



Análisis filogenético de variantes circulantes de SARS-CoV-2 en la zona 7



UTPL
La Universidad Católica de Loja

INFORMACIÓN GENERAL

Título: Análisis filogenético de variantes circulantes de SARS-COV-2 en la Región Zonal 7, para comprender la variación a nivel local en el período agosto 2020 – febrero 2021

ÁREA: Biológica y Biomédica	DEPARTAMENTO: Ciencias de la Salud
GRUPO DE INVESTIGACIÓN AL QUE PERTENCE EL PROYECTO:	Enfermedades Crónicas no Transmisibles
SECCIÓN DEPARTAMENTAL: Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica	
LÍNEA ESTRATÉGICA: Ciencias Biomédicas	
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN: Salud pública y medicina familiar	
Fecha de Inicio: Agosto 2020	Fecha de Fin: Marzo 2021

DATOS DEL DIRECTOR DEL PROYECTO	
NOMBRES Y APELLIDOS: Paola Ximena Dalgo Aguilar	
IDENTIFICACIÓN: 1104736655	CORREO ELECTRÓNICO: pxdalgo@utpl.edu.ec

ÁREAS DE CONOCIMIENTO DE ACUERDO A ORGANISMOS NACIONALES E INTERNACIONALES		
SENESCYT		
Actividad Científica	Objetivo Socioeconómico	Área Temática de I+D
Ciencias médicas	Protección y mejora de la salud humana	Salud
OBJETIVOS DEL PLAN NACIONAL DEL BUEN VIVIR		
Mejorar la calidad de vida de la población		
UNESCO		
Área	Sub - área	
Salud y servicios sociales	72 Medicina	

TIPO DE PROYECTO:		
<input checked="" type="checkbox"/> INVESTIGACIÓN	<input type="checkbox"/> INNOVACIÓN	
TIPO DE INVESTIGACIÓN:		
Investigación Básica: <input checked="" type="checkbox"/>	Investigación Aplicada: <input type="checkbox"/>	Desarrollo Experimental: <input type="checkbox"/>

Resumen del proyecto

La pandemia por COVID-19 constituye una amenaza para la salud mundial, principalmente en países con precarios sistemas sanitarios. El nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, desde su aparición en diciembre 2019, se ha propagado por todo el mundo. El virus ha mostrado un alto nivel de transmisibilidad, agudizada por la capacidad de permanecer por largo período de tiempo en incubación, antes de causar sintomatología en el huésped. A pesar de que hoy en día la ciencia y la tecnología han permitido, en tiempo récord, conocer al patógeno que ha causado la pandemia, la información con respecto al virus sigue siendo limitada. La secuenciación de los genomas de los virus SARS-Cov-2 aislados de las personas diagnosticadas como infectadas por COVID-19, permite elaborar un registro de la evolución del virus, así como el conocimiento de su distribución y movimiento tanto espacial como temporal.

Una característica de los virus de ARN como SARS-CoV-2 es su capacidad de mutación, acumulando cambios en su genoma, por lo que registrar estos cambios es una herramienta epidemiológica muy útil, para mantener un seguimiento de la infección. Desde que se inició la pandemia; a nivel mundial los países están colocando las secuencias de los genomas de SARS-CoV-2, identificados en cada población, en bases de datos científicas (Gisaid, NCBI, PubMed) para uso en investigación. El conocimiento de las secuencias de las variantes circulantes tiene como objetivo principal, conocer mejor al patógeno que está causando la pandemia. Lo que hoy en día entendemos del SARS-CoV-2 ha sido inferido en virtud de la similitud y homología genética que presenta con SARS-CoV-1 y MERS, los patógenos más cercanos con los que guarda relación, presentado una similitud genética del 60% y 40% respectivamente. Claro está que cada microorganismo es distinto, por tanto, conocer mejor genética y estructuralmente al patógeno nos permitirá entender su dinámica de transmisión, infección y mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica.

Las investigaciones generadas con respecto a COVID-19 intentan atender distintas aristas y la que proponemos en el presente proyecto está enfocada en generar beneficios dirigidos a la población de la zona 7. La principal estrategia de control del virus es por medio de la vacunación, mecanismo que permite activar la respuesta inmune del hospedero, asegurando la ganancia de memoria inmunológica, siendo éste el efecto protector que se intenta lograr con las vacunas para SARS-CoV-2. Se conoce que existen aproximadamente 6 proyectos que se encuentran en fases II y III en el desarrollo de vacunas, liderados por los países de Reino Unido, Estados Unidos y China. En el Ecuador no contamos actualmente con un proyecto establecido en la producción masiva de vacunas dirigidas a nuestra población. Hay que comprender que el virus se está distribuyendo de forma acelerada por los distintos países y se encuentra con poblaciones genéticamente diferentes, por lo tanto, se observan mutaciones que le permitan adaptarse mejor a cada hospedador y que le asegure la supervivencia. No tenemos la certeza de que las vacunas que se están desarrollados en otros países generen un efecto protector en nuestra población. ¿Existe la posibilidad de que SARS-CoV-2 haya mutado de tal forma que las vacunas no puedan generar un efecto protector frente a las variantes distribuidas en nuestra población? Para determinar si una vacuna es o no eficiente para proteger a una población se deben evaluar múltiples factores. Uno de ellos tiene que ver con si la variante utilizada para desarrollar la vacuna es similar a la variante del virus que circula a nivel local. El conocimiento de las variantes circulantes del virus a través de la detección de los cambios o mutaciones en los genomas que circulan a nivel local permitirá determinar la posibilidad de que estos cambios interfieran con la eficacia de las vacunas comerciales, que con seguridad empezarán a salir al mercado para su distribución en distintos países. Constituye nuestra responsabilidad como personal de salud poder generar conocimiento dirigido a mitigar la pandemia que estamos atravesando. Sobre todo, asegurar la protección en salud de las personas de la zona 7, a través del monitoreo de los cambios que ocurren en el genoma del virus (mutaciones). Este monitoreo contribuirá para el mejor entendimiento de la epidemiología del virus y proveerá información que aporte para evaluar si las vacunas que se están desarrollando a nivel internacional podrían no generar protección contra las variantes que se encuentran circulando en nuestra población.

Introducción

En diciembre del 2019 fueron reportados los primeros casos de un brote de neumonía grave en Wuhan, China, cuyo agente causal posteriormente fue nombrado como SARS-CoV-2. En la actualidad representa una amenaza para la salud mundial, afectando aproximadamente a millones de personas y causando la muerte a cientos de miles. El agente causal de la enfermedad por coronavirus, denominado Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) pertenece a la familia de los coronavirus, estructuralmente está constituido por una hebra de ARN de sentido positivo, con una longitud de 26 a 32 kilobases. El SARS-CoV-2 tiene una alta transmisibilidad y puede tener un largo tiempo de incubación antes de manifestar síntomas como fiebre, tos, falta de aliento, diarrea y pérdida del olfato. La razón principal para la propagación del virus es la ausencia de síntomas durante los primeros días de la infección, lo cual favorece que las personas puedan transmitir el patógeno en ausencia de señales de la enfermedad. En Ecuador la propagación del nuevo coronavirus se reportó a finales del mes de febrero mostrando una capacidad infectiva elevada. A nivel global, los científicos han unido esfuerzos en una tarea monumental para descubrir cómo está mutando el virus causante de COVID-19. En enero, investigadores de China divulgaron la primera secuencia del genoma del virus. Desde entonces y hasta la fecha, más de 32 mil genomas del SARS-CoV-2, han sido secuenciados por investigadores en diferentes países, y las secuencias se han depositado en plataformas científicas (GISAID, PubMed, NCBI) disponibles para quienes quieran hacer uso de ellas en investigación. Hasta el momento se han detectado al menos 200 mutaciones en regiones codificantes de los transcritos del virus, existiendo la posibilidad de que estas mutaciones confieran al virus mayores características de patogenicidad o agresividad. Según la información que se dispone, en el Ecuador estarían circulando las cepas A1b/131K y la A2/re5. Es necesario indicar que los pacientes que llegaron a Ecuador provienen de al menos cuatro lugares: Bélgica, Italia, España y Holanda, y se conoce que en estos sitios existen cepas diversas entre sí, por lo que es inminente la existencia de algunas variantes circulando en el país. La secuenciación de los genomas de los virus SARS-Cov-2 que se van aislando de las personas diagnosticadas como infectadas, permite elaborar un registro de cómo va evolucionando el virus. Si las mutaciones del virus en algún sitio del planeta tienen grandes similitudes con las de genomas obtenidos con anterioridad en otra parte del mundo, esas semejanzas pueden indicar tras un complejo análisis estadístico que el virus "viajó" de un país a otro, así como identificar "cuándo".

Parece que las mutaciones modifican el comportamiento del virus y algunos autores recomiendan "mantener una vigilancia de su evolución, sobre todo ahora que se busca una vacuna que sea efectiva". Existe la posibilidad que las mutaciones confieran mayor infectividad y evidencia clínica que se asocia con mayores cargas virales. El papel de una vacuna es provocar que el cuerpo desarrolle anticuerpos que neutralicen el virus al unirse a él de una forma muy específica y ese es el evento que están analizando los científicos: cómo las mutaciones pueden afectar a esa interacción. En el caso en el que las mutaciones no provoquen cambios en la interacción entre los anticuerpos y el virus, hay esperanza en que la vacuna no tenga que ser actualizada constantemente, con lo que no sería necesario la creación de una vacuna universal para todas las variantes. Los anticuerpos producidos por nuestro cuerpo como respuesta a una infección o provocados por la vacuna se unen a puntos específicos del virus llamado antígeno. Si las mutaciones aleatorias del virus alteran la forma de un antígeno, puede hacer que una vacuna sea menos efectiva contra el virus y se conviertan en diferentes cepas o variantes, como es el caso de la gripe o influenza. Los antígenos del virus mutan tanto que evolucionan a cepas diferentes y cada una requiere una vacuna ligeramente diferente para ser efectiva. Si esto sucede en el caso del coronavirus, los científicos tendrán que ser capaces de producir y administrar tantas nuevas vacunas como cepas surjan.

La ejecución de este proyecto, abre las puertas para continuar con investigación dirigida a mitigar la emergencia sanitaria, el conocimiento de las secuencias y las mutaciones ocurridas en las variantes circulantes en la zona, además de proporcionar información sobre la efectividad de las vacunas, permitirán continuar con estudios en donde se pueda

averiguar si hay una correlación entre parámetros clínicos con ciertas mutaciones, tratar de entender el efecto que las mutaciones del virus pueden tener sobre la enfermedad en sí. Con los datos de variantes poblacionales, se puede plantear que al existir una distribución geográfica y poblacional particular y diversa, los individuos tendrían diferentes marcadores genéticos de susceptibilidad o resistencia al Covid-19, fenómeno reportado para muchos otros virus (dengue, herpes, VIH, sarampión, etc.). El proyecto busca contribuir a la comprensión de la enfermedad a través de un mejor conocimiento del patógeno, información que pretende direccionar a una mejor toma de decisiones con respecto a la prevención, evolución y terapia del paciente, así como un control del patógeno en el transcurso de la pandemia.

Objetivo general

- Caracterizar molecularmente las variantes de SARS-CoV-2 que circulan en la población de la zona 7.

Específicos:

- Analizar el genoma de las variantes de SARS-CoV-2 que circulan en la población de la zona 7.
- Aportar con las secuencias genómicas obtenidas a bases de datos de acceso abierto, para que estén a servicio de la comunidad científica nacional e internacional.
- Informar a los principales organismos de salud de la zona 7, así como a la comunidad científica sobre la variabilidad genética de las cepas circulantes en la población analizada, que podría influir en la efectividad de las vacunas en desarrollo

Muestreo

La estrategia de muestreo en el contexto de un análisis de epidemiología genética debe priorizar la cobertura espacial y temporal de las muestras. Esto significa que, para obtener suficiente señal sobre la dinámica de transmisión a partir de las secuencias genéticas, es importante incluir secuencias de pacientes que abarquen todo el periodo de la duración de una epidemia, y representando todas las zonas geográficas afectadas 12 . En virtud de ello el presente proyecto constituye a un análisis descriptivo transversal que busca contribuir con información de la zona 7 del Ecuador. El universo comprende un total de 50 muestras para el análisis filogenético. El proyecto se realizará bajo la colaboración de dos IES: Universidad San Francisco de Quito y Universidad Técnica Particular de Loja, y una institución de salud pública: la Dirección distrital de la zona 7 del MSP. Los criterios de inclusión son: Aceptación voluntaria de participación en el proyecto, y resultado positivo de SARS-CoV-2 por PCR tiempo real. Criterios de exclusión: No aceptación voluntaria de participación en el proyecto, y resultado negativo de SARS-CoV-2 por PCR tiempo real.

Las muestras biológicas que se requieren para el proyecto corresponden a un hisopado nasofaríngeo, obtenido con un hisopo estéril que posteriormente será embebido en inactivado, para conservar los ácidos nucleicos de la muestra, a la vez que disminuye el potencial infeccioso de la misma. Las muestras serán tomadas a los pacientes (participantes del estudio) que acudan a los centros de salud de la zona 7 y que, por su sintomatología, se les tome una muestra para diagnosticar COVID-19 por PCR tiempo real, a estos mismos pacientes previo a la firma de consentimiento informado se les tomará un hisopado adicional para el presente proyecto.

El proceso de toma de muestra se desarrollará en aproximadamente 10 minutos por participante. Los hisopos inactivados serán almacenados en refrigeración (4 a 8 grados centígrados) dentro de los centros de salud. Luego de la confirmación de la positividad de la muestra para COVID-19, serán enviadas al laboratorio de la UTPL a través del Courier de la Universidad, etiquetadas y embaladas con triple empaque, junto con los consentimientos informados firmados por los pacientes (Anexo D). Adicional a la muestra biológica será necesario obtener información de los pacientes referente a su historia clínica: Información que será obtenida en el momento de la toma de muestra, por el

personal del MSP (es necesario indicar que el personal del MSP encargado de coordinar y realizar la toma de muestra no será remunerado).

Procesamiento de las muestras

Una vez en el laboratorio de la UTPL las muestras serán custodiadas por el personal UTPL y su procesamiento estará bajo su responsabilidad. En esta entidad se realizarán los siguientes procesos:

- **Extracción de ARN:** El ARN viral será extraído de las muestras, a través de un kit de comercial, para el efecto se utilizará el hisopo obtenido de los pacientes. Una vez extraído el ARN se eliminará el hisopo considerando las recomendaciones para la eliminación de muestras potencialmente infecciosas establecidas por la OMS.
- **Síntesis de cDNA:** Con el ARN obtenido se sintetizará el cDNA (usando protocolo del Public Health England) para obtener una muestra más estable para la secuenciación, para el efecto se utilizará una transcriptasa inversa que permita realizar el proceso.
- **Cuantificación:** Para conocer la cantidad y calidad de ARN se realizará la cuantificación del ácido nucleico a través del espectrofotómetro nanodrop 2000. Aquellas muestras que cumplan con los criterios de pureza y calidad suficiente, serán etiquetadas y embaladas en triple empaque y enviadas a través del Courier de la UTPL a la USFQ, quienes a partir de este momento serán los custodios de las muestras.
- **Secuenciación:** El proceso de secuenciación se desarrollará en la USFQ, a través del proceso Multiplex PCR usando primers dirigidos a todo el genoma del SARS-CoV-2. Posteriormente se realizará la preparación de la librería para el secuenciamiento de nueva generación usando plataforma: Oxford Nanopore, equipo MinION. -Análisis Bioinformáticos de las secuencias obtenidas: donde se realizará:
 - Control de calidad de las secuencias
 - Filtración para eliminar primers y adaptadores
 - Demultiplex de secuencias crudas
 - Mapeo de las secuencias de cada muestra con el genoma de referencia de Wuhan-Hu-1 (GenBank accession number MN908947) para obtener la Secuencia consenso.
 - Alineamiento con genomas de Base de Datos GISAID.
 - Generar un árbol filogenético con los genomas obtenido

Procesamiento de los desechos

Una vez procesadas las muestras, éstas serán eliminadas ya que el estudio no contempla el almacenamiento de ninguna muestra para futuras investigaciones. El proceso de eliminación de las muestras se realizará según lo establecido por la OMS para el manejo de desechos biológicos infecciosos proveniente de los niveles 2 y 3. Se aplicarán procesos de desinfección a través de auto clavado como tratamiento de las muestras y materiales infecciosos dentro de los laboratorios de las IES, para posteriormente transportarlo a su destino final GAD Municipal, quienes gestionarán la eliminación de las muestras con tratamientos de incineración como lo tienen establecido como competencias dentro de los GADs.

Difusión de los resultados

Los resultados obtenidos de esta investigación serán difundidos en artículos científicos, esta información contribuirá para conocer mejor la distribución del virus y las mutaciones que puedan generar variantes circulantes de SARS-CoV- 2 en el Ecuador.

Para mantener informada a la población sobre los hallazgos de este estudio, interpretaremos nuestros resultados y elaboraremos boletines informativos con información relevante para la población. De esta manera, mantendremos a la población enterada de los hallazgos encontrados, la información final será puesta a consideración de la distrital de salud de la zona 7, para contribuir a la toma de decisiones con respecto al uso de las vacunas en desarrollo.

Es importante considerar que actualmente, la única información relevante para los pacientes y médicos tratantes es el conocer el resultado de la prueba de diagnóstico PCR para SARS- CoV-2. Con este resultado los médicos toman decisiones que benefician al paciente. Los resultados de este estudio tienen que ver con detalles en el genoma del virus que todavía no han sido relacionados a severidad de infección y deben ser interpretados a nivel poblacional y no individual. Debido a la complejidad de estos resultados y a que no proveen información relevante para el tratamiento de los pacientes, los resultados obtenidos de la secuenciación no serán entregados a los participantes.

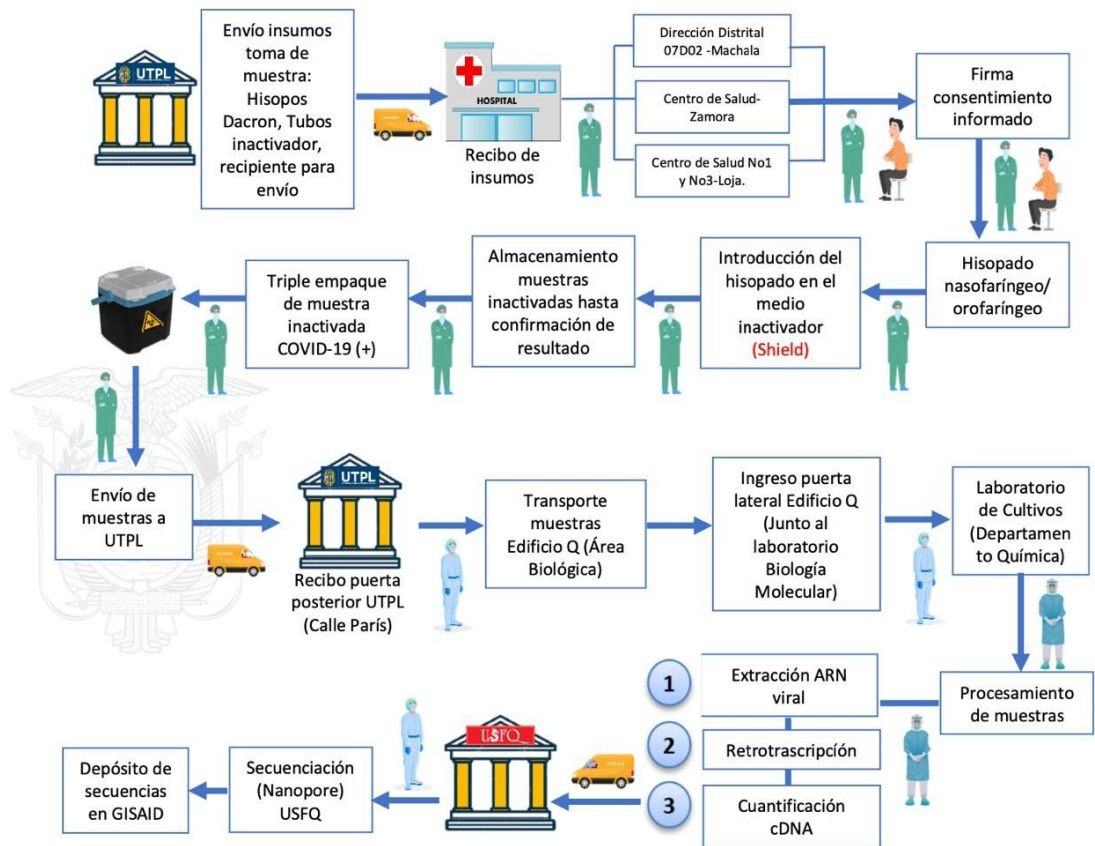
Resultados por objetivos











- Genomas de variantes de SARS-CoV2, que se encuentran circulando en población de la zona 7.
- Alineamiento de secuencias en base de datos científica (GISAID).
- Informe de las variantes de SARS-CoV2 circulantes y su correlación con las vacunas en desarrollo.

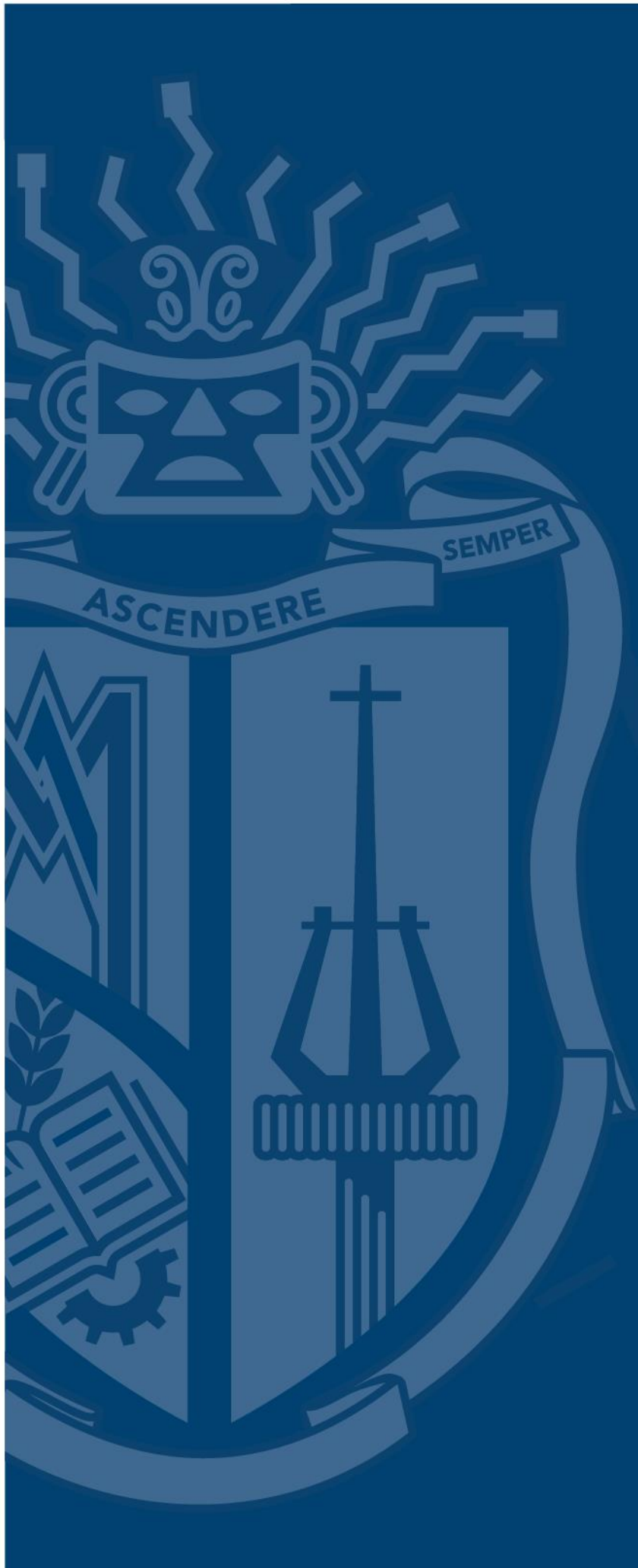
Cronograma de actividades

Actividades principales	Fecha inicio	Fecha de fin
Objetivo general	agosto 2020	diciembre 2020
Recolección de muestras	agosto 2020	octubre 2020
Análisis Filogenéticos	octubre 2020	diciembre 2020
Objetivo Específico 1	noviembre 2020	enero 2021
Objetivo Específico 2	febrero 2021	marzo 2021

Flujo de manejo de muestra



Simbología	Cargo
	Médico/responsable de laboratorio MSP
	Equipo procesamiento UTPL
	Equipo procesamiento UTPL
	Paciente
	Universidad Técnica Particular de Loja
	Universidad San Francisco de Quito
	Centro de Salud
	Empaque para envío
	Medio de Transporte
	Etapas del procesamiento



UTPL
La Universidad Católica de Loja