

Informe de situación: 21 de diciembre de 2021 (versión 16 enero)

Procedimientos para la detección de la variante Ómicron en España RED de Laboratorios de Secuenciación de SARS-CoV-2 (RELECOV)

Informe realizado por el equipo HERA-CNM: I Casas, S Vazquez-Morón, M Iglesias-Caballero, V Sandonís

Revisado por el equipo coordinador HERA: C Lopez, JA Lepe, S Perez, F Lazaro, J Camara, MA Marcos.

Introducción

El documento de “Estrategia de integración de la secuenciación en la vigilancia de SARS CoV-2”, aprobado por la Ponencia de Alertas y por la Comisión de Salud Pública, plantea la necesidad de incluir como parte de la vigilancia de la COVID-19, los datos generados mediante secuenciación genómica de SARS-CoV-2 para la detección e identificación de variantes virales en España. Para cumplir este objetivo la *Red Nacional de Laboratorios de Secuenciación Genómica* cubre las necesidades de generación de secuencias de los virus y de conocimiento genómico mediante su análisis. El Centro Nacional de Microbiología (CNM-ISCIII) coordina dicha red.

De nuevo nos enfrentamos a una nueva variante del SARS-CoV-2 y los laboratorios de microbiología designados por las CCAA deben dar una rápida respuesta para poder establecer los sistemas de detección de esta nueva variante y comunicarla a los Servicios de Salud Pública de cada CCAA tan pronto sea posible para poder implementar las medidas de contención de la expansión de esta variante.

Se diseñó específicamente un cuestionario para recoger la información de cómo se está realizando el cribado y la detección rápida de la variante Ómicron. El viernes 17 de diciembre se envió el cuestionario vía email a los laboratorios de la RELECOV. La primera parte del cuestionario identifica a los laboratorios, a sus responsables, así como a las personas encargadas de contestar dicho cuestionario. La segunda parte aborda preguntas técnicas específicas acerca de la muestra, la llegada de las muestras al laboratorio, el tipo de muestra, la extracción de los ácidos nucleicos, la amplificación del virus y la detección específica de la variante Ómicron basándose en la amplificación de determinadas mutaciones

Objetivos del informe

1. Conocer detalladamente el procedimiento para el cribado de la variante Ómicron por la detección de mutaciones específicas
2. Conocer qué métodos de PCRs específicas se están utilizando en los laboratorios
3. Prever posibles problemas que puedan existir para buscar soluciones concretas.
4. Conocer la capacidad que presenta cada CCAA para la detección e identificación de la nueva variante Ómicron mediante el trabajo realizado por la Red de Laboratorios de Secuenciación Genómica de SARS-CoV-2.

Resultados

El cuestionario se envió a un total de 44 laboratorios recogidos en la Tabla 1. Se recibieron 37 respuestas de las cuales se elimina 1 por haberlo completado de manera incorrecta. En la Tabla 1 se identifican aquellos laboratorios que han participado siendo un total de 36. No se tiene en cuenta las respuestas de 2 laboratorios por haber sido enviadas fuera del periodo de respuesta. Total respuestas analizadas: 34.

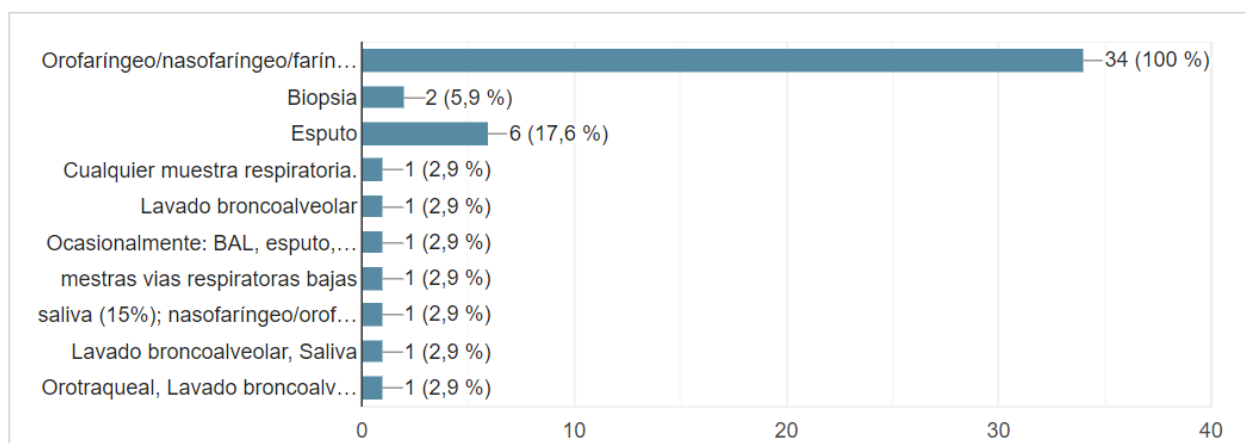
Tabla 1. En negrita, laboratorios integrantes de la RELECOV que han respondido al cuestionario

CCAA	Laboratorios
ANDALUCIA	Hospital Universitario San Cecilio, Granada
	Hospital Universitario Virgen del Rocio, Sevilla
ARAGON	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa
	Hospital Universitario Miguel Servet
	Centro de Investigación Biomédica de Aragón
ASTURIAS	Hospital Universitario Central de Asturias
BALEARES	Hospital Universitario Son Espases
CANARIAS	Hospital Universitario Ntra. Sra de Candelaria
	Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrin
CANTABRIA	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
CASTILLA LA MANCHA	Complejo Hospitalario Universitario de Albacete
	Hospital General Universitario de Ciudad Real
	Complejo Hospitalario de Toledo
	Hospital Universitario de Guadalajara
CASTILLA Y LEON	Consorcio LUCIA (SACYL,ITACYL UBU,UVa)
CATALUÑA	Hospital Universitari Vall d'Hebron
	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
	Hospital Clínic de Barcelona
	Hospital Universitari Bellvitge
	Lab Clínic ICS Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre. Hospital Joan XXIII
	Laboratori de Referencia de Catalunya
	Banc de Sang i Teixits Catalunya
	Unitat Genòmica Medicina Personalitzada - Hospital Dr. Josep Trueta
CEUTA	Hospital Universitario de Ceuta
C. VALENCIANA	FISABIO CSIC-Epidemiología Molecular-Universidad de Valencia
	Hospital General Universitario de Alicante
	Hospital General Universitario de Elche
	Consorci Hospital General Universitari de València
EXTREMADURA	Hospital Universitario de Badajoz
	Complejo Hospitalario Universitario de Cáceres
GALICIA	Complejo Hospitalario Universitario de Vigo
	Complejo Hospitalario Universitario A Coruña
	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago Compostela
LA RIOJA	Hospital Universitario San Pedro (Logroño)
MADRID	Hospital Universitario Gregorio Marañón
	Hospital Universitario Ramón y Cajal
	Hospital Universitario La Paz
	Hospital Universitario 12 de Octubre
MELILLA	Hospital Universitario de Melilla
MURCIA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
NAVARRA	Complejo Hospitalario de Navarra
PAIS VASCO	Hospital Universitario Donostia
	Hospital Universitario de Basurto
	Hospital Universitario Cruces

Tipo de Muestras:

Los resultados de los tipos de muestras que se utilizan en la RELECOV se recogen en la Figura 1. El tipo de muestra que se recibe en todos los laboratorios para el análisis es fundamentalmente muestra respiratoria de tracto superior Orofaringeo/nasofaringeo/faríngeo (100%). De manera minoritaria se reciben para estudio muestras del tracto respiratorio inferior tal y como se muestra en la Figura 1.

Figura 1: relación de tipos de muestras clínicas utilizadas por los laboratorios de la RELECOV y proporción de los laboratorios que las utilizan.



Inactivación vs No inactivación de la muestra

En 15 de los 34 laboratorios la muestra clínica respiratoria se recibe ya inactivada (44%) y en 24 (71%) se recibe no inactivada. Esto es muy importante a la hora de establecer la posibilidad de aislar el virus en cultivos celulares para poder realizar una caracterización antigénica o fenotípica. En 5 laboratorios se reciben ambos tipos de muestras, tanto muestras inactivadas como no inactivadas dependiendo del origen de la muestra.

En 28 de los 34 laboratorios (88%) se utiliza como método de inactivación previo a la extracción de ácidos nucleicos un buffer de extracción o de lisis, aunque en 4 de los laboratorios también se utiliza inactivación de la muestra, o de una alícuota de la muestra, por calor y especialmente en el caso de la muestra saliva. Este hecho es importante a la hora de conocer el rendimiento de la secuenciación debido a que la preservación de la integridad del RNA va a ser un condicionante del éxito de la posterior secuenciación.

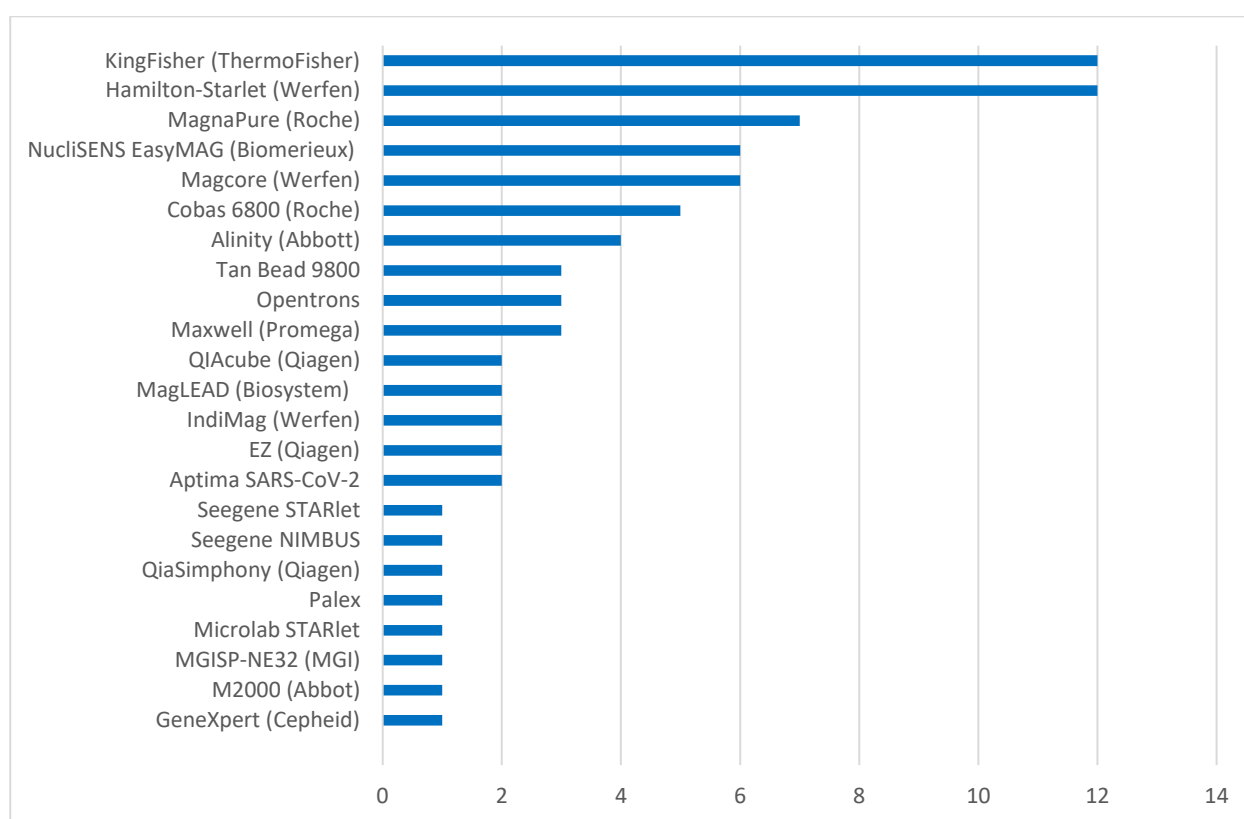
En algunos laboratorios existen diferentes circuitos de actuación dependiendo si se trata de establecer un diagnóstico de la infección o se va a realizar una secuenciación de la muestra o un tipado molecular. En estos laboratorios no se inactiva el volumen total que se recibe, sólo el necesario para el diagnóstico. Todas las muestras que después de haber sido utilizadas para establecer un diagnóstico y que entran en la fase de secuenciación siguen el mismo circuito consistente en una inactivación, un cribado para conocer la carga viral y finalmente una selección de aquellas que cumplen el criterio para su secuenciación. Los dos circuitos se realizan en paralelo y los procedimientos en cada uno de los laboratorios puede que sean diferentes. La evaluación de dichos criterios se debe realizar por cada laboratorio con el objetivo de mejorar los procesos y el número de muestras a analizar y secuenciar.

Extracción de ácidos nucleicos:

En 23 de los 34 laboratorios se realiza una extracción de ácidos nucleicos totales y en 33 de ellos el proceso de extracción se realiza de manera automática. Dado que la calidad de la extracción va a generar ácidos nucleicos mejor o peor conservados y por ello el rendimiento de la secuenciación está íntimamente ligado a este proceso, se ha preguntado por el tipo de extractor automático que se utiliza.

Existen diferentes extractores automáticos en el mercado y han sido modificados para agilizar el proceso de la extracción, Figura 2. La mayoría de los laboratorios presentan la posibilidad de poder utilizar más de un extractor automático y son los laboratorios los que deben evaluar cuál de los extractores genera la mejor calidad del RNA extraído y que será el de elección para realizar la secuenciación posterior. Los reactivos que se utilizan van asociados al tipo de aparato y son suministrados por las empresas que suministran el extractor.

Figura 2. Equipos extractores de ácidos nucleicos utilizados por los 34 laboratorios de la RELECOV.



Los sistemas KingFisher (Thermofisher) y Hamilton-Starlet (Werfen) son los más utilizados. Además, se aprecia una gran diversidad en los equipos que se utilizan para realizar las extracciones de ácidos nucleicos. Algunos de estos equipos pueden automatizar el proceso de manera completa, estando incluidos en ellos los procesos de amplificación de ácidos nucleicos. La automatización presenta una ventaja a la hora de establecer una enorme rapidez en la generación de resultados y en el manejo de elevadas cantidades de muestras. La dependencia de las casas comerciales que suministran los reactivos podría ser un inconveniente, aunque tras la situación que se generó durante la primera ola de la pandemia a nivel global, las casas comerciales han cambiado sus estrategias de producción y de distribución.

Detección de SARS-CoV2

Hay que diferenciar entre:

1. los métodos de diagnóstico por RT-PCR que los laboratorios utilizan para la detección de SARS-CoV-2, que fundamentalmente tiene como objetivo la realización de un diagnóstico,
2. la realización de métodos RT-PCR dirigidos a un cribado rápido que mediante la identificación de una serie de marcadores moleculares permiten la asociación con un determinado grupo de variantes de SARS-CoV-2 definidas por una serie de mutaciones. En general esta asociación no identifica específicamente un linaje o una variante sino a un grupo de linajes que contengan una determinada mutación o marcador molecular.

Metodos de diagnóstico: Todos los laboratorios realizan el diagnóstico de SARS-CoV2 mediante métodos comerciales y solamente 3 de ellos han informado poder realizar dicho diagnóstico mediante sistemas desarrollados “in house”. Esto es importante de cara a posibles desabastecimientos del mercado, tal y como se demostró durante la primera ola de 2020. Hay que aclarar que un posible desabastecimiento puede ser tanto de reactivos como de material fungible. La recomendación realizada en la red de laboratorios se basa en la posibilidad de utilizar diferentes métodos de diagnóstico comerciales o no, o al menos tenerlos evaluados por si existe algún problema de suministro en el futuro. En la mayoría de los laboratorios, el número de muestras que se están investigando, tanto para el diagnóstico como para los cribados y la secuenciación, hace imposible e inviable el procesamiento por métodos no automatizados

Métodos de cribado: En 28 de los 34 laboratorios (82%) se realiza un cribado de las variantes mediante PCRs específicas que identifican mutaciones concretas en el gen de la espícula del virus tal y como se muestra en la Figura 2 y su distribución geográfica en la Figura 3.

Figura 2. Proporción de los laboratorios de la RELECOV que utilizan sistemas de cribado mediante PCR.

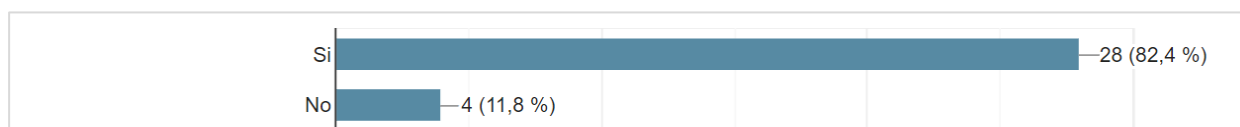


Figura 3. Se muestra la distribución geográfica en nuestro país de los laboratorios que presentan sistemas de cribado por PCR



Tabla 2. Se muestran los métodos utilizados para el cribado, las mutaciones que son capaces de detectar específicamente y el número de laboratorios que los está utilizando

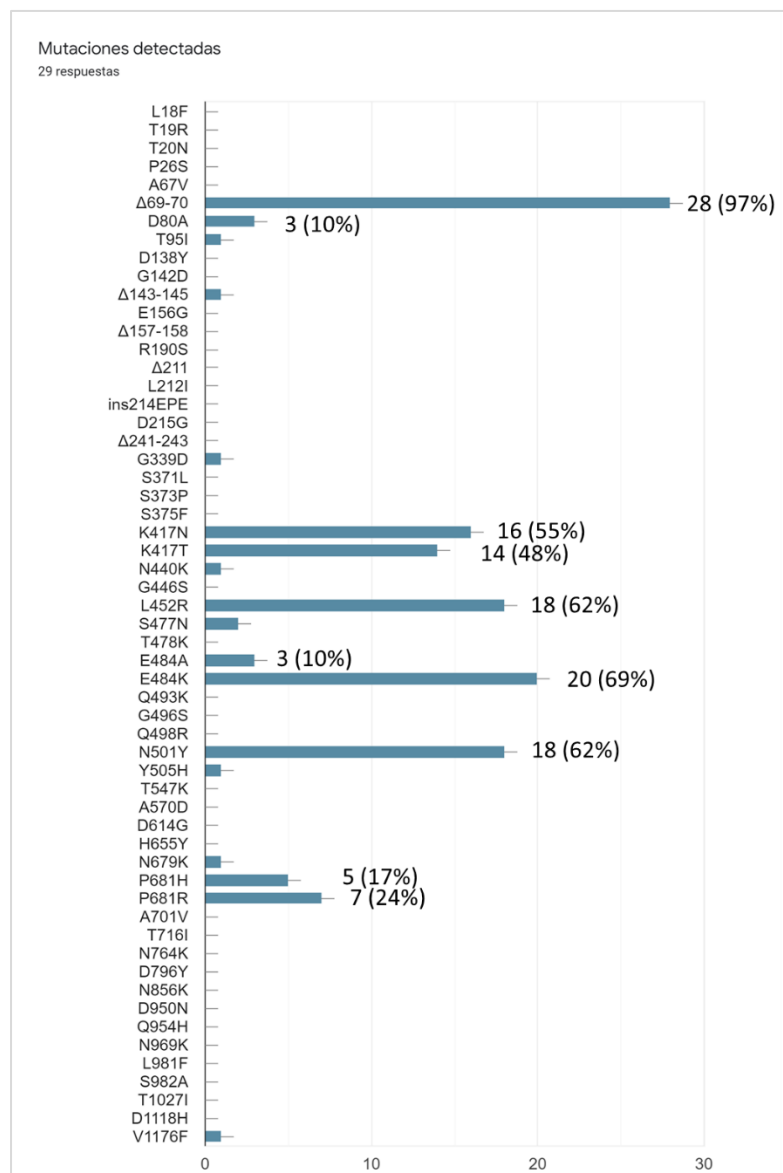
Método de cribado	Mutaciones detectadas	nº
TaqPath COVID-19 RT-PCR Kit (ThermoFisher)	Δ69-70	8
Allplex SARS-CoV2 Variants I, II Assay (Seegene)	Δ69-70, W152C, K417N, K417T, L452R, E484K, N501Y	7
Vircell	Δ69-70, L452R	3
Novaplex SARS-CoV-2 Variants I, II, V Assay (Seegene)	Δ69-70, W152C, K417N, K417T, L452R, L452Q, E484K, F490S, N501Y, P681R	2
Allplex SARS-CoV-2 Variants I, II Assay (Seegene) + Fluorotype Variant IQ	Δ69-70, D80A, K417N, K417T, L452R, S477N, E484K, N501Y, P681R	1
TibMolBiol (Roche) (mutaciones sueltas mayor agilidad)	K417N, L452R, E484A, E484K, N501Y	1
TibMolBiol Ligthmix SARS Spike (Roche) + TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Assay (ThermoFisher)	Δ69-70, K417N, L452R, E484K, N501Y, P681R, V1176F	1
TaqPath COVID-19 RT-PCR Kit (ThermoFisher) + batería de sondas Roche	Δ69-70, K417N, K417T, E484A, E484K, N501Y, N679K, P681H, P681R	1
TaqPath COVID-19 RT-PCR Kit (ThermoFisher) + PCR Variant (Ascires Sistemas Genómicos)	Δ69-70, G339D, K417N, K417T, L452R, E484K, Y505H, P681H, P681R	1
TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR + Custom TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel	Δ69-70, K417T, L452R, S477N, E484K, P681H	1
Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay (Seegene)	Δ69-70, E484K, N501Y	1
SARS-CoV-2 Mutation panel (ThermoFisher) + Allplex SARS-CoV-2 Variants I Assay (Seegene)	Δ69-70, E484K, N501Y, P681R	1
RT-PCR con sondas Taqman específicas para mutaciones	Δ69-70, D80A, T95I, K417N, K417T, L452R, E484K, N501Y, P681H	1
Allplex™ SARS-CoV-2 Master Assay (Seegene)	Δ69-70, E484K, N501Y, P681H	1
"in house"	Δ69-70, Δ143-145, K417N, K417T, L452R, E484A, E484K, N501Y	1

En la Tabla 2 se muestran los sistemas declarados por los laboratorios en el cuestionario. Muchos laboratorios disponen de diferentes sistemas de cribado por PCR.

Como comentario general a la Tabla sería interesante conocer el grado de automatización de los diferentes métodos de cribado. Deberíamos poder conocer si los laboratorios que por ejemplo utilizan las técnicas de Roche las realizan 100% automatizadas en Cobas 6800 o las procesan e interpretan manualmente. Esta cuestión se preguntará específicamente en la siguiente actualización de este informe ya que resulta muy importante conocer la rapidez de generación de resultados frente a una nueva variante con el incremento de casos positivos como el que estamos viviendo en estos momentos con la variante Ómicron.

Algunos laboratorios han declarado el uso de diferentes sistemas de cribado. Estos sistemas están implementados según un algoritmo interno de trabajo en base al uso y rentabilidad de los métodos que en un determinado momento se utilizan para realizar un trabajo concreto. Estos algoritmos son desarrollados por los laboratorios de manera interna y se consultará su puesta en común para conocimiento de toda la red en la siguiente actualización de este informe.

Figura 3. Se presenta la distribución de las mutaciones específicas detectadas de un total de 29 laboratorios que han contestado la pregunta del cuestionario y se presentan las mutaciones específicas de Ómicron y sus sublinajes.



Mutaciones variante Omicron y sublinajes			
B.1.1.529	BA.1	BA.2	BA.3
		T19I	
		L24S	
		del25/27	
A67V	A67V		A67V
del69/70	del69/70		del69/70
T95I	T95I		T95I
G142D	G142D	G142D	G142D
del143/145	del143/145		del143/145
	N211I		N211I
	del212/212	V213G	del212/212
	G339D	G339D	G339D
	S371L	S371F	S371F
	S373P	S373P	S373P
	S375F	S375F	S375F
		T376A	
		D405N	D405N
		R408S	
		K417N	
		N440K	
	S477N	S477N	S477N
	T478K	T478K	T478K
	E484A	E484A	E484A
	Q493R	Q493R	Q493R
	G496S		
	Q498R	Q498R	Q498R
	N501Y	N501Y	N501Y
	Y505H	Y505H	Y505H
T547K	T547K		
D614G	D614G	D614G	D614G
H655Y	H655Y	H655Y	H655Y
N679K	N679K	N679K	N679K
P681H	P681H	P681H	P681H
N764K		N764K	N764K
D796Y	D796Y	D796Y	D796Y
N856K	N856K		
Q954H	Q954H	Q954H	Q954H
N969K	N969K	N969K	N969K
L981F	L981F		

Como se puede apreciar las mutaciones que se pueden identificar en la RELECOV de manera específica corresponden a: del69-70, D80A, T95I, del 143-145, G339D, K417N, K417T, N440K, L452R, S477N, E484A, E484K, N501Y, Y505H, N679K, P681H, P681R, V1176F. Algunas de estas mutaciones solamente se pueden detectar en un único laboratorio.

Para facilitar el análisis y las conclusiones en la Tabla 3 se recogen los porcentajes de frecuencia de las mutaciones que son detectadas por los laboratorios de la RELECOV de las diferentes VOC. Se han señalado aquellos porcentajes que permiten definir esas determinadas mutaciones como definitorias de las variantes. Hay que considerar que dichos porcentajes son orientativos y depende del grado de calidad de las secuencias procedentes de la base de datos GISAID.

Tabla 3. Mutaciones que se pueden detectar mediante la PCRs de cribado y que son características de cada VOC y sus porcentajes de presencia en las secuencias depositadas en GISAID

Variante	del69-70	K417N	K417T	L452R	S477N	E484A	E484K	N501Y	P681H	P681R
Alfa	96%							98%	99%	
Beta		93%					86%	87%		
Delta				97%				0.1%	0.1%	99%
Gamma			95%				95%	95%		
Ómicron	95%				88%	87%		88%	99%	
BA.1	97%	39%			88%	88%		88%	99%	
BA.2		94%			92%	93%		27%	99%	
BA.3	94%	46%		6%	72%	74%		70%	98%	
B.1.1..529	78%	13%		20%	25%	25%		94%	90%	2.5%

CONCLUSIONES:

1. La mayoría de los laboratorios son capaces de detectar la delección 69/70 que está presente en los sublinajes BA.1 y BA.3 aunque no en BA.2, tal y como se muestra en la Figura 3 y en la Tabla 3.
2. Aproximadamente el 50% son capaces de detectar mutaciones en la posición 417.
 - K417T es característica de la variante Gamma.
 - K417N es característica de la variante Beta y ahora de BA.2. Los porcentajes de presencia de esta mutación no llegan al 50% en los sublinajes BA.1 y BA.3. La prevalencia de la mutación K417N depende de la cobertura de secuenciación que se realiza con los primers v4 del protocolo ARTIC que pueden generar malos resultados de cobertura en esta zona. Las estimaciones de la frecuencia de estas mutaciones en base a los datos procedentes de GISAID hay que tomarlos con cautela. La mayoría de las secuencias de BA.1 de España de las últimas dos semanas que hay en GISAID (y que tienen la región bien cubierta) presentan la K417N por lo que probablemente su prevalencia esté infraestimada.

- En el momento actual en el que la variante beta no ha sido detectada se puede considerar con una alta probabilidad de los positivos que presenten esta mutación son variante Ómicron. Además, K417N se detecta en combinación con otras mutaciones/delecciones, del69-70, con lo que la probabilidad de que sea una variante Ómicron, aumenta.
3. Las mutaciones definidas en las posiciones 501 y 681 son compartidas en la variante Alfa. Como se puede ver en la Tabla 3 el porcentaje de secuencias de la variante Delta que contienen N501Y y P681H es muy bajo 0.1%. En la situación actual los laboratorios capaces de detectar P681H pueden sospechar de que se trata de la variante Ómicron ya que la variante Delta presenta mayoritariamente como componente de las mutaciones características P681R.
 4. Solamente 3 laboratorios son capaces de detectar específicamente la mutación E484A que es característica de los 3 sublinajes de la variante Ómicron aunque también se ha detectado como mutación específica del sublinaje de Delta AY.43. En un principio se pensaba que esta mutación podría indicar la presencia de Ómicron pero el sublinaje Delta AY.43 presentó una enorme circulación en nuestro país hasta los meses de noviembre-diciembre. Una vez se haya evidenciado que la variante Ómicron ha desplazado totalmente a la variante Delta, los resultados positivos de las PCRs de cribado que detectan E484A podrán ser considerados como variante Ómicron.
 5. No existe un sistema implementado en la red que de manera indiscutible pueda confirmar con las amplificaciones de determinadas mutaciones la presencia de Ómicron. Sin embargo, la identificación de Ómicron por PCR de cribado se está haciendo convenientemente en al menos 16 laboratorios según los datos recogidos en el cuestionario. En el contexto epidemiológico actual es inviable secuenciar todas las muestras positivas.
 6. Los sistemas que permitan de manera ágil la detección personalizada de las mutaciones específicas de las diferentes variantes y sus sublinajes presentan una ventaja añadida dada su versatilidad.

ANEXO-CUESTIONARIO ENVIADO

Fecha:

Laboratorio:

Responsable del Laboratorio:

Nombre

Dirección

email

Persona/s que rellena el cuestionario:

Nombre

Dirección

Email

-
- 1.** Tipo de muestra clínica utilizada para la detección
 - a.** Orofaringeo/nasofaringeo/faríngeo
 - b.** Biopsia
 - c.** Esputo
 - d.** Otras (especificar)
 - 2.** Llega inactivada al laboratorio: Si/No
 - 3.** Inactivación de la muestra en el laboratorio
 - a.** Buffer de extracción/lisis/inactivación
 - b.** Calor
 - c.** Otros (especificar)
 - 4.** Tipo de extracción de RNA
 - a.** Ácidos nucleicos totales: Si/No
 - b.** Método automático: Si/No
 - c.** Tipo y Marca de Extractor
 - d.** Kit de Reactivos para la extracción
 - 5.** Detección para el diagnóstico de SARS-CoV-2
 - a.** Metodo comercial: Si/No/Especificar
 - b.** Metodo in house: Si/No
 - 6.** Detección para screening de variantes por PCR de mutaciones específicas en gen S:
Si/No/Especificar
 - 7.** Mutaciones detectadas:

L18F

T19R

T20N

P26S

A67V

Δ69-70

D80A

T95I

D138Y

G142D

Δ143-145

E156G
Δ157-158
R190S
Δ211
L212I
ins214EPE
D215G
Δ241-243
G339D
S371L
S373P
S375F
K417N
K417T
N440K
G446S
L452R
S477N
T478K
E484A
E484K
Q493K
G496S
Q498R
N501Y
Y505H
T547K
A570D
D614G
H655Y
N679K
P681H
P681R
A701V
T716I
N764K
D796Y
N856K
D950N
Q954H
N969K
L981F
S982A
T1027I
D1118H
V1176F
Otras:

8. Secuenciación completa de virus:

a. Método comercial: Si/No/Especificar

b. Método in house: Si/No

9. Uso de Protocolo Artic: Si/No/Especificar

- 10.** En su experiencia, en su laboratorio se pueden detectar fallos en la amplificación de zonas que incluyen mutaciones definitorias de linaje: Si/No/Especificar versión de los primers/Especificar las mutaciones que no se detectan