

Análisis de la variabilidad de SARS-CoV-2 mediante técnicas de secuenciación ultra profunda y correlación de parámetros virológicos con la severidad de la COVID-19

Departamento de Microbiología

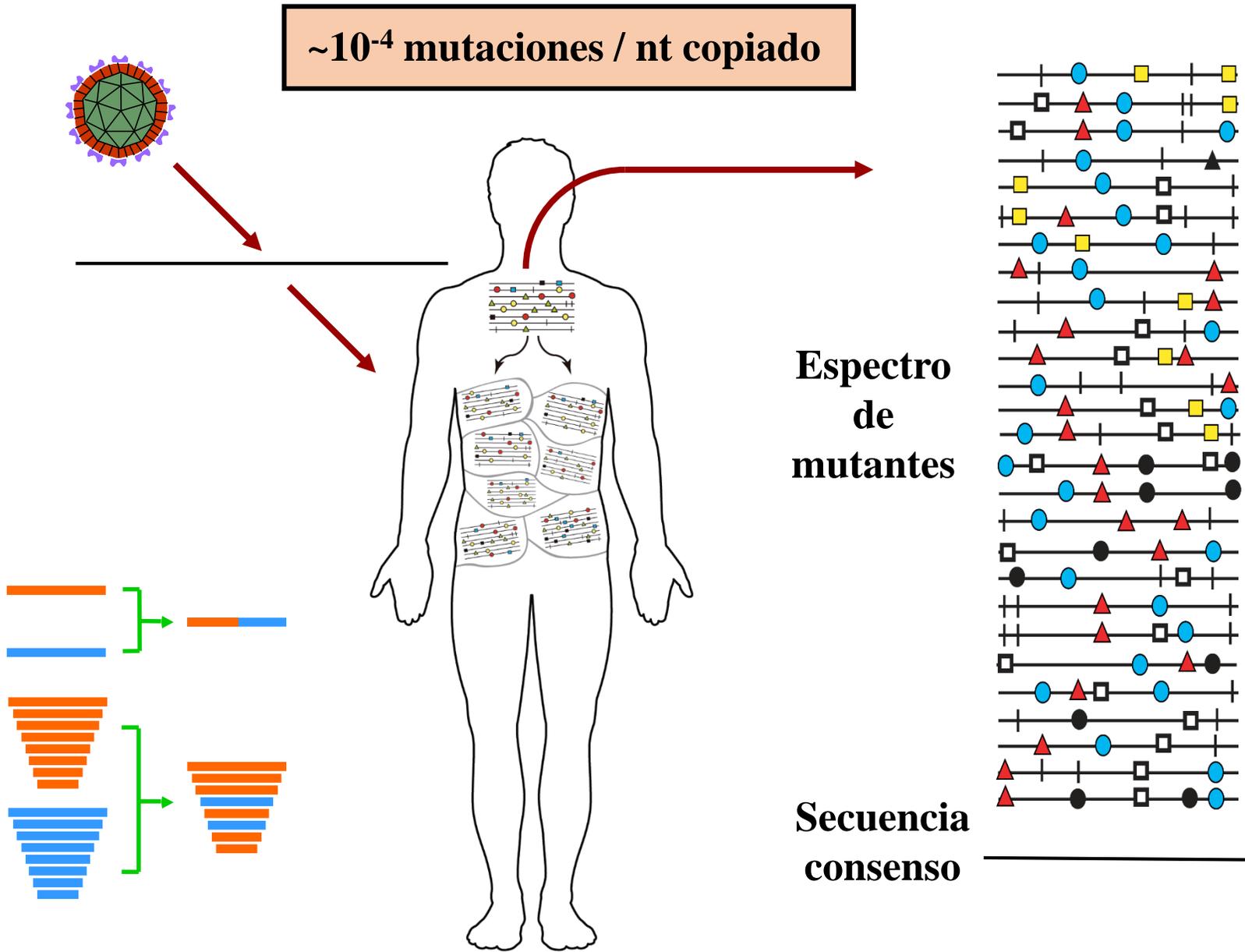
Celia Perales Viejo
celia.perales@quironsalud.es



INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

***III Reunión Anual Área Enfermedades Infecciosas,
Inflamatorias y Crónicas del IIS-FJD***

08. Abril.2021



$\sim 10^{-4}$ mutaciones / nt copiado

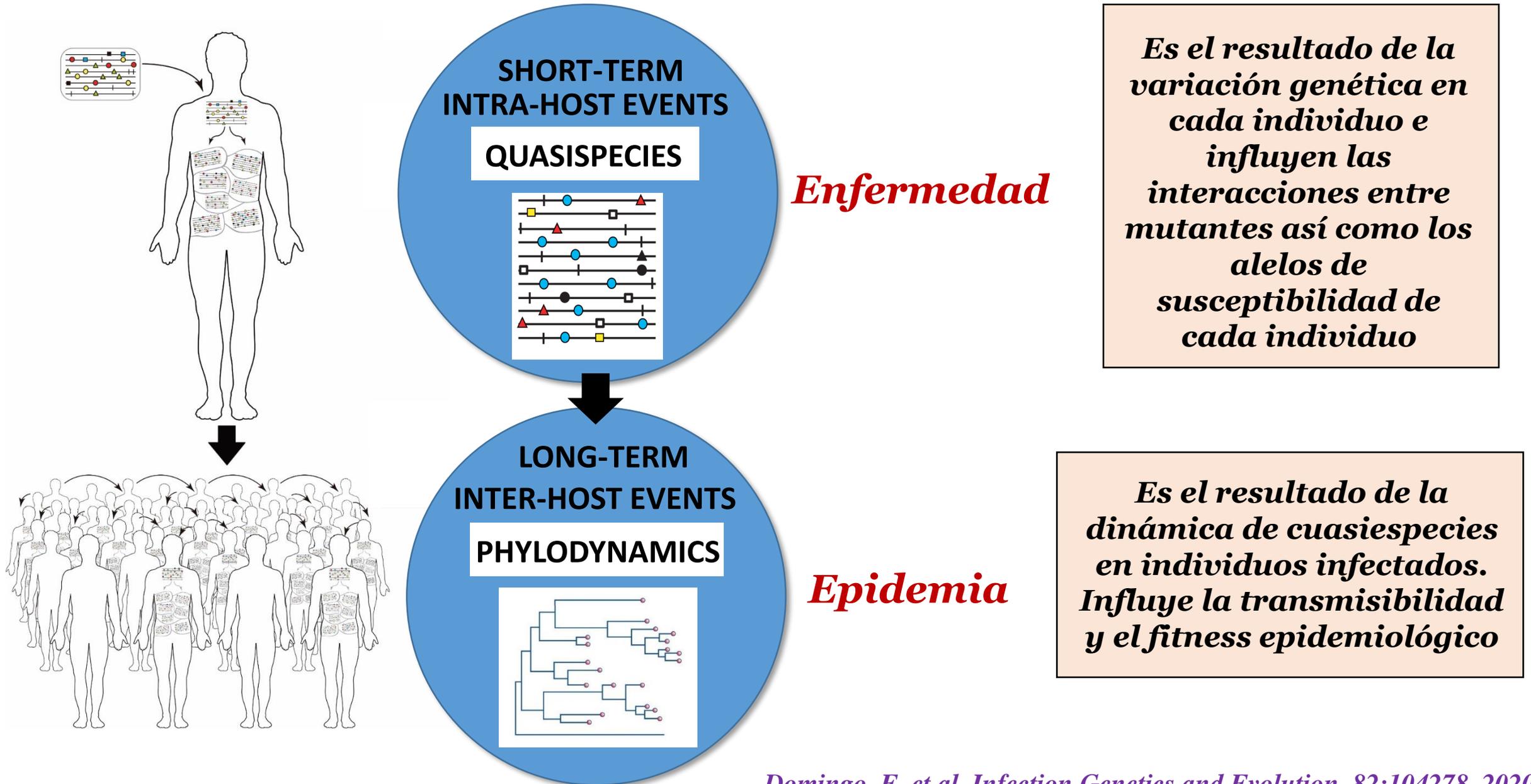
Espectro de mutantes

Secuencia consenso

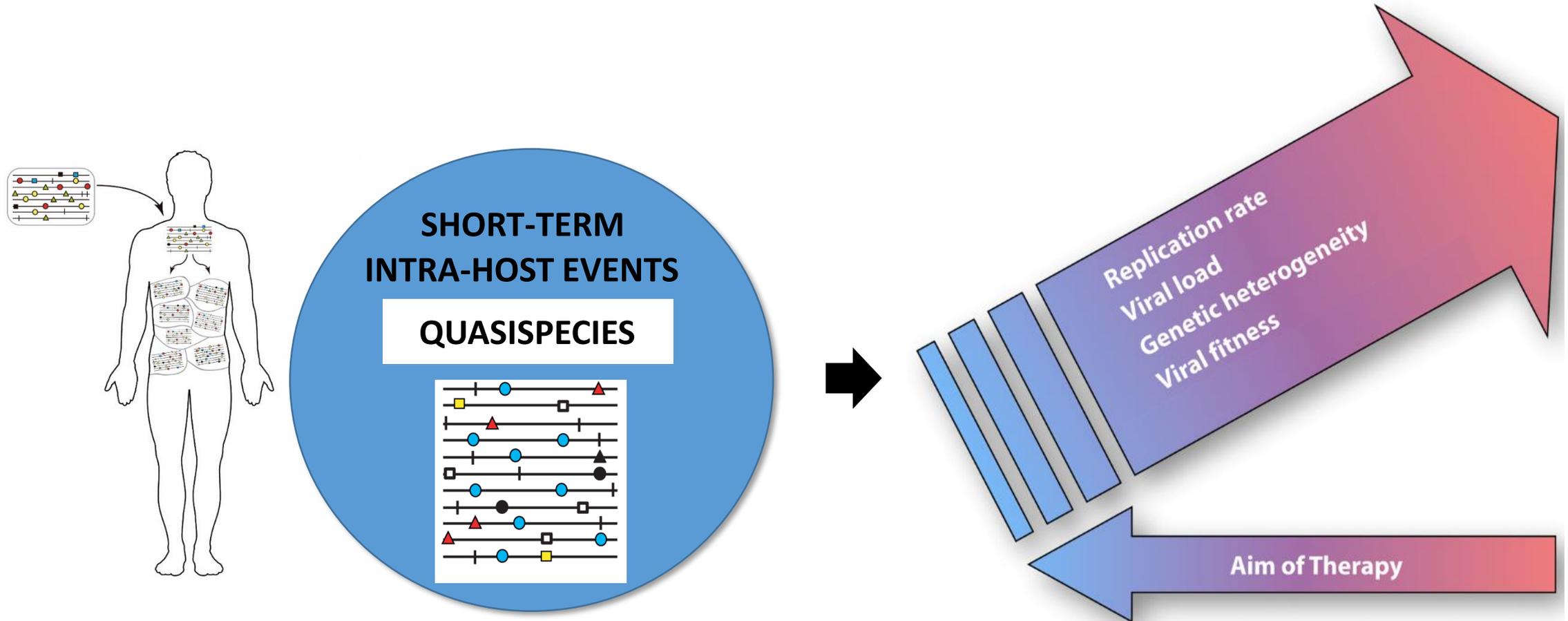
Domingo et al. Cell 13:735-44, 1978

Domingo and Perales PLoS Genetics 15:e1008271, 2019

Dos fases en la evolución viral



Parámetros interconectados en poblaciones virales



STOP-Coronavirus: factores clínicos, inmunológicos, genómicos, virológicos y bioéticos de COVID-19

WP7 Genómica viral

Contamos con muestras de SARS-CoV-2 pertenecientes a las distintas olas de COVID-19 en España:

- **Muestras 1^a ola** → 2425 (3/4/2020 – 30/4/2020)
- **Muestras 2^a ola** → 2810 (19/10/2020 – 24/11/2020)
- **Muestras 3^a ola** → > 1380 (22/1/2021 – actualidad)

Muestras de SARS-CoV-2 disponibles en la FJD

Parámetros a determinar en muestras de SARS-CoV-2 y su relación con la severidad de la infección

- 1) Carga viral (valor de Ct diagnóstico)***
- 2) Genómica viral (secuenciación masiva)***
- 3) Fitness vírico (cultivo celular)***

Cohorte de pacientes infectados con SARS-CoV-2 en estudio: 1ª ola



Departamento de
Microbiología Clínica



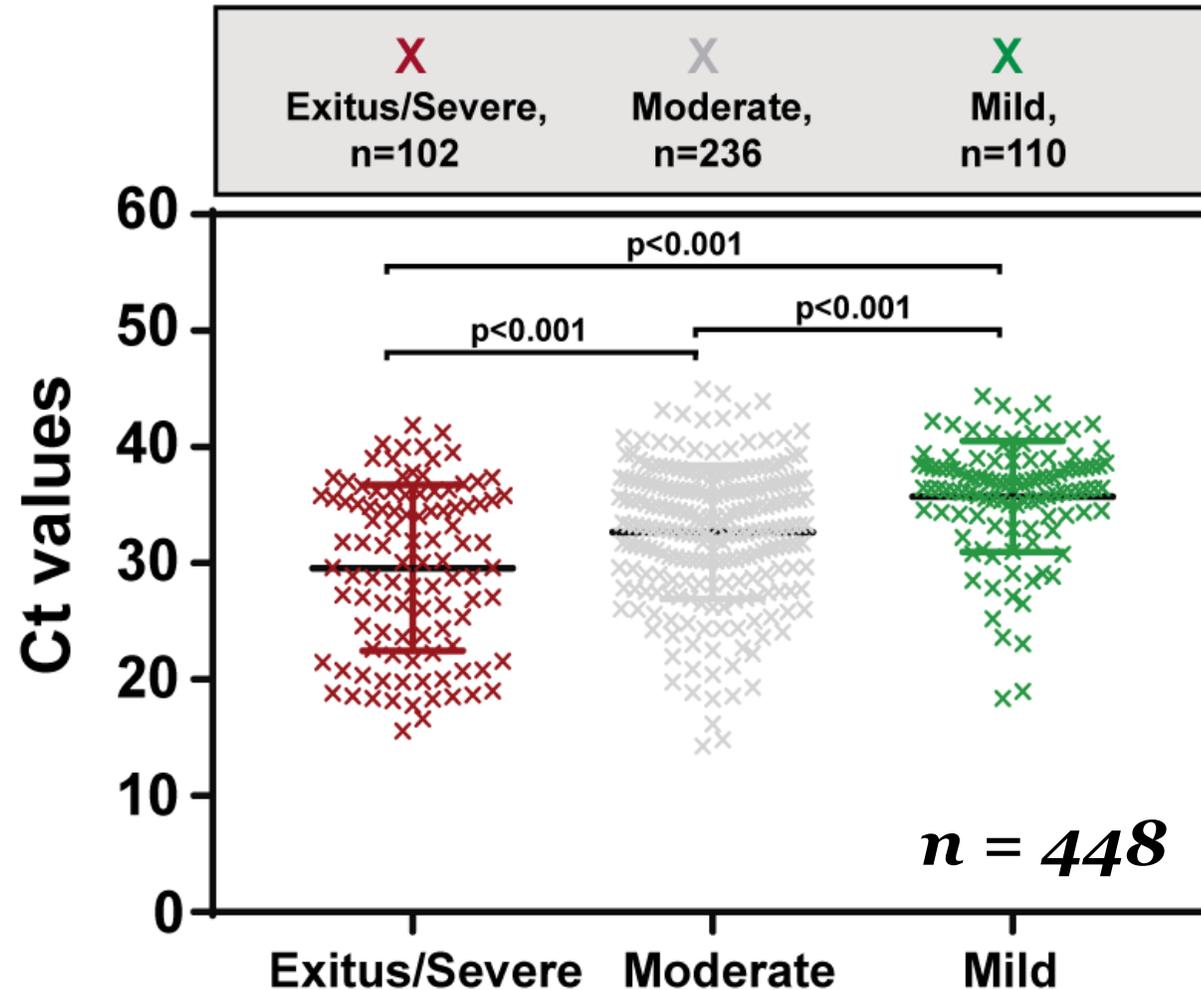
Hemos clasificado y organizado una COVID-teca de 2424 hisopos nasofaríngeos procedentes de pacientes de la FJD, HUIE, HGV, HURJC recogidos entre el 3 y 29 de Abril 2020 correspondiente al primer brote de la pandemia en España

Clasificación clínica distinguiendo varios niveles de severidad:

- **Leves:** no ingresados, hospitalizados por causa no COVID
- **Moderados:** ingresados no UCI/UCIR con oxigenoterapia convencional
- **Graves/Éxitus:** UCI/UCIR, pacientes no en UCI/UCIR con Ventilación Mecánica u O₂ de alto flujo (>15 l/min)/Pacientes cuyo éxitus se debe a COVID-19

En colaboración con el Departamento de Genética (Dra. Carmen Ayuso), el Dr. Francisco Javier Ruíz Hornillos (Hospital Universitario Infanta Elena) y el Departamento de Big Data del grupo Quirón

Correlación entre el **valor de Ct diagnóstico** y la **severidad de la enfermedad clínica (COVID-19)**



< valor de Ct = > carga viral

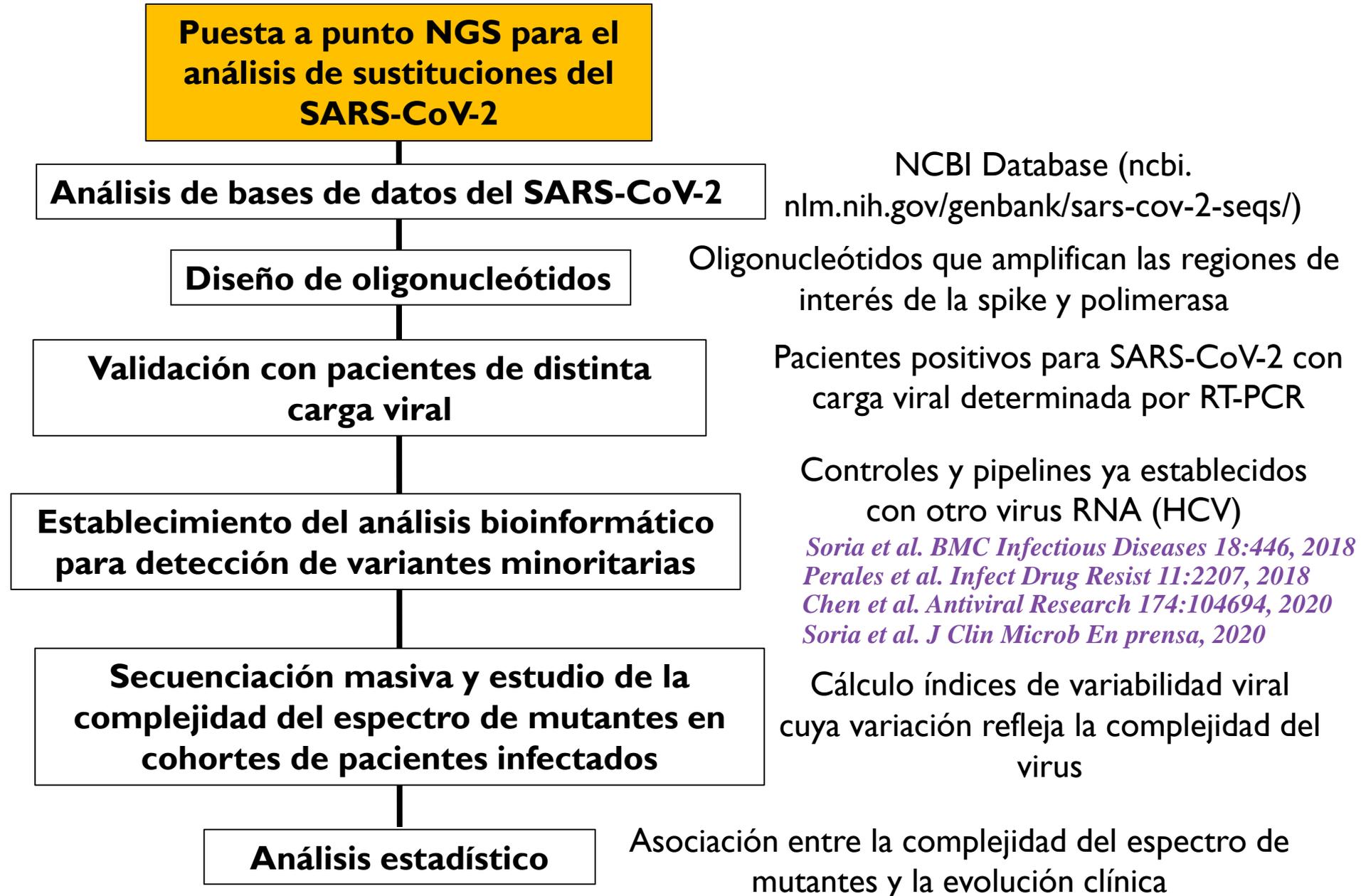
Se ha observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre el valor de Ct diagnóstico y la severidad de la infección

Correlación entre el valor de Ct diagnóstico y la severidad de la enfermedad clínica (COVID-19)

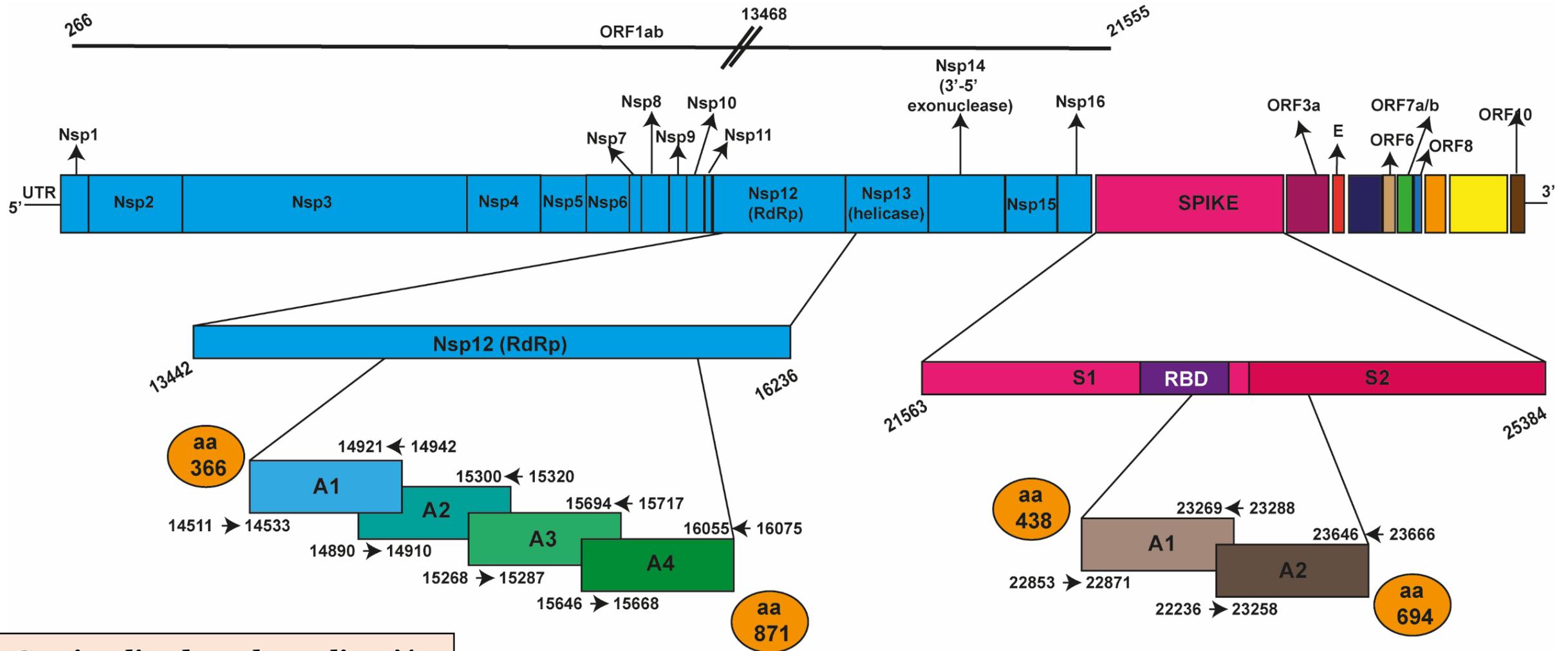
Characteristics	Total (n=448)	Disease Severity			p-value ^a	Significance ^a
		Exitus/Severe (n=102)	Moderate (n=236)	Mild (n=110)		
Age mean ± standard deviation, years	71.04 ± 18.29	79.92 ± 15.33	73.25 ± 16.59	58.05 ± 17.50	1.49 x 10 ⁻¹²	***
Age > 60 years (%)	321 (71.6%)	91 (89.2%)	185 (78.4%)	45 (41.0%)	1.11 x 10 ⁻⁸	***
Male (%)	205 (45.7%)	49 (48.0%)	122 (51.7%)	34 (31.0%)	1.40 x 10 ⁻¹²	***
Female (%)	243 (54.2%)	53 (52.0%)	114 (48.3%)	76 (69.1%)		
Hypertension (%)	236 (52.7%)	69 (67.6%)	134 (56.8%)	33 (30.0%)	1.14 x 10 ⁻¹²	***
Cardiac disease (%)	142 (31.7%)	42 (41.2%)	73 (30.9%)	27 (24.5%)	1.35 x 10 ⁻¹²	***
Diabetes (%)	8 (1.8%)	2 (2.0%)	5 (2.1%)	1 (0.9%)	1.08 x 10 ⁻¹²	***
Obesity (%)	17 (3.8%)	5 (4.9%)	8 (3.4%)	4 (3.6%)	1.37 x 10 ⁻¹²	***
Asthma (%)	29 (6.5%)	8 (7.8%)	16 (6.8%)	5 (4.5%)	1.42 x 10 ⁻¹²	***
COPD (%)	15 (3.3%)	4 (3.9%)	8 (3.4%)	3 (2.7%)	1.34 x 10 ⁻¹²	***
Hospitalization (%) ^b	365 (81.5%)	102 (100%)	236 (100%)	27 (24.5%)	1.21 x 10 ⁻¹²	***
ICU admission (%) ^c	36 (8.0%)	33 (32.3%)	2 (0.8%)	1 (0.9%)	1.16 x 10 ⁻¹²	***
Conventional oxygen therapy (%)	288 (64.3%)	102 (100%)	183 (77.5%)	3 (2.7%)	1.10 x 10 ⁻¹²	***
Invasive mechanical ventilation (%)	19 (4.2%)	19 (18.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1.25 x 10 ⁻¹²	***
Noninvasive mechanical ventilation (%) ^d	21 (4.7%)	20 (19.6%)	1 (0.4%)	0 (0%)	1.27 x 10 ⁻¹²	***
High Flow Nasal Cannulas (%)	19 (4.2%)	19 (18.6%)	0 (0%)	0 (0%)	1.43 x 10 ⁻¹²	***
Survival 90 days after diagnosis (%) ^e	366 (81.7%)	27 (26.5%)	233 (98.7%)	106 (96.4%)	8.44 x 10 ⁻¹³	***
Days since symptoms onset ^f	7.84 ± 6.40	7.57 ± 6.62	8.26 ± 6.53	3.25 ± 0.50	2.81 x 10 ⁻¹²	***

Datos demográficos y comorbilidades preexistentes en la cohorte según la severidad de la infección

El valor de Ct diagnóstico está relacionado con la severidad de la infección independientemente de factores de riesgo previamente descritos como son la edad, sexo, hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, obesidad, ó enfermedad pulmonar.



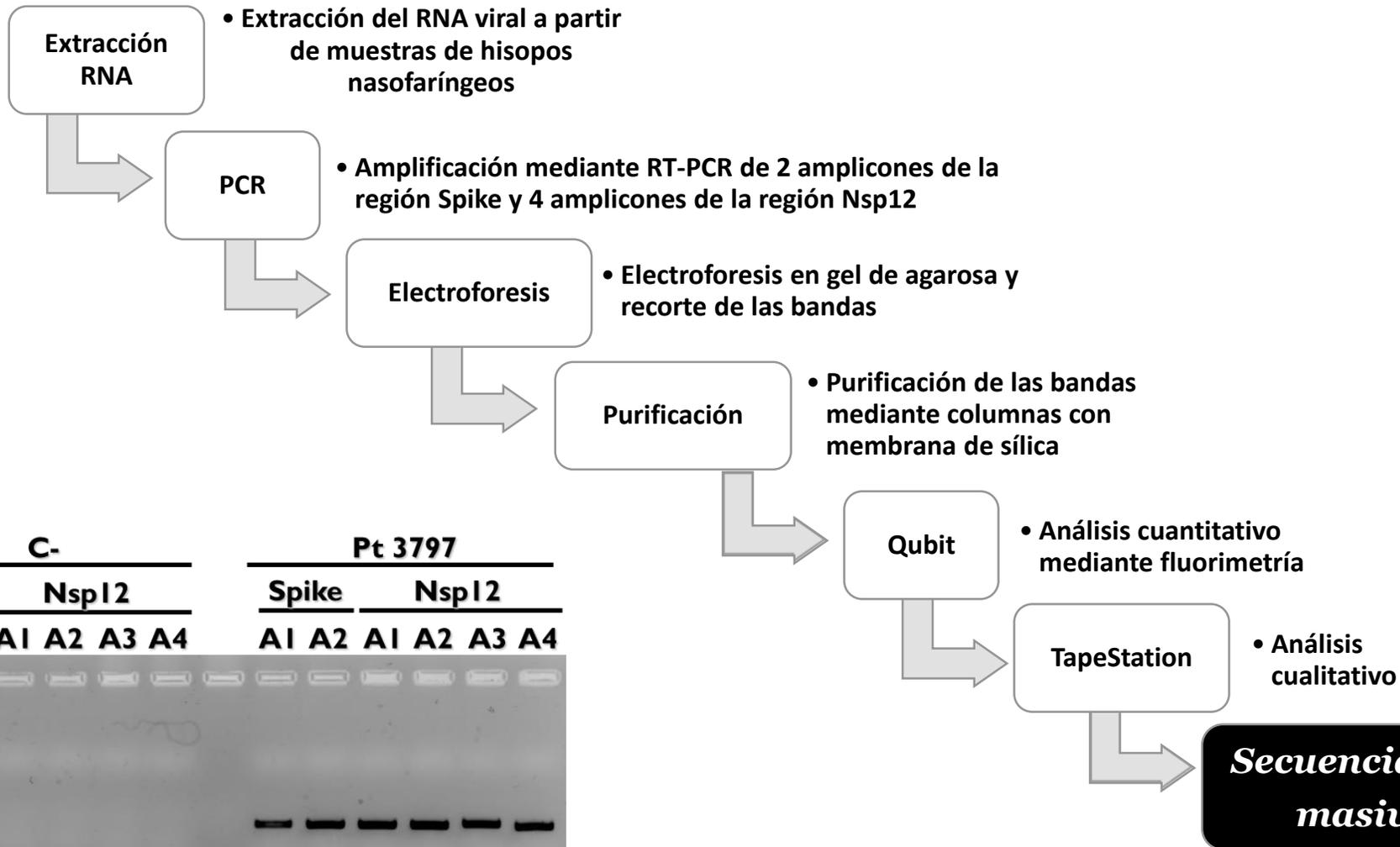
Regiones del genoma a estudiar (polimerasa y spike)

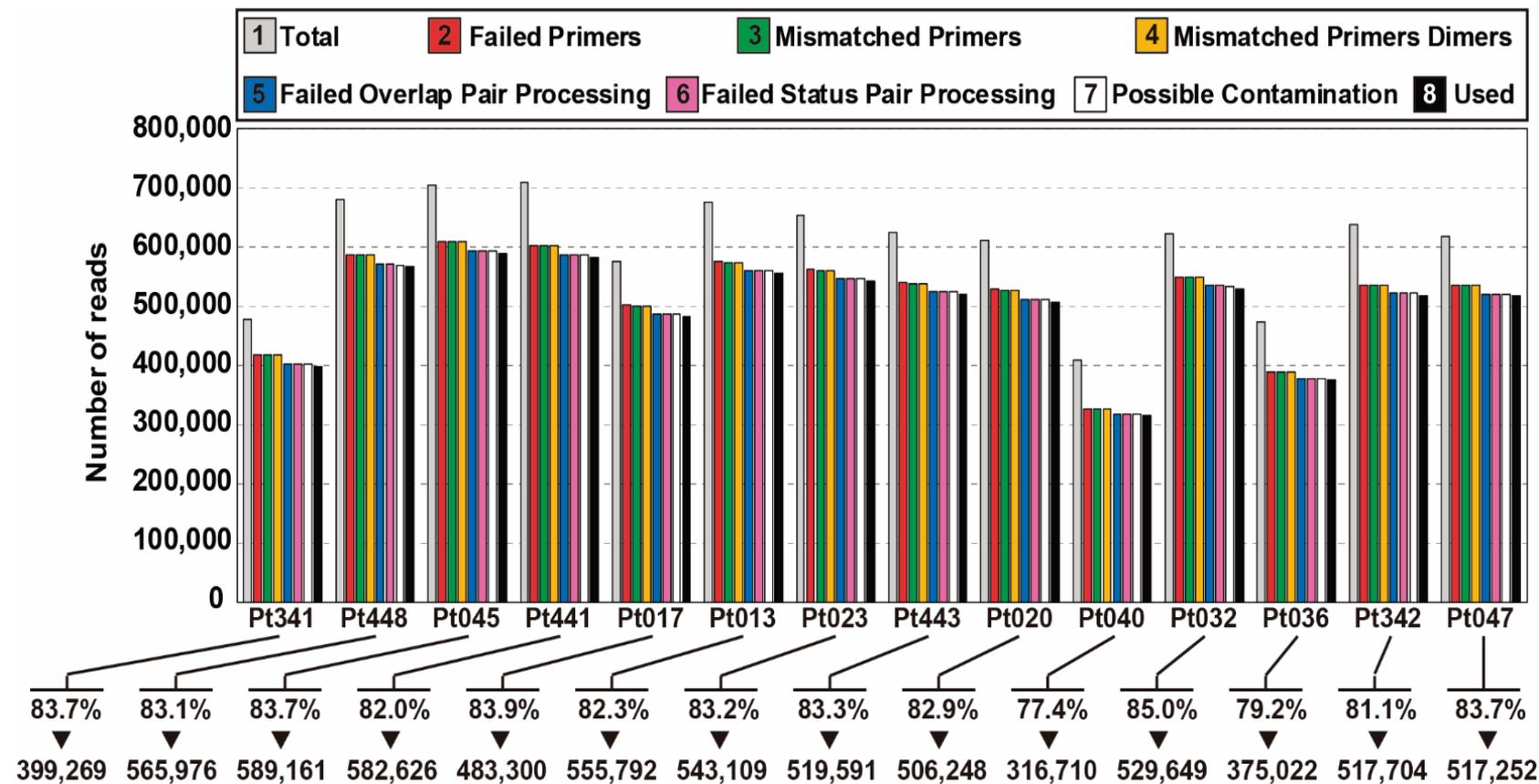


Gen implicado en la replicación viral y diana de antivirales de amplio espectro

Gen implicado en el tropismo celular

Etapas para la secuenciación masiva basada en amplicones de SARS-CoV-2 a partir de muestras de hisopos nasofaríngeos





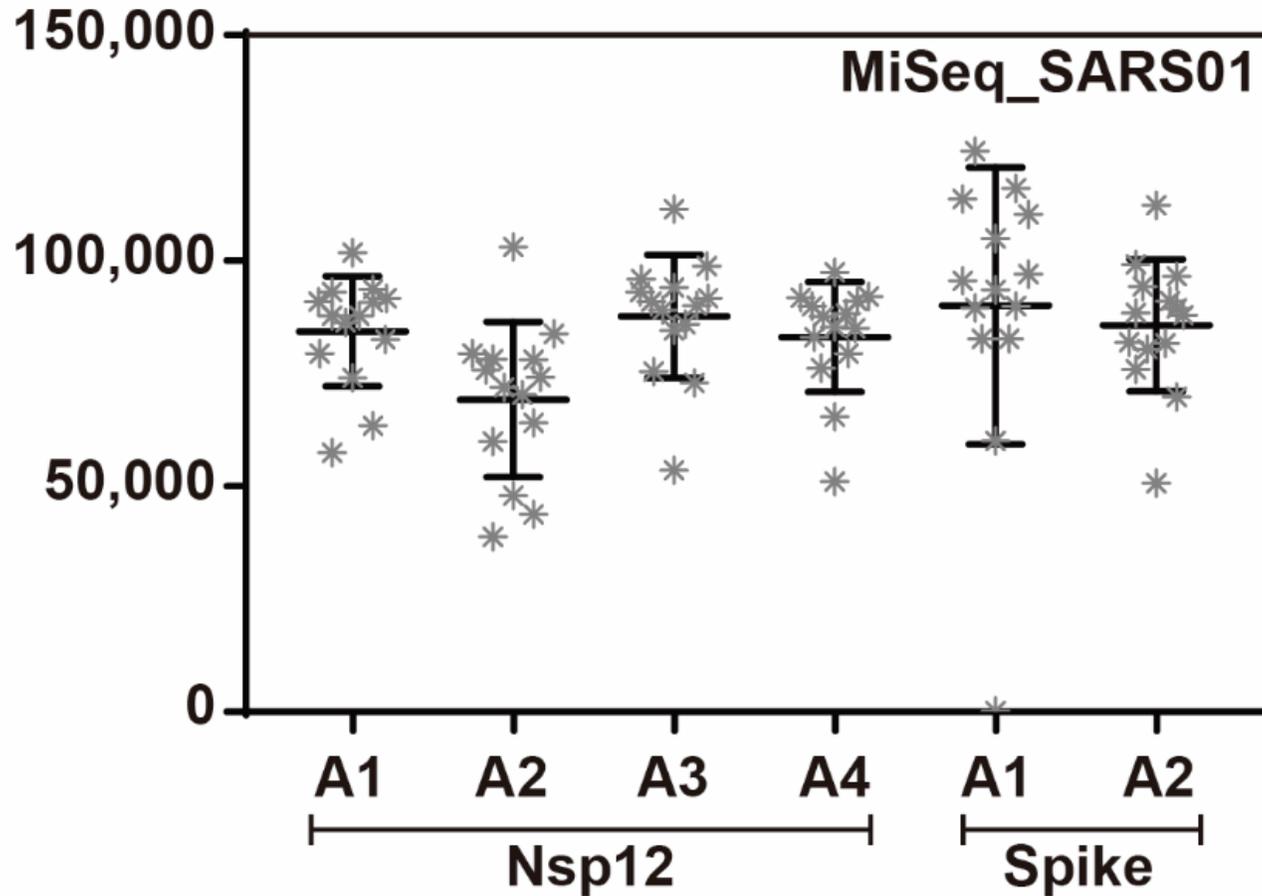
Análisis de la primera placa de secuenciación masiva (SeekDeep)

% de recuperación medio/paciente = 83.5%

Número reads medio/paciente = 500,100.6 reads

En colaboración con el Dr. Pablo Mínguez y Lorena de la Fuente (Departamento de Bioinformática de la FJD)

Número de secuencias obtenido en cada amplicón



**% de recuperación
medio/amplicón = 96.4%**

**Número reads medio/amplicón
= 84,352.8 reads**

**Rendimiento similar en todos
los amplicones**

**Todos los amplicones > 10,000
reads**

*En colaboración con el Dr.
Pablo Mínguez y Lorena de la
Fuente (Departamento de
Bioinformática de la FJD)*

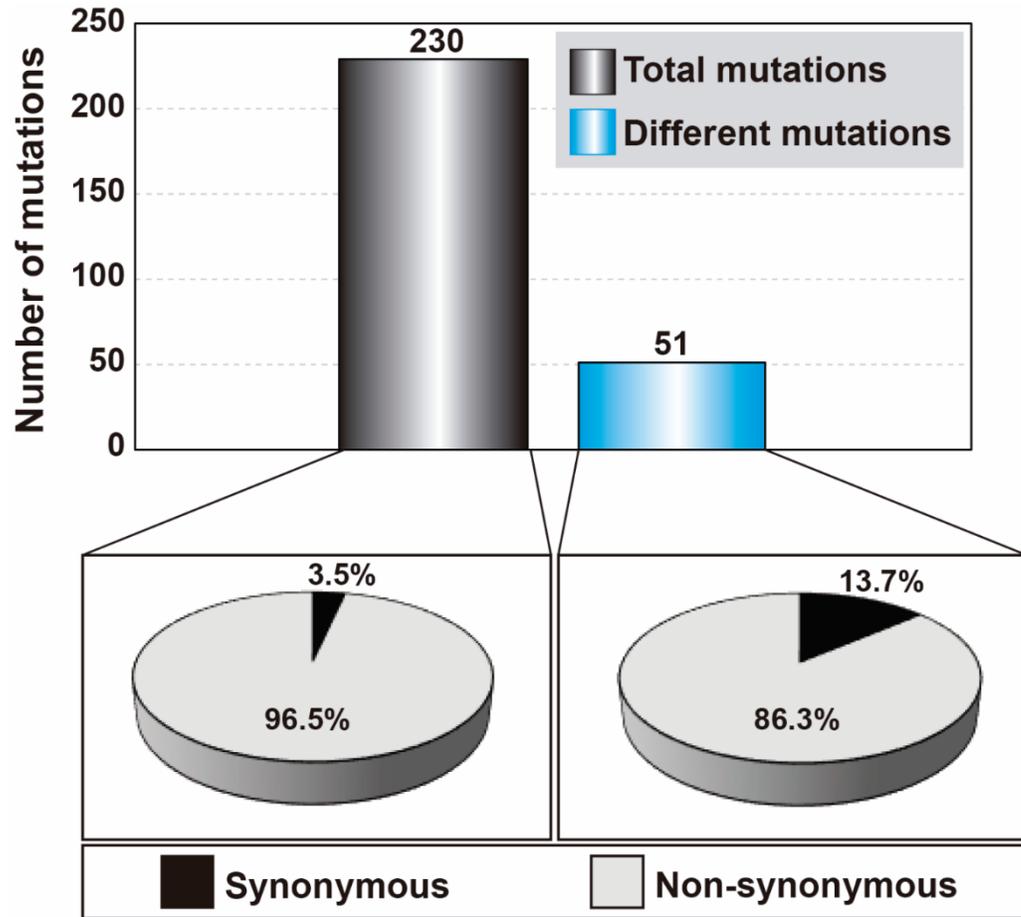
Comparación de mutaciones detectadas mediante secuenciación masiva respecto a lo reportado en GISAID

Región	Mutación	Frecuencia	GISAID GLOBAL por primera vez	GISAID ESPAÑA por primera vez
Nsp12 A1	C14554T (L372F)	0.5-0.9%	No registrada	No registrada
	T14709C (SYN)	1-1.9%	No registrada	No registrada
	C14805T (SYN)	99-100%	Febrero de 2020 en Corea del Sur	No registrada
Nsp12 A2	C14931T (SYN)	1-2.9%	Finales de mayo 2020 en Côte d'Ivoire	No registrada
	G15109A (V557I)	3-3.9%	No registrada	No registrada
	C15237T (SYN)	0.5-0.9%	Marzo de 2020 en Francia	No registrada
	T15255C (SYN)	4-4.9%	No registrada	No registrada
Nsp12 A3	C15656T (T739I)	1.69%	Septiembre 2020 en Colombia	No registrada
Nsp12 A4	T15717A (SYN)	1-1.9%	Enero 2021 en México	No registrada
	A15772G (S778G)	1.1.9%	No registrada	No registrada
	G15906T (Q823H)	99-100%	Octubre 2020 en Nigeria	No registrada
	A15911G (D824G)	2-2.9%	No registrada	No registrada
Spike A1	T23152C (SYN)	0.5-0.9%	Noviembre 2020 en Rusia	No registrada
Spike A2	G23311T (E583D)	3-3.9%	Mayo 2020 en Sudáfrica	No registrada
	A23403G (D614G)	0.5 – 100%	Finales de enero 2020 en India	Febrero 2020 (Extremadura)
	A23544G (E661G)	0.5 – 0.9%	No registrada	No registrada

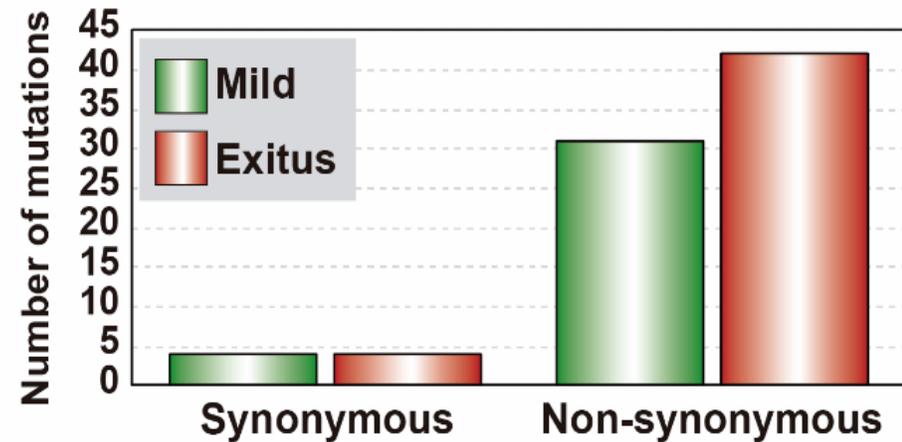
3-29 Abril 2020

Martínez-González et al. Manuscrito en preparación

2) Genómica viral (secuenciación masiva)

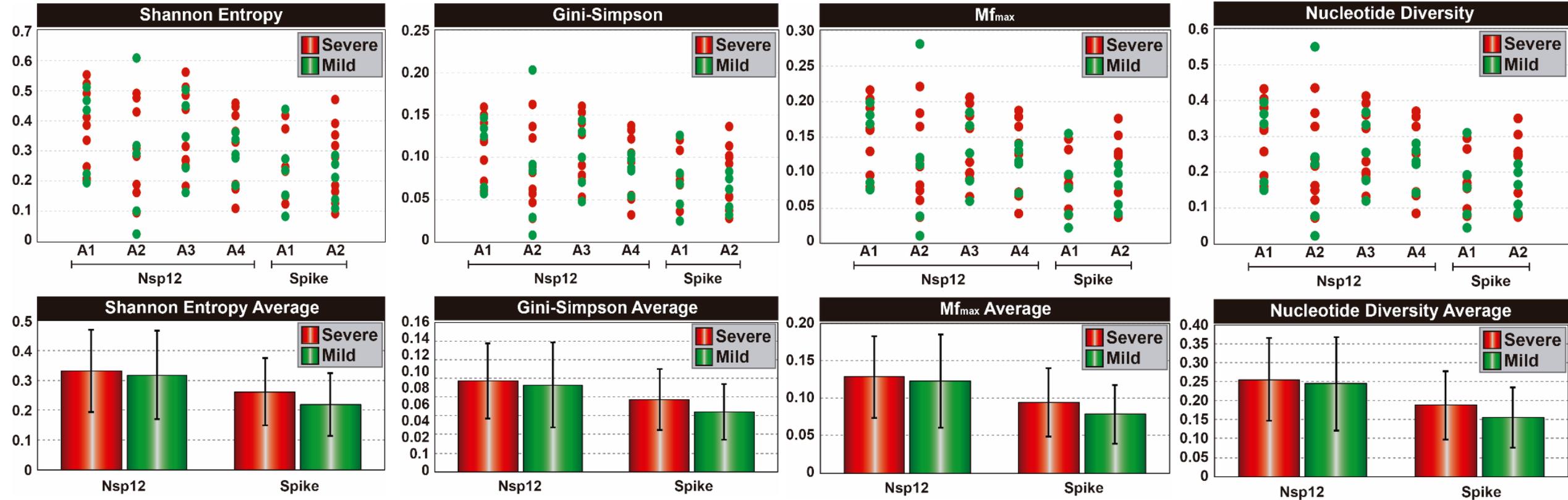


Gran variabilidad con solo el resultado de 14 pacientes y la mayoría de mutaciones implican cambios de aminoácido



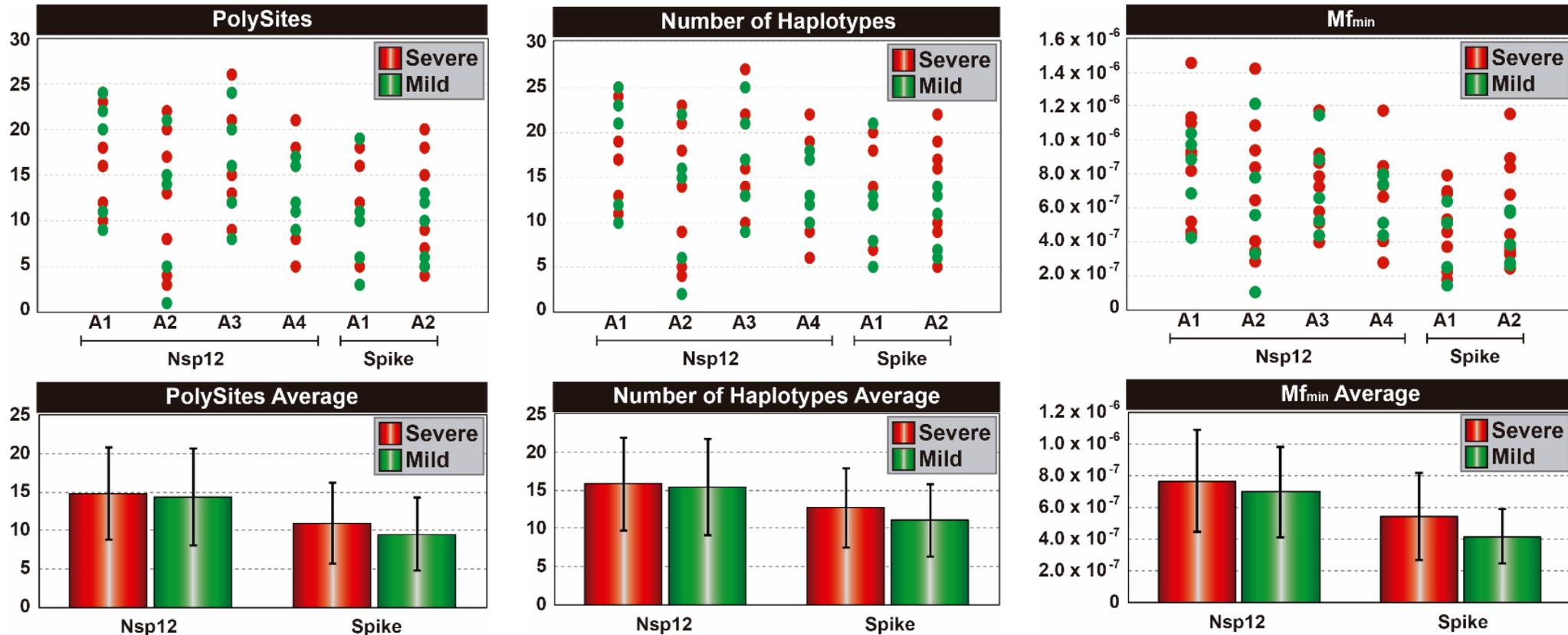
Se observa un mayor número de mutaciones no sinónimas tanto en pacientes Leves como en pacientes Éxitus

Diversidad del espectro de mutantes



El análisis de la diversidad del espectro de mutantes calculado mediante índices de diversidad basados en abundancia aumenta en el caso de los pacientes que han cursado la COVID-19 de forma grave

Diversidad del espectro de mutantes



El análisis de la diversidad del espectro de mutantes calculado mediante índices de diversidad basados en incidencia aumenta en el caso de los pacientes que han cursado la COVID-19 de forma grave

Variantes de SARS-CoV-2

Riesgos:

- ✓ Incremento de la transmisibilidad
- ✓ Incremento en la severidad de la infección
- ✓ Pérdida de respuesta a vacunas

Variantes U.K

SARS-CoV-2 VUI 202012/01
(B.1.1.7)

- N501Y, A570D, D614G, P681H (Spike)
- 57400 casos

SARS-CoV-2 VUI 202012/01
(B.1.1.7 + E484K)

- E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H (Spike)
- 28 casos

Variante Sud África

SARS-CoV-2 20H/501Y.V2
(B.1.351)

- E484K, N501Y (Spike)
- 1400 casos

Variante Nigeria

(B.1.1.207)

- P681H (Spike)

Variante California

SARS-CoV-2 CAL.20C
(B.1.429)

- L452R (Spike)

Variante Brasil

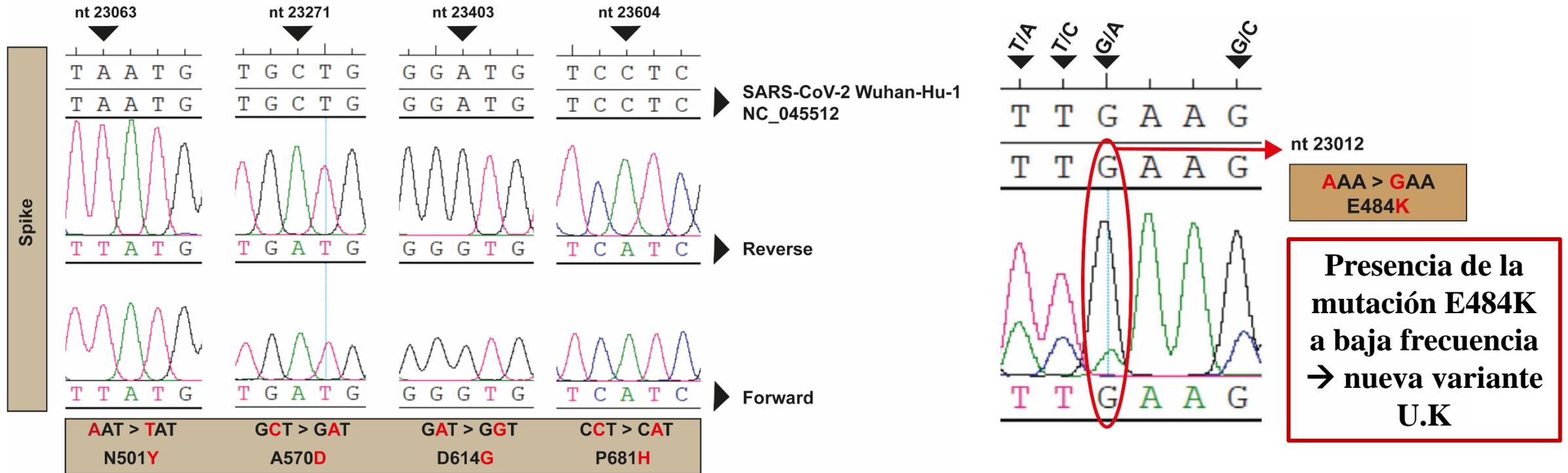
SARS-CoV-2 20J/501Y.V
(B.1.1.248)

- E484K, N501Y, H655Y (Spike)
- 200 casos



Amplificación y secuenciación variante U.K.

Nuestros primers son capaces de amplificar muestras pertenecientes a la 3ª ola de SARS-CoV-2



Detección de cuatro de las mutaciones presentes en la spike de SARS-CoV-2 en la variante U.K B.1.1.7 con Secuenciación Sanger

Detección de mutaciones a baja frecuencia con Secuenciación Sanger en uno de los pacientes pertenecientes a la variante U.K. B.1.1.7

Ejemplos de mutantes de escape descritos en SARS-CoV-2

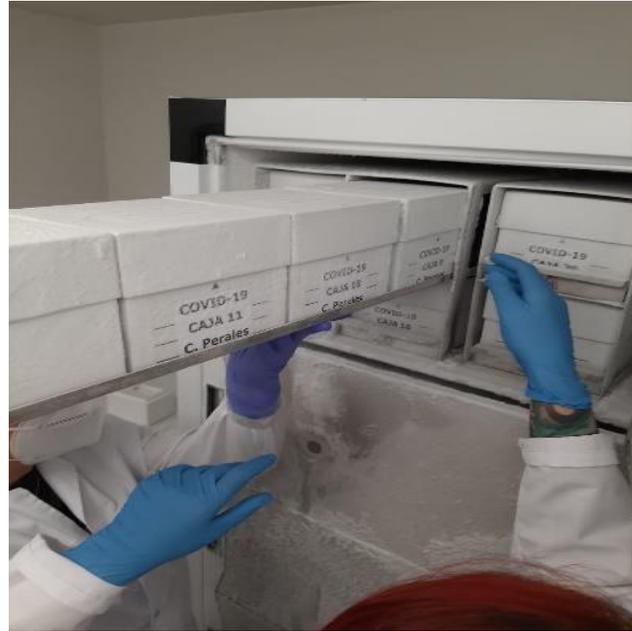
Proteína	Tipo de Mutación	Cambio producido	Implicaciones	Referencia
Spike	Mutación	A475V	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos y suero de pacientes convalecientes	<i>Li et al. Cell 182: 1-11, 2020</i>
Spike	Mutación	D614G + I472V	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos y suero de pacientes convalecientes	<i>Li et al. Cell 182: 1-11, 2020</i>
Spike	Mutación	V483A	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos	<i>Li et al. Cell 182: 1-11, 2020</i>
Spike	Mutación	N234Q	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos	<i>Li et al. Cell 182: 1-11, 2020</i>
Spike	Mutación	N439K	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos monoclonales y policlonales	<i>Thomson et al. Cell 184: 1-17, 2021</i>
Spike	Mutación	P475A	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos	<i>Durmaz et al. Medeni Med J, 35: 253-260, 2020</i>
Spike	Inserción	G482	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos	<i>Durmaz et al. Medeni Med J, 35: 253-260, 2020</i>
Spike	Mutación	E484K	Aparece en las nuevas variantes (sudafricana y brasileña) reduce la capacidad neutralizante de los anticuerpos de suero de pacientes y de pacientes vacunados [Pfizer BioNTech (NT162b2)]	<i>Andreano et al. BioRxiv, 2020</i> <i>Diamond et al. Research Square, 1-17, 2021</i>
Spike	Delección	F140	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos	<i>Andreano et al. BioRxiv, 2020</i>
Spike	Inserción	KTRNKSTSRRE248	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos presentes en plasma de pacientes recuperados	<i>Andreano et al. BioRxiv, 2020</i>
Spike	Mutación	F486S	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos monoclonales y policlonales.	<i>Liu et al. Cell Host & Microbe, 29: 1-12, 2021</i>
Spike	Mutación	S477N	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos monoclonales.	<i>Liu et al. Cell Host & Microbe, 29: 1-12, 2021</i>

Mutaciones que disminuyen la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos:
V483A, N234Q, N439K, P475A, G482 (inserción), F140 (delección), F486S y S477N

Disminuyen la capacidad neutralizante de los **anticuerpos de suero de pacientes que se han recuperado de la infección:**

D614G + I472V, KTRNKSTSRRE248 (inserción) y A475V

Disminuyen la capacidad neutralizante de los anticuerpos de suero de **pacientes recuperados de la infección e individuos vacunados:** E484K



STOP-Coronavirus: factores clínicos, inmunológicos, genómicos, virológicos y bioéticos de COVID-19



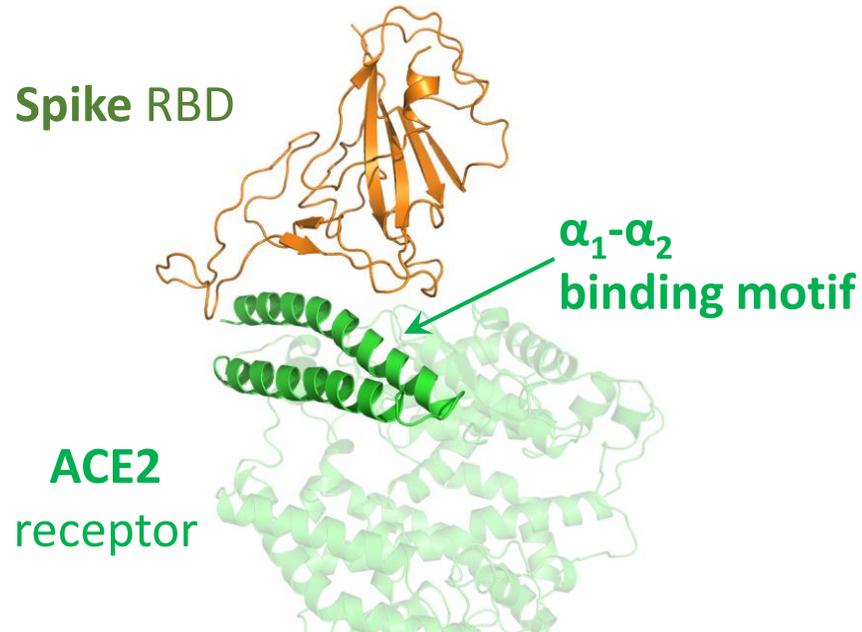
Combinaciones de antivirales frente al SARS-CoV-2 (CSIC-COV19-014)

Dra. Nuria Verdaguer (IBMB)

Dr. Esteban Domingo (CBMSO)

Inhibiting SARS-CoV-2 entry through designed ACE2-mimetics

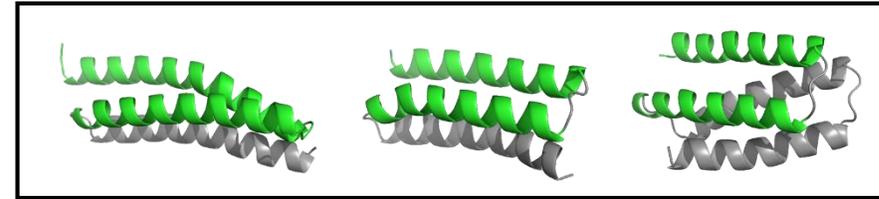
Spike-ACE2 complex structure
Lan J et al. *Nature* (2020)



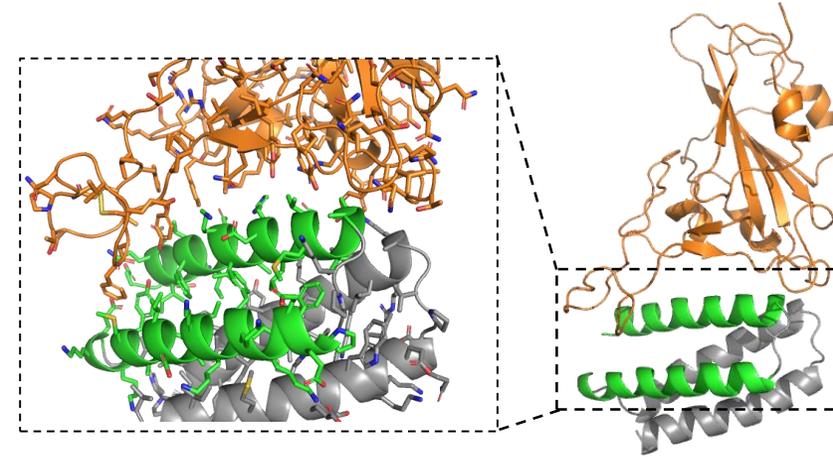
**Experimental
characterization
of best candidates**

-----> **ACE2-protein mimetics
by computational design**

De novo mimetic library



Optimization of binding sequence

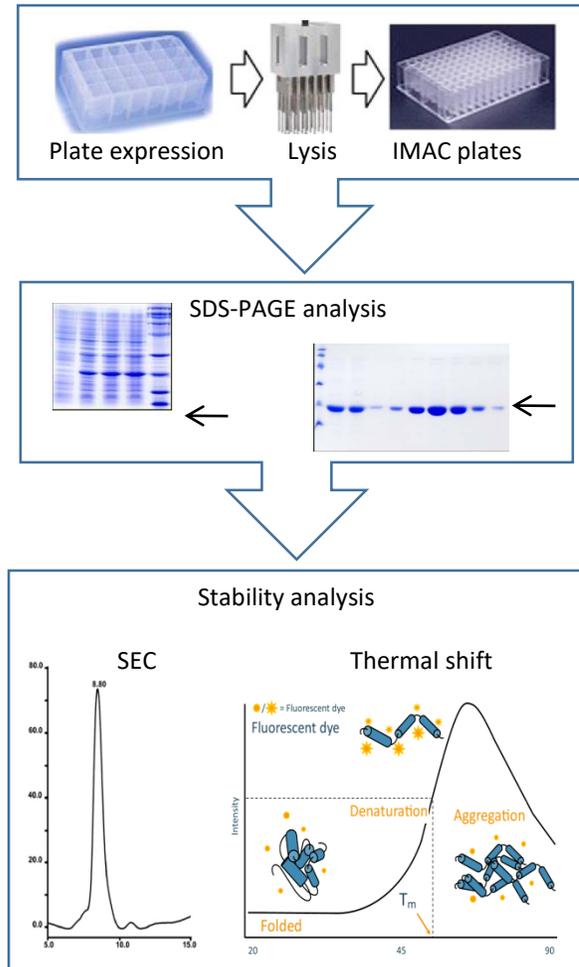


Marcos et al. Science 355:201, 2017

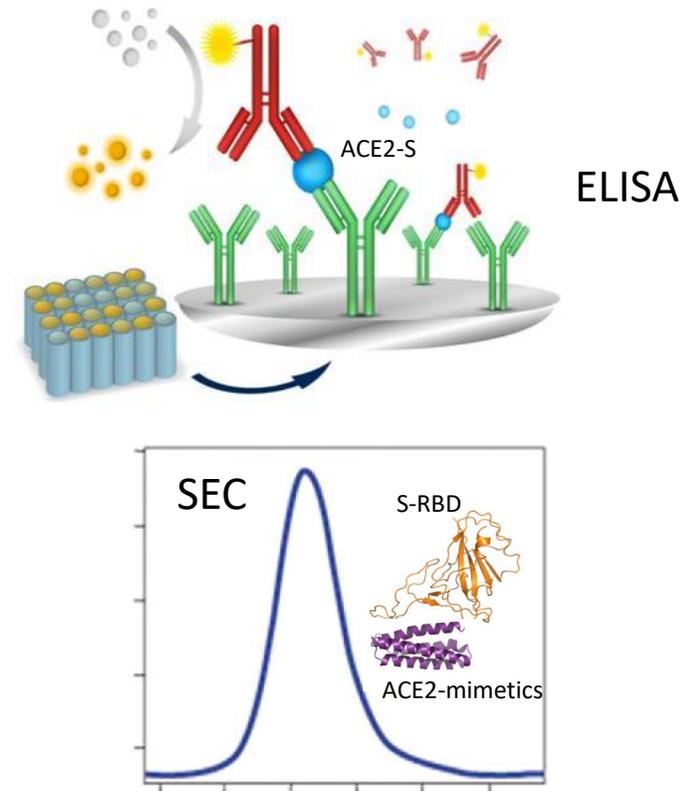
Marcos et al. Nature Struct. Mol. Biol. 25:1028, 2018

Inhibiting SARS-CoV-2 entry through designed ACE2-mimetics

Parallel expression, purification and stability assays of ACE2 mimetic miniproteins



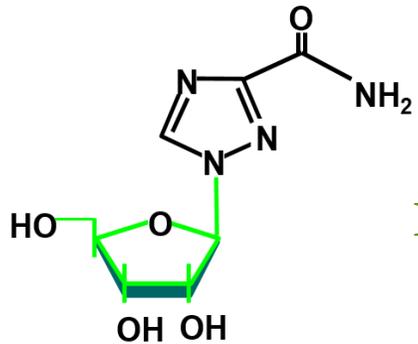
ACE2 mimetics – S RBD binding, competition and complex stability



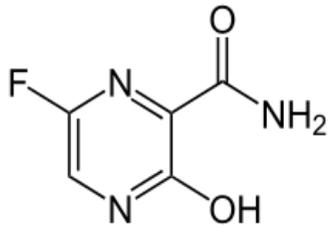
Verdaguer et al. Nature Struct. Mol. Biol. 5:429, 2004

Ferrero et al. PLoS Pathogens 15:e1007656, 2019

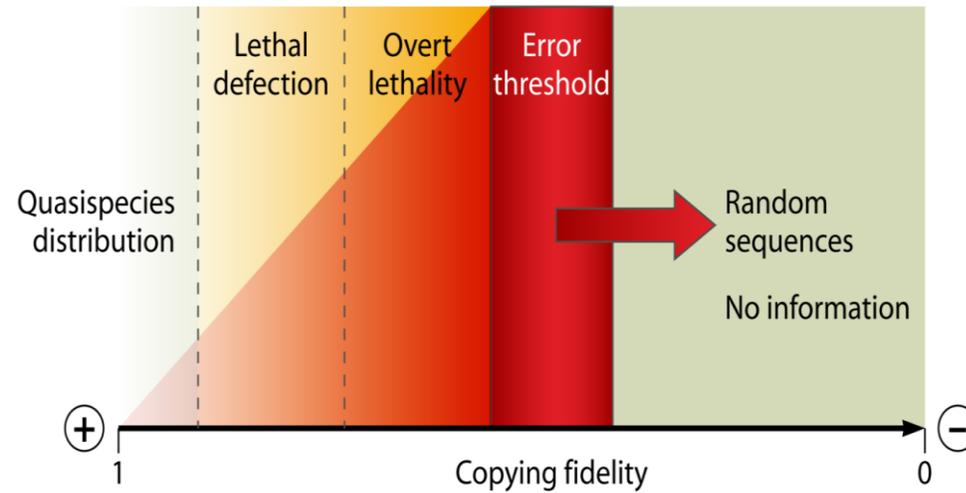
Lethal mutagenesis is a broad-spectrum antiviral approach



Ribavirin



Favipiravir



Lethal mutagenesis (**virus extinction by an excess of mutations evoked by nucleoside analogues**) is an antiviral design that has proven effective to extinguish several RNA viruses both in cell culture and in vivo



Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C. *MMBR*, 76:159, 2012

Perales et al. *Fut. Med. Chem.* 11:1645, 2019

Sheahan et al. *Sci. Transl. Med.* 12:eabb5883, 2020

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>

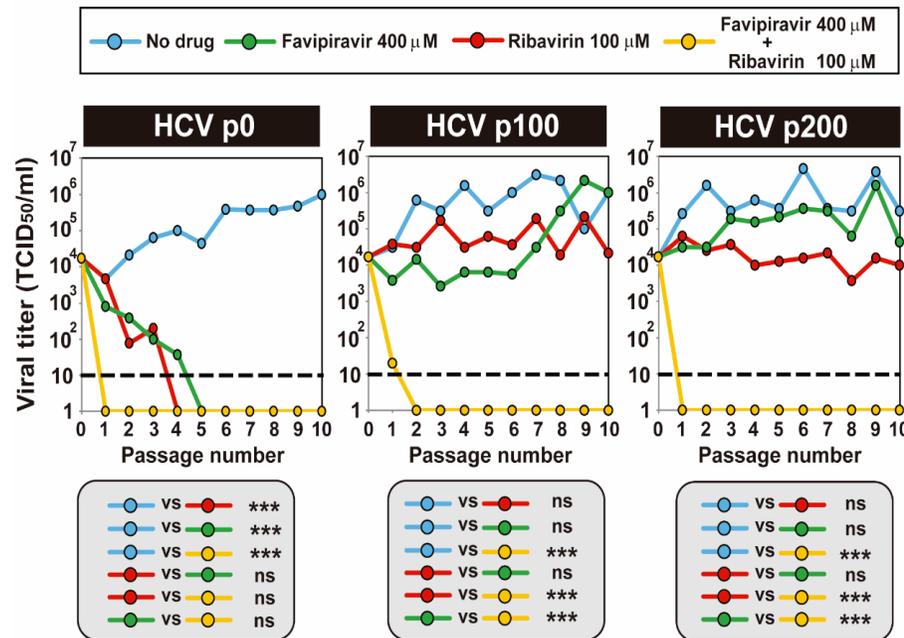
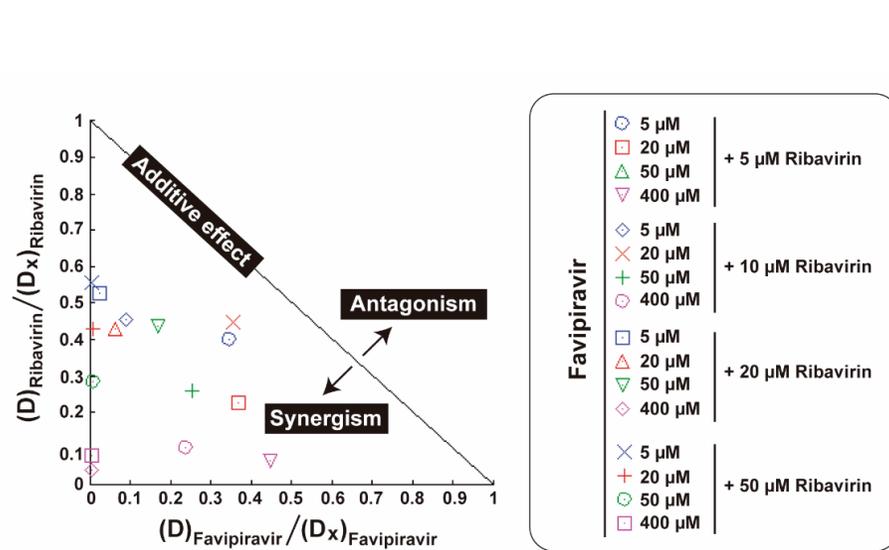
OPEN



Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis

Ashleigh Shannon¹, Barbara Selisko¹, Nhung-Thi-Tuyet Le¹, Johanna Huchting², Franck Touret³, Géraldine Piorkowski³, Véronique Fattorini¹, François Ferron¹, Etienne Decroly¹, Chris Meier², Bruno Coutard³, Olve Peersen⁴ & Bruno Canard¹

Synergy between favipiravir and ribavirin for HCV



Unexpectedly, working with HCV, we have discovered a **new synergy mechanism between two lethal mutagens** despite both targeting the viral polymerase. Its basis is the different preference for mutation sites

Conclusiones generales y trabajo en marcha

- *Se han clasificado clínicamente pacientes positivos para SARS-CoV-2 en tres niveles de severidad (leve, moderado y grave) recogidos durante la primera ola de la pandemia en los hospitales del grupo Quirón. Hemos obtenido una correlación positiva entre el valor del Ct del hisopo diagnóstico y la severidad clínica de la infección*
- *Hemos puesto a punto la secuenciación masiva ultra profunda para el análisis de los espectros de mutantes de SARS-CoV-2 con el objetivo de detectar variantes minoritarias que puedan tener relevancia epidemiológica en meses posteriores*
- *La secuenciación masiva de los primeros pacientes de cada grupo de severidad clínica (leves, moderados y graves) ha revelado una mayor complejidad de los espectros de mutantes de aquellos pacientes con enfermedad COVID-19 mas grave*
- *Hemos secuenciado muestras de la cepa británica disponibles de la 3ª ola y estamos haciendo secuenciación masiva para determinar la dinámica de mutaciones adicionales que acompañan a las mutaciones ya impuestas*
- *Queremos determinar **regiones conservadas** basadas en el análisis de espectros de mutantes*
- *Queremos establecer una correlación entre la carga viral, la complejidad del espectro de mutantes y la tasa de replicación/fitness vírico en **cultivo celular** (a desarrollar en colaboración con los Dres. Esteban Domingo y Nuria Verdaguer y con el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes), así como ensayar combinaciones de antivirales sinérgicas frente a SARS-CoV-2*
- *Ampliación de todos estos estudios a pacientes de la segunda y tercera ola en la medida en que se consiga financiación adicional*

The Time for COVID-19 Vaccination



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Journal of
Virology®

 Esteban Domingo,^{a,b}  Celia Perales^{a,b,c}

^aDepartment of Interactions with the Environment, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^cDepartment of Clinical Microbiology, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM), Madrid, Spain

El efecto protector de una vacuna está influenciado por la capacidad del virus circulante de superar la respuesta inmune.

La probabilidad de que un mutante de escape este presente es mayor cuanto mayor es la cantidad de virus circulante.

Sería aconsejable considerar el contexto epidemiológico para iniciar las campañas de vacunación cuando sea posible de forma que se vacune en épocas donde la incidencia del virus es baja.

Agradecimientos



Brenda Martínez-González

Rebeca Lobo-Vega

Lucía Vázquez-Sirvent

María Eugenia Soria



INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Departamento de Microbiología
(Dres. I. Gadea, J. Esteban y R. Fernández)

Departamento de Genética
(Dra. C. Ayuso y Dr. P. Mínguez)

Departamento de Estadística (Dr. I. Mahíllo)

Dra. Nuria Verdaguer

Dr. Esteban Domingo

