCL-81, con aumento progresivo del título viral a mayor número de pasajes y una posterior caída en los últimos pasajes (Figura 5A). Esta adaptación muestra el aumento progresivo de la virulencia en la línea celular Vero ATCC CCL-81, observada desde la formación de unidades formadoras de placas (UFP) deficientes, con bordes no definidos en los primeros pasajes, que progresivamente se definen en los pasajes 3 y 4; mientras que en el pasaje 8 se muestran placas de lisis translúcidas, circulares y simétricas con bordes regulares (Figura 5B). La cuantificación de las UFP muestra el aumento progresivo del título viral proporcional al número de pasajes, teniendo

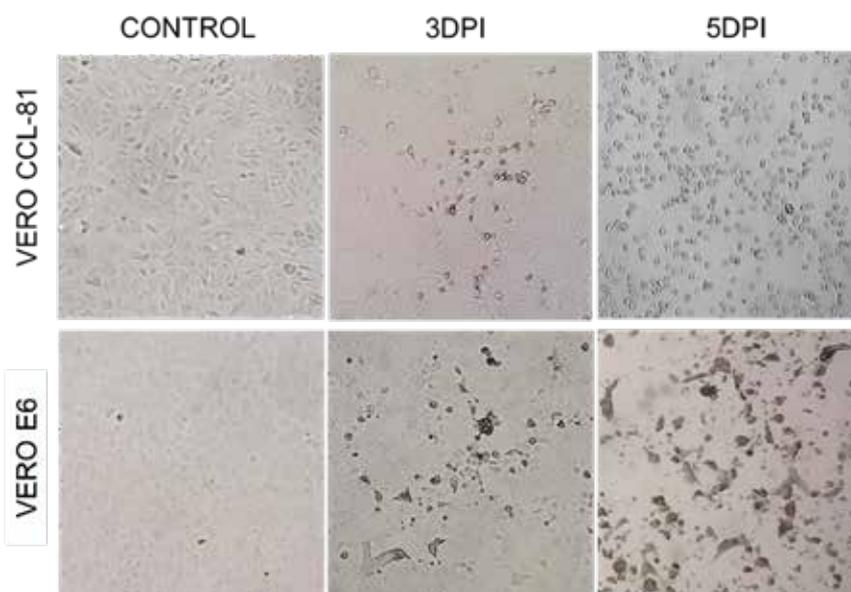


Figura 2. Efecto citopático comparativo en las líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y Vero E6 infectadas con el virus SARS-CoV-2. Se muestra la morfología en células a los 3 y 5 días posteriores a la infección (DPI).

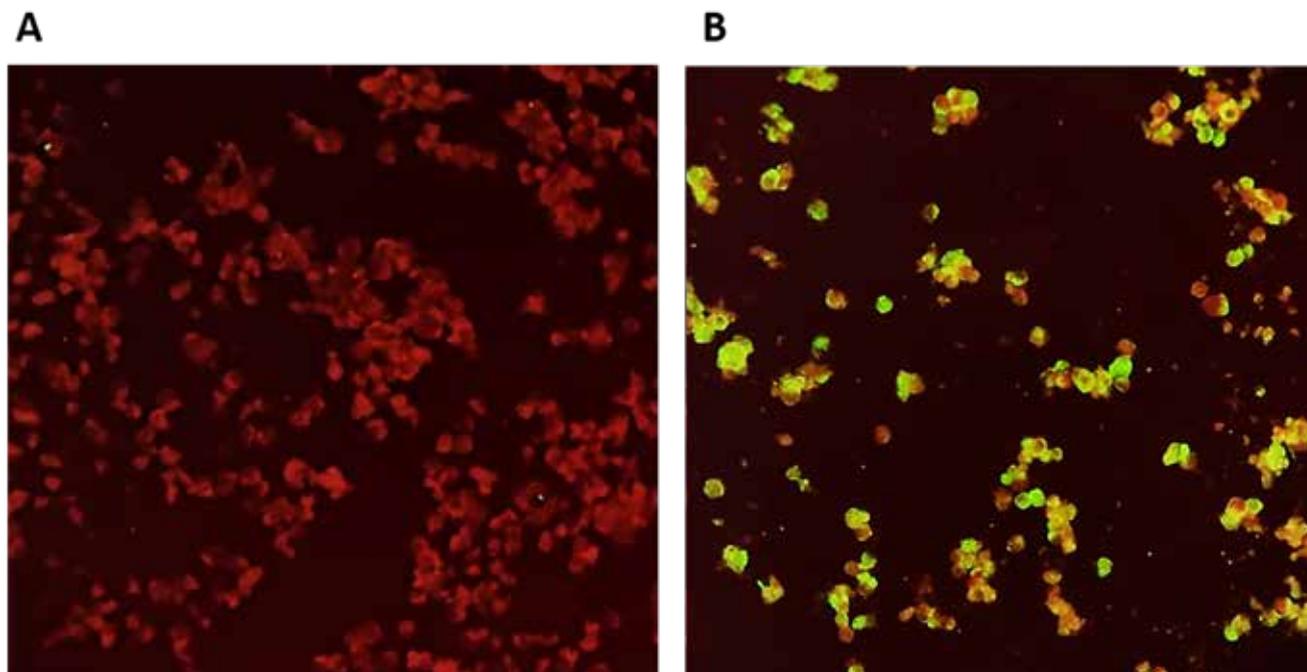


Figura 3. Identificación de aislamiento del virus SARS-CoV-2 por inmunofluorescencia indirecta (IFI). A. Reacción negativa para IFI. B. Reacción positiva para IFI.

como pico el pasaje 7 con un promedio de $59,5 \times 10^5$ UFP/mL y posterior declive en los pasajes siguientes (Figura 5C).

En complemento a las características fenotípicas observadas en los pasajes de

la cepa prototipo, la secuenciación en cada pasaje mostró alteraciones en el genoma del linaje asociadas con el fenotipo y carga viral (Figura 6). En el pasaje 2 (P2) de la cepa prototipo se encontró una de-

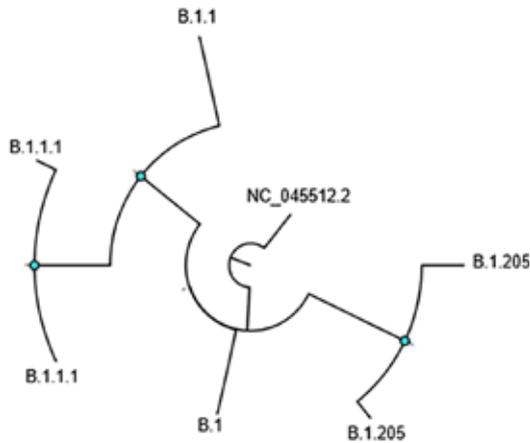
lección de 27 pares de base en la posición 21764 – 21790 y mutaciones a nivel de la proteína de la espiga en el pasaje 4 (P4) y pasaje 8 (P8). La mutación del pasaje 4 en la posición 23014 corresponde a un cambio

Tabla 1. Resultado del diagnóstico, aislamiento y secuenciación de las 20 muestras de SARS-CoV-2.

Muestras N°	Código de muestra	Hisopado (nasal y faríngeo)		Pruebas confirmatorias para aislamiento viral				Secuenciación
		RT-PCR		RT-PCR del aislamiento en Vero ATCC CCL-81		Vero ATCC CCL-81 y Vero E-6		NGS
		Ct	Resultado	Ct	Resultado	Efecto citopático	IFI	Linaje (PANGO)
1	28549	21.42	Positivo	9.56	Positivo	Positivo	Positivo	B.1.1
2	28594	20.56	Positivo	10.45	Positivo	Positivo	Positivo	B.1.1.1
3	8720	19.07	Positivo	13.63	Positivo	Positivo	Positivo	*
4	25413	16.04	Positivo	12.93	Positivo	Positivo	Positivo	B.1.1.1
5	9116	22.3	Positivo	12.89	Positivo	Positivo	Positivo	*
6	27171	23.7	Positivo	33.61	Positivo	Negativo	Negativo	-
7	27148	28.52	Positivo	36.63	Positivo	Negativo	Negativo	-
8	25400	20.3	Positivo	12.51	Positivo	Positivo	Positivo	*
9	28755	20.79	Positivo	10.05	Positivo	Positivo	Positivo	*
10	27195	23.58	Positivo	35.43	Positivo	Negativo	Negativo	-
11	28782	16.83	Positivo	12.27	Positivo	Positivo	Positivo	B.1.205
12	25618	29.97	Positivo	37.04	Positivo	Negativo	Negativo	-
13	25480	28.4	Positivo	38.43	Positivo	Negativo	Negativo	-
14	29700	21.54	Positivo	10.8	Positivo	Positivo	Positivo	B.1.205
15	25303	21.81	Positivo	31.91	Positivo	Negativo	Negativo	-
16	25142	24.03	Positivo	10.59	Positivo	Positivo	Positivo	B.1
17	284674	22.23	Positivo	10.71	Positivo	Positivo	Positivo	*
18	28520	19.38	Positivo	29.92	Positivo	Negativo	Negativo	-
19	23611	24.95	Positivo	35.98	Positivo	Negativo	Negativo	-
20	25262	22.19	Positivo	33.05	Positivo	Negativo	Negativo	-

*No se secuenció por muestra insuficiente.

NGS: Secuenciación de nueva generación, RT-PCR: Reverse transcription PCR, IFI: Inmunofluorescencia indirecta



N°	Código	Id de acceso	Fecha de colección	Linaje
1	29700	EPI_ ISL_1111169	15/04/2020	B.1.205
2	28594	EPI_ ISL_1111367	13/04/2020	B.1.1.1
3	25142	EPI_ ISL_1111376	12/04/2020	B.1
4	28782	EPI_ ISL_1111374	14/04/2020	B.1.205
5	28549	EPI_ ISL_1111366	13/04/2020	B.1.1
6	25413	EPI_ ISL_1111368	12/04/2020	B.1.1.1

Figura 4. Filogenia de los linajes del virus SARS-CoV-2 aislado en abril del 2020 en Lima-Perú al inicio de la pandemia.

aminoacídico de ácido glutámico por ácido aspártico (E484D) y la segunda mutación en la posición 24507 corresponde al cambio de una serina por leucina (S982L).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran concordancia con otros reportes que mencio-

nan la mayor probabilidad de aislamiento del virus SARS-CoV-2 asociado a la carga viral de las muestras, con Ct < 24 se logra 80% de recuperación del virus (35). También se muestra la utilidad de las líneas celulares Vero ATCC CCL-81 y Vero E6 en la replicación del virus SARS-CoV-2, con preferencia por la célula Vero ATCC CCL-81 como lo reportan algunos estudios (36), a diferencia de otros que indican mayor replicación celular en Vero E6, siendo la más utilizada (17). Para este estudio se utilizó el aislamiento clásico que sigue siendo un estándar de comparación, aunque actualmente se han desarrollado métodos como el de aislamiento automatizado de alta velocidad a gran escala de SARS-CoV-2, a partir de muestras clínicas mediante cocultivo miniaturizado (37).

En esta investigación se confirmó el aislamiento del virus SARS-CoV-2 de 11 muestras de hisopado nasal y faríngeo por el método de RT-PCR e IFI, se observó que en el RT-PCR del aislamiento los valores de Ct fueron menores en comparación con el RT-PCR diagnóstico. Las 9 muestras no aisladas a pesar de tener un RT-PCR de aislamiento positivo los valores de Ct son mayores al PCR diagnóstico, lo cual indica que no hubo replicación viral, esto fue complementado con los resultados negativos del efecto citopático e IFI.

La selección de la cepa prototipo del virus SARS-CoV-2 denominada PE/B.1.1/28549/2020 y la generación de 10 pasajes sucesivos *in vitro* mostró mutaciones del virus para una mejor adaptación a la célula huésped Vero ATCC CCL-81, en este caso, específicamente a

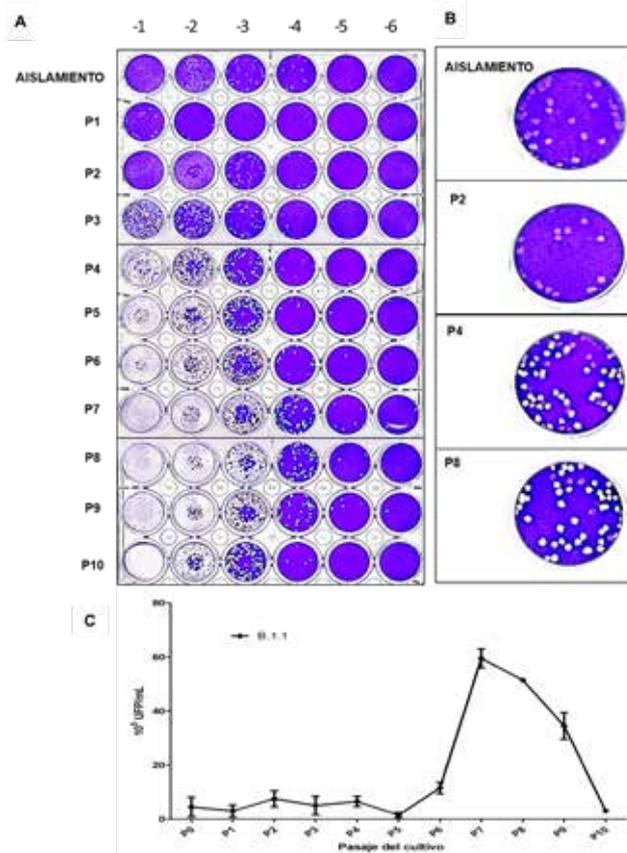


Figura 5. Dinámica mutacional del linaje B.1.1 del virus SARS-CoV-2 (PE/B.1.1/28549/2020) en 10 pasajes sucesivos en células Vero ATCC CCL-81. A. Titulación de los 10 pasajes del virus SARS-CoV-2. B. Aspecto morfológico de las placas virales de los pasajes del virus SARS-CoV-2. C. Cuantificación del título viral en los 10 pasajes. Los datos muestran la media y desviación estándar de 4 repeticiones.

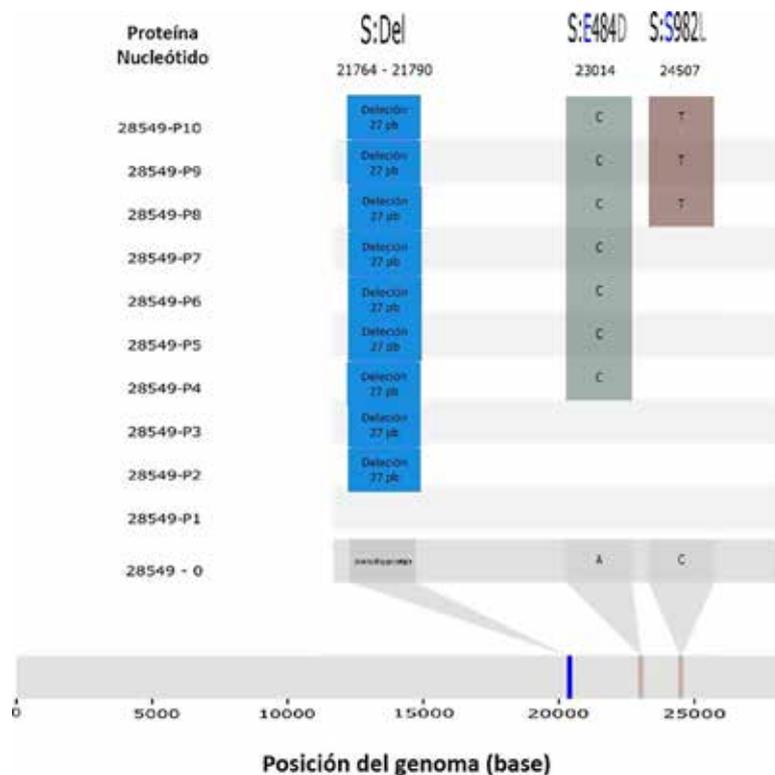


Figura 6. Secuenciación de los 10 pasajes del linaje B.1.1 del virus SARS-CoV-2. Se observa en el pasaje 2 (P2) una delección de 27 pares de base en la posición 21764 – 21790 y mutaciones a nivel de la proteína de la espiga en el pasaje 4 (P4) en la posición 23014 (E484D) y el pasaje 8 (P8) corresponde a la posición 24507 (S982L).

nivel de la proteína de la espiga, causando delecciones y mutaciones. La mutación nucleotídica del pasaje 4 (P4) en la posición 23014 (E484D) permitió a la cepa adaptarse a la línea celular e infectar satisfactoriamente, con aumento de su virulencia. Esta mutación fue reportada en la cepa original de Wuhan (Wuhan-Hu-1, número de acceso de GenBank NC_045512) ⁽³⁸⁾

La segunda mutación del pasaje 8 corresponde a la posición 24507 (S982L), esta mutación disminuye su virulencia, pero demuestra la adaptación genética a la línea celular. Investigaciones con resultados similares indican que el virus SARS-CoV-2 cuando es cultivado está bajo una fuerte presión selectiva para adquirir estas mutaciones en diversos ORF del genoma, entre ellos el gen S ^(39,40). Dichos hallazgos confirman que estas mutaciones se fijan durante la adaptación del virus a las condiciones del ambiente, como lo muestran estudios de ARN *in vitro* ^(40,41).

En conclusión, se aisló el virus del SARS-CoV-2 en células Vero ATCC CCL-81. El aislamiento se realizó de muestras obtenidas durante la primera ola de la pandemia de la COVID-19 en el Perú. En abril del 2020 fueron identificados 4 linajes PANGO (B.1, B.1.1, B.1.1.1 y B.1.205) circulantes. Los pasajes sucesivos de la cepa prototipo PE/B.1.1/28549/2020 presentó mutaciones en la proteína de la espiga indicando su adaptación a la célula hospedera, que le permitió tener más éxito de supervivencia. La obtención de dicho aislado nos permitió realizar la transferencia del material biológico a otras instituciones de investigación que desarrollaban tecnologías para enfrentar la pandemia de la COVID-19.

Agradecimientos: Los autores agradecen al equipo de diagnóstico de COVID-19 del Instituto Nacional de Salud de Perú y al personal de coordinación del Laboratorio de Virus Respiratorios: Blga. Nancy Rojas, Blgo. Joseph Huayra, Blga. Gloria Arotinco y Blga. Priscila Lope. Además, agrade-

cemos la colaboración del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, NAMRU-6, al Dr. Max Grogil, TM. Dina Puche y Tec. Lab. Alfredo Huamán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020 [Internet]. Ginebra: World Health Organization; 2020 [Citado el 26 de mayo del 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>
2. Huang D, Lian X, Song F, Ma H, Lian Z, Liang Y, et al. Clinical features of severe patients infected with 2019 novel coronavirus: a systematic review and meta-analysis. *Ann Transl Med.* 2020; 8(9):576–576. doi:10.21037/ATM-20-2124
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020; 579(7798):265–269. doi:10.1038/s41586-020-2008-3
4. La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Organización Panamericana de la Salud; 2020 [Citado el 05 de setiembre del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia>
5. Perú duplica las muertes por covid-19 tras una revisión de cifras y se convierte en el país con la mayor tasa de mortalidad per cápita del mundo - BBC News Mundo [Internet]. BBC News Mundo; 2021 [Citado el 05 de setiembre del 2022]. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-america-latina-57310960>
6. Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2 [Internet]. CDC; 2021 [Citado el 16 de setiembre 2022]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variant-info.html>
7. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol.* 2020; 81:104260. doi:10.1016/j.meegid.2020.104260
8. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. Johns Hopkins University Medicine; 2022 [Citado el 05 de julio 2022]. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
9. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2 [Internet]. Organización Mundial de la Salud (OMS); 2022 [Citado el 05 de julio 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
10. Gutiérrez-Tudela JW. La pandemia de la COVID-19 en el Perú: análisis epidemiológico de la primera ola. *Rev la Soc Peru Med Interna.* 2021; 34(2):51–2. doi:10.36393/SPMI.V34I2.595
11. Padilla-Rojas C, Vega-Chozo K, Galarza-Perez M, Bailon Calderon H, Lope-Pari P, Balbuena-Torres J, et al. Genomic analysis reveals local transmission of SARS-CoV-2 in early pandemic phase in Peru. *bioRxiv.* 2020; 2020.09.05.284604. doi:10.1101/2020.09.05.284604
12. Toyama M, Vargas L, Ticlihuana S, Quispe AM. Regional clustering and waves patterns due to COVID-19 by the index virus and the lambda/delta/gamma, and delta/omicron SARS-CoV-2 variants in Peru. *Ann Epidemiol.* 2022; 75:74. doi:10.1016/j.annepidem.2022.08.026
13. Sala de Situación de COVID-19 [Internet]. Ministerio de salud Perú; 2022 [Citado el 28 de abril del 2022]. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/covid19.html>
14. Lupa S con. Perú entró en la cuarta ola de covid-19 con más de 11.000 casos semanales - Salud con lupa

- [Internet]. Lima: Salud con Lupa; 2022 [Citado el 05 de julio 2022]. Disponible en: <https://saludconlupa.com/noticias/peru-entro-en-la-cuarta-ola-de-covid-19-con-mas-de-11000-casos-semanales/>
15. Rojas-Serrano N, Lope-Pari P, Huaranga-Nuñez M, Simas PVM, Palacios-Salvatierra R, Balbuena-Torres J, et al. Validación y evaluación de una prueba de RT-PCR en tiempo real in house para la detección de SARS-CoV-2 usando un gen específico RdRp y control endógeno GAPDH. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021; 38(4):595–600. doi:10.17843/RPMESP.2021.384.7596
 16. Padilla-Rojas C, Jimenez-Vasquez V, Hurtado V, Mestanza O, Molina IS, Barcena L, et al. Genomic analysis reveals a rapid spread and predominance of lambda (C.37) SARS-COV-2 lineage in Peru despite circulation of variants of concern. *J Med Virol*. 2021; 93(12):6845–9. doi:10.1002/JMV.27261
 17. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamil S, Kumar Sakthivel S, Murray J, et al. Isolation and characterization of SARS-CoV-2 from the first US COVID-19 patient. *bioRxiv*. 2020; 2020.03.02.972935. doi:10.1101/2020.03.02.972935
 18. Yamada S, Fukushi S, Kinoshita H, Ohnishi M, Suzuki T, Fujimoto T, et al. Assessment of SARS-CoV-2 infectivity of upper respiratory specimens from COVID-19 patients by virus isolation using VeroE6/TMPRSS2 cells. *BMJ Open Respir Res*. 2021; 8(1). doi:10.1136/BMJRESP-2020-000830
 19. Criterios para poner fin al aislamiento de los pacientes de COVID-19: reseña científica, 17 de junio de 2020 [Internet]. Ginebra: OMS; 2020 [Citado el 02 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332997>
 20. Roth B, Mohr H, Enders M, Garten W, Gregersen JP. Isolation of influenza viruses in MDCK 33016PF cells and clearance of contaminating respiratory viruses. *Vaccine*. 2012; 30(3):517–22. doi:10.1016/J.VACCINE.2011.11.063
 21. Taştan C, Yurtsever B, Sir Karakuş G, Dilek Kançağlı D, Demir S, Abanuz S, et al. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk J Biol*. 2020; 44(3):192–202. doi:10.3906/biy-2004-113
 22. Díaz FJ, Aguilar-Jiménez W, Flórez-Álvarez L, Valencia G, Laiton-Donato K, Franco-Muñoz C, et al. Aislamiento y caracterización de una cepa temprana de SARS-CoV-2 durante la epidemia de 2020 en Medellín, Colombia. *Biomédica*. 2020; 40(Supl. 2):148–58. doi:10.7705/BIOMEDICA.5834
 23. Mendoza EJ, Manguiat K, Wood H, Drebort M. Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 57(1):cpmc105. doi:10.1002/CPMC.105
 24. Leite JA, Resende P, Araya JL, Barrera GB, Baumeister E, Caicedo AB, et al. Genetic evolution of influenza viruses among selected countries in Latin America, 2017–2018. *PLoS One*. 2020; 15(3):e0227962. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0227962
 25. Harfoot R, Lawley B, Hernández LC, Kuang J, Grant J, Treece JM, et al. Characterization of the First SARS-CoV-2 Isolates from Aotearoa New Zealand as Part of a Rapid Response to the COVID-19 Pandemic. *Viruses*. 2022; 14(2):366. doi:10.3390/V14020366/S1
 26. Jureka AS, Silvas JA, Basler CF. Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020;12(6):622. doi:10.3390/v12060622
 27. Manual de procedimientos para diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) por inmunofluorescencia indirecta - Informes y publicaciones - Ministerio de Salud - Gobierno del Perú [Internet]. Lima: INS; 2001 [Citado el 02 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/353005-manual-de-procedimientos-para-diagnostico-del-virus-de-la-inmunodeficiencia-humana-tipo-1-vih-1-por-inmunofluorescencia-indirecta>
 28. Thermo Fisher Scientific. SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System [Internet]. 2022 [Citado el 02 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12594025>
 29. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 2019; 20(1):1–13. doi:10.1186/S13059-019-1891-0/FIGURES/2
 30. Goswami C, Sheldon M, Bixby C, Keddache M, Bogdanowicz A, Wang Y, et al. Identification of SARS-CoV-2 variants using viral sequencing for the Centers for Disease Control and Prevention genomic surveillance program. *BMC Infect Dis*. 2022; 22(1):404. doi:10.1186/S12879-022-07374-7
 31. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754–60. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324
 32. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021;10(2):giab008. doi:10.1093/gigascience/giab008
 33. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol*. 2019; 20(1):1–19. doi:10.1186/S13059-018-1618-7/FIGURES/9
 34. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30(9):1312–3. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTU033
 35. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Bernal JL, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(32):2001483. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483
 36. Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, Malta F de M, de Araujo GG, Monteiro CO, et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115:1–8. doi:10.1590/0074-02760200342
 37. Francis R, Le Bideau M, Jardot P, Grimaldier C, Raoult D, Bou Khalil JY, et al. High-speed large-scale automated isolation of SARS-CoV-2 from clinical samples using miniaturized co-culture coupled to high-content screening. *Clin Microbiol Infect*. 2021; 27(1):128.e1–128.e7. doi:10.1016/J.CMI.2020.09.018
 38. Chung H, Noh JY, Koo BS, Hong JJ, Kim HK. SARS-CoV-2 mutations acquired during serial passage in human cell lines are consistent with several of those found in recent natural SARS-CoV-2 variants. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022; 20:1925–34. doi:10.1016/J.CSBJ.2022.04.022
 39. Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, Limpens RWAL, van der Meer Y, Caly L, et al. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J Gen Virol*. 2020; 101(9):925–40. doi:10.1099/JGV.0.001453/CITE/REFWORKS
 40. Sonnleitner ST, Sonnleitner S, Hinterbichler E, Halbfurter H, Kopecky DBC, Koblmüller S, et al. The mutational dynamics of the SARS-CoV-2 virus in serial passages *in vitro*. *Virology*. 2022; 37(2):198–207. doi:10.1016/J.VIRS.2022.01.029
 41. Sasaki M, Uemura K, Sato A, Toba S, Sanaki T, Maenaka K, et al. SARS-CoV-2 variants with mutations at the S1/S2 cleavage site are generated *in vitro* during propagation in TMPRSS2-deficient cells. *PLOS Pathog*. 2021; 17(1):e1009233. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1009233.