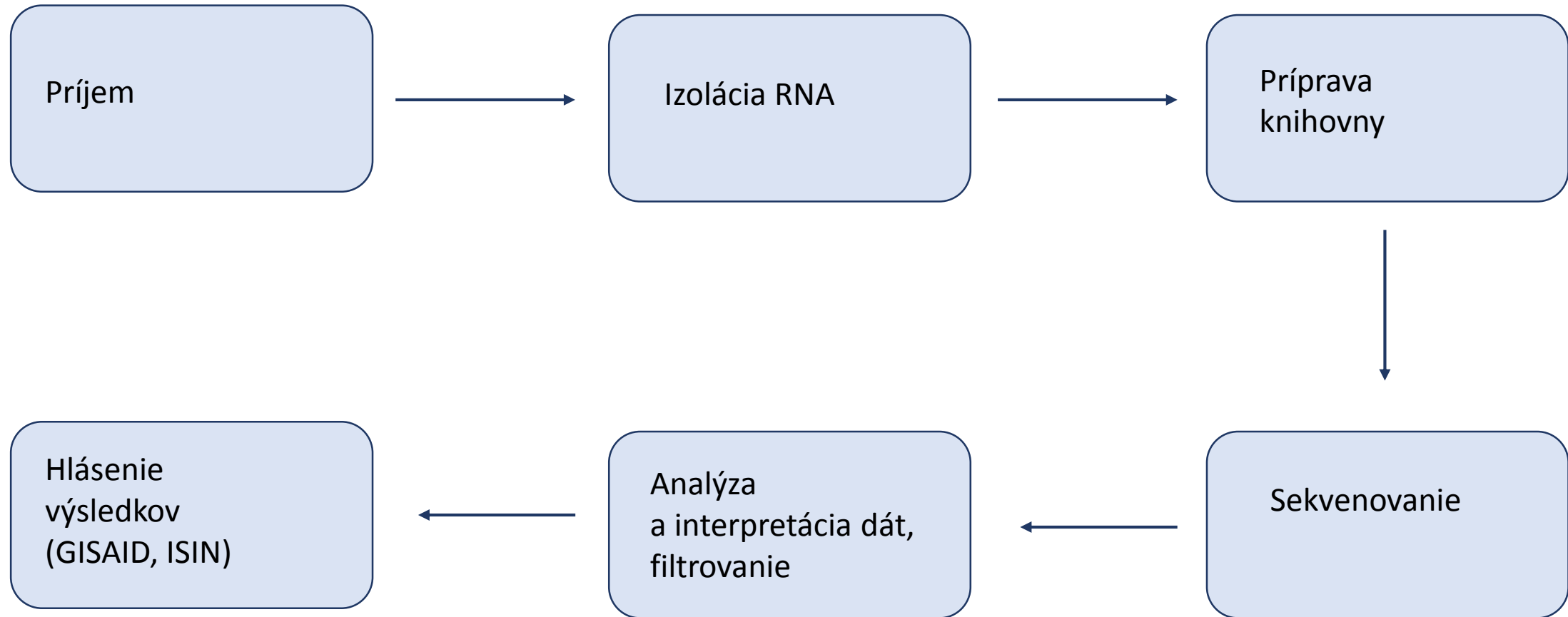


Automatizace celogenomové sekvenace SARS-Cov-2

Autoři: **Timotej Šuri**¹, Helena Jiřincová¹, Radomíra Limberková¹, Jaromíra Večeřová¹, Jan Moskalyk¹, Alexander Nagy¹

Pracoviště: 1- Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie
Kontakt: email - timotej.suri@szu.cz ; tel. 267082508

- Ciel: sekvenovať 100 – 300 vzoriek týždenne
- Automatizácia laboratórnej práce a hlásenia výsledkov
- Zvýšiť kapacitu sekvenačného centra



- Na zapísanie vzoriek do LIS:
 - Zoznam vzoriek
 - Žiadanky
 - Ct hodnoty
- Zaviedli sme integráciu LIS + ISIN
- Čiarové kódy pomohli pri zapisovaní
- Nedostatok personálu na zvýšenie sekvenčnej kapacity

Žádanka existuje



Žádanka testu COVID-19

45

Přihlášený uživatel	
Název odběrového místa	Stan 1
Datum	27. 3. 2020

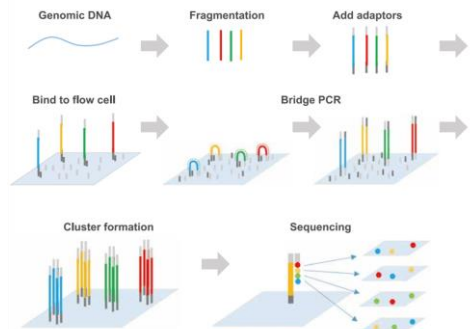
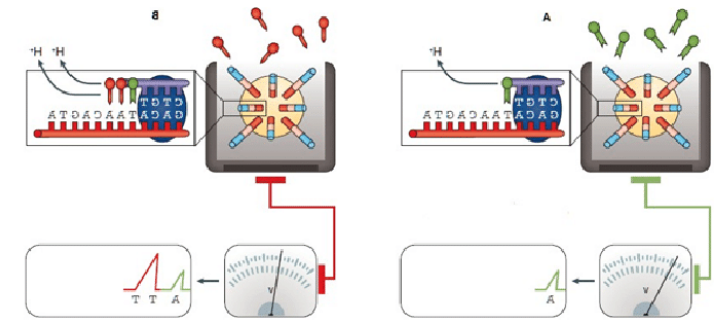
Informace o pacientovi	
Jméno	Pavel
Příjmení	Pokusný
Číslo pojištěnce / rodné číslo	0105080011
Datum narození	5.5.2001
Státní příslušnost	Česko
Zdravotní pojišťovna	111 Všeobecná zdravotní pojišťovna ČR

Údaje o pobytu	
Ulice a č.p.	
PSČ	100 00
Město	Praha

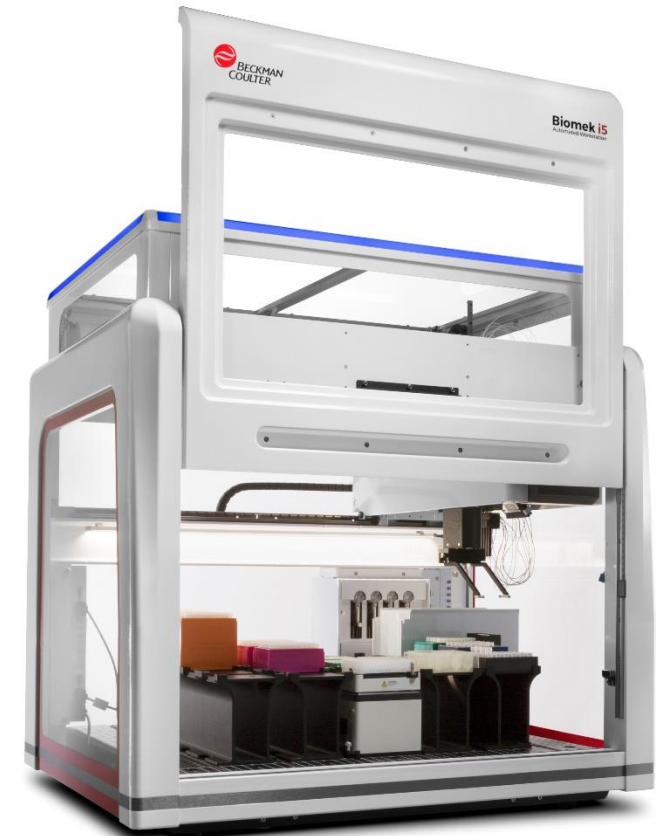
- Izolácia RNA v čistej miestnosti oddelenej od lab. na prípravu knihovny
- Thermo Fisher Kingfisher flex – ≤96 vzoriek za < 1 hodinu
- Zymogen EXM 3000 – 32 vzoriek za 9 minút
- Laboratórium pošle izolát



- ECDC – Illumina NovaSeq 6000
- NRL - Illumina MiSeq
- NRL - ThermoFisher Ion Torrent Genexus
- SVU – Oxford Nanopore MinION



- Biomek i5:
96-jamkova pipetovacia hlavica, 25 pozícií, integrovaný termocycler, peltier, platničkový vortex
- in-house protokol na automatizáciu:
- Paragon Genomics CleanPlex SARS-CoV-2 protokolu
48 / 96 vzoriek za 8-10 hodín
- NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 FS Library Prep
96 vzoriek za 6-8 hodín
- NEBNext ARTIC SARS-CoV-2 Companion Kit (Oxford Nanopore)



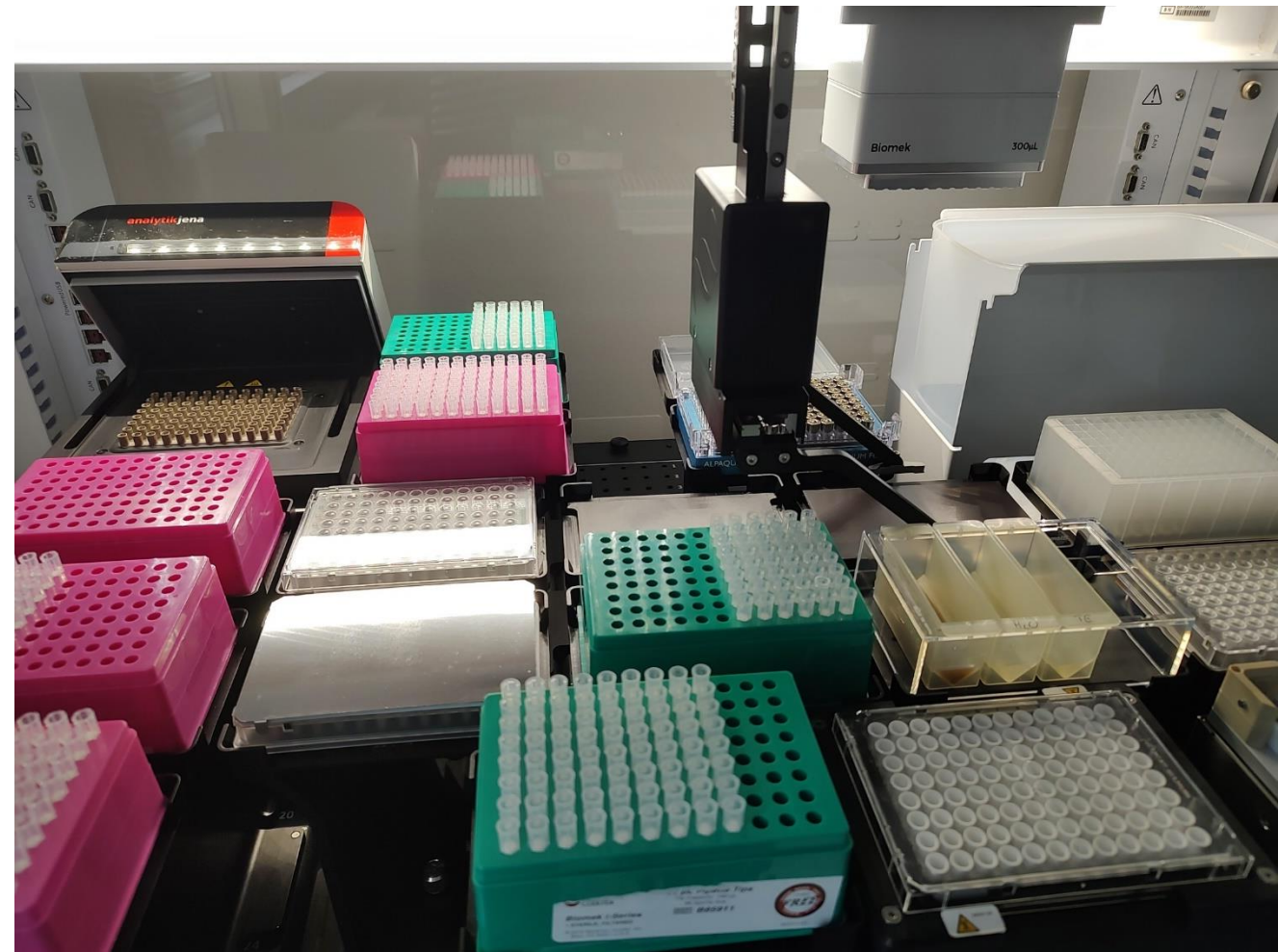
- Manuálna normalizácia:
 - Individuálna kvantifikácia všetkých knihoven
 - Riedenie a pooling
 - 1x bead prečistenie
 - Normalizácia na 4nM
 - Príprava knihovny a cartridge na sekvenovanie
- Cieľ – zjednodušiť a automatizovať proces, aj vďaka NEBNext kitu



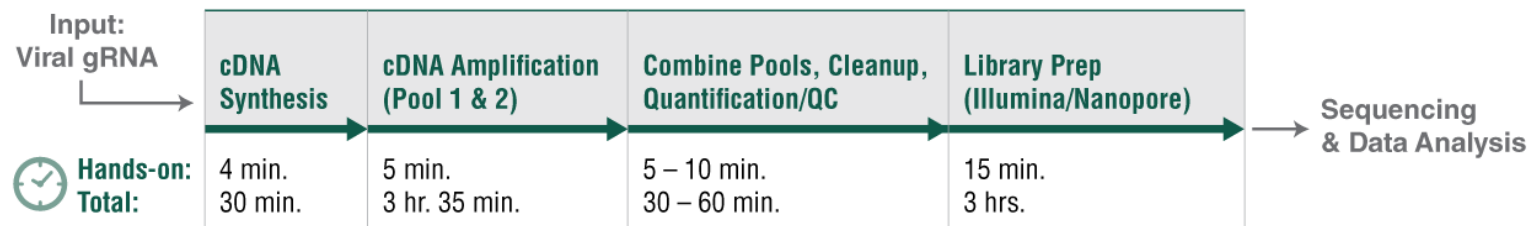
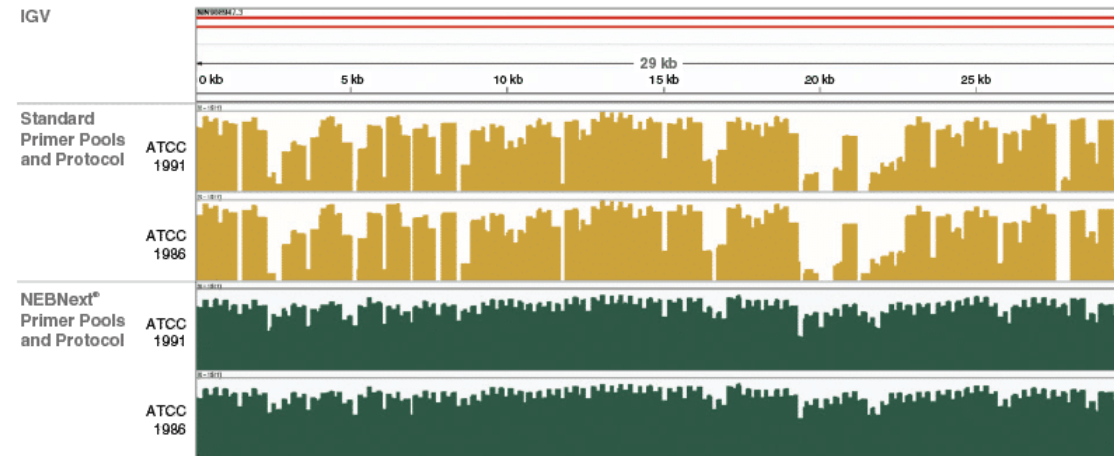
Qubit flex – 8 strip



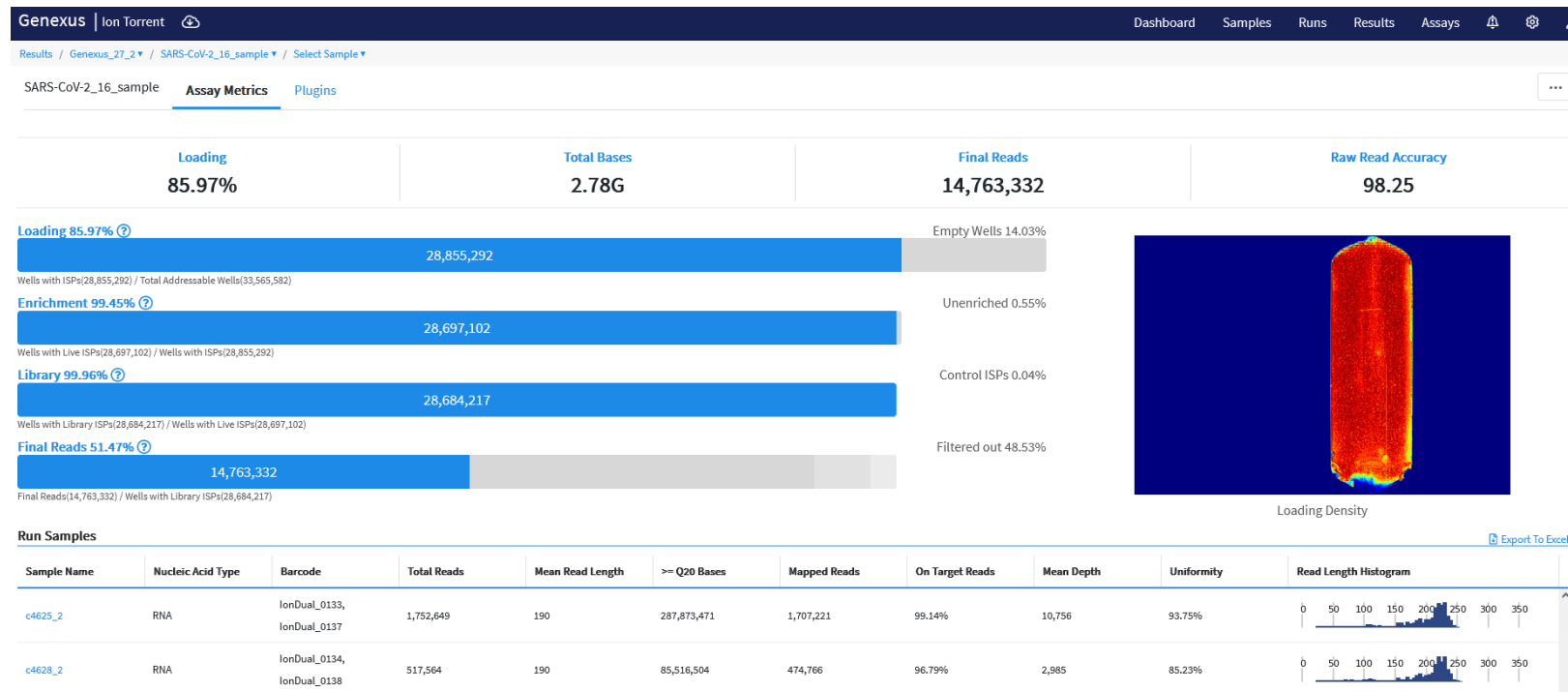
- Protokol ma veľa krokov
- Ťažko sa automatizuje, nespoľahlivý
- Neflexibilný protokol – počet vzoriek
- 1 integrovaný termocykler, 2 PCR platničky
- Niektoré kroky sa nedajú automatizovať
- Limitovaný počet špičiek
- Zatiaľ potrebuje dohľad operátora



- NEBNext kit ma menej krokov, jednoduchší, lacnejší
- Male zmeny v Biomek i5 programe, zmena plastov
- Kúpiť tip loader – výrazne viac použiteľných špičiek
- Automatizovať poolovanie bez normalizácie – NEBNext
- Validovať program, aj s rôznym počtom vzoriek



- Jednoduchý a funkčný program – pripojenie cez prehliadač
- Plne automatizovaný, integrovaný sekvenátor
- Reagencie v uzavretých plastových kazetách
- Stačí rozmraziť
- Výsledky pre 16 vzoriek za ~21 hodín



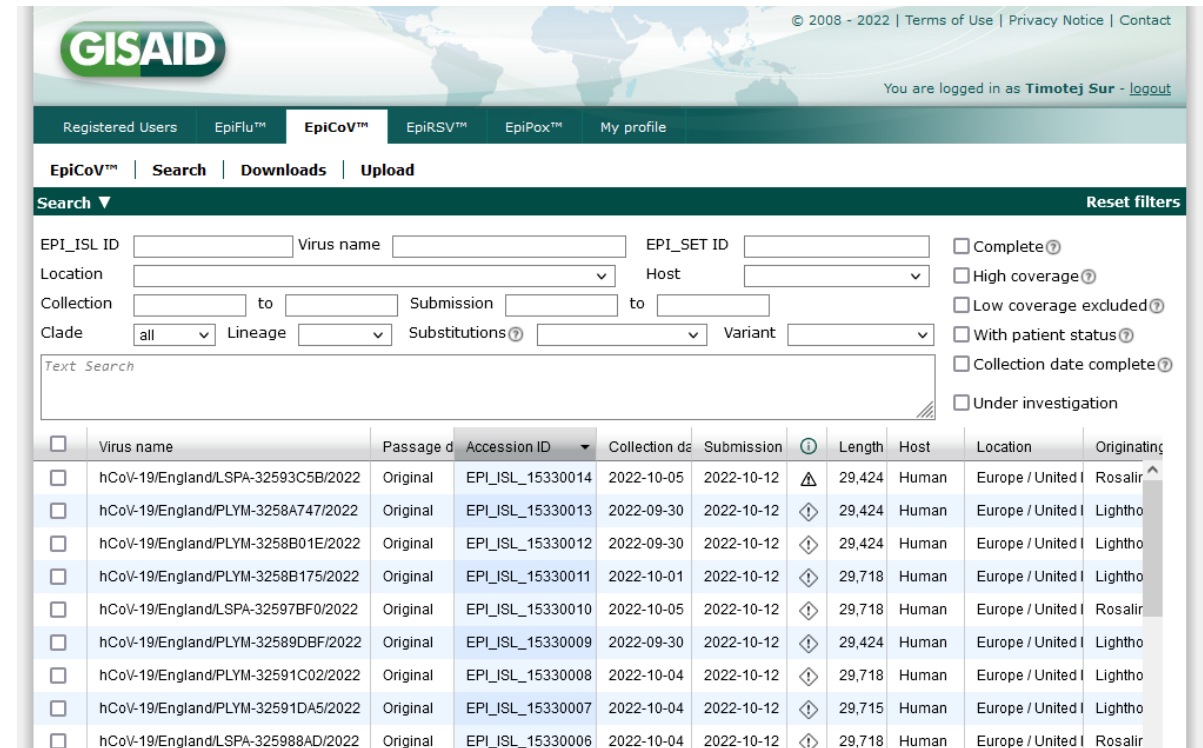
- Kontrola kvality cez bioxsys
- Nextclade
- Pangolin línie



◀ Back Done. Total sequences: 93. Succeeded: 93

ID	Sequence name	QC	Clade	Pango lineage (Nextclade)	Mut.	non-ACGTN	Ns	Cov.	Gaps	Ins.	FS	SC	Nucleotide sequence
0	hCoV-19/Czech Republic/NRL_s5516/20200326	N M P C F S	22B (Omicron)	BA.5.2	75	0	434	98.5%	33	0	0	0	
1	hCoV-19/Czech Republic/NRL_s5517/20200326	N M P C F S	22B (Omicron)	BA.5.2	72	0	366	98.8%	33	0	0	0	
2	hCoV-19/Czech Republic/NRL_s5518/20200326	N M P C F S	22B (Omicron)	BE.1.1	74	0	539	98.2%	24	0	0	0	
3	hCoV-19/Czech Republic/NRL_s5519/20200326	N M P C F S	22B (Omicron)	BA.5.1	71	0	563	98.1%	33	0	0	0	
4	hCoV-19/Czech Republic/NRL_s5520/20200326	N M P C F S	22B (Omicron)	BA.5	73	0	456	98.5%	33	0	0	0	

- GISAID:
 - in-house skript na vygenerovanie GISAID CSV súboru
 - formátovanie fasta
- UZIS:
 - Cez LIS
 - hlásenie pango línie a GISAID EPI čísla



The screenshot shows the GISAID EpiCoV™ web interface. At the top, there is a navigation bar with tabs for 'Registered Users', 'EpiFlu™', 'EpiCoV™', 'EpiRSV™', 'EpiPox™', and 'My profile'. Below this is a search bar with a dropdown menu and a 'Reset filters' button. The search filters include: EPI_ISL ID, Virus name, EPI_SET ID, Location, Host, Collection, Submission, Clade, Lineage, Substitutions, and Variant. There are also checkboxes for 'Complete', 'High coverage', 'Low coverage excluded', 'With patient status', 'Collection date complete', and 'Under investigation'. Below the filters is a table with the following columns: Virus name, Passage date, Accession ID, Collection date, Submission date, Length, Host, Location, and Originating institution. The table contains 10 rows of data for hCoV-19/England sequences.

<input type="checkbox"/>	Virus name	Passage date	Accession ID	Collection date	Submission date	Length	Host	Location	Originating institution
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/LSPA-32593C5B/2022	Original	EPI_ISL_15330014	2022-10-05	2022-10-12	29,424	Human	Europe / United Kingdom	Rosalind
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-3258A747/2022	Original	EPI_ISL_15330013	2022-09-30	2022-10-12	29,424	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-3258B01E/2022	Original	EPI_ISL_15330012	2022-09-30	2022-10-12	29,424	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-3258B175/2022	Original	EPI_ISL_15330011	2022-10-01	2022-10-12	29,718	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/LSPA-32597BF0/2022	Original	EPI_ISL_15330010	2022-10-05	2022-10-12	29,718	Human	Europe / United Kingdom	Rosalind
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-32589DBF/2022	Original	EPI_ISL_15330009	2022-09-30	2022-10-12	29,424	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-32591C02/2022	Original	EPI_ISL_15330008	2022-10-04	2022-10-12	29,718	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/PLYM-32591DA5/2022	Original	EPI_ISL_15330007	2022-10-04	2022-10-12	29,715	Human	Europe / United Kingdom	Lightho
<input type="checkbox"/>	hCoV-19/England/LSPA-325988AD/2022	Original	EPI_ISL_15330006	2022-10-04	2022-10-12	29,718	Human	Europe / United Kingdom	Rosalind

- NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění
- SZÚ



MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ
ČESKÉ REPUBLIKY



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.



BIOCEV

Biotechnologické a biomedicínské centrum
Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci



World Health
Organization

Ďakujem za pozornosť

