

**Curso**

# **Biología molecular aplicada al diagnóstico médico**

**2021**



# CURSO BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO MEDICO

## Diagnóstico molecular covid-19

9 de noviembre de 2021

Lic. Javier Sfalcin

Especialista Biología Molecular

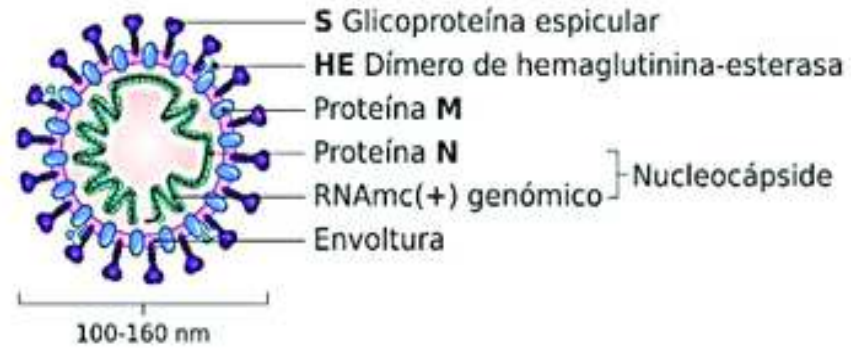
Laboratorio CIBIC



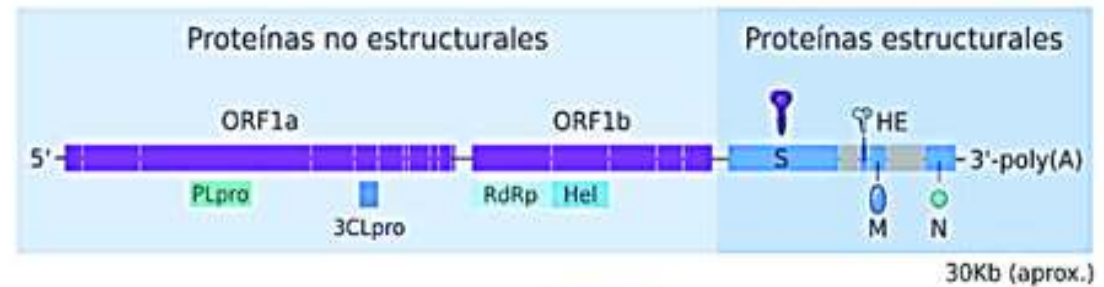


## Coronavirus SARS-CoV-2

### Estructura

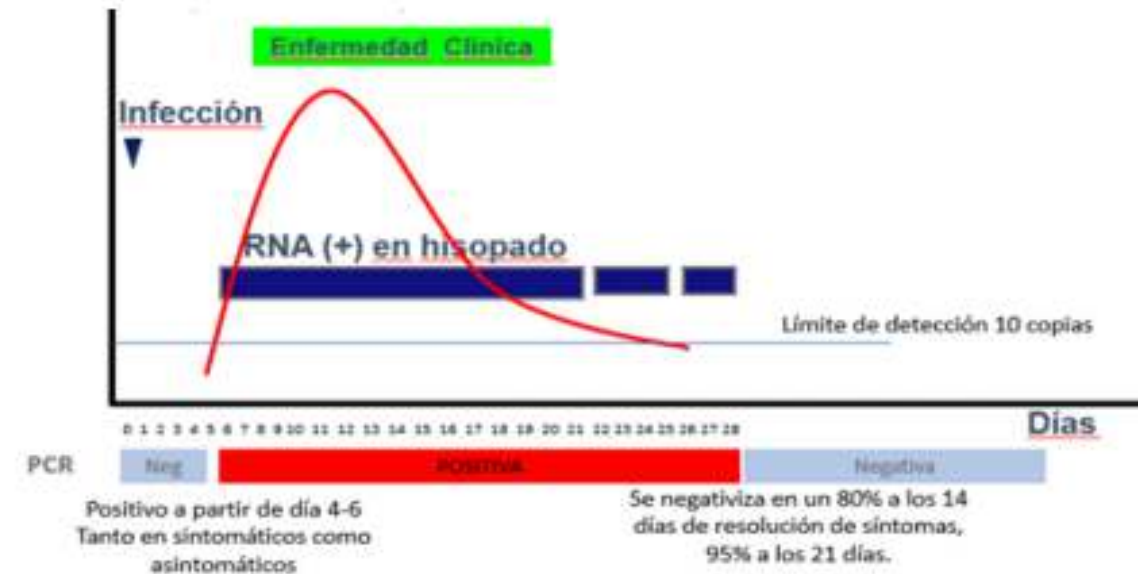
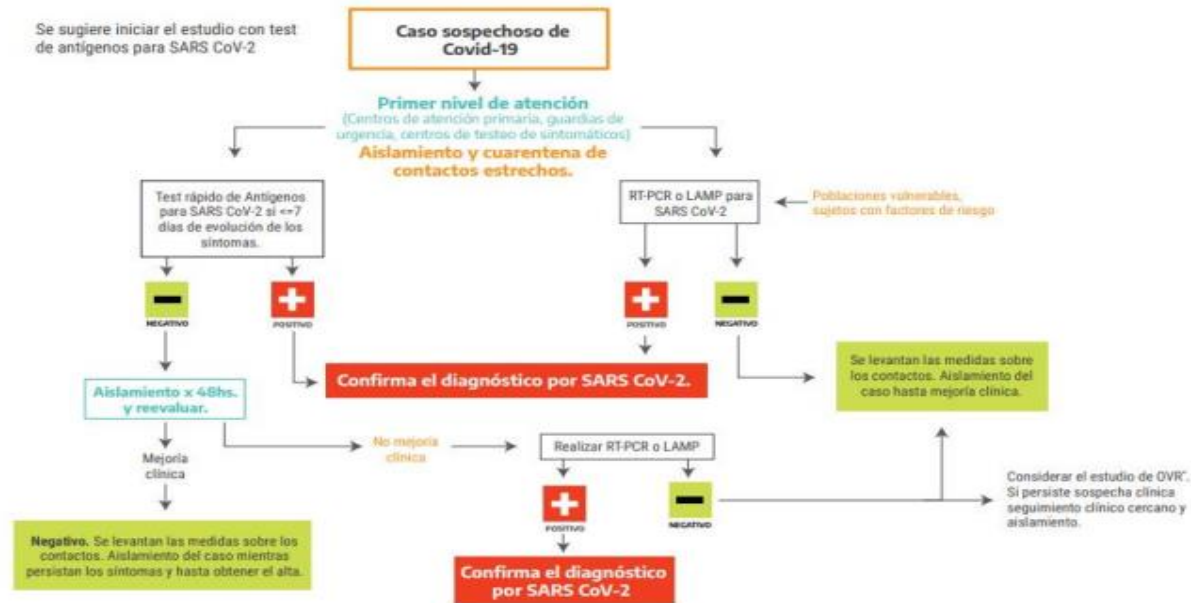


### RNAmc(+) genómico





### Algoritmo 1: Diagnóstico en personas con síntomas compatibles con caso sospechoso de COVID-19.



# DIAGNOSTICO MOLECULAR DE COVID-19



Detección directa del genoma viral por técnicas de biología molecular (RT-PCR, LAMP, etc.) basadas en la amplificación específica de regiones del genoma de SARS CoV-2 que incluye los genes E, N, RdRP y S.

Las muestras empleadas y recomendadas para el diagnóstico son las del tracto respiratorio y saliva

- Deben procesarse en un laboratorio por personal especializado (en ARG, requiere permiso especial)
- Requieren múltiples insumos
- Infraestructura (cabina de bioseguridad)
- El tiempo hasta los resultados es variable (1 a 3 días)



# COVID EN EL LABORATORIO



**1- Suspensión de hisopados**

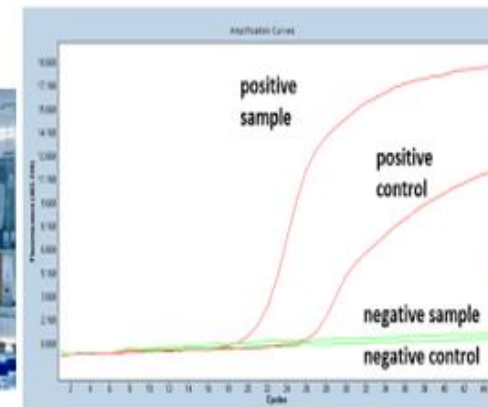


**2- Extracción de RNA viral (manual/ automatizada)**



**3- RT/PCR**

**4- Validación técnica y clínica del resultado**



**PCR A: ORF1ab, N, RdRp**

**PCR B: GEN E, RNP, GEN N**

**PCR C: GEN E, GEN N**

**PCR D: GEN E, GEN N, VAR DELTA**



## Molecular Tests Impacted by SARS-CoV-2 Mutations

The FDA's analysis to date has identified the following EUA-authorized molecular tests whose performance could be impacted by SARS-CoV-2 viral mutations:

### EJEMPLOS:

Accula SARS-CoV-2 Test (Mesa Biotech Inc.)

Linea COVID-19 Assay Kit (Applied DNA Sciences, Inc.)

TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.)

Xpert Xpress SARS-CoV-2, Xpert Xpress SARS-CoV-2 DoD, Xpert Omni SARS-CoV-2 (Cepheid)

orf1ab

GEN N

GEN S

**AMPLIFICACION DE LOS 3 GENES  
PCR COVID DETECTABLE**

orf1ab

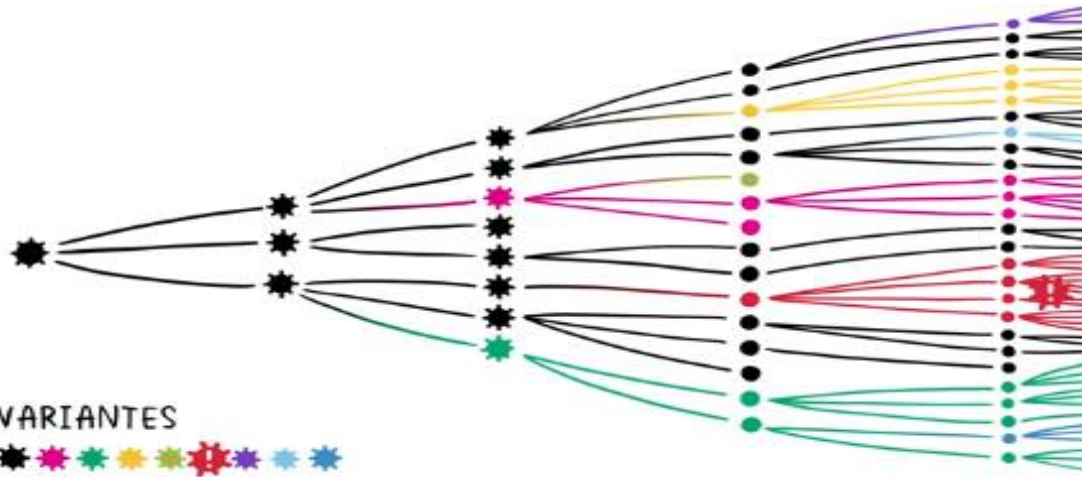
GEN N

GEN S

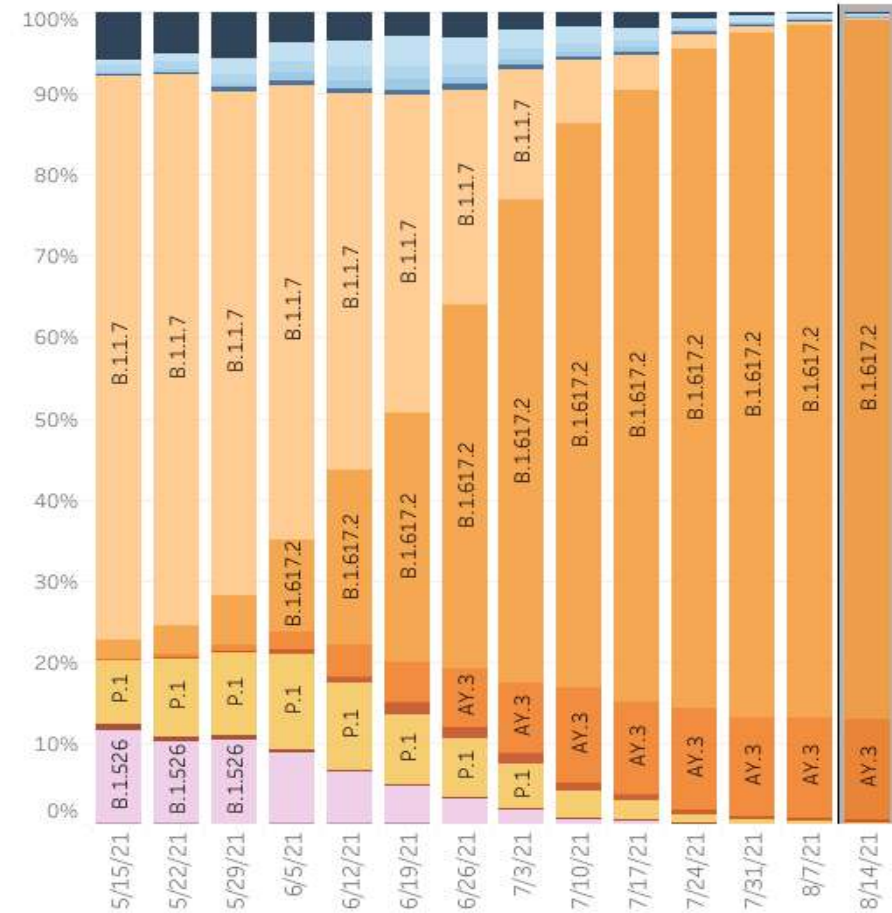
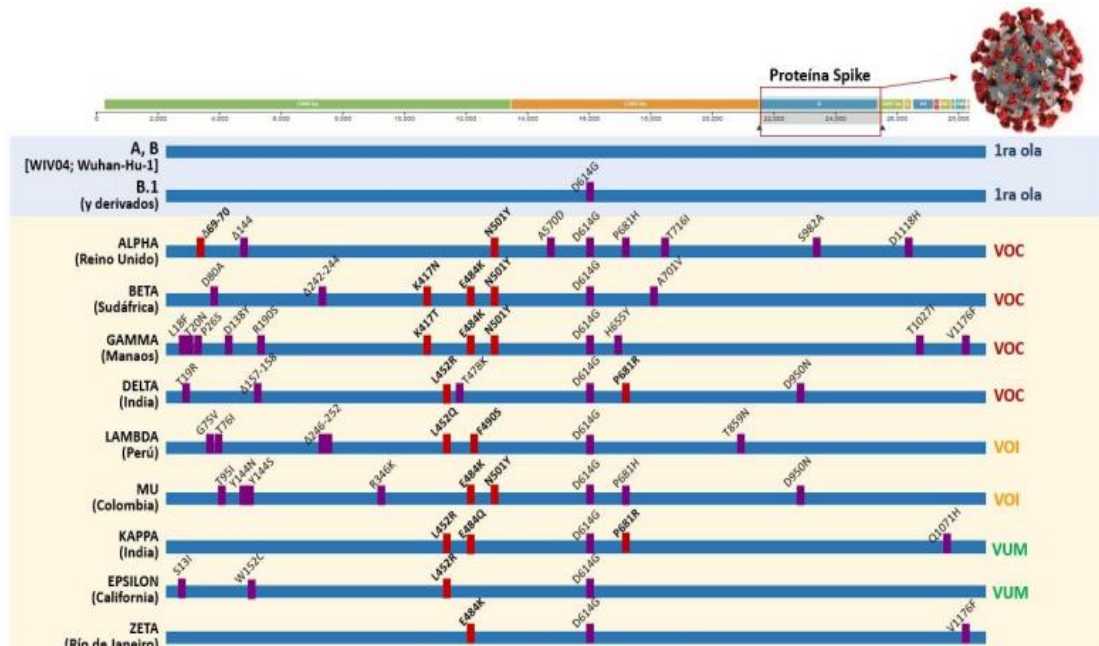
**DROPOUT DEL GEN S POR MUTACION  
del69-70**

**PCR COVID DETECTABLE??**

Nueva Variante UK/Alpha

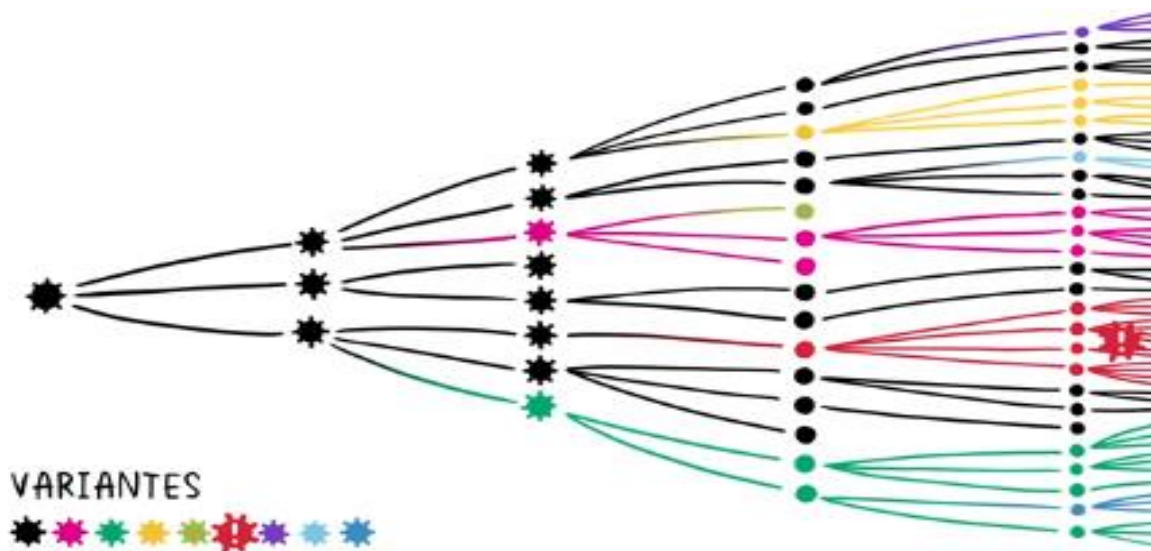


VARIANTES



Ej: Rio de Janeiro (BR)





VARIANTES DE PREOCUPACIÓN

VARIANTES DE INTERES

VARIANTES BAJO MONITOREO

# SECUENCIACION NGS



|  | <b>Amplicon sequencing</b>                   | <b>Whole Genome Sequencing (WGS)</b>   |
|--|--|--|
| Precio de la muestra                     | \$X  | \$XXX  |
|  | 1M DE LECTURAS/MUESTRA                       | 25M – 40M DE LECTURAS/MUESTRA  |
| Cantidad de cDNA requerido               | MÍNIMO DE 1ng RNA                            | 150ng  |
| Automatización de formación de librerías | LIBRERÍA AUTOMATIZADA                        | NO AUTOMATIZABLE   |
| Requiere experiencia en NGS              | NO   | SI   |
| Análisis                                 | MAPEO<br>ENSAMBLAJE<br>BUSQUEDA DE VARIANTES | ELIMINACION DE SECUENCIAS DEL HOSPEDADOR<br>MAPEO<br>ENSAMBLAJE<br>BUSQUEDA DE VARIANTES |

# SECUENCIACION SANGER



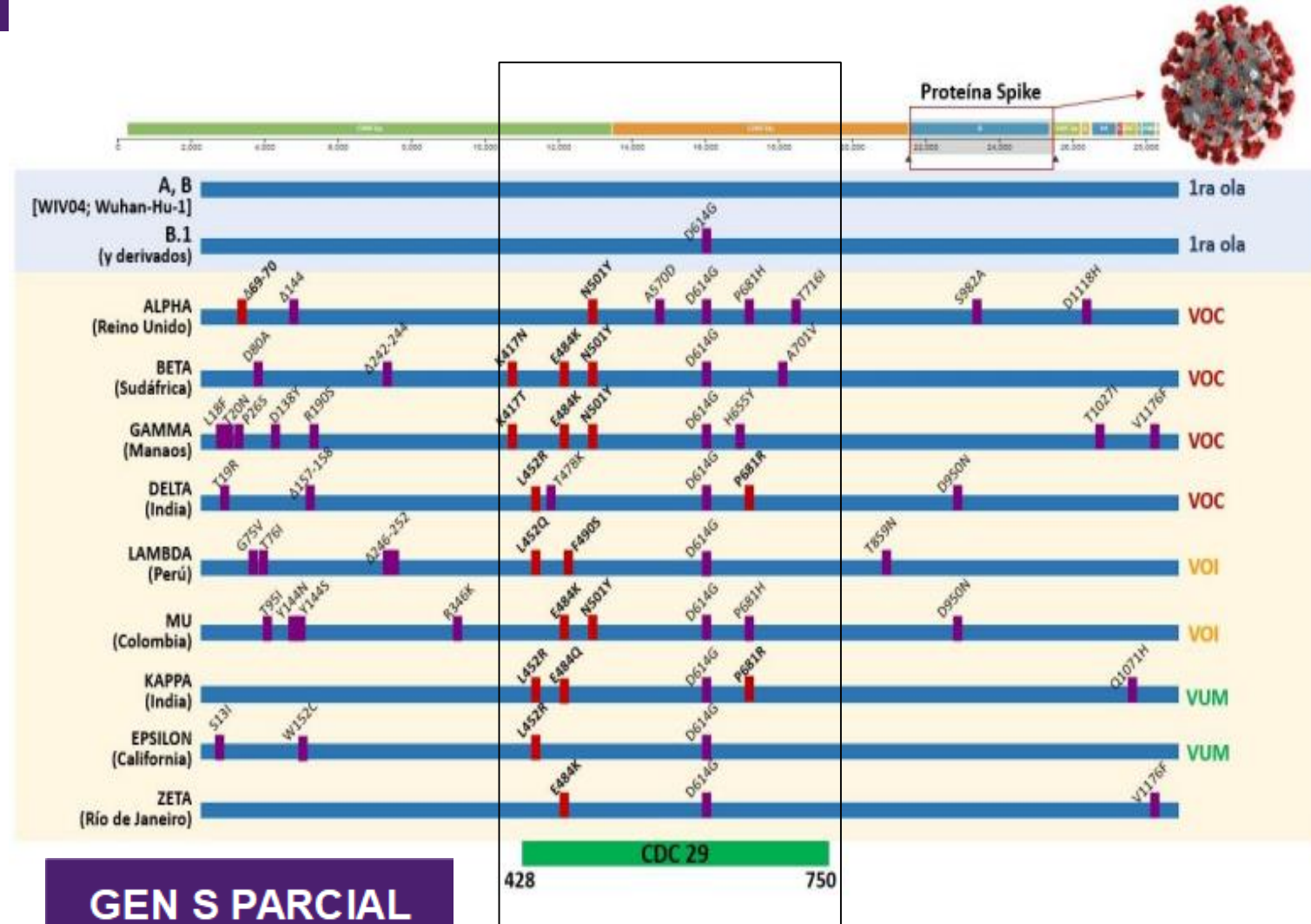
**Table 1. Sequences of M13-tagged primers for analyzing the S gene.** A subset of primer pairs that focus on specific regions of the S gene can be chosen according to researchers' needs; the complete list is provided in here. The M13 sequence tags are highlighted in red.

| Coordinates* | Forward primer name | Forward primer sequence                                 | Reverse primer name | Reverse primer sequence                                  |
|--------------|---------------------|---|---------------------|--|
| 20990-21562  | SC2M1-54_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TTGATTGGTGATTGTGCAACTGTACA    | SC2M1-54_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACCT</b> GTTCGTTTAGTTGTTAAACAAGAACATCA |
| 21421-21916  | SC2M1-55_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TAGGGGTACTGCTGTTATGTCTTTAAA   | SC2M1-55_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACCA</b> AGTAGGGACTGGGTCTTCGAA         |
| 21775-22345  | SC2M1-56_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TGGGACCAATGGTACTAAGAGGT       | SC2M1-56_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> ACCAGCTGTCCAACCTGAAGAA         |
| 22203-22697  | SC2M1-57_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TGTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCG      | SC2M1-57_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> ACTTAAAAGTGAAAAATGATGCGGAA     |
| 22563-23128  | SC2M1-58_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TACTTGTGCCCTTTTGGTAAAGT       | SC2M1-58_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACCT</b> GTGCTGGTGCATGTAGAAGTTCA       |
| 22986-23519  | SC2M1-59_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TCCGGTAGCACACCTTGAATGG        | SC2M1-59_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> CCCCTATTAAACAGCCTGCACG         |
| 23379-23876  | SC2M1-60_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TACCAGGTGCTGTTCTTTATCAGG      | SC2M1-60_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> CAGCTATTCCAGTTAAAGCACGGT       |
| 23737-24231  | SC2M1-61_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGAC  | SC2M1-61_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> GCACAAAGGTCCAACCAGAAG          |
| 24095-24623  | SC2M1-62b_LEFT_M13  | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TTGCAGATGCTGGCTTCATCA         | SC2M1-62b_RIGHT_M13 | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> CACACTCTGACATTTTAGTAGCAGC      |
| 24493-25003  | SC2M1-63_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAA | SC2M1-63_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> TGAGTCTAATTGAGTTGCAAAGGA       |
| 24858-25369  | SC2M1-64_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TGCACACTGGTTGTAACACAA         | SC2M1-64_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> TTTGACTCCTTTGAGCACTGGC         |
| 25214-25790  | SC2M1-65_LEFT_M13   | TG <b>TAAAACGACGGCCAG</b> TTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGC    | SC2M1-65_RIGHT_M13  | <b>CAGGAAACAGCTATGACC</b> CATTTCAGCAAAGCCAAAGCC          |

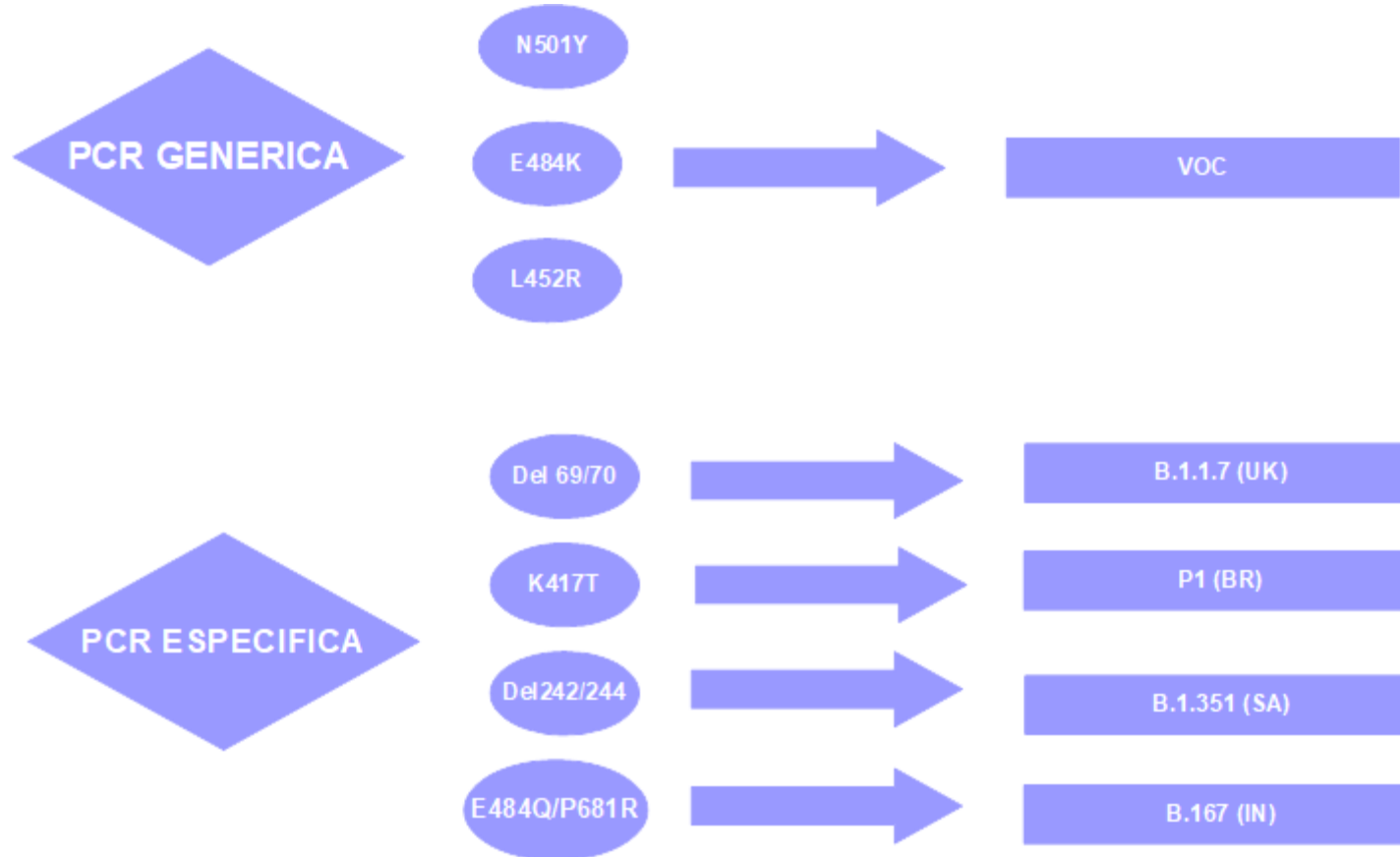
\* Based on NC\_045512.2 coordinates.

# GEN S COMPLETO

# SECUENCIACION SANGER



# PCR EN TIEMPO REAL

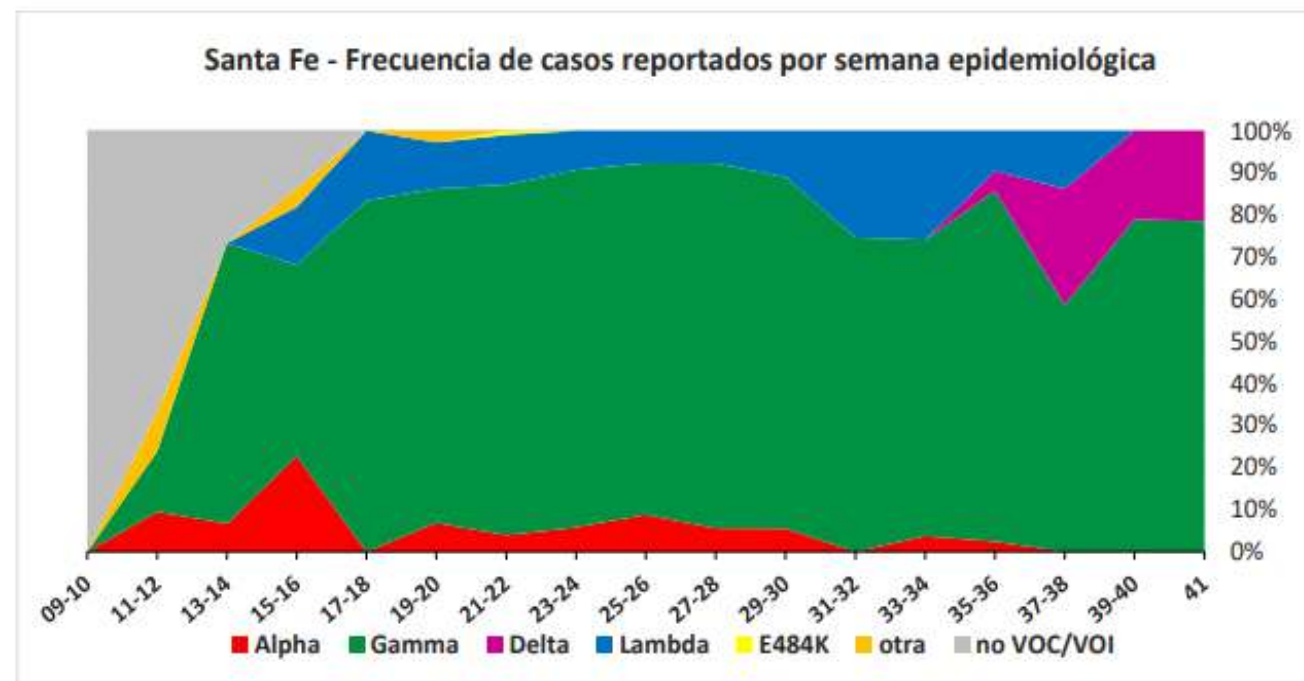
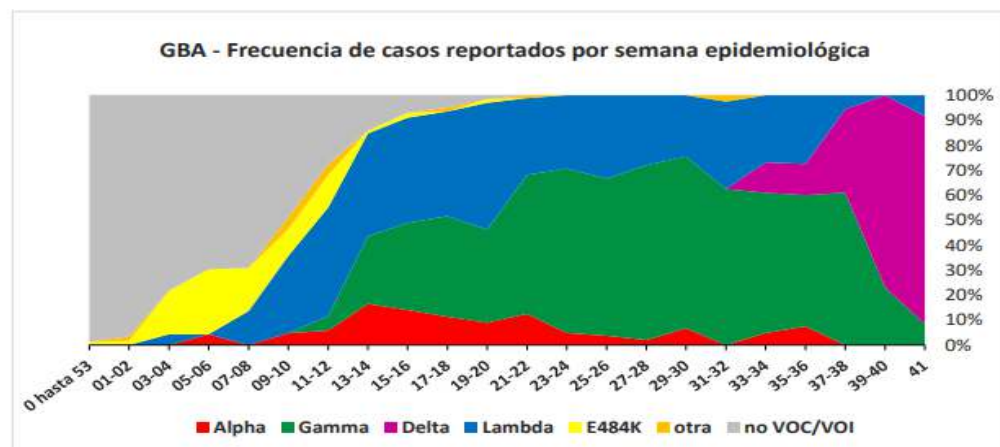
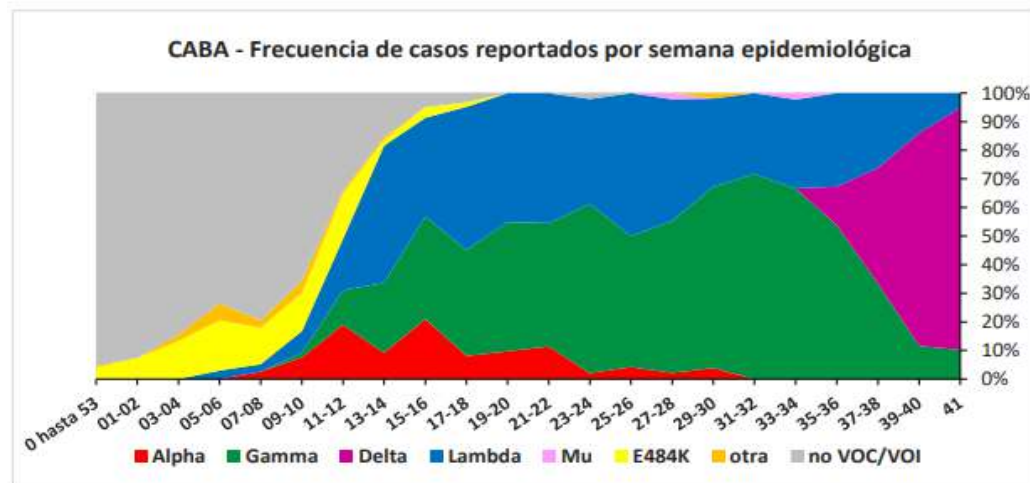


# VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE VARIANTES



## DATOS DE PROYECTO PAIS

<http://pais.qb.fcen.uba.ar/>



Base de datos de registro de secuencias  
- GISAID  
- NEXTRAIN



**¡Muchas gracias!**

[jsfalcin@cibic.com.ar](mailto:jsfalcin@cibic.com.ar)



[www.heritas.com.ar](http://www.heritas.com.ar)



[info@heritas.com.ar](mailto:info@heritas.com.ar)



[.Héritas](#)



[HeritasArg](#)