XII Workshop Nazionale
Innovazione e Ricerca per la Pratica Clinica

TERAPIE INNOVATIVE DELLE EPATITI CRONICHE VIRALI
E DELLE INFEZIONI VIRALI

Update sulla pandemia da Covid 19

Le varianti:
ruolo della diagnostica

Dott.ssa Francesca Malentacchi
SODs Microbiologia e Virologia
Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi

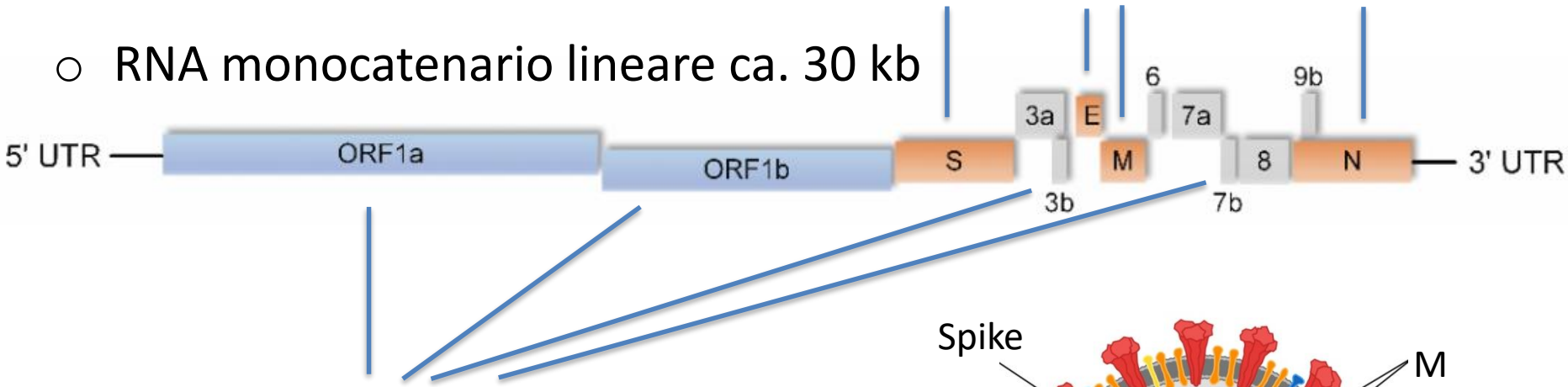
Firenze, 10-11 Gennaio 2022
Centro Congressi Hotel Londra

Il genoma di SARS-CoV-2

Ordine: *Nidovirales*
Famiglia: *Coronaviridae*

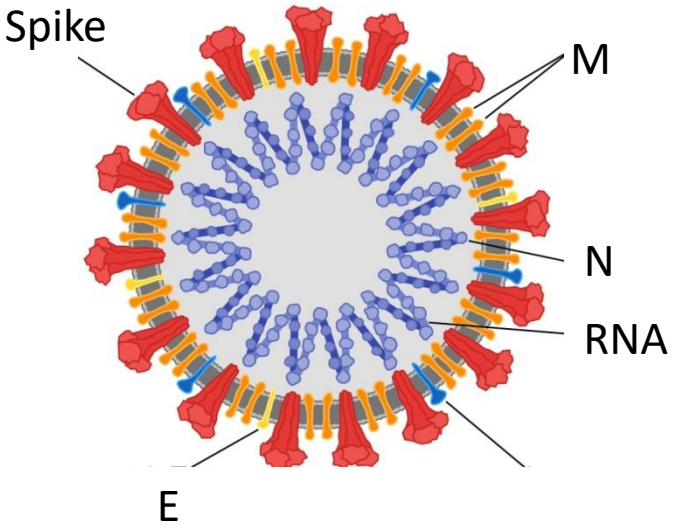
Proteine strutturali del virus

- RNA monocatenario lineare ca. 30 kb



Proteine non-strutturali (NSP)

- Replication and transcription complex (RTC):
  - 15 NSP coinvolte nella replica ed espressione del genoma
  - Attività *proofreading* (necessaria per le dimensioni del genoma)
- Interazioni con l'ospite
- Funzioni sconosciute



Proteina S o Spike:

- Coivolta riconoscimento virus-ospite,
- Internalizzazione
- Realizzazione vaccini
- Relaizzazione anticorpi monoclonali

V'kovski *et al* - Nature Rev Microbiol 2021

SARS-CoV-2: variabilità genomica

GISAID clade	PANGOLIN lineage	Nucleotide features	Corresponding effects on protein sequence
G	B.1	C241T C3037T C14408T A23403G	5′UTR NSP3:F106F NSP12b:P314L S:D614G
GH	B.1.*	C241T C3037T C14408T A23403G G25563T	5′UTR NSP3:F106F NSP12b:P314L S:D614G ORF3a:Q57H
GR	B.1.1	C241T C3037T C14408T A23403G GGG28881AAC	5′UTR NSP3:F106F NSP12b:P314L S:D614G N:RG203KR
S	A	C8782T T28144C	NSP4:S76S ORF8:L84S
V	B.2	G11083T G26144T	NSP6:L37F ORF3a:G251V
L		Reference in all nts defining clades G, GH, GR, S, and V	
O		Others	

Alm et al., Eurosurv 2020

Giugno-settembre 2020

"..[RNA polymerase RNA Dependent (RpRD)]..it contributes to a replication error rate more than 10-fold lower than that of other RNA viruses. This activity also likely contributes to the low genetic diversity of SARS-CoV-2"

Jason W. RauschJW at al.,PNAS, 2020 117 (40) 24614-24616

SARS-CoV-2: definizione delle varianti

WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	Evidence for impact on immunity
Beta	B.1.351	South Africa	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	September 2020	Yes (v) (1)	Yes (v) (2, 3)
Gamma	P.1	Brazil	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	December 2020	Yes (v) (6)	Yes (v) (7)
Delta	B.1.617.2	India	L452R, T478K, D614G, P681R	December 2020	Yes (v) (8)	Yes (v) (9-11)
Omicron	B.1.1.529	South Africa and Botswana	(x)	November 2021	Yes (v) (13)	Yes (v) (14)

VOC
(variants of concern)

www.ecdc.europa.eu

SARS-CoV-2: definizione delle varianti

WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	for impact on immunity
Mu	B.1.621	Colombia	R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H	January 2021	Yes (m) (15)	Yes (m) (16)
Lambda	C.37	Peru	L452Q, F490S, D614G	December 2020		Yes (v) (17, 18)
n/a	AY.4.2	United Kingdom	L452R, T478K, D614G, P681R, A222V, Y145H	June 2021	Yes (v) (19)	No (v) (19, 20)

VOI
(variants of interest)

www.ecdc.europa.eu

SARS-CoV-2: definizione delle varianti

WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	Evidence for impact on immunity
n/a	C.36+L452R	Egypt	L452R, D614G, Q677H	December 2020		Yes (m) (21)
n/a	B.1.1.318	Unclear (b)	E484K, D614G, P681H	January 2021		Yes (m) (16)
n/a	P.1+P681H	Italy	D614G, E484K, H655Y, K417T, N501Y, P681H	February 2021		Unclear (22, 23)
n/a	C.1.2	South Africa	D614G, E484K, H655Y, N501Y, N679K, Y449H	June 2021	Yes (m) (15)	Yes (m) (16)
n/a	B.1.617.2 + E484X (d)	India	L452R, T478K, D614G, P681R, E484X (d)	April 2021		
n/a	B.1.617.2 + Q613H	India	L452R, T478K, D614G, P681R, Q613H	April 2021		

VUM (variants under monitoring)

n/a	B.1.617.2 + E484X (d)	India	L452R, T478K, D614G, P681R, E484X (d)	April 2021		
n/a	B.1.617.2 + Q613H	India	L452R, T478K, D614G, P681R, Q613H	April 2021		
n/a	B.1.617.2 + Q677H	India	L452R, T478K, D614G, P681R, Q677H	April 2021		
n/a	B.1.640	The Republic of Congo	D614G, F490R, N394S, N501Y,	September 2021		

www.ecdc.europa.eu

SARS-CoV-2: definizione delle varianti

WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	Evid for impa on imm
Alpha	B.1.1.7	United Kingdom	N501Y, D614G, P681H	September 2020	Yes (v) (15)	No
n/a	B.1.1.7+E484K	United Kingdom	E484K, N501Y, D614G, P681H	December 2020	Yes (v) (15)	Yes (16,
Epsilon	B.1.427/B.1.429	USA	L452R,	September	Unclear (21)	Yes (
n/a	B.1.616*(c)*	France	V483A, D614G, H655Y, G669S	February 2021	Detection (c) (26)	
Eta	B.1.525	Nigeria	E484K, D614G, Q677H	December 2020		Yes ((16,
Theta	P.3	The Philippines	E484K, N501Y, D614G, P681H	January 2021	Yes (m) (15)	Yes ((16)

De-escalated variants

www.ecdc.europa.eu

SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - Virulenza modificata
  - Immuno-escape (reinfezioni, protezione vaccinale, terapia: sensibilità a monoclonali)
- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

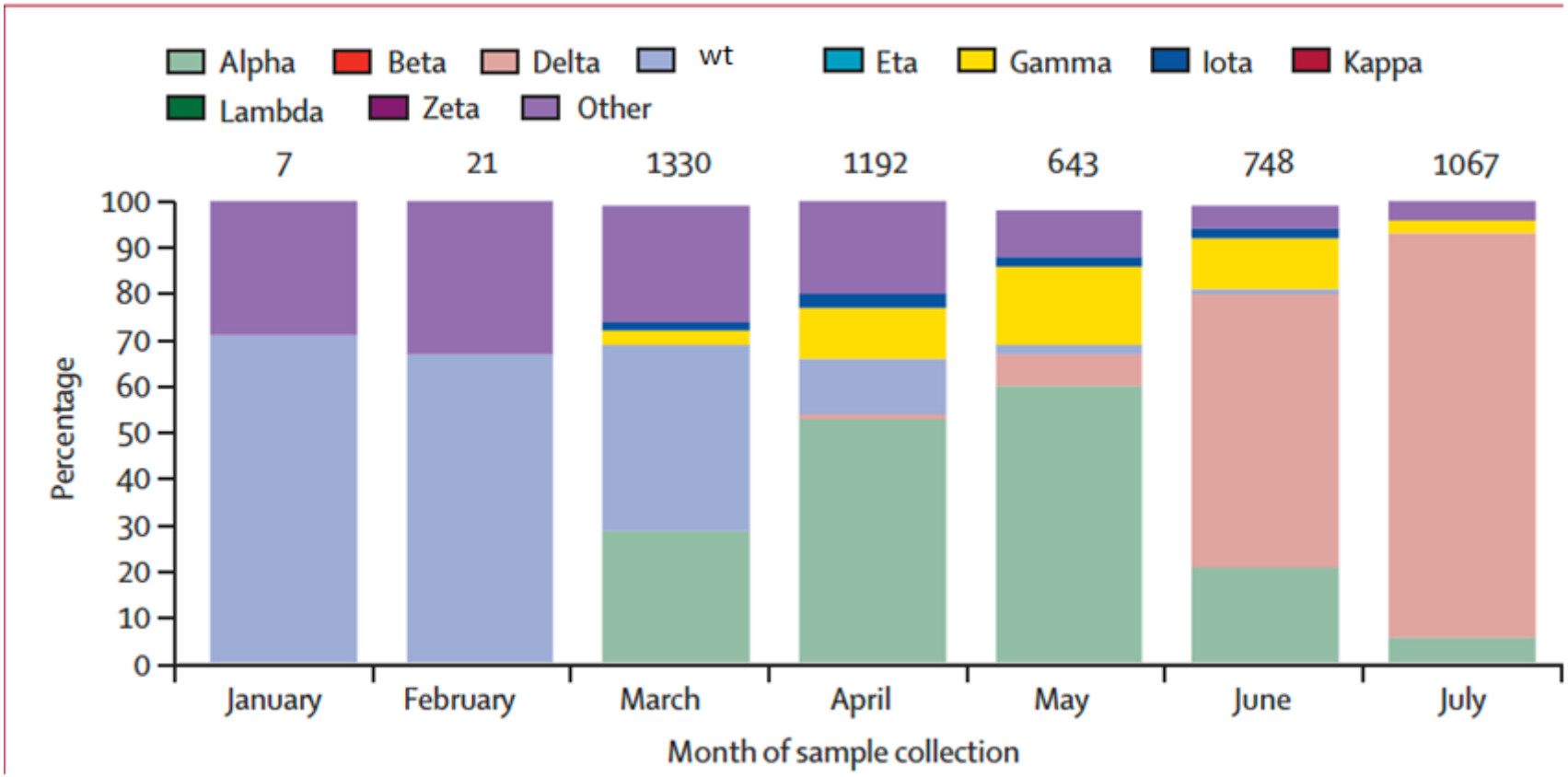
- **Epidemiologia - maggiore diffusibilità**

- Clinica - Virulenza modificata
  - Immuno-escape (reinfezioni, protezione vaccinale, terapia: sensibilità a monoclonali)

- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

SARS-CoV-2: comparsa di varianti associate ad alta diffusibilità

USA



Maggior diffusibilità

Tartof *et al* - Lancet 2021

SARS-CoV-2: epidemiologia e maggiore diffusibilità

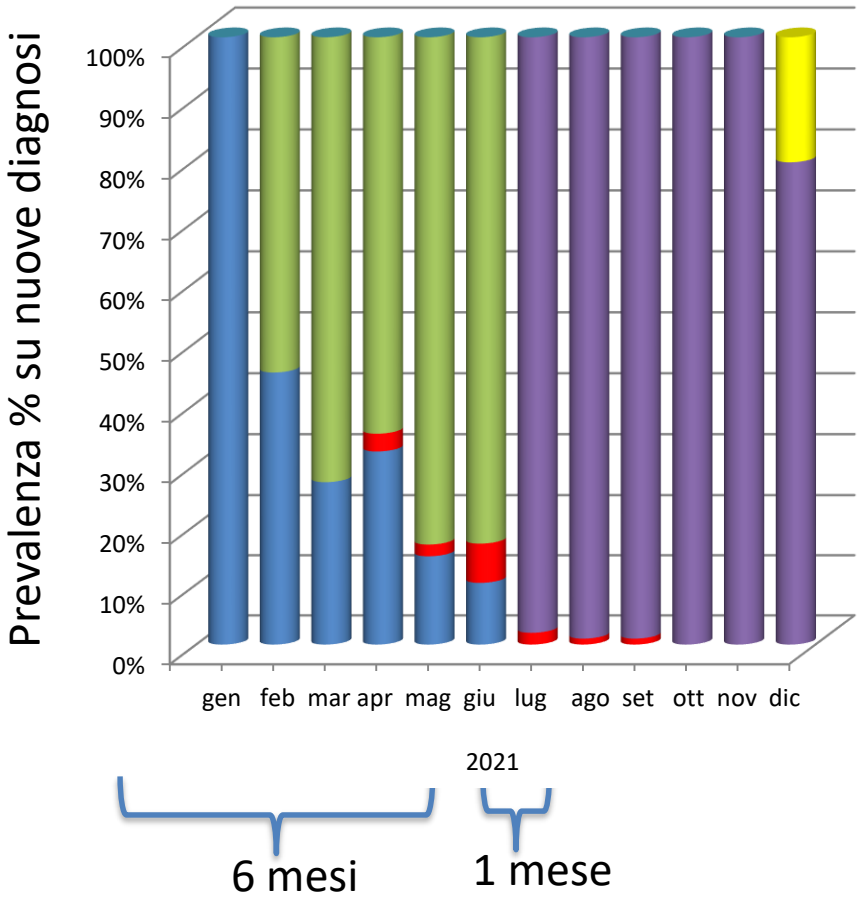
2020 2021

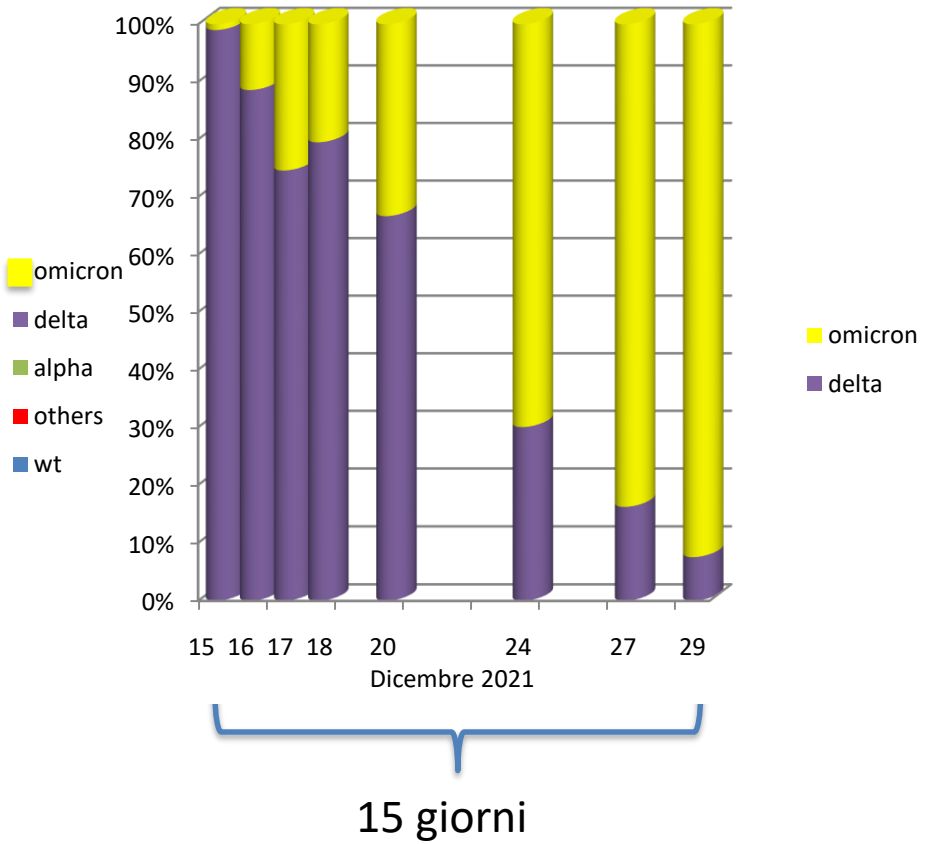
alfa delta omicron

SARS-CoV-2: nuove varianti associate ad alta diffusibilità

Evoluzione varianti prevalenti nell'area Toscana Centro

Maggior diffusibilità





Others: Gamma, eta, beta, zeta

SOD Microbiologia AOUC - data on file

SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - **Virulenza modificata**
  - Immuno-escape (reinfezioni, protezione vaccinale, terapia: sensibilità a monoclonali)
- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - Virulenza modificata
  - **Immuno-escape** (**reinfezioni**, protezione vaccinale, terapia: sensibilità a monoclonali)
- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

SARS-CoV-2: reinfezioni

Fondazione Umberto Veronesi – per il progresso delle scienze

magazine

IL PORTALE DI CHI CREDE NELLA RICERCA

PUBBLICATO IL 04-01-2022

seconda infezione con test molecolare positivo entro i 90 giorni dalla prima diagnosi purché con ceppo virale di SARS-CoV-2 diverso dal precedente, documentato da genotipizzazione.

A seguito di una circolare dello scorso mese di agosto, infatti, sono stati registrati i casi di **seconde infezioni** dal 24 agosto fino al 21 dicembre 2021. In totale, nel periodo considerato in Italia sono stati censiti **15.195** casi di reinfezione, pari allo **1,4% del totale dei casi** segnalati.

Dati preliminari, ancora non sottoposti a revisioni approfondite, raccolti nel Regno Unito fra novembre e dicembre sembrano indicare che Omicron è associata ad un **rischio di reinfezione** 5,4 volte più grande rispetto a Delta. In Italia, i dati del periodo agosto-dicembre ci parlano ancora prevalentemente di ciò che accade con la variante Delta. Come sottolineano gli estensori del rapporto, fino a dicembre i casi di reinfezione erano l'1 per cento del totale, abbastanza stabili. Se consideriamo soltanto la settimana del 20 dicembre si registra un balzo al 2,3 per cento del totale delle diagnosi di positività.

Reinfection with new variants of SARS-CoV-2 after natural infection: a prospective observational cohort in 13 care homes in England

Anna Jeffery-Smith, Thomas A J Rowland, Monika Patel, Heather Whitaker, Nalini Iyanger, Sarah V Williams, Rebecca Giddings, Leah Thompson, Maria Zavala, Felicity Aiano, Joanna Ellis, Angie Lackenby, Katja Höschler, Kevin Brown, Mary E Ramsay, Robin Gopal, J Yimmy Chow, Shamez N Ladhani, Maria Zambon**

Lancet Healthy Longev 2021; 2: e811-19

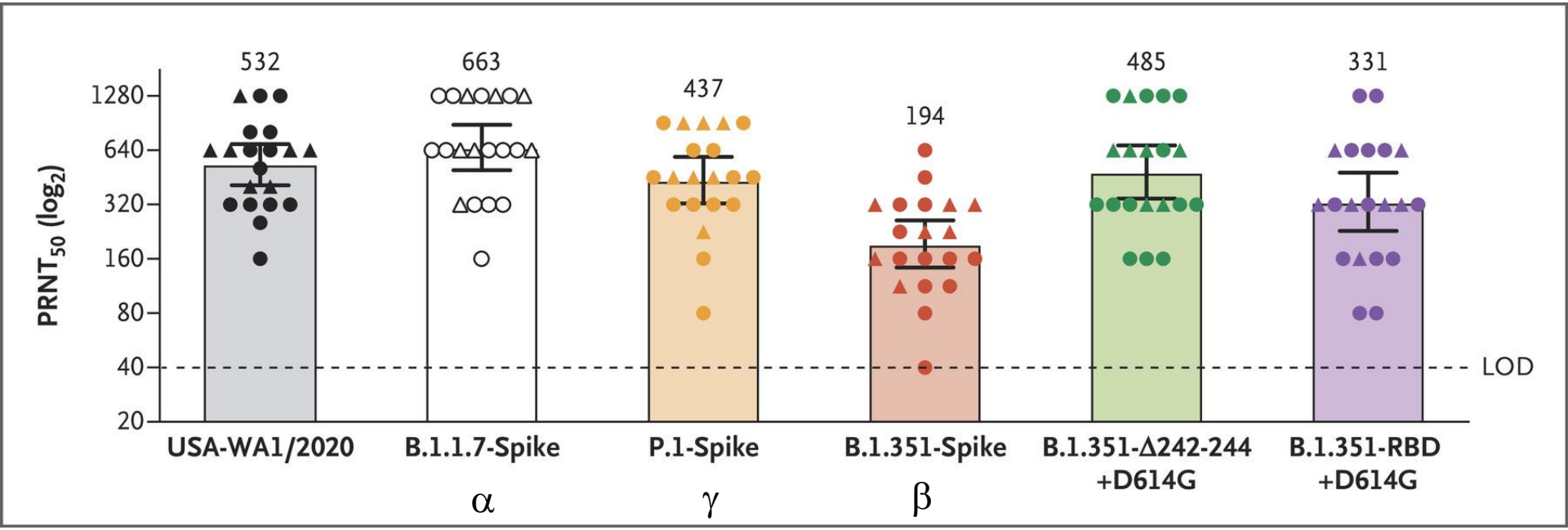
SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - Virulenza modificata
  - **Immuno-escape** (reinfezioni, **protezione vaccinale**, terapia: sensibilità a monoclonali)
- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

Alm et al., Eurosurv 2020

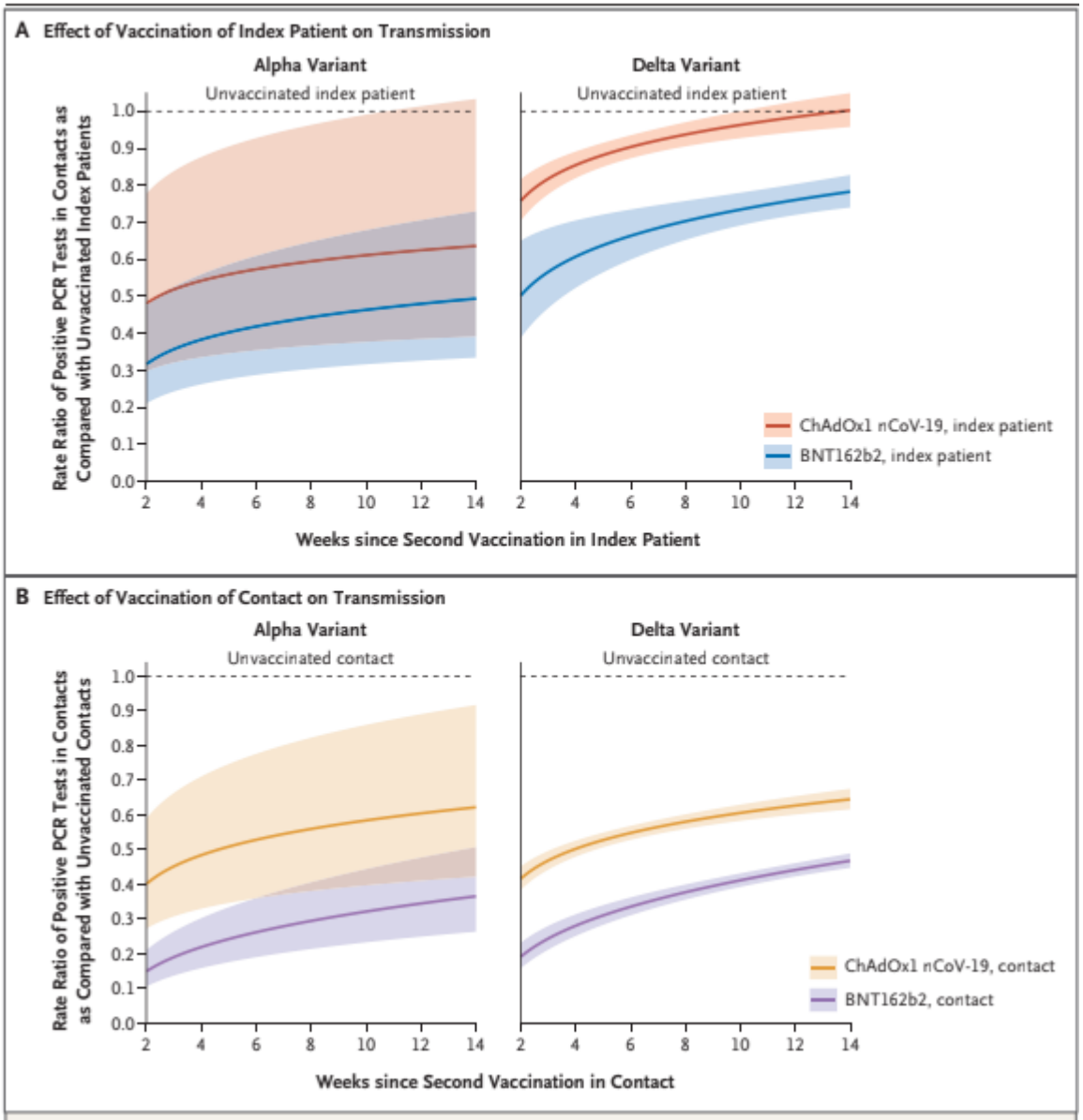
Varianti SARS-CoV-2 e protezione vaccinale



Serum neutralization of variant strains of SARS-CoV-2 after the second dose of BNT162b2 vaccine

Liu *et al* – NEJM, march 2021

Varianti SARS-CoV-2 e protezione vaccinale



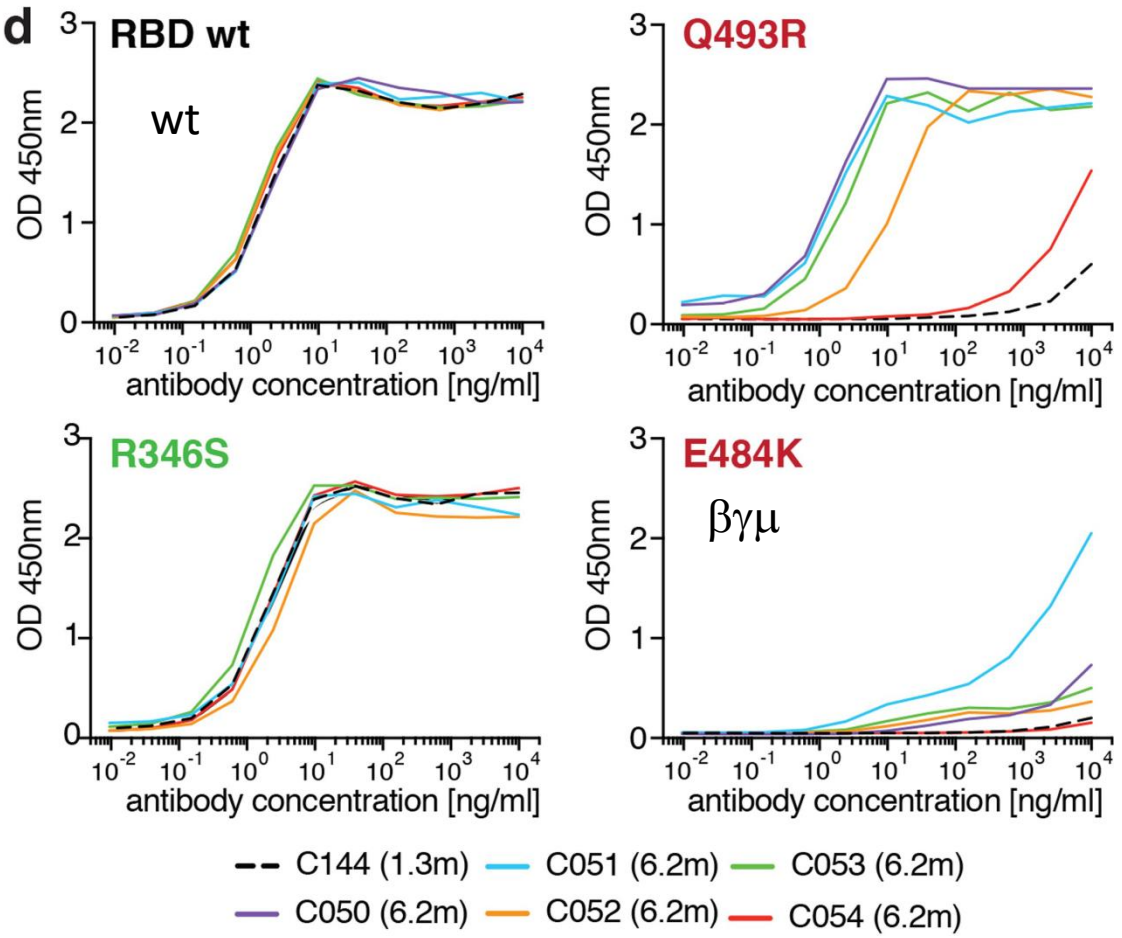
Eyre DW, NEJM, 202210.1056/NEJMoa2116597

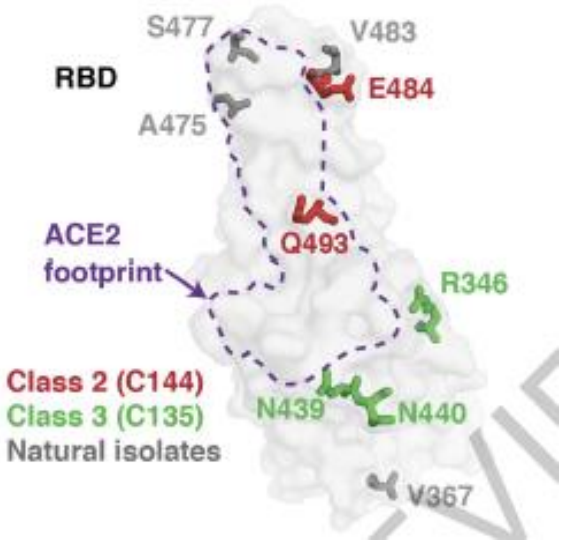
SARS-CoV-2: variabilità genomica

Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - Virulenza modificata
  - **Immuno-escape** (reinfezioni, protezione vaccinale, **terapia: sensibilità a monoclonali**)
- Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici

Varianti SARS-CoV-2 in S-RBD: diverso legame con mAb





Gaebler *et al*. – Nature 2021

Varianti SARS-CoV-2:
Terapia con anticorpi monoclonali

MENU

Agenzia Italiana del Farmaco

Home > Emergenza COVID-19 > Uso degli anticorpi monoclonali per COVID-19

Uso degli anticorpi monoclonali per COVID-19

La Commissione europea, su parere dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA), ha autorizzato i seguenti medicinali contenenti anticorpi monoclonali, da soli o in associazione, contro la proteina spike del virus SARS-CoV-2:

- associazione **casirivimab-imdevimab** denominata **Ronapreve** (dell'azienda farmaceutica Regeneron/Roche) per il trattamento e la prevenzione di COVID-19;
- **regdanvimab** denominato **Regkirona** (dell'azienda farmaceutica Celltrion Healthcare Hungary Kft) per il trattamento di COVID-19;
- **sotrovimab** denominato **Xevudy** (dell'azienda GSK) per il trattamento di COVID-19.

L'associazione di anticorpi monoclonali **bamlanivimab-etesevimab** (dell'azienda farmaceutica Eli Lilly) per il trattamento di COVID-19 non ha ancora ricevuto l'approvazione della Commissione europea ma in Italia è stata autorizzata in via temporanea con Decreto del Ministro della Salute del 6 febbraio 2021 pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 32 dell'8 febbraio 2021, e con Decreto del Ministro della Salute del 12 luglio 2021 pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 180 del 29 luglio 2021 (proroga del decreto del 6 febbraio 2021).

L'autorizzazione all'uso in via temporanea dell'anticorpo monoclonale **bamlanivimab** in monoterapia è stata revocata. Resta ammesso l'uso di bamlanivimab in associazione estemporanea con etesemivab.

Bamianivimab-estesevimab

COVID-19 deve essere di recente insorgenza (e comunque da non oltre 10 giorni) e confermata da positività di esame virologico diretto per SARS-CoV-2. Il trattamento è possibile oltre i 10 giorni dall'esordio solo in soggetti con immunodeficienza che presentino: sierologia per SARS-COV-2 negativa e prolungata positività al tampone molecolare.

Studi in vitro sulla resistenza agli anticorpi monoclonali hanno identificato sei sostituzioni di amminoacidi in 3 posizioni (K417N, D420N e N460K/S/T/Y) nel dominio di legame del recettore spike che avevano un fenotipo resistente a etesevimab e sei sostituzioni di amminoacidi in 4 posizioni (E484D/K/Q, F490S, Q493R e S494P) che avevano un fenotipo resistente a bamlanivimab, come determinato utilizzando test di neutralizzazione con SARS-CoV-2 neutralizzazione di pseudovirus o test di binding. Non sono state identificate varianti quando bamlanivimab ed etesevimab sono stati testati insieme utilizzando le stesse metodiche. Tutte le varianti resistenti a bamlanivimab ed etesevimab identificate hanno mantenuto suscettibilità a bamlanivimab ed etesevimab insieme, eccetto per le sostituzioni E848K, E484Q e Q493R, per cui è risultato un cambio di suscettibilità utilizzando un test di neutralizzazione di pseudovirus.

Gli studi su pseudovirus con sostituzioni concomitanti nella proteina spike presenti nella linea della variante B.1.351 di origine sudafricana (K417N + E484K + N501Y) e nella linea variante P.1 di origine brasiliana (K417T + E484K + N501Y) hanno mostrato una suscettibilità significativamente ridotta a etesevimab da solo, bamlanivimab da solo e bamlanivimab ed etesevimab insieme. Bamlanivimab ha mantenuto l'attività contro lo pseudovirus che esprime le sostituzioni nella proteina spike del69-70 + N501Y trovata nella variante B.1.1.7 (di origine inglese).

Varianti SARS-CoV-2:
Terapia con anticorpi monoclonali

Regdanvimab «Regkirona»

Tabella 3. **Dati di neutralizzazione di SARS-CoV-2 autentico e pseudovirus per regdanvimab**

Lignaggio con sostituzione della proteina spike	Sostituzioni chiave testate[a]	Riduzione della sensibilità (n. di volte) (virus autentico)	Riduzione della sensibilità (n. di volte) (pseudovirus)[f]
B.1.1.7 (variante Alpha, UK)	N501Y/P681H	Nessuna variazione[b, d, e]	Nessuna variazione[b]
P.1 (variante Gamma, brasiliana)	K417T/E484K/N501Y	137,88[e]/167,90[d]	61,42
P.2 (variante Zeta, [illegible])	E484K	Nessuna variazione[b, d]	8,66
B.1.351 (variante Beta, Sudafricana)	K417N/E484K/N501Y	19,75[e]/310,06[d]	184,29
B.1.427 (variante Epsilon, californiana)	L452R	73,89[d]	34,97
B.1.429 (variante Epsilon, californiana)	L452R	54,08[d]	34,97
B.1.526 (variante Iota, newyorkese)[c]	E484K/A701V	Nessuna variazione[b, d]	6,84
B.1.525 (variante Eta, [illegible])	E484K/Q677H	Nessuna variazione[b, d]	7,22
B.1.617.1 (variante Kappa, indiana)	L452R/E484Q/P681R	23,89[d]	44,14
B.1.617.2 (variante Delta, indiana)	L452R/T478K/P681R	182,99[d]	27,70
AY.1 (variante Delta plus, indiana)	K417N/L452R/T478K	Non determinata	63,65
C.37 (variante Lambda, peruviana)	L452Q/F490S	Non determinata	15,50
B.1.621 (variante Mu, colombiana)	R346K/E484K/N501Y/P681H	Non determinata	38,65

a Per le varianti con più di una sostituzione di interesse, vengono elencate solo quelle con il maggiore impatto sull'attività
b Nessuna variazione: riduzione di < 5 volte della sensibilità
c Non tutti gli isolati del lignaggio newyorkese presentano la sostituzione E484K (a febbraio 2021)
d Lo studio è stato condotto utilizzando il test di neutralizzazione con riduzione delle placche
e Lo studio è stato condotto mediante test di microneutralizzazione
f Le sostituzioni chiave per le varianti globali sono state testate in un test sugli pseudovirus

Documento reso disponibile da AIFA il 27/11/2021
Esula dalla competenza dell'AIFA ogni eventuale disputa concernente i diritti di proprietà industriale e la tutela brevettuale dei dati relativi all'AIC dei medicinali e, pertanto, l'Agenzia non può essere ritenuta responsabile in alcun modo di eventuali violazioni da parte del titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio (o titolare AIC).

Casirivimab/imdevimab «Ronapreve»

Tabella 4. **Dati di neutralizzazione sulle particelle simil-virali (VLP) pseudotipizzate per la sequenza completa o le principali sostituzioni della proteina spike di SARS-CoV-2 presenti nelle VOC/VOI* con casirivimab e imdevimab da soli o in associazione**

Lineage con sostituzioni della proteina spike	Principali sostituzioni valutate	Suscettibilità ridotta all'associazione casirivimab + imdevimab	Suscettibilità ridotta al solo casirivimab	Suscettibilità ridotta al solo imdevimab
B.1.1.7 (con origine nel Regno [illegible]/Alpha)	Proteina spike completa[a]	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]
B.1.351 (con origine in Sudafrica/Beta)	Proteina spike completa[b]	Nessuna variazione[e]	45 volte	Nessuna variazione[e]
P.1 (con origine in Brasile/Gamma)	Proteina spike completa[c]	Nessuna variazione[e]	418 volte	Nessuna variazione[e]
[illegible] (con origine in [illegible])	L452R	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]
B.1.526 (con origine nella città di New York/Iota)[f]	E484K	Nessuna variazione[e]	25 volte	Nessuna variazione[e]
B.1.617.1/B.1.617.3 (con origine in India/Kappa)	L452R+E484Q	Nessuna variazione[e]	7 volte	Nessuna variazione[e]
B.1.[illegible] (con origine in [illegible])	L452R+T478K	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]
AY.1/AY.2[g] (con origine in India/Delta [+K417N])	K417N+L452R+T478K[d]	Nessuna variazione[e]	9 volte	Nessuna variazione[e]
B.1.621/B.1.621.1 (con origine in Colombia/Mu)	R346K, E484K, N501Y	Nessuna variazione[e]	23 volte	Nessuna variazione[e]
C.37 (con origine in Perù/Lambda)	L452Q+F490S	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]	Nessuna variazione[e]

[a] Testata VLP pseudotipizzata esprimente l'intera proteina spike della variante. Nella variante sono riscontrate le seguenti alterazioni rispetto alla proteina spike *wild-type*: del69-70, del144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H.
[b] Testata VLP pseudotipizzata esprimente l'intera proteina spike della variante. Nella variante sono riscontrate le seguenti alterazioni rispetto alla proteina spike *wild-type*: D80Y, D215Y, del241-243, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V.
[c] Testata VLP pseudotipizzata esprimente l'intera proteina spike della variante. Nella variante sono riscontrate le seguenti alterazioni rispetto alla proteina spike *wild-type*: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F.
[d] Per AY.1: testata VLP pseudotipizzata esprimente l'intera proteina spike della variante. Nella variante sono state riscontrate le seguenti alterazioni rispetto alla proteina spike *wild-type*: T19R, G142D, E156G, F157-, F158-, K417N, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N.
[e] Nessuna variazione: riduzione della suscettibilità ≤ 5 volte.
[f] Non tutti gli isolati del *lineage* New York portano la sostituzione E484K (a febbraio 2021).
[g] Nota comunemente come "Delta Plus".
*Varianti di interesse (*Variant of Interest*, VOI/*Variant of Concern*, VOC) come definite dai Centers for Disease Control and [illegible]avirus/2019-ncov/variants/variant-info.html)

Sotrovimab «Xevudy»

Una valutazione VLP pseudotipizzata in coltura cellulare ha mostrato che i polimorfismi di sequenza dell'epitopo K356T, P337H/L/R/T e E340A/K/G hanno conferito una ridotta suscettibilità a sotrovimab sulla base dell'aumento osservato del valore EC_{50} (mostrato tra parentesi): E340K (>297), P337R (>276), P337L (180), E340A (>100), E340G (27), P337H (7,50), K356T (5,90) e P337T (5,438). La presenza della variante D614G altamente prevalente, da sola o in combinazione, non ha alterato l'attività di neutralizzazione di sotrovimab.

SARS-CoV-2: variabilità genomica

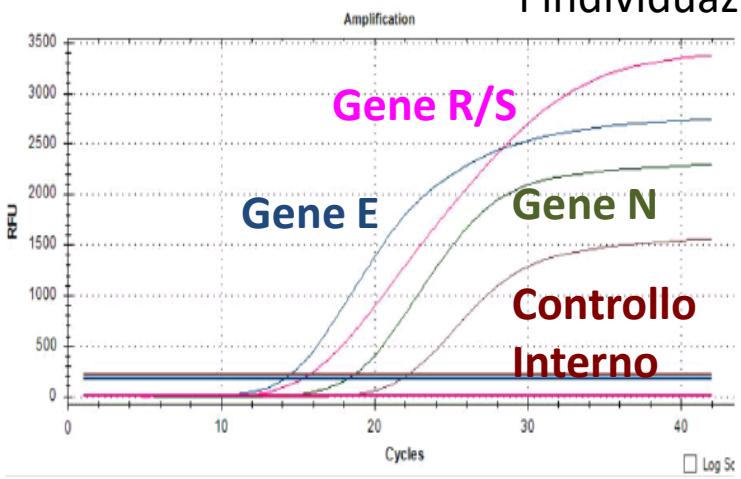
Evoluzione in **numerose varianti** con mutazioni distintive

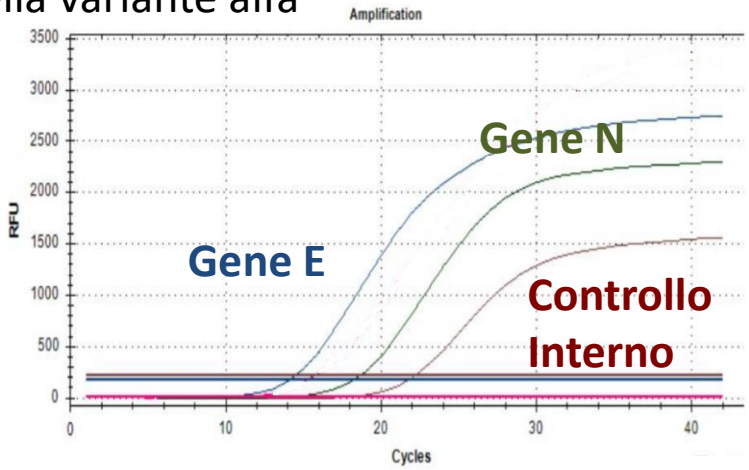
- Epidemiologia - maggiore diffusibilità
- Clinica - Virulenza modificata
  - Immuno-escape (reinfezioni, protezione vaccinale, terapia: sensibilità a monoclonali)
- **Diagnostica - Falsi negativi test diagnostici**

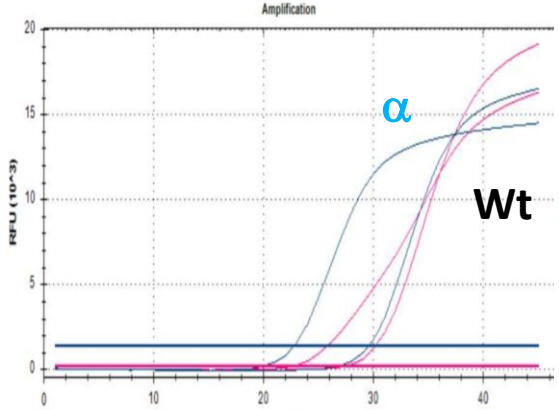
Ricerca di RNA di SARS-CoV-2 mediante RT-PCR real time/ quantitative PCR (qPCR)

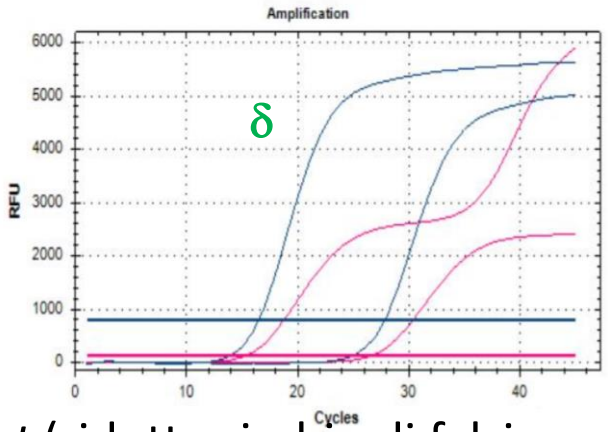
Falsi negativi test diagnostici: punti di forza e debolezza

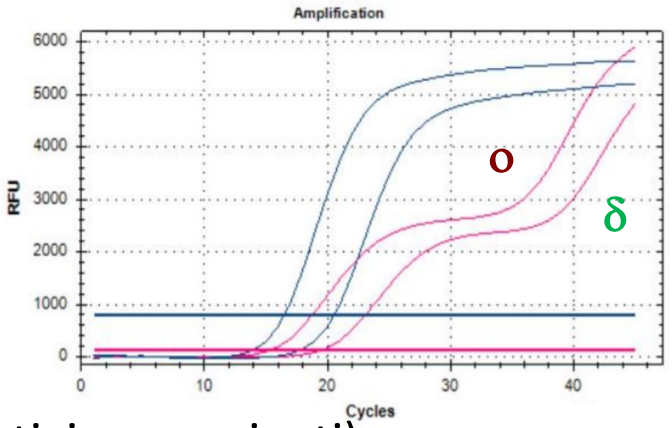
l'individuazione della variante alfa



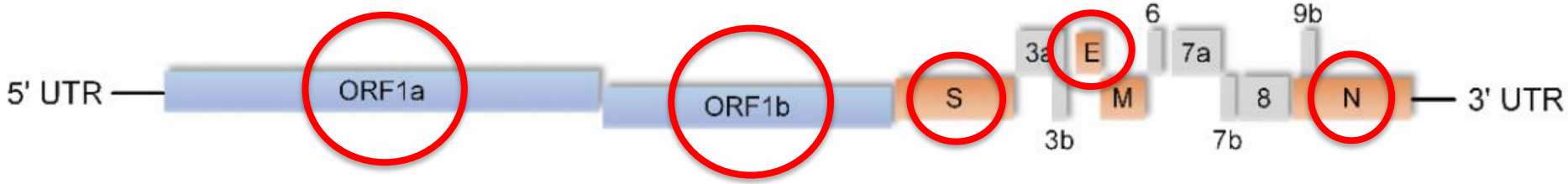








- Approccio *multi-target* (ridotto rischio di falsi negativi con varianti)



Ricerca di SARS-CoV-2 con test antigenici rapidi

FDA in update says 2 COVID-19 tests fail to detect the omicron variant

Published Dec. 16, 2021 • Updated Dec. 29, 2021

Omicron contains mutations to the spike protein and if tests rely on the spike gene to detect the virus it can cause false negative results. In the case of [redacted]a COVID-19 Assay Kit, the test has two viral targets on the SARS-CoV-2 genome and both cover the portions of the S-gene where these mutations occur and are not able to detect omicron.

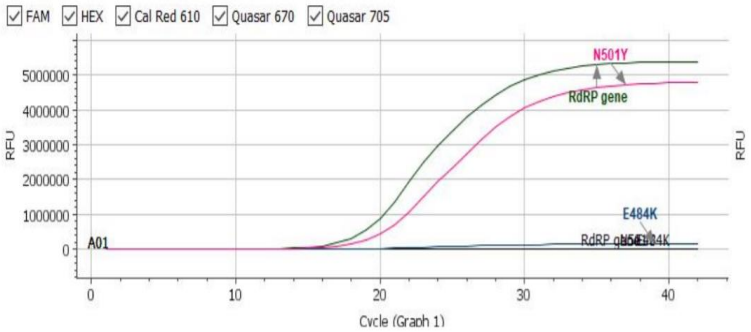
Covid, test rapidi meno affidabili per l'Omicron. Limiti e difetti secondo gli esperti

Pubblicato il **7 gennaio 2022**

La Fondazione Gimbe: sensibilità massima del 70% che nei prodotti di scarsa qualità scende al 50. Il professor Rasi: studiati per altre varianti

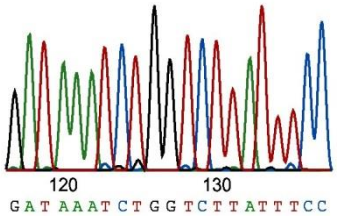
Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni

- Screening rapido con RT-qPCR/RT-qPCR-HRMA (mutazioni principali proteina S)



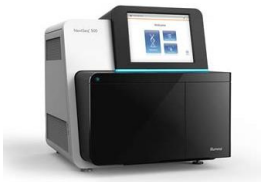
3 - 5 ore

- Sequenziamento Sanger Spike-RBD (mutazioni proteina S, singoli frammenti)



2 – 3 giorni

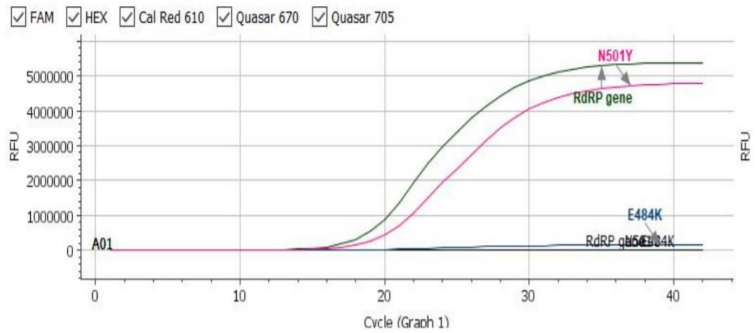
- Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) (genoma completo)



6 - 8 giorni

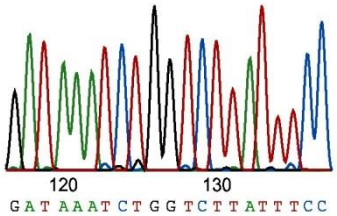
Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni

- **Screening rapido con RT-qPCR/RT-qPCR-HRMA** (mutazioni principali proteina S)



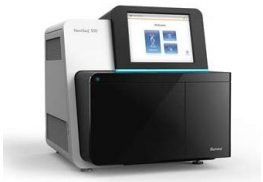
3 - 5 ore

- Sequenziamento Sanger Spike-RBD (mutazioni proteina S, singoli frammenti)



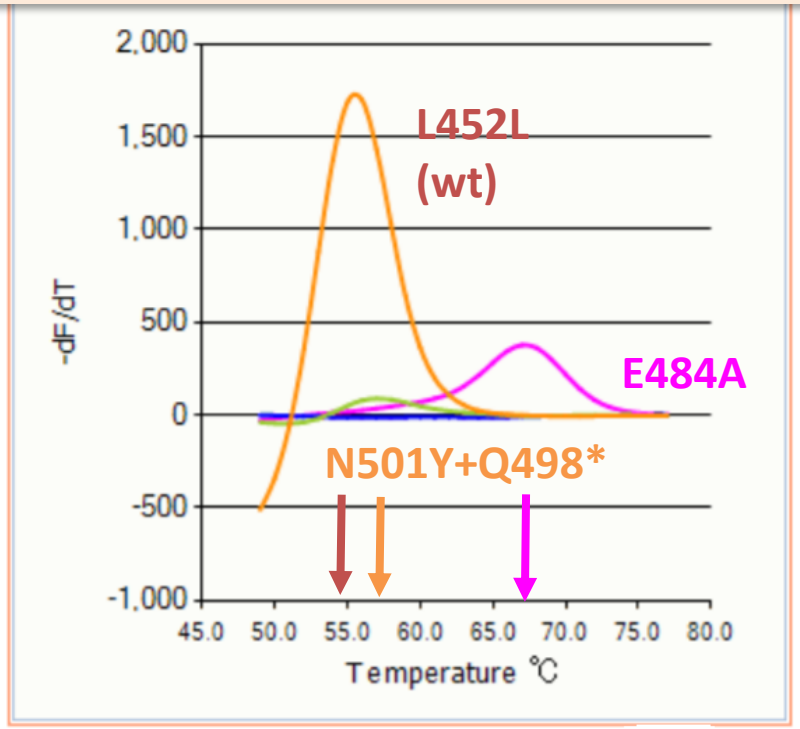
2 – 3 giorni

- Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) (genoma completo)

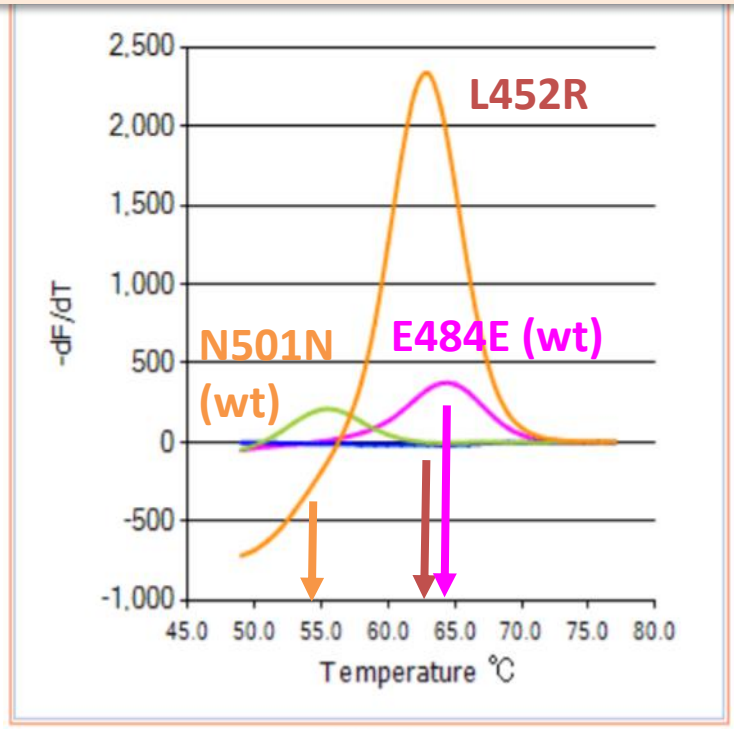


6 - 8 giorni

Ricerca ed identificazione principali mutazioni proteina Spike (S) tramite Rt-qPCR – High Resolution Melting Analysis



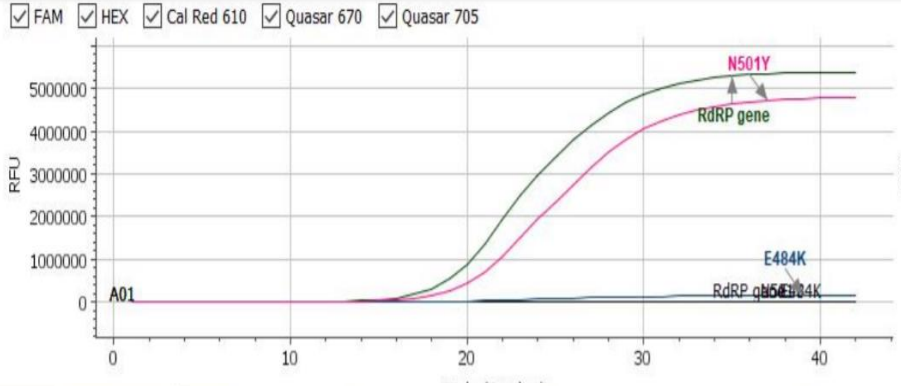
Melting

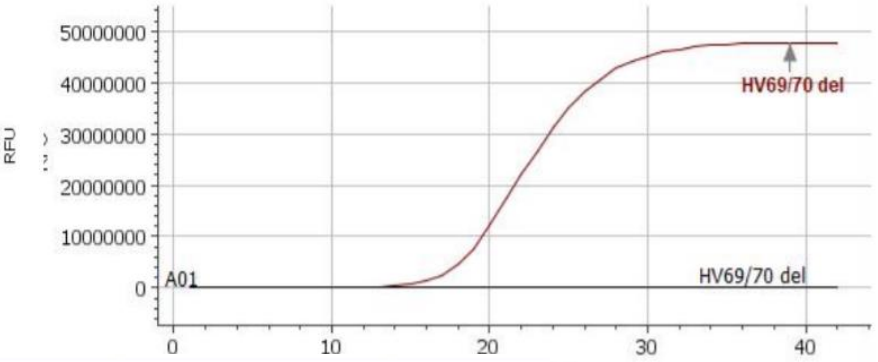


Melting

	484	IC	501	452
Measured Ct	23.46	27.04	36.40	21.12
Ct Limits	45.00	35.00	45.00	45.00
Measured Tm (℃)	64.2		55.5	62.6
Tm Limits (℃)	65.9 to 68.8 59.4 to 61.9 63.1 to 65.8		62.6 to 65.6 56.5 to 58.7 54.6 to 56.4	61.5 to 64.5 54.3 to 57.3 57.4 to 59.7

Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni proteina Spike (S) tramite RT-qPCR





Well	Name	Type	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 705		Quasar 670		
			E484K	C(t)	RdRP gene	C(t)	N501Y	C(t)	HV69/70 del	C(t)	IC	C(t)	
D01	8694261764	SAMPLE	+	11.12	+	11.06	+	7.93	+	7.09	+	17.56	RdRP gene, N501Y, HV69/70del
A01	8694414687	SAMPLE	-	N/A	+	18.04	-	N/A	-	N/A	+	21.78	RdRP gene
B01	8694415769	SAMPLE	-	N/A	+	18.10	+	20.22	+	17.41	+	23.02	RdRP gene,N501Y,HV69/70 del

Alpha:	Beta/Gamma:	Kappa/Delta:	Omicron:	Omicron2:	B.1.640.2:	Deltacron:
E484K, del69/70 N501Y	E484K, - N501Y	-	del69/70 N501Y	N501Y	E484K N501Y	?

well	ID		L452R	Cq	W152C	Cq	K417T	Cq	K417N	Cq	IC	Cq

Alpha:	Beta:	Gamma:	Kappa/Delta:	Delta plus:	Omicron:	Omicron2:	B.1.640.2:	Deltacron:
- - -	K417N	K417T	L452R	L452R K417N	K417N	K417N	-	?

Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione nuove varianti

medRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR HEALTH SCIENCES

CSH Cold Spring Harbor Laboratory BMJ Yale

B.1.640.2/lhu

Emergence in Southern France of a new SARS-CoV-2 variant of probably Cameroonian origin harbouring both substitutions N501Y and E484K in the spike protein

Philippe Colson, Jérémy Delerce, Emilie Burel, Jordan Dahan, Agnès Jouffret, Florence Fenollar, Nouara Yahi, Jacques Fantini, Bernard La Scola, Didier Raoult

doi: https://doi.org/10.1101/2021.12.24.21268174

This article is a preprint and has not been peer-reviewed

Rapida evoluzione: comparsa di nuove mutazioni

QUOTIDIANONAZIONALE

Covid, variante 'Deltacron' a Cipro: combinazione di Delta e Omicron

Pubblicato il **8 gennaio 2022**

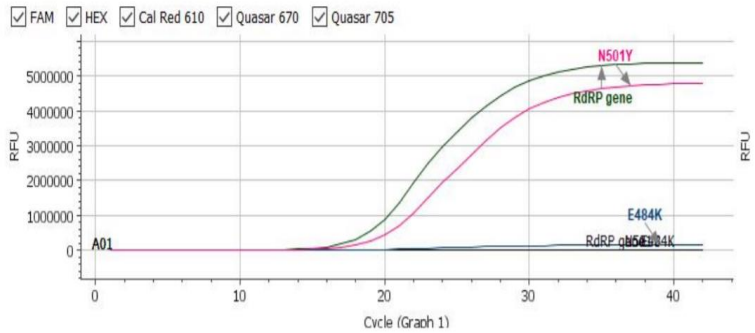
Identificati 25 casi dai ricercatori dell'Università. Kostrikis, professore di Scienze biologiche: "Vediamo se è più contagiosa"

Ricerca ed identificazione principali mutazioni proteina Spike (S)

E484K	N501Y	DEL69/70	L452R	K417N	K417T	W152C	
-	-	-	-	-	-	-	WT
-	+	+	-	-	-	-	**ALFA**
+	+	-	-	+	-	-	**BETA**
+	+	-	-	-	-	-	**GAMMA**/MU/THETA
-	-	-	+	-	-	-	**DELTA/KAPPA**/EPSILON
-	+	+	-	+	-	-	**OMICRON**
+	-	-	-	-	-	-	**ZETA/ETA**
+	+	-	-	-	-	-	**B.1.640.2/Ihu**
-	+	-	-	+	-	-	**OMICRON 2 (BA.2)**
							DELTACRON

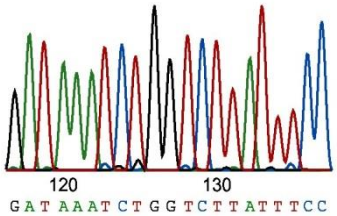
Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni

- Screening rapido con RT-qPCR/RT-qPCR-HRMA (mutazioni principali proteina S)



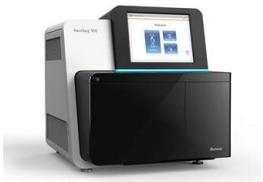
3 - 5 ore

- **Sequenziamento Sanger Spike-RBD (mutazioni proteina S, singoli frammenti)**



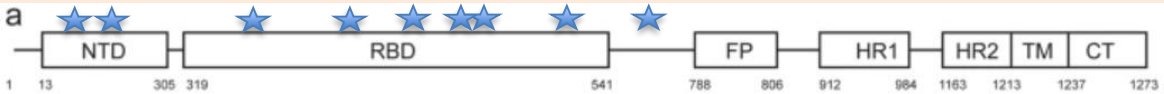
2 – 3 giorni

- Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) (genoma completo)

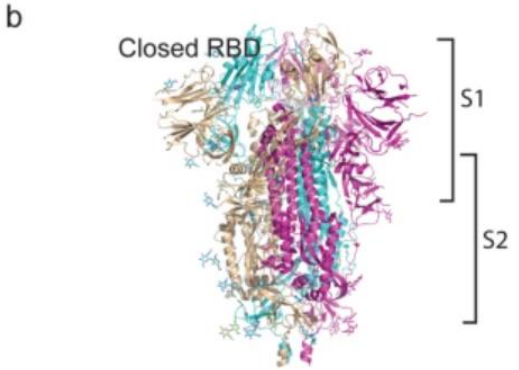


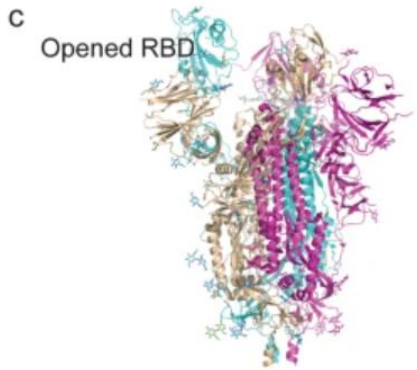
6 - 8 giorni

Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni proteina Spike (S) tramite Sanger

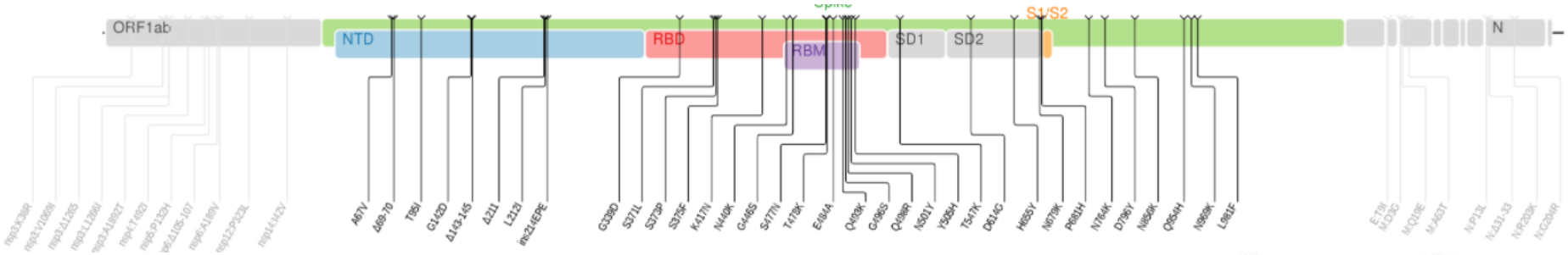


Circa 3800pb





omicron

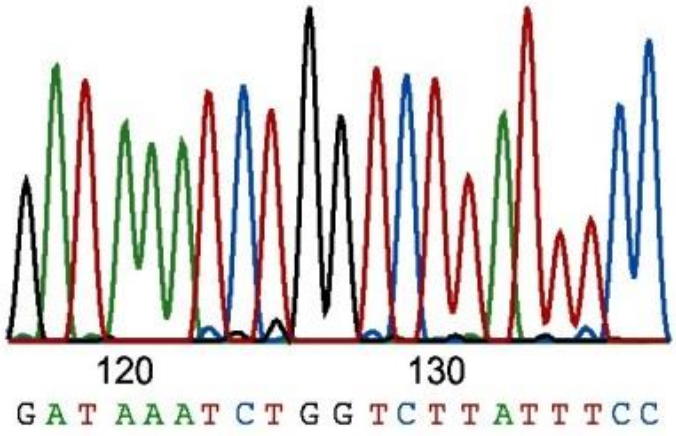


Sequenziamento di frammenti 200-700 pb (65-250aa)

Interpretazione manuale/semiautomatizzata

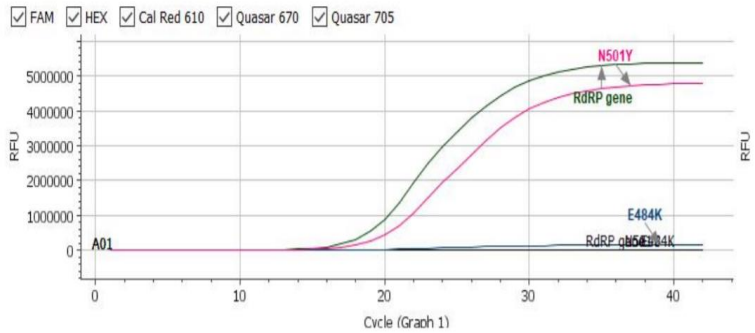
Sequenziamento parziale della proteina S

Individuazione «nuove mutazioni» solo nel frammento analizzato



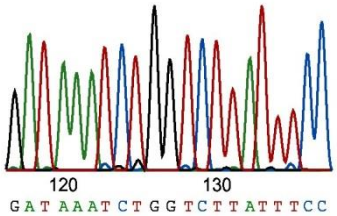
Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni

- Screening rapido con RT-qPCR/RT-qPCR-HRMA (mutazioni principali proteina S)



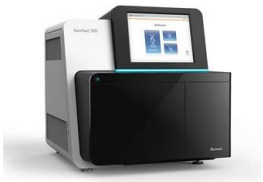
3 - 5 ore

- Sequenziamento Sanger Spike-RBD (mutazioni proteina S, singoli frammenti)



2 – 3 giorni

- **Sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS)** **(genoma completo)**



6 - 8 giorni

Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione mutazioni (intero genoma) tramite NGS

Clade	E-protein	Lineage	M-protein	N-protein	N_consensus	Notifica	ORF10	ORF1ab	ORF3a	ORF6	ORF7a	ORF7b	ORF8	S-protein	Variante
21J (Delta)	=	AY.111	I82T;	D63G; R203M; P207S; G215C; D377Y;	41 (0.1%)	Si	=	F106; A488S; N544; A579; P1228L; P1469S; D144; V167L; T492I; K90R; T77A; V120; M67I; P323L; G671S; P77L; Y211; A394V;	S26L;	=	V82A; T120I;	T40I;	DF119_del;	T19R; T95I; G142D; EFR156G_del; K417N; L452R; T478K; S494L; D614G; P681R; D950N; Q1071;	Delta
21J (Delta)	=	AY.122	I82T;	D63G; R203M; G215C; D377Y;	1615 (5.5%)	-	=	K81N; A318V; E493K; A507T; D9; F106; Q167H; L216F; A488S; N891; P1228L; P1469S; T1830I; T492I; T77A; V120; P323L; G671S; P77L; A394V; D402; F445; K160R;	S26L;	I17L;	V82A; R118G; T120I;	T40I;	DF119_del;	T19R; G142D; EFR156G_del; G181V; L452R; S477; T478K; D614G; P681R; Y707; G842V; D950N;	Delta

Diagnostica varianti SARS-CoV-2:
Ricerca ed identificazione principali mutazioni proteina Spike (S) tramite NGS

Clade	E-protein	Lineage	M-protein	N-protein	N_consensus	Notifica	ORF10	ORF1ab	ORF3a	ORF6	ORF7a	ORF7b	ORF8	S-protein	Variante
21K (Omicron)	T9I;	BA.1	D3G; A63T;	P13L; GERS30G_del; R203K; G204R;	657 (2.2%)	Si	=	K38R; F106; A889; SL1265I_del; C1852; A1892T; T492I; P132H; LSGF105F_del; I189V; V57; P323L; N600; Y269C; I42V;	T64;	R20;	=	L18;	=	A67V; T95I; GVYY142D_del; NL211I_del; D215EPED; G339D; S371L; S373P; S375F; K417N; N440K; G446S; S477N; T478K; E484A; Q493R; G496S; Q498R; N501Y; Y505H; T547K; D614G; H655Y; N679K; P681H; N764K; D796Y; N856K; Q954H; N969K; L981F; D1146;	Omicron

Varianti SARS-CoV-2:
Epidemiologia - Distribuzione varianti in Toscana

Ottobre-Dicembre 2021

Analisi Sanger

Delta: 54

Omicron: 54

Alfa: 2

Analisi NGS

Delta: 54

B.1.617.2: 24

AY.4: 9

AY.36:1

AY.119: 3

AY.126: 1

AY.127: 1

AY.4.2.3: 1

AY.43: 2

AY.43.4: 1

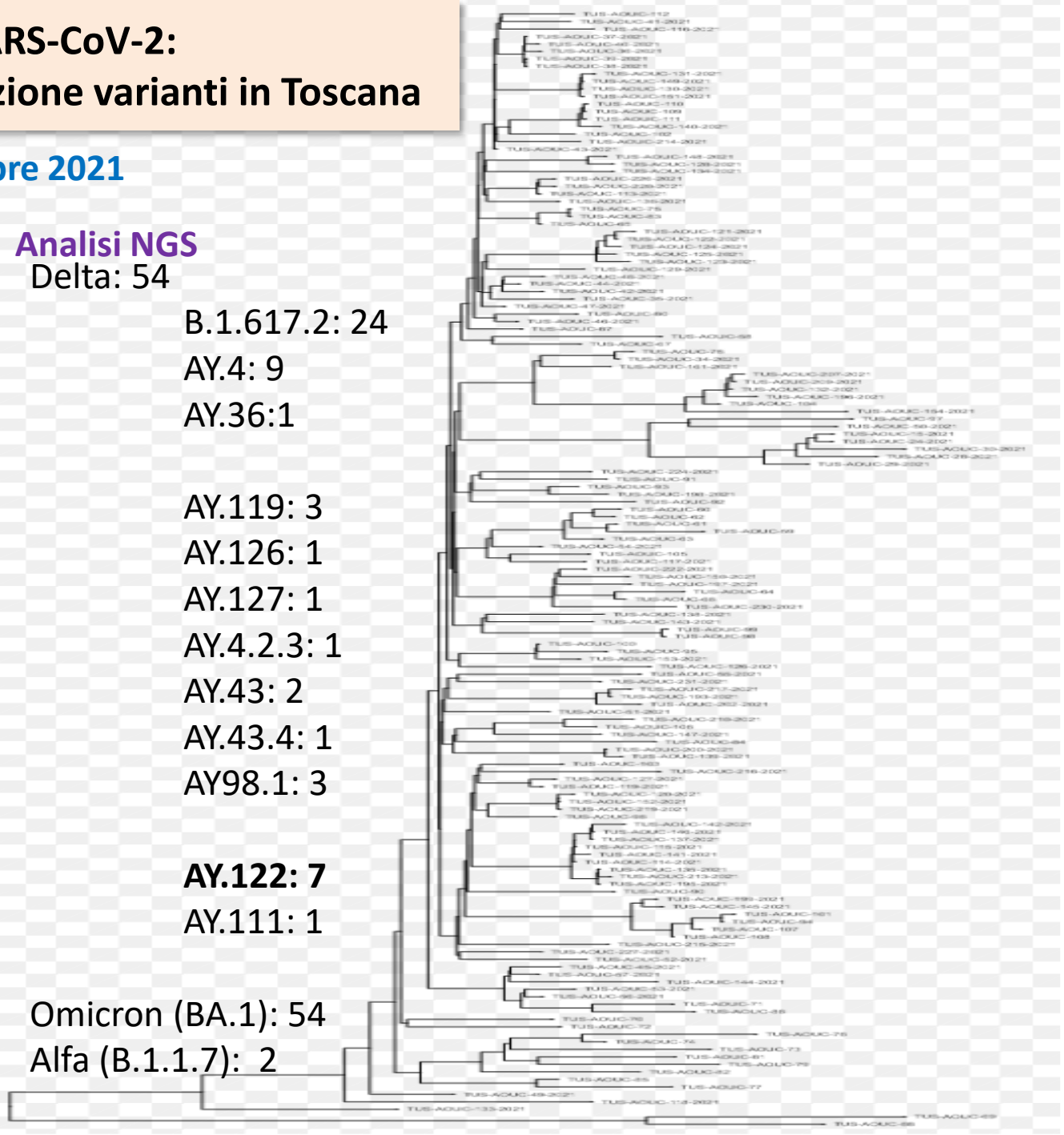
AY98.1: 3

AY.122: 7

AY.111: 1

Omicron (BA.1): 54

Alfa (B.1.1.7): 2



Varianti SARS-CoV-2: strumento per la lotta contro la pandemia