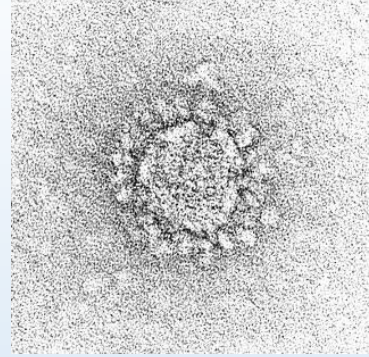


# SARS-COV-2



<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23640>

## Sekvenace

## Diskriminační PCR

## Mass Array

Jaromíra Večeřová

Státní zdravotní ústav

# Sekvenace

- výsledkem procesu je „přečtení celého genomu viru“, cca 30 000 nukleotidů
- důležitá pro sledování změn viru SARS-CoV-2 v čase
- umožňuje sledovat změny v genomu (záměny nukleotidů) → ty mohou vést ke změně složení aminokyselin → a tím může dojít k ovlivnění struktury proteinu a jeho vlastností
- některé změny vedly ke snížení účinnosti ochranných protilátek:
  - např. E484K = záměna glutaminu za lysin
  - L452R = záměna leucinu za arginin
- další změny vedly ke zlepšení schopnosti šíření viru v populaci
  - např. N501Y = záměna kyseliny asparagové za tyrosin

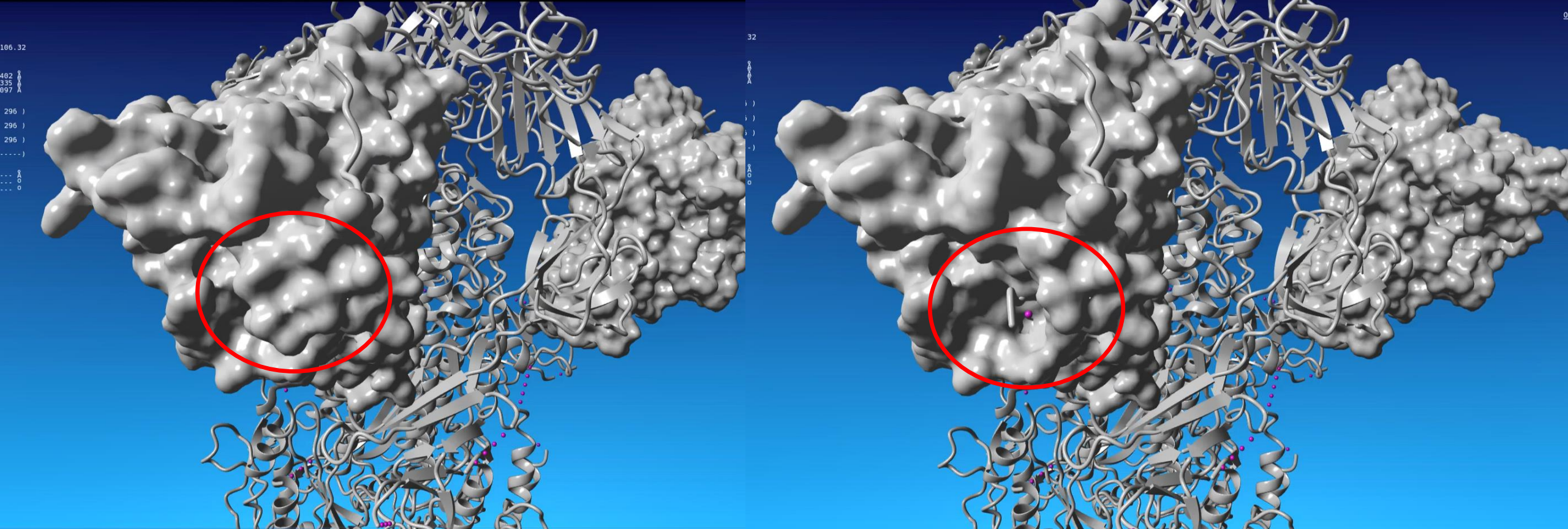
# Od pozitivního vzorku v laboratoři po známou sekvenci

- sběr a svoz vzorků do sekvenačního centra
- administrativa spojená s příjmem vzorků (elektronická žádanka, Ct do 30)
- izolace NK
- příprava tzv. knihovny
- vlastní sekvenace v sekvenátoru
- vyhodnocení
- nahrání sekvence do mezinárodní databáze GISAID
- nahrání výsledků do ISIN
- výsledek do 2 - 3 týdnů od odběru vzorku

Ke dni 8.11.2022 je v databázi GISAID nahráno téměř 13,9 mil sekvencí, za ČR pak 54 000

**Varianty, které by nás měly znepokojovat** (VOC = variants of concerns): zvýšená rychlost přenosu, vážnější průběh nemoci, snížení účinnosti ochranných protilátek

**Varianty hodné zájmu** (VOI = of interests): je třeba sledovat jejich další vývoj a blíže poznat jejich vlastnosti<sup>3</sup>



Delece 6 nukleotidů, tedy 2 aminokyselin (69 histidin, 70 valin) v N-terminální doméně spike proteinu - boční pohled (model dle rentgenostrukturní analýzy – A. Nagy)

# GENEXUS

- integrovaný NGS sekvenátor s automatickou přípravou, sekvenováním a analýzou knihovny NGS
- veškerý požadovaný výpočetní hardware je zabudován do sekvenátoru
- poskytuje výsledky v krátkém čase: 24 hodin včetně automatické přípravy knihoven a generování klinického reportu v plně automatickém režimu bez nutnosti zásahu obsluhy
- možnost „statim WGS“ pro případ urgentního přesného určení epidemiologicky významného patogenu
- zjednodušení a automatizace procesu sekvenace:
  - samostatně vytvoří knihovny (včetně cDNA syntézy)
  - je schopný 16 - 32 reakcí v jednom běhu
  - reagentie jsou připraveny k okamžitému použití
  - minimalizuje lidskou práci – úspora pracovní síly, minimalizace chybovosti

# Diskriminační PCR

- umožňuje sledovat známé mutace, které jsou v popředí zájmu
- musí existovat komerčně dostupná diagnostická sada

|       |           |           | N501Y | K417N | E484K | P681R | E484A | L452R | T547K |
|-------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| alfa  | „britská“ | B.1.1.7   | +     |       |       |       |       |       |       |
| beta  | „JAR“     | B.1.351   | +     | +     | +     |       |       |       |       |
| gama  | „P1“      | P1        | +     |       | +     |       |       |       |       |
| kappa |           | B.1.617.1 |       |       |       |       |       | +     |       |
| delta | „indická“ | B.1.617.2 |       |       |       | +     |       | +     |       |



| Detekovaná mutace v určitém období | Suspektní varianta                                   |
|------------------------------------|--|
| N501Y                              | alfa (B. 1.1.7)                                      |
| N501Y, E484K                       | alfa (B. 1.1.7) + E484K<br>gama (P.1)<br>theta (P.3) |
| N501Y, E484K, K417N                | beta (B.1.351)                                       |
| N501Y, L452R                       | alfa (B. 1.1.7) + L452R                              |
| L452R, P681R                       | delta (B.617.2)                                      |
| L452R, E484Q, P681R                | kapa (B.1.617.1)<br>B.1.617.3                        |

Kombinace 7 mutací/souprava používaná v NRL

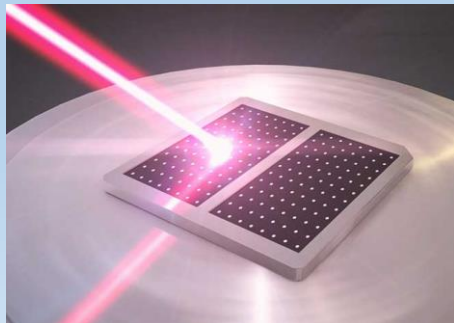
## Aktuální situace: varianty omikronu

|      | N501Y | K417N | E484K | P681R | E484A | L452R | T547K |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BA.1 | +     | +     |       |       | +     | -     | +     |
| BA.2 | +     | +     |       |       | +     | -     | -     |
| BA.4 | +     | +     |       |       | +     | +     | -     |
| BA.5 | +     | +     |       |       | +     | +     | -     |

- mutace hlášené v současnosti: A570D, E484A, E484K, K417N, L452R, N501Y, P681R, T547K, Y505H
- 12 laboratoří
- 230 vzorků s datem odběru v posledních 8 dnech (UZIS, aktualizace denně)

# Mass Array

- **HERA grant:** posílení kapacity systému rychlé detekce variant SARS-CoV-2
- detekce 37 mutací ve spike proteinu
- Postup: reakce probíhá v jedné jamce: postupné přidávání reagensů, pro jeden vzorek 2 reakce
  - RT-PCR amplifikace (celkový objem 5ul)
  - Odstranění nezačleněných dNTP v reakci pomocí enzymu SAP = Shrimp Alkaline Phosphatase (celkový objem 7ul)
  - Extenzní reakce iPLEX Pro (celkový objem 9ul), ddNTPs
  - Přidání vody (celkový objem 50ul)
- MassArray
  - Nastavení analýzy
  - Automatické pipetování: odsolení (pomocí pryskyřice)
  - Automatické přenesení vzorků na chip
- Analýza
- Zobrazení dat a vytvoření reportu



[www.agenabio.com](http://www.agenabio.com)





## Detekované mutace

|              |       |        |
|--------------|-------|--------|
| L5F          | N439K | Q677P  |
| S13I         | Y453F | P681H  |
| L18F         | S477N | P681R  |
| T19R         | L452R | I692V  |
| H69_V70del   | T478K | A701V  |
| D80A         | E484K | T716I  |
| D80G         | E484Q | T95I   |
| Y144del      | Q493K | S982A  |
| W152C        | N501Y | K1191N |
| D215G        | N501T |        |
| L242_L244del | A570D |        |
| D253G        | D614G |        |
| K417T        | Q677H |        |
| K417N        | Q677P |        |

- zpracovali jsme celkem 1426 vzorků
- hodnoceno bylo 1263 vzorků (92 technický problém cycleru, 71 neprošlo kontrolou kvality)
- hodnoty Ct 12 – 30
- období říjen 2020 – červenec 2022
- 895 analyzovaných vzorků osekvenovaných



# Srovnání s WGS:

| MassArray |                          | WGS  |                  | % shody     |
|-----------|--------------------------|------|------------------|-------------|
| 105X      | <b>B.1.258</b>           | 97X  | <b>B.1.258</b>   | <b>92,4</b> |
|           |                          | 4X   | B.1.527          |             |
|           |                          | 3X   | B.1              |             |
|           |                          | 1X   | B.1.221          |             |
| 21X       | <b>B.1.1.7 (alpha)</b>   | 21X  | <b>B.1.1.7</b>   | <b>100</b>  |
| 89X       | <b>B.1.617.2 (delta)</b> | 84X  | <b>B.1.617.2</b> | <b>94,4</b> |
|           |                          | 4X   | BA.1.1           |             |
|           |                          | 1X   | BA.2             |             |
| 94X       | <b>BA.1 (omicron)</b>    | 52X  | <b>BA.1</b>      | <b>90,4</b> |
|           |                          | 33X  | <b>BA.1.1</b>    |             |
|           |                          | 7X   | BA.2             |             |
|           |                          | 1X   | AY.127           |             |
|           |                          | 1X   | XE               |             |
| 337X      | <b>BA.2 (omicron)</b>    | 331X | <b>BA.2.X</b>    | <b>98,2</b> |
|           |                          | 3X   | XE               |             |
|           |                          | 2X   | XT               |             |
|           |                          | 1X   | BA.1.1           |             |
| 191X      | <b>BA.2 (omicron)</b>    | 168X | BA.5.X           |             |
|           |                          | 23X  | BA.4             |             |
| 58X       | D614G                    |      | *                |             |

\*

- 8x BA.2.x, 3x BA.5, 3x BA.4 (odběr duben – červen 2022)
- 8x B.1.258 (odběr konec roku 2020)
- 8x B.1.160, 1x B.1.177, 6x B.1.527, 4x B.1.416.1, 5x B.1.221, 1x B.1.88, 1x B.1.1.141, 2x B.1.1.277, 1x B.1.1.294, 1x B.1.1.39, 6x B.1.1 (odběr konec roku 2020)

## Rozdíl mezi výsledky stanovenými pomocí MA a WGS:

- 5 vzorků vyhodnocených jako B.1.617.2 bylo sekvenačně určeno jako BA.1.1 nebo BA.2, datum odběru všech spadá do první poloviny února 2022
- 1 vzorek vyhodnocený jako BA.1 byl sekvenačně určen jako AY.127, datum odběru leden 2022
- 7 vzorků vyhodnocených jako BA.1 bylo sekvenačně určeno jako BA.2, datum odběru začátek února 2022 u všech
- 1 vzorek určený jako BA.2 byl sekvenačně určen jako BA.1, datum odběru březen 2022

**Důvodem pro zařazení do jiné linie než jaká byla sekvenačně stanovena může být omezení metody Mass Array, kdy je detekováno „pouze“ 37 markerů.**

# PODĚKOVÁNÍ VŠEM KOLEGŮM

## Příjem a zpracování vzorků:

NRL pro enteroviry: Katka Jirková, Milena Šalplachová, Iva Vodičková , Petra Rainetová

NRL pro herpetické viry: Michaela Růžková

NRL pro spalničky: Simona Repelová, Radka Limberková

NRL pro chřipku: Marcela Trinklová, Denisa Husáková, Viktorie Laštůvková, Michal Shejbal, Alena Hanzalová, Jana Kosová, Dušan Trnka

Jana Kozáková a kolegyně z budovy č.2 (Monika, Renata, Katka a další, kteří pomohli se zápisem vzorků a přípravou k izolaci)

## Sekvenace:

Alexandr Nagy, Timotej Šuri

## Mass Array

Marcela Trinklová

## HERA

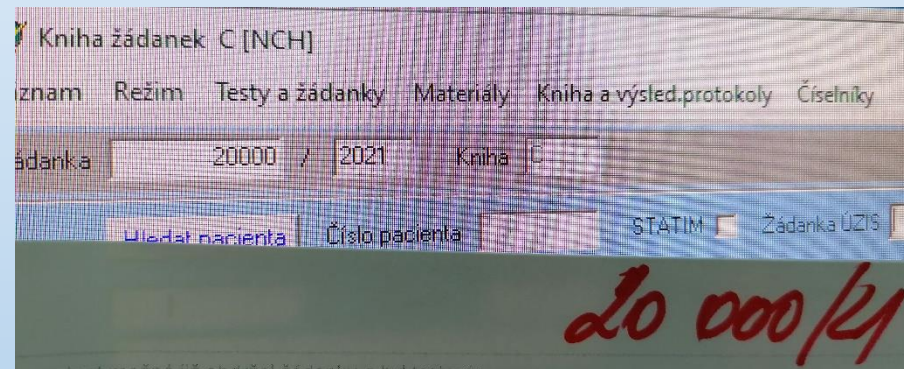
Helena Jiřincová

## Zasílající laboratoře:

N Kolín, N Nymburk, Synlab Cube, Synlab ČB, Aeskulab, Nutrimed, Česká Laboratorní, CityLab, EUC, VIDIA, FNKV, ZU Ostrava, Elphogene, a další

## Dodavatel Mass Array: Explorea

Ing. Jirout, pan technik Mrázek, Mgr. Pidímová



Project „Enhancing Whole Genome Sequencing (WGS) and/or Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) national infrastructures and capacities to respond to the Covid-19 pandemic in the European Union and European Economic Area“ had received funding from the European Centre for Disease Prevention and Control under the Grant Agreement number ECDC/HERA/2021/004 ECD.12218.



More information about the project: <http://www.szu.cz/ecdc-1>

NOTE:

Information included reflects only the authors' view and the Centre (ECDC) is not responsible for any use that may be made of the information it contains.