

INFORME SARS-CoV-2

Sociedad Argentina de Virología
División de la Asociación Argentina de Microbiología

26 de marzo de 2020
(versión corregida)



División de la Asociación Argentina de
Microbiología



Deán Funes 472 (C1214ADD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Argentina. TEL (5411) 4932-8858/894

COMISIÓN DIRECTIVA
SOCIEDAD ARGENTINA DE
VIROLOGÍA

Presidente

Lucía V. Cavallaro

Vicepresidente

Víctor Romanowski

Secretaria

Inés Zapiola

Prosecretaria

Andrea Mangano

Tesorera

Nora López

Protesorero

Mariano Pérez Filgueira

Vocal Titular 1º

Pamela Valva

Vocal Titular 2º

Nadia Fuentealba

Vocal Titular 3º

Viviana Ré

Vocal Titular 4º

Silvana Levis

Vocal Suplente 1º

Sandra Cordo

Vocal Suplente 2º

Juan Stupka

Vocal Suplente 3º

Ana Laura Cavatorta

Vocal Suplente 4º

Juan Manuel Carballada

COMISIÓN DIRECTIVA
ASOCIACIÓN ARGENTINA
DE MICROBIOLOGÍA

Presidente

Gustavo Giusiano

Vicepresidente

Adriana Sucari

Secretaria

Estefanía Benedeti

Secretaria de actas

Inés García de Salamone

Prosecretario

Juan Stupka

Tesorero

Roberto Suárez Álvarez

Protesorero

Marina Bottiglieri

Vocal Titular 1º

María Cecilia Freire

Vocal Titular 2º

Oscar Alberto Taboga

Vocal Titular 3º

Paula Gagetti

Vocal Titular 4º

Ricardo Rodríguez

Vocal Suplente 1º

Manuel Gómez Carrillo

Vocal Suplente 2º

Marcelo Berretta

Vocal Suplente 3º

Fabiana Guglielmone

Vocal Suplente 4º

Leonora Nusblat

Vocal Suplente 5º

Pablo Power

Comisión revisora de cuentas

María I. G. Fernández

María Mercedes Ávila

*Este documento fue elaborado por los miembros de la
Comisión Directiva de la Sociedad Argentina de Virología
y la colaboración de la Dra. Alejandra Victoria Capozzo.*

Contenido

Coronavirus	6
Características de los Coronavirus	6
Clasificación, Estructura, composición de la partícula viral, organización del genoma y proteínas codificadas.....	6
Proteínas virales	8
Proteína S	8
Proteína N o proteína de la nucleocápside	8
Proteína de envoltura, E	8
Proteína de membrana, M	9
Proteínas no estructurales y accesorias.....	9
Ciclo de Replicación de los Coronavirus	10
Análisis de secuencias	13
Implicancias biológicas	14
Análisis filogenético.....	15
Patogenia de los coronavirus	17
Diagnóstico de laboratorio.....	19
Recolección y envío de muestras	19
Diagnóstico de COVID-19.....	21
Tratamiento	24
Vacunas contra coronavirus.....	24
Vacunas contra coronavirus humanos.....	25
Candidatos vacunales para el SARS-CoV-2	27
Desafíos para el desarrollo de vacunas para el SARS-CoV-2.....	28

Coronavirus

Los coronavirus son virus envueltos cuyo genoma consiste en una única molécula de RNA simple cadena de sentido positivo. Pertenecen a una gran familia de virus (*Coronaviridae*) que infectan aves y varios mamíferos, incluyendo camélidos, murciélagos, civetas, ratas, ratones, perros, gatos y humanos. Ocasionalmente, los coronavirus pueden emerger como patógenos mediante un salto a una especie hospedadora diferente. Por ejemplo, entre octubre 2016 a mayo 2017, en la provincia de Guangdong, China, tuvo lugar un brote de diarrea aguda en cerdos asociado a un 90 % de mortalidad en crías. El análisis molecular indicó que el causante del brote fue el coronavirus HKU2 de murciélagos (Cui et al., 2019). En humanos, algunos miembros de la familia -229E, OC43, NL63, y HKU1- son conocidos desde hace décadas por causar síntomas de resfrío común (Su et al., 2016). Luego del brote del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) en la provincia de Guangdong, China, en 2002, los coronavirus han sido reconocidos como causantes de graves infecciones respiratorias e intestinales. El agente etiológico del SARS (SARS-CoV) se extendió a cinco continentes a través de rutas aéreas infectando 8.098 personas y causando 774 muertes. En 2012 emergió otro coronavirus (MERS-CoV) en la península arábiga y fue exportado a 27 países, donde causó un total de 2.494 infecciones y 88 muertes. Un coronavirus previamente desconocido, denominado SARS-CoV-2, fue descubierto en diciembre de 2019 en Wuhan, provincia de Hubei, China. El virus fue rápidamente aislado y su genoma secuenciado en enero 2020 (Zhou et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la epidemia como emergencia de salud pública a nivel internacional el 30 de enero 2020. SARS-CoV-2 es el agente causal de la epidemia de neumonía atípica (COVID-2019; CoronaVirus Disease 2019) que ha afectado más de 189 países en los cinco continentes, causando, hasta el día 26 de marzo, 462.684 casos confirmados y 20.834 muertes a nivel global (<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200326-sitrep66-covid-19.pdf>). Si bien existen decenas de compuestos en evaluación, hasta el momento, no existen terapias antivirales específicas ni vacunas disponibles contra el nuevo coronavirus SARS-CoV-2.

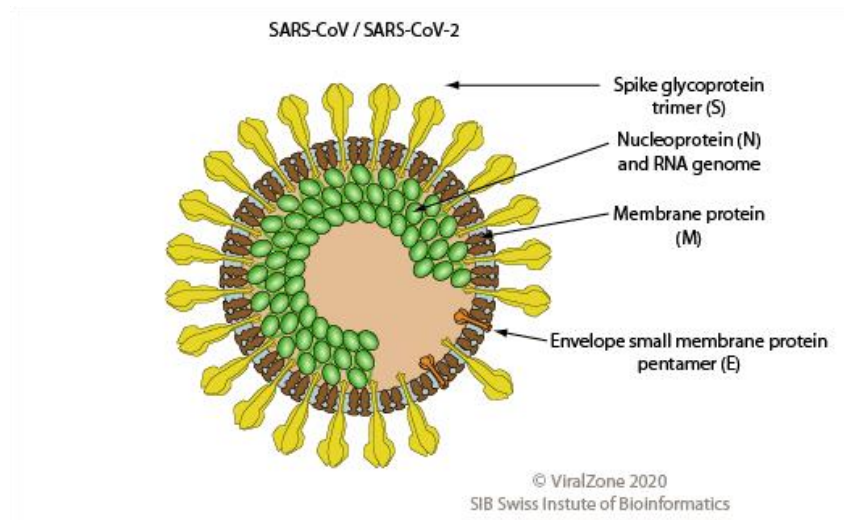
Características de los Coronavirus

Clasificación, Estructura, composición de la partícula viral, organización del genoma y proteínas codificadas

Los virus de la familia *Coronaviridae* (orden *Nidovirales*) se agrupan en dos subfamilias, *Torovirinae* y *Coronavirinae*. Los miembros de la subfamilia *Coronavirinae*, en la que nos detendremos, se clasifican en tres géneros: *Alpha-*, *Beta-*, y *Gammacoronavirus* de acuerdo a sus propiedades antigénicas y relación filogenética. Casi todos los alfa- y betacoronavirus (género que comprende al virus SARS-CoV) tienen hospedadores mamíferos, mientras que los gammacoronavirus infectan generalmente aves. A partir de la emergencia del SARS, en 2002 se iniciaron trabajos de vigilancia a nivel molecular, que llevaron a describir numerosos coronavirus desconocidos previamente, principalmente en murciélagos ((Masters and Perlman, 2013); Sun et al., 2020; Cui et al., 2019).

Las partículas de coronavirus son mayormente esféricas, con rango de tamaño de 50 a 200 nm y un diámetro promedio de 118-136 nm. Las espículas características de esta familia emergen de la envoltura en la superficie del virión. Rodeada por la envoltura viral, se encuentra la nucleocápside, formada por el genoma viral al que se encuentran unidas múltiples copias de la proteína N (Fig. 1). La nucleocápside adopta una estructura helicoidal y presenta forma de ovillo. En la envoltura se insertan las proteínas virales S, E y M.

Figura 1. Estructura de la partícula viral: esquema del virión envuelto en el que se identifican las principales proteínas estructurales (tomado de <https://viralzone.expasy.org/764>)



El virus posee un genoma RNA de simple cadena de polaridad positiva, de 26-32 kb de longitud. A partir de esta molécula se traducen al menos 27 proteínas, incluidas 16 proteínas no estructurales y 4 proteínas estructurales, necesarias para cumplir el ciclo de replicación completo (Fig. 2) (Masters and Perlman, 2013).

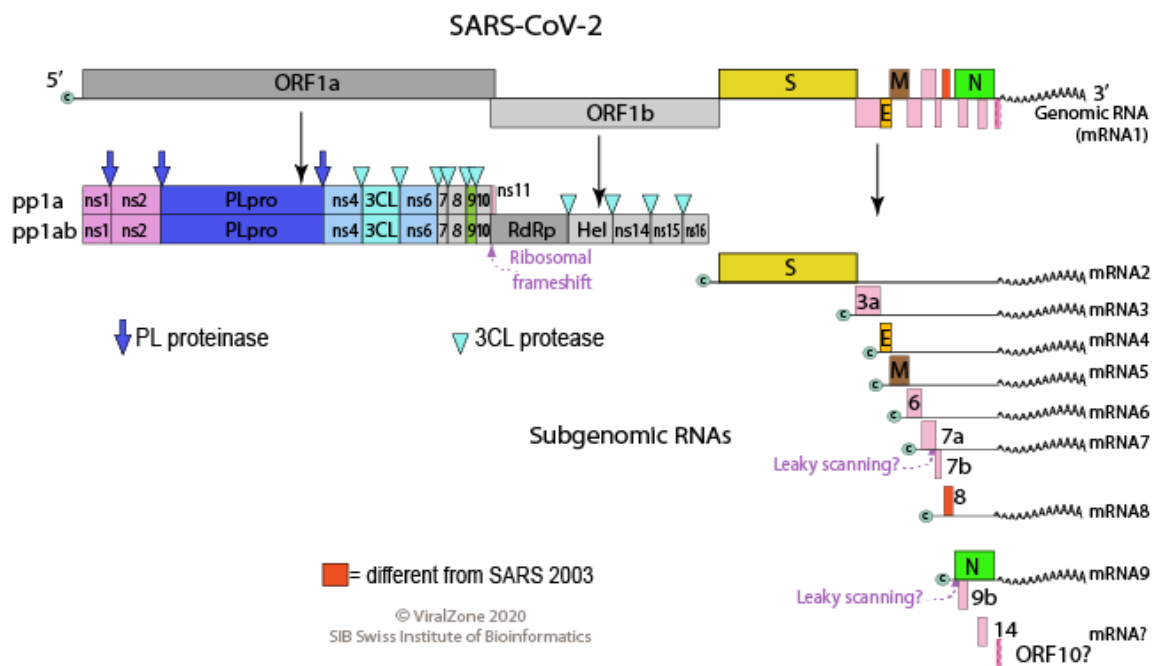


Figura 2. Genoma viral y expresión de genes. Esquema del RNA genómico que funciona como mRNA1 y codifica una poliproteína (se muestran los sitios de clivaje proteolítico con flechas y triángulos). También se esquematizan los mRNA subgenómicos. Por ejemplo, la proteína S, que forma la estructura de las proyecciones en forma de espiga (*spike*) de la partícula viral se traduce del mRNA2. (<https://viralzone.expasy.org/8996>)

Proteínas virales

Las proteínas que se ensamblan para formar las estructuras del virión y aquellas que no son estructurales provienen del procesamiento proteolítico de una poliproteína traducida a partir del RNA genómico (mRNA1) y otras son productos de traducción individuales a partir de una serie de mRNA subgenómicos (Figuras 2 y 3).

Proteína S

La glicoproteína S constituye las espículas (largo 16 a 21 nm para SARS-CoV-2) que se proyectan en la superficie del virión y juega un papel central en la entrada a la célula blanco. La proteína S comprende una subunidad (N)-terminal denominada S1 y una subunidad C-terminal denominada S2. En el caso de SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 la proteína tiene entre 1104 a 1273 aminoácidos (Fig. 1) (Fields Virology, 2013).

Las subunidades S1 y S2 son generadas mediante el clivaje de S por una proteasa celular de tipo Furina. El sitio de clivaje es un pentapéptido altamente básico. En la subunidad S1 se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD, *receptor-binding domain*). La subunidad S2 contiene el péptido de fusión, responsable de la fusión de las membranas viral y celular, durante la entrada del virus a la célula, así como de la formación de sincicios, que puede producir este virus en la fase tardía de la infección de células en cultivo o en la infección *in vivo*. S1 es muy variable entre los distintos coronavirus, mientras que S2 es muy conservado. La región de S1 que hace contacto con el receptor celular (RBD) difiere entre diferentes coronavirus, pudiendo involucrar el dominio N-terminal o el dominio C terminal ((Masters and Perlman, 2013); Schoeman, et al., 2020; Li 2016).

Proteína N o proteína de la nucleocápside

La proteína N (43 a 50 kDa) se une a lo largo de todo el genoma viral conformando la nucleocápside helicoidal. N contiene 2 dominios, ambos capaces de reconocer el RNA viral. Esta proteína es fosforilada en un número discreto de serinas y treoninas (Wang et al., 2003). Aunque el rol de la fosforilación aún no ha sido determinado, se ha sugerido que tendría una función regulatoria. Por ejemplo, se ha encontrado que la fosforilación dispara un cambio conformacional en N aumentando su afinidad por el RNA viral. Además, hay evidencia que indica que N se une a nsp3 (proteína no estructural 3) para dirigir el genoma al complejo de replicación y transcripción, así como el empaquetado de la nucleocápside. Se ha reportado también, que N funciona como antagonista de la producción de interferón y que posee una actividad supresora del sistema de silenciamiento por RNAs de interferencia de la célula hospedadora. Otra importante función es su asociación con otra proteína estructural, la proteína M (Fehr and Perlman, 2015; Hurst et al., 2009; Cui et al., 2015; Cong et al., 2020).

Proteína de envoltura, E

Es un polipéptido pequeño que se encuentra en cantidades limitadas en la envoltura viral. Durante el ciclo de replicación, se expresa abundantemente dentro la célula infectada, pero solo una pequeña cantidad se incorpora al virión. E se encuentra mayormente localizada en el sitio de tráfico intracelular, el retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, y el compartimiento intermedio RE-Golgi (*endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment*, ERGIC), donde participa en el ensamblado de la partícula viral. Se considera que esta proteína es muy importante en la producción y maduración de la partícula viral (Schoeman, et al., 2020).

Proteína de membrana, M

Es la proteína estructural más abundante, y la responsable de darle la forma al virión. El monómero M, que oscila entre 25 y 30 kDa, es una proteína de membrana que está insertada en la envoltura a través de tres dominios transmembrana. El extremo amino constituye un ectodominio pequeño, mientras que el endodominio C-terminal constituye la mayor parte de la molécula y está situada en el interior del virión o en la cara citoplasmática de la membrana intracelular. El ectodominio puede ser modificado por glicosilación, lo cual influye, tanto en el tropismo de los órganos a infectar, como en la capacidad inductora de interferón (IFN) de algunos coronavirus. Dado que M es capaz de interactuar con todas las demás proteínas estructurales, y se ha demostrado que la sola coexpresión de M y E es suficiente para la liberación de partículas de tipo viral (VLPs) desde la membrana de células eucariotas, la proteína M es considerada el motor del ensamblado de las partículas virales ((Masters and Perlman, 2013); Perrier et al., 2019).

Proteínas no estructurales y accesorias

La mayoría de las funciones específicas que cumplen las proteínas no-estructurales (nsps, nsp1 a nsp16) durante el proceso de replicación de los coronavirus han sido descriptas. Entre ellas se destacan las de RNA polimerasa RNA-dependiente, helicasa, metil-transferasa y endo-ribonucleasa (ver Fig. 3). Sin embargo, las funciones de algunas de ellas aún son desconocidas o solo han sido sugeridas por estudios bioinformáticos (Snijder et al., 2016).

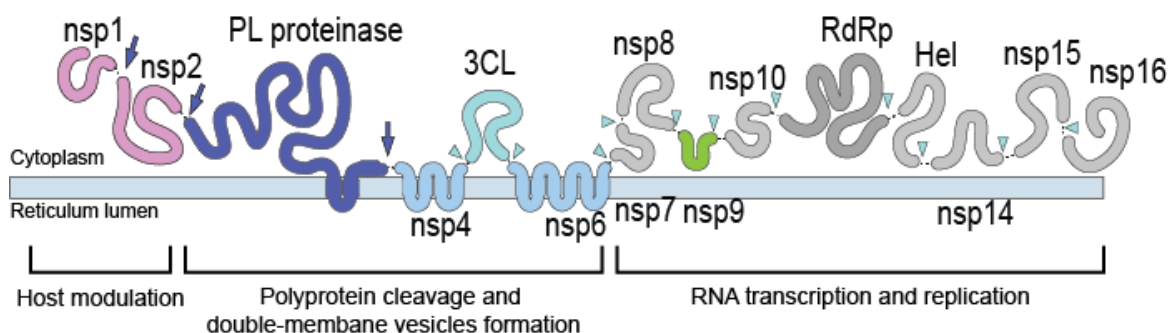


Figura 3. Topología de los productos de procesamiento de la poliproteína. Se muestra la orientación de las proteínas que se procesan a partir de la poliproteína traducida del mRNA1 en relación a la membrana del RE. También se indica su función en el ciclo viral. (<https://viralzone.expasy.org/8996>)

Además de las nsps y las proteínas estructurales, diferentes CoV codifican proteínas denominadas “accesorias” como HE, 3a/b y 4a/b. Los ORF que las codifican se ubican entre los genes de las proteínas estructurales. La mayoría de las proteínas accesorias son no estructurales, aunque en algunos casos, como las codificadas por los ORFs 3a, 6, 7a, 7b, y 9b de SARS-CoV han sido encontradas en la partícula viral (Masters and Perlman, 2013). Las proteínas accesorias no son necesarias para la replicación viral en cultivos celulares. Algunas de las funciones descritas incluyen actividad hemaglutinina-esterasa (HE) y actividad supresora del sistema inmune innato (Rabouw et al., 2016; Matthews et al., 2014; Yang et al., 2014).

Bibliografía

- Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthe M, V'kovski P, Kriegenburg F, Thiel V, de Haan CAM, Reggiori F (2020). Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *J Virol*. 2020 Jan 31;94(4). pii: e01925-19. doi: 10.1128/JVI.01925-19.
- Coronavirus disease 2019 (COVID-19) (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200318-sitrep-58-covid-19.pdf?sfvrsn=20876712_2).
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181–92.
- Cui, L., et al., The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *J Virol*, 2015. 89(17): p. 9029-43.
- Fehr, A.R. and S. Perlman, Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 2015. 1282: p. 1-23.
- Hurst, K.R., C.A. Koetzner, and P.S. Masters, Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol*, 2009. 83(14): p. 7221-34.
- Li F. 2016. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 29;3(1):237-261.
- Matthews KL, Coleman CM, van der Meer Y, Snijder EJ, Frieman MB (2014) The ORF4b-encoded accessory proteins of Middle East respiratory syndrome coronavirus and two related bat coronaviruses localize to the nucleus and inhibit innate immune signalling. *J Gen Virol* 95:874–882.
- Masters PS, Perlman S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 825-58.
- Perrier A, Bonnin A, Desmarests L, Danneels A, Goffard A, Rouillé Y, Dubuisson J, Belouzard S (2019) The C-terminal domain of the MERS coronavirus M protein contains a trans-Golgi network localization signal. *J Biol Chem*. 2019 Sep 27;294(39):14406-14421.
- Rabouw HH, Langereis MA, Knaap RC, Dalebout TJ, Canton J, Sola I, Enjuanes L, Bredenbeek PJ, Kikkert M, de Groot RJ, van Kuppeveld FJ (2016) Middle East respiratory coronavirus accessory protein 4a inhibits PKR-mediated antiviral stress responses. *PLoS Pathog* 12: e1005982.
- Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J*. 2019 May 27;16(1):69. Review.
- Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res*. 2016; 96:59-126.
- Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016; 24: 490-502.
- Sun et al., COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. *Trends in Molecular Medicine*. March 21, 2020.
- Wang J, Ji J, Ye J, Zhao X, Wen J, Li W, Hu J, Li D, Sun M, Zeng H, Hu Y, Tian X, Tan X, Xu N, Zeng C, Wang J, Bi S, Yang H. The structure analysis and antigenicity study of the N protein of SARS-CoV. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2003;1(2):145-54.
- Yang Y, Zhang L, Geng H, Deng Y, Huang B, Guo Y, Zhao Z, Tan W (2013) The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists. *Protein Cell* 4:951–961

Ciclo de Replicación de los Coronavirus

Los coronavirus entran a la célula blanco por medio del contacto entre la proteína S y un receptor ubicado en la membrana celular. El receptor para el virus SARS-CoV es la proteína ACE2, por sus siglas en inglés *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (Li et al., 2003). Esta proteína posee actividad carboxipeptidasa, y está involucrada en la regulación de la presión sanguínea y la función cardíaca. La ACE2 cliva la angiotensina II para generar angiotensina 1-7, molécula que produce vasodilatación y disminuye la presión arterial. En humanos, ACE2 se expresa en células epiteliales de pulmón e intestino delgado, los cuales son los blancos

primarios de SARS-CoV, así como en corazón, riñón y otros tejidos (Masters and Perlman, 2013). Estudios estructurales de la superficie de unión entre S y ACE2 han demostrado que la mutación de solo 2 residuos aminoacídicos en el RBD de SARS-CoV de civeta (hospedador intermediario) fue suficiente para que esta proteína ganara la habilidad de unirse al ACE2 de humanos, dando sustento estructural a la hipótesis del salto de especie (Li, 2008; Li et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que ACE2 también funciona como receptor para el nuevo SARS-CoV-2 (Zhang et al., 2020). Un estudio publicado por Cao et al. (2020) sugiere que variantes genéticas de la proteína ACE2 en las distintas etnias poblacionales podrían presentar distintos niveles de afinidad y reconocimiento por SARS-CoV-2; y así explicar en parte la gravedad de la enfermedad en los distintos continentes.

Luego del reconocimiento del receptor, los coronavirus ingresan al citoplasma por endocitosis a partir del re-arreglo estructural de la proteína S en condiciones de pH ácido.

Ésto permite que el péptido de fusión quede expuesto, promoviendo la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular del endosoma tardío y liberando así la nucleocápside al citoplasma celular. Alternativamente, estos virus pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática celular por un mecanismo dependiente de una proteasa celular que produce el corte proteolítico en la proteína S del virus y permite exponer el péptido de fusión (Milewska et al., 2018; Wang et al., 2019).

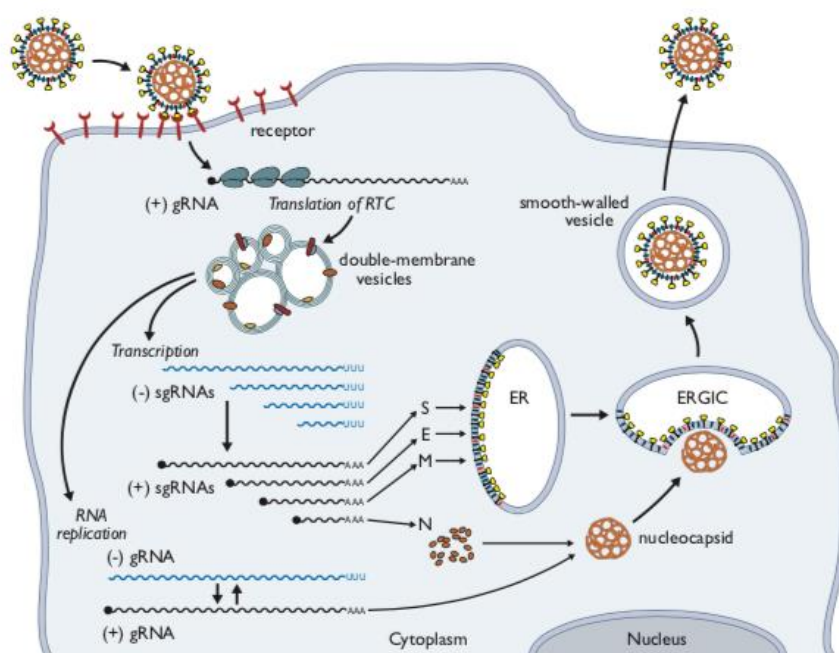


Figura 4. *Ciclo de replicación de los coronavirus.* Luego del reconocimiento del receptor celular, se produce el ingreso y desnudamiento de la partícula dentro del citoplasma. A partir del genoma (+gRNA) es traducido el gen de la replicasa viral. El autoclivaje de las poliproteínas pp1a y pp1ab genera las proteínas no estructurales que conforman el RTC (complejo de la replicasa-transcriptasa). Una vez sintetizados los intermediarios replicativos (-sgRNA) son sintetizados los RNA genómicos y subgenómicos (+sgRNA), a partir de los cuales se expresan, asociadas al retículo endoplasmático (ER), las proteínas estructurales S, E y M. El ensamblado de la partícula se produce en el compartimiento ERGIC. Las nuevas partículas infectivas son liberadas al medio extracelular mediante exocitosis. Ver más detalles en el texto.

Una vez liberada la nucleocápside al citoplasma comienza la traducción del gen de replicasa viral a partir del genoma viral, el cual funciona como un mRNA celular ya que posee estructura cap en el extremo 5' y cola de poliA en el extremo 3' (Fig. 4). El gen de la replicasa consiste en dos grandes ORF (rep 1a y rep 1b) que se superponen en una pequeña región y se traducen mediante un mecanismo intrincado de desplazamiento (*frameshifting*) por parte de los ribosomas celulares, para dar los polipéptidos **pp1a** (440–500 kDa) y **pp1ab** (740–810 kDa). A partir de estos y mediante un proceso autoproteolítico se generan las proteínas no estructurales (denominadas nsp1 a nsp16) necesarias para formar el complejo de la replicasa-transcriptasa (RTC) y completar un ciclo de infección exitoso (Brierley et al., 1989; Masters, 2006).

Río abajo del gen de la replicasa se encuentran los genes estructurales S, M, E y N; que serán expresados a partir de mRNA subgenómicos, una vez que el RTC está conformado y activo. Las factorías replicativas de los coronavirus provocan remodelamientos de estructuras membranosas muy complejas en las células infectadas (RTC). Extensivas y morfológicamente diversas redes de vesículas, conectadas con el RE permiten la compartimentalización del proceso de síntesis del RNA viral protegiéndolo de ribonucleasas y evadiendo la vigilancia de la respuesta inmune innata del hospedador (Knoops et al., 2008).

Las proteínas estructurales M, S y E son expresadas asociadas al RE desde donde serán transportadas hacia el sitio de ensamblado, el compartimiento intermedio RE-Golgi (*endoplasmic reticulum-Golgi interediate compartment, ERGIC*). Allí, junto con las nucleocápsides, forman las nuevas partículas virales que son transportadas hacia la membrana plasmática en el interior de vesículas de pared lisa y liberadas por exocitosis (De Haan et al., 2005; Hogue et al., 2008; Masters, 2006). En algunos coronavirus, una fracción de S no ensamblada en partículas llega a la membrana plasmática, donde puede mediar la fusión de la membrana de células infectadas con la de células vecinas no infectadas, permitiendo al virus escapar a la acción de anticuerpos neutralizantes y dando lugar a la formación de sincicios (Masters and Perlman, 2013).

Bibliografía

- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426: 450–454.
- Li F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *J Virol* 2008; 82: 6984–6991.
- Li W, Zhang C, Sui J, et al. Receptor and viral determinants of SARS- coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* 2005; 24: 1634–1643.
- Cao Yanan, Lin Li, Zhimin Feng, Shengqing Wan, Peide Huang, Xiaohui Sun, Fang Wen, Xuanlin Huang, Guang Ning & Weiqing Wang. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discovery* 6: 11, 2020
- Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020 Mar 3. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9.
- Milewska A, Nowak P, Owczarek K, Szczepanski A, Zarebski M, Hoang A, Berniak K, Wojarski J, Zeglen S, Baster Z, Rajfur Z, Pyrc K. Entry of Human Coronavirus NL63 into the Cell. *J Virol.* 2018 Jan 17;92(3). pii: e01933-17. doi: 10.1128/JVI.01933-17.
- Wang H, Yuan X, Sun Y, Mao X, Meng C, Tan L, Song C, Qiu X, Ding C, Liao Y. Infectious bronchitis virus entry mainly depends on clathrin mediated endocytosis and requires classical endosomal/lysosomal system. *Virology.* 2019; 528:118-136. doi: 10.1016/j.virol.2018.12.012.
- Brierley I, Digard P, Inglis SC. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudo- knot. *Cell* 1989; 57: 537–547.
- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 2006; 66:193–292.

- Masters PS, Perlman S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 825-58.
- Knoops K, Kikkert M, Worm SH, et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. PLoS Biol 2008;6: e226.
- De Haan CA, Rottier PJ. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. Adv Virus Res 2005; 64: 165-230.
- Hogue BG, Machamer CE. Coronavirus structural proteins and virus assembly. In: Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ, eds. Nidoviruses. Washington, DC: ASM Press; 2008:179-200.

SARS-CoV-2: Identificación y análisis filogenético

En diciembre 2019, varios pacientes de tres hospitales de Wuhan, que tenían diagnóstico de neumonía viral sin causa identificada y en los que no pudo ser detectado ninguno de los virus respiratorios conocidos, pudieron ser asociados epidemiológicamente por haber concurrido a un mercado de productos de mar en Wuhan, provincia de Hubei, China, donde se comercializan gran número de especies animales.

A partir de las muestras de lavado broncoalveolar de dichos pacientes se logró extraer el material genético, se aisló el virus en una línea celular de epitelio de vías aéreas humana (*human airway epithelial*, HAE) y se obtuvo la secuencia genómica completa. El virus fue denominado inicialmente 2019-nCoV y más tarde SARS-CoV-2 por el ICTV (Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020; Gorbalenya et al., 2020).

Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias de SARS-CoV-2 mostró al menos 12 regiones codificantes predichas incluyendo 1ab, S, 3, E, M, 7, 8, 9, 10b, N, 13, y 14 en el genoma viral (Figura 2). La disposición de dichas regiones indica que el virus posee una organización genómica similar a las cepas de murciélago: bat-SL-CoVZC45 y bat-SL-CoVZXC21 y al SARS-CoV (Figuras 5 y 6).

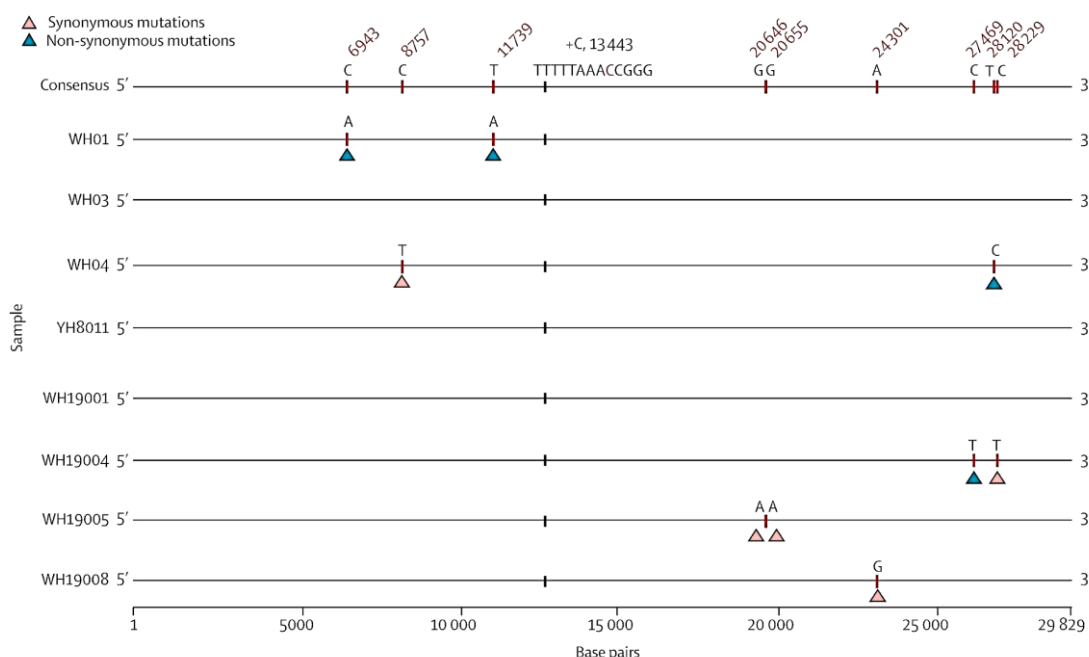


Figura 5. Comparación de secuencias y organización genómica del SARS-CoV-2. Esquema de las secuencias de ocho genomas completos de SARS-CoV-2, de 29829 pb de longitud, donde se indican las posiciones divergentes. (Adaptado de Lu R et al, 2020).

La comparación de secuencias aminoacídicas reveló una alta similitud (95% –100%) entre la mayoría de las proteínas de SARS-CoV-2 y las de SARS-CoV (Lu R et al., 2020). Sin embargo, dos proteínas (**orf8** y **orf10**) en SARS-CoV-2 no tienen proteínas homólogas en SARS-CoV. La proteína Orf8 del SARS-CoV-2 no contiene el dominio o motivo funcional de agregación VLTVL (aminoácidos 75-79) presente en el orf8b de SARS-CoV, asociado a la activación de las vías de estrés intracelular e inflammasoma.

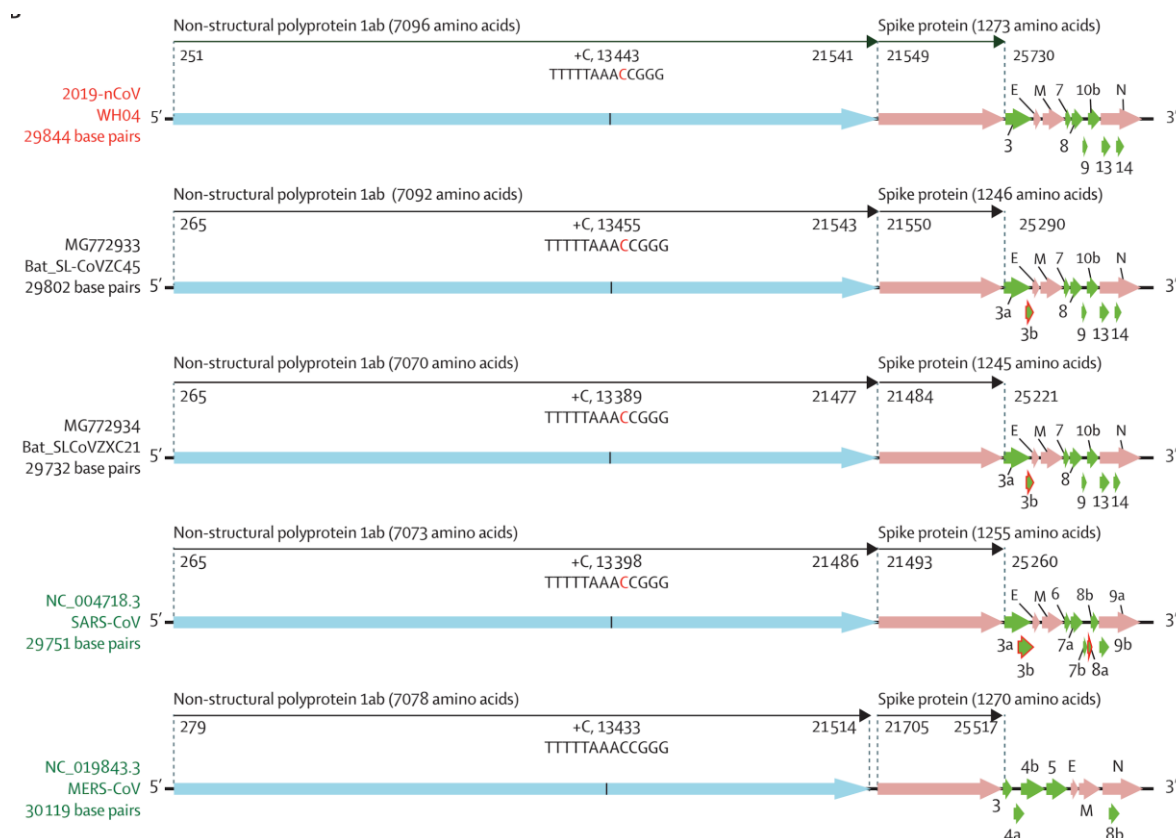


Figura 6. Comparación de secuencias y organización genómica del SARS-CoV-2. Organización de las regiones codificantes de SARS-CoV-2 (indicado como 2019-nCoV), bat-SL-CoVZC45, bat-SL-CoVZXC21, SARS-CoV, y MERS-CoV. Únicamente se muestran los ORF mayores a 100 nt. (Adaptado de Lu R et al, 2020).

Implicancias biológicas

Como se describió anteriormente, existe evidencia experimental que sugiere que el nuevo virus podría usar el mismo receptor que SARS-CoV, la proteína ACE2. Sin embargo, el sitio de unión al receptor (RBD) localizado en el fragmento S1 de la proteína S, en SARS-CoV-2, presenta cambios en posiciones claves para su unión a ACE2 (aa Asn439, Asn501, Gln493, Gly485 y Phe 486), respecto a la secuencia de SARS-CoV (Fig. 5). Otra diferencia notable es que SARS-CoV-2 posee un largo de espícula mayor a la de los coronavirus de murciélago cercanos, y que SARS-CoV y MERS-CoV.

Es interesante mencionar que SARS-CoV-2 presenta un motivo polibásico entre S1 y S2, que es reconocido por Furina y que no está presente en la proteína S de los virus de murciélago o en la S de SARS-CoV (Fig. 7). La capacidad de los coronavirus de adquirir nuevos sitios de clivaje para proteasas tales como la furina, y otras proteasas ampliamente distribuidas en células humanas, sugiere una capacidad adaptativa particular, y podría estar relacionado con la capacidad infectiva de este nuevo virus.

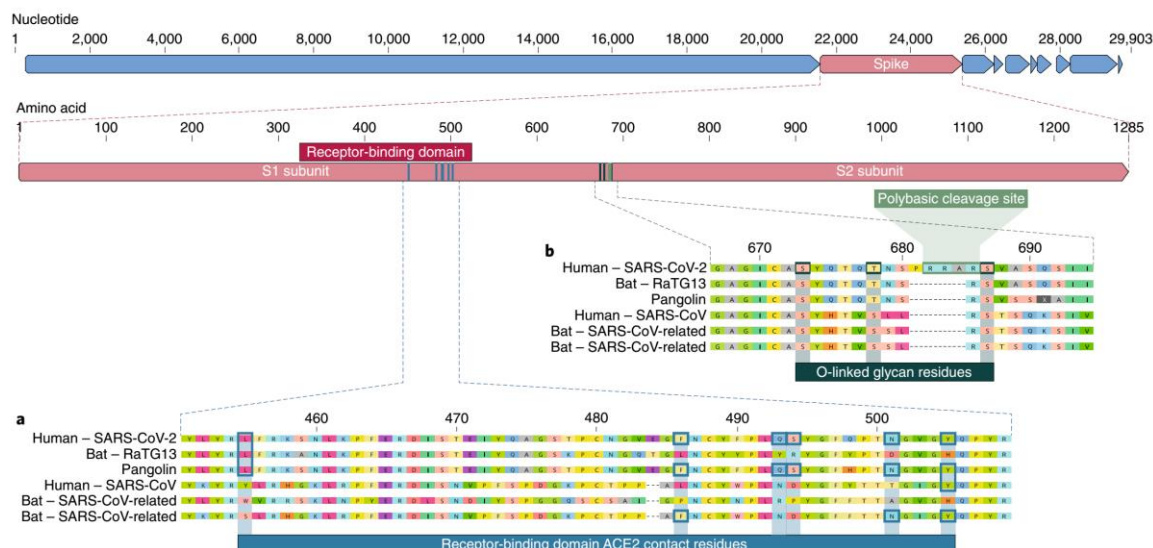


Figura 7. Comparación de secuencias de la proteína S entre distintos CoV. El esquema superior muestra el genoma completo, la posición en la secuencia de aminoácidos del RBD y el sitio polibásico de clivaje. **(a)** Mutaciones en el RBD de la proteína de la espícula S1 de SARS-CoV-2. La proteína S de SARS-CoV-2 (barra roja arriba) se alineó con la de virus emparentados (SARS-CoV-like y SARS-CoV). Los residuos claves que hacen contacto con ACE2 se marcan con cajas azules en SARS-CoV-2 y virus relacionados. **(b)** Sitio polibásico de clivaje en la proteína S de SARS-CoV-2 que está ausente en virus relacionados. (Modificado de Andersen et al., 2020).

Análisis filogenético

El análisis filogenético de la secuencia de SARS-CoV-2, realizado con secuencias de genomas de referencia muy relacionados, así como secuencias representativas de los betacoronavirus, muestra 5 subgéneros formados con ramas que tienen muy buen soporte estadístico, y permite clasificar al nuevo virus dentro del subgénero *Sarbecovirus*. Las diferencias en la secuencia de la proteína S determinan que SARS-CoV 2 y SARS-CoV agrupen en clados diferentes. A nivel del genoma completo el SARS-CoV-2 es filogenéticamente más cercano a otros coronavirus que infectan murciélagos (bat SL CoVZC45 y bat SLCov ZXC21) que al SARS-CoV (Fig. 8).

El análisis filogenético refuerza la idea que los murciélagos son un reservorio para los coronavirus, y posiblemente para SARS-CoV-2 en particular (Li et al., 2005; Lu et al., 2020; Menachery et al., 2015; Anthony et al., 2017; Hu et al., 2017; Ge et al., 2013; Cui et al., 2019). No obstante, varias consideraciones sugieren que otros animales pueden haber actuado como hospedador intermediario entre los murciélagos y los humanos. En primer lugar, el brote fue reportado en diciembre de 2019, cuando la mayoría de las especies de murciélagos que habitan en Wuhan estaba hibernando. Segundo, no se comercializaron murciélagos en el mercado de Huanan (ciudad de Wuhan), mientras que había disponibles otras varias especies animales (incluyendo mamíferos). Tercero, la identidad de secuencias entre SARS-CoV-2 y las cepas de murciélago más cercanas fue menor al 90 %, tal como se ve reflejado en el largo de rama en el árbol filogenético. Esto sugiere que las cepas de murciélago no serían los ancestros directos de SARS-CoV-2. En el caso de SARS-CoV y MERS-CoV, los murciélagos actuaron como reservorio natural, siendo la civeta para SARS-CoV y los dromedarios para MERS-CoV, el hospedador intermediario, y los humanos, el hospedador terminal o final.

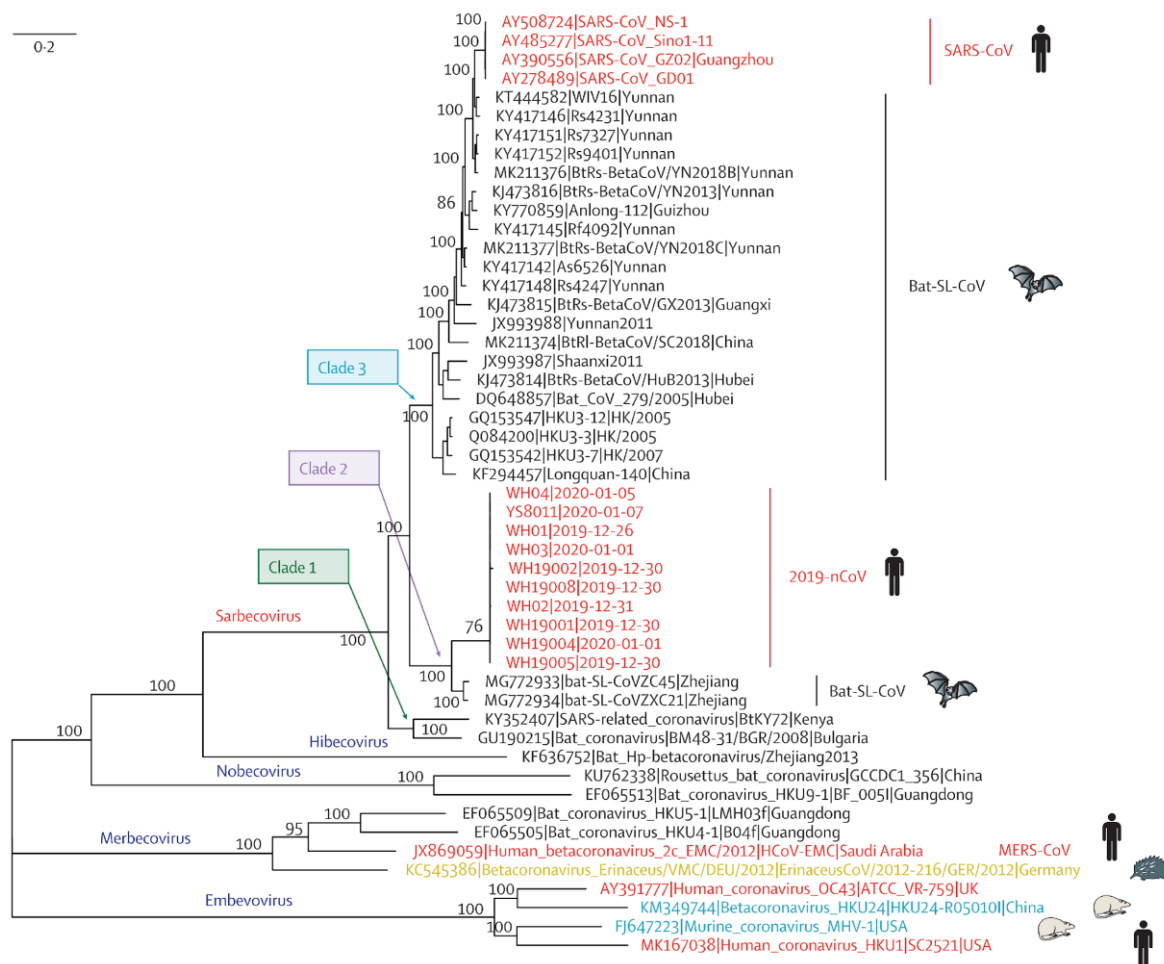


Figura 8: Análisis filogenético de genomas completos de SARS CoV-2 (indicado como 2019-nCoV) y virus representativos del género Betacoronavirus. MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus), SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus). (Adaptado de Lu R et al, 2020).

La tasa evolutiva promedio para coronavirus es de 10^{-4} nt/sitio/año, con mutaciones que se incorporan durante cada ciclo de replicación. Los análisis filogenéticos de las secuencias de SARS-CoV-2 disponibles hasta el momento obtenidas a partir de individuos de distintos países muestran un origen común y por lo tanto, se puede inferir una fuente única para el brote (Lu et al. 2020). Dada la tasa de evolución y la elevada capacidad de transmisión y dispersión del virus, es esperable la fijación de mutaciones en corto tiempo. La vigilancia epidemiológica para detectar estas mutaciones permitirá evaluar la evolución del virus, la aparición de cadenas de transmisión locales y eventualmente su posible asociación con distintos cuadros clínicos o respuesta a tratamientos antivirales.

La identificación de este nuevo virus da cuenta del rol de los animales salvajes como reservorios de distintos virus, que pueden ocasionalmente introducirse en la población humana y diseminarse. La historia natural de los coronavirus, con los repetidos saltos de especie desde los reservorios a humanos, y la detección de numerosos coronavirus en murciélagos similares a SARS, sugiere la posibilidad de nuevos eventos de transmisión zoonótica en el futuro.

Bibliografía

- Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anthony SJ1, Gilardi K, Menachery VD, Goldstein T, Ssebide B, Mbabazi R, Navarrete-Macias I, Liang E, Wells H, Hicks A, Petrosov A, Byarugaba DK, Debbink K, Dinno KH, Scobey T, Randell SH, Yount BL, Cranfield M, Johnson CK, Baric RS, Lipkin WI, Mazet JA. Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. mBio. 2017 Apr 4;8(2). pii: e00373-17. doi: 10.1128/mBio.00373-17.
- Cui, J., Li, F. & Shi, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol 17, 181–192 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- Ge, X.-Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. Nature 503, 535–538 (2013).
- Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol 5, 536–544 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Hu, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. PLoS Pathog. 13, e1006698 (2017).
- Li, W. et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. Science 310, 676–679 (2005)
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet. 2020;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- Menachery, V., Yount, B., Debbink, K. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. Nat Med 21, 1508–1513 (2015). <https://doi.org/10.1038/nm.3985>
- Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. Published online February 3, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1212-7>.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017. Epub 2020 Jan 24. PubMed PMID: 31978945.

Patogenia de los coronavirus

La mayoría de los coronavirus se propagan a los hospedadores susceptibles por vías respiratoria o fecal-oral. La replicación ocurre primero en la puerta de entrada, en las células epiteliales del tracto respiratorio. Sin embargo, además de la infección local de las vías respiratorias o entéricas, varios coronavirus causan enfermedad respiratoria aguda grave como consecuencia de la infección en el tracto respiratorio inferior (Masters and Perlman, 2013).

Como se mencionó anteriormente, el SARS-CoV-2 se une con gran afinidad a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que es utilizada como uno de los receptores de entrada para invadir las células. Este mecanismo permite explicar la eficiente propagación viral en los humanos. La proteína ACE2 se presenta en abundancia en células epiteliales alveolares pulmonares y también en enterocitos del intestino delgado, lo que puede ayudar a comprender mejor las rutas de infección y manifestaciones de la enfermedad (Guo, et al., 2020).

Hasta el momento se sabe que el virus puede causar síntomas leves parecidos a la gripe, como fiebre, tos, dolor en los músculos o más importantes presentando dificultad para respirar y fatiga. Los casos más graves desarrollan neumonía grave, síndrome de dificultad respiratoria

aguda, sepsis y shock séptico que pueden conducir a la muerte. Las personas con afecciones crónicas parecen ser más vulnerables a las formas graves de la enfermedad. Sin embargo, en comparación con el SARS-CoV (10 % de mortalidad) y el MERS-CoV (35 % de mortalidad), el SARS-CoV-2 parece ser menos virulento en este punto, con la excepción de la infección en los ancianos y en aquellos con otras enfermedades de base (Guo et al., 2020).

Dado que estamos frente a un virus emergente, hasta el momento es escasa la información que se tiene en forma específica sobre el mecanismo de patogenia que presenta SARS-CoV-2. Por lo tanto, en su mayoría, los datos que existen a nivel mundial se basan en la similitud del mismo con SARS-CoV. Como se mencionó previamente, el SARS-CoV se replica principalmente en células epiteliales respiratorias. Las células en la vía aérea superior se infectan inicialmente, lo que resulta en desprendimiento celular, pero relativamente poco daño. Sin embargo, el virus se propaga rápidamente a los alvéolos causando daño alveolar difuso. Esto se caracteriza por descamación de neumocitos, edema alveolar, infiltración celular inflamatoria y formación de membrana hialina. También se detectan virus o productos virales en otros órganos, como el riñón, el hígado, cerebro y el intestino delgado, y en las heces (Masters and Perlman, 2013; Zhang C et al., 2020; Baig, et al., 2020, Peiris, et al., 2003). Aunque el pulmón es reconocido como el órgano más gravemente afectado por el SARS-CoV, el mecanismo preciso de la lesión pulmonar es controvertido. Las observaciones histopatológicas de las lesiones pulmonares no solo muestran respuestas inflamatorias inespecíficas como edema e infiltrado de células inflamatorias, sino que también una exfoliación severa de las células epiteliales alveolares, ensanchamiento y daño del tabique alveolar, e infiltración del espacio alveolar (Li et al., 2020). Patológicamente, la inflamación incluye degeneración (necrosis), infiltración e hiperplasia. El daño a las paredes arteriolas intersticiales pulmonares indica que la respuesta inflamatoria juega un papel importante a lo largo del curso de la enfermedad. Durante la infección, el huésped desencadena una respuesta inmune contra el virus. La inmunopatogénesis se asocia con una respuesta inmune fuera de control, lo que puede provocar daños en el tejido pulmonar, deterioro funcional y capacidad pulmonar reducida (Li et al., 2020).

La respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa son necesarias para la eliminación viral, pero siempre bajo una regulación muy estricta, de lo contrario puede desencadenarse la inmunopatología asociada. Es de destacar que en pacientes con COVID-19 se observó un ascenso plasmático del nivel de citocinas y quimiocinas, incluidas IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GCSF, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), IP-10, MCP-1, MIP-1 α , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IFN- γ y TNF- α . Esta liberación exacerbada de inmunomediadores, a su vez, recluta linfocitos, macrófagos y leucocitos al sitio de la infección, pudiendo explicar en parte el daño histológico observado en los pacientes con COVID-19 de condiciones más críticas (Guo et al., 2020).

Bibliografía

- Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic mechanisms. ACS Chem Neurosci. 2020 Mar 13. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00122.
- Masters PS, Perlman S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 825-58.
- Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res. 2020 Mar 13;7(1):11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0. Review
- Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020 Apr;92(4): 424-432. doi: 10.1002/jmv.25685. Epub 2020 Feb 7. Review.

- Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003; 361:1767–1772.
- Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 4. pii: S2468-1253(20)30057-1. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30057-1.

Diagnóstico de laboratorio

Recolección y envío de muestras

La Organización Mundial de la Salud ha determinado una serie de normas que se deben cumplir para el análisis de muestras a los pacientes que se ajustan a la definición de caso sospechoso (<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>).

Es prioritario recoger y analizar rápidamente muestras apropiadas de los casos sospechosos, tarea que debe realizarse bajo la dirección de un experto de laboratorio. Para tal fin, se debe asegurar que existan procedimientos operativos normalizados y que se disponga del personal adecuado y debidamente capacitado para la recolección, conservación, embalaje/envasado y transporte de las muestras.

Muestras

1. De elección:

Muestras respiratorias (hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo, y esputo (si es el caso), y/o aspirado nasofaríngeo, aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedades respiratorias más graves).

2. Para ensayos complementarios

Suero para pruebas serológicas, muestras obtenidas en la fase aguda y la convaleciente (se trata de materiales adicionales a las muestras respiratorias, que pueden ayudar a identificar al agente etológico cuando las pruebas serológicas estén disponibles).

La tabla 1 detalla los tipos de muestra incluyendo características importantes a tener en cuenta para la conservación y el transporte:

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio refrigeradas (no congelar) y en envase de bioseguridad apropiado para muestras biológicas (triple envase). Debe ser identificada como muestras para detección de nuevo coronavirus, SARS-CoV-2 o COVID19. No deberán venir acompañadas con muestras para otras patologías.

Todas las muestras que se obtengan para las investigaciones de laboratorio deben considerarse potencialmente infecciosas, y los agentes de atención sanitaria que recojan o transporten muestras clínicas deben atenerse rigurosamente a las directrices sobre prevención y control de infecciones y a las reglamentaciones nacionales o internacionales relativas al transporte de mercancías peligrosas (sustancias infecciosas) para reducir al mínimo la posibilidad de exposición a agentes patógenos.

(<https://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2019.20/en/>)

Tabla 1: Tipo de muestras y sus características

Tipo de muestra	Materiales para toma de muestra	Transporte	Conservación	Observaciones
Hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo	Torundas floculadas de dacrón/poliéster *	4 °C	≤5 días: 4 °C >5 días: -70 °C	Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos deben conservarse en el mismo tubo para aumentar la carga vírica. Los hisopos a utilizar deben ser de torunda de nylon, dacrón o viscosa con manguito plástico. Los mismos se deberán sumergir en 2 ml de medio de transporte para virus o en su defecto 2 ml de solución salina de uso parenteral. Deberán ser contenidos en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.
Lavado broncoalveolar (BAL)	recipiente estéril*	4 °C	≤48 horas: 4 °C >48 horas: -70 °C	Deberá ser contenido en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.
Aspirado (endo) traqueal, aspirado nasofaríngeo o lavado nasal	recipiente estéril *	4 °C	≤48 horas: 4 °C >48 horas: -70 °C	Deberá ser contenido en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.
Espuito	recipiente estéril	4 °C	≤48 horas: 4 °C >48 horas: -70 °C	Debe cerciorarse de que la muestra provenga de las vías respiratorias bajas. Deberá ser contenido en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.
Tejidos de biopsia o autopsia, en particular pulmonares	recipiente estéril con medio salino	4 °C	≤24 horas: 4 °C >24 horas: -70 °C	
Suero	Tubos separadores de suero (en adultos: obtenga 3-5 ml de sangre entera)	4 °C	≤5 días: 4 °C >5 días: -70 °C	Se debe obtener muestras pareadas: • fase aguda – primera semana de enfermedad • convalecencia – 2 a 3 semanas después
Sangre entera	tubo de recogida	4 °C	≤5 días: 4 °C >5 días: -70 °C	Para detectar antígenos, en especial durante la primera semana de enfermedad
Orina	recipiente para orina	4 °C	≤5 días: 4 °C >5 días: -70 °C	

*Al transportar las muestras para la detección viral, utilice **MTV (medios de transporte de virus)** que contengan suplementos antifúngicos y antibióticos.

Para los procedimientos con una alta probabilidad de generar aerosoles o gotas, se debe utilizar una cabina de Bioseguridad certificada Clase II Tipo A1 o A2, o tomar precauciones adicionales para proporcionar una barrera entre la muestra y el personal. Ejemplos de estas precauciones adicionales incluyen equipo de protección personal (EPP) como máscara quirúrgica o protector facial, u otras barreras físicas como un protector contra salpicaduras; tazas de seguridad centrífugas; y rotores de centrífuga sellados para reducir el riesgo de exposición al personal de laboratorio

(<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/biosafety-faqs.html>)

Es importante recalcar que para el cultivo viral se requiere medidas de bioseguridad reforzadas, condiciones de BSL3.

Las muestras deberán estar acompañadas por una copia de la Ficha epidemiológica correspondiente a un caso sospechoso, con toda la información solicitada.

Debe constar la siguiente información:

- Información personal del paciente: nombre, fecha de nacimiento, sexo y domicilio, número de identificación único, otra información útil (por ejemplo, número del paciente en el hospital, número de identificación a efectos de vigilancia, nombre del hospital, dirección del hospital, número de habitación, nombre e información de contacto del médico, nombre y dirección del destinatario del informe)
- Fecha y hora de la toma de la muestra
- Sitio anatómico y localización de toma de la muestra
- Pruebas que se solicitan
- Síntomas clínicos e historia pertinente del paciente (antecedentes de viaje, o contacto con una persona que estuvo en zonas de circulación comunitaria del virus, en particular, vacunas y tratamientos antimicrobianos recibidos, información epidemiológica, factores de riesgo).

Diagnóstico de COVID-19

El diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2, se basa en la detección de genoma viral a través de técnicas de biología molecular como es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o RT-qPCR. Esta técnica se utiliza sobre muestras denominadas de elección antes mencionadas (secreciones de las vías aéreas superiores e inferiores como son los hisopados naso- y orofaríngeos, el esputo, el aspirado nasofaríngeo y el lavado bronco-alveolar), tomados en personas que cumplen con el criterio de caso sospechoso según la definición del Ministerio de Salud (<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/Definicion-de-caso>).

Dado que el virus SARS-CoV-2 es un nuevo coronavirus que fue descripto como el agente causal del COVID-19 el día 7 de enero del 2020, a partir del conocimiento de la secuencia completa del genoma viral, se pudieron diseñar los ensayos utilizados para su detección fueron en un principio ensayos estandarizados en institutos de distintos países del mundo y cuyos protocolos están disponibles y publicados en la página de la OMS (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>).

Los ensayos disponibles se listan en la tabla 2.

Tabla 2: Ensayos utilizados en diversos países

País	Instituto	Gen viral amplificado
China	China CDC	ORF1ab y N
Alemania	Charité	RdRP, E, N
Hong Kong SAR	HKU	ORF1b-nsp14, N
Japón	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Virología III	Pan-corona y múltiples blancos, proteína S
Tailandia	Instituto Nacional de Salud	N
Estados Unidos	CDC	Tres blancos en el gen N
Francia	Instituto Pasteur, Paris	Dos blancos en RdRP

El detalle de cada metodología, incluyendo los protocolos y secuencias de los iniciadores se encuentran en los siguientes links:

- [China CDC Primers y sondas para la detección del 2019-nCoV \(24 de enero 2020\)](#)
- [Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR – Charité, Berlin Germany \(17 de enero 2020\)](#)
- [Detection of 2019 novel coronavirus \(2019-nCoV\) in suspected human cases by RT-PCR – Hong Kong University \(23 de enero 2020\)](#)
- [PCR and sequencing protocol for 2019-nCoV - Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand \(Actualizado el 28 de enero 2020\)](#)
- [PCR and sequencing protocols for 2019-nCoV- National Institute of Infectious Diseases Japan \(24 de enero 2020\)](#)
- [US CDC Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus \(28 de enero 2020\)](#)
- [US CDC panel primer and probes– U.S. CDC, USA \(28 de enero 2020\)](#)
- [Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 Institut Pasteur, Paris \(2 de marzo 2020\)](#)

Sin embargo, el CDC de EEUU ha desarrollado un kit de laboratorio llamado “*Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time Reverse Transcriptase (RT)-PCR Diagnostic Panel*”. Este ensayo está diseñado para ser utilizado con el equipo de PCR en tiempo real *Applied Biosystems 7500 Fast DX Real-Time PCR* con el software SDS 1.4. El CDC ha distribuido este ensayo a varios laboratorios del mundo y fue el único aprobado inicialmente en Argentina por el ente regulador ANMAT cuando se detectaron los primeros casos en nuestro país.

Recientemente, el 21 de marzo 2020, el ANMAT informó a los profesionales e instituciones de la salud, la lista actualizada de los nuevos ensayos comerciales de uso *in vitro* para detección o diagnóstico directo de SARS-CoV-2 que se encuentran autorizados en el marco

de la emergencia sanitaria ante dicha administración nacional. Dentro de este grupo se encuentran los que se listan a continuación:

Tabla 3: Ensayos comerciales aprobados por ANMAT

Importador	Test	Marca (origen)	Método
Altona Diagnostics Argentina	RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	Altona Diagnostics Argentina GmbH (Alemania)	Real Time RT-PCR
Becton Dickinson Argentina SRL	VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	Certest Biotec (España)	Real Time RT-PCR
Biodiagnostico S.A.	GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit (Código IFMR-45)	Gene Finder (Corea)	Real Time RT-PCR
Bioars S.A	VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit (Código VS-NCO206L)	Certest Biotec (España)	Real Time RT-PCR
Bioars S.A	Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit v2 (Código AVCOW5)	Anatolia Diagnostics and Biotechnology Products Inc.	Real Time RT-PCR
Invitrogen Argentina S.A.	1.- TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1 (SKU A47532)	Applied Biosystems (USA)	Real Time RT-PCR
Invitrogen Argentina S.A.	2.- TaqMan 2019-nCoV Control Kit v1 (SKU A47533)	Applied Biosystems (USA)	Real Time RT-PCR
Productos Roche S.A.Q. e I.	1- Modular Wuhan CoV E-gene	TIB Molbiol-Syntheselabor GmbH	Real Time RT-PCR
Productos Roche S.A.Q. e I.	2- Modular Wuhan CoV RdRP-gene	TIB Molbiol-Syntheselabor GmbH	Real Time RT-PCR
Productos Roche S.A.Q. e I..	3- Modular Wuhan CoV N-gene TIB	TIB Molbiol-Syntheselabor GmbH	Real Time RT-PCR
Donadas por el gobierno Chino	Real-time fluorescent RT-PCR kit for detecting 2019-nCoV	BGI Europe A/S, Dinamarca (elaborado en China)	Real Time RT-PCR

Advertencia: el listado de reactivos de diagnósticos aprobados que figura en el documento corresponde a la fecha de emisión. Para acceder al listado de reactivos actualizados dirigirse a: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/reactivos-para-deteccion-covid-19>

Es importante destacar que, en caso de enfermedad grave o progresiva, un único resultado negativo en una prueba para la detección del virus SARS-CoV-2 (especialmente si se ha realizado a partir de una muestra de las vías respiratorias superiores) no se considera excluyente de la posibilidad de una infección. Se recomienda repetir el estudio en una muestra de las vías respiratorias inferiores. Del mismo modo, un resultado positivo por un patógeno alternativo no excluye necesariamente la posibilidad de una coinfección.

(https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/178252/WHO_MERS_SUR_15.2_eng.pdf;%20sequence=1;
https://www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_2000_4/en/).

Bibliografía

- Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases (<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>).
- Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2019. (<https://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2019.20/en/>).
- Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>).
- Definición de caso Ministerio de Salud de la Nación (21/3/2020) (<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/Definicion-de-caso>).
- WHO Global Influenza Surveillance Network Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza, OMS, 2011 (https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/).
- Investigation of cases of human infection with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), interim guidance, Organización Mundial de la Salud, actualizado en junio de 2018 WHO/MERS/SUR/15.2 Revision 1 (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/178252/WHO_MERS_SUR_15.2_eng.pdf;sequence=1).
- Guideline for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks WHO/CDS/CSR/EDC/200.4. (https://www.who.int/ihr/publications/WHO_CD_S_CSR_EDC_2000_4/en/).

Tratamiento

La Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció el 19 de marzo el inicio de un ensayo clínico de alcance global, llamado SOLIDARIDAD, para evaluar la efectividad de compuestos con potencial efecto terapéutico para la enfermedad causada por SARS-CoV-2 (COVID-19). El ensayo incluirá varios miles de pacientes en docenas de países (incluida Argentina) y apunta al 15% de pacientes con COVID-19 que sufren enfermedad severa. Los compuestos que serán evaluados son los cuatro considerados como más prometedores: el antiviral experimental llamado remdesivir (análogo de nucleótido que podría actuar como inhibidor de la RNA polimerasa viral); cloroquina e hidroxicloroquina, una medicación utilizada en enfermos de malaria o individuos que viajan a zonas endémicas de malaria y paludismo, cuyo mecanismo de acción, es elevar el pH de los endosomas tardíos e interferir en el proceso de entrada del virus a la célula hospedadora); una combinación de dos drogas para HIV: lopinavir y ritonavir, que se usa desde hace mucho tiempo para el tratamiento de infecciones con HIV, y cuyo mecanismo de acción es el de inhibidores de proteasas, y finalmente estas combinadas con interferón-beta, una glicoproteína celular que media la respuesta inmune innata, y degrada RNA virales, y puede contribuir a frenar la infección.

Bibliografía

- Nuevo Coronavirus 2019 (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>)

Vacunas contra coronavirus

No existen en la actualidad vacunas contra ninguno de los coronavirus humanos, y en general el desarrollo de vacunas contra los virus de esta familia ha representado un desafío. En la actualidad, y como reflejo de esta situación, sólo existen vacunas contra algunos tipos virales, a pesar de ser una familia que, incluyendo al ser humano, afecta a un amplio rango de especies animales domésticas (cánidos y felinos) o de interés en la producción (porcinos, aves, bovinos, equinos, etc.). Esto puede relacionarse con las características propias del patógeno, que presenta capacidad de recombinación y de incorporar mutaciones, y por lo tanto variar

antigénicamente. Sin embargo, también debe analizarse desde la inducción de una respuesta inmune apropiada, que estimule los mecanismos innatos y adaptativos adecuados para proporcionar protección a la infección posterior, que no están totalmente dilucidados.

Algunos ejemplos de vacunas comerciales incluyen la de la bronquitis infecciosa viral (IBV) de las aves, el coronavirus bovino (BoCoV) y el canino (CCoV). Sin embargo, en muchos casos el desempeño de estas vacunas a campo no es satisfactorio. Quizás el ejemplo más exitoso es el de la vacuna contra la IBV (un coronavirus del género *Gammacoronavirus*) que consiste en virus vivos atenuados, generados a partir de numerosos pasajes seriados en huevos embrionados, en procesos que pueden llevar hasta un año de duración (Jordan, 2017). Con esta metodología se han podido producir vacunas contra numerosas variantes y serotipos del IBV, entre los cuales puede existir una reactividad cruzada limitada. Existen también vacunas basadas a virus inactivado pero su capacidad inmunogénica es menor respecto a las formuladas con virus atenuado y su uso está restringido a ciertas categorías de aves, durante determinadas etapas del proceso productivo. También se han desarrollado vacunas recombinantes contra este virus siguiendo diversas estrategias, aunque con resultados variables respecto a los niveles de protección conferidos (Li et al., 2016; Toro et al., 2014).

Vacunas contra coronavirus humanos

Las referencias más cercanas a desarrollos de vacunas relacionados a coronavirus humanos son las relacionadas con las epidemias de SARS y MERS. Poco tiempo después de los brotes de SARS, se iniciaron los estudios sobre las capacidades inmunogénicas de las distintas proteínas del virus para su potencial uso en el desarrollo de vacunas. Uno de estos trabajos describió que las respuestas de anticuerpos de individuos recuperados de la infección tenían como blanco una zona muy rica en epitopes en la región S2 dentro de la glicoproteína de las espículas del virus y que fue identificada como sitio inmunodominante (Zhong et al., 2005). Estos anticuerpos eran capaces de neutralizar el SARS-CoV. Por el contrario, otras proteínas del virus (la de matriz, M, y la de envoltura pequeña, E) presentaban poca capacidad para inducir respuestas de anticuerpos específicos. Se observó que en los individuos vacunados la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la región S2 era variable, avalando la hipótesis de quizás la respuesta celular específica (de linfocitos T citotóxicos CD8+) también ejercieran un rol importante en la protección de esos pacientes (Gao et al., 2003).

A partir del brote de MERS-CoV se iniciaron distintos desarrollos de candidatos vacunales específicos, los cuáles, en su mayoría, aún se encuentran en etapas de prueba preclínica. Los proyectos actualmente en desarrollo incluyen vacunas basadas en vectores virales, vacunas de ADN, vacunas de subunidad, basadas en partículas similares a virus (VLP), y también las tradicionales como, vacunas a virus completo inactivado (IWV) y vacunas vivas atenuadas (Yong et al., 2019). En la actualidad sólo existe un estudio clínico publicado sobre una vacuna para el MERS-CoV que ha superado la Fase I de evaluación clínica. La vacuna contiene ADN plasmídico codificando la glicoproteína S del virus y fue desarrollada por GeneOne Life Science & Inovio Pharmaceuticals (Modjarrad et al., 2019). La vacuna resultó segura para su aplicación y registró seroconversión en el 86 % y 94 % de los participantes después de dos y tres dosis, respectivamente. También se detectaron anticuerpos neutralizantes en el 50 % de los individuos, y respuestas de linfocitos T específicas en el 71 % y 76 % de los individuos, luego de dos o tres dosis vacunales, respectivamente.

Respecto a las vacunas contra el SARS-CoV, existen registros de dos candidatos que alcanzaron la Fase I de ensayos clínicos. Una de ellas es una vacuna basada a ADN correspondiente a la glicoproteína S del virus y realizado por el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) de EE.UU. Los autores reportaron buena tolerancia a la vacuna y la inducción de anticuerpos neutralizantes y respuestas celulares adaptativas (CD4+

y CD8+) contra el virus en pacientes vacunados, luego de tres dosis de la vacuna (Martin et al., 2008). Por otro lado, otro candidato desarrollado en China y basado en una formulación a virus inactivado, también reportó buena tolerancia a la vacuna y la inducción de anticuerpos específicos a partir del día 42 y luego de la segunda vacunación (Lin et al., 2007).

Tabla 4: Candidatos de vacunas contra SARS-CoV y MERS-CoV (Pang et al., 2020)

Organización / Candidato	País de estudio; Tipo de ensayo; Diseño del estudio; Detalles	Población	Resultados (seguridad)	Resultados (eficacia)	Referencias
SARS-CoV					
Sinovac Biotech Co. Ltd.; Inactivated ARS-CoV (ISCV)	China (Beijing); Ensayo clínico de fase I; Aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo; 2 dosis de 16 unidades de SARS-CoV (SU) o 32 SU ISCV o vacuna de control con placebo, inyección intramuscular de vacunas en el músculo deltoides, las dosis fueron de 28 días de diferencia	36 adultos sanos entre 21 y 40 años, libres de enfermedades crónicas, inmunosupresión, SARS-CoV, VHC y VIH; Se incluyeron 12 sujetos en cada brazo de intervención	No se informaron reacciones adversas graves (grado 3). Todos los eventos adversos locales fueron leves y se resolvieron en 47-72 h, mientras que los eventos adversos sistémicos se informaron esporádicamente de los 3 grupos y se resolvieron en 24 h.	La seroconversión alcanzó el 100% para ambos grupos de vacunas en el día 42, persistió al 100% en el grupo que recibió 16 SU pero disminuyó a 91.1% para el grupo que recibió 32 SU en el día 56. Títulos medios geométricos (GMT) de anticuerpos neutralizantes específicos de SARS-CoV alcanzó su punto máximo 2 semanas después de la segunda dosis, pero comenzó a caer 4 semanas después (valores no informados). La seroconversión y la GMT de los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron menores en los sujetos entre 21-30 años en comparación con los del grupo de ancianos, pero sin diferencias significativas (35: seroconversión p = 0,444; GMT P = 0,528) en los días 35 y 42.	Lin et al. 2007
Institutos Nacionales de Salud, Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, Centro de Investigación de Vacunas; VRC-SRSDNA015-00-VP	Estados Unidos (Maryland); Ensayo clínico de fase I; Estudio de etiqueta abierta; 3 dosis de vacuna (4 mg / dosis), inyección intramuscular en el músculo deltoides lateral a través del Biojector 2000® Needle-Free Injection Management System™ en los días de estudio 0, 38 y 56	10 sujetos entre 21 y 29 años (edad media 35.5) con un IMC medio de 24,6 (rango 19,7 a 33,9) y eran caucásicos (90%) o asiáticos (10%); solo 9 sujetos completaron las 3 dosis	No hubo reacciones adversas graves (grado 3), pero al menos el 50% de los sujetos informaron al menos un síntoma sistémico leve después de la vacunación.	El ELISA detectó anticuerpos específicos contra el SARS en 8 de 10 (80%) de los sujetos en uno o más puntos temporales. La respuesta de anticuerpos neutralizantes se detectó en todos los sujetos que recibieron 3 dosis de vacuna y alcanzaron su punto máximo entre las semanas 8 y 12, con 6 sujetos que permanecieron positivos en la semana 32. Se detectaron respuestas de células T CD4 + específicas de SARS-CoV en todas las vacunas entre la semana 2 y 32, y respuestas de células T CD8 + en ~20% de individuos por ICS. La respuesta máxima de las células T se produjo entre las semanas 8 y 12 y, cuando estuvo presente, se mantuvo durante las 32 semanas de prueba.	Martin et al. 2008
MERS-CoV					
GeneOne Life Science e Inovio Pharmaceuticals; GLS-5300	Estados Unidos (Maryland); Ensayo clínico de fase I de los Estados Unidos, de un solo brazo, con aumento de la dosis; 3 dosis de 0 · 67 mg, 2 mg o 6 mg GLS-5300; inyección intramuscular de 1 ml seguida inmediatamente por electroporación intramuscular co-localizada con dispositivo CELLECTRA®-5P en la semana 0, 4 y 12 con seguimiento hasta 48 semanas después de la dosis 3	75 adultos sanos entre 18 y 50 años (edad media 32,2 años), con electrocardiograma de detección normal, hallazgos de laboratorio de detección dentro de límites normales o hallazgos de grado 0-1, y sin antecedentes de enfermedad inmunosupresora o autoinmune clínicamente significativa, VIH, hepatitis Infección por el virus B o C; Se asignaron al azar 25 sujetos a cada grupo de dosis y 65 sujetos completaron el estudio, y se utilizó el análisis por protocolo.	No hay eventos adversos graves asociados a la vacuna. El 97% de los participantes informaron al menos un evento adverso solicitado, pero la mayoría de los síntomas solicitados se informaron como leves y fueron autolimitados (19 [76%] con 0 · 67 mg, 20 [80%] con 2 mg y 17 [68%] con 6 mg); Las reacciones en el sitio de inyección fueron el evento adverso más común [92%].	La seroconversión medida mediante ELISA S1 se produjo en el 86% y el 94% de los participantes después de 2 y 3 dosis, respectivamente, y se mantuvo en el 79% de los participantes hasta el final del estudio en la semana 60. Se detectaron anticuerpos neutralizantes en el 50% de los participantes una o más veces puntos durante el estudio, pero solo el 3% mantuvo la actividad de neutralización hasta el final del estudio. Se detectaron respuestas de células T en 71% y 76% de los participantes después de 2 y 3 dosis, respectivamente. No hubo diferencias en las respuestas inmunitarias entre los grupos de dosis después de 6 semanas y las respuestas humorales y celulares inducidas por la vacuna se detectaron respectivamente en 77% y 64% de los participantes en la semana 60.	Modjarrad et al. 2019

Candidatos vacunales para el SARS-CoV-2

Tal como se muestra en la Tabla 5, luego del surgimiento de SARS-CoV-2, se desarrollaron alrededor de 15 candidatos potenciales para vacunas a nivel mundial (Pang et al., 2020). Las vacunas se basan en diversas tecnologías, que incluyen la administración del mRNA de proteínas de la superficie viral, vacunas génicas, nanopartículas, vacunas sintéticas, a subunidades y a virus modificados (Lu, S; 2020). Se estima que la mayoría de los candidatos tardará aproximadamente un año en comenzar los ensayos clínicos de Fase I, que es la primera etapa para lograr licenciar una vacuna (Tabla 2). Las excepciones son las vacunas financiadas por la *Coalition for Epidemic Preparedness Innovations* (CEPI) y desarrolladas por Inovio, The University of Queensland y Moderna, Inc., respectivamente, que se proponen probar clínicamente las vacunas experimentales en aproximadamente 16 semanas.

Por último, algunos autores también han postulado que debido a la estrecha relación genética entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 (Lu R, et al., 2020) podría existir un cierto grado de protección cruzada a partir del uso de vacunas contra el SARS-CoV. Sin embargo, hasta el momento no existen ensayos que estén evaluado esta posibilidad.

Tabla 5: Listado de candidatos de vacunales contra el SARS-CoV-2 (Pang et al., 2020)

Compañía	Tiempo estimado	Tecnología	Avance/Financiamiento	Referencias
Moderna Therapeutics—US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)	Ensayo clínico de 3 meses a la etapa inicial (fase 1) en EE. UU. (estimado más temprano); mucho más tiempo para pruebas completas y aprobación regulatoria	Vacuna de mRNA	Preclínico / En espera de pruebas preclínicas y estudio de fase 1 por el NIAID/ Financiación por CEPI.	(McKay, 2020)
Inovio Pharmaceuticals	Pruebas en humanos en los próximos meses.	Vacuna basada en DNA INO-4800 (DNA sintetizado en laboratorio, no requiere muestra de virus real)	Preclínico / Financiación por Coalición para las innovaciones de preparación para epidemias (CEPI), hasta \$ 9 millones	(McKay, 2020) (Inovio, 2020)
Novavax	3 meses	Vacuna a nanopartículas	Preclínico	(McKay, 2020)
University of Queensland	3 meses	Tecnología de respuesta rápida, plataforma de vacuna "Pinza molecular" (un gen agregado a las proteínas virales induce al hospedador a generar anticuerpos)	Preclínico / Financiación por Coalición para las innovaciones de preparación para epidemias (CEPI),	(Univ. of Queensland, 2008), (Hennessy, 2020)
Vir Biotechnology	No disponible	Anticuerpos monoclonales anti-coronavirus. Además, utilizando "capacidades de detección de genoma completo basadas en CRISPR para identificar el receptor del huésped para el coronavirus de Wuhan"	Preclínico	(Reinicke, 2020), (VIR, 2020)
Chinese Centre for Disease Control and Prevention (CDC)	No disponible	No disponible / Vacuna de virus inactivada (postulada, no verificada)	Preclínico / virus aislado con éxito, seleccionando actualmente la cepa	(Xinhua ¹ , 2020) (Cheung, 2020)
Shanghai East Hospital (Tongji University)—Stermima Therapeutics	<40 días para la fabricación de muestras de vacunas	Vacuna de mRNA	Preclínico	(Xinhua ² , 2020)

Johnson & Johnson	1 año para llegar al mercado	Adenovirus: tecnología vectorial utilizada para la vacuna contra el Ébola (y los candidatos a la vacuna contra el zika y el HIV)	Preclínico	(Berkley, 2020) (Bursztynsky, 2020)
University of Hong Kong	Meses para pruebas en animales, al menos 1 año para ensayos clínicos en humanos	La vacuna contra la influenza en aerosol nasal modificada (con el antígeno de superficie del coronavirus) previene tanto la influenza como el coronavirus	Preclínico, vacuna desarrollada	(Cheung, 2020)
University of Saskatchewan (VIDO-InterVac)	Target for animal testing in 6–8 weeks, human trials in at least a year	No disponible	Preclínico	(The Canadian Press, 2020)
GeoVax—BravoVax	No disponible	Vaccinia Ankara modificada: plataforma de vacuna contra partículas similares a virus (MVA-VLP)	Preclínico	(Geo Vax, 2020)
Clover Biopharmaceuticals	No disponible	Vacuna trímica de subunidad-proteína recombinante 2019-nCoV S altamente purificada (S-Trimer), producida utilizando la tecnología <i>Trimer-Tag</i> ©	Preclínico	(Clover, 2020)
CureVac	No disponible	Vacuna de mRNA	Preclínico	(Precision Vaccinations, 2020)
Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development at Baylor College of Medicine	No disponible	No disponible	No disponible	(Usdin, 2020)
Codagenix	No disponible	No disponible	No disponible	(Usdin, 2020)

Desafíos para el desarrollo de vacunas para el SARS-CoV-2

Uno de los puntos críticos de la inmunidad generada por las vacunas contra los coronavirus es la posibilidad de que la inducción de anticuerpos contra la proteína S promuevan un aumento en la infección e incluso el agravamiento de la sintomatología. Este efecto ya había sido tempranamente descrito para coronavirus felinos (Olsen et, 1992), y es similar al observado con el virus dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus de la inmunodeficiencia humana (Tirado et al., 2003). Algunos estudios demostraron que anticuerpos específicos eran capaces de aumentar la capacidad del SARS-CoV de infectar células humanas que no expresan el receptor del virus, tales como las células mononucleares de sangre periférica y los macrófagos derivados de monocitos (Yip et al., 2016). Otros autores también describen un agravamiento de la infección inducida por anticuerpos vacunales como función de su concentración. Es decir, mientras altas concentraciones de anticuerpos contra SARS-CoV eran capaces de neutralizar la infección, los sueros diluidos, en cambio, aumentaban significativamente la capacidad de infección por SARS-CoV medida en ensayos *in vitro* (Wang et al., 2014).

Trabajos posteriores mostraron que existe un umbral de ocupación de anticuerpos en el virus y que, dependiendo de ese umbral, los anticuerpos pueden neutralizar el virus, o por el contrario aumentar su capacidad infectiva. En particular, los anticuerpos de alta afinidad con fuerte capacidad neutralizante son capaces de inhibir la infección a un nivel de ocupación menor, mientras que los anticuerpos débilmente neutralizantes se unen a epítopes distintos y requieren una ocupación mucho mayor sobre la partícula viral para neutralizar la infectividad. Por lo tanto, si la ocupación de anticuerpos cae por debajo del umbral de neutralización,

puede incrementarse la capacidad infectiva por anticuerpos (*antibody-dependent enhancement*, ADE). Este efecto fue particularmente observado sobre células mononucleares y macrófagos derivados de monocitos, en los que el virus podía ingresar a través de los receptores de los fragmentos constantes de los anticuerpos (FcγR). Otros estudios sugieren que la ADE dependiente de los receptores de anticuerpos podría no ser el único mecanismo para aumentar la infección mediada por anticuerpos, tal como se describió para el virus del dengue (Huang et al., 2006). En el caso particular del modelo de infección del SARS-CoV en primates no humanos, se han identificado algunos péptidos de la glicoproteína S que pueden inducir simultáneamente anticuerpos con funciones opuestas, brindando protección mediante la neutralización y/o causando el incremento de la capacidad infectiva del virus (Wang et al., 2016).

Respecto al nuevo virus, SARS-CoV-2, no tenemos información suficiente para especular si es posible que pueda ocurrir un fenómeno similar al que se observa con SARS CoV.

Tomando estos resultados en conjunto, y siendo que la inducción de niveles variables de los anticuerpos neutralizantes (incluyendo niveles bajos) es un fenómeno esperable en el contexto de la vacunación masiva de la población general, estas consideraciones deberían ser tenidas en cuenta y analizadas en profundidad como un factor más de evaluación de los ensayos clínicos de las vacunas candidatas.

Bibliografía

- Berkeley, L., Jr. Us health officials fast-track coronavirus vaccine, hope to start clinical trial in three months: CNBC Markets. <https://www.cnbc.com/2020/01/28/us-fast-tracks-coronavirus-vaccine-hopes-to-start-trial-in-three-months.html> (accessed on 23 March 2020).
- Bursztynsky, J. J&J scientific officer 'pretty confident' they can create coronavirus vaccine as outbreak widens. CNBC Markets. <https://www.cnbc.com/2020/01/27/jj-pretty-confident-it-can-create-chinacoronavirus-vaccine.html> (accessed on 23 March 2020).
- Cheung, E. China coronavirus: Hong Kong researchers have already developed vaccine but need time to test it, expert reveals. South China Morning Post. <https://www.scmp.com/news/hong-kong/health-environment/article/3047956/china-coronavirus-hong-kong-researchers-have> (accessed on 23 March 2020).
- Clover Biopharmaceuticals. Clover initiates development of recombinant subunit-trimer vaccine for Wuhan coronavirus (2019-ncov). <http://www.cloverbiopharma.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=11&id=40> (accessed on 23 March 2020).
- Gao, W., Tamin, A., Soloff, A., D'Aiuto, L., Nwanegbo, E., Robbins, P.D., Bellini, W.J., Barratt-Boyes, S., Gambotto, A., 2003. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 362, 1895-1896.
- GeoVax. Geovax and Bravovax (Wuhan, China) to collaborate on development of coronavirus vaccine. <https://www.geovax.com/news/geovax-and-bravovax-wuhan-china-to-collaborate-on-development-of-coronavirus-vaccine> (accessed on 23 March 2020).
- Huang, K.J., Yang, Y.C., Lin, Y.S., Huang, J.H., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., Liu, C.C., Lei, H.Y., 2006. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 176, 2825-2832.
- Hennessy, J. Australia's been asked to make a coronavirus vaccine at 'unprecedented speed' business insider. <https://www.sciencealert.com/australian-scientists-asked-to-make-coronavirus-vaccine-at-unprecedented-speed> (accessed on 23 March 2020).
- Inovio Pharmaceuticals Inc. Inovio selected by CEPI to develop vaccine against new coronavirus inovio. <http://ir.inovio.com/news-and-media/news/press-release-details/2020/Inovio-Selected-byCEPI-to-Develop-Vaccine-Against-New-Coronavirus/default.aspx> (accessed on 23 March 2020).
- Jordan, B., 2017. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Vet Microbiol* 206, 137-143.

- Li, H., Wang, Y., Han, Z., Wang, Y., Liang, S., Jiang, L., Hu, Y., Kong, X., Liu, S., 2016. Recombinant duck enteritis viruses expressing major structural proteins of the infectious bronchitis virus provide protection against infectious bronchitis in chickens. *Antiviral Res* 130, 19-26.
- Lin, J.T., Zhang, J.S., Su, N., Xu, J.G., Wang, N., Chen, J.T., Chen, X., Liu, Y.X., Gao, H., Jia, Y.P., Liu, Y., Sun, R.H., Wang, X., Yu, D.Z., Hai, R., Gao, Q., Ning, Y., Wang, H.X., Li, M.C., Kan, B., Dong, G.M., An, Q., Wang, Y.Q., Han, J., Qin, C., Yin, W.D., Dongs, X.P., 2007. Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antiviral therapy* 12, 1107-1113.
- Lu, S., 2020. Timely development of vaccines against SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections* 9, 542-544.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565-574.
- Martin, J.E., Louder, M.K., Holman, L.A., Gordon, I.J., Enama, M.E., Larkin, B.D., Andrews, C.A., Vogel, L., Koup, R.A., Roederer, M., Bailer, R.T., Gomez, P.L., Nason, M., Mascola, J.R., Nabel, G.J., Graham, B.S., Team, V.R.C.S., 2008. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 26, 6338-6343.
- McKay, B.L.P. Drugmakers rush to develop vaccines against china virus. *The Wall Street Journal*. Available online: <https://www.wsj.com/articles/drugmakers-rush-to-develop-vaccines-against-china-virus-11579813026> (accessed on 23 March 2020).
- Modjarrad, K., Roberts, C.C., Mills, K.T., Castellano, A.R., Paolino, K., Muthumani, K., Reuschel, E.L., Robb, M.L., Racine, T., Oh, M.D., Lamarre, C., Zaidi, F.I., Boyer, J., Kudchodkar, S.B., Jeong, M., Darden, J.M., Park, Y.K., Scott, P.T., Remigio, C., Parikh, A.P., Wise, M.C., Patel, A., Duperret, E.K., Kim, K.Y., Choi, H., White, S., Bagarazzi, M., May, J.M., Kane, D., Lee, H., Kobinger, G., Michael, N.L., Weiner, D.B., Thomas, S.J., Maslow, J.N., 2019. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *The Lancet Infectious Diseases* 19, 1013-1022.
- Olsen, C.W., Corapi, W.V., Ngichabe, C.K., Baines, J.D., Scott, F.W., 1992. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages. *J Virol* 66, 956-965.
- Pang, J., Wang, M.X., Ang, I.Y.H., Tan, S.H.X., Lewis, R.F., Chen, J.I., Gutierrez, R.A., Gwee, S.X.W., Chua, P.E.Y., Yang, Q., Ng, X.Y., Yap, R.K., Tan, H.Y., Teo, Y.Y., Tan, C.C., Cook, A.R., Yap, J.C., Hsu, L.Y., 2020. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine* 9.
- Precision Vaccinations. mRNA vaccines can induce immune responses for 2019-nCoV. <https://www.precisionvaccinations.com/curevac-mrna-platform-specifically-suitable-rapidlyprovide-answer-viral-outbreak-situation-novel> (accessed on 23 March 2020).
- Reinicke, C. An obscure biotech stock skyrockets 38% after saying it's testing a coronavirus antibody (vir). <https://markets.businessinsider.com/news/stocks/vir-biotechnology-stock-price-surgescoronavirus-antibody-tests-crispr-2020-1-1028847912> (accessed on 23 March 2020).
- The Canadian Press. Saskatchewan lab joins global effort to develop coronavirus vaccine. <https://www.cbc.ca/news/canada/saskatchewan/viro-intervac-working-on-coronavirus-vaccine-1.5439118> (accessed on 23 March 2020).
- Tirado, S.M., Yoon, K.J., 2003. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol* 16, 69-86.
- Toro, H., Zhang, J.F., Gallardo, R.A., van Santen, V.L., van Ginkel, F.W., Joiner, K.S., Breedlove, C., 2014. S1 of distinct IBV population expressed from recombinant adenovirus confers protection against challenge. *Avian diseases* 58, 211-215.
- University of Queensland Australia. Race to develop coronavirus vaccine. <https://www.uq.edu.au/news/article/2020/01/race-develop-coronavirus-vaccine> (accessed on 23 March 2020).
- Usdin, S. J&J developing coronavirus vaccine, at least nine other vaccines under development. <https://www.biocentury.com/bc-extra/company-news/2020-01-27/jj-developing-coronavirus-vaccineleast-nine-other-vaccines-under-> (accessed on 23 March 2020).
- VIR. Vir biotechnology applying multiple platforms to address public health risk from wuhan coronavirus. <https://investors.vir.bio/news-releases/news-release-details/vir-biotechnology-applyingmultiple-platforms-address-public> (accessed on 23 March 2020).

- Wang, Q., Zhang, L., Kuwahara, K., Li, L., Liu, Z., Li, T., Zhu, H., Liu, J., Xu, Y., Xie, J., Morioka, H., Sakaguchi, N., Qin, C., Liu, G., 2016. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS infectious diseases* 2, 361-376.
- Wang, S.F., Tseng, S.P., Yen, C.H., Yang, J.Y., Tsao, C.H., Shen, C.W., Chen, K.H., Liu, F.T., Liu, W.T., Chen, Y.M., Huang, J.C., 2014. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 451, 208-214.
- Xinhua (1). China CDC developing novel coronavirus vaccine Xinhua. http://www.xinhuanet.com/english/2020-01/26/c_138734908.htm (accessed on 23 March 2020).
- Xinhua (2). China fast-tracks novel coronavirus vaccine development xinhua. Available online: http://www.xinhuanet.com/english/2020-01/28/c_138739378.html (accessed on 23 March 2020).
- Yip, M.S., Leung, H.L., Li, P.H., Cheung, C.Y., Dutry, I., Li, D., Daeron, M., Bruzzone, R., Peiris, J.S., Jaume, M., 2016. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Medical Journal = Xianggang yi xue za zhi* 22, 25-31.
- Yong, C.Y., Ong, H.K., Yeap, S.K., Ho, K.L., Tan, W.S., 2019. Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Frontiers in Microbiology* 10, 1781.
- Zhong, X., Yang, H., Guo, Z.F., Sin, W.Y., Chen, W., Xu, J., Fu, L., Wu, J., Mak, C.K., Cheng, C.S., Yang, Y., Cao, S., Wong, T.Y., Lai, S.T., Xie, Y., Guo, Z., 2005. B-cell responses in patients who have recovered from severe acute respiratory syndrome target a dominant site in the S2 domain of the surface spike glycoprotein. *J Virol* 79, 3401-3408.