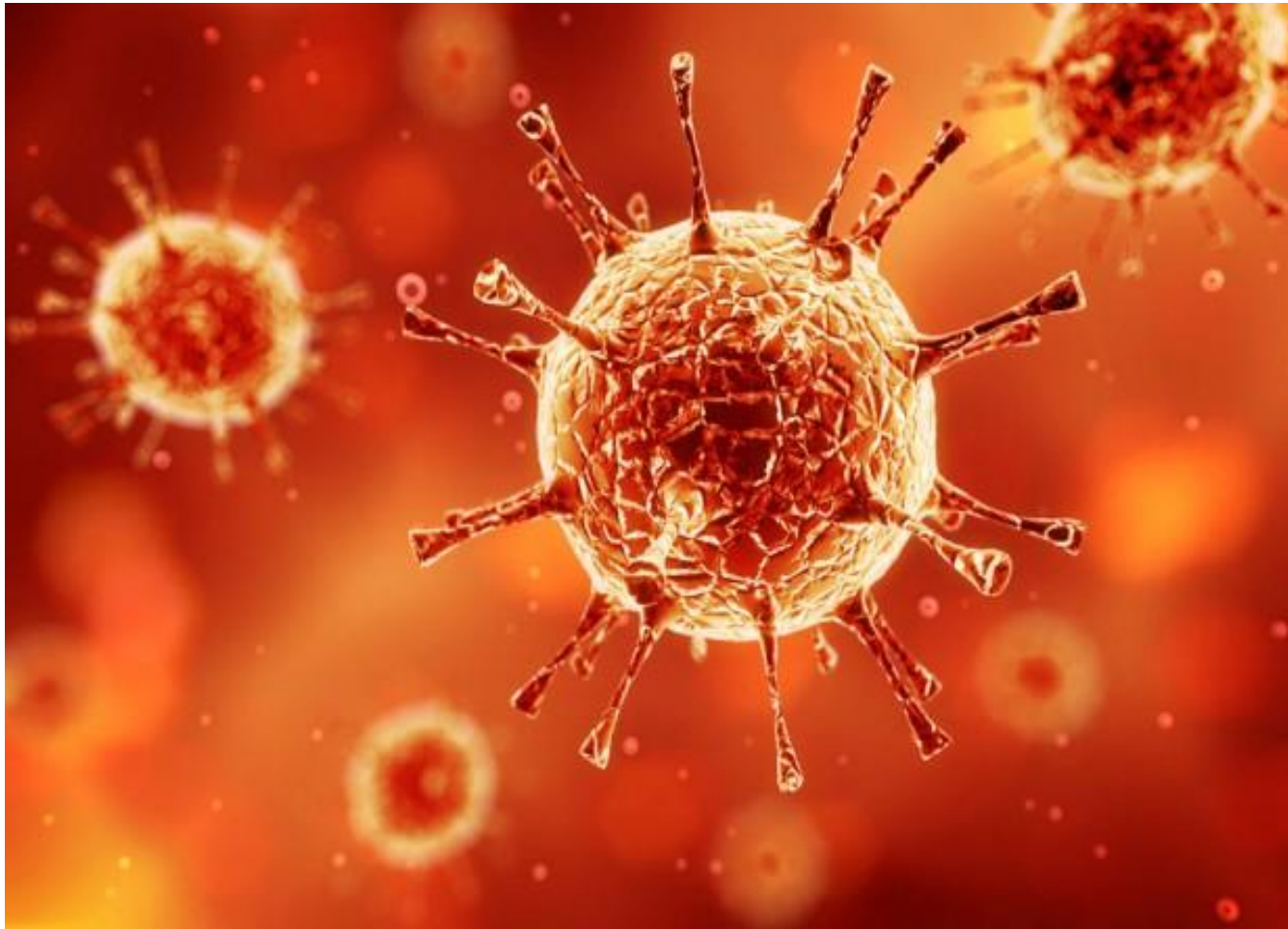


Geneza coronavirusului SARS-CoV-2

Evoluția COVID-19 în Republica Moldova



ANSP

MSMPS

Prof. C.
Spînu,

N. Furtună,

A. Ceban

I. Coronavirusurile (descoperite la începutul anilor 1930)

- Subfamilie de virusuri din familia Coronaviridelor, care include 4 genuri: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus și Deltacoronavirus;
- Supradomeniu Biota
- Regn Virus
- Ordin Nidovirales
- Familie Coronaviridae
- Subfamilie Orthocoronavirinae

Coronaviroze umane

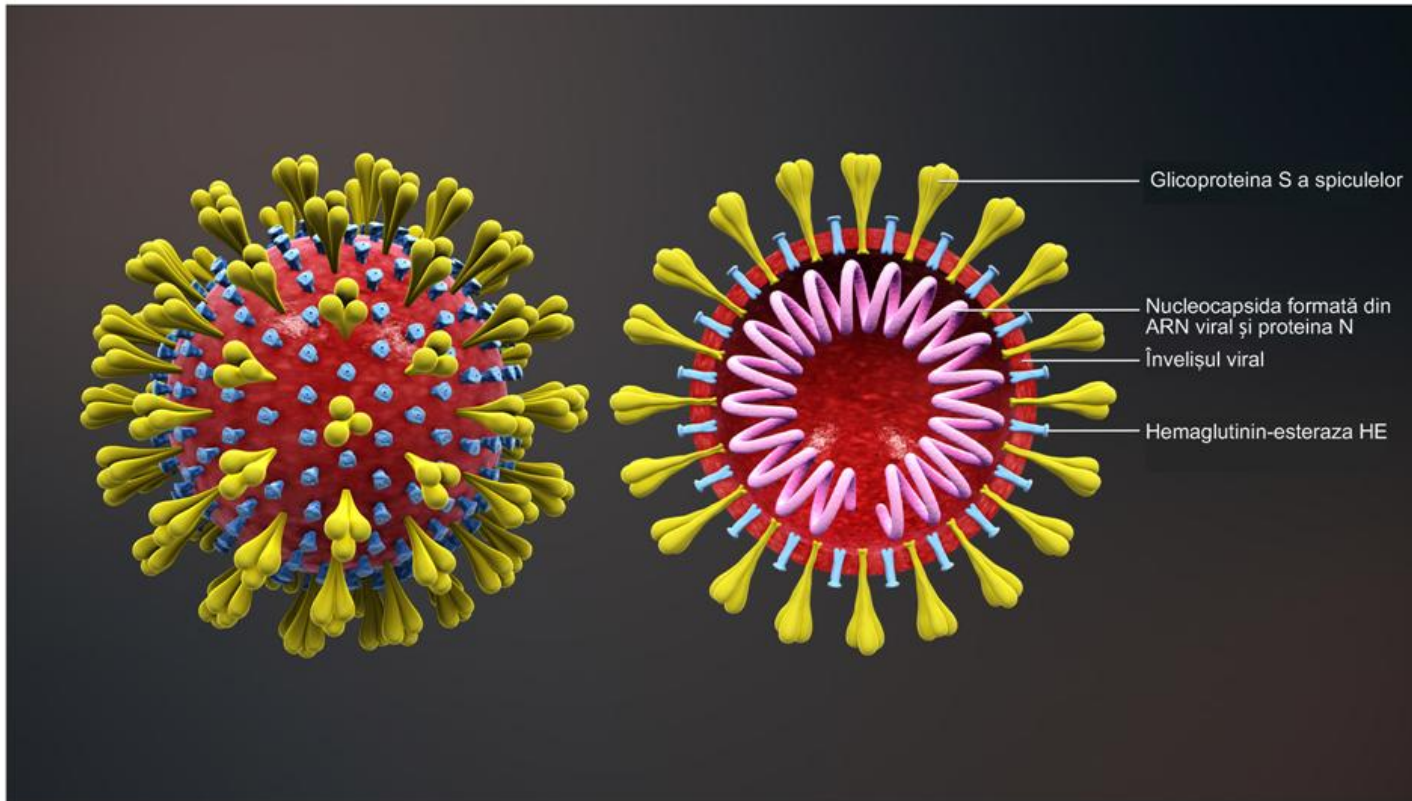
- Coronavirusul uman 229E
- Coronavirusul uman NL63
- Coronavirusul uman OC43
- Coronavirusul uman HKU1
- Coronavirusul sindromului respirator acut sever (SARS-CoV) – China - letalitate 9,6%
- Coronavirusul sindromului respirator din Orientul Mijlociu (MERS-CoV) – Coreea de Sud - letalitate 19,5%
- Coronavirusul sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2) sau noul coronavirus 2019 (2019-nCoV) – nivel global - letalitate circa 3,4%; Italia - letalitate 6,6%

II. Coronavirusurile

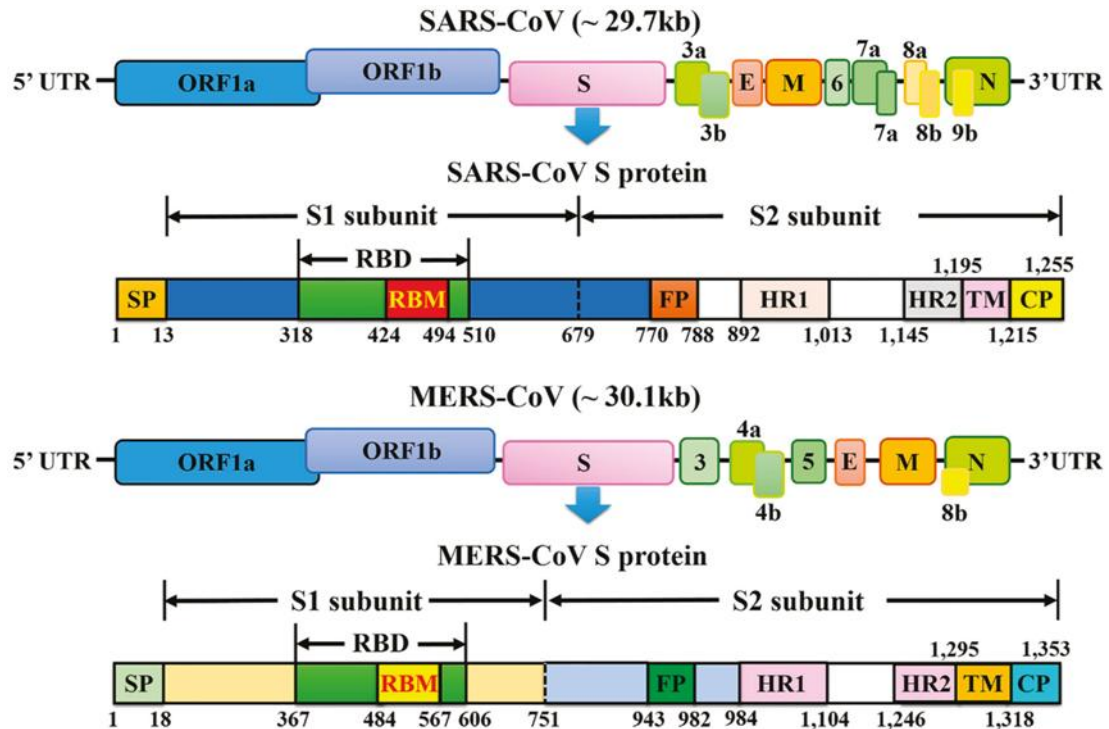
Morfologie, Structura, Proliferare

- Formă variabilă, sferică sau ovoidală, diametrul de 120-160 nm,
- Proeminențe glicoproteice, spicule (peplomere), foarte lungi (24 nm) cu extremități rotunjite, aranjate în așa fel încât, la microscopul electronic, dau aspect de coroană solară. Spiculele au rolul de a se lega de receptorii celulari, favorizând infecția celulelor sensibile
- Virionul are înveliș extern de natură lipoproteică, care conține proteine virale:
 - glicoproteină S (proteina structurală a spiculelor)
 - proteină E de înveliș
 - proteină M de membrană
 - hemaglutinin-esterază (HE)
- Genomul constă într-o singură moleculă lineară de acid ribonucleic (ARN), monocatenară, de sens pozitiv, care are 25-33 kb, fiind cel mai mare ARN viral cunoscut
- Genomul ARN și proteina N formează o nucleocapsida helicală, înconjurată de învelișul extern. ARN este infecțios, servește ca genom și ca ARNm viral
- Transcrierea genomului este un proces complex și implică sinteza a opt catene de ARN de sens negativ subgenomic intermediar; cele cinci proteine structurale sunt traduse de la ARN subgenomic
- Intrat în celulă ARN celular este depus în citoplasmă, prezența proteinei ARN replicase, permite transferul ARN-ului virusului în celula gazdă. Replicase este apoi prima proteină care se reproduce acolo
- Coronavirusurile au o protează care este capabilă să separe proteinele de lanț. Aceasta este o formă de economie genetică pentru virus, care îi permite să împartă cel mai mare număr de gene într-un număr mic de nucleotide

Schema unui coronavirus



Reprezentarea schematică a organizării genomului și a domeniilor funcționale ale proteinei S pentru SARS-CoV și MERS-CoV

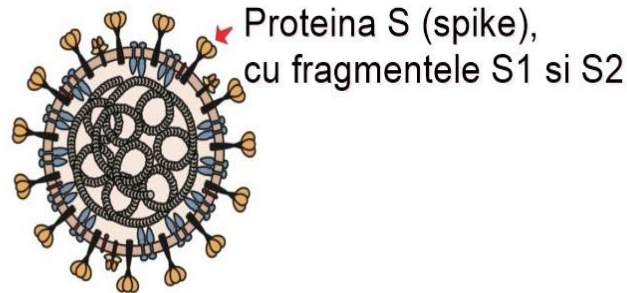


COVID-19

- De la începutul anului 2020, comunitatea medicală internațională își îndreaptă atenția asupra noului coronavirus, SARS-CoV-2, și a bolii pe care o determină, COVID-19
- Virusul a apărut în orașul Wuhan, provincia Hubei, din China și s-a răspândit la nivel internațional
- Cunoașterea virusului SARS-CoV-2 și a bolii COVID-19 este în permanentă dinamică, deoarece este un virus nou apărut.
- Genomul viral a fost identificat într-un timp record pentru un virus recent descoperit în numai 30 zile
- Studiile recente sugerează că mai sunt multe detalii de înțeles despre acest virus și modul în care acționează
- SARS-CoV-2 prezintă similarități structurale și genetice cu coronavirusuri identificate la liliac și la pangolin, ceea ce susține ipoteza traversării barierei speciilor la om

I. Evoluția genetică a SARS-CoV-2: de unde provine, încotro se îndreaptă

- Virusul SARS-CoV-2 provine dintr-o familie virală care afectează în mod majoritar animalele: printre speciile afectate se numără lilieci, porcii, șoarecii și chiar balenele beluga
- Cele șapte specii de coronavirus care infectează și oamenii (dintre care cel mai recent descoperit este SARS-CoV-2) au fost identificate și la diverse specii de animale
- Debutul pandemiei COVID-19 și primele cazuri din Wuhan au fost strâns legate de o piață agroalimentară, înainte să se răspândească prin transmitere interumană
- Toate acestea sugerează că SARS-CoV-2 este un virus zoonotic, care a trecut bariera speciilor de la un animal la om
- Studiile genetice au trasat drumul virusului de la gazdele animale la om, urmărind variațiile genetice ale proteinei S (spike)



Proteina S (spike),
cu fragmentele S1 și S2

Proteaza furina cliveaza fragmentele S1 și S2
din structura proteinei S, permitand virusului sa fuzioneze cu
membrana celulelor umane și sa le infecteze

- Proteina structurală S (spike) a coronavirusului SARS-CoV-2 poate fi clivată la nivelul sitului polibazic de către furină, o enzimă des întâlnită în organism, ceea ce favorizează infectarea cu noul coronavirus

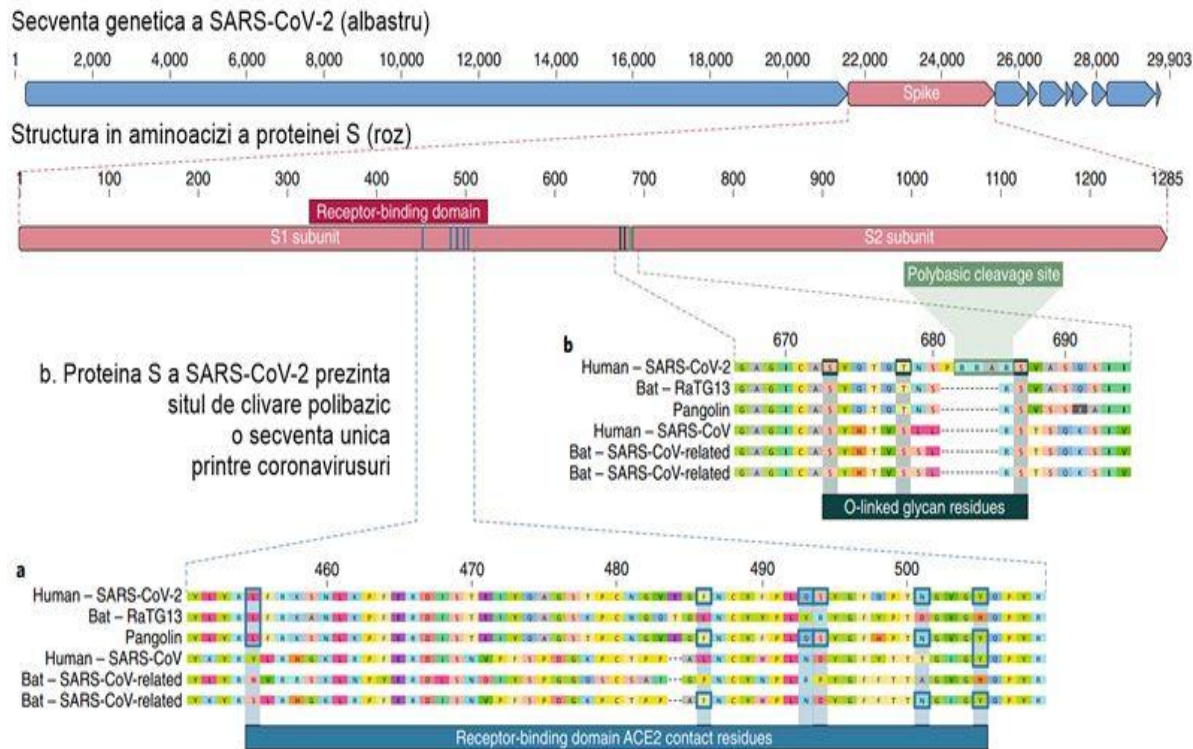
II. Evoluția genetică a SARS-CoV-2: de unde provine, încotro se îndreaptă

Identificarea originii SARS-CoV-2 prin compararea codului genetic responsabil pentru construirea acestei proteine din diferite coronavirusuri

- Atât virusul SARS, cât și SARS-CoV-2 au afinitate ridicată pentru receptorul din celulele umane, însă structura proteinei S este semnificativ diferită între cele două virusuri
- Această observație indică faptul că proteina S a virusului SARS-CoV-2 a apărut prin selecție naturală, un proces îndelungat de acumulare de mutații genetice în generații succesive de virusuri. Ipoteza improbabilă de apariție a noului coronavirus prin manipulare umană implică utilizarea unei structuri virale deja cunoscute.
- SARS-CoV-2 este similar cu celelalte coronavirusuri SARS și, respectiv, MERS (care au evoluat într-o manieră epidemică în trecut) doar într-o proporție de doar 79% și, respectiv, 50%
- Un alt aspect care diferențiază SARS-CoV-2 de celelalte coronavirusuri cunoscute este prezența unui sit de clivare între două dintre cele trei subunități ale proteinei S. Acest fragment proteic, format dintr-o serie de aminoacizi bazici (polybasic cleavage site), poate fi clivat de furină, o enzimă care se regăsește în numeroase țesuturi din organism. La fel ca structura unică a proteinei S printre coronavirusuri, și situl de clivare este diferit de alte fragmente proteice cu funcție similară din alte coronavirusuri (virusul SARS ne reprezentând deloc un astfel de sit).

III. Evoluția genetică a SARS-CoV-2: de unde provine, încotro se îndreaptă

Structura în aminoacizi a proteinei S virale și comparația acesteia cu proteinele omoloage din alte coronavirusuri



a. Proteina S a SARS-CoV-2 prezintă secvențe de aminoacizi comune cu virusuri identificate la pangolin și liliac, plasate în regiuni esențiale pentru infectarea celulelor

The proximal origin of SARS-CoV-2, autori K. Andersen, A. Rambaut, et al.
17 martie 2020, Nature Medicine, doi 10.1038/s41591-020-0820-9

Evoluția structurii genetice a virusului SARS-CoV-2

- Structura genetică a SARS-CoV-2 indică liliacul drept sursa zoonotică a infecției: este identic în proporție de 96.2% cu un coronavirus din populația de liliaci din China. Totuși, fragmente importante din proteina S diferă.
- Gazda intermediară între liliac și om este cel mai probabil pangolinul, un mamifer cu corpul acoperit de solzi, care se comercializează în mod ilegal în piețele agroalimentare precum cea din Wuhan, datorită utilizării în medicina tradițională chineză.
- Coronavirusurile izolate de la aceste animale au în comun cu SARS-CoV-2 fragmente înalt specifice de proteină S, responsabile cu legarea de celule. Aceste două observații indică istoria SARS-CoV-2: un coronavirus specific liliecilor, care s-a transmis la pangolin în piața agroalimentară din Wuhan, acumulând mutații care cresc infectivitatea în acest proces



Istoria virusului SARS-CoV-2: un coronavirus specific liliecilor, care s-a transmis la pangolin în piața agroalimentară din Wuhan, acumulând mutații care i-au permis să traverseze bariera speciilor la om.

Confirmarea originii zoonotice prin identificarea „verigii – lipsă”: specia de coronavirus care infectează pangolinul

- Prin analiza unor fragmente tisulare, s-a identificat genomul unui coronavirus întâlnit în mai multe probe, și a fost comparat cu coronavirusul specific liliecilor și cu SARS-CoV-2. Diferite secvențe de nucleotide au fost identice cu SARS-CoV-2 în proporții variind între 85,5% și 92,4%
- Cel mai semnificativ aspect este însă similaritatea înaltă, de 97,4%, în fragmentul genetic corespunzător proteinei S
- Fragmentul responsabil cu interacțiunea cu receptorul uman (ACE2) este identic într-o proporție de 84,4% între coronavirusul din pangolin și SARS-CoV-2, față de 80,8% și 81,4% între virusul din liliac și SARS-CoV-2, indicând o legătură filogenetică mai apropiată
- Astfel, originea zoonotică este mult mai probabilă decât cea „de laborator”: în primul rând, în laboratoarele care cercetează coronavirusuri nu s-au raportat prezența de specii suficient de similare cu SARS-CoV-2 încât să explice apariția acestuia, iar fragmentul comun al proteinei S între SARS-CoV-2 și coronavirusul specific pangolinului indică această cale de apariție drept mai mult probabilă

I. Comportamentul virusului SARS-CoV-2 de la începutul epidemiei COVID-19

- Compararea proteinei S cu proteina S a altor coronavirusuri relevă o altă observație, cu semnificație epidemiologică: capacitatea SARS-CoV-2 de a se lega de celulele umane este superioară altor coronavirusuri
- Existența sitului polibazic de clivare (menționat anterior), la nivelul căruia poate activa o enzimă ubicuitară din organism (furina) îi conferă noului coronavirus capacitatea de a infecta, în mod eficient, mai multe țesuturi diferite. Prin clivare, fragmentele din proteina S responsabile cu pătrunderea în celulă sunt activate. Enzima furină este, în plus, bogat distribuită în tractul respirator și în țesutul pulmonar.
- Virusurile SARS-CoV-2 și SARS se atașează de același receptor în momentul infecției gazdei umane – enzimă de conversie a angiotensinei (ACE2). Totuși, comparația genetică relevă faptul că proteina S de suprafață (care interacționează cu ACE2) a celor două virusuri diferă în mod semnificativ, iar proteina S a SARS-CoV-2 are o afinitate superioară față de receptorul uman
- Aceste diferențe se datorează, probabil, recombinării genetice suferite de virus în cadrul gazdei sale intermediare, pangolinul
- Un aspect important, care poate indica schimbări în comportamentul virusului în organismul uman, este prezența de mutații genetice. Pe măsură ce virusul infectează mai mulți oameni și se multiplică, există posibilitatea apariției de mutații, care să conducă la tulpini virale distincte, cu comportamente diferite, în ceea ce privește infectarea de noi pacienți, transmiterea interumană, agresivitatea formelor clinice de COVID-19
- Până în acest moment, cercetările indică un grad scăzut de variabilitate genetică în cazul SARS-CoV-2

II. Comportamentul virusului SARS-CoV-2 de la începutul epidemiei COVID-19

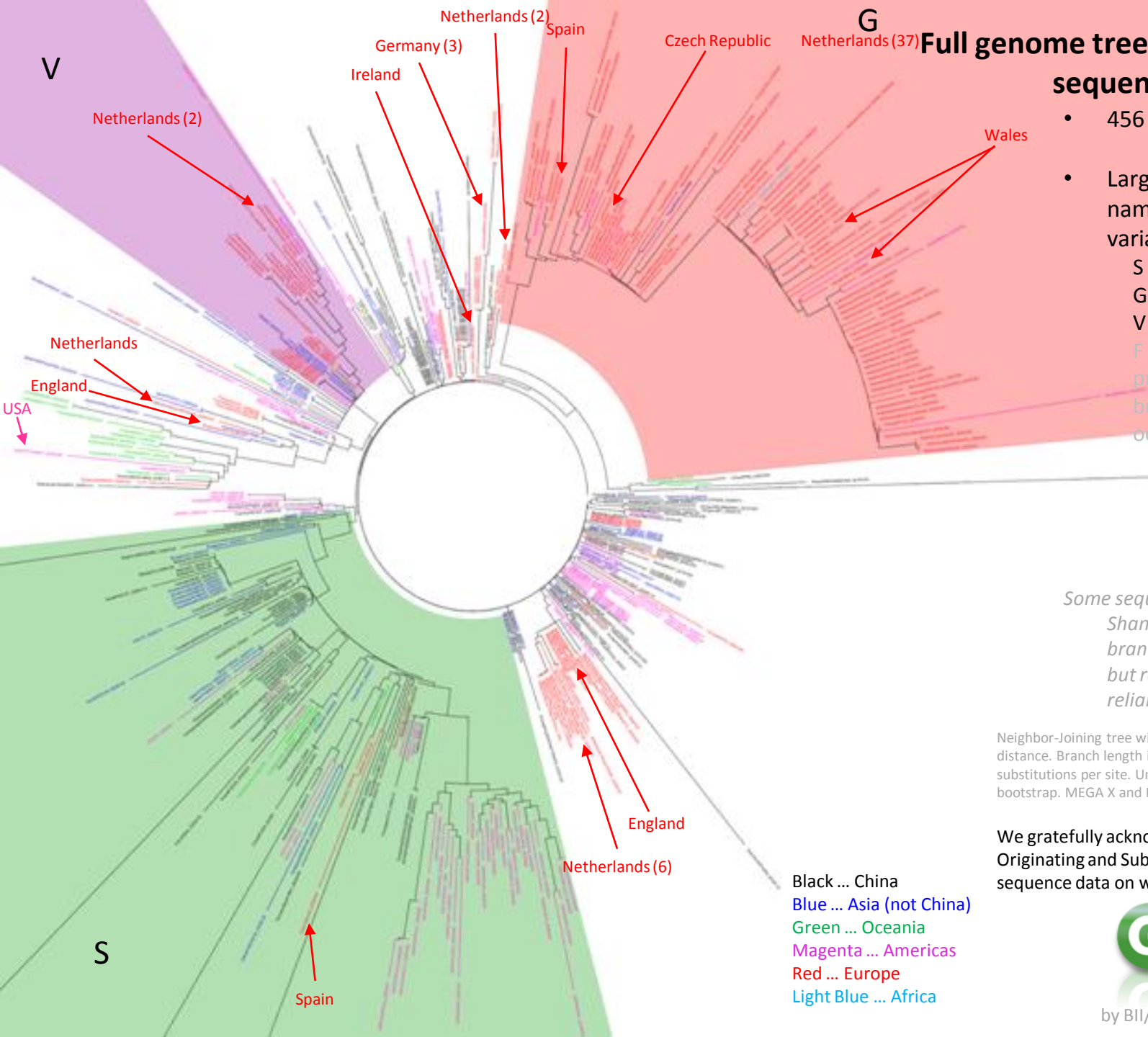
- Astfel, este necesară analiza comparativă a genomului viral prelevat de la pacienți din diferite regiuni ale pomondului și momente diferite ale evoluției pandemiei, pentru a identifica diferențele genetice
- Prin compararea a 103 probe, s-a observat că există două tulpini distincte de coronavirus SARS-CoV-2, denumite L și S (în funcție de aminoacidul codificat de regiunile omoloage diferite ale celor două tulpini)
- Se estimează că 70% dintre pacienții COVID-19 sunt infectați cu tulpina L, iar 30% cu tulpina S. Reconstruind evoluția celor două tulpini, se observă că tulpina S se regăsește de mai multă vreme în circulație, iar tulpina L a apărut ulterior, evoluând din tulpina S.

I. Variabilitatea genetică, explicație pentru agresivitatea virusului SARS-CoV-2

- Astfel tulpina L este predominantă (70%), deși a apărut mai recent, și în plus prezintă o variabilitate genetică mai mare, putem deduce că se transmite și se replică mai rapid în populația umană
- Acest comportament îi permite să acumuleze mutații la fiecare replicare, și să se răspândească mai rapid.
- Primii pacienți diagnosticați, din Wuhan, au fost infectați preponderent cu tulpina L (96.3%). Ulterior, pacienții din restul Chinei, au prezentat tulpina L într-o proporție de doar 61.6%. Acest lucru poate fi explicat de măsurile prompte ale autorităților: prin izolarea și carantinarea precoce, transmiterea tulpinii L, mai rapidă și agresivă, a fost stopată, iar tulpina S, mai lentă, a putut atinge o incidență mai mare.

II. Variabilitatea genetică, explicație pentru agresivitatea virusului SARS-CoV-2

- Toate aceste concluzii reprezintă, însă, rezultatele analizei unei proporții mici de probe din totalul infecțiilor, cauzate de SARS-CoV-2. O analiză similară este necesară și în alte regiuni afectate de COVID-19, precum Europa și SUA
- Cercetările efectuate asupra probelor virale de la pacienți din Italia confirmă faptul virusul SARS-CoV-2 la moment nu are o tendință pronunțată spre a acumula mutații genetice: în populația italiană au fost descrise doar cinci variante genetice virale, un număr scăzut pentru un număr atât de mare de cicluri replicative
- Concomitent este necesar de amintit că virusul SARS-CoV-2 conduce la o proporție ridicată de cazuri severe de pneumonie și respectiv la o mortalitate crescută, în comparație cu gripa sezonieră. Mai exact, 80% dintre cazuri sunt ușoare, 15% sunt severe și doar 5,0% sunt grave, necesitând suport ventilator
- În ceea ce privește mortalitatea (până la 30.03.2020), 3.4% dintre cazurile raportate de OMS au evoluat către deces. Această valoare este mai mare decât în cazul gripei sezoniere, care are o mortalitate de maximum 0,15% (conform estimărilor CDC pentru iarna 2019-2020), însă net inferioară mortalității cauzate de coronavirusurile care au condus la epidemii în trecut, SARS și, respectiv, MERS, cu mortalități de 9.6% și, respectiv, 34,0%



Full genome tree of all outbreak sequences 2020-03-13

- 456 full genomes shared
- Larger clades were named based on marker variants:
 - S ... ORF8-L84S
 - G ... S-D614G
 - V ... NS3-G251V
 - F ... NSP6-L37F was previously considered but marker is not stable occurring elsewhere too

Some sequences (e.g. Beijing, Shanghai, Henan,...) have long branches due to lower quality but relative tree position reliable.

Neighbor-Joining tree with Maximum Composite Likelihood distance. Branch length in the units of the number of base substitutions per site. Uniform rates. Pairwise deletion. 500 bootstrap. MEGA X and FigTree.

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

- Black ... China
- Blue ... Asia (not China)
- Green ... Oceania
- Magenta ... Americas
- Red ... Europe
- Light Blue ... Africa

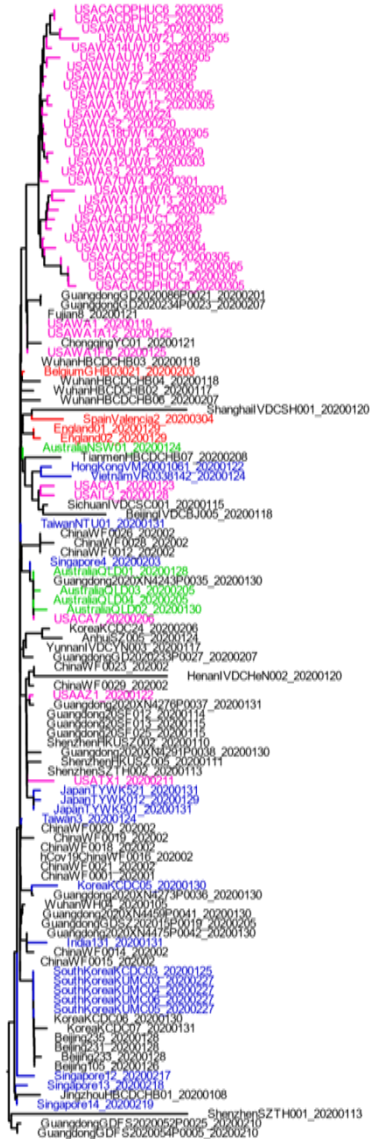


Full genome trees of major subclades

2020-03-13

Black ... China
 Blue ... Asia (not China)
 Green ... Oceania
 Magenta ... Americas
 Red ... Europe
 Light Blue ... Africa

S clade
 119 (+1)



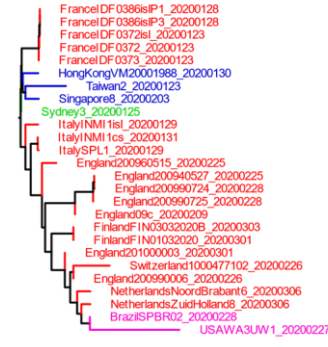
9. DE-5

G clade
 92 (+44)



4. DE-5

V clade
 26 (+2)



3. DE-5

Notable changes:

- S clade: 1 Spain
- G clade: 37 Netherlands, 1 Spain, 3 Germany, 2 Wales, 1 Czech Republic
- V clade: 2 Netherlands

Other clades (+13)

9 Netherlands, 1 Ireland, 1 USA, 2 England

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



Full genome nucleotide alignments for high quality genomes

2020-03-13 (456 full genomes)

To reduce noise of random mutations all 272 available high quality genomes are considered here

Primer set names	Genomes aligned with base change	Primer set names	Genomes aligned with base change
Egene_Sarbeco (Amplicon length – 113bp) Charité	EPI_ISL_402124:g.26354T>A - EPI_ISL_411929 EPI_ISL_402124:g.26370C>T - EPI_ISL_412459, 413611, 413612 Clade G (0) Clade S (0) Clade V (1) Other (3)	HKU1_N (Amplicon length – 110bp) HKU	EPI_ISL_402124:g.29200C>T EPI_ISL_408478 EPI_ISL_402124:g.29230C>T EPI_ISL_413609 Clade G (0) Clade S (1) Clade V (0) Other (1)
RdRPGene_SARsR (Amplicon length – 100bp) Charité https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf	None (accepting flexibility on published ambiguous S position in reverse primer)	HKU1_ORF1b_nsp14 (Amplicon length – 132bp) HKU https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf	EPI_ISL_402124:g.18828C>T EPI_ISL_412459, EPI_ISL_402124:g.18867C>T EPI_ISL_413592 Clade G (1) Clade S (0) Clade V (0) Other (1)
ChinaCDC_ORF1ab (Amplicon length – 119bp) ChinaCDC	None	N1_USA_CDC (Amplicon length – 72bp) USA_CDC	EPI_ISL_402124:g.28291C>T EPI_ISL_406534, EPI_ISL_402124:g.28315C>T EPI_ISL_412983 Clade G (0) Clade S (1) Clade V (0) Other (1)
ChinaCDC_N (Amplicon length – 99bp) ChinaCDC http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html	EPI_ISL_402124:g.28881G>A, EPI_ISL_402124:g.28882G>A, EPI_ISL_402124:g.28883G>C EPI_ISL_412912, 412972, 413021, 413022, 413023, 413024, 413488, 413579, 413587, 413584, 413604, 413647, 413997, 414023, 414022, 414021, 414012 EPI_ISL_402124:g.28916G>A EPI_ISL_414485 Clade G (16) Clade S (0) Clade V (0) Other (2)	N2_USA_CDC (Amplicon length – 67bp) USA_CDC	EPI_ISL_402124:g.29200C>T EPI_ISL_408478, EPI_ISL_402124:g.29230C>T EPI_ISL_413609 Clade G (0) Clade S (0) Clade V (1) Other (1)
		N3_USA_CDC (Amplicon length – 72bp) USA_CDC https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-PCR-panel-primer-probes.pdf	EPI_ISL_402124:g.28688T>C EPI_ISL_408482, 412975, 412981, 413213, 413214, 413490, 413597, 413598, 413595, 413600, 414008, 414476? EPI_ISL_402124:g.28716C>T EPI_ISL_406595 Clade G (0) Clade S (0) Clade V (0) Other (12)

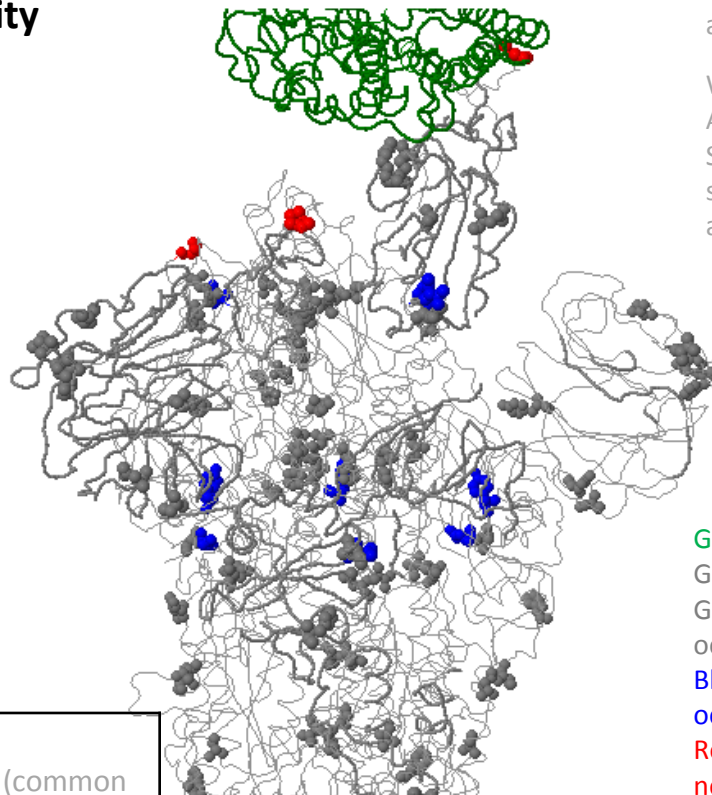
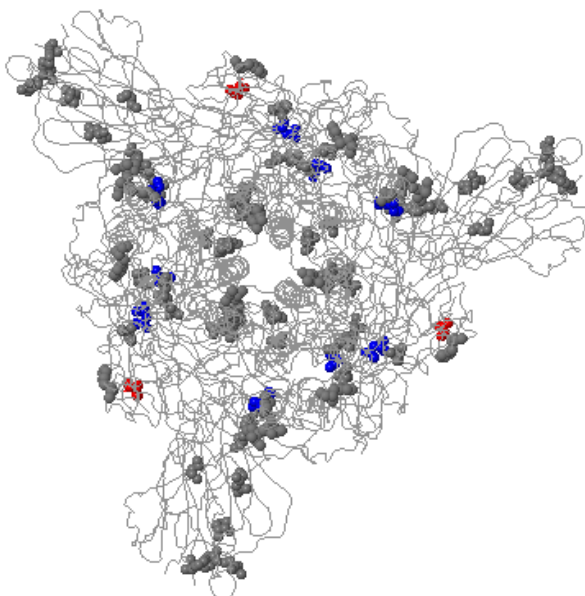
We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

by BII/GIS, A*STAR Singapore



Receptor binding surveillance for high quality genomes 2020-03-13

One rare variant near the binding interface not known to be linked to severity



To reduce noise of random mutations all 272 available high quality genomes are considered here

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

Green ... ACE2 human host receptor
 Gray ... CoV spike glycoprotein trimer
 Gray balls ... Spike glycoprotein variation occurring once
 Blue balls ... Spike glycoprotein variation occurring more than once
 Red balls ... Spike glycoprotein variation near host receptor

List of common variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region)	Frequency (common location)
H49Y	5 (3 Guangzhou)
V367F	6 (5 France)
V483A	3 (USA-WA)
D614G	31 (Europe)

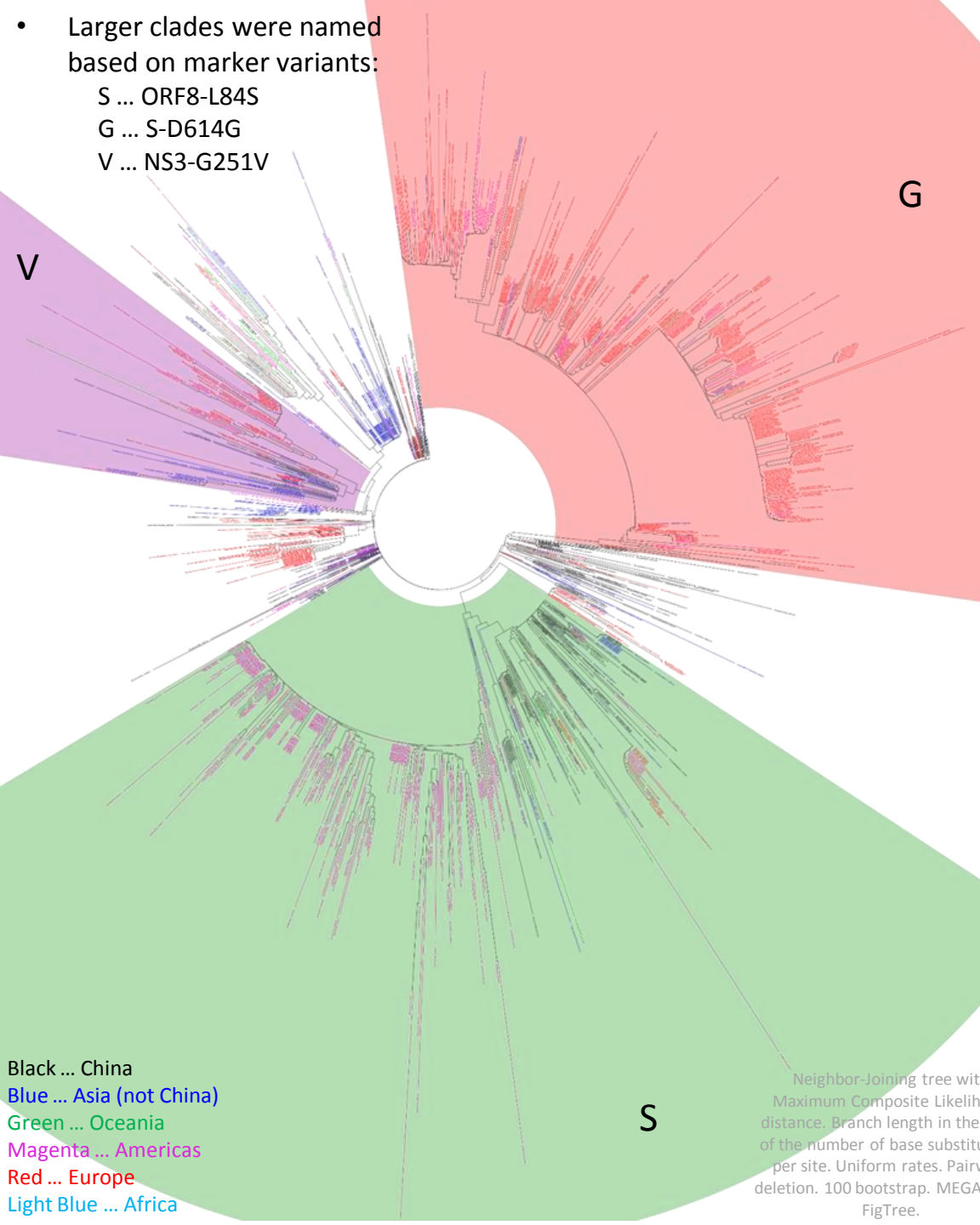
V483A is near the receptor binding interface and equivalent in position to I529T in MERS where it weakly reduced host receptor binding and altered antigenicity <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30404801>

Numbering relative to start codon 21563 in hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019



• Larger clades were named based on marker variants:

- S ... ORF8-L84S
- G ... S-D614G
- V ... NS3-G251V



Full genome tree of all outbreak sequences 2020-03-25

Notable changes:

- 1,375 full genomes (+123)
(excluding low coverage, out of 1,775 entries)
- S clade 439 (+106): 103 USA/WA, 1 Hong Kong, 1 Australia/QLD, 1 Brazil/AM
- G clade 404 (+2): 1 South Africa, 1 Australia/QLD
- V clade 108 (+11): 11 Hong Kong
- Other clades 424 (+4): 2 USA/WA, 1 Australia/QLD, 1 Hong Kong

- Black ... China
- Blue ... Asia (not China)
- Green ... Oceania
- Magenta ... Americas
- Red ... Europe
- Light Blue ... Africa

Neighbor-Joining tree with Maximum Composite Likelihood distance. Branch length in the units of the number of base substitutions per site. Uniform rates. Pairwise deletion. 100 bootstrap. MEGA X and FigTree.

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



20
by BII/GIS, A*STAR
Singapore

S clade

Full genome trees of major subclades 2020-03-25

- Black ... China
- Blue ... Asia (not China)
- Green ... Oceania
- Magenta ... Americas
- Red ... Europe
- Light Blue ... Africa



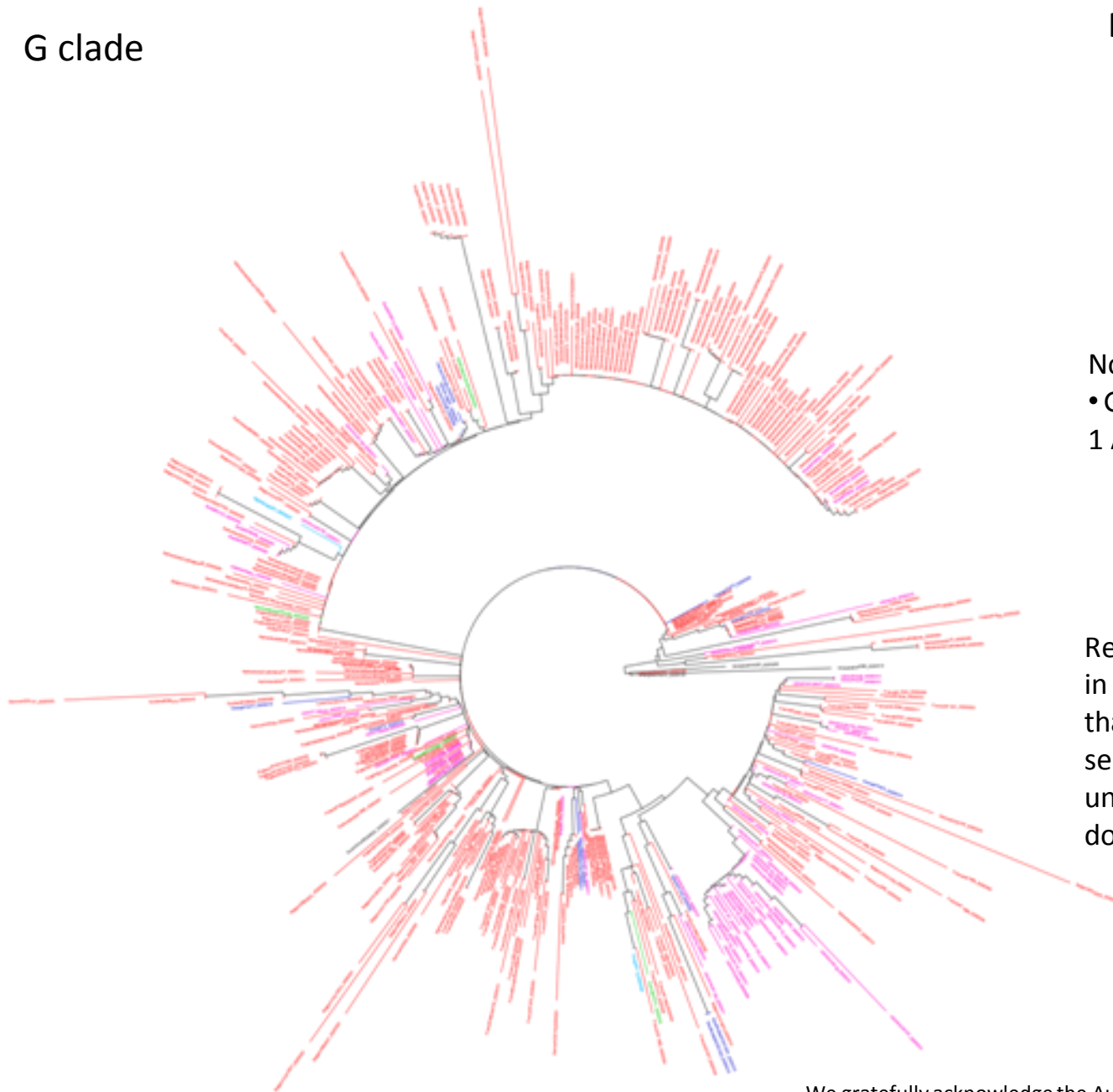
- Notable changes:
- S clade 439 (+106):
103 USA/WA, 1 Hong Kong, 1 Australia/QLD, 1 Brazil/AM

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

G clade

Full genome trees of major subclades 2020-03-25

Black ... China
Blue ... Asia (not China)
Green ... Oceania
Magenta ... Americas
Red ... Europe
Light Blue ... Africa



Notable changes:

- G clade 404 (+2): 1 South Africa, 1 Australia/QLD

Recent deep sampling of sequences in Shanghai revealed 3 (out of 90) that are close to the early Bavarian sequence which was previously uniquely situated at the root of the dominant European clade G.

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

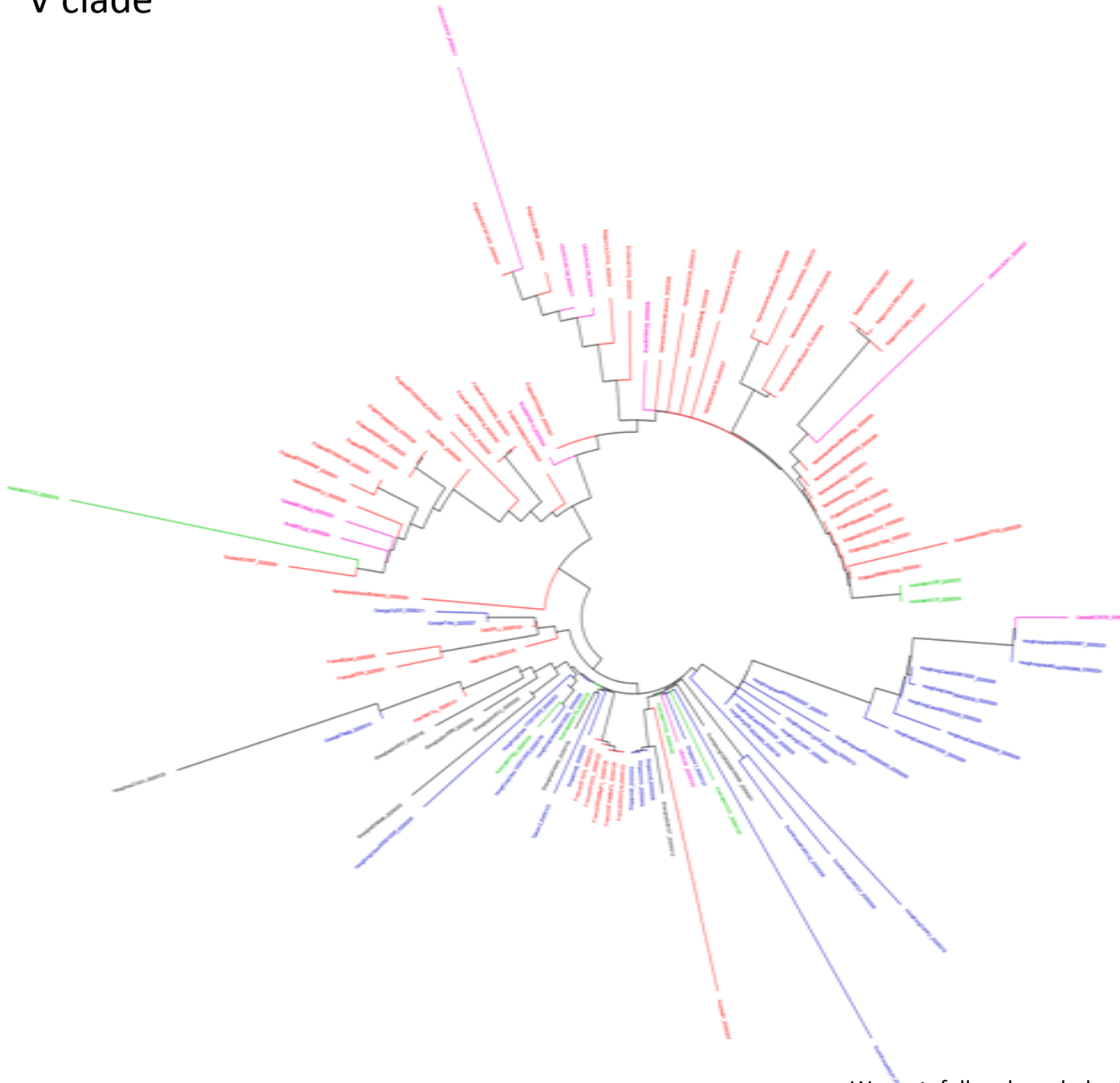


22
by BII/GIS, A*STAR Singapore

V clade

Full genome trees of major subclades 2020-03-25

Black ... China
Blue ... Asia (not China)
Green ... Oceania
Magenta ... Americas
Red ... Europe
Light Blue ... Africa



Notable changes:
• V clade 108 (+11): 11
Hong Kong

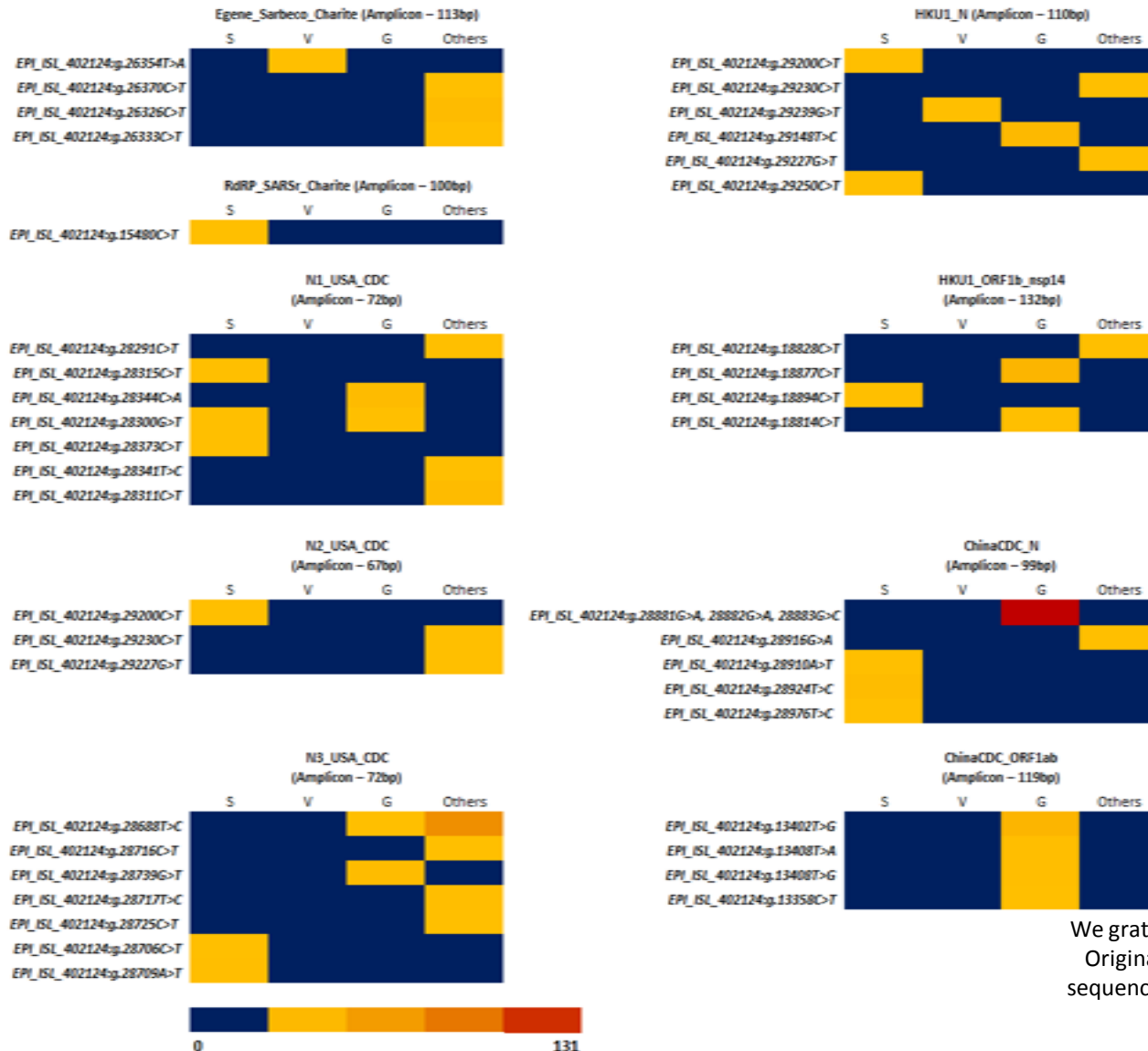
We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



Full genome nucleotide alignments for high quality genomes

2020-03-25 (updated every 3 days)

To reduce noise of random mutations all 1,113 available high quality genomes (out of 1,375) are considered here



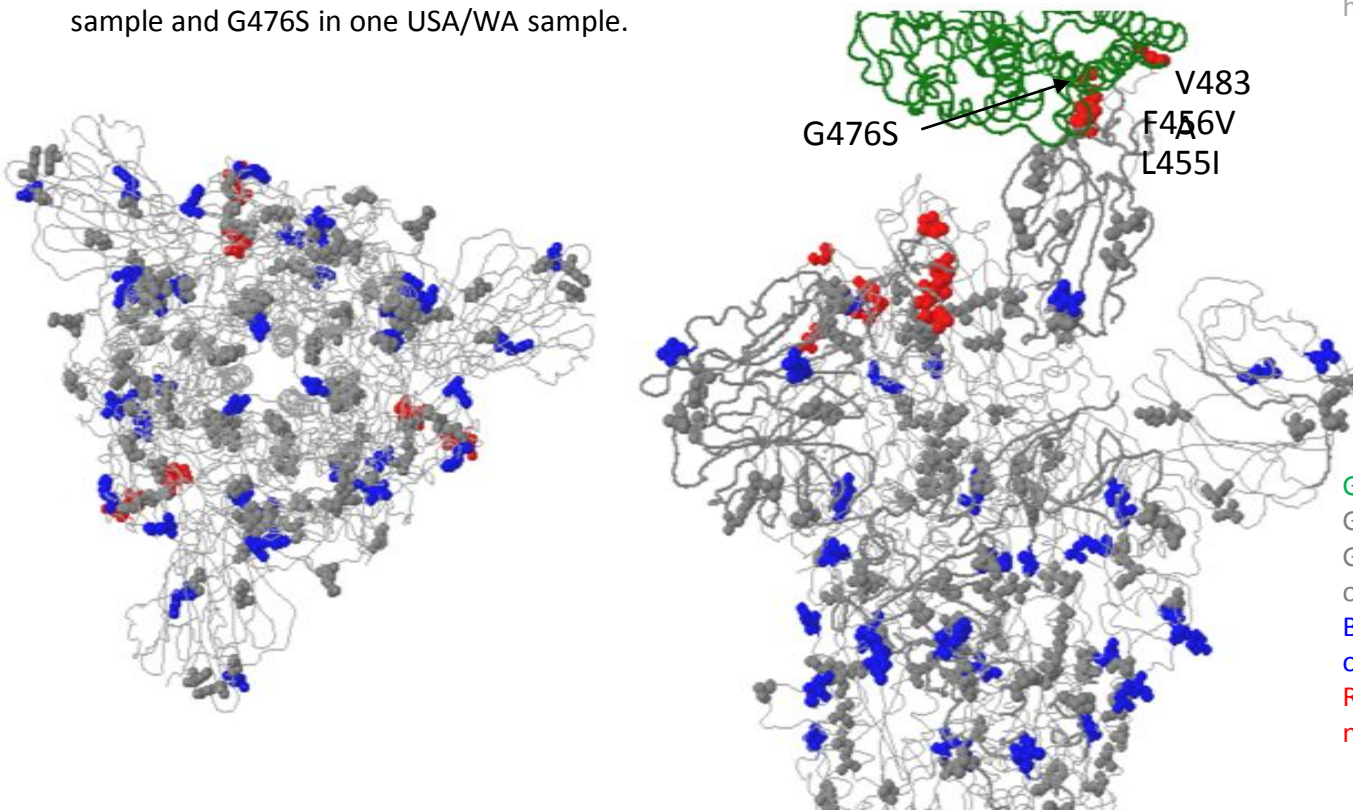
We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

Receptor binding surveillance for high quality genomes 2020-03-25

4 different rare variants near the binding interface not known to be linked to severity. V483A in **11 (+7)** USA/WA samples, L455I together with F456V in one Brazilian sample and G476S in one USA/WA sample.

To reduce noise of random mutations all 1,001 available high quality genomes (out of 1,258) are considered here

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



Green ... ACE2 human host receptor
Gray ... CoV spike glycoprotein trimer
Gray balls ... Spike glycoprotein variation occurring once
Blue balls ... Spike glycoprotein variation occurring more than once
Red balls ... Spike glycoprotein variation near host receptor

Equivalent positions have been studied for V483A in MERS (I529T, DOI: [10.1128/JVI.01381-18](https://doi.org/10.1128/JVI.01381-18)) and L455I, F456V and G476S in SARS (Y442F, DOI: [10.1074/jbc.M111.325803](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325803) and L443R, D463G DOI: [10.1086/651022](https://doi.org/10.1086/651022)) where they weakly reduced host receptor binding and altered antigenicity.

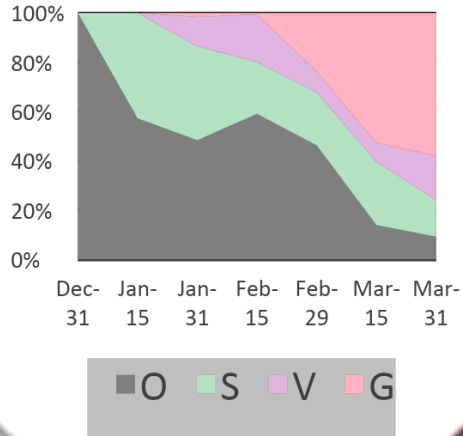
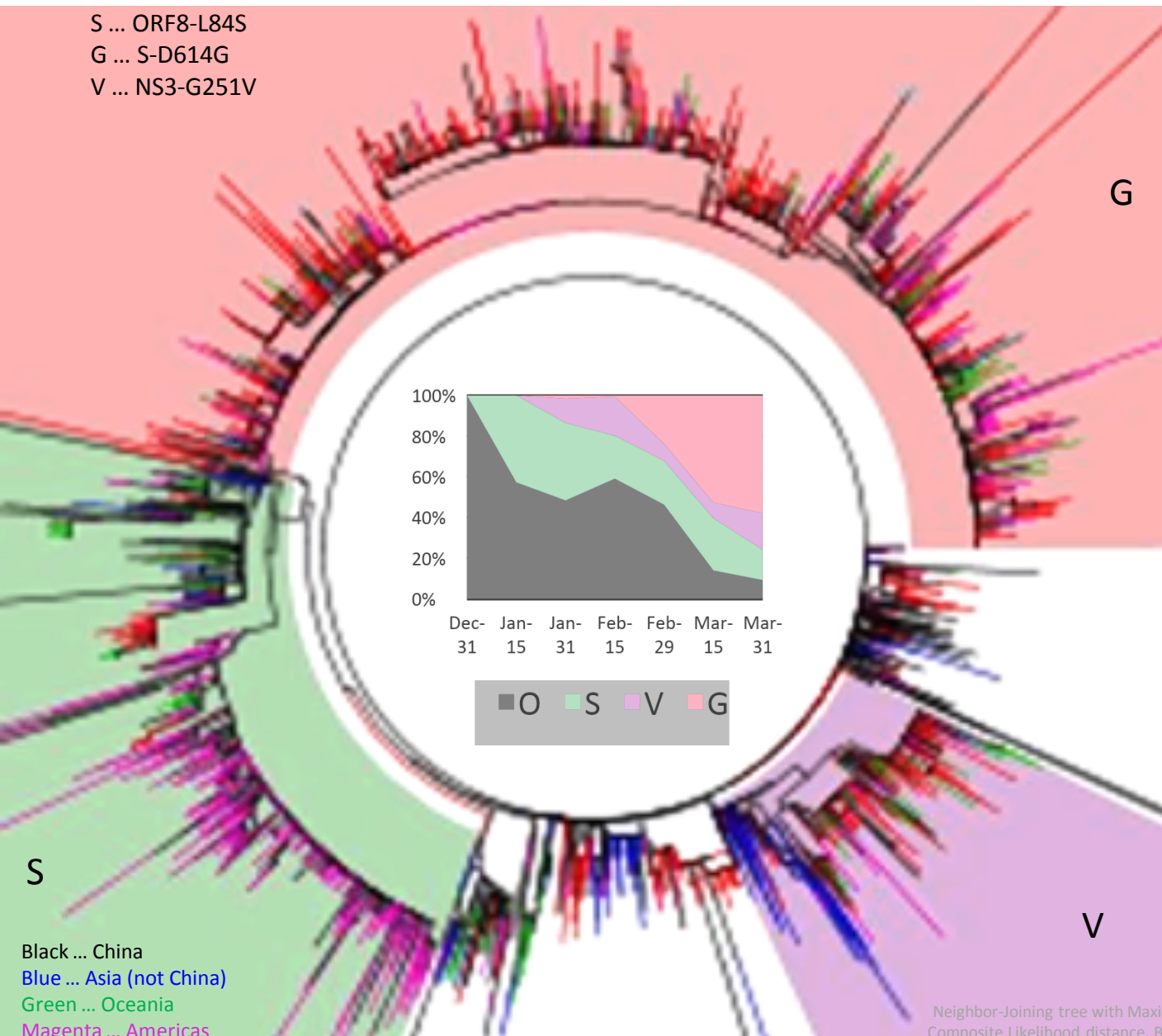
Numbering relative to start codon 21563 in hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019



Full genome tree of all outbreak sequences 2020-04-05

- Larger clades were named based on marker variants:

S ... ORF8-L84S
 G ... S-D614G
 V ... NS3-G251V



Black ... China
 Blue ... Asia (not China)
 Green ... Oceania
 Magenta ... Americas
 Red ... Europe
 Light Blue ... Africa

Notable changes:
3,521 full genomes (+169)
 (excluding low coverage, out of 3,859 entries)

S clade 768 (+71):
 36 USA/CT, 28 USA/ID, 2 USA/OR, 2 USA/VA, 2 Senegal, 1 Australia/VIC (108 USA/WA temporarily removed for updating)

G clade 1,632 (+95):
 27 France, 26 USA/CT, 12 USA/ID, 10 USA/VA, 7 Senegal, 6 Congo, 3 Estonia, 2 Russia, 1 USA/OR, 1 Algeria

V clade 389 (+3):
 2 USA/CT, 1 USA/ID

Other clades 732 (+1):
 1 Senegal

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



Neighbor-Joining tree with Maximum Composite Likelihood distance. Branch length in the units of the number of base substitutions per site. Uniform rates. Pairwise deletion.MEGA X and FigTree.

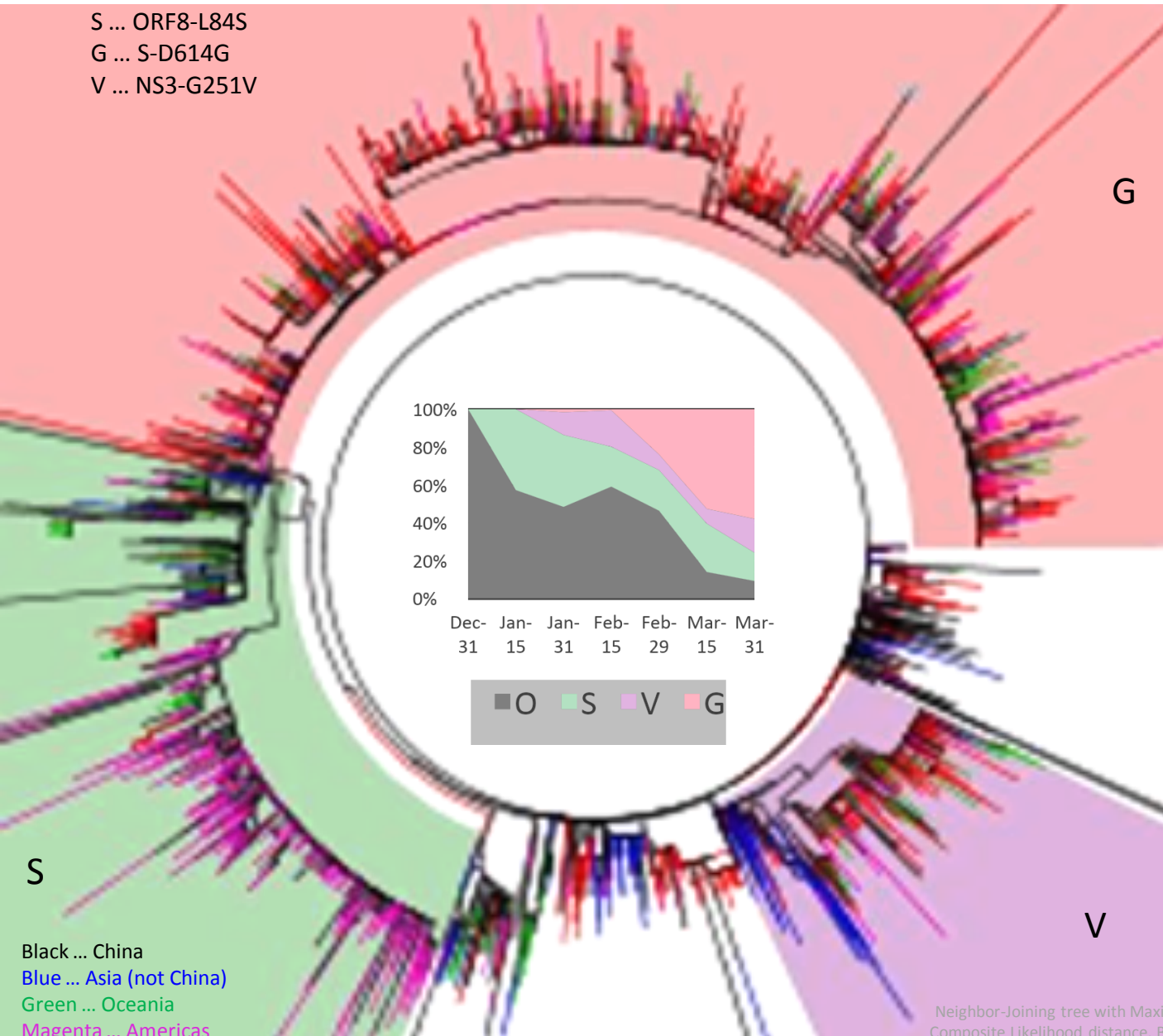
26
 by BII/GIS, A*STAR Singapore

Full genome tree of all outbreak sequences

2020-04-05

- Larger clades were named based on marker variants:

S ... ORF8-L84S
 G ... S-D614G
 V ... NS3-G251V



Notable changes:
3,521 full genomes (+169)
 (excluding low coverage, out of 3,859 entries)

S clade 768 (+71):
 36 USA/CT, 28 USA/ID, 2 USA/OR, 2 USA/VA, 2 Senegal, 1 Australia/VIC (108 USA/WA temporarily removed for updating)

G clade 1,632 (+95):
 27 France, 26 USA/CT, 12 USA/ID, 10 USA/VA, 7 Senegal, 6 Congo, 3 Estonia, 2 Russia, 1 USA/OR, 1 Algeria

V clade 389 (+3):
 2 USA/CT, 1 USA/ID

Other clades 732 (+1):
 1 Senegal

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



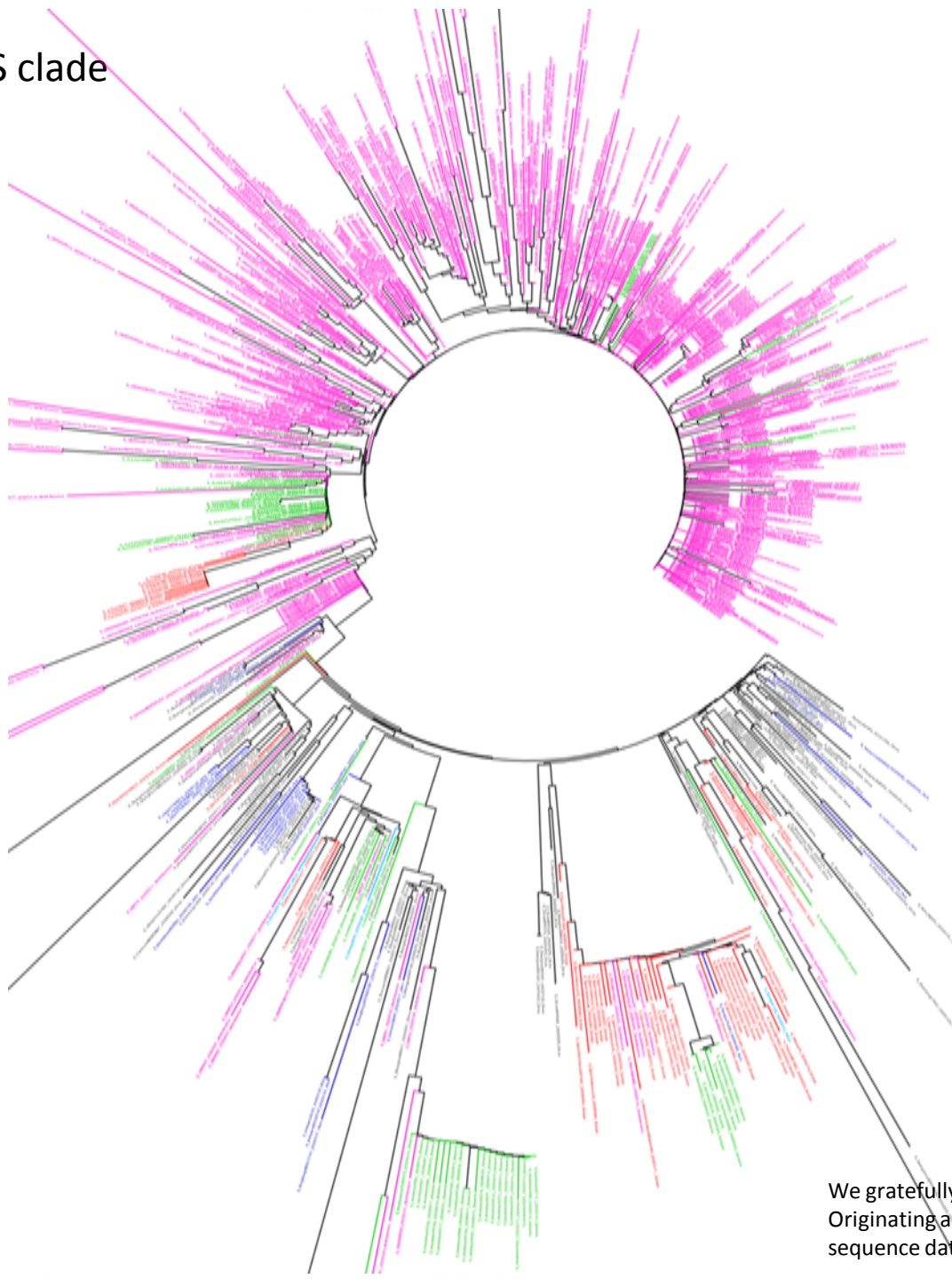
27
 by BII/GIS, A*STAR Singapore

Neighbor-Joining tree with Maximum Composite Likelihood distance. Branch length in the units of the number of base substitutions per site. Uniform rates. Pairwise deletion.MEGA X and FigTree.

S clade

Full genome trees of major subclades 2020-04-05

Black ... China
Blue ... Asia (not China)
Green ... Oceania
Magenta ... Americas
Red ... Europe
Light Blue ... Africa



Notable changes:

S clade 768 (+71):

36 USA/CT, 28 USA/ID,
2 USA/OR, 2 USA/VA, 2
Senegal, 1 Australia/VIC
(108 USA/WA temporarily
removed for updating)

We gratefully acknowledge the Authors from
Originating and Submitting laboratories of
sequence data on which the analysis is based.

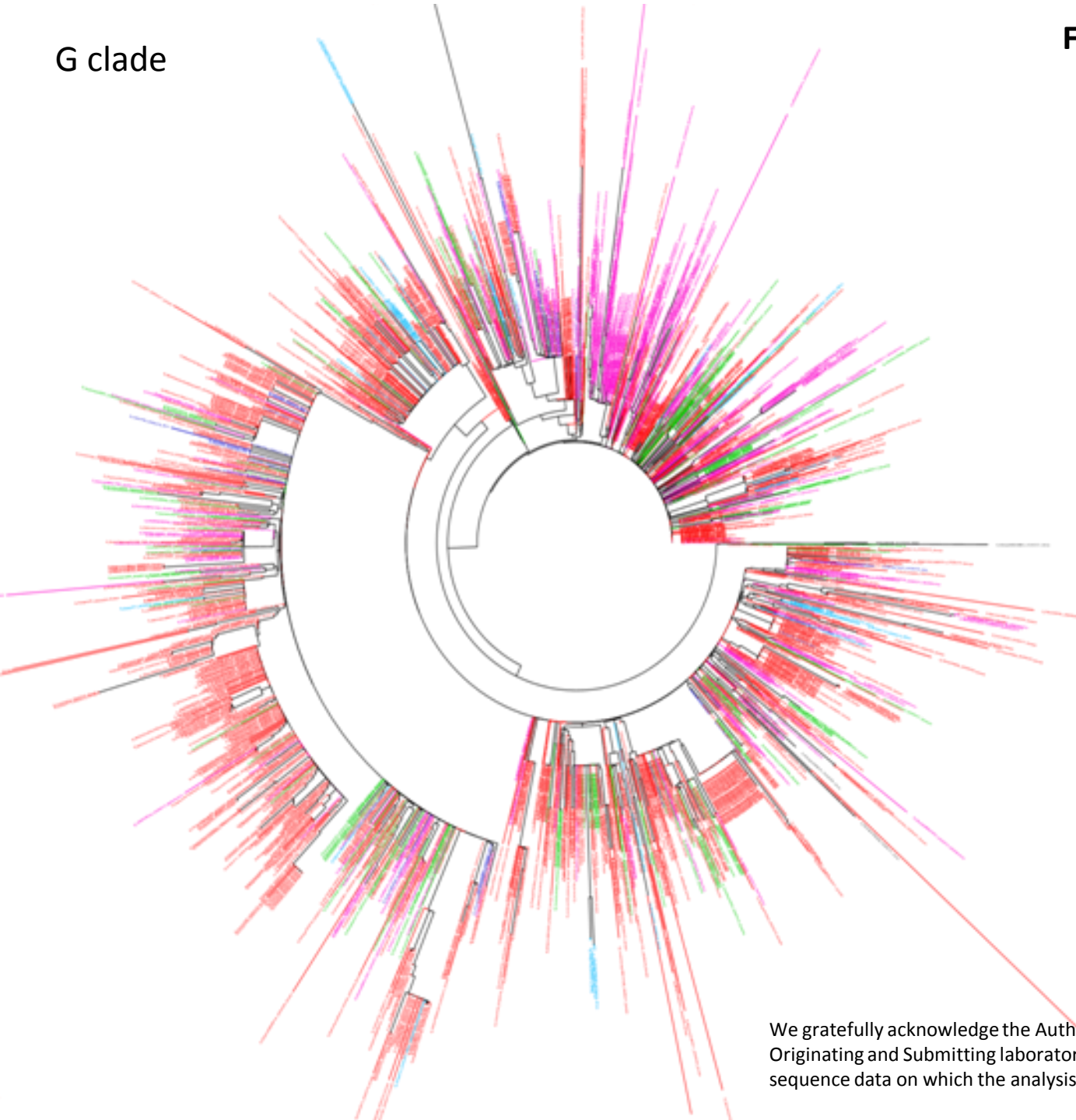


28
by BII/GIS, A*STAR Singapore

G clade

Full genome trees of major subclades 2020-04-05

Black ... China
Blue ... Asia (not China)
Green ... Oceania
Magenta ... Americas
Red ... Europe
Light Blue ... Africa



Notable changes:
G clade 1,632 (+95):
27 France, 26 USA/CT,
12 USA/ID, 10 USA/VA,
7 Senegal, 6 Congo, 3
Estonia, 2 Russia, 1
USA/OR, 1 Algeria

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

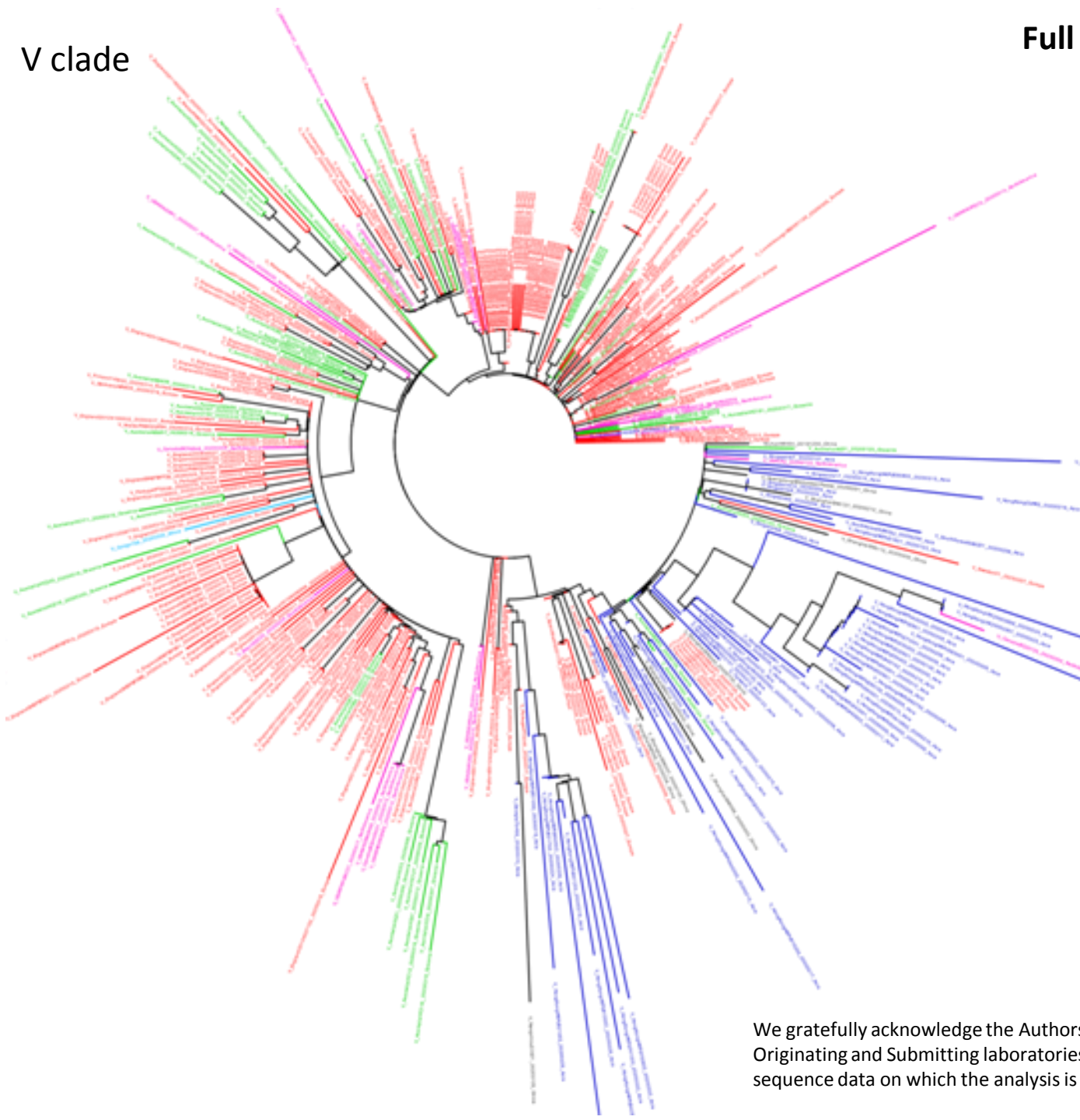


29
by BII/GIS, A*STAR Singapore

V clade

Full genome trees of major subclades 2020-04-05

- Black ... China
- Blue ... Asia (not China)
- Green ... Oceania
- Magenta ... Americas
- Red ... Europe
- Light Blue ... Africa



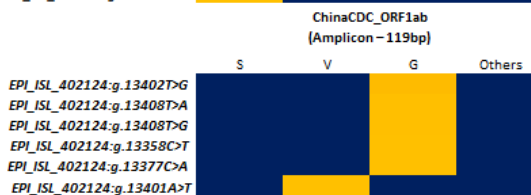
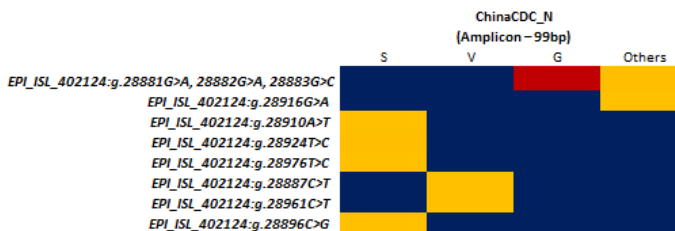
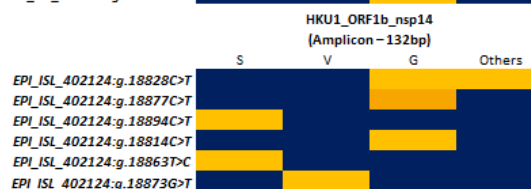
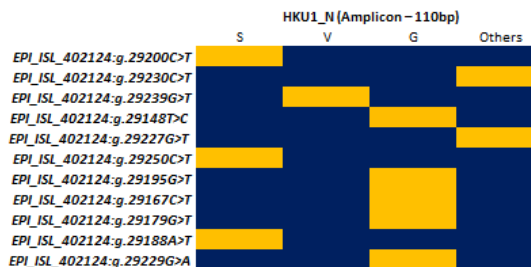
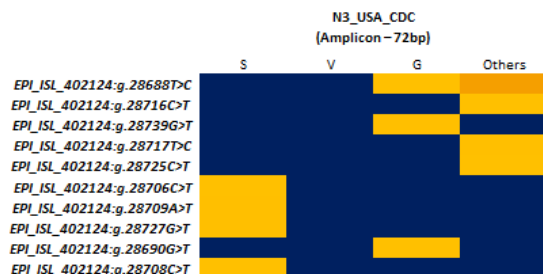
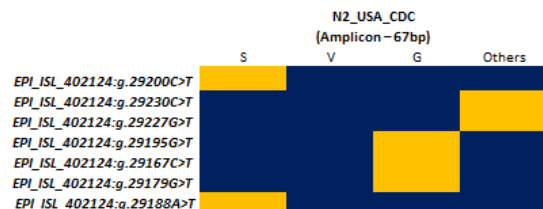
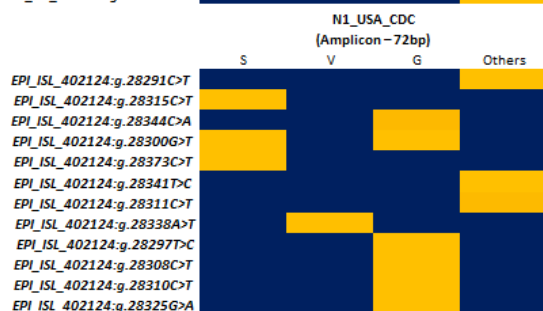
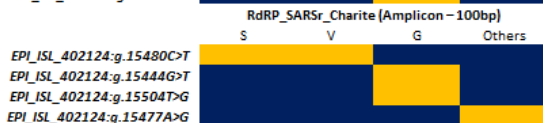
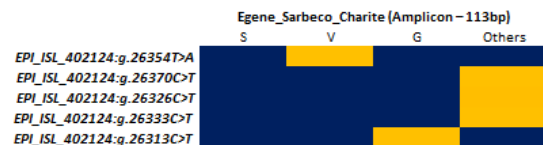
Notable changes:
V clade 389 (+3):
2 USA/CT, 1 USA/ID

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

Full genome nucleotide alignments for high quality genomes

2020-04-03 (updated every 3 days)

To reduce noise of random mutations all 2,402 available high quality genomes (out of 2,434) are considered here



The color codes in the heatmaps represent the number of genomes carrying a positional mismatch to different PCR primers and probes – Presented here is data analysed using high quality genomes on EpiCoV with PCR primers and probes (amplicons) from Charite, HKU, ChinaCDC and USACDC.

The colors Blue-Yellow-Red are used to represent a range of no genomes carrying a mismatch on amplicon positions to the highest number of genomes carrying a mismatch on amplicon positions.

All the genomes are aligned to the reference genome EPI_ISL_402124 and the amplicon co-ordinates are as per the reference genome.

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>
- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf>
- http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html
- <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-pcr-panel-primer-probes.pdf>

by BII/GIS, A*STAR Singapore

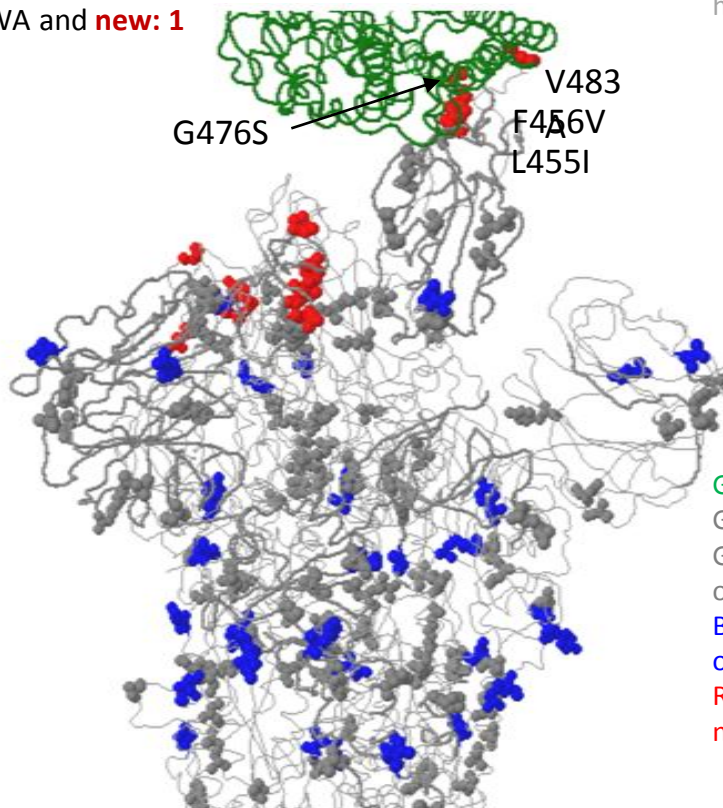
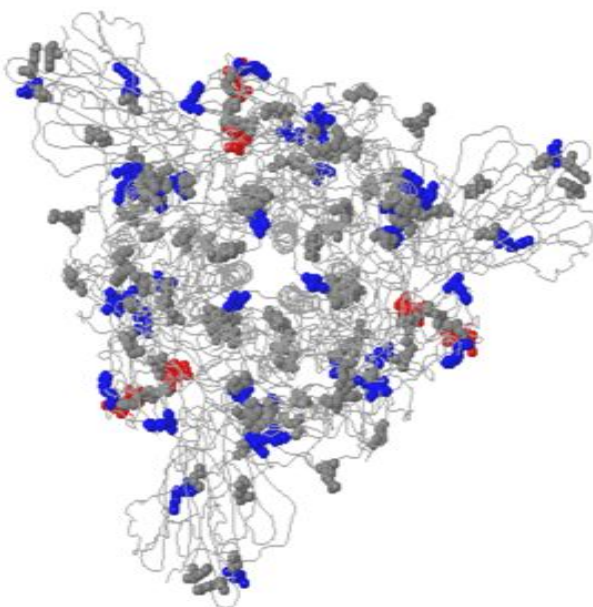


Receptor binding surveillance for high quality genomes 2020-04-05

4 different rare variants near the binding interface not known to be linked to severity. **V483A** in 16 USA/WA and **new: 1 USA/CT** samples, L455I together with F456V in one Brazilian sample and **G476S** in 7 USA/WA and **new: 1 USA/OR, 1 USA/ID, 1 USA/CT** samples.

To reduce noise of random mutations all 2,264 available high quality genomes (out of 2,919) are considered here

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.



Green ... ACE2 human host receptor
Gray ... CoV spike glycoprotein trimer
Gray balls ... Spike glycoprotein variation occurring once
Blue balls ... Spike glycoprotein variation occurring more than once
Red balls ... Spike glycoprotein variation near host receptor

Equivalent positions have been studied for V483A in MERS (I529T, DOI: [10.1128/JVI.01381-18](https://doi.org/10.1128/JVI.01381-18)) and L455I, F456V and G476S in SARS (Y442F, DOI: [10.1074/jbc.M111.325803](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325803) and L443R, D463G DOI: [10.1086/651022](https://doi.org/10.1086/651022)) where they weakly reduced host receptor binding and altered antigenicity.

Numbering relative to start codon 21563 in hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019



Full genome tree of all CoV families

- Nearest bat precursor RaTG13
- Nearest pangolin precursors from Guangdong
- Several pangolin-derived sequences part of recent family of related viruses

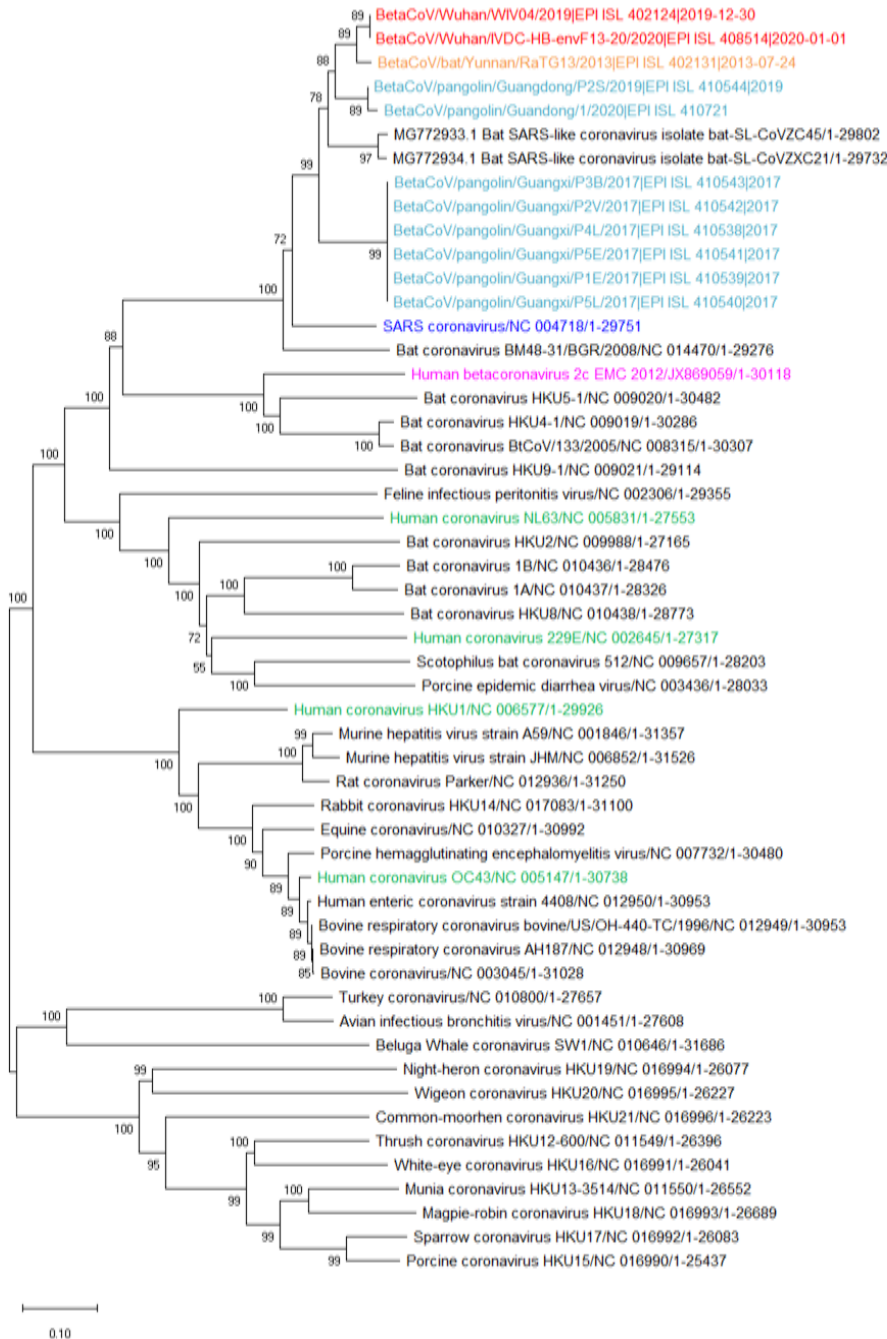
Genome identity to hCoV-19:

- 96% RaTG13 (nearest bat precursor)
- 90% Guangdong1/P2S (nearest pangolin precursor)
- 88% ZC45/ZXC21 bat precursor
- 80% SARS

Orange ... bat RaTG13
 Red ... hCoV-19 2019-2020
 Cyan ... pangolin CoV
 Blue ... SARS CoV
 Purple ... MERS CoV
 Green ... common cold CoV

We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

Phylogenetic tree of Wuhan CoV full genome sequences in context of representatives of all CoV families (whole genome Neighbor Joining, Maximum Composite Likelihood, uniform rates, 500 bootstrap, MegaX)

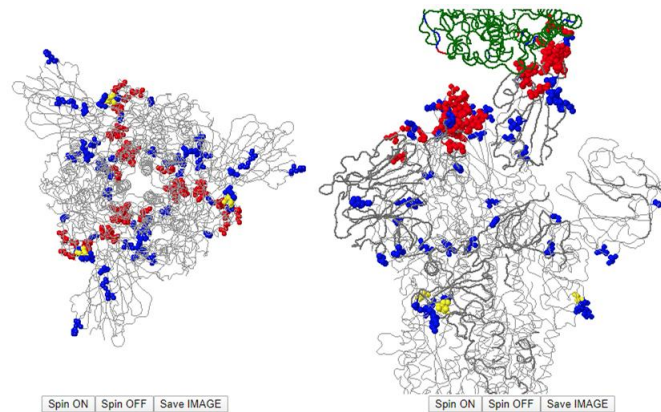


by BII, A*STAR Singapore



Spike host receptor changes for nearest bat and nearest pangolin sequences

Strain 1	Strain 2	Spike overall identity	Interface mutations
Human Wuhan	Bat Yunnan	98%	13
Pangolin Guangdong	Bat Yunnan	90%	13
Pangolin Guangdong	Human Wuhan	91%	1



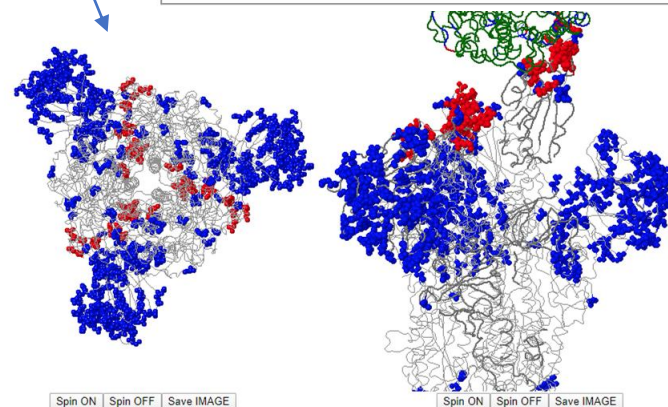
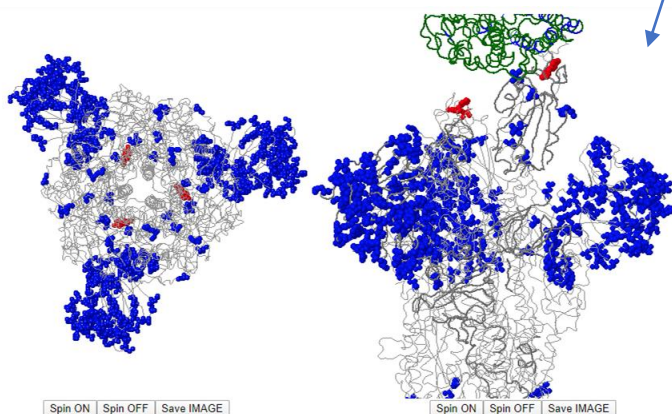
Select Query Sequence & Reference Sequence to display on 3D Structure Viewer:

Query Sequence: Reference Sequence:

% AA Identity: 97.636% # mutations: 30

List of variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region):
 S32F L50S I76T(I77) P218Q D324E T346R T372A T403R K439R H440N H441L A443S E445V F449Y A455S K478T Q483V I484E L486P Y488F Y493Q R494S Y498Q D501N H505Y N519H A604T **H669P(P19A)(F74,S88) S1121N**

List of mutations not displayed in structure: H224V(C-term)



Select Query Sequence & Reference Sequence to display on 3D Structure Viewer:

Query Sequence: Reference Sequence:

% AA Identity: 91.280% # mutations: 111

List of variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region):
 S12N T20Q T22A Q23A L24I P25Q A27S Y28F F32S T33Q K41T V42I S46N V47T H49V S50L T51S D53G L54Y F59Y T63S F65Y H66Y I68L G72T(G8) T76E(I77) F79V P85Q N87K V90I S94A I101Y S126N K131T T144S V127I E132N N637Y F140Y Q142S V143Q S161T M153S E164T S165R R168A A1637Y N164A Q173K P174S L176M M177L L179A E180A Q183S N186L K187D N188T K196R I197V H207Y I210V L212V V213M R214S D215H Q216I D226E L229N I231A R237K Q239R A243T Q239R A243T L244I Y248D(249) T250M S255N S256N A260V G261F A262S Q271A L276M K278N T299A F306L R365T A372T I402V K417K Q498H H519N K529Q N555S R563S A568S S581A S708A T747I A1070S A1076T D1084E

List of mutations not displayed in structure:
 M1L(N-term) V3F(N-term) L5F(N-term) V8L(N-term) L7H(N-term) L8F(N-term) P9A(N-term) N1125S(C-term) V1228(C-term)

Select Query Sequence & Reference Sequence to display on 3D Structure Viewer:

Query Sequence: Reference Sequence:

% AA Identity: 90.307% # mutations: 123

List of variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region):
 S12N T20Q T22A Q23A L24I P25Q A27S Y28F T33Q K41T V42I S46N V47T H49V T51S D53G L54Y F59Y T63S F65Y H66Y I68L G72T(G8) T76E(I77) F79V P85Q N87K V90I S94A I101Y S126N K131T T144S V127I E132N N637Y F140Y Q142S V143Q S161T M153S E164T S165R R168A A1637Y N164A Q173K P174S L176M M177L L179A E180A Q183S N186L K187D N188T K196R I197V H207Y I210V L212V V213M R214S D215H Q216I D226E L229N I231A R237K Q239R A243T L244I Y248D(249) T250M S255N S256N A260V G261F A262S Q271A L276M K278N T299A F306L R365T A372T I402V K417K Q498H H519N K529Q N555S R563S A568S S581A S708A T747I A1070S A1076T D1084E

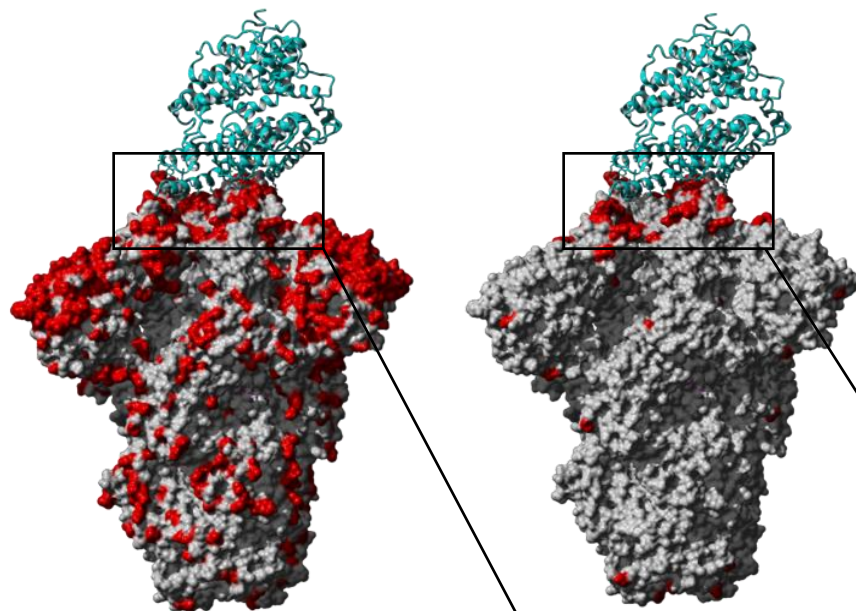
List of mutations not displayed in structure:
 M1L(N-term) V3F(N-term) L5F(N-term) V8L(N-term) L7H(N-term) L8F(N-term) P9A(N-term)



Host receptor binding site differences between SARS, bat precursor (RaTG13) and human outbreak hCoV-19

Additional Analysis for RaTG13 sequence from Zhengli Shi's lab

CAS Key Laboratory of Special Pathogens,
Wuhan Institute of Virology



Cyan ... ACE2 human host receptor

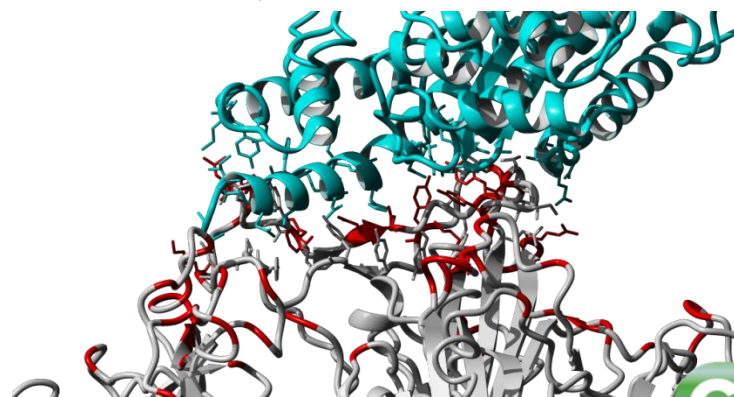
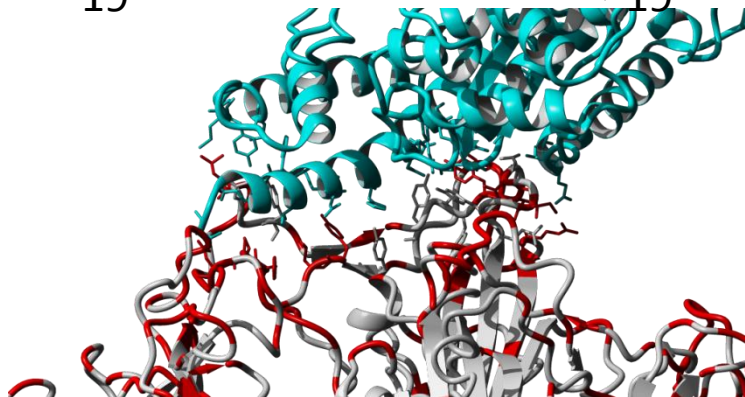
Gray ... CoV spike glycoprotein

Red ... mutations between either SARS (left side) or bat precursor RaTG13 (right side) vs human outbreak WIV04 CoV

- Surface proteins are 76% and 98% identical, respectively
- Antigenic surface highly divergent compared to SARS
- Bat precursor differences in receptor binding interface indicative of changes that allowed host switch

SARS vs hCoV-19

RaTG13 vs hCoV-19



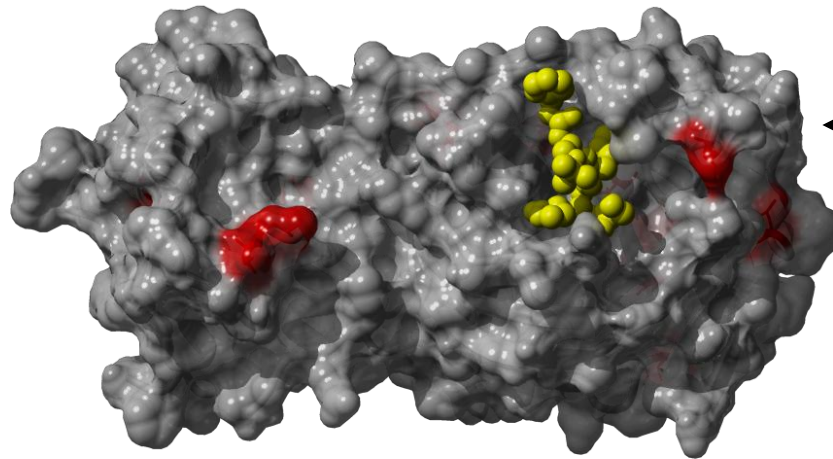
We gratefully acknowledge the Authors from Originating and Submitting laboratories of sequence data on which the analysis is based.

by BII, A*STAR Singapore



Potential drug targets highly conserved between hCoV-19 and SARS

- Both, the main protease and polymerase which are potential drug targets are highly conserved between hCoV-19 and SARS with 96% and 97% overall identity, respectively
- Inhibitors developed against the SARS-CoV main protease or polymerase have good potential to bind similarly to hCoV-19



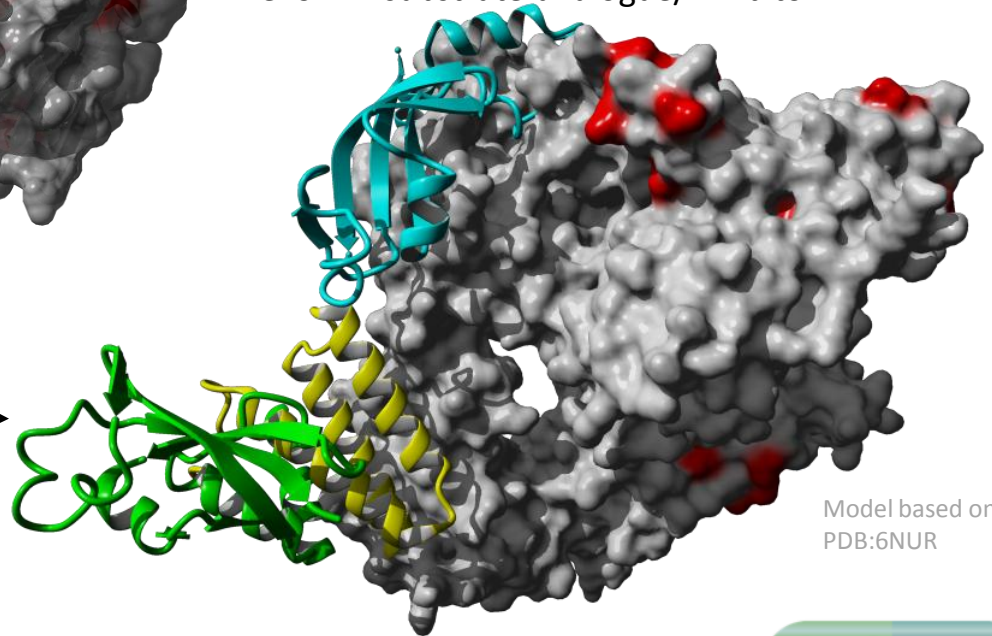
Model based on PDB:3TNT

Main protease hCoV-19 vs SARS

- ← Red ... consensus differences (surface mutations)
Yellow ... substrate analogue/inhibitor

Polymerase hCoV-19 vs SARS

nsp12 (gray=identical, red=mutated) →
complex with nsp7 (yellow) and nsp8 (cyan, green)

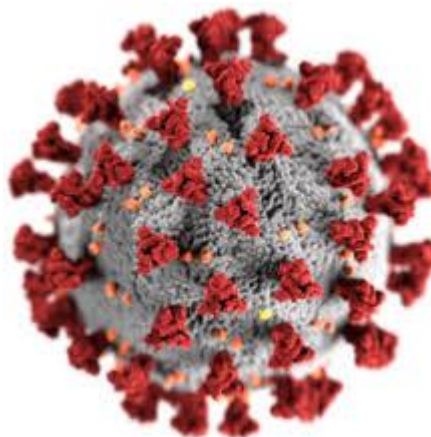


Model based on PDB:6NUR

Raport săptămânal COVID-19

22.04.2020, Republica Moldova

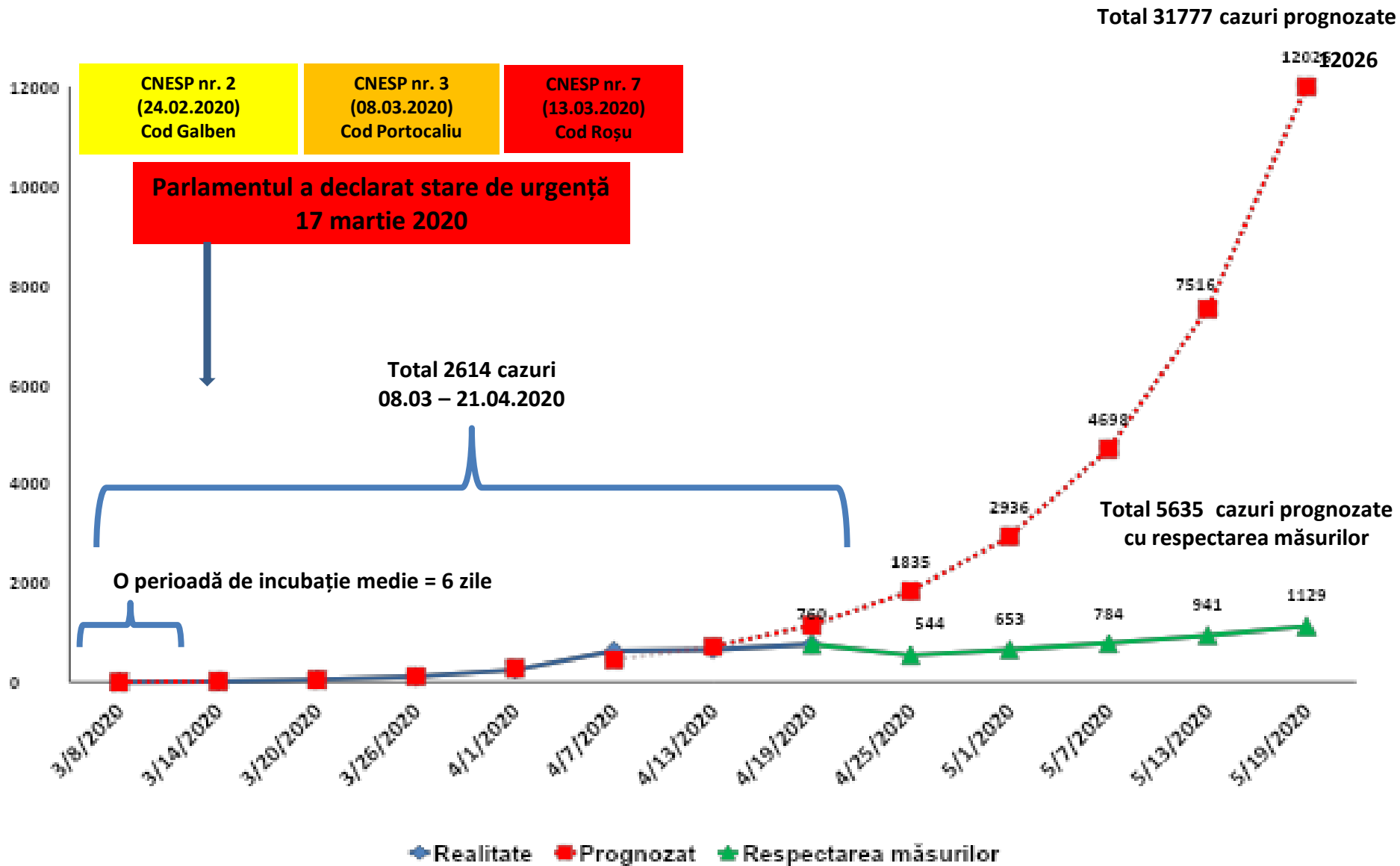
Viorica Dumbrăveanu
Ministrul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale



**Ministerul Sănătății,
Muncii și Protecției Sociale**
al Republicii Moldova



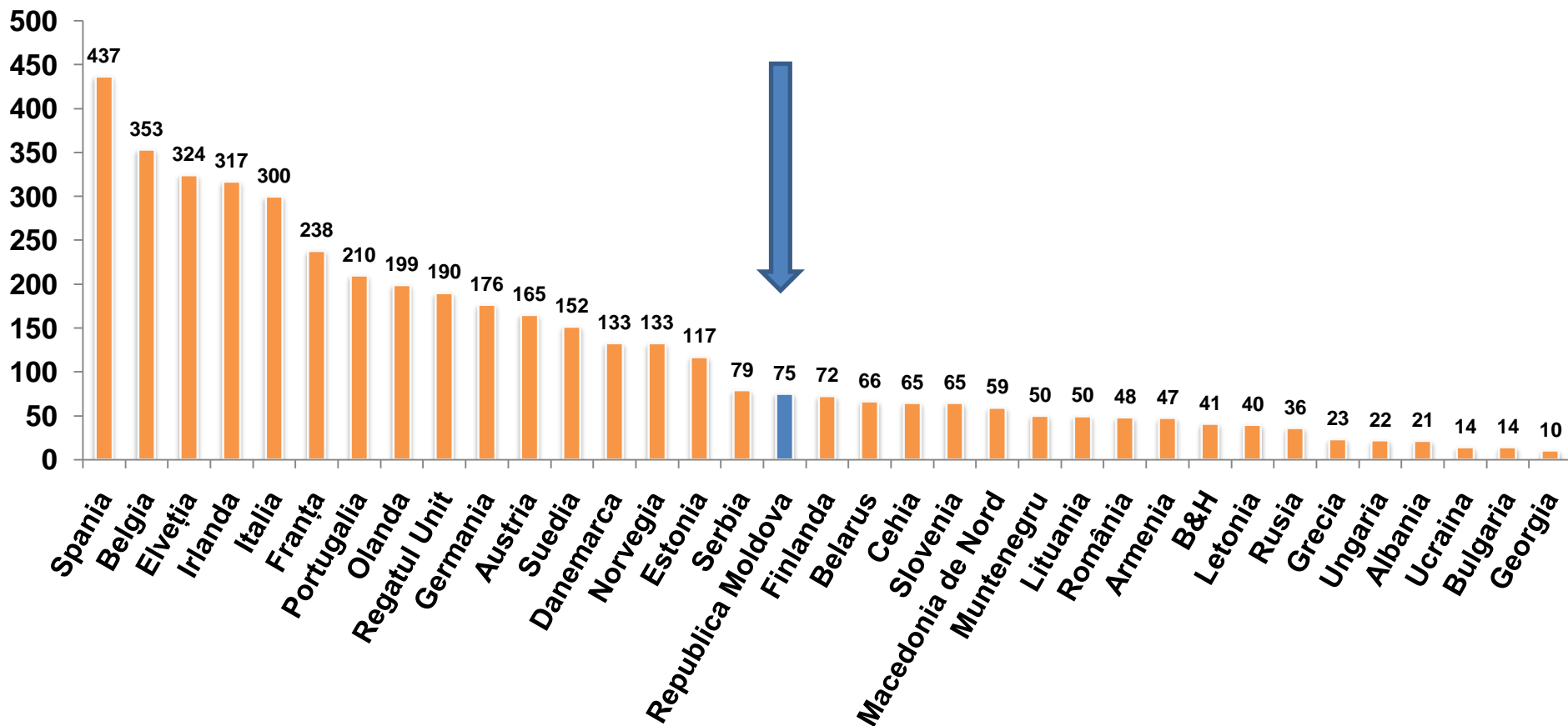
Evoluția epidemică a infecției COVID-19 în RM





Incidența COVID-19 la 100.000 populație comparativă cu alte țări, 21.04.2020

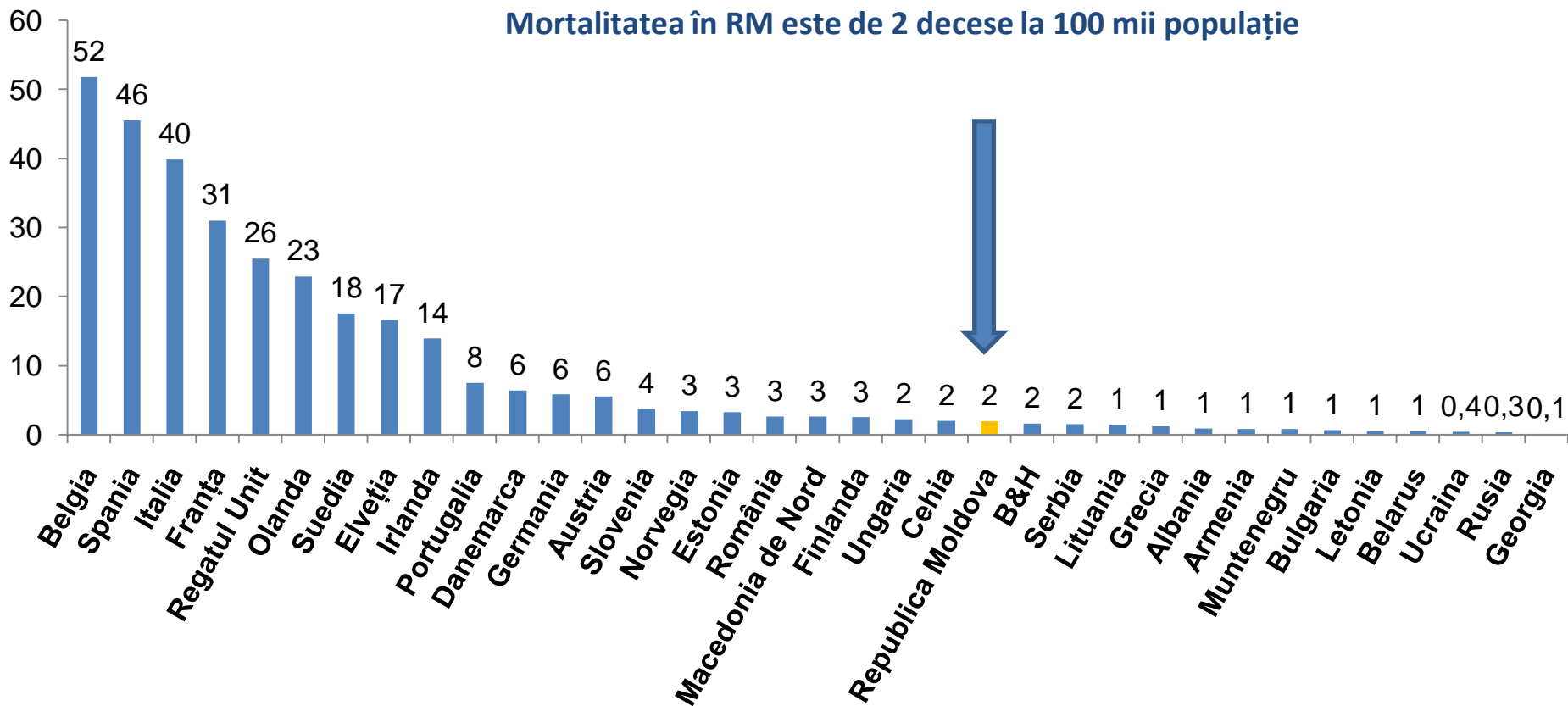
Total 2614 cazuri absolute
Incidența în RM este de 75 cazuri la 100 mii populație





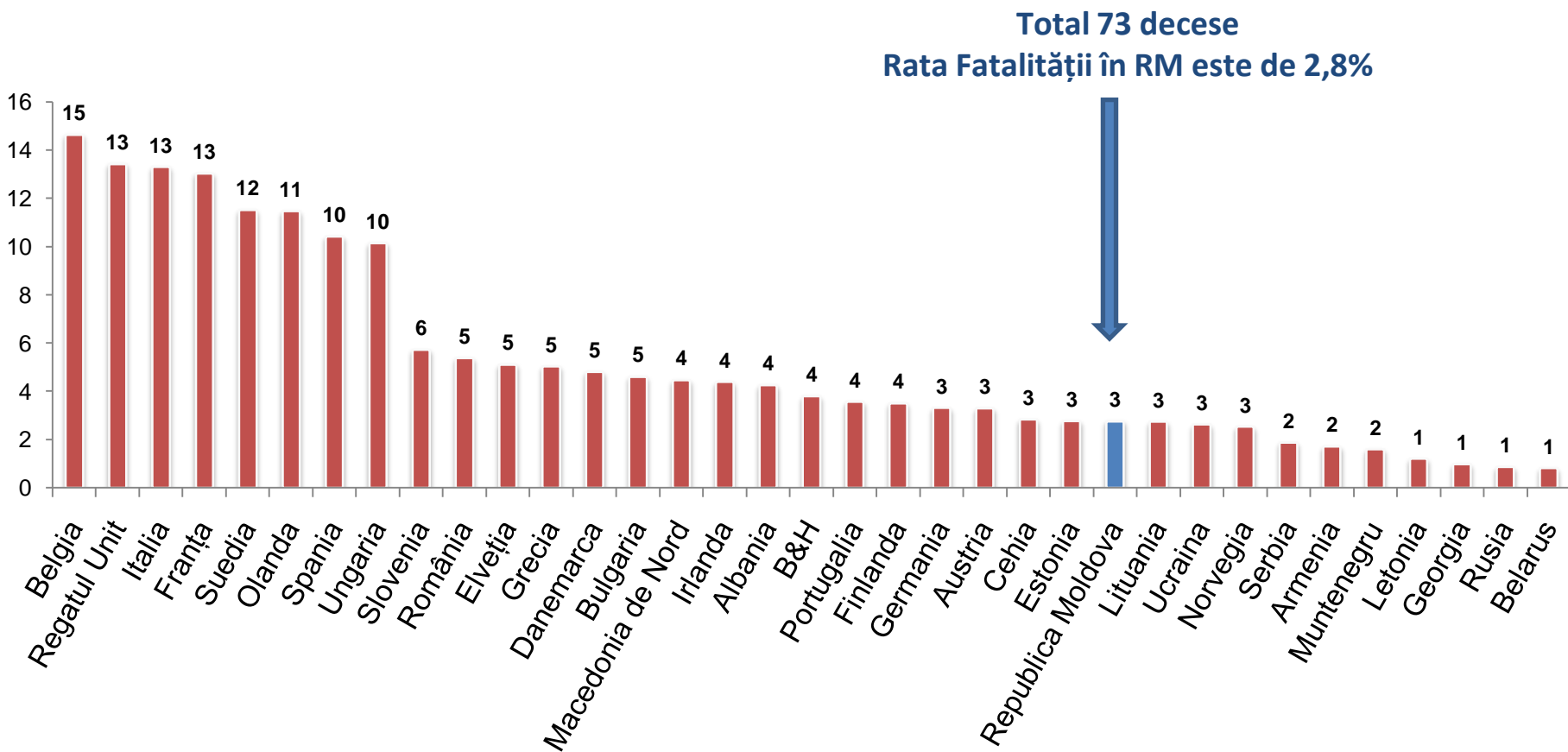
Mortalitatea prin COVID-19 la 100.000 populație comparativă cu alte țări, 21.04.2020

Total 73 decese cazuri absolute
Mortalitatea în RM este de 2 decese la 100 mii populație



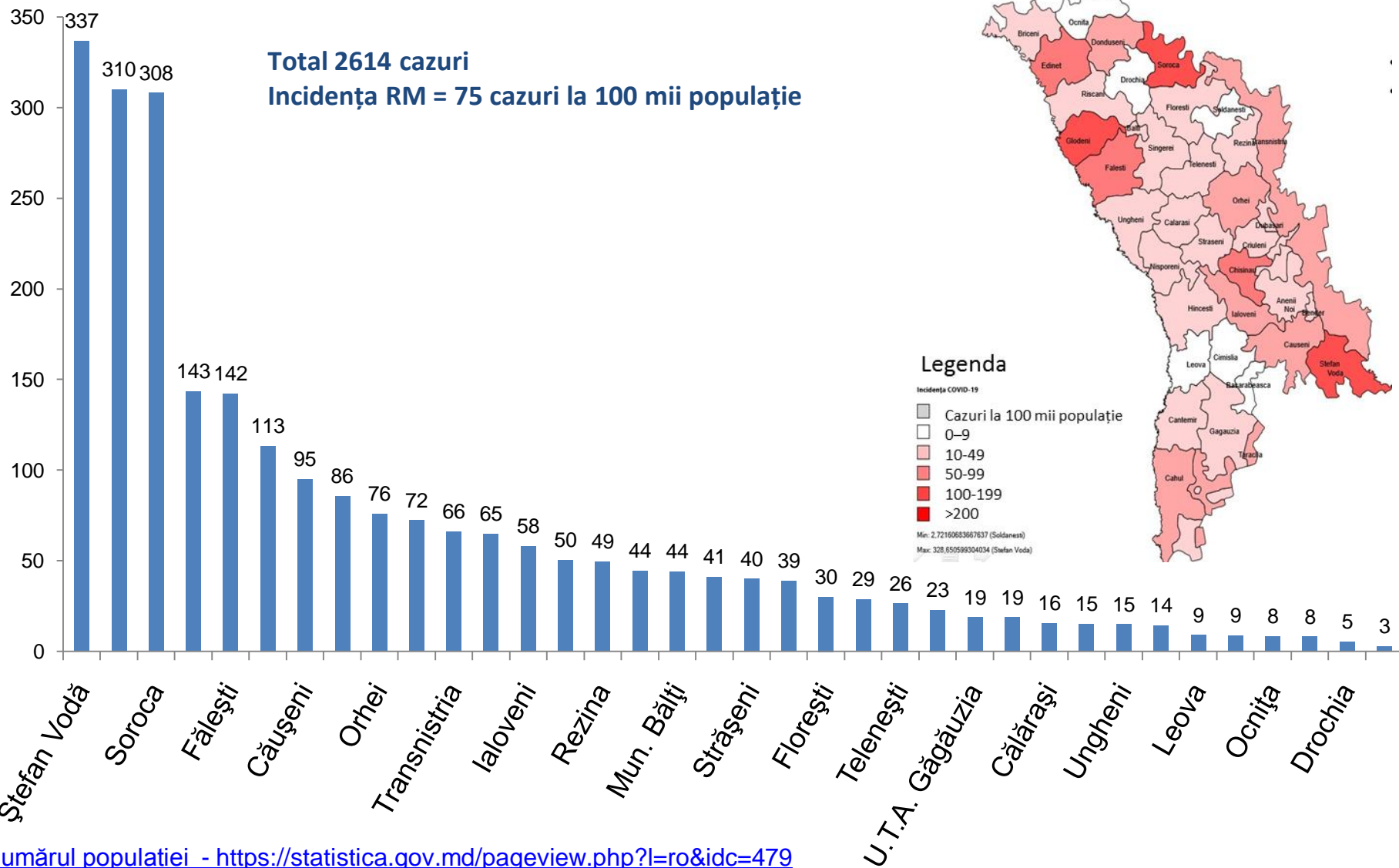


Rata fatalității COVID-19 comparativă cu alte țări, 21.04.2020





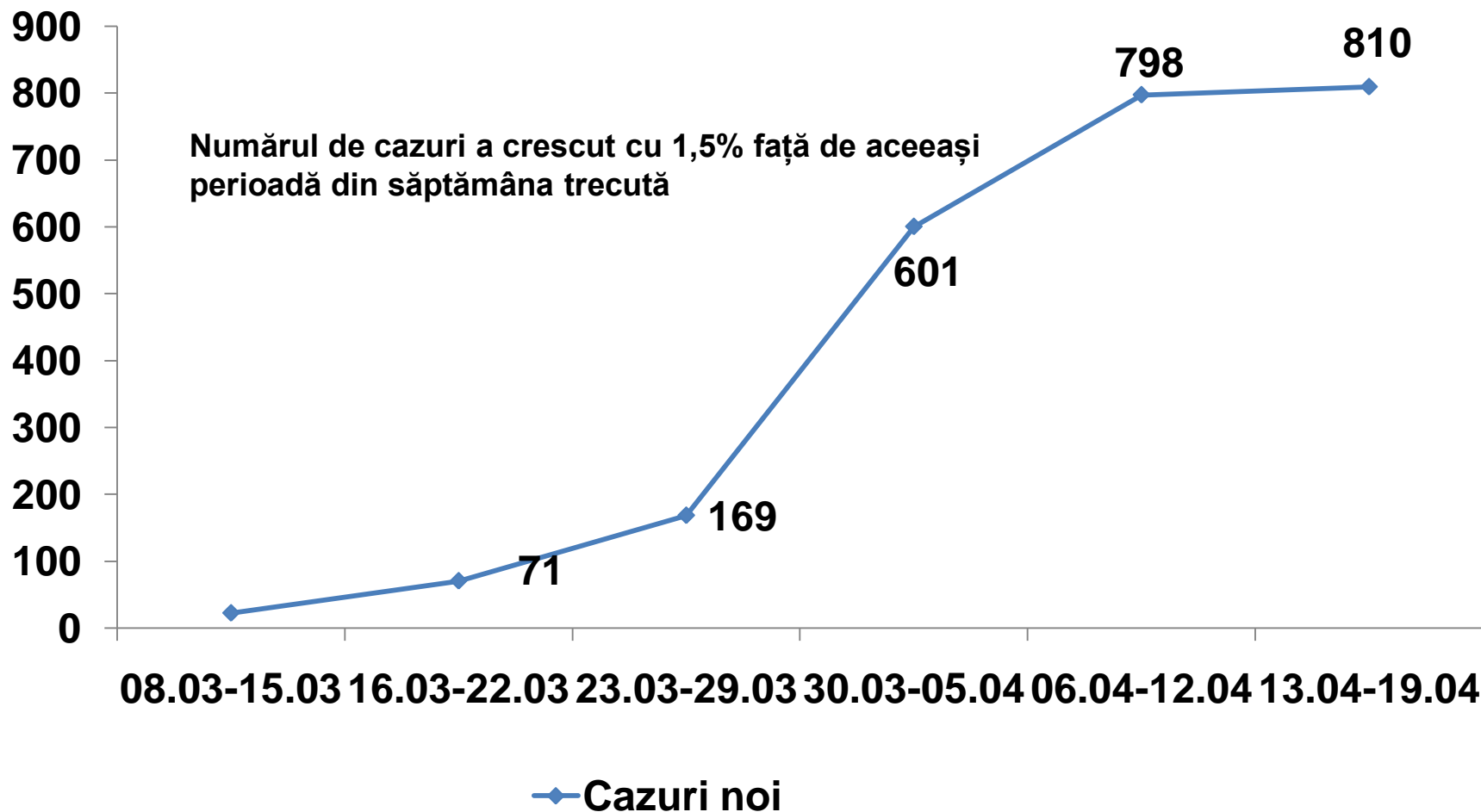
Incidența prin COVID-19 la 100 mii populație în dependență de teritorii administrative, 08.03-21.04.2020, Republica Moldova





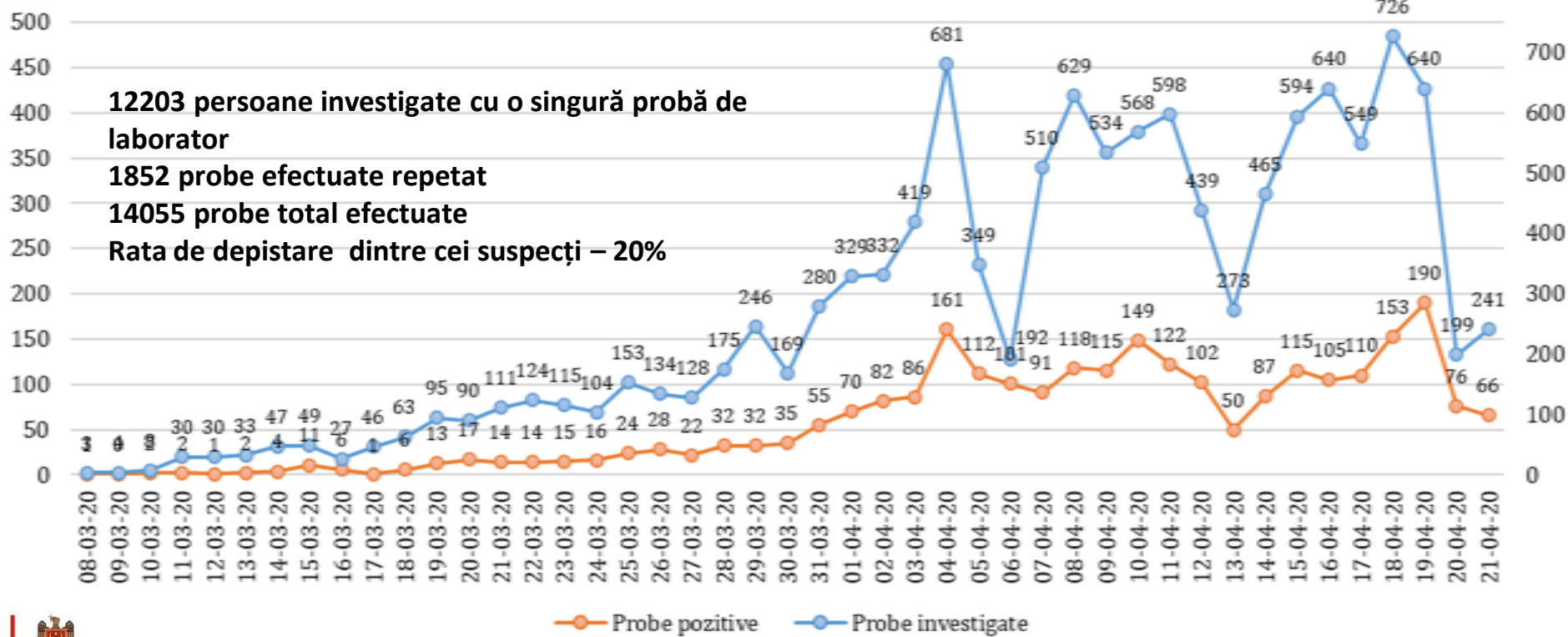
Distribuția săptămânală a cazurilor noi și cumulative COVID-19

08.03-19.04.2020, Republica Moldova



Distribuția în timp a testelor efectuate de COVID-19, 08.03-21.04.2020, Republica Moldova

Numărul de persoane investigate și persoane pozitive COVID-19



12203 persoane investigate cu o singură probă de laborator
1852 probe efectuate repetat
14055 probe total efectuate
Rata de depistare dintre cei suspecți – **20%**

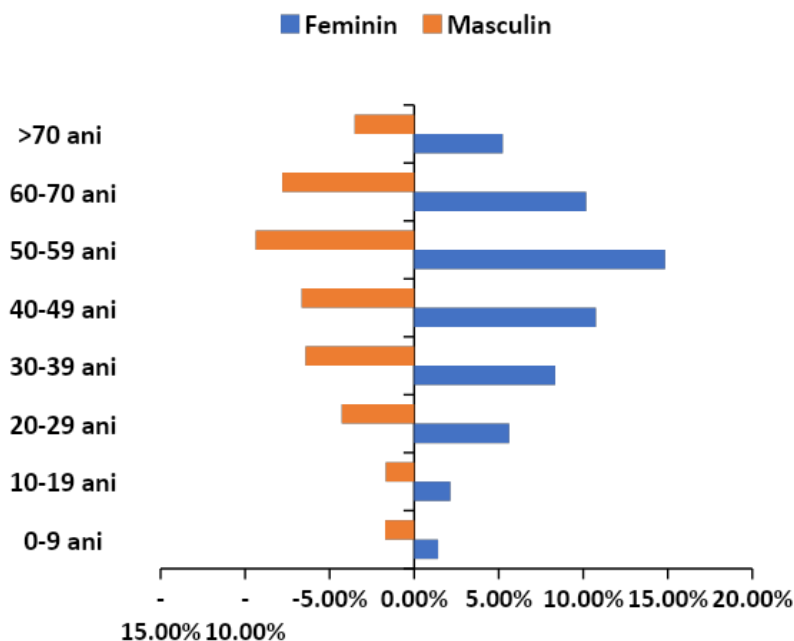




Ponderea după vârstă și gen a cazurilor și a deceselor de COVID-19, 08.03-21.04.2020, Republica Moldova

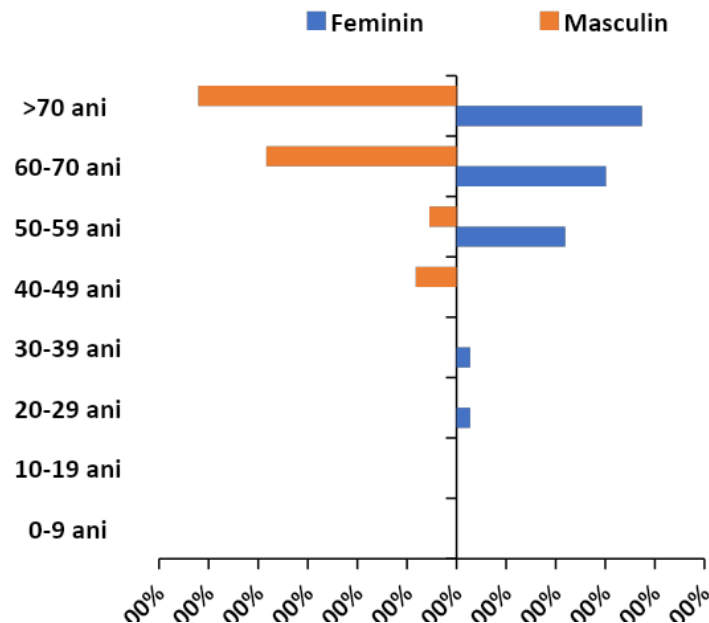
Cazuri

- ✓ Rata de contagiozitate (R_0) = 2,6
- ✓ Perioada de incubație medie = 6 zile
- ✓ Vârsta medie – 47 ani
- ✓ Sex feminin – 58 %
- ✓ Mediul urban – 56 %
- ✓ Import – 5% (133 cazuri)



Decese

- ✓ Vârsta medie – 67 ani
- ✓ Sex masculin – 52 %
- ✓ Cel puțin o comorbiditate – 98%
- ✓ Două și mai multe comorbidități – 51%
- Afecțiuni cardiovasculare – 78%
- Diabet zaharat – 30%
- Afecțiuni respiratorii – 25 %
- Afecțiuni renale – 21 %
- Afecțiuni hepatice -11%





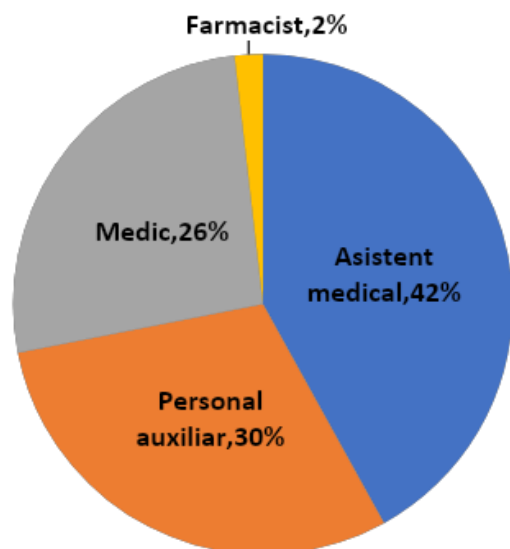
Personalul Medical afectat de COVID-19 08.03-21.04.2020, Republica Moldova

2 din 10 persoane infectate sunt din sistemul medical

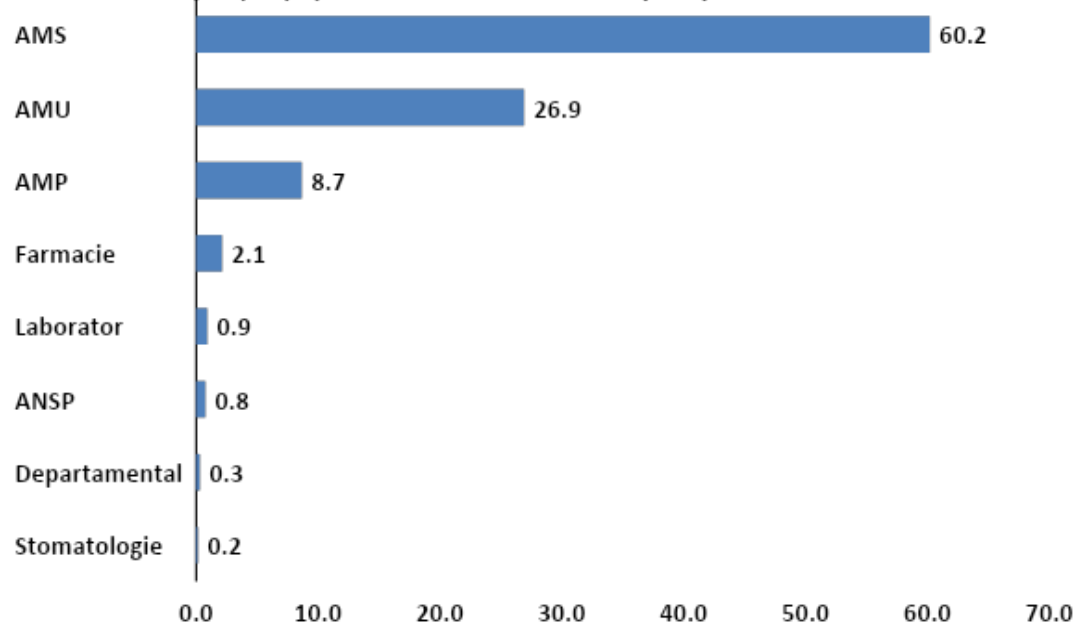


În total sunt confirmați de laborator 635 de lucrători medicali cu infecția COVID-19

Lucrătorii medicali infectați cu COVID-19 după funcție



Proporția (%) lucrătorilor medicali după tipul de servicii medicale

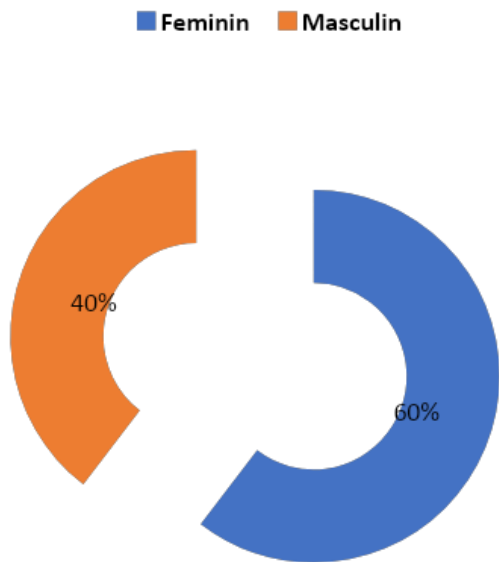




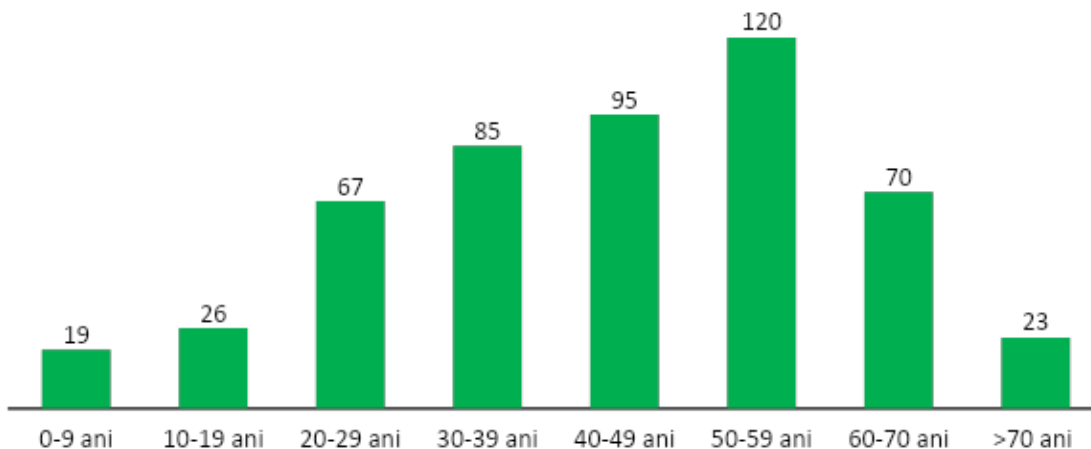
Persoanele vindecate în urma tratamentului COVID-19 08.03-21.04.2020, Republica Moldova

În total au fost vindecați de infecția COVID-19 505 persoane (19,3%)

Persoanele vindecate după gen

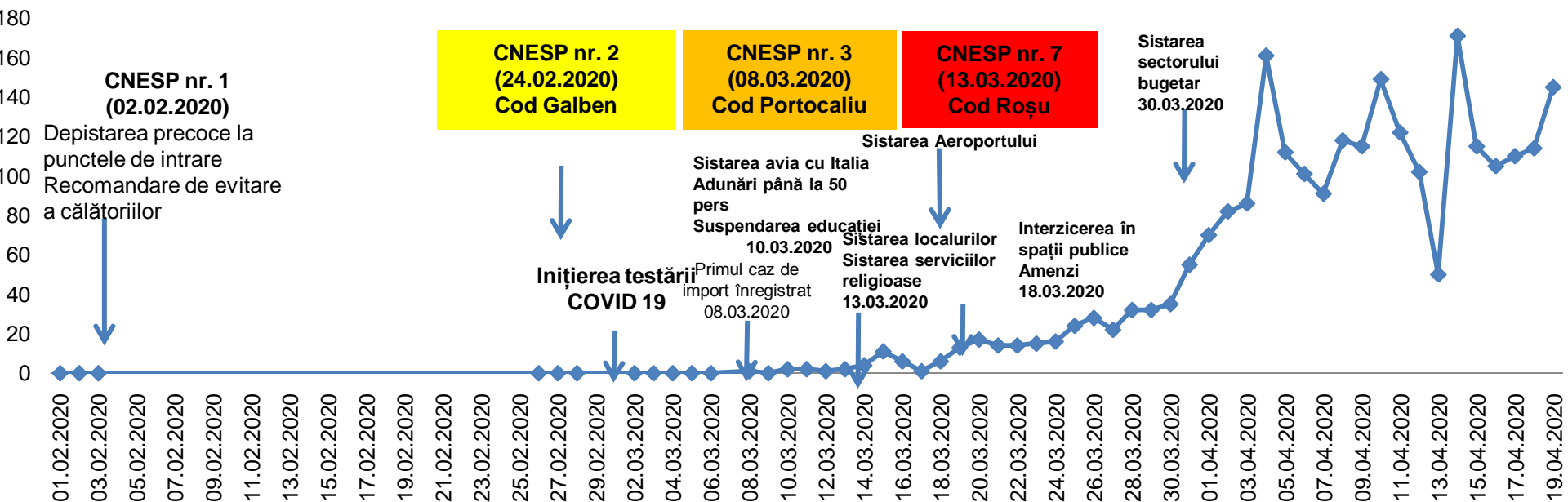


Distribuția persoanelor vindecate după grupe de vârstă



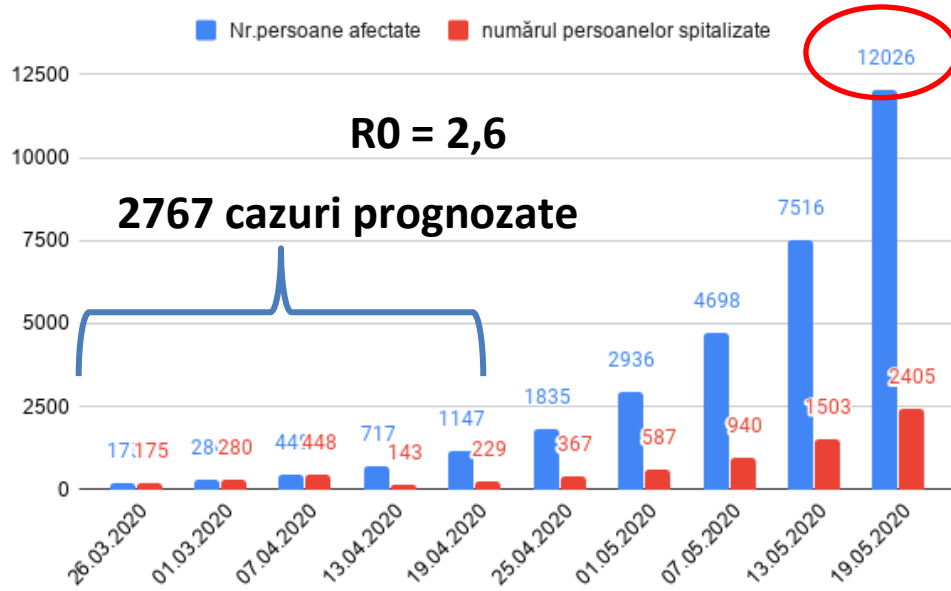


Distribuția cazurilor absolute în timp, COVID-19, 26.02 - 19.04.2020

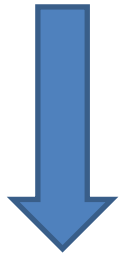


Scenariul de prognoză (perioada de incubație - 6 zile)

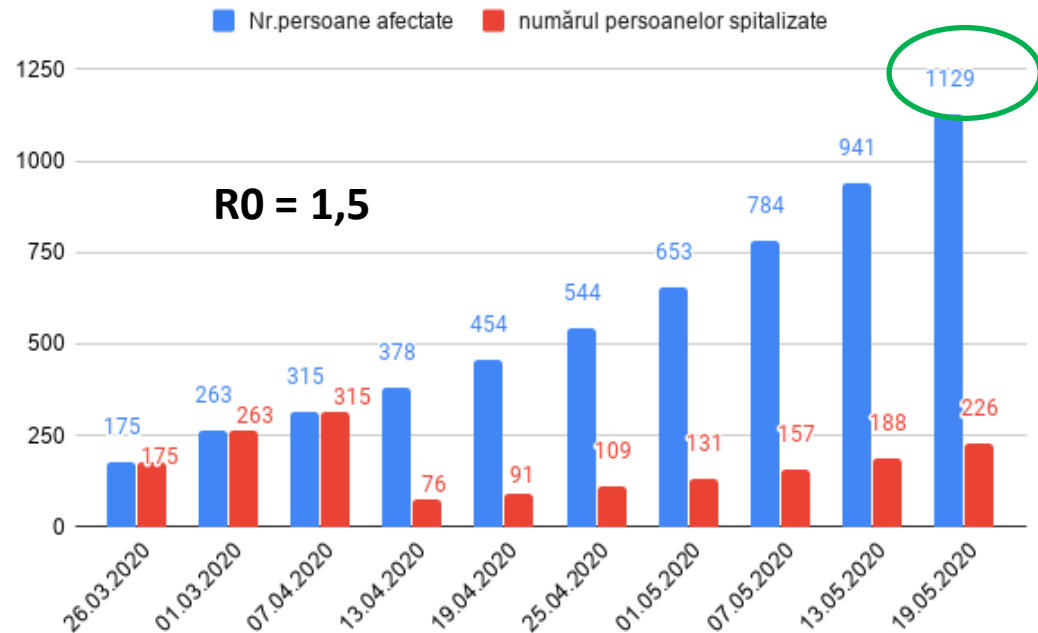
Cazuri spitalizate și persoane afectate de COVID 19 estimate, 26.03-19.05.2020, RM



- Estimat din luna februarie - la data de **19.04.2020**:
2767 cazuri și 62 decese
- ✓ În realitate avem la data de **19.04.2020**:
2472 cazuri și 67 decese



La implementarea măsurilor de prevenire și control strict cu izolarea și testarea contacților și suspecților, morbiditatea scade de 10 ori, inclusiv și povara de spitalizare de către IMS.



În cazul în care nu se implementau măsurile de sănătate publică în timp util, la data de 19.04.2020 erau estimate 26 mii cazuri de Covid 19 dintre care minim 2400 în stare extrem de gravă!!!



World Health Organization

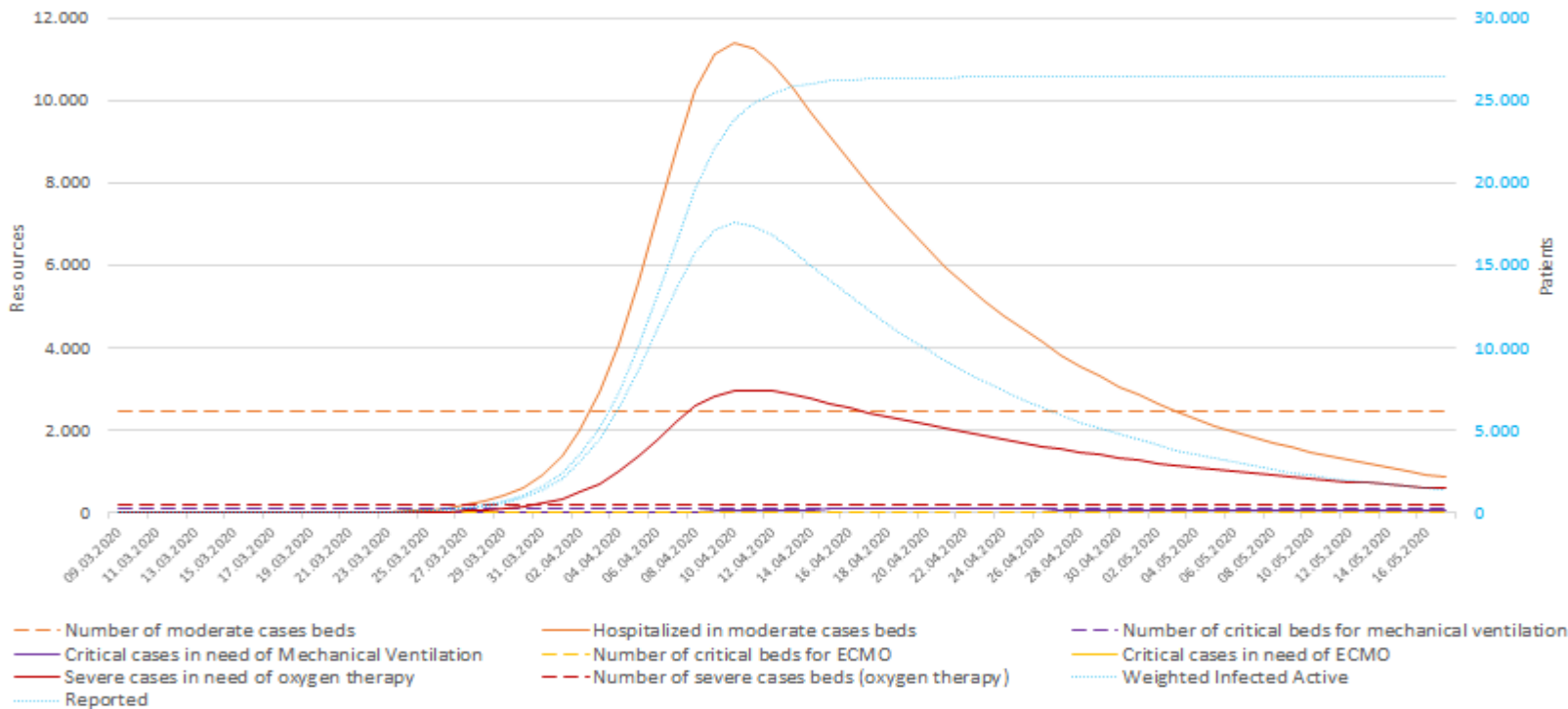
COVID-19 | Surge Planning Support Tool

— Illustrative —

glinitt

APAH

Bed capacity



Predicted moderate bed shortage:	03.04.2020	Predicted severe bed shortage:	31.03.2020	Predicted critical bed (vent.) shortage:	18.04.2020
Predicted ECMO shortage:		Predicted RRT shortage:	NA		

Scenariul ajustat condițiilor Republicii Moldova, COVID-19, 26.03-19.05.2020

R0 (rata de contagiozitate) =2,6 (calculată în condițiile RM)						Decese
Perioada de incubație	Nr. persoane afectate	Forme clinice ușoare și medii (80%)	Forme Grave (15%)	Foarte grave necesită ventilare asistată (5%)	Spitalizați	
3 (26.03)	175	140	26	9	175	2
4 (01.04)	280	224	42	14	455	6
5 (07.04)	448	358	67	22	448	10
6 (13.04)	717	573	108	36	143	16
7 (19.04)	1147	918	172	57	229	26
8 (25.04)	1835	1468	275	92	367	42
9 (01.05)	2936	2349	440	147	587	68
10 (07.05)	4698	3758	705	235	940	108
11 (13.05)	7516	6013	1127	376	1503	173
12 (19.05)	12026	9621	1804	601	2405	277
	31777	25422	4767	1589	7253	729

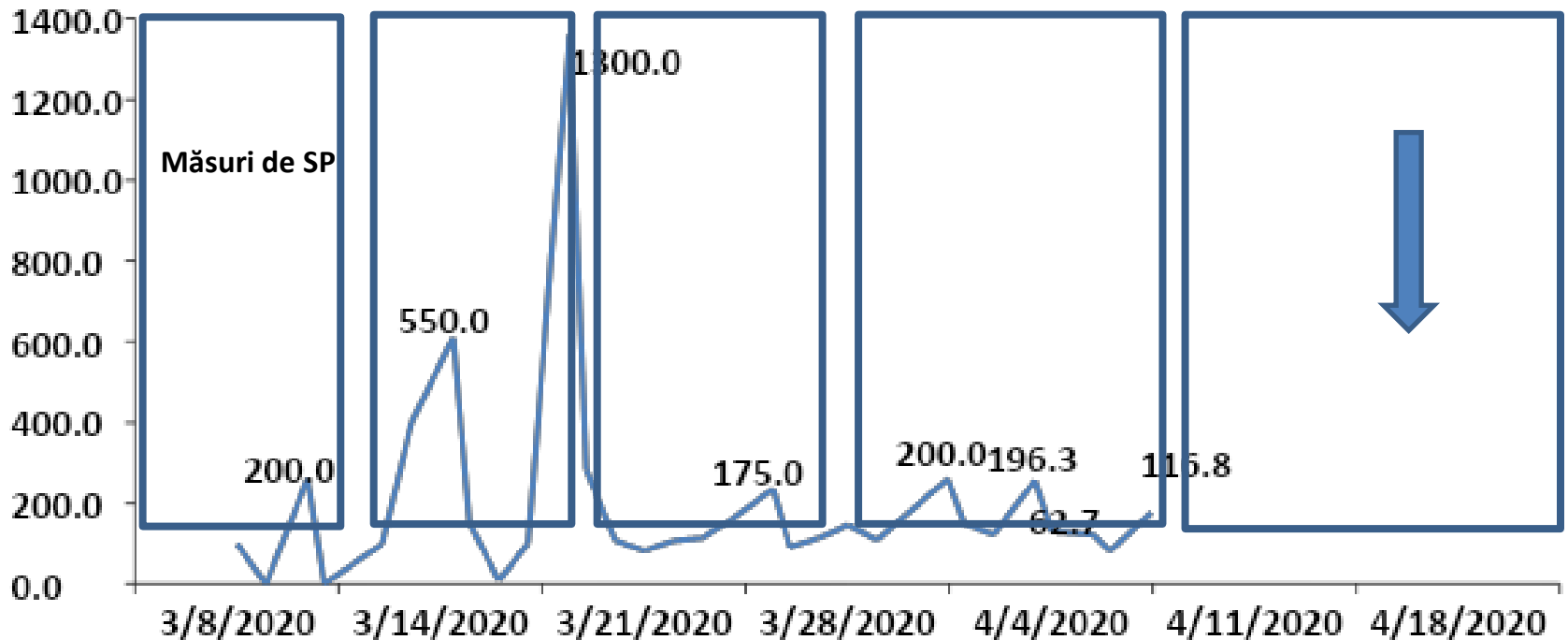
- Estimat încă din luna februarie - la data de **19.04.2020**:

2767 cazuri și 62 decese

- ✓ În realitate avem la data de **17.04.2020**:

2264 cazuri și 55 decese

Rata de creștere în % a cazurilor de COVID-19, 08.03-08.04.2020, Republica Moldova



Dacă rata este de sub 100% - descreștere semnificativă

Dacă rata este de 100% - rămâne constantă

Dacă rata este mai mare de 100% - se atestă o creștere a transmiterii

Pentru prima dată sa atestat o descreștere în datele de 05-07.04.2020

Posibilul scenariu de evoluție a infecției COVID-19 în Republica Moldova

I. Variabilele care pot influența dinamica reducerii morbidității și mortalității prin COVID:

- Persistența și extinderea măsurilor de distanțare socială cu depistarea activă a persoanelor bolnave și a contactilor în special: pînă, pe parcurs și după sărbătorile din aprilie - mai
- Respectarea strigentă acestor măsuri la nivelul populației, întru reducerea presiunii asupra sistemului de sănătate
- Capacitatea de reacție a sistemului de sănătate
- Capacitatea de reacție a administrației publice locale, etc.

II. Realizarea acestor măsuri ar putea favoriza dezvoltarea unui scenariu favorabil după cum urmează:

8 martie - 16-20 aprilie (2020) - perioada de ascendență a procesului epidemic

21 aprilie - 1-10 mai (2020) - vârful procesului epidemic

11 mai - 20-25 mai (2020) - perioada de platou a procesului epidemic

26 mai - 10 iunie (2020) - perioada de descendență a procesului epidemic

Materiale au fost prezentate în data de 8 aprilie, 2020 la Comisia pentru Sănătate a Consiliului Societății Civile

I. Recomandări generale pentru reducerea riscului contractării infecției cu coronavirusul SARS-CoV-2

- Spălați-vă des pe mâini cu apă și săpun sau cu o soluție pe bază de alcool în special după vizitarea locurilor publice, magazinelor alimentare, farmaciilor, utilizării transportului public
- Păstrați distanțarea socială de cel puțin 1,5 m: evitarea strângerilor de mâini, îmbrățișarea sau sărutarea oamenilor, schimbul de produse alimentare, mâncare, ustensile, căni și prosoape
- Respectați regulile corespunzătoare de strănut și tuse: acoperiți-vă gura și nasul cu șervețelul sau cu pliul cotului când strănuțați sau tușiți. Aruncați imediat șervețelul folosit și spălați-vă mâinile
- Evitați contactul direct cu oricine are simptome de răceală sau gripă; evitați să vă atingeți fața cu mâinile (gura, nasul, ochii); evitați contactul neprotejat cu animale vii (sălbatică sau domestice)

II. Recomandări generale pentru reducerea riscului contractării infecției cu coronavirusul SARS-CoV-2

- Curățați suprafețele care ar fi putut intra în contact cu coronavirusul și, în special în spațiile publice utilizați soluții de substanțe dezinfectante cu acțiune virulicidă
- Dacă decideți să purtați mască de protecție igienică, asigurați-vă că aceasta va acoperi nasul și gura - evitați atingerea măștii în timp ce o purtați. Imediat după utilizare, aruncați masca și spălați-vă pe mâini cu săpun
- Adresați-vă medicului de familie sau serviciului 112 pentru îngrijiri medicale dacă Dumneavoastră sau membrii familiei aveți febră, tuse sau dificultăți de respirație
- Transpuneți activ în activitatea Dumneavoastră recomandările specialiștilor, difuzate prin toate canalele mass-media, punând accentul pe risc și căile de diminuare acestuia în situația de criză creată

*Știința cere investiții, nu-s investiții, nu-i cercetare, nu-i
cercetare, nu-i prosperare... ceea ce în continuare
conduce la degradare...*

C. Spînu

Mulțumesc pentru
atenție!

