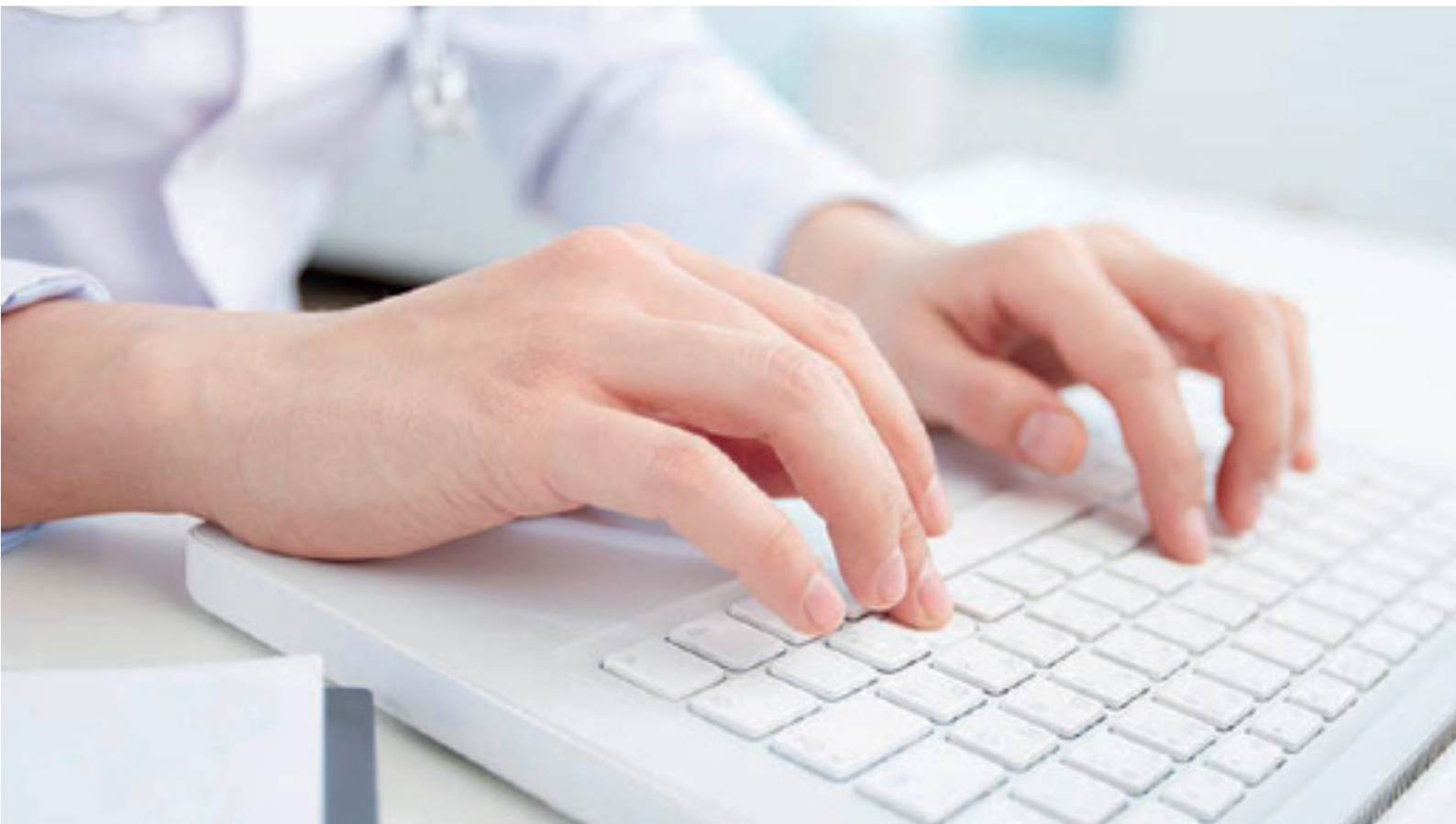


INFORME N° 2

ASPECTOS BIOMEDICOS BÁSICOS





Grupo: ASPECTOS BIOMÉDICOS BÁSICOS – INFORME 2

Fecha: 15 de mayo de 2020

Participantes: Lucía Alonso, Juan Arbiza, Rodney Colina, María Hortal, Eduardo Mizraji, Otto Pritsch, Enrique Barrios.

Solicitud de los Coordinadores del G.A.C.H.

“A continuación, les indicamos los temas a trabajar en los próximos días sin perjuicio de que realicen otras propuestas que así consideren.

- 1) Informe sobre proyecto de Batthyany
- 2) Informe sobre pooleo
- 3) Informe sobre importancia de la secuenciación”

1. “Monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales como estimador de incidencia poblacional de COVID-19”.

En relación a la solicitud realizada al grupo de tomar posición técnica en relación al proyecto denominado “Monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales como estimador de incidencia poblacional de COVID-19” corresponde informar que:

- Fue opinión de la totalidad del grupo que este tipo de iniciativas son de interés en forma general y que su aplicación puede aportar insumos de valor en el manejo de este y otros eventos. No existe aún evidencia a nivel internacional sobre el impacto de este tipo de investigaciones en el control del evento, siendo aún muy precoz su aplicación específicamente para SARS-CoV-2, si bien existen estudios de este tipo que están siendo desarrollados en otros países de la región (y del mundo).

- Sin perjuicio de ello, se entiende crítico contar con los resultados de la primera fase del estudio propuesto para tener mayores insumos para el análisis de la propuesta en forma global. Ello se sustenta en el hecho de que este paso es crítico y de gran complejidad técnica.



- Existe también consenso en que, en caso de progresar hacia las fases siguientes del proyecto, es relevante brindarle un “anclaje” a la estructura nacional de respuesta, de modo que la evidencia producida en el marco de esta investigación pueda lograr un impacto concreto en el control del evento.
- El grupo desea expresar, asimismo, que esta, al igual que otras iniciativas semejantes debieran analizarse en forma global e intentar contar con un marco de priorización en relación a la investigación aplicada sobre pruebas diagnósticas para la detección de SARS-CoV-2 con fines de salud pública.

Nota: Artículos recientes (ver más abajo las referencias) demuestran que el monitoreo ambiental a partir de aguas residuales del SARS-CoV-2 tiene carácter predictivo y puede ser utilizado como una poderosa herramienta de análisis que “complementa” al testeo individual poblacional y que incluso puede llegar a ser indicativo de “en donde realizar testeos”. A continuación, se referencian y comentan brevemente a esos artículos.

Referencias y breves comentarios en relación a la Nota previa.

- Ahmed et al, 2020 Sci Total Environ. 2020 Apr 18;728:138764

Estudio agua residual en Australia: Indican que el monitoreo de las aguas residuales tiene un potencial enorme para ofrecer señales tempranas de advertencia con respecto a cuan amplia está la circulación comunitaria del SARS-CoV-2, especialmente en aquellos individuos asintomáticos o con síntomas leves. La carga viral estimada en las aguas residuales fue usada para estimar el número de individuos infectados en el área de influencia del saneamiento por medio de una simulación vía Monte Carlo.

- Mallapaty, Nature, 580(7802):176-177, 202

El monitoreo de los influents de una PTAR podría ofrecer una mejor estimativa de la dispersión del coronavirus que el testeo, ya que la vigilancia de las aguas residuales informa también sobre los no testeados (como asintomáticos) (Medema, Holanda). De Roda Husman detectó el coronavirus en las aguas residuales de un aeropuerto en Holanda cuatro días antes de que ese país confirme el primer caso de COVID-19. También detectaron el virus en la ciudad de Amersfoort antes que las infecciones fueran reportadas en la comunidad.



- Medema et al, 2020, MedRxiv, Holanda

Detectaron coronavirus en una PTAR de Amersfoort cuando todavía no había ningún caso reportado en dicha ciudad, que sugiere que la circulación en la población se da antes que el reporte de los casos de COVID-19 por medio del sistema de vigilancia de la salud.

- Wurtzer et al, 2020, MedRxiv, Francia

Compararon el nivel de detección del virus en aguas residuales y el número de muertos por COVID-19 en París y confirmaron que un aumento en la carga viral en las aguas residuales se acompaña de un aumento en el número de casos fatales de esa región.

- Ahmed et al, Sci Total Environ. 2020 Apr 18;728:138764

Estudio agua residual en Australia indican que el monitoreo de las aguas residuales tiene un potencial enorme para ofrecer señales tempranas de advertencia con respecto a cuan amplia está la circulación comunitaria del SARS-CoV-2, especialmente en aquellos individuos asintomáticos o con síntomas leves.

2. Estrategia de “Pooling” a partir de muestras de hisopados nasales y nasofaríngeos para la detección de SARS-CoV-2 mediante técnicas de biología molecular (RT-QPCR).

Desde el comienzo de la pandemia uno de los objetivos para su adecuado manejo ha sido el desarrollo de métodos diagnósticos altamente sensibles, específicos y rápidos que garanticen un resultado preciso que será determinante en la toma de decisiones. Varios kits diagnósticos validados por los distintos organismos nacionales e internacionales han demostrado que los métodos basados en la detección del genoma viral (RT-QPCR) son lo suficientemente robustos para dicho fin y de hecho son los que se utilizan a nivel global.

Debido la elevada demanda existente para realizar testeos masivos a nivel poblacional varios trabajos recientemente publicados demuestran que realizar pools de muestras de hisopados nasofaríngeos y nasales puede ser una estrategia recomendable, de acuerdo a la realidad epidemiológica de cada país.



Recomendación: De acuerdo a distintos trabajos científicos recientemente publicados (ver anexo) es recomendable realizar pools de hisopados nasales y nasofaríngeos de entre 5 y 10 muestras como máximo. Dichos pools deben ser realizados a partir de volúmenes iguales de cada muestra de hisopado para luego mezclarlas y comenzar con la extracción del ARN viral. Debido a que no existe un protocolo validado aún, es recomendable que se realicen testeos de validación en aquellos laboratorios que lo vayan a utilizar ya que no todos los laboratorios utilizan exactamente los mismos sistemas diagnósticos y puede haber variaciones en las sensibilidades y especificidades de las técnicas.

Riesgos: Es importante destacar que la viremia en personas asintomáticas es bastante menor que aquellas sintomáticas y mucho más aún que aquellas que presentan un estado de salud crítico. Debido a ello no es recomendable realizar pools con un número muy elevado de muestras ya que es posible que puedan existir resultados falsos negativos producto de la dilución de la muestra original, en particular en pacientes asintomáticos.

Referencias:

1- Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample Pooling as a Strategy to Detect Community Transmission of SARS-CoV-2. JAMA. 2020; Apr 6. doi: 10.1001/jama.2020.5445

2- Aktuelles aus der Goethe-Uni. Pool Pool testing of SARS-CoV-02 samples increases worldwide test capacities many times over. <https://aktuelles.unifrankfurt.de/englisch/pool-testing-of-sars-cov-02-samples>.

3- Yelin I, Aharony N, Shaer-Tamar E, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools. medRxiv preprint. 2020; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20039438>.

4-Torres I, Albert E, Navarro D. Pooling of Nasopharyngeal Swab Specimens for SARS-CoV-2 detection by RT-PCR [published online ahead of print, 2020 May 5]. J Med Virol. 2020;10.1002/jmv.25971. doi:10.1002/jmv.25971.



3. Secuenciación del SARS CoV-2

-SECUENCIACION DE SARS CoV-2 EN URUGUAY

Se ha establecido un consorcio para atender de forma conjunta y potenciar las acciones que se lleven a cabo en relación a la secuenciación de SARS CoV-2 en el país, integrada con un representante de cada una de las siguientes instituciones: UdelaR, IP, IIBCE e INIA. Recientemente se ha implementado un llamado para presentar proyectos relacionados con secuenciación con los fondos de donaciones recibidos.

La idea es que las secuencias que se generen sean depositadas en un repositorio nacional. A su vez los grupos que las generan las depositen en bancos internacionales de secuencias y hagan sus respectivas comunicaciones científicas. Al momento de contar con un importante número de secuencias nacionales se podrá hacer un estudio multidisciplinario que incluya de forma relevante especialistas en bioinformática.

Hasta el momento se están utilizando dos estrategias de obtención de secuencias: a) una es llevada a cabo entre los Laboratorios de Genómica Microbiana del Instituto Pasteur y Virología molecular de la Facultad de Ciencias ([Estrategia 1](#)) y b) entre las Secciones Genética evolutiva y Virología de la Facultad de Ciencias ([Estrategia 2](#)).

Algunos beneficios de tener capacidad para secuenciar y disponer de secuencias:

- 1) Poder conocer el origen geográfico y temporal de la epidemia en nuestro país.
- 2) Evidenciar la generación de mutaciones para evaluar su impacto en la severidad de la enfermedad.
- 3) Hacer seguimiento de la evolución de las cuasiespecies virales en un determinado paciente.
- 4) Estar preparados para cuando se generen vacunas o drogas a fin de evaluar la susceptibilidad



o resistencia según los virus circulantes que tengamos.

5) Poder evidenciar utilizando la [Estrategia 2](#) coinfecciones con otros agentes, que tiene importante uso en la clínica como diagnóstico diferencial para descartar la presencia de SARS CoV-2 o como posible factor de sinergia para aumentar la gravedad de la enfermedad ante la presencia de SARS CoV-2 y otros agentes respiratorios.

Estrategias 1. Tecnología de secuenciación protocolo Artic Network/ Oxford Nanopore

Para esta tecnología se utiliza un protocolo diseñado por ARTIC disponible desde el mes de enero (1). Este protocolo ha sido rápidamente adoptado por varios laboratorios de diferentes países en el mundo dando como resultado el depósito en GISAID de genomas casi completos. Esta tecnología parte del ARN extraído de una muestra clínica positiva por qPCR y realiza un paso de multiplex-PCR que permite la amplificación de genomas de SARSCOV-2. Debido a este paso de amplificación previo a la secuenciación masiva se pueden obtener secuencias del genoma del virus a partir de muestras con Ct (ciclo umbral) alto (hasta 35) (1).

Se han realizado hasta la fecha tres sets de cebadores diferentes con el objetivo de mejorar la eficiencia de la multiplex-PCR en la cual se utilizan 219 cebadores. En una primera instancia, el set de cebadores V1 ha presentado dificultades en la amplificación de algunos fragmentos del genoma, y han desarrollado nuevos protocolos (V2 y V3) que tratan de mejorar la cobertura en amplicones problemáticos mediante la adición de cebadores alternativos. En la medida que la diversidad genética de SARSCOV-2 aumente con el paso del tiempo estos protocolos van a necesitar más cambios que le permitan amplificar todas las nuevas variantes del virus. Asimismo, se encuentran desarrollando estrategias que le permitan amplificar las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', ya que este protocolo no permite la amplificación de estas regiones (1).

Los beneficios de la secuenciación con Nanopore (secuenciación de tercera generación) radican principalmente en que es una tecnología portátil y proporciona datos de secuencia en tiempo real (se requiere 1 hora de tiempo de secuenciación cuando se usan MinION Flow Cells). Si bien la tecnología Nanopore proporciona una gran longitud de lectura (decenas de miles de bases por lectura), se ha adoptado con precaución debido a sus altas tasas de error (2). Si bien las



secuencias de consenso de Nanopore con corrección de errores pueden ser lo suficientemente precisas para muchos usos, la precisión de lectura sigue siendo una preocupación si se va a utilizar para la evaluación de la diversidad dentro de la muestra (3), por ejemplo para la identificación de cuasiespecies virales.

Estrategia 2. Tecnología de secuenciación Viroma/Illumina

En el abordaje virómico no se utiliza como paso previo la amplificación por PCR con cebadores específicos sino que se realiza una etapa de enriquecimiento de partículas virales contenidas en la muestra clínica y tras la extracción de ARN se utiliza cebadores aleatorios para la síntesis de cDNA. La metagenómica es un método de secuenciación imparcial y universal, ya que no requiere conocimiento previo de la secuencia viral y posee un gran potencial para el descubrimiento, identificación y caracterización genética de microorganismos diversos tanto en muestras biológicas como ambientales (4). Claramente brinda grandes oportunidades de aplicación en salud pública y en virología clínica, por ejemplo cuando infecciones virales heterogéneas comparten similares presentaciones clínicas (5).

La plataforma Illumina (secuenciación de segunda generación), se caracteriza por su corta longitud de lectura (50-300 nt) lo que le brinda una mayor precisión de lectura y una menor tasa de error (6). Los desafíos de esta técnica surgieron con la dificultad en el ensamblado de novo de los cortos fragmentos secuenciados para obtener genomas completos de gran tamaño, incluso la dificultad de analizar con precisión las regiones repetitivas en un genoma. Sin embargo, gracias al pequeño tamaño del genoma de los virus es posible obtener una alta cobertura de secuenciación lo que facilita el ensamblaje de novo, aunque también esto puede realizarse utilizando una base de datos de referencia (4).

Referencias

1. <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-bbmuik6w>
2. Lu, H., Giordano, F. & Ning, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly.



Genomics Proteomics Bioinformatics 14, 265–279 (2016).

3. McNaughton A.L., Roberts H.E., Bonsall D., de Cesare M., Mokaya J., Lumley S.F. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV) Sci Rep. (2019)

4. Nooij, S., Schmitz, D., Vennema, H., Kroneman, A., Koopmans, M.P.G. Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. Front. Microbiol. 9, 749 (2018).

5. Kiselev, D., Matsvay, A., Abramov, I., et al. Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology. doi:10.3390/v12020211 (2020).

6. Greig, D.R., Jenkins, C., Gharbia, S., and Dallman, T.J. Comparison of single-nucleotide variants identified by Illumina and Oxford Nanopore technologies in the context of a potential outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli. GigaScience, 8, 1–12 (2019).

4. Propuestas sobre temas que consideramos relevantes a abordar por el grupo:

- El grupo desea dejar expresa voluntad de abordar aspectos más genéricos en relación al testeo, tales como: potenciales estrategias, pertinencia y “timing” del uso de pruebas serológicas (por ej. para la realización de pruebas serológicas), criterios para la recomendación de testeos “masivos”, evaluación de la performance analítica y clínica de las pruebas aplicadas en el país, entre otros.

- Planes de contingencia en caso que surjan brotes severos de Covid-19.