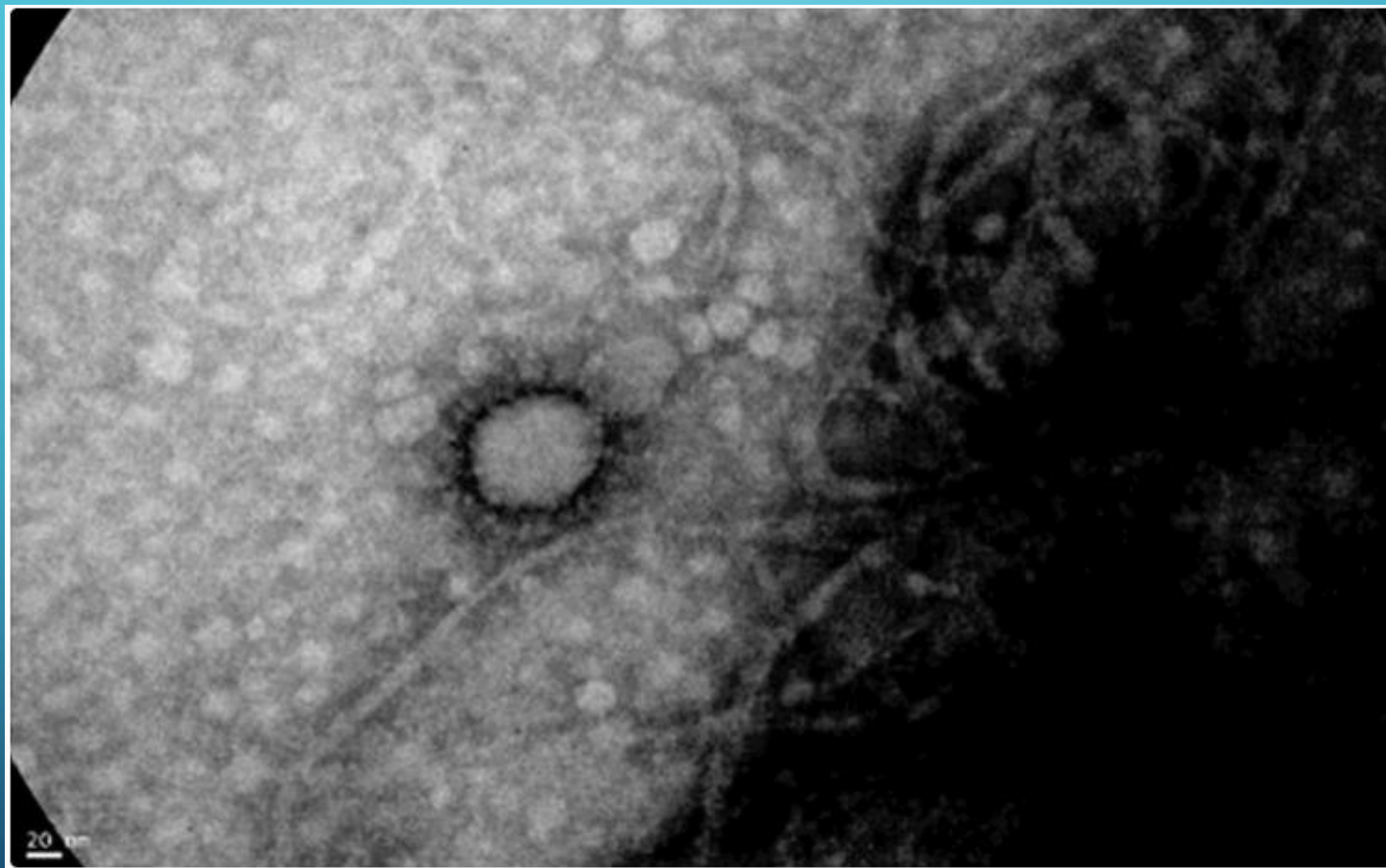




IMPORTANCIA DEL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO Y EN LA DETECCIÓN DE VARIANTES

DR. CARLOS ESPUL

SARS-COV-2



Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Profesor E de Robertis",
UBA - CONICET de la Facultad de Medicina

ESTRUCTURA GENÓMICA VIRAL

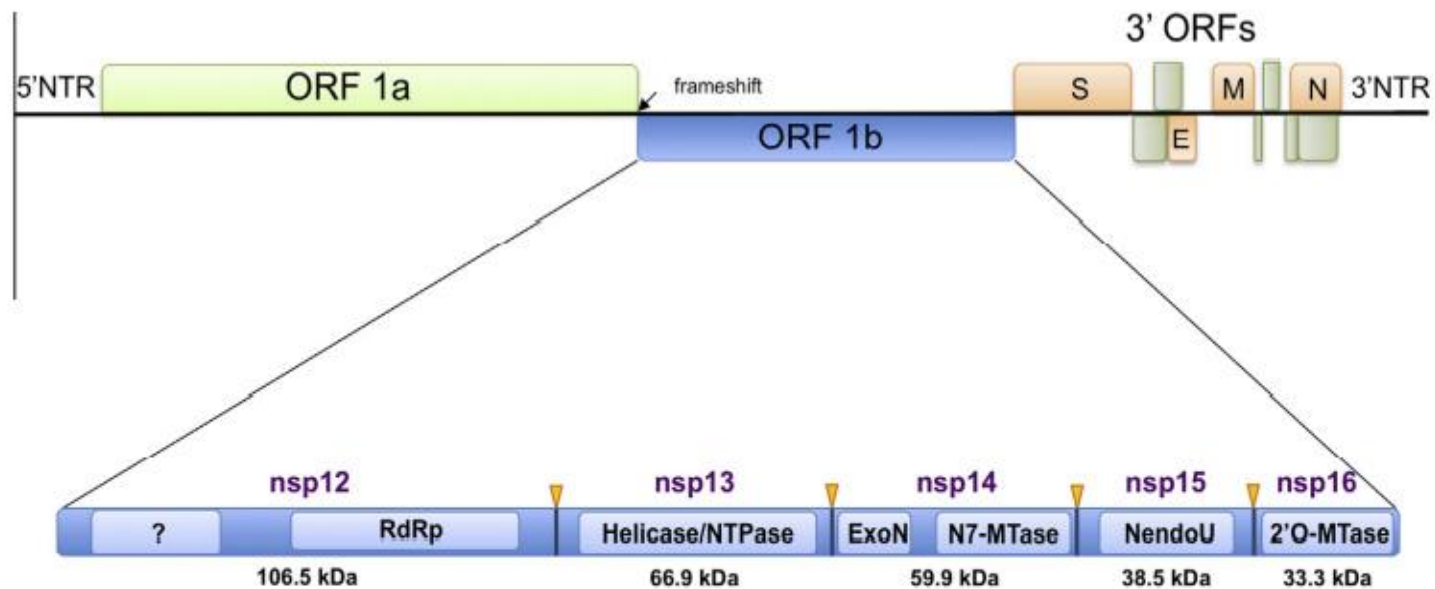


Fig. 1. Coronavirus genome organization and expression. Coronavirus genome is depicted and divided into five main segments: 5'NTR (nontranslated region), ORF1a (light green), ORF1b (blue), 3'ORFs, corresponding to all open reading frames coding for structural (orange) and accessory proteins (dark green), and 3'NTR. The ORF1b is zoomed and the derived nonstructural proteins are shown. The nsp5 protease cleavage sites (yellow arrow), the domains harbouring enzymatic activities (soft blue) and the size of each nsp are also depicted. ?: predicted domain of unknown function; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; NTPase, nucleoside triphosphatase, also capable of hydrolyzing 5'-triphosphate-RNA to 5'-diphosphate-RNA; ExoN, 3' to 5' exonuclease; N7-MTase, guanine-N7-methyltransferase; NendoU, endoribonuclease; 2'-O-MTase, 2'-O-methyltransferase. Protein size is indicated below each nsp.

CAMBIOS EN SARS-COV-2

Pueden originar cambios: negativos, neutros o positivos para la evolución del virus

- Facilitar su propagación/transmisibilidad=cambio en su epidemiología
- Aumentar su patogenicidad o virulencia:
 - a. Menor rendimiento de anticuerpos generados (infección natural/vacunas
 - b.)
 - c. Menor respuesta a medicamentos terapéuticos

Este matrimonio es imposible,
ustedes han divergido demasiado



TASAS DE MUTACIÓN Y DE EVOLUCIÓN GENÓMICA

- Tasa de mutación: Asociada a errores que ocurren en la replicación de RNA

Medida en Mutaciones/genoma/replicación

- Tasa de evolución: Asociada al número de sustituciones nucleotídicas/sitio/año

(Se estudian virus de diferentes pacientes en diferentes periodos de tiempo)

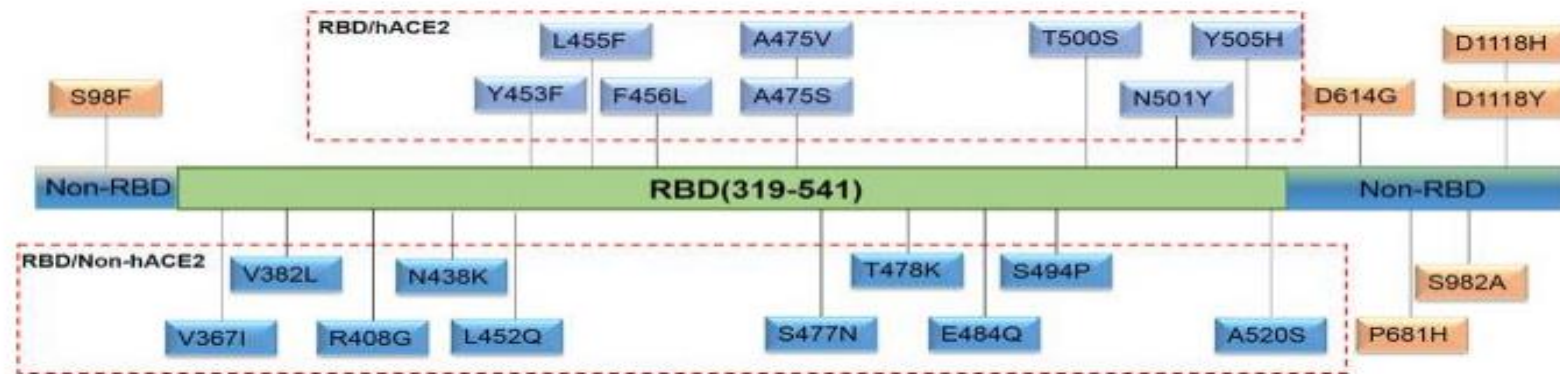
TASA DE MUTACIÓN DE SARS-COV-2

Table S1. Evolutionary rates of pathogenic RNA viruses

Virus	Type	Evolutionary rate (10^{-3} sub/site/year)
HIV	Retrovirus	2.02 – 16.8
Poliovirus	+ssRNA	10.3
Influenza A	-ssRNA	1.43 - 1.16
SARS-CoV	+ssRNA	7.8
SARS-CoV-2	+ssRNA	0.8 - 6.58
Rotavirus	dsRNA	0.73
Hepatitis C virus	+ssRNA	0.48 – 0.91
MERS-CoV	+ssRNA	0.24

Tasa de mutación es \neq de la evolución antigénica: caso poliovirus vs influenza

La evolución antigénica condiciona una resistencia a través de la evasión inmune, bajo presión de selección positiva



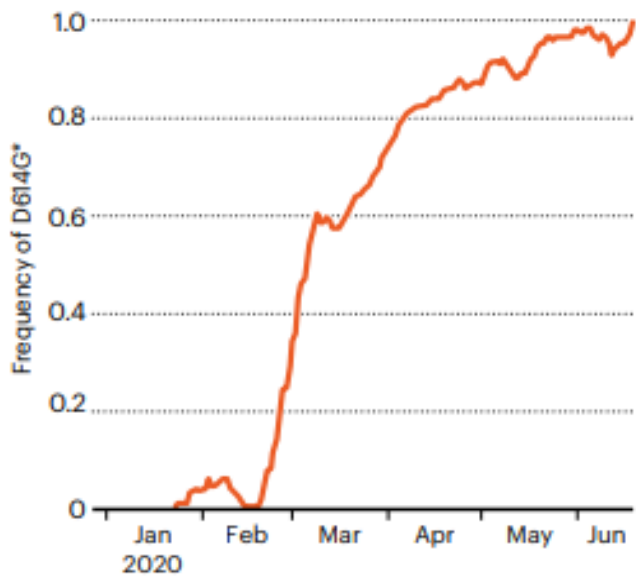
Natural and high-frequency amino acid mutations of the spike protein selected in this study. Twenty-four single amino acid mutations were located in three regions. Eight mutations (Y453F, L455F, F456L, A475V, A475S, T500S, N501Y, and Y505H) were in the RBD and hACE2 interaction region (**RBD/hACE2**); 10 mutations (V367I, V382L, R408G, N438K, L452Q, S477N, T478K, E484Q, S494P, and A520S) were in the RBD region but no interaction with hACE2 (**RBD/Non-hACE2**); 6 mutations (S98F, D614G, P681H, S982A, D1118H, and D1118Y) were not in the RBD region (**Non-RBD**).

Ding C, He J, Zhang X, Jiang C, Sun Y, Zhang Y, Chen Q, He H, Li W, Xie J, Liu Z, Gao Y. Crucial Mutations of Spike Protein on SARS-CoV-2 Evolved to Variant Strains Escaping Neutralization of Convalescent Plasmas and RBD-Specific Monoclonal Antibodies. *Front Immunol.* 2021 Aug 17;12:693775. doi: 10.3389/fimmu.2021.693775. PMID: 34484190; PMCID: PMC8416052.

MUTACIÓN D614G

GLOBAL SPREAD

By the end of June, the D614G mutation was found in almost all SARS-CoV-2 samples worldwide.



THE MUTATION THAT LOOSENS THE SPIKE PROTEIN

Spike proteins on SARS-CoV-2 bind to receptors on human cells, helping the virus to enter. A spike protein is made up of three smaller peptides in 'open' or 'closed' orientations; when more are open, it's easier for the protein to bind. The D614G mutation — the result of a single-letter change to the viral RNA code — seems to relax connections between peptides. This makes open conformations more likely and might increase the chance of infection.

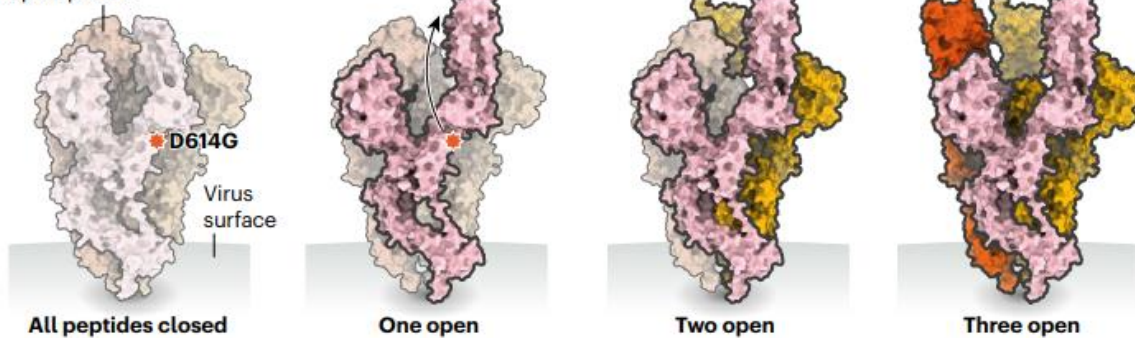
RNA base sequence ...CAGGAUGUUAAC...
Amino acid Gln Asp Val Asn
(Q) (D) (V) (N)

Mutation →

RNA base sequence ...CAGGUGUUAAC...
Amino acid Gln Gly Val Asn
(Q) (G) (V) (N)

Bases
A: adenine
C: cytosine
G: guanine
U: uracil

Spike protein



Likelihood of infection

Coexistencia de Nomenclaturas

Nextstrain	PANGO lineages	GISAID	Medios de comunicación y redes sociales	WHO
Clados (más macro)	Linajes (más micro y dinámico)	Clados	Supuesto origen geográfico	Nomenclatura reciente de VOC y VOI
19A, 19B 20A, 20B, ..., 20G, 20I 21A	B.1.1.7 P.1 C.37 B.1.499 N.5 B.1.617	S L V O G GV GH GR ...	“La de UK” “La de Manaos” “La andina” “La de Sudáfrica” “La de India”	Alpha Gamma Delta Lambda
Nextclade 	Pangolin 			Mu 

VARIANTES DE INTERÉS

- Presentan cambios genéticos que se predice o se sabe que afectan las características del virus, tales como transmisibilidad, gravedad de la enfermedad, escape inmunológico, escape diagnóstico o terapéutico; Y
- Han sido identificadas como causa de una transmisión comunitaria significativa o múltiples grupos de COVID-19, con una prevalencia relativa creciente junto con un número creciente de casos a lo largo del tiempo, u otros impactos epidemiológicos aparentes que sugieren un riesgo emergente para la salud pública mundial.

Currently designated Variants of Interest:

WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	Multiple countries, Dec-2020	17-Mar-2021
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	United States of America, Nov-2020	24-Mar-2021
Kappa	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	India, Oct-2020	4-Apr-2021
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	Peru, Dec-2020	14-Jun-2021
Mu	B.1.621	GH	21H	Colombia, Jan-2021	30-Aug-2021

VARIANTES DE PREOCUPACIÓN

- Aumento de la transmisibilidad o cambio perjudicial en la epidemiología de COVID-19; ○
- Aumento de la virulencia o cambio en la presentación clínica de la enfermedad; ○
- Disminución de la eficacia de las medidas sociales y de salud pública o de los diagnósticos, vacunas y terapias disponibles.

VARIANTES DE PREOCUPACIÓN

Currently designated Variants of Concern:

WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Additional amino acid changes monitored ^o	Earliest documented samples	Date of designation
Alpha	B.1.1.7 #	GRY	20I (V1)	+S:484K +S:452R	United Kingdom, Sep-2020	18-Dec-2020
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	+S:L18F	South Africa, May-2020	18-Dec-2020
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	+S:681H	Brazil, Nov-2020	11-Jan-2021
Delta	B.1.617.2 [§]	G/478K.V1	21A	+S:417N	India, Oct-2020	VOI: 4-Apr-2021 VOC: 11-May-2021

ESTUDIOS DE VARIANTES DE PREOCUPACIÓN

- 1- Sospecha de brotes epidemiológicos: seleccionar 10% de las muestras positivas
- 2- Fallos vacunales de pacientes con una o dos dosis de vacuna pasados los 14 días de la primera o segunda dosis, en casos moderados, severos o críticos: 100% de las muestras.
- 3- Viajeros positivos provenientes del exterior: 100% de las muestras.
- 4- Embarazadas positivas con cuadros clínicos moderados, graves o críticos: 100% de las muestras.
- 5- Vigilancia regular de variantes en la comunidad: 5% de las muestras positivas.
- 6- Sospecha de reinfecciones: 100% de las muestras positivas.
- 7- Vigilancia escolar en casos positivos por PCR: 100% de las muestras positivas.

VARIANTS BEING MONITORING (VBM)



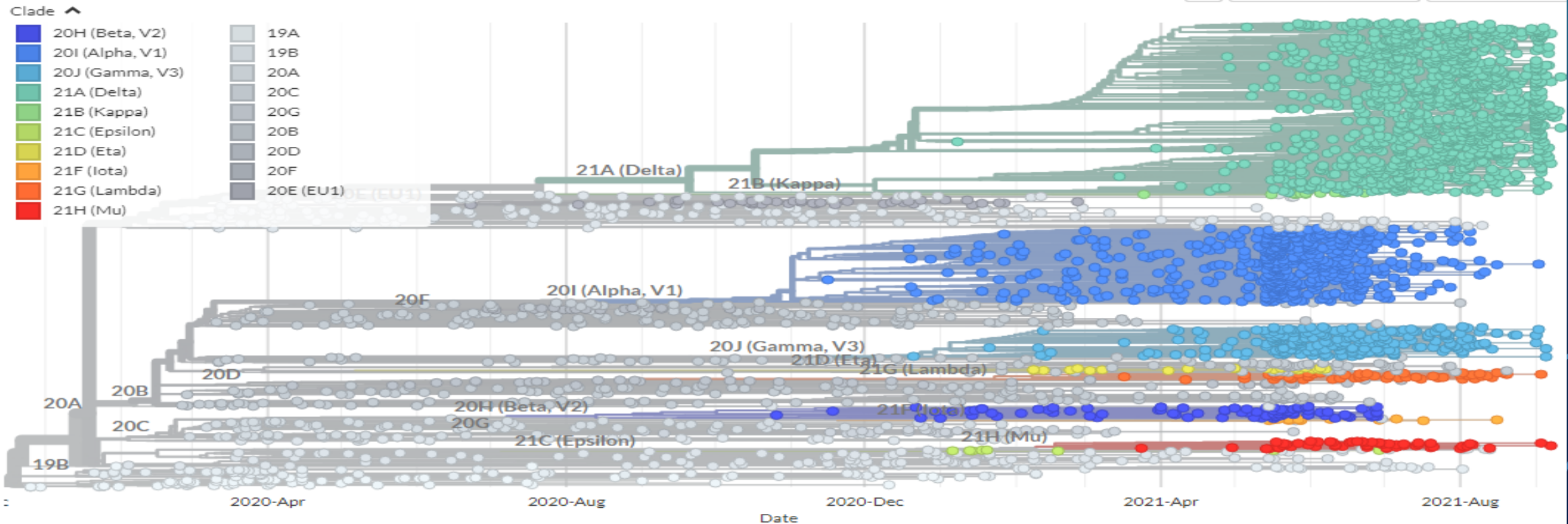
Etiqueta de la OMS	Linaje Pango	Fecha de designación		
		VOC	VOI	VBM
Alfa	B.1.1.7 , Q.1 -Q.8	VOC : 29 de diciembre de 2020		VBM : 21 de septiembre de 2021
Beta	B.1.351 , B.1.351.2, B.1.351.3	VOC : 29 de diciembre de 2020		VBM : 21 de septiembre de 2021
Gama	P.1 , P.1.1, P.1.2	VOC : 29 de diciembre de 2020		VBM : 21 de septiembre de 2021
Épsilon	B.1.427 B.1.429	VOC : 19 de marzo de 2021	VOI : 26 de febrero de 2021 VOI : 29 de junio de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
Eta	B.1.525		VOI : 26 de febrero de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
Iota	B.1.526		VOI : 26 de febrero de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
Kappa	B.1.617.1		VOI : 7 de mayo de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
N / A	B.1.617.3		VOI : 7 de mayo de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
Zeta	P.2		VOI : 26 de febrero de 2021	VBM : 21 de septiembre de 2021
Mu	B.1.621 , B.1.621.1			VBM : 21 de septiembre de 2021

GISAID (INICIATIVA GLOBAL PARA COMPARTIR TODOS LOS DATOS DE INFLUENZA) – NIVEL GLOBAL

Built with nextstrain/ncov. Maintained by the Nextstrain team. Enabled by data from **GISAID**.

Showing 3520 of 3520 genomes sampled between Dec 2019 and Sep 2021.

Phylogeny



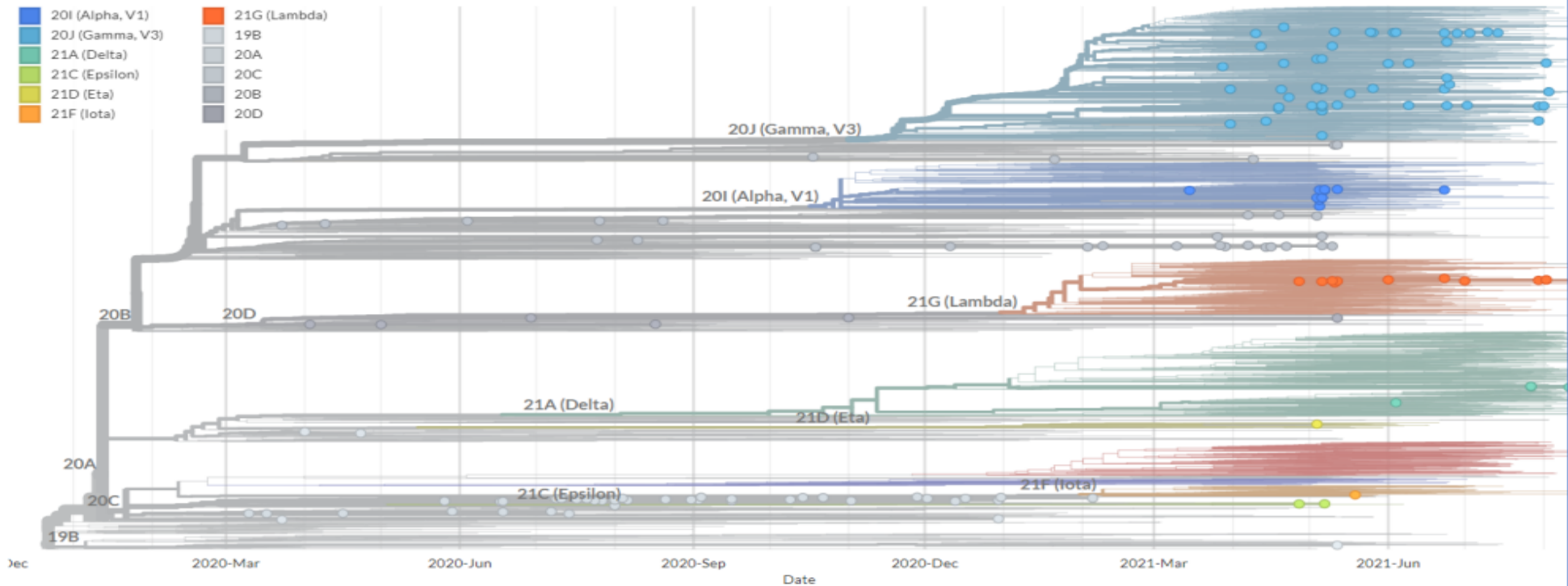
Nextstrain - Argentina

Showing 170 of 3591 genomes sampled between Mar 2020 and Aug 2021. Filtered to [Argentina \(170\)](#)

Phylogeny

Clade ^

- | | |
|-----------------|--------------|
| 20I (Alpha, V1) | 21G (Lambda) |
| 20J (Gamma, V3) | 19B |
| 21A (Delta) | 20A |
| 21C (Epsilon) | 20C |
| 21D (Eta) | 20B |
| 21F (Iota) | 20D |

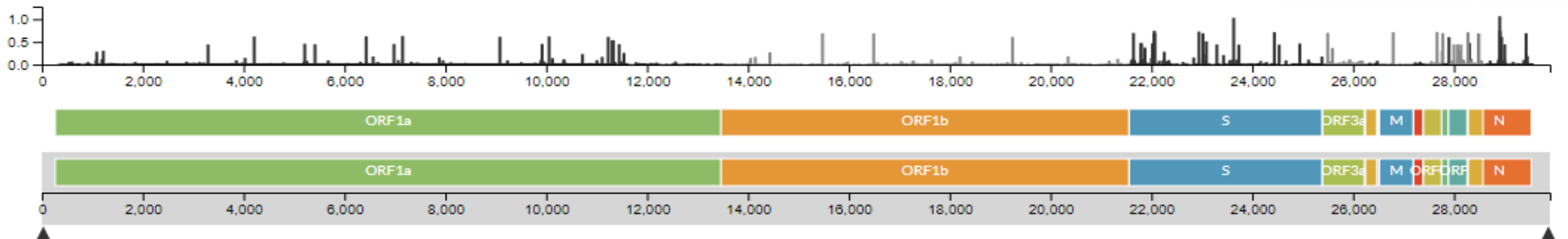


ZOOM TO SELECTED RESE

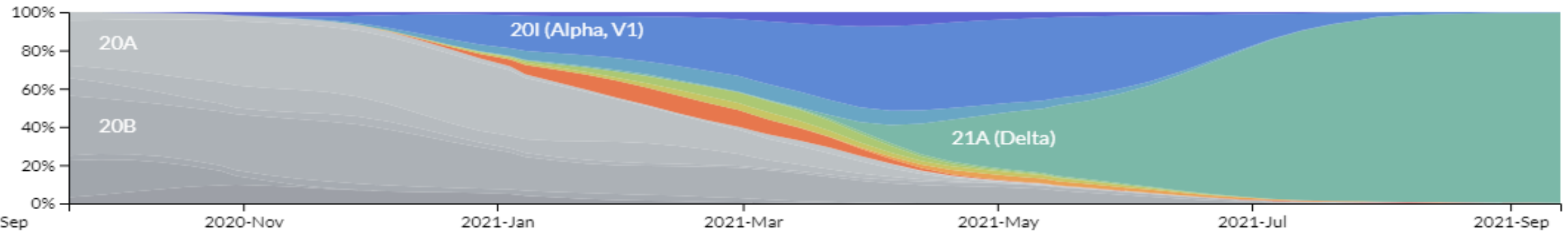
REAL-TIME TRACKING OF PATHOGEN EVOLUTION



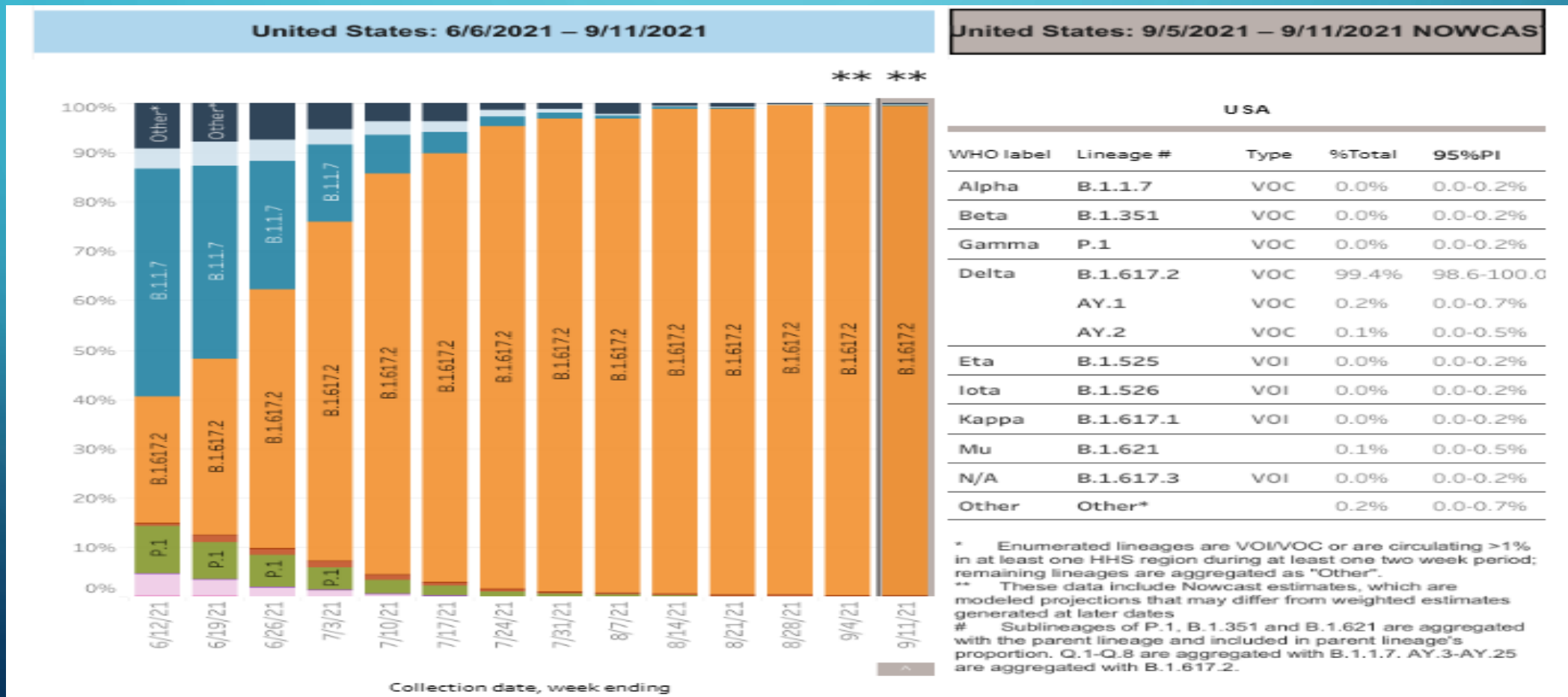
Diversity



Frequencies (colored by Clade)

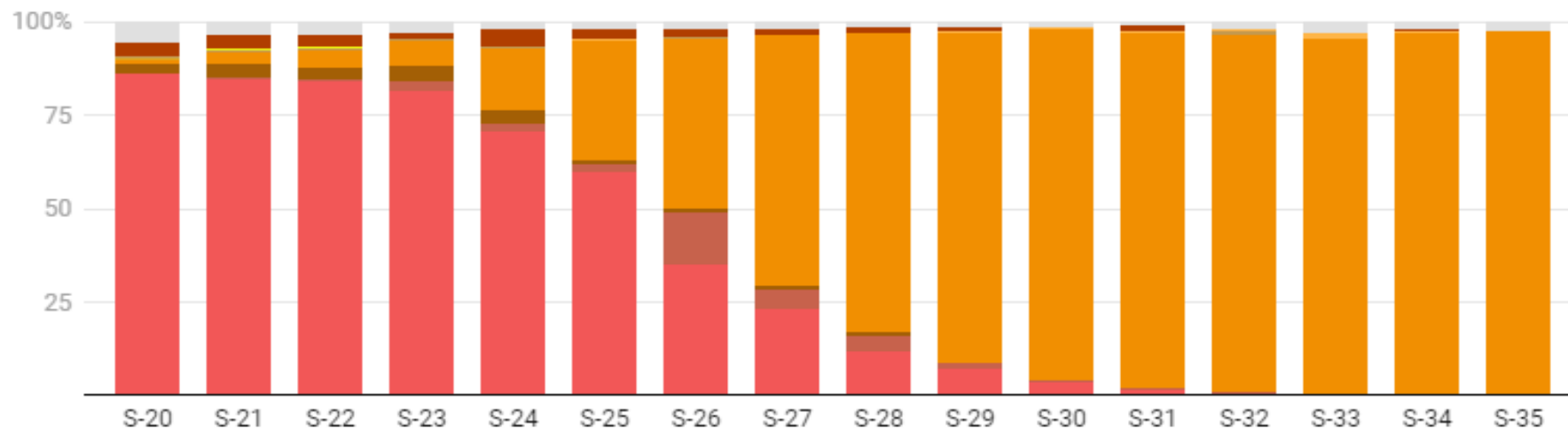


DISTRIBUCIÓN DE VOC EN USA 06/06 AL 11/09



DISTRIBUCIÓN DE VOC RN ESPAÑA AL 17/09

Distribución de las variantes en España cada semana



Datos preliminares hasta el 17 de septiembre de 2021, a partir de la secuenciación de muestras aleatorias y sujetos a modificaciones por retrasos de notificación. Falta información de seis territorios.

DatosRTVE • Fuente: SiViEs / Ministerio de Sanidad • [Insertar](#)

rtve

LABORATORIO DE LA GENÓMICA DE SARS-COV-2: ANÁLISIS DE ASPECTOS GENÉTICOS Y EVOLUTIVOS

- Procesos de identificación específica de variantes por Real Time RT-PCR
- Procesos de secuenciación parcial/masiva o completa de SARS-CoV-2

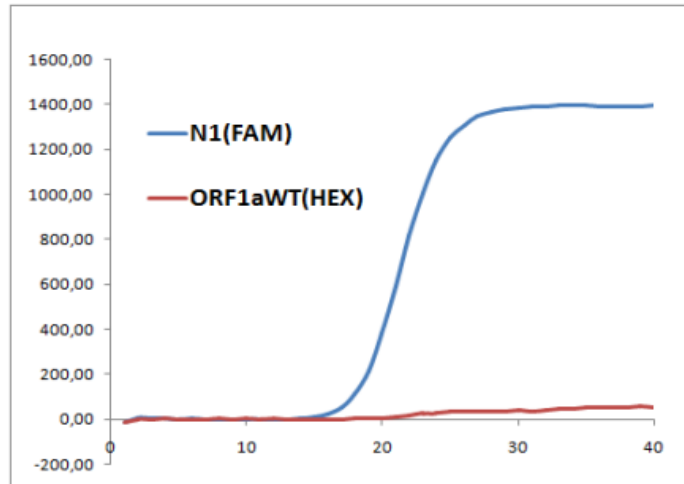
PROCESOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE VARIANTES POR REAL TIME RT-PCR

PCR in house para identificación de Delta

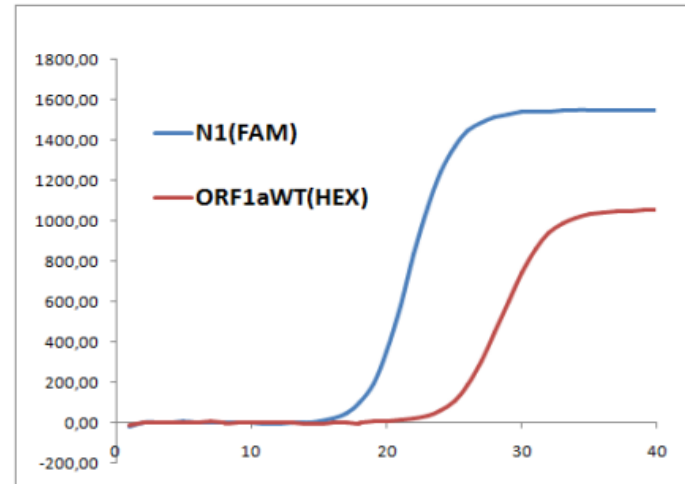
- RT-qPCR de GENES ESPECÍFICOS DE ORF 1a/b y gen N1
- Específica de GEN S (PCR asimétrica con análisis de curvas de melting)

Ensayo duplex N1/ORF1ab en *pools* de 5 muestras

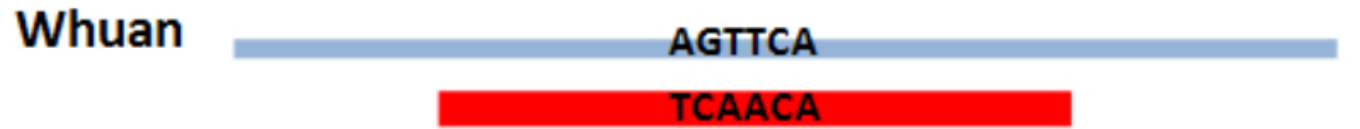
5 muestras negativas



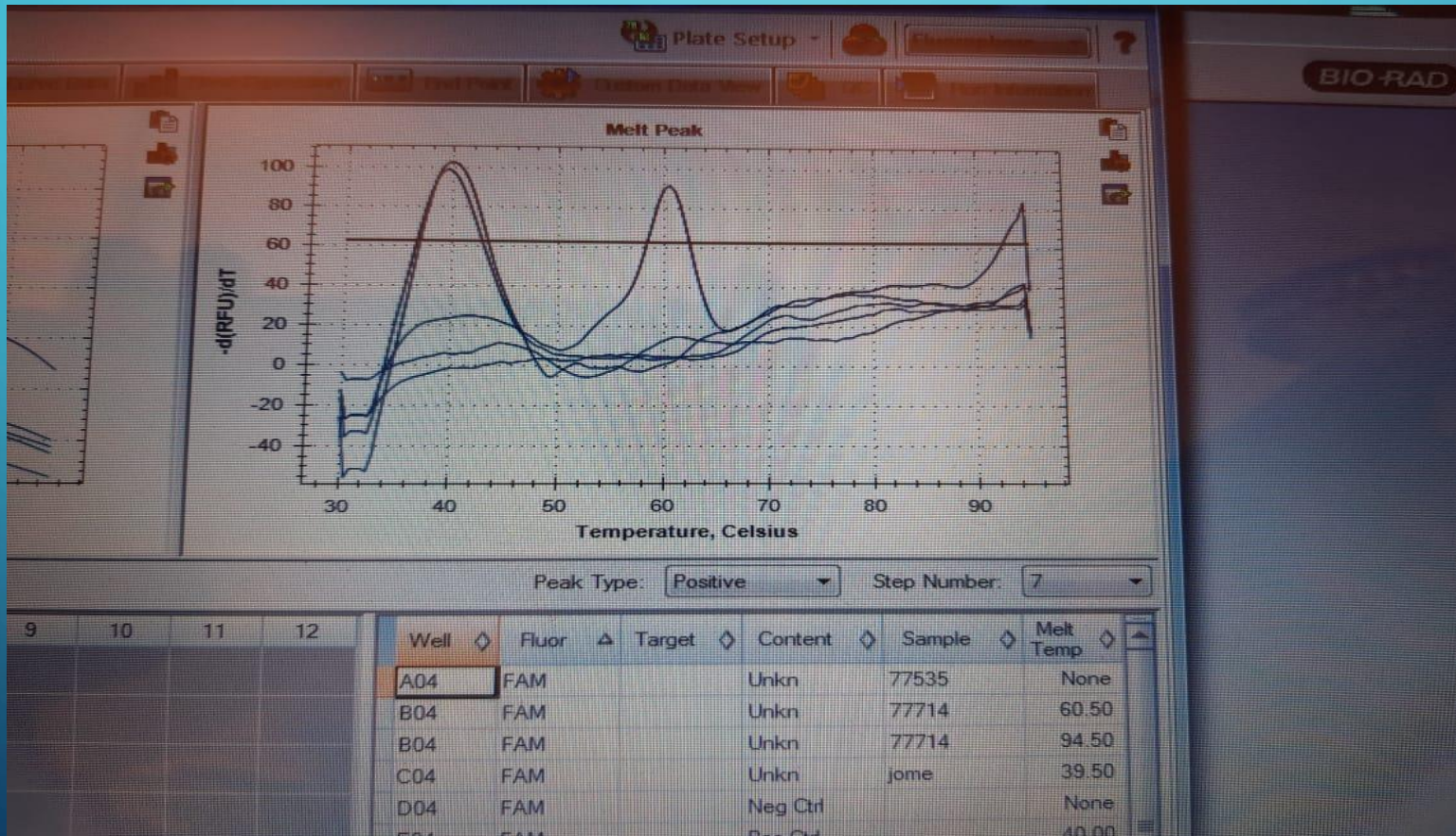
4 muestras negativas + 1 **positiva**



Estrategia PCR asimétrica y *melting* sonda



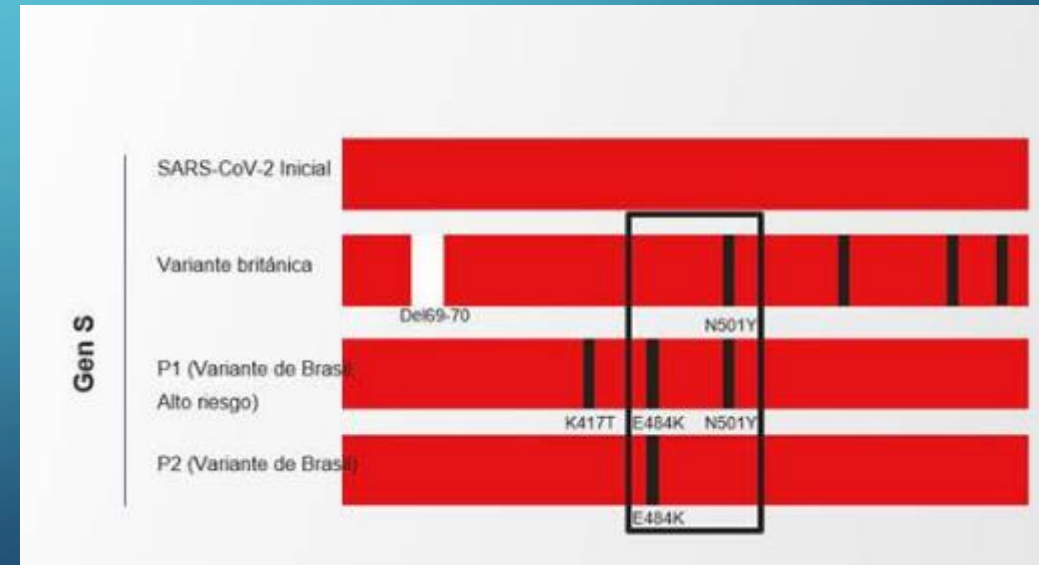
PROCESOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE VARIANTES POR RT-QPCR



PROCESOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE VARIANTES POR REAL TIME RT-PCR

- Identificación de variantes VOC mediante kits comerciales

Variante	Mutaciones seleccionadas
Británica (B.1.1.7)	N501Y; del69-70
Brasileña P1	N501Y; E484K; K417T
Brasileña P2	E484K



SARS-CoV-2

DIANAS

	Diana	Canal
SARS-CoV-2 (genérico)	gen N	Texas Red/ROX
SARS-CoV-2 (variante)	gen S – N501	FAM
SARS-CoV-2 (variante)	gen S – H69/V70	HEX/VIC
Control Interno (CI)	gen humano <i>ARNasa P</i>	Cy5

CONTENIDO

Master mix único, Solución de reconstitución, Control positivo y negativo. El mix incluye cebadores/sondas de control interno para la validación de muestras humanas que permite detectar una toma de muestra incorrecta o su posible degradación.

Formatos del Kit:

Ref. RTPCR010 contiene 6 viales de vidrio con master mix liofilizado. No incluye tubos de reacción.

Ref. RTPCR010-LP contiene tapones y 12x8 tiras de PCR con el mix predispensado.

APLICACIONES

Escobillón orofaríngeo/nasofaríngeo y saliva. Alternativamente se puede usar aspirado traqueal y lavado broncoalveolar (BAL).

COMPATIBILIDAD

Sistemas de extracción:

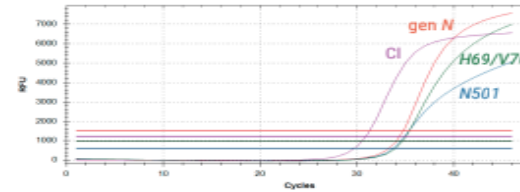
Qiagen (Viral RNA Mini Kit & MinElute Virus Spin Kit), bioMérieux (NucliSENS® easyMag™), Roche (MagNA Pure System), TANBead (Maelstorm 9600), ThermoFisher (KingFisher Flex) y Bruker (GenoXtract 12) entre otros.

Termocicladores Realtime PCR:

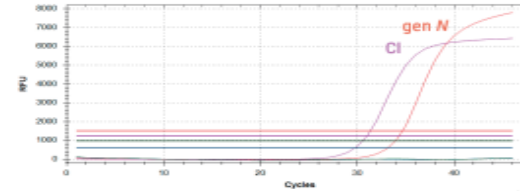
Bio Rad (CFX96), Roche (LightCycler® 96, 480 y COBAS® z480), Agilent (Aria Mx), Applied Biosystems (7500 Fast) y QuantStudio 5, entre otros.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

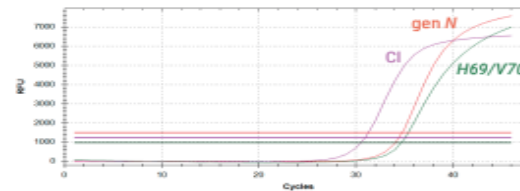
SARS-CoV-2 CEPA SENSIBLE



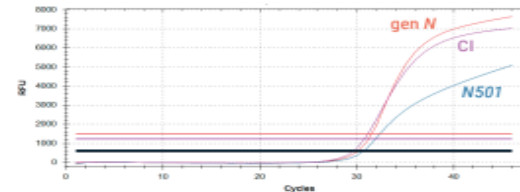
VARIANTE B.1.1.7 (REINO UNIDO)



VARIANTES B.1.351 (SUDÁFRICA)/ B.1.1.28.1 (P.1) (BRASIL)



VARIANTE B.1.525 (NIGERIA)



The image shows the front of a product box for the VIASURE Real Time PCR Detection Kit. The box is split into two vertical panels. The left panel has a dark purple background with a glowing, textured vertical line. The right panel has a light grey background with a faint, glowing DNA double helix. The text is white and purple. The CE IVD logo is in the bottom right corner.

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit

SARS-CoV-2 & UK Variant
(S UK, ORF1ab and N genes)

CE IVD

PROCESOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA O COMPLETA DE SARS-COV-2

- Paso 1- Generación de una Retro-transcripción (RT) del RNA viral c/enz de alto rendimiento.
- Paso 2- Secuenciación de las cepas de SARS-Cov-2 por NSG

A partir del ADN complementario, cada muestra se somete a dos reacciones de amplificación por separado con 48 pares de cebadores cada una, se generarán fragmentos de 400 bp (+/- 40 bp) abarcando la totalidad del genoma viral.



MUCHAS GRACIAS !!