

***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***

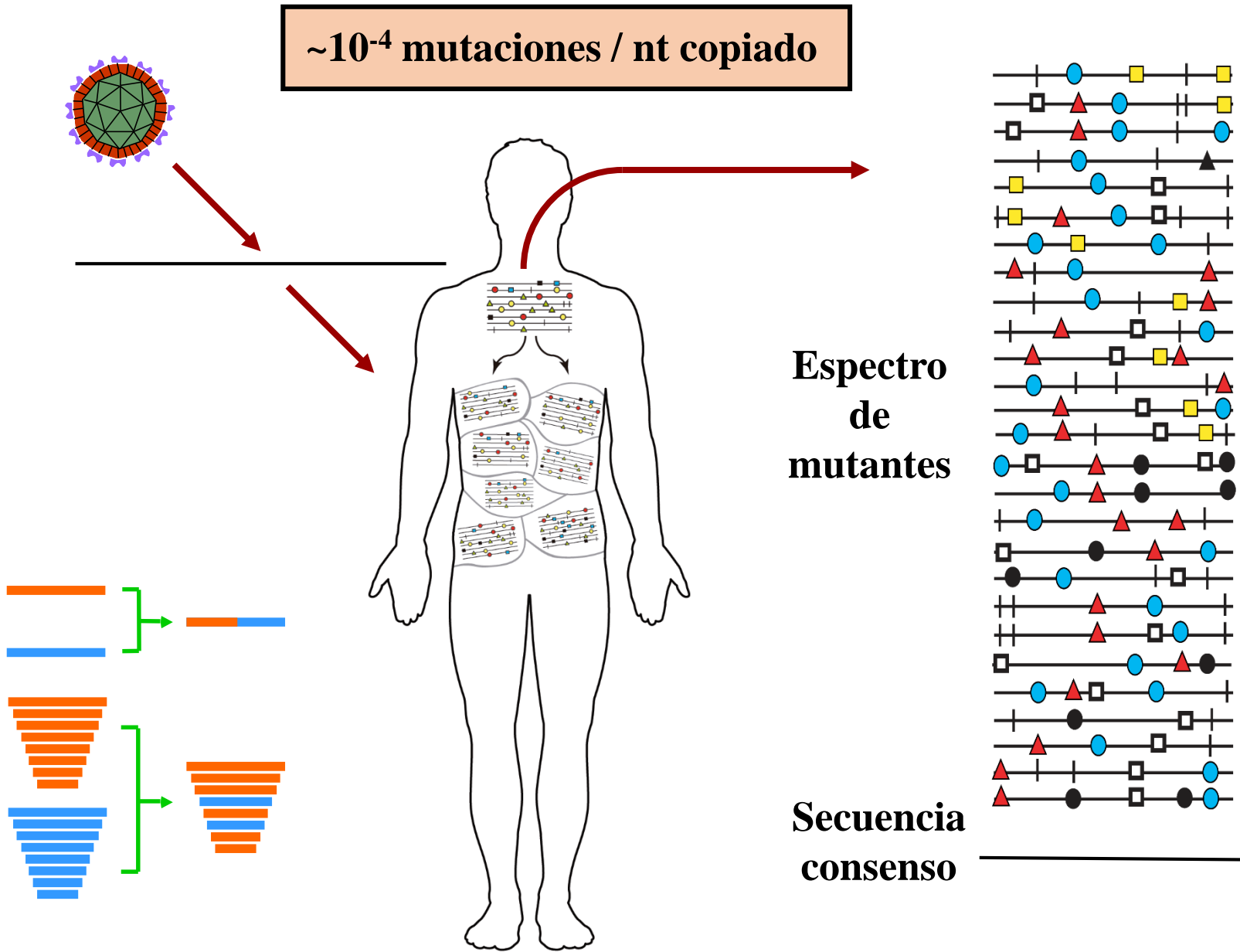
***Departamento de Microbiología***

***Celia Perales Viejo***  
[celia.perales@quironsalud.es](mailto:celia.perales@quironsalud.es)



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

***08. Abril.2021***



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

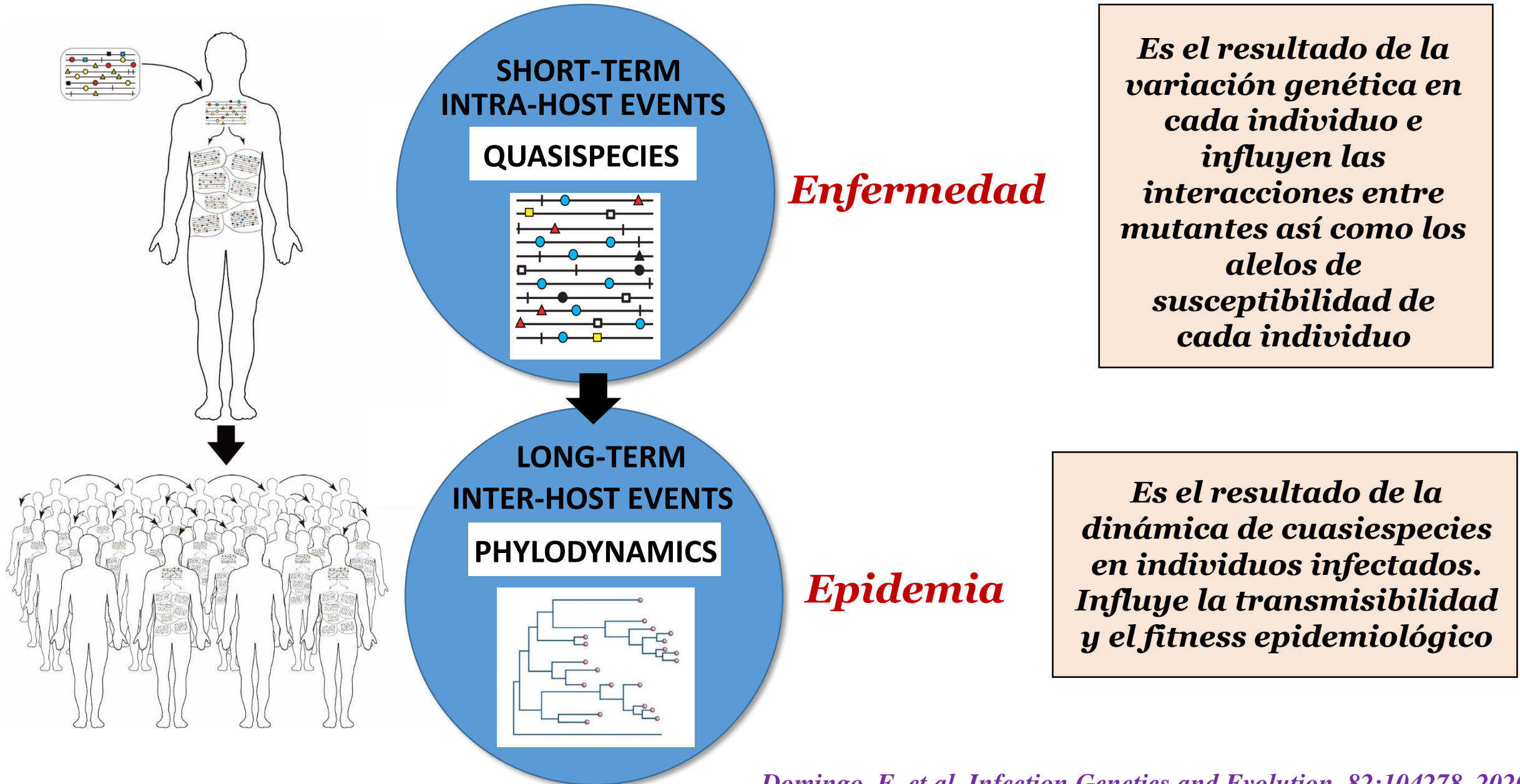
Espectro de mutantes

Secuencia consenso

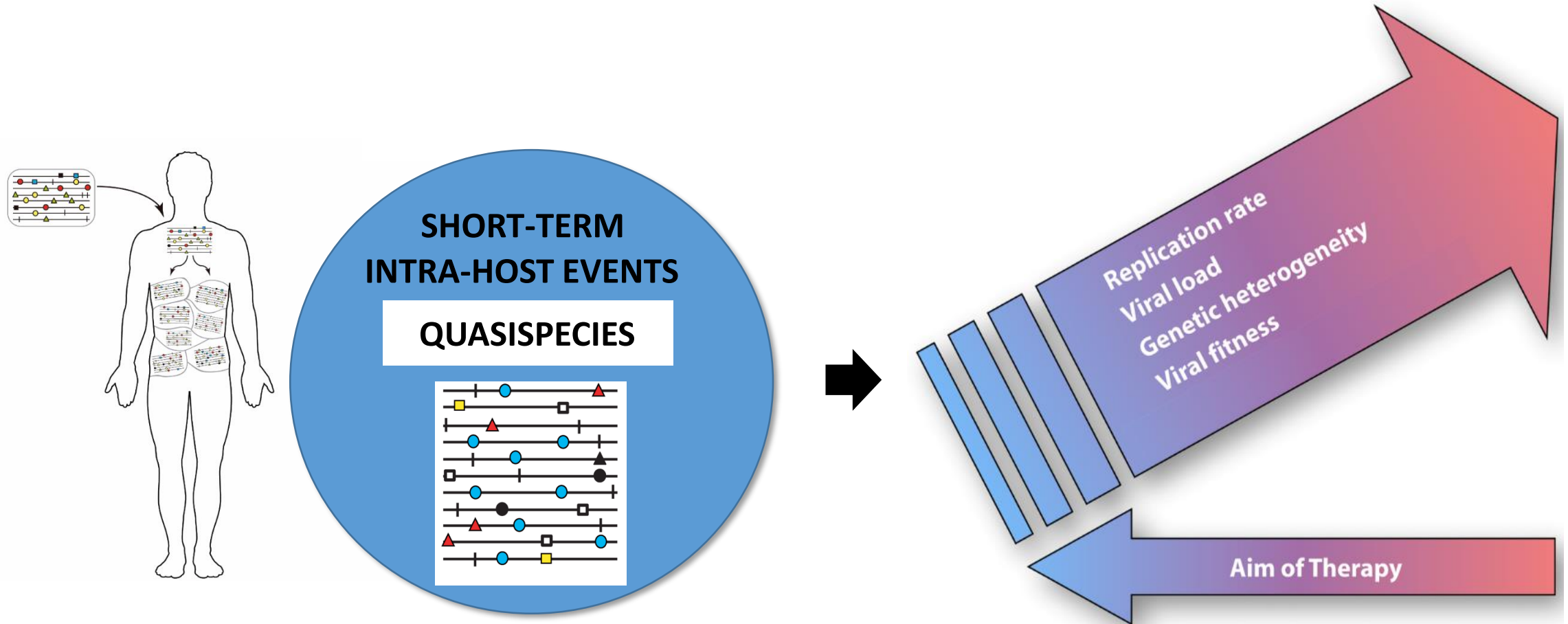
*Domingo et al. Cell 13:735-44, 1978*

*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<sup>a</sup> ola** → 2425 (3/4/2020 – 30/4/2020)
- **Muestras 2<sup>a</sup> ola** → 2810 (19/10/2020 – 24/11/2020)
- **Muestras 3<sup>a</sup> 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



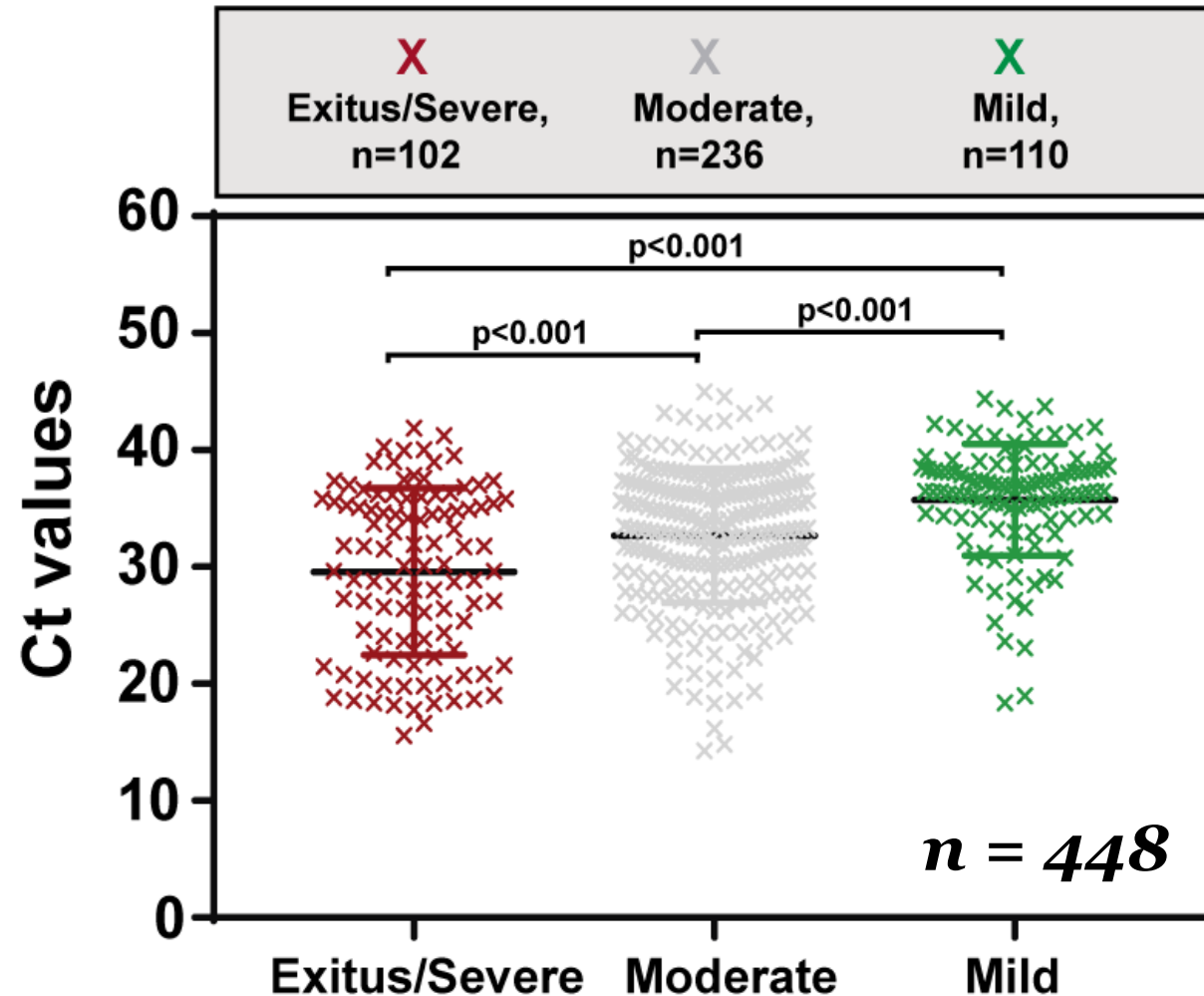
Hemos clasificado y organizado una COVID-teca de 2424 hisopos nasofaríngeos procedentes de pacientes de la FJD, HUIE, HGV, HURJC recogidos entre el 3 y 29 de Abril 2020 correspondiente al primer brote de la pandemia en España

## 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 O<sub>2</sub> 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

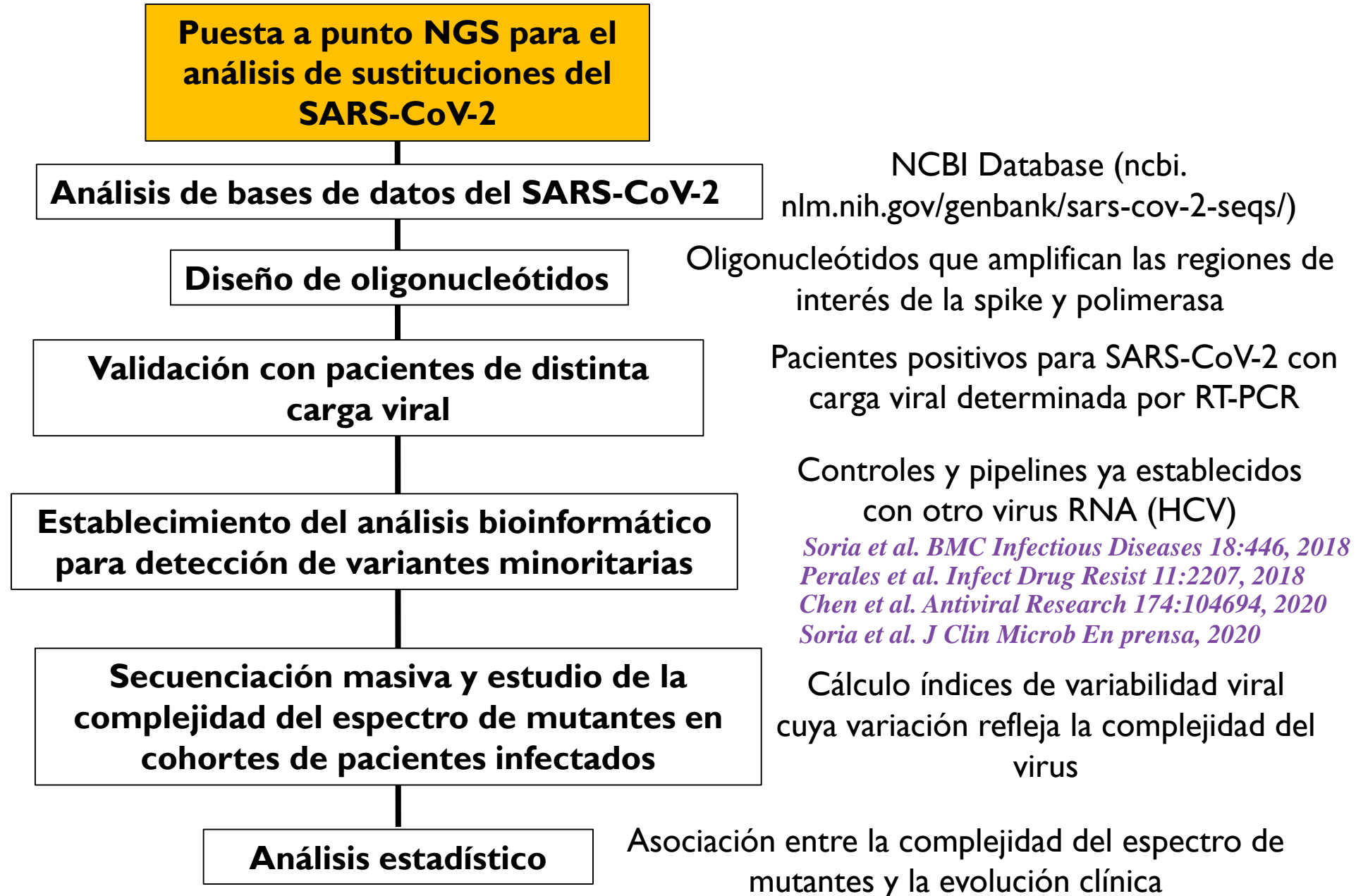
## Correlación entre el valor de Ct diagnóstico y la severidad de la enfermedad clínica (COVID-19)

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

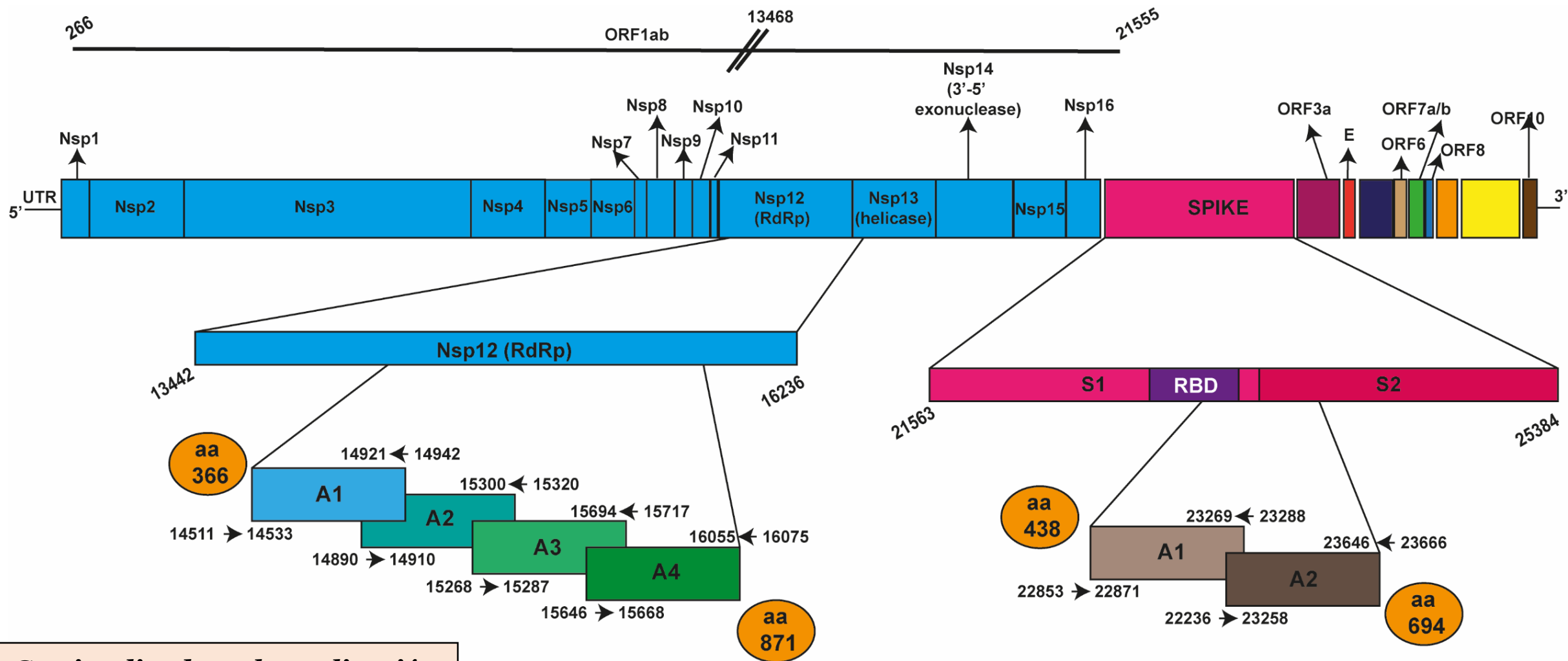
**Datos demográficos y comorbilidades preexistentes en la cohorte según la severidad de la infección**

**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.**





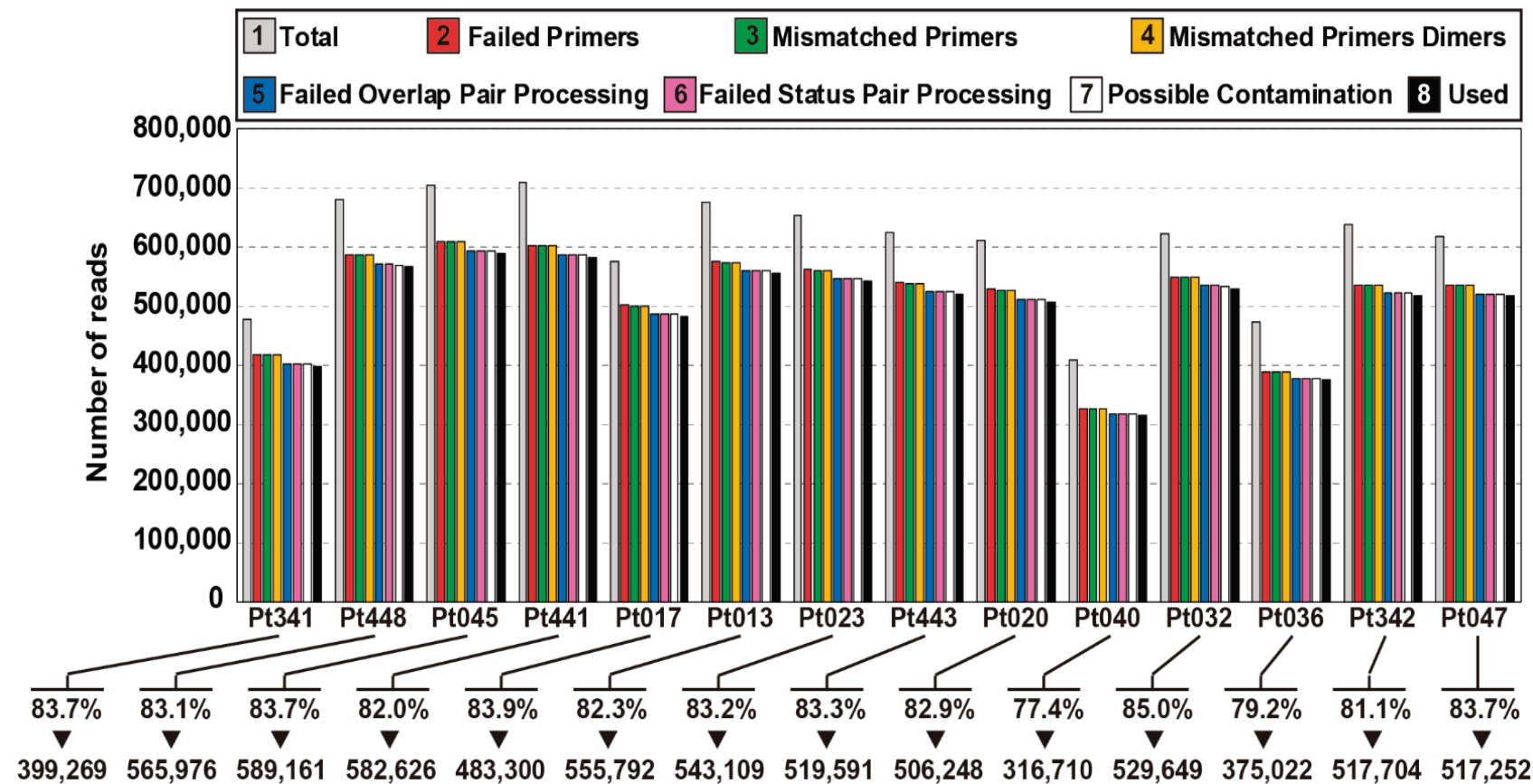
# Regiones del genoma a estudiar (polimerasa y spike)



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

*Gen implicado en el tropismo celular*





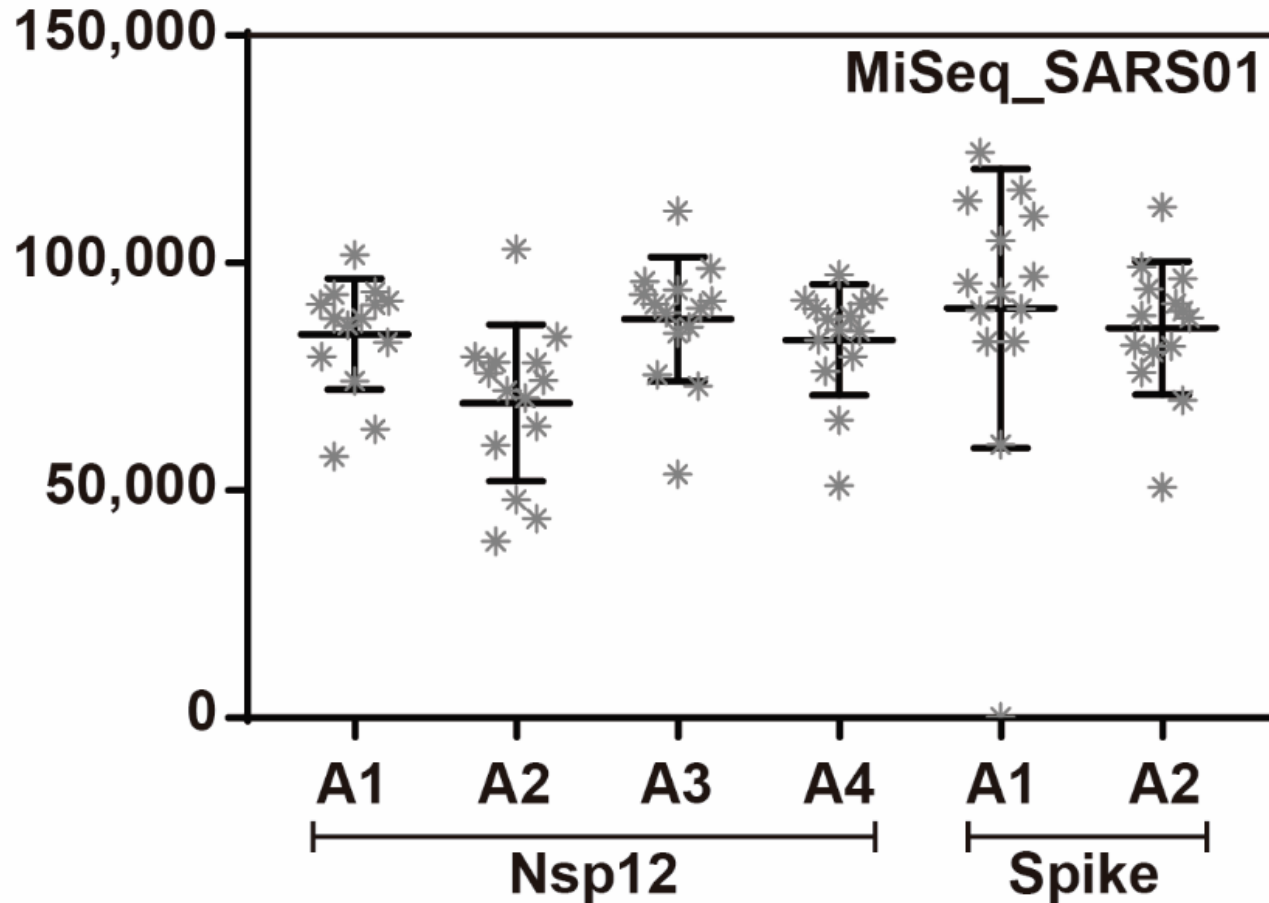
**Análisis de la primera placa de secuenciación masiva (SeekDeep)**

**% 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)*

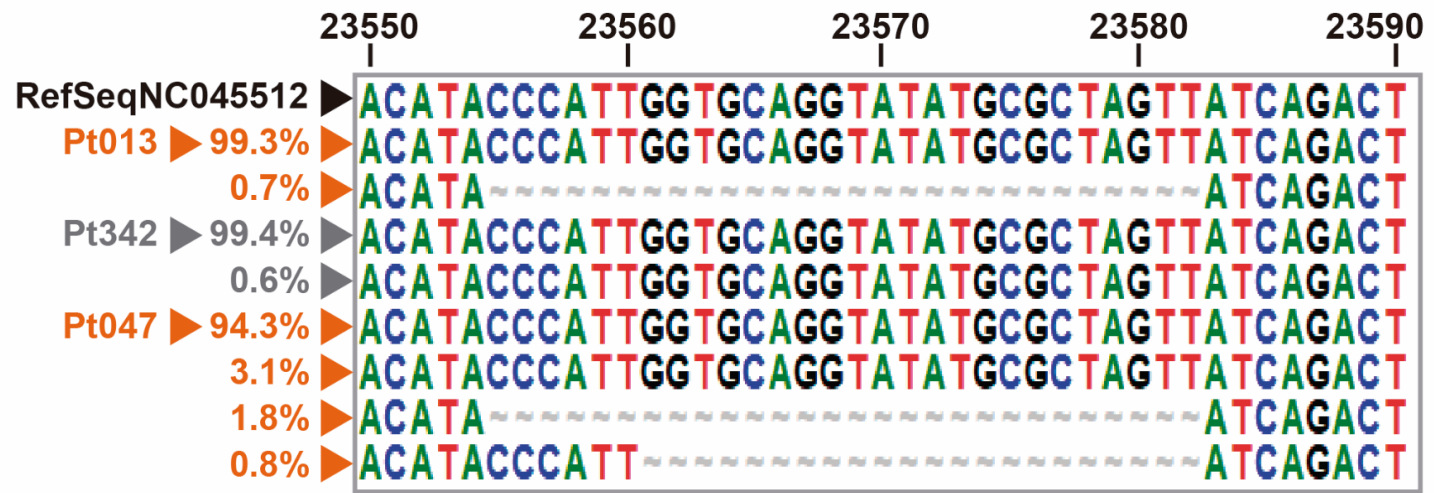
## Visualización de haplotipos mediante secuenciación masiva

### Mutación

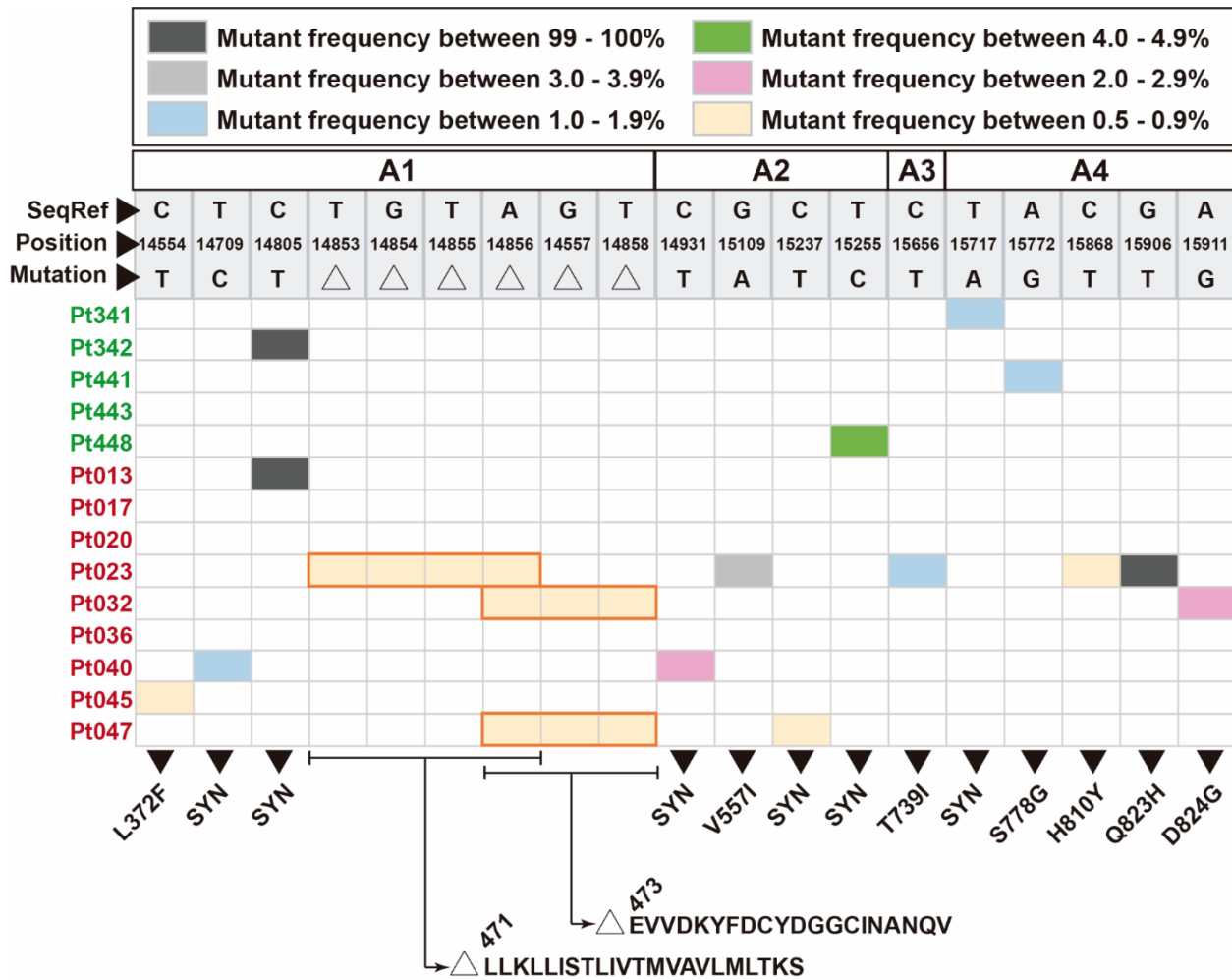


**Haplotipo:**  
conjunto de  
secuencias  
idénticas  
representadas  
por una  
frecuencia

### Delección

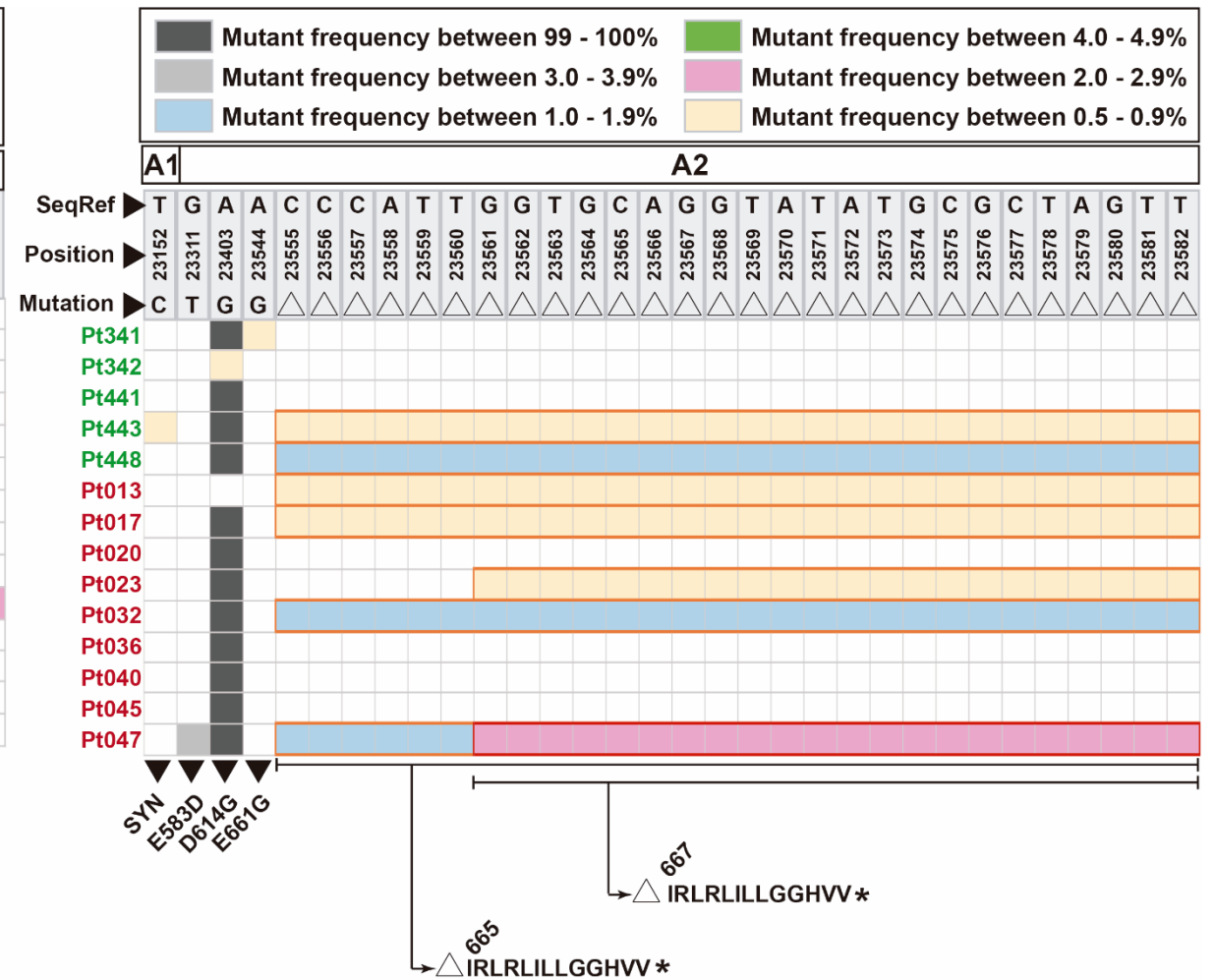


### Polimerasa



**Únicamente se detectan deleciones en la nsp12 en los pacientes Éxitus**

### Spike



**Únicamente se detecta la deleción de los nucleótidos 23561 a 23582 en la spike en los pacientes Éxitus**

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

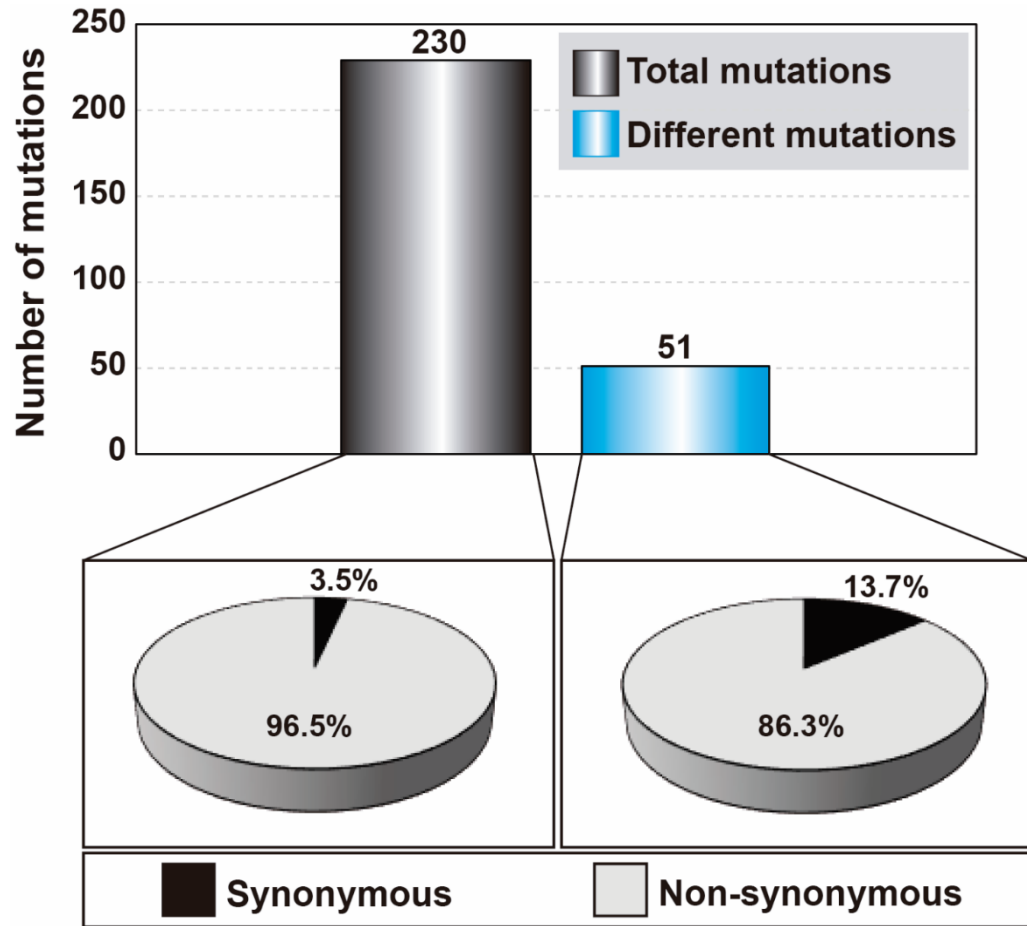
Región	Mutación	Frecuencia	GISAID GLOBAL por primera vez	GISAID ESPAÑA por primera vez
Nsp12 A1	C14554T (L372F)	0.5-0.9%	No registrada	No registrada
	T14709C (SYN)	1-1.9%	No registrada	No registrada
	C14805T (SYN)	99-100%	Febrero de 2020 en Corea del Sur	No registrada
Nsp12 A2	C14931T (SYN)	1-2.9%	Finales 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**

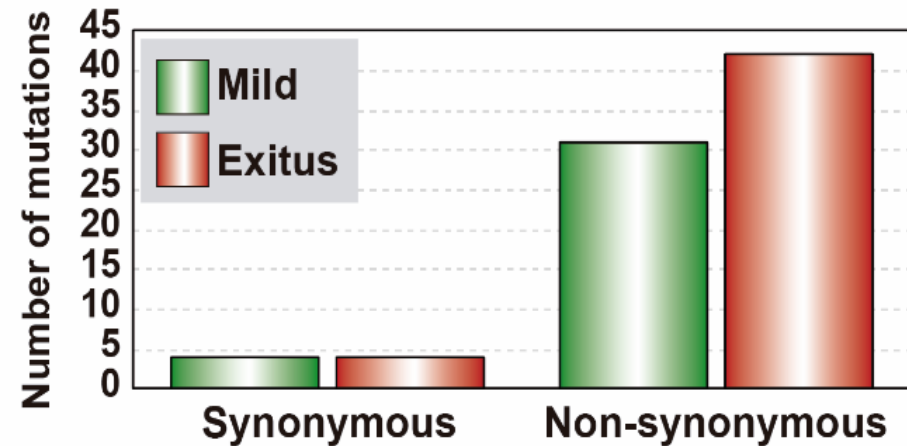
*Martínez-González et al. Manuscrito en preparación*



## 2) Genómica viral (secuenciación masiva)

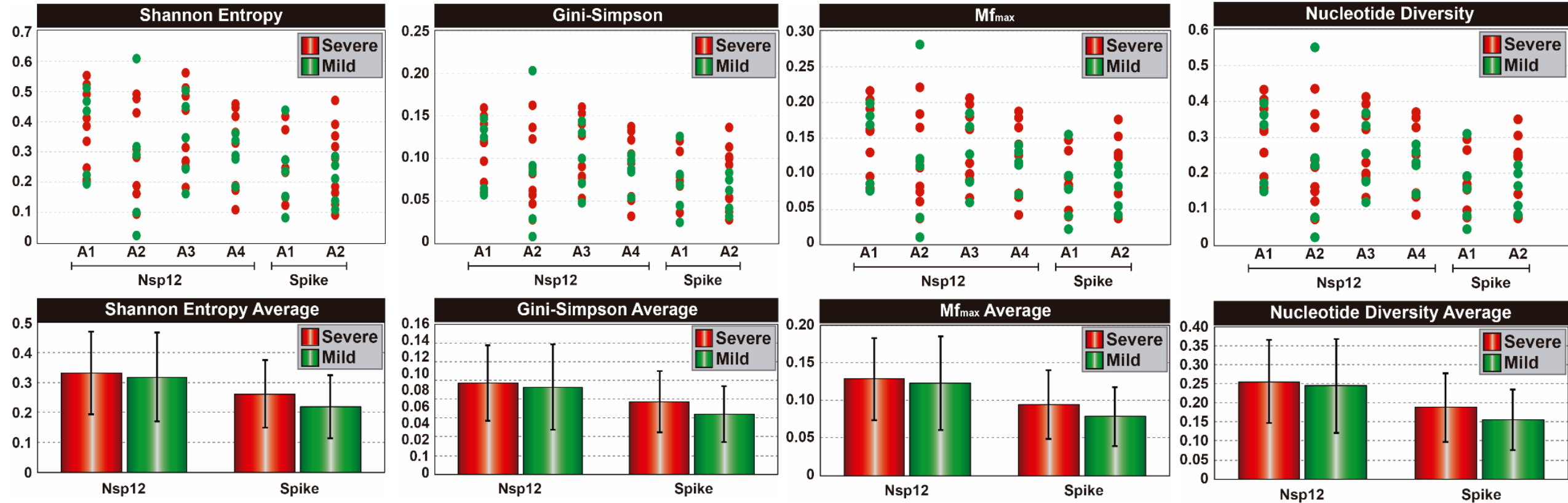


**Gran variabilidad con solo el resultado de 14 pacientes y la mayoría de mutaciones implican cambios de aminoácido**



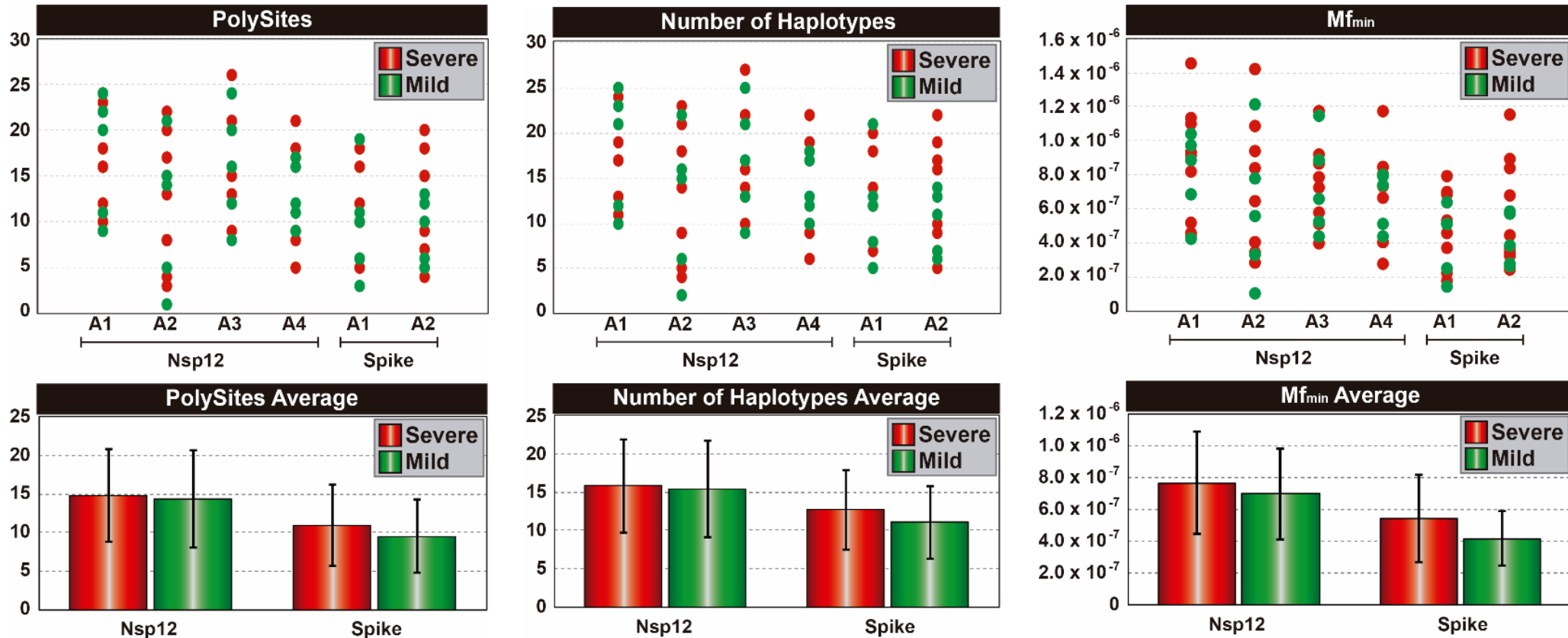
**Se observa un mayor número de mutaciones no sinónimas tanto en pacientes Leves como en pacientes Éxito**

## 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

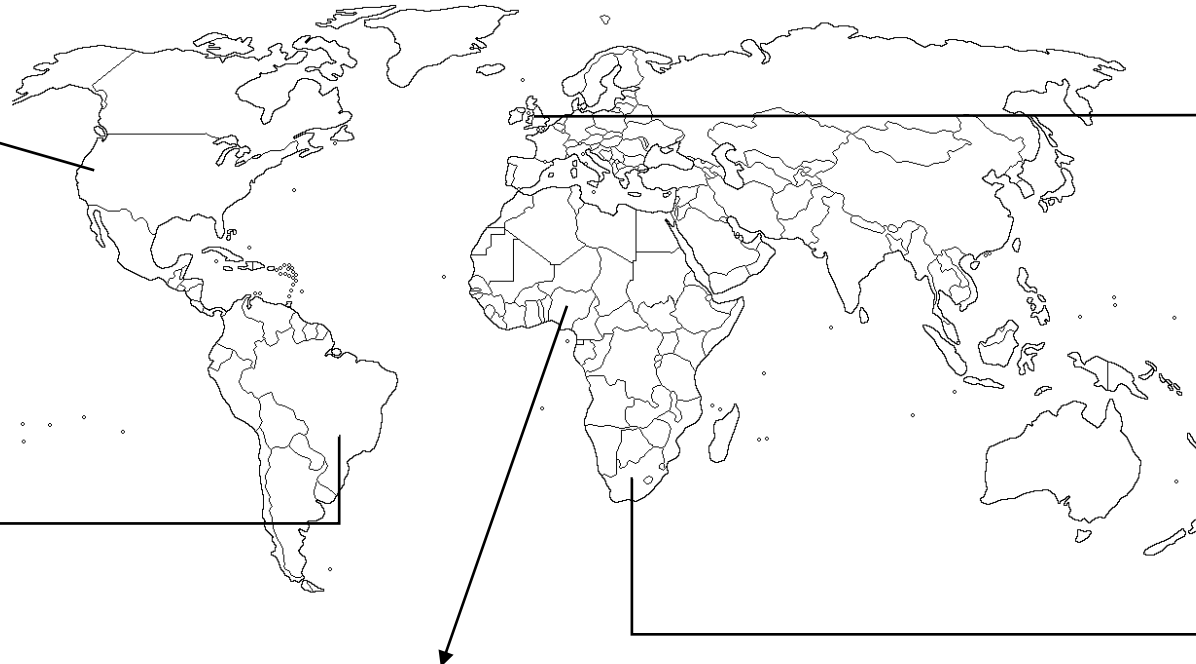
SARS-CoV-2 CAL.20C  
(B.1.429)

- L452R (Spike)

### Variante Brasil

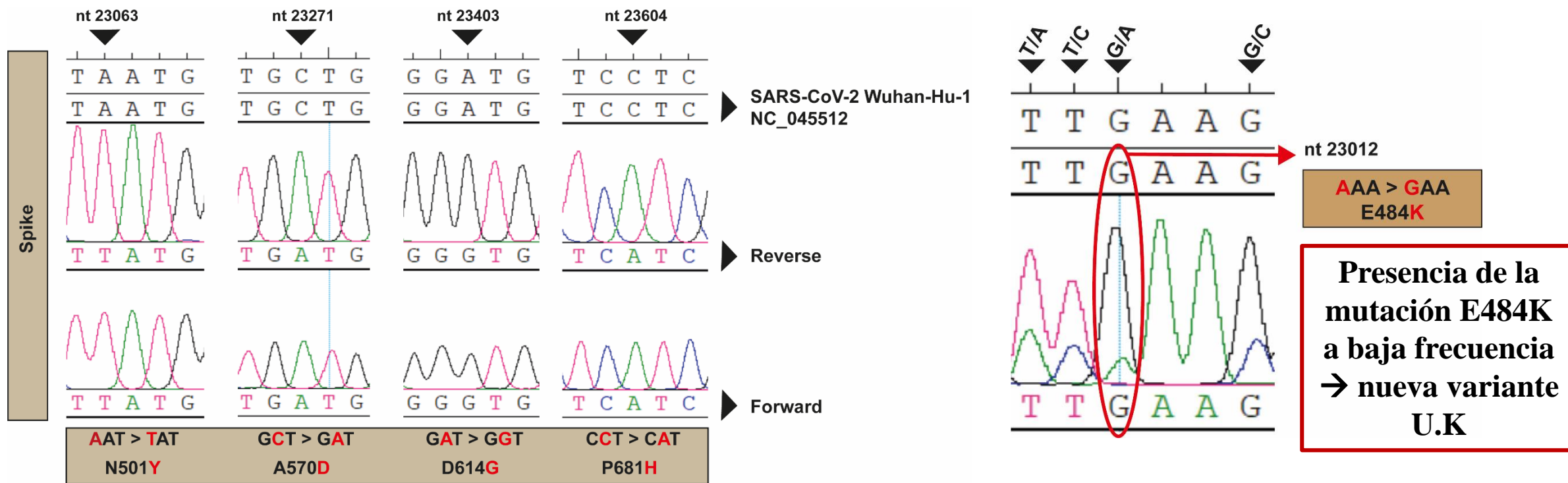
SARS-CoV-2 20J/501Y.V  
(B.1.1.248)

- 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

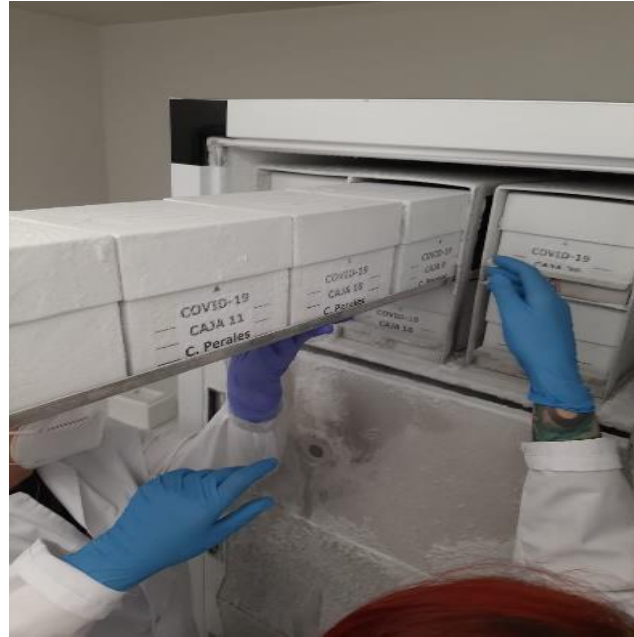
Proteína	Tipo de Mutación	Cambio producido	Implicaciones	Referencia
Spike	Mutación	A475V	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos y suero de pacientes convalecientes	<i>Li et al. Cell 182: 1-11, 2020</i>
Spike	Mutación	D614G + I472V	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por 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 &amp; Microbe, 29: 1-12, 2021</i>
Spike	Mutación	S477N	Disminuye la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos monoclonales.	<i>Liu et al. Cell Host &amp; 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***



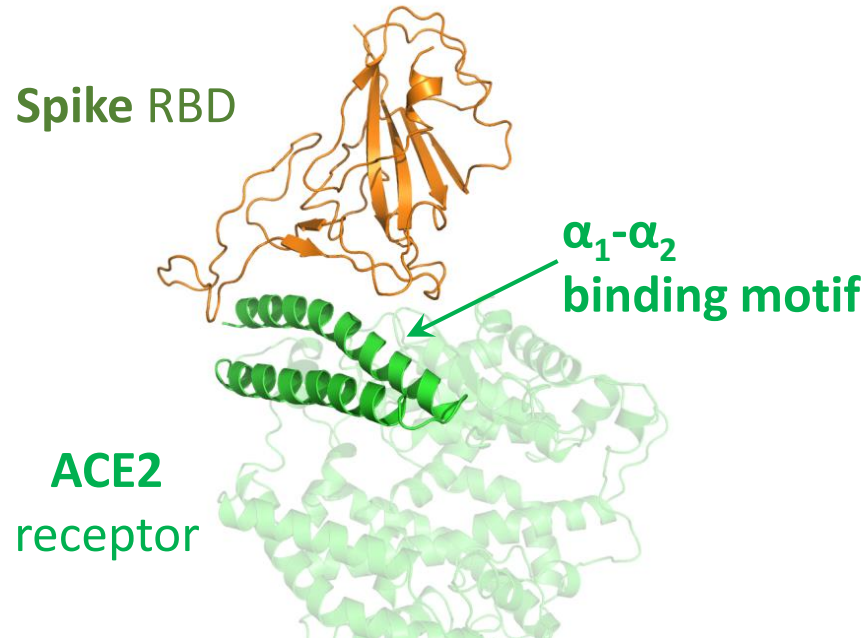
***Combinaciones de antivirales frente al SARS-CoV-2 (CSIC-COV19-014)***

***Dra. Nuria Verdaguer (IBMB)***

***Dr. Esteban Domingo (CBMSO)***

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

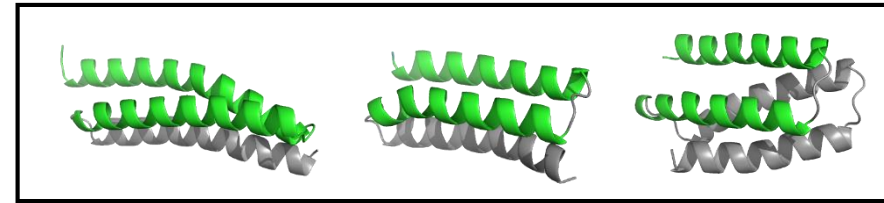
**Spike-ACE2 complex structure**  
Lan J et al. *Nature* (2020)



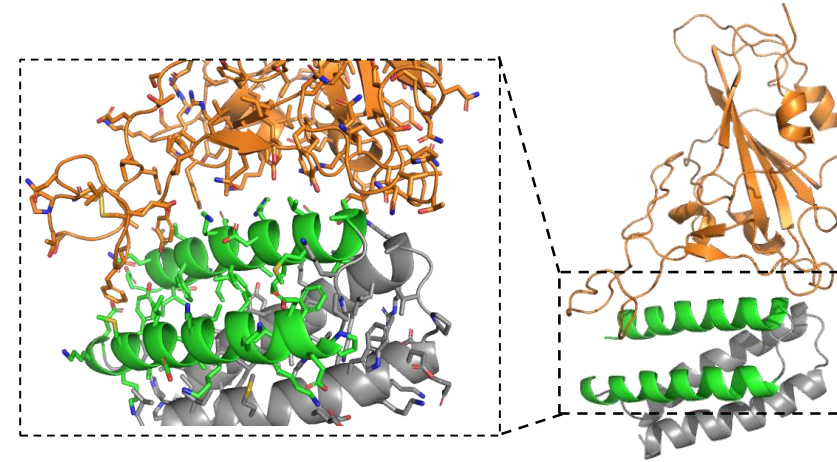
**Experimental  
characterization  
of best candidates**

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

*De novo mimetic library*



*Optimization of binding sequence*



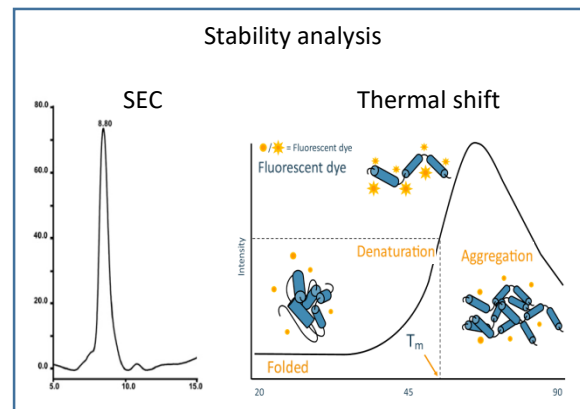
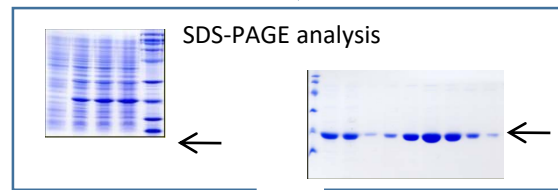
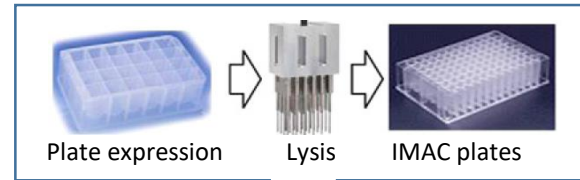
*Marcos et al. Science 355:201, 2017*

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

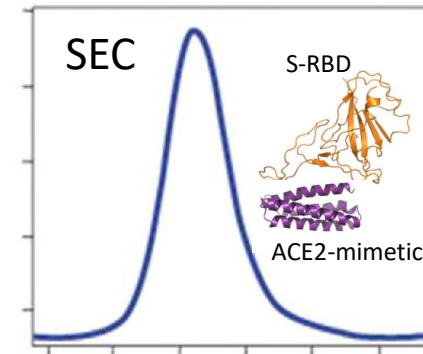
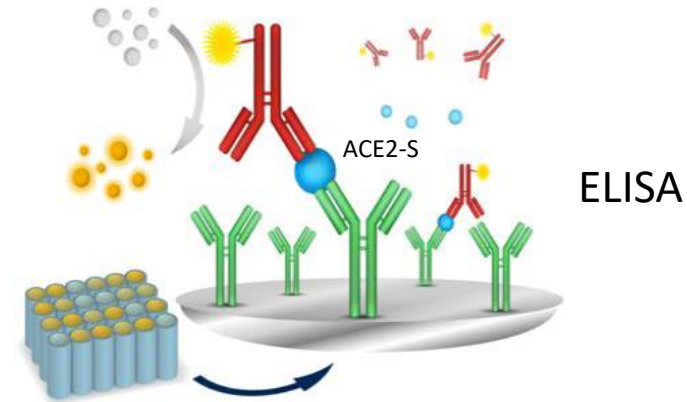


## Inhibiting SARS-CoV-2 entry through designed ACE2-mimetics

Parallel expression, purification and stability assays of ACE2 mimetic miniproteins



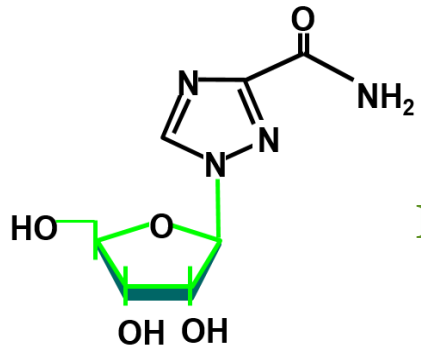
ACE2 mimetics – S RBD binding, competition and complex stability



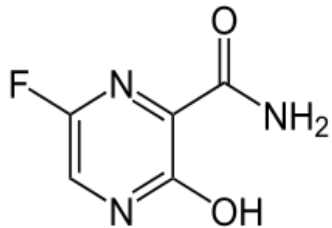
*Verdaguer et al. Nature Struct. Mol. Biol. 5:429, 2004*

*Ferrero et al. PLoS Pathogens 15:e1007656, 2019*

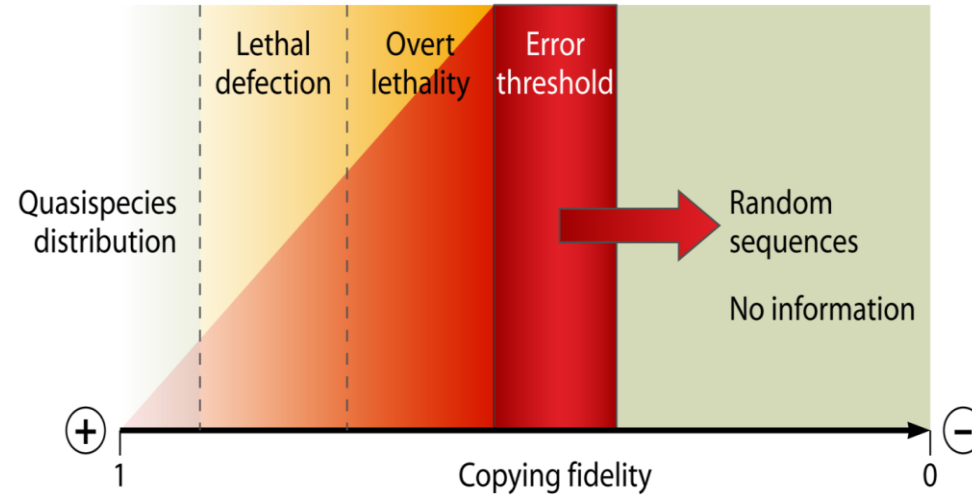
## Lethal mutagenesis is a broad-spectrum antiviral approach



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>

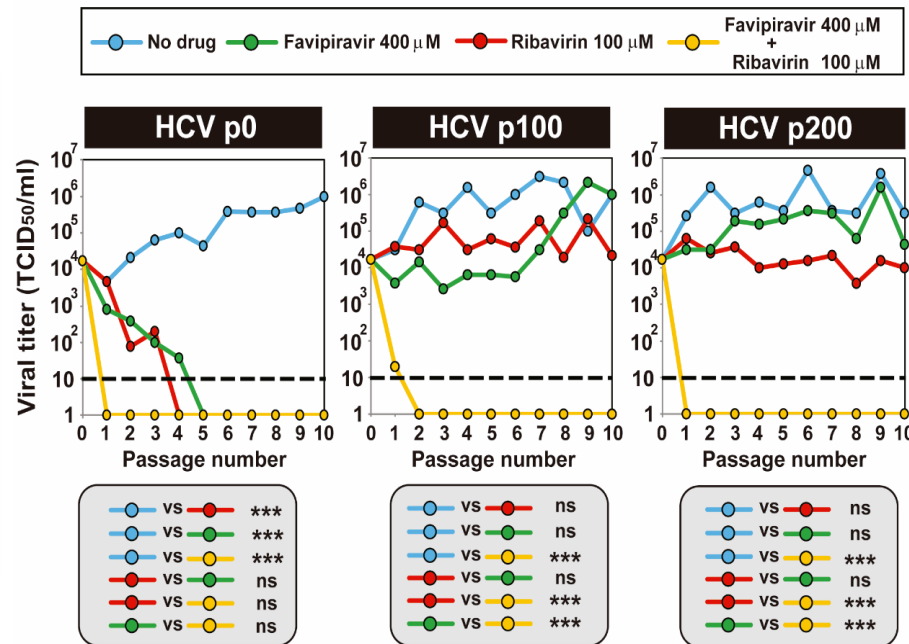
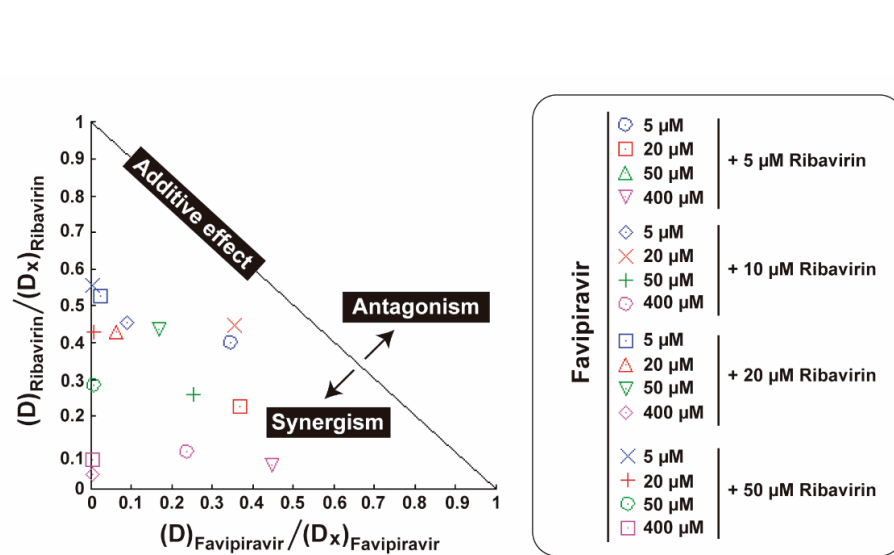
OPEN



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

Ashleigh Shannon<sup>1</sup>, Barbara Selisko<sup>1</sup>, Nhung-Thi-Tuyet Le<sup>1</sup>, Johanna Huchting<sup>2</sup>, Franck Touret<sup>3</sup>, Géraldine Piorkowski<sup>3</sup>, Véronique Fattorini<sup>1</sup>, François Ferron<sup>1</sup>, Etienne Decroly<sup>1</sup>, Chris Meier<sup>2</sup>, Bruno Coutard<sup>3</sup>, Olve Peersen<sup>4</sup> & Bruno Canard<sup>1</sup>

## 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,<sup>a,b</sup>  Celia Perales<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Interactions with the Environment, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Department 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. Mahillo)

Dra. Nuria Verdaguer

Dr. Esteban Domingo

