



**Análisis genómico de secuencias del virus SARS-CoV-2 de casos costarricenses,
marzo - julio 2020.**

Dr. Francisco Duarte-Martínez
Centro Nacional de Referencia de Inocuidad Microbiológica de Alimentos
Laboratorios de genómica y biología molecular

Cita sugerida: Duarte-Martínez Francisco^{1*} y Molina-Mora José Arturo^{2**}, Cordero-Laurent Estela¹, Godínez-Rojas Adriana¹, Calderón-Osorno Melany¹, Corrales-Aguilar Eugenia², Brenes-Porras Hebleen¹, Soto-Garita Claudio¹, et al. 2020. **Análisis genómico de secuencias del virus SARS-CoV-2 de casos costarricenses.** Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa) y Universidad de Costa Rica (UCR), Costa Rica.

¹ Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa), Tres Ríos.

² Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José.

* fduarte@inciensa.sa.cr** jose.molinamora@ucr.ac.cr,

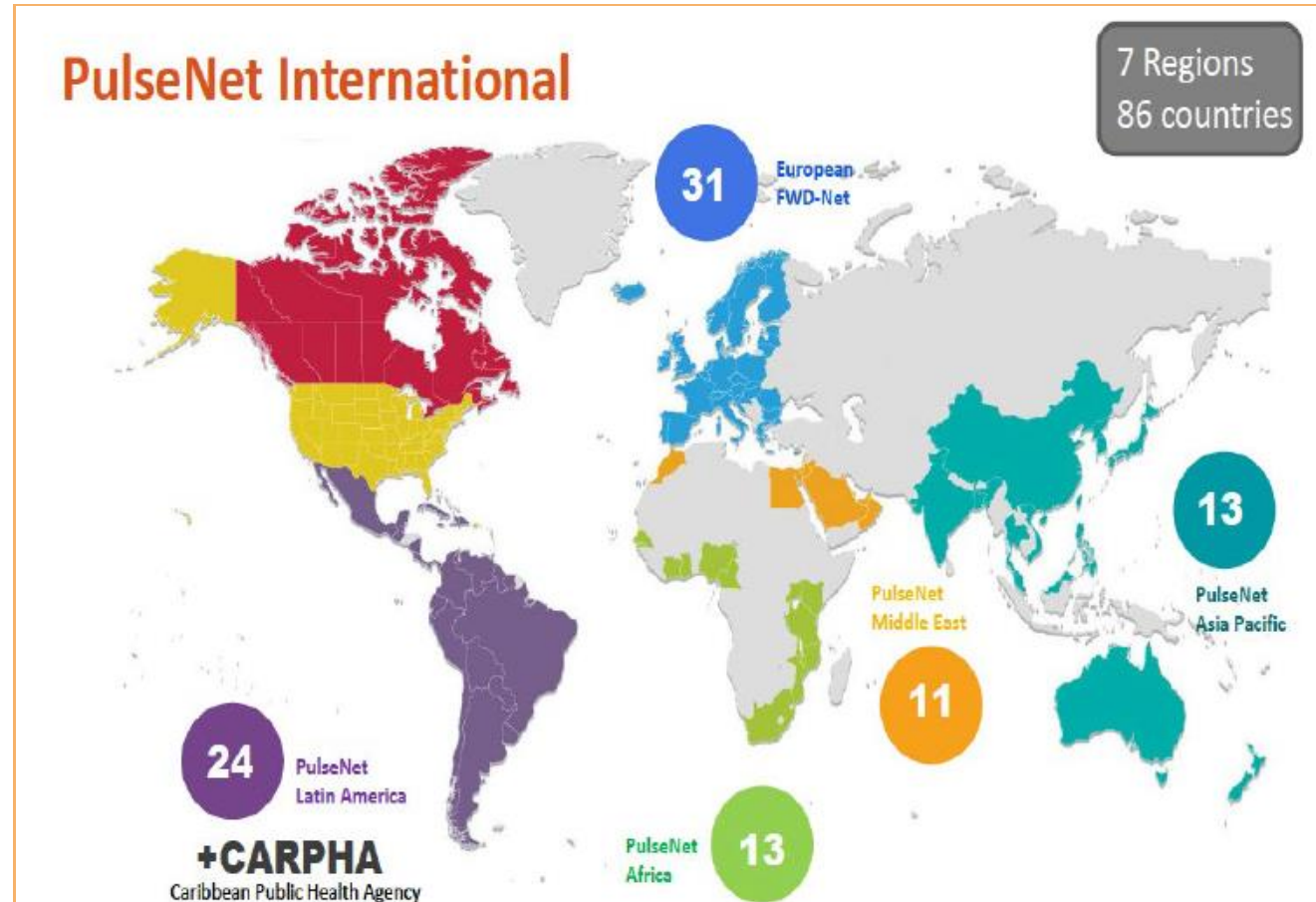


PulseNet Internacional

- 1996, CDC → Red nacional de subtipificación molecular para la vigilancia de las ETA
- PFGE y WGS determinar relación genética entre los patógenos
- Identificar, relacionar casos de enfermedad, determinar, monitorear y controlar brotes de ETA causados por diversos patógenos de transmisión alimentaria

Metodologías estandarizadas

Resultados intercomparables

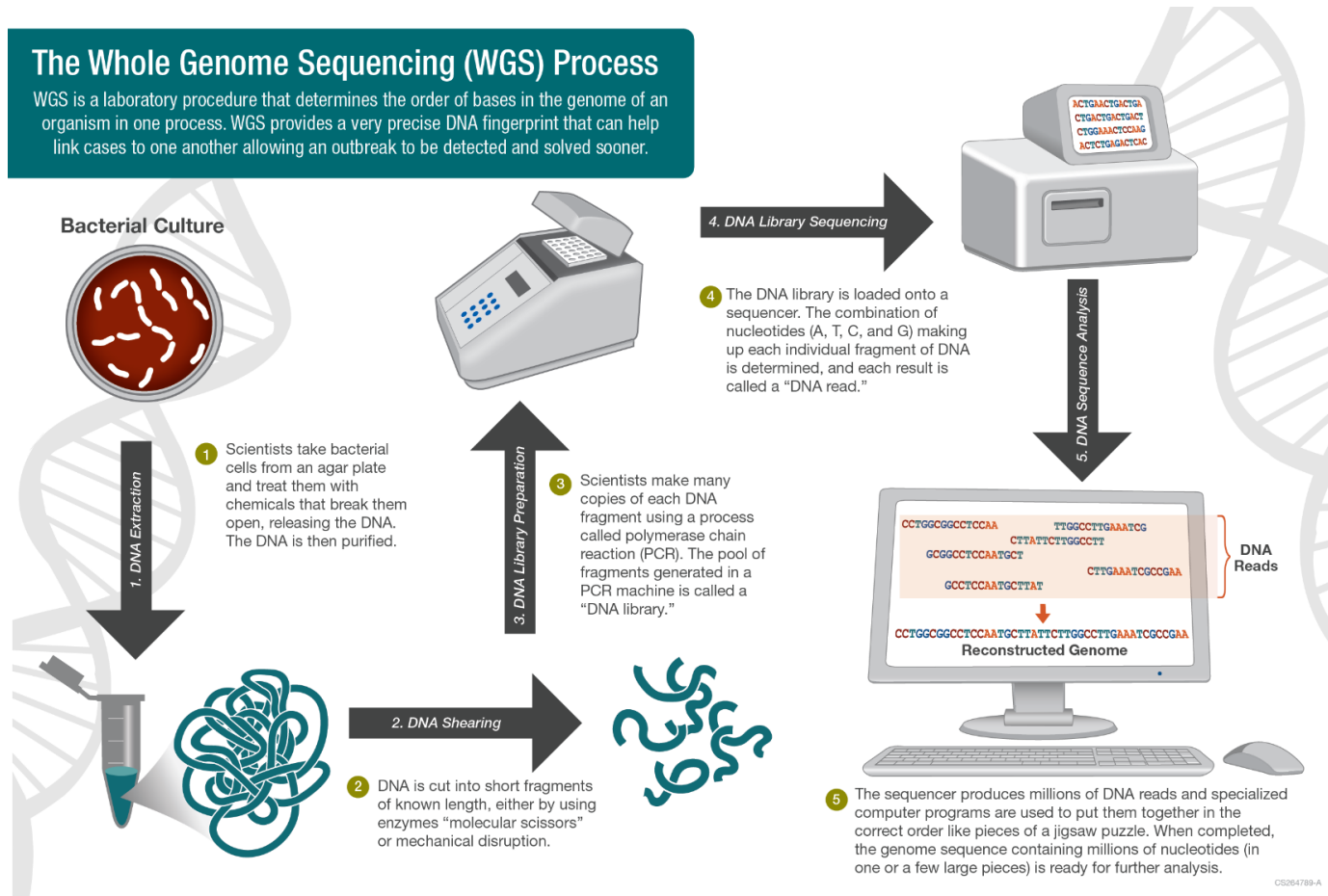




Protocols: Producing whole genome sequencing data

The Whole Genome Sequencing (WGS) Process

WGS is a laboratory procedure that determines the order of bases in the genome of an organism in one process. WGS provides a very precise DNA fingerprint that can help link cases to one another allowing an outbreak to be detected and solved sooner.





Materiales y métodos

70 casos - marzo y julio (SE 10-15 y SE 23-27).

4 años hasta los 89 años (46 masc y 24 fem).

Al menos una muestra de cada provincia y se incluyeron cuatro defunciones.

El procesamiento de las muestras

Inciensa: 52 muestras (CRC-001 a CRC-006 y CRC-025 a CRC-070) y

la UCR-FMic & Instituto Virología Charité (Berlín): 18 muestras (muestras CRC-007 a CRC-024).

Se realizó un análisis descriptivo de las variables epidemiológicas (boletas de solicitud)

Desarrollo de un protocolo bioinformático y de inteligencia artificial para el apoyo de la vigilancia epidemiológica (Inciensa-CIET,UCR)



Genoma viral - ARN



RT-PCR

ADNc



PCR anidada

ADN

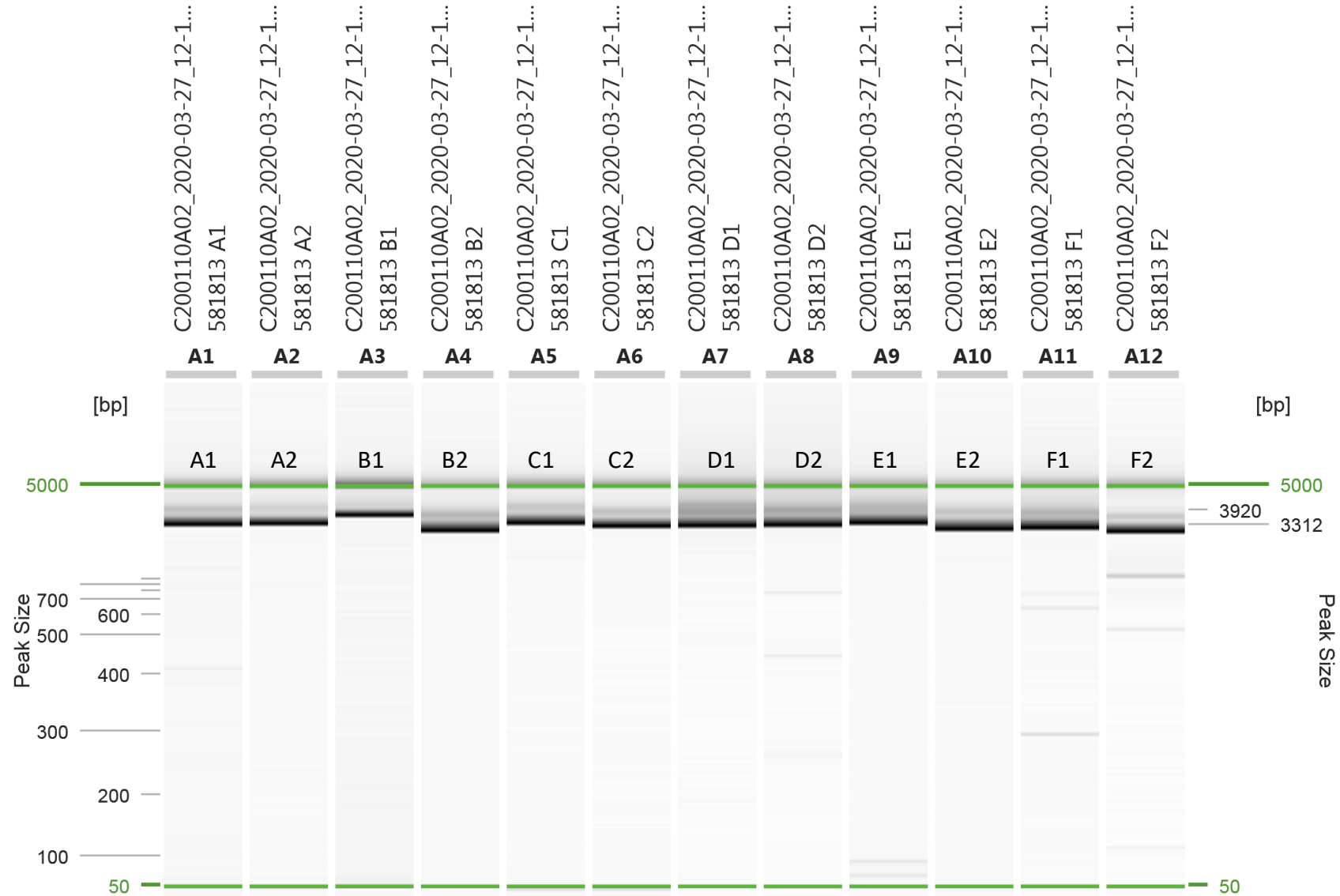


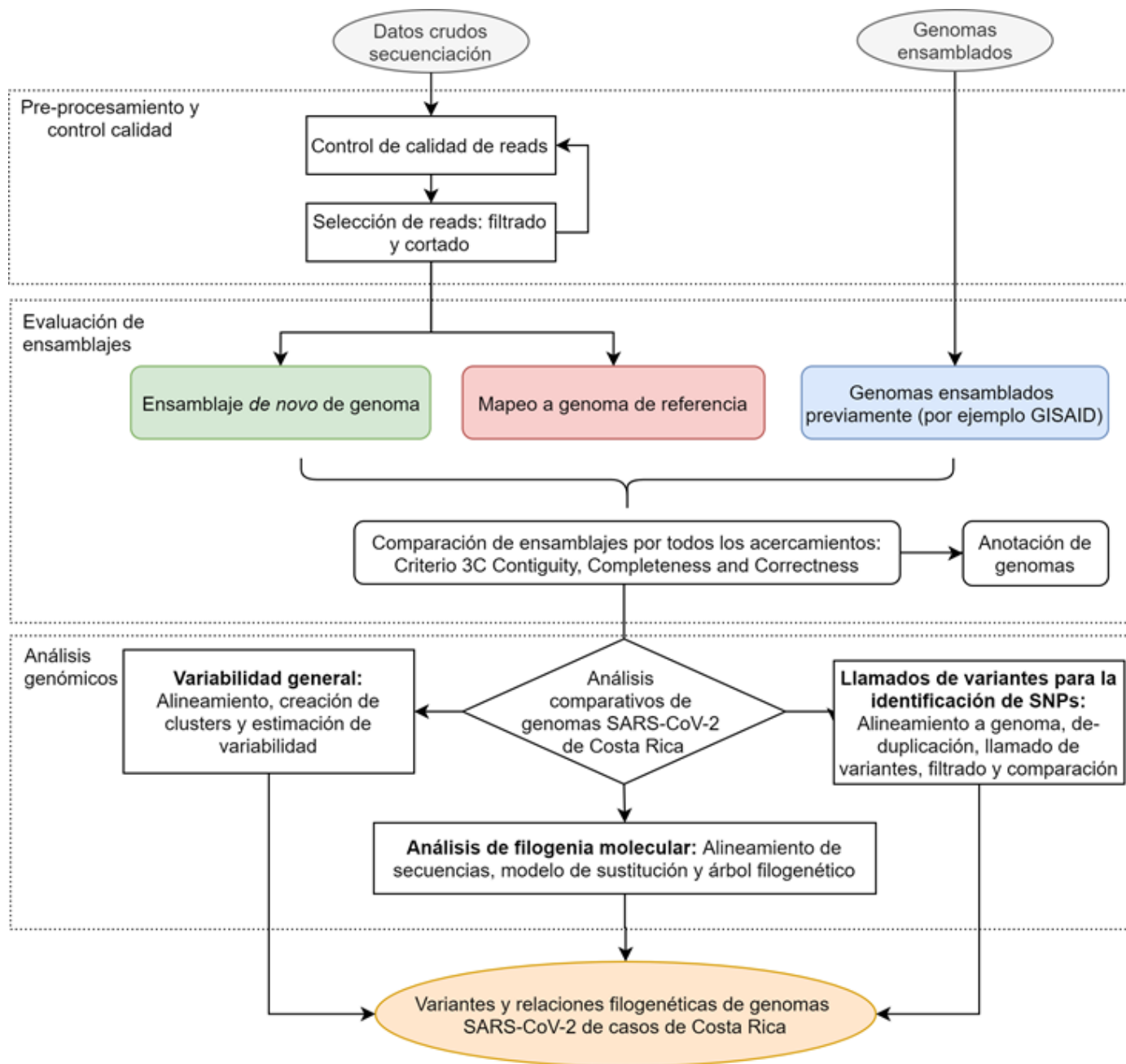


Condiciones

Retrotranscripción: GoScript RT-PCR (2020-06-25)

PCR anidada: GoTaq PCR (2020-06-26)





Análisis bioinformáticos adicionales
BioNumerics v7.6 de Applied Maths con el
plugin SARSCoV2 v0.14

Detección de SNPs y
la extracción de los productos de PCR
genes E y RdRP

Todas las secuencias genómicas fueron
depositadas en la plataforma de la iniciativa
GISAID (www.gisaid.org)

Filogenia: criterio de información bayesiano (BIC) y el modelo: HKY+F+I.



Figura 2. Distribución de frecuencia de los casos GISAID identificados para los genomas de SARS-CoV-2 de Costa Rica (n =70)

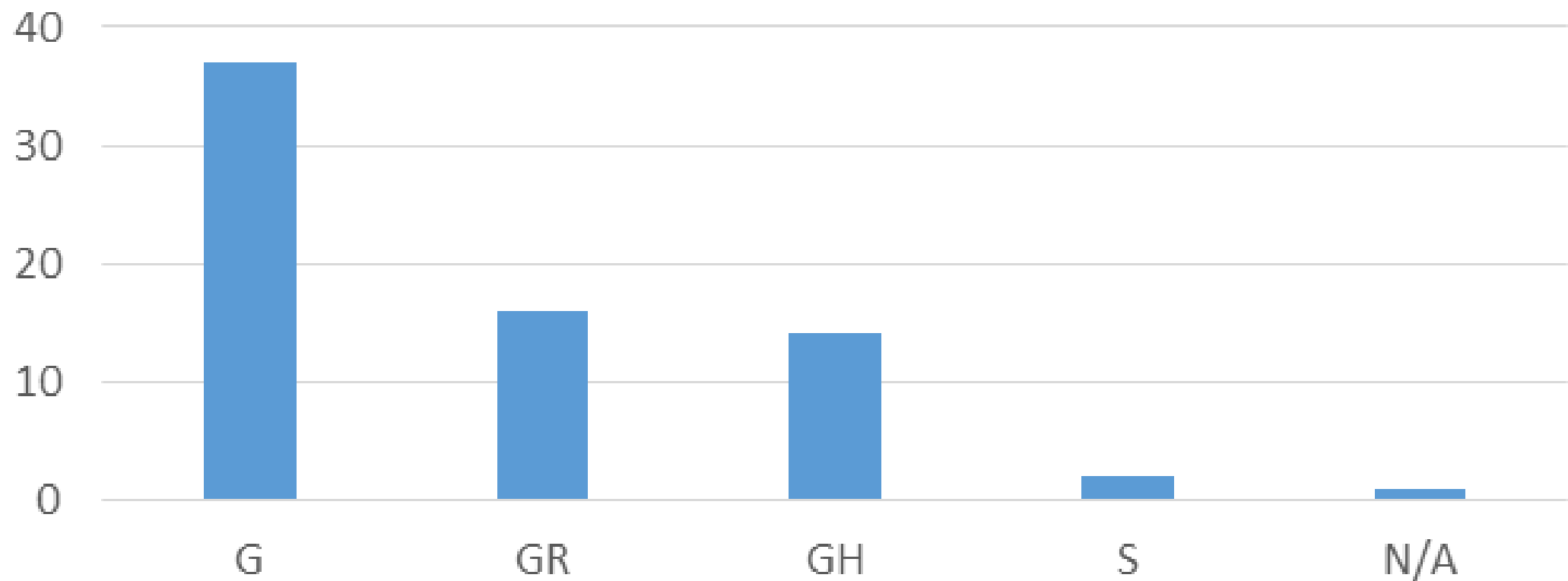




Figura 3. Linajes de SARS-CoV-2 identificados en Costa Rica, marzo - julio 2020

N: 70

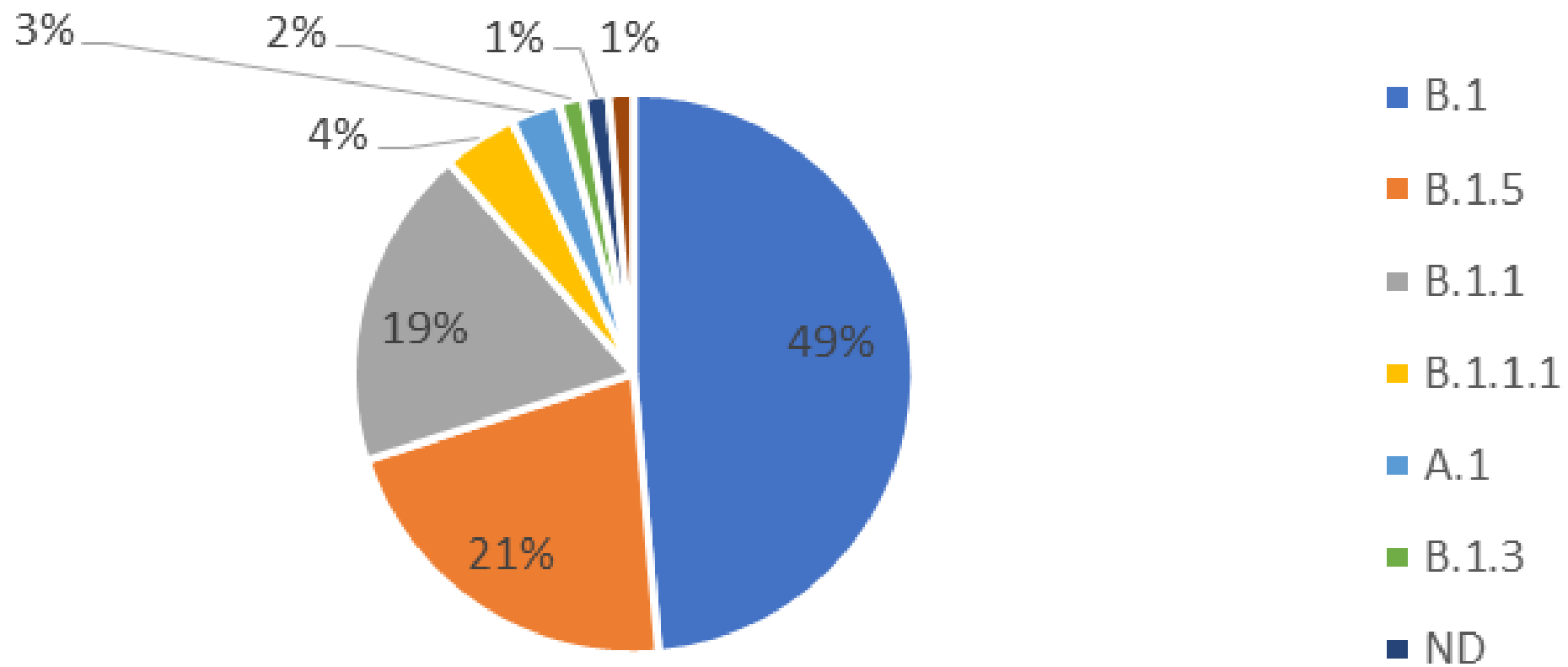




Figura 4. Linajes de SARS-CoV-2 circulantes de la semana epidemiológica 10 a 15, Costa Rica, 2020.
N: 52

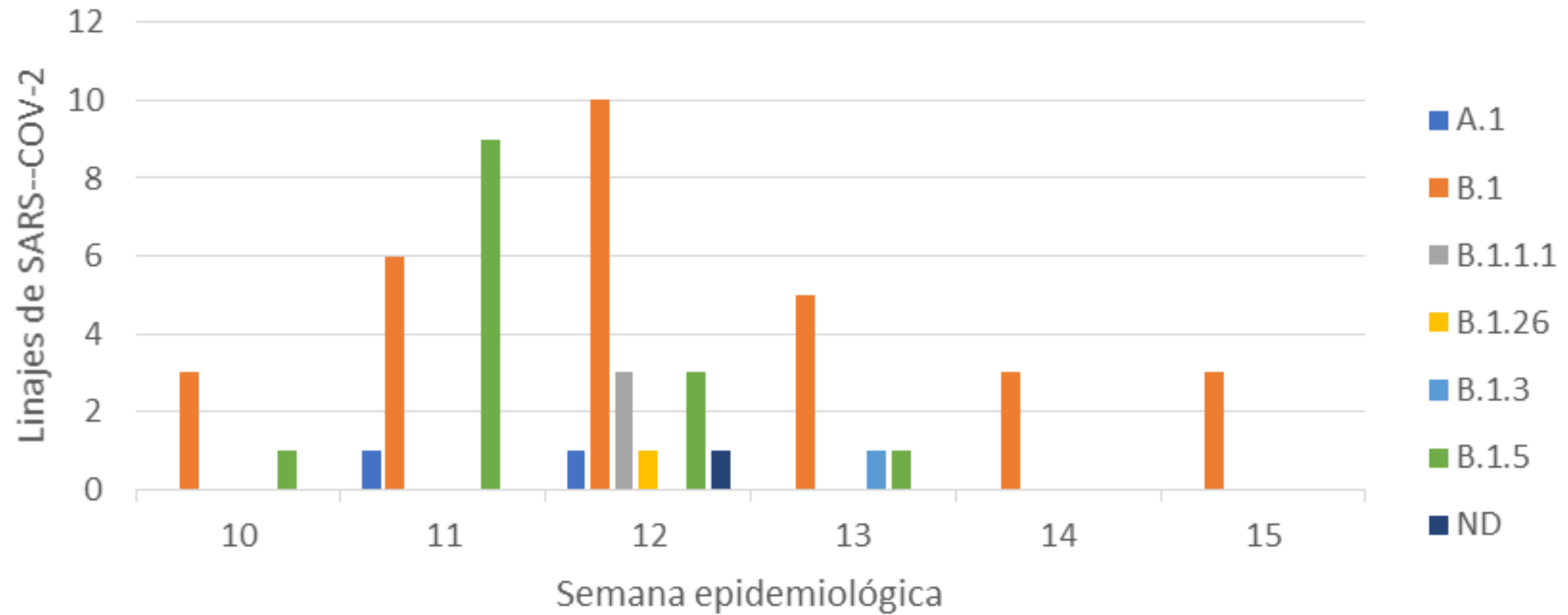




Figura 5. Linajes de SARS-CoV-2 identificados en pacientes con antecedente de viaje al exterior

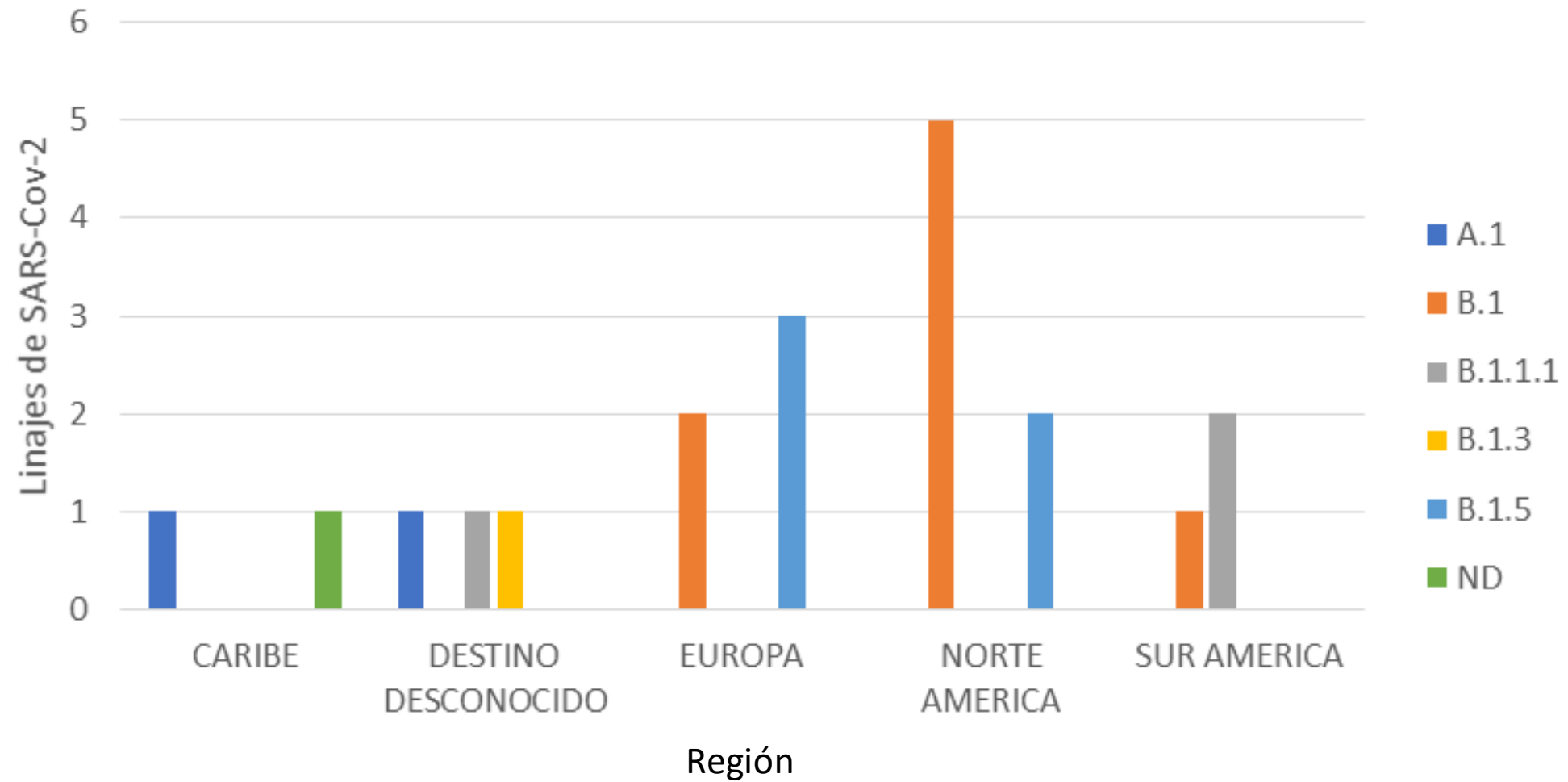




Figura 6. Linajes de SARS-CoV-2 circulantes de la semana epidemiológica 24 a 27, Costa Rica 2020
N: 18

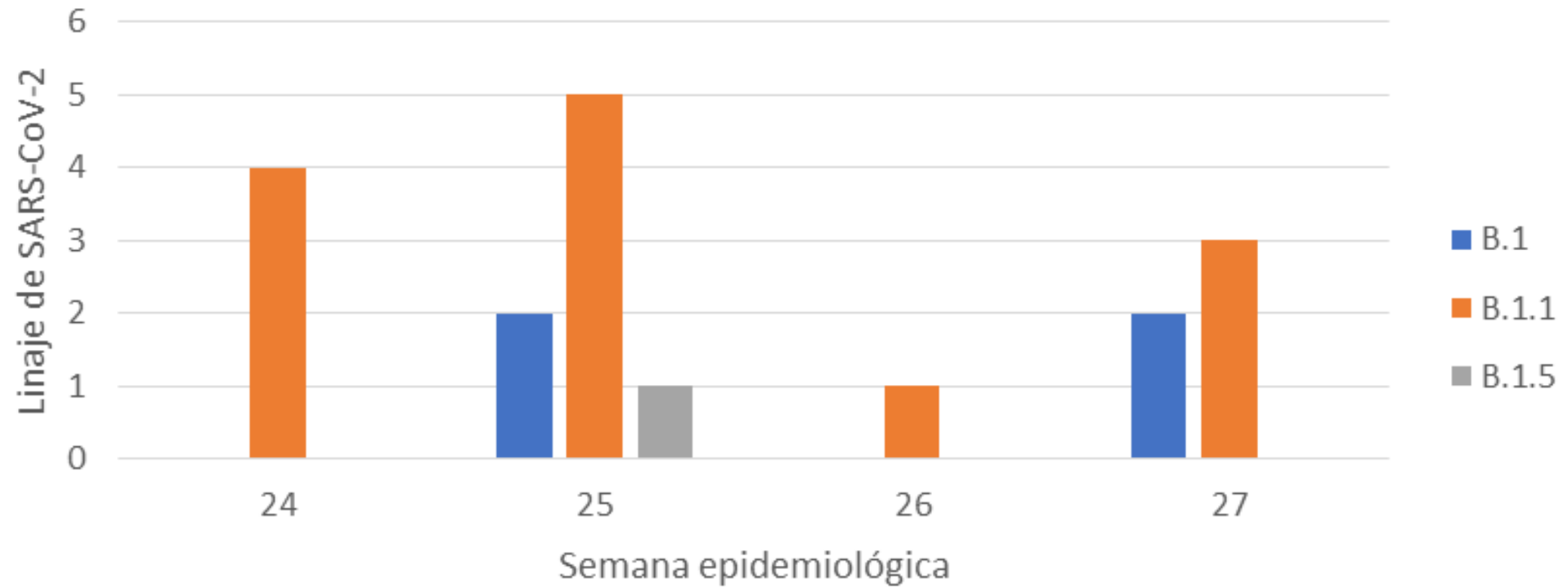
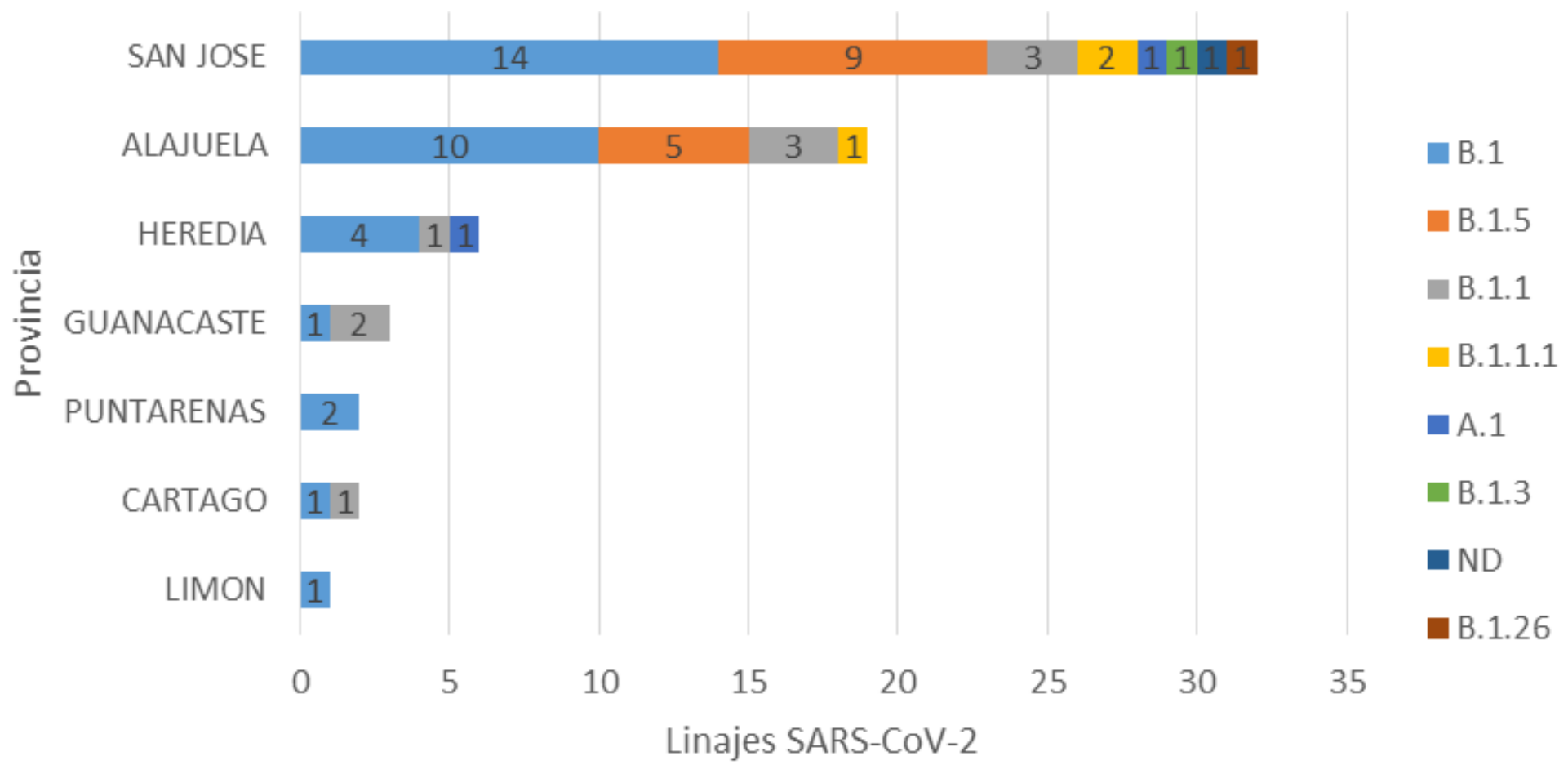




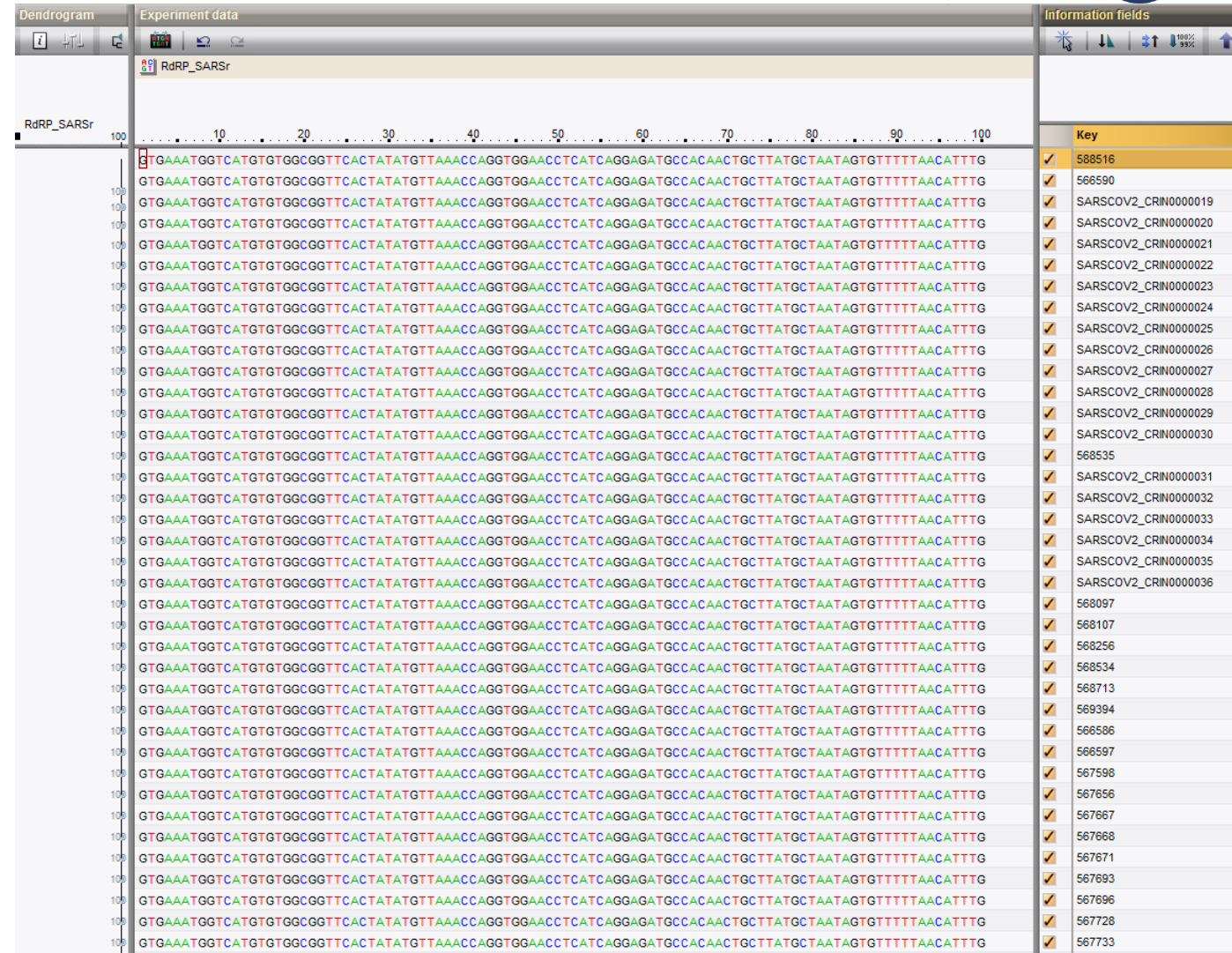
Figura 7. Distribución de linajes de SARS-CoV-2 por provincia
N: 65





Análisis de variantes:

- De 4 y 11 mutaciones contra ref. Wuhan-hu-1.
- La mutación D614G predominó (97%) de la muestra .
- Ninguna de las variantes identificadas se localizó en las regiones de unión de “primers” y sondas de los genes E y RdRP, que se usan en el ensayo de RT-PCR (Corman et al., 2020).
- No se documentaron las variantes estructurales (Spike_N439K, T481I, V483A, E484E ni G476S) en el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína de la espícula viral.



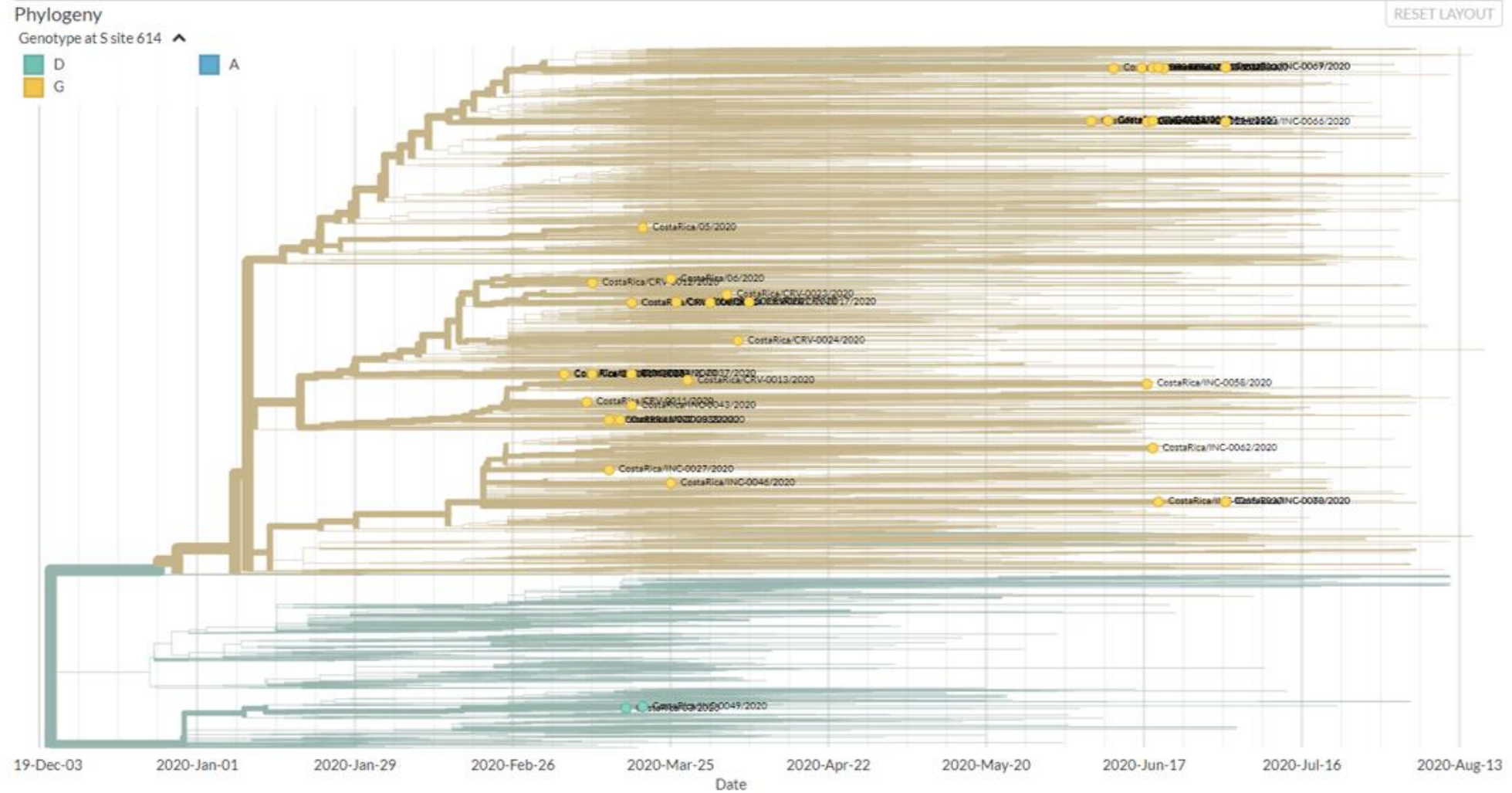
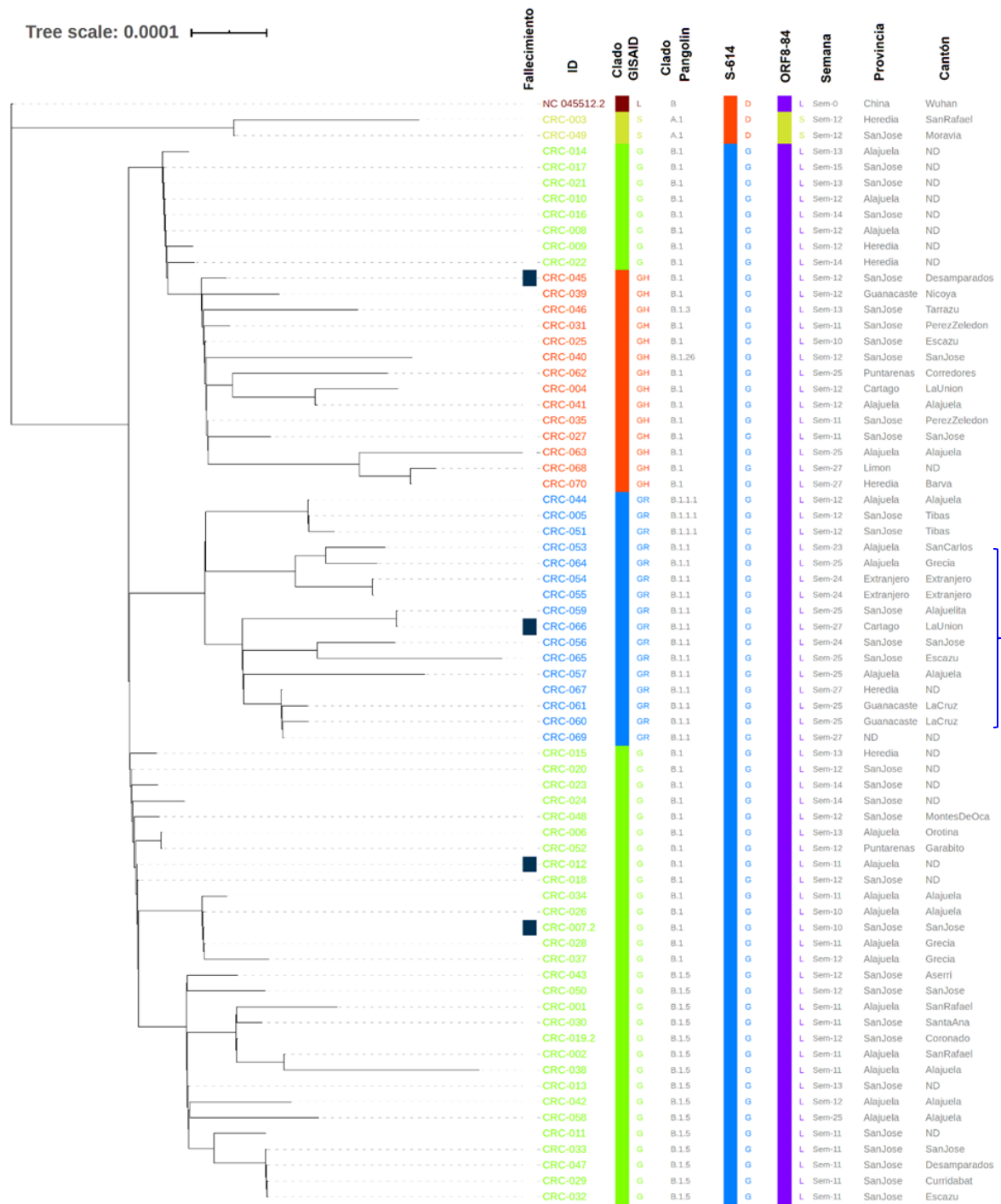


Figura 12. Distribución de secuencias de SARS-CoV-2 de Costa Rica dentro del contexto global. El color del grupo se define por el aminoácido en la posición 614 de la secuencia de aminoácidos de la espícula o proteína S: verde para ácido aspártico (Asp o D) y amarillo para glicina (Gly o G). Fuente: base de datos GISAID (<https://www.nextstrain.org/>).

Tree scale: 0.0001



Tamizaje comunitario - ZN





4.2 Haplotype determination

In the second step of the process, the haplotype is determined. The haplotype as defined in the *SarsCoV2 plugin* is a set of high-frequency amino acid substitutions, organized by linkage groups. They are ordered from left to right by the date on which they first appeared.

Position (genome)	ORF8: 251	ORF2: 1841	ORF1nsp12: 941	ORF1nsp13: 1622	ORF1nsp13: 1511	ORF3a: 171	ORF1nsp2: 254
Ancestral allele	S	D	P	Y	P	Q	T
Derived allele	L	G	L	C	L	H	I

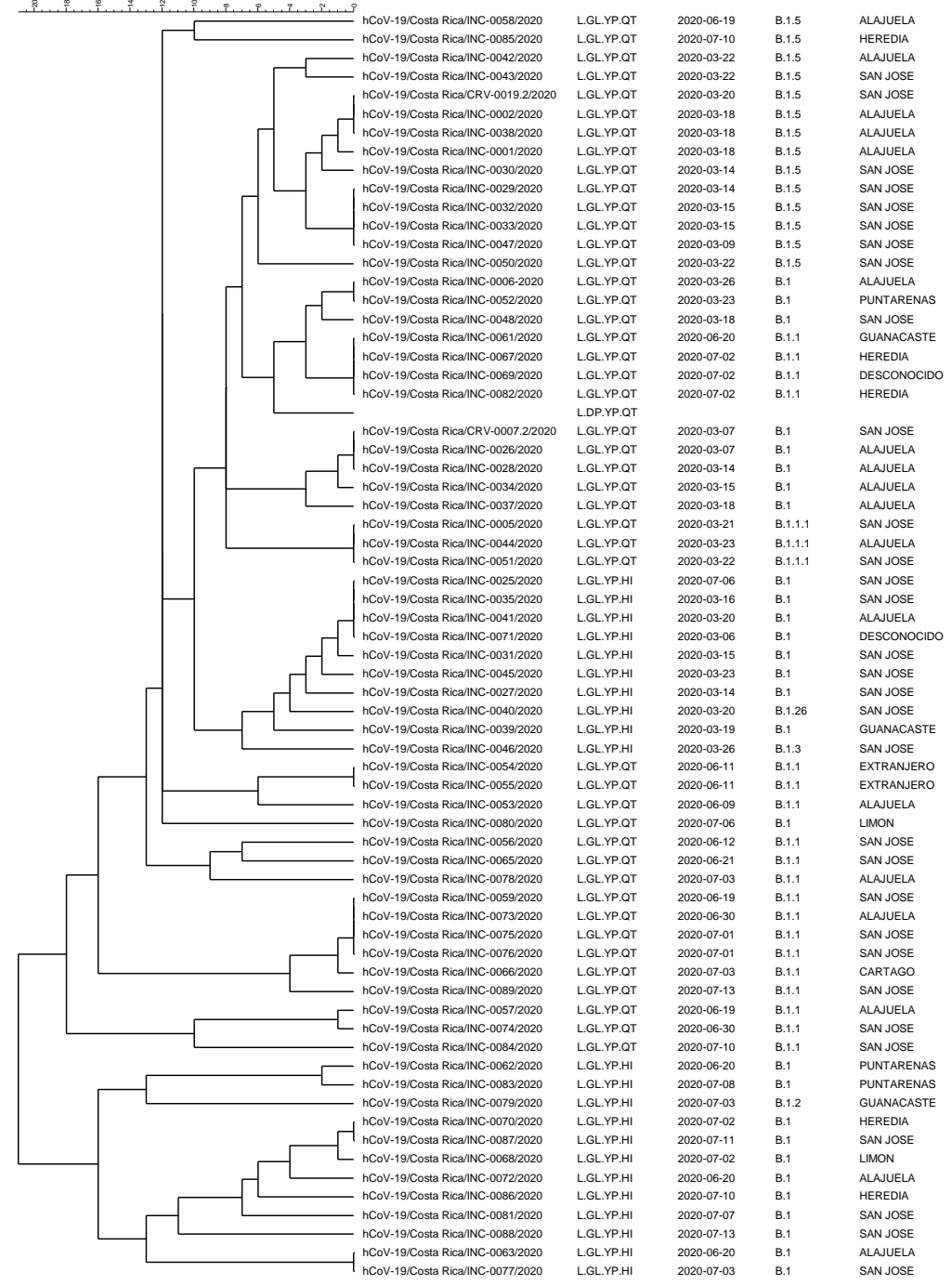
Table 4.1: High-frequency amino acid substitutions.

Amino acid substitutions that exceed a 5% minimum allele frequency (based on all available NCBI genomic sequences). They are sorted by date of first appearance (as shown in the Nextstrain tree), and linkage groups are expressed as pairs separated by dots.



SARS-CoV-2 SNPs – CL BN7.6

SNP (<All Characters>)



}
}
}

}



Otros proyectos y colaboraciones

UCR(CIBCM-CABANA)-SENASA- CTBC


Otros POE y tecnologías de secuenciación

Instituto Conmemorativo Gorgas

Comportamiento epidemiológico Sub regional del SARS-CoV-2 SARS-CoV-2

OPS-OMS. Comportamiento Regional del SARS-CoV-2

PulseNet LA y C



**“Al mundo no va a podrirlo la gente mala.
Si no la que se dice buena pero no hace nada”.**

2017, Buena Fe