

MASS ARRAY

Monitoring variant SARS-CoV-2 systémem Mass Array

Mrázek J.¹, Mikešová R.², Jiřincová H.³

¹ Zdravotní ústav se sídlem v Ostrava

² Zdravotní ústav se sídlem v Ústí na Labem

³ Státní zdravotní ústav

MASS ARRAY

PROJEKT:

„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 EU“.

ECDC/HERA/2021/004 ECD.12218.

ZÁMĚR:

Posílení kapacity systému rychlé detekce variant SARS-CoV-2 monitorováním velkého souboru mutací ve Spike genu metodou zahrnující kombinaci RT-PCR, jedno-nukleotidové extenze a hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS).

KROKY:

Pořízení 3 systému Mass Array (ZÚ Ostrava, ZÚ Ústí nad Labem, SZÚ Praha)

Zavedení a verifikace **standardního operačního postupu** pro analýzu variant SARS-CoV-2 v klinickém materiálu.

Dosažení společné **kapacity** analýzy až 1500 vzorků týdně.

Analýza a vyhodnocení **10.000 vzorků**.

MASS ARRAY

Workflow



PCR/SAP/Extension



Target Sequence Detection



Data Analysis

96 FORMAI



Run Time: 7 Hrs*
Hands-on Time: 23 Min

1) (RT-)PCR reakce

- Reverse a forward primer; 5 ng/ μ l DNA / 3 μ l of RNA

2) SAP reakce

- SAP enzyme - Shrimp Alkaline Phosphatase
- odstraňuje nezačleněné dNTPs v PCR produtech před SNP analýzou

3) Extenční reakce

- Extenční koktejl - buffer, terminační mix, **ddNTPs, extend primer mix,...**
- Jednobázová extenze k identifikaci locus-specifické allelely

MASS ARRAY

Workflow



PCR/SAP/Extension



Target Sequence Detection



Data Analysis

Total Elapsed Time

4) MassArray instrument s Chip Prep Modulem

- Automatické rozplnění vzorků na SpectroCHIP (96 format)
- Vzorky analyzovány pomocí MALDI-TOF MS

5) Software

- Popis rozpoložení vzorků
- Analýza výsledků a reportování

96 FORMAT



Run Time: 7 Hrs*
Hands-on Time: 23 Min



Run Time: 90 Mins*
Hands-on Time: 5 Min



Hands-on Time:
5-10 Min

9.13 Hours

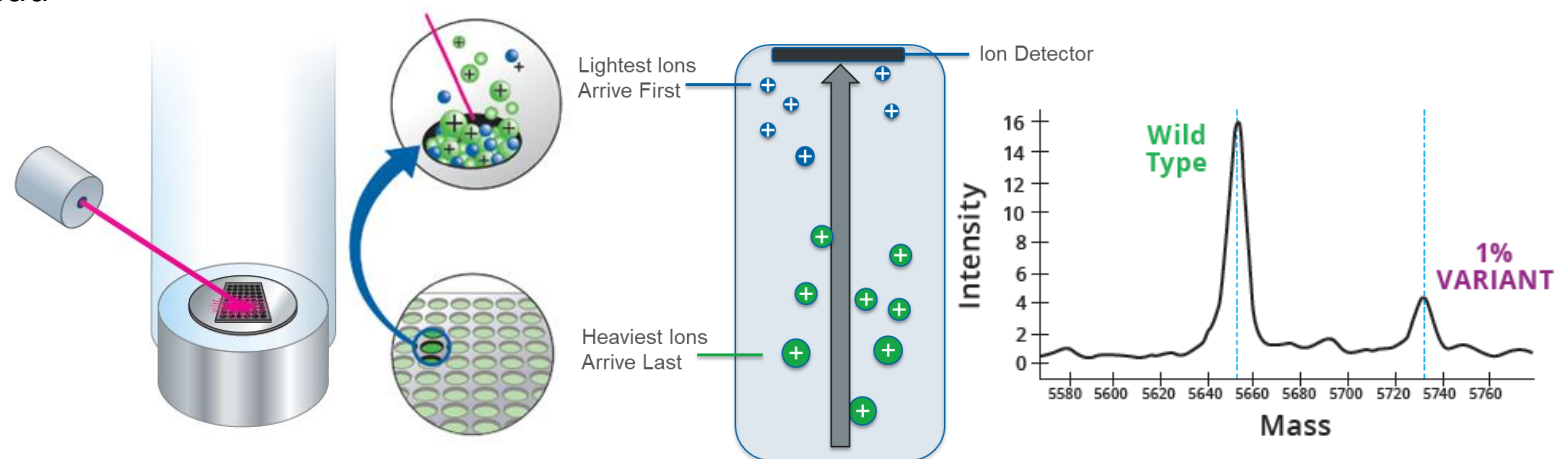
Up to 768 samples

Up to 960 samples overnight

MASS ARRAY

Detekce:

- Založena na MALDI-TOF mass spectrometrii
- Přesná detekce definovaných DNA oligonukleotidů
- Rozlišení dle **time-of-flight** po ionizaci
- Nevyžaduje fluorescenční značení

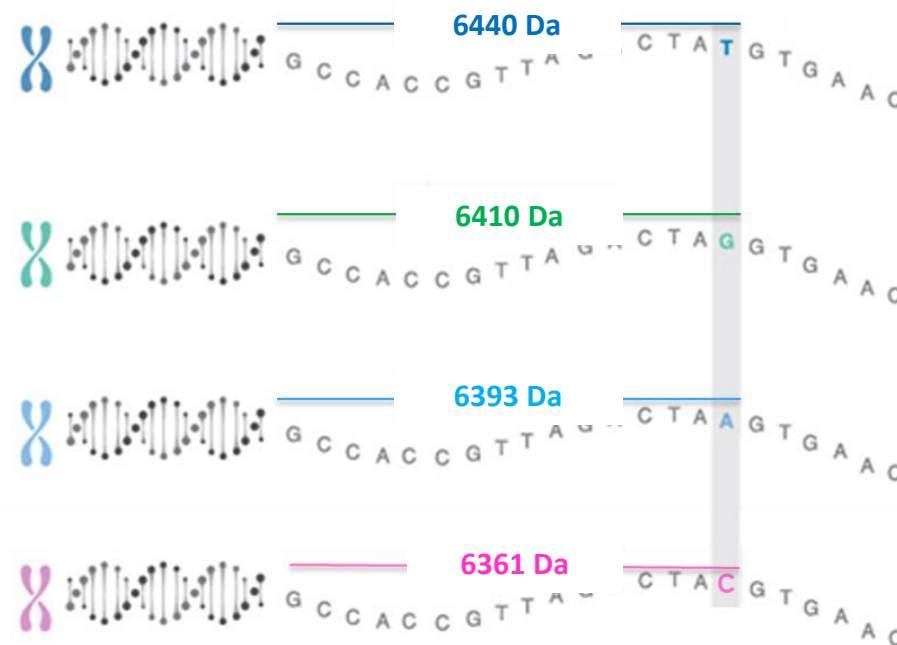


MASS ARRAY

Detekce variant

Známe celkovou hmotnost extendovaných primerů a nukleotidů

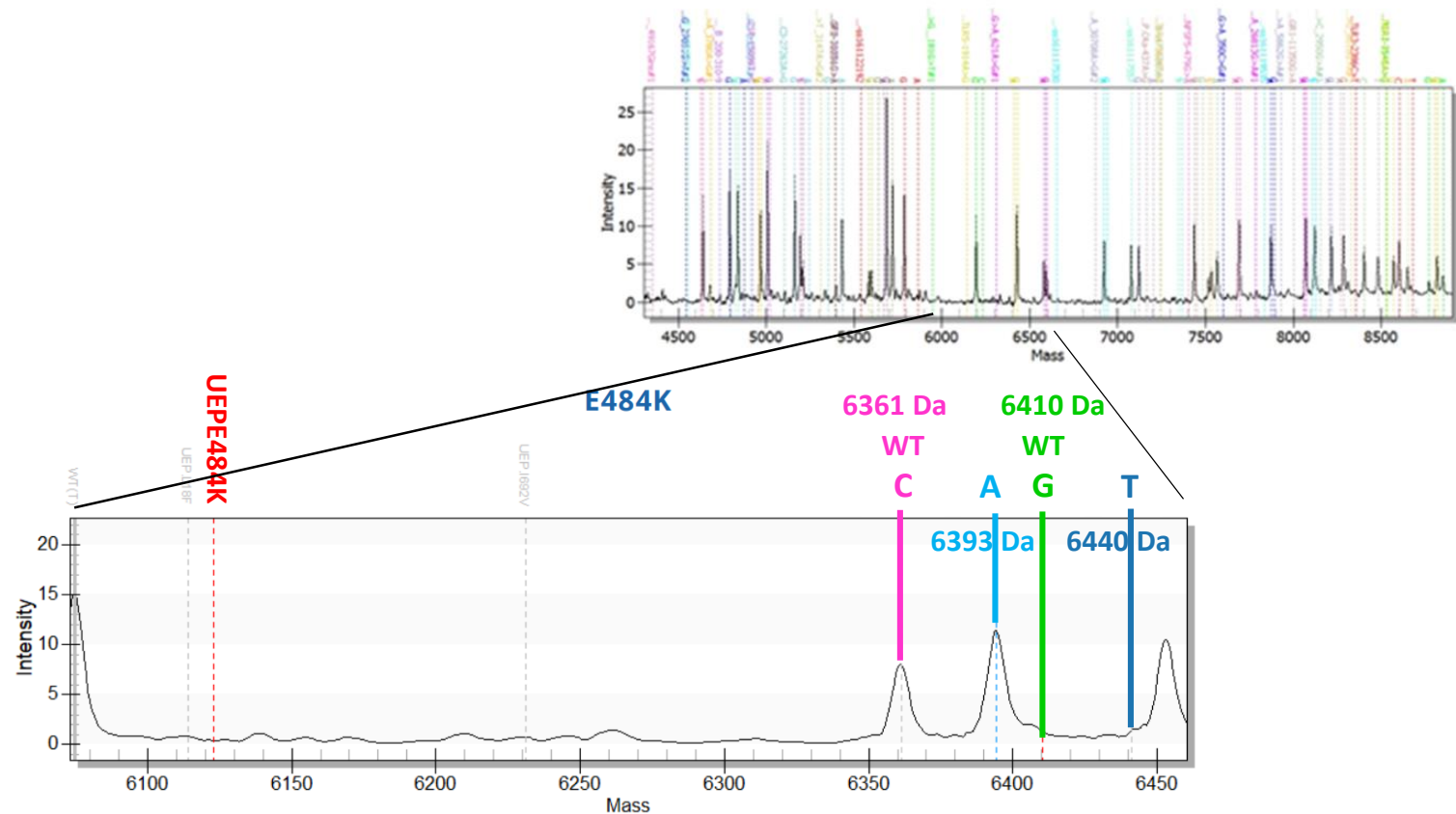
Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)



MASS ARRAY

Variant detection

- Software využívá známé hmotnosti sekvencí příslušících různým variantám SARS-CoV-2 a očekávaných v daném detekčním okně.



MASS AIRRAY

Detekované mutace (37):

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

MASS AIRRAY

INSTALACE:

Ostrava	10.3.2022
Ústí nad Labem	3.5.2022 (dodán vadný sample prep. modul)
Praha	2.3.2022

ZAHÁJENÍ TESTOVÁNÍ:

Ostrava	31.3.2022
Ústí nad Labem	16.5.2022
Praha	15.4.2022

KAPACITA:

500 testů týdně
500 testů týdně
500 testů týdně

POČTY VYŠETŘENÝCH VZORKŮ:

4 846
2 794
1 429

POKRYTÉ OBDOBÍ:

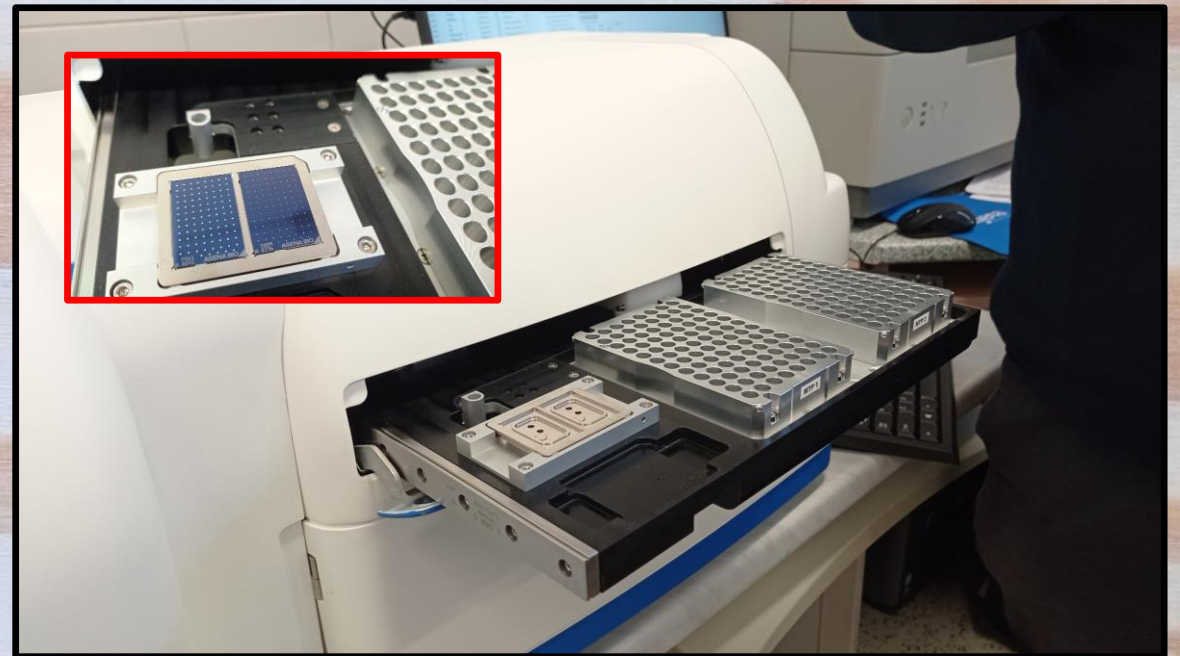
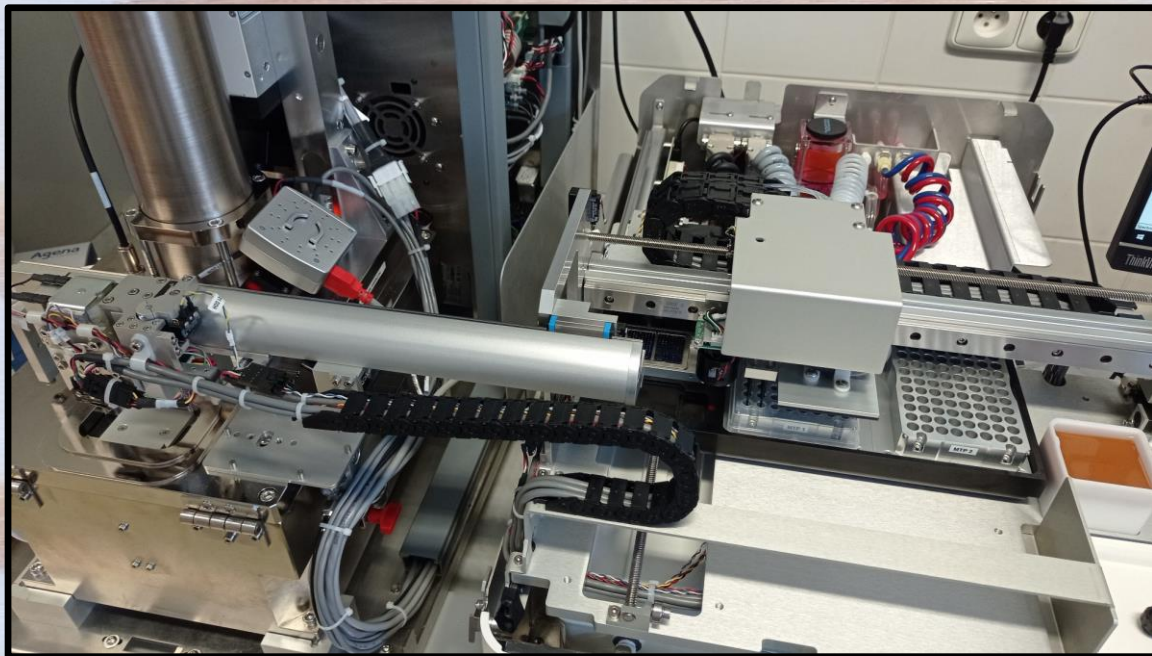
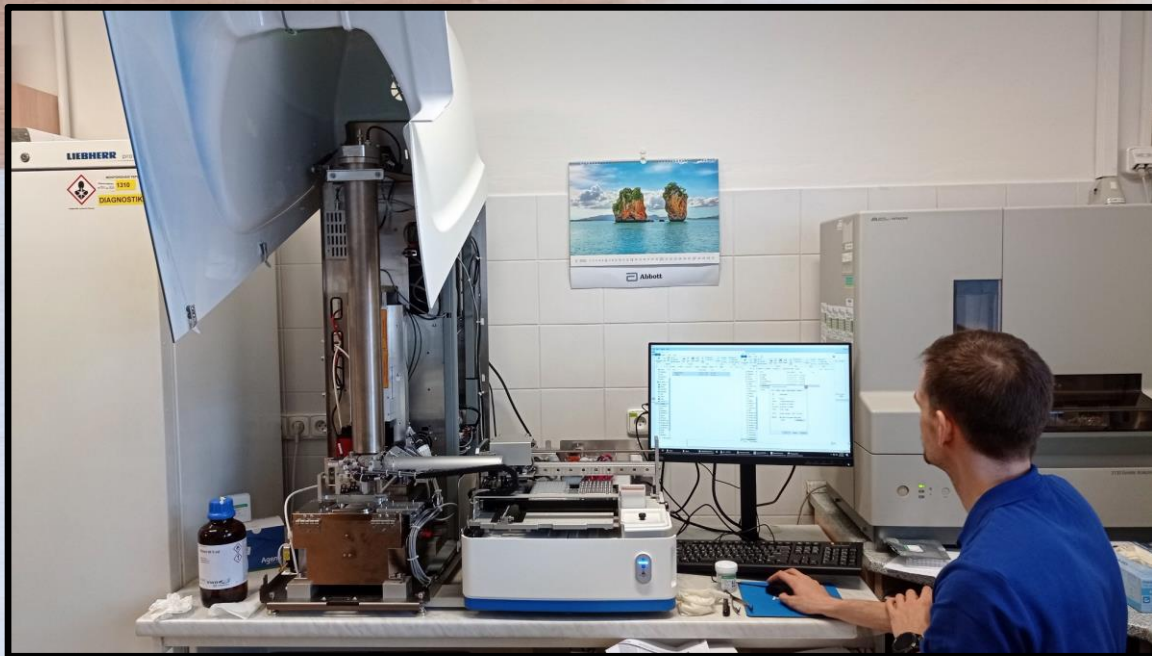
11/21-6/22
11/21-7/22
10/20 -7/22

CELKEM

1500 testů týdně

9 069

10/20-**11/21**-7/22



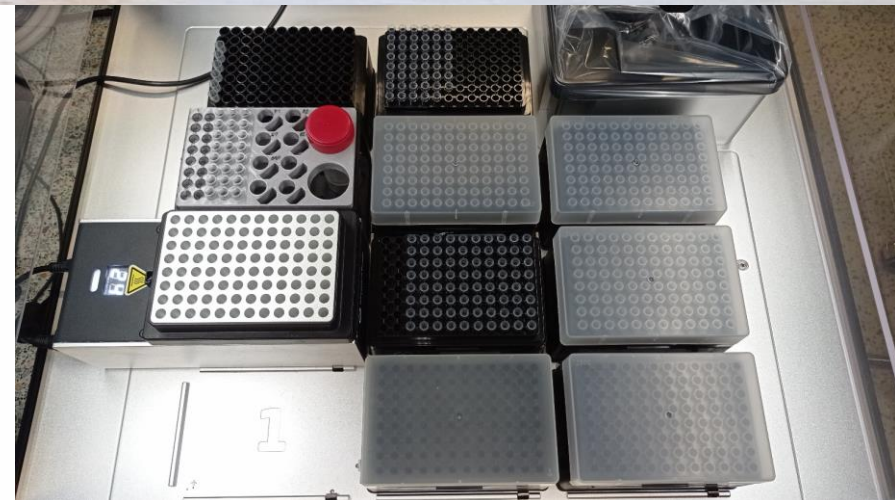
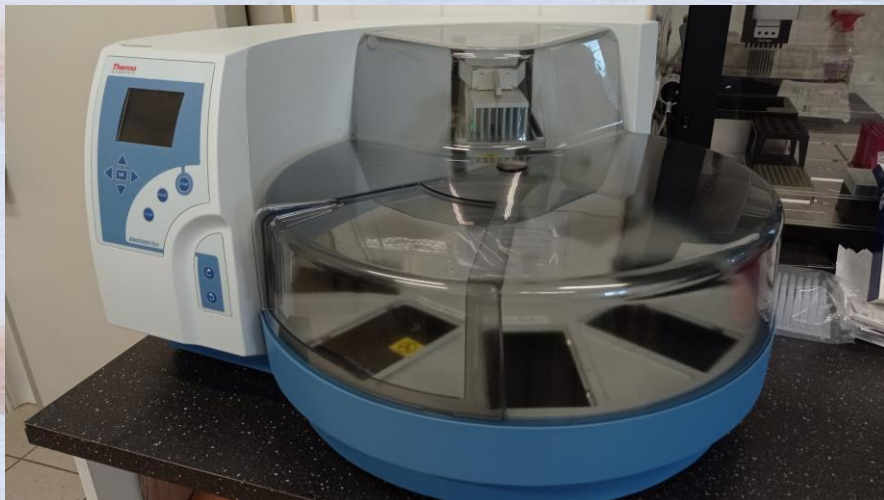
MASS ARRAY

DALŠÍ INSTRUMENTACE

Ostrava Izolátor Kingfisher FLEX 96, C1000Touch
Ústí nad Labem Izolátor EXM3000, Zybio, CFX96
Praha Izolátor Kingfisher FLEX 96, CFX96, C1000Touch

AUTOMATIZACE:

Pipetovací robot Opentrons (OT-2)
-
Pipetovací robot Ep Motion 5070



MASS

ARRAY

Srovnání s WGS:

Varianta	MassArray	WGS		% shody	% součet
105X	B.1.258	97X	B.1.258	92,4	92,4
		4X	B.1.527		
		3X	B.1		
		1X	B.1.221		
21X	B.1.1.7 (alpha)	21X	B.1.1.7	100	100
89X	B.1.617.2 (delta)	84X	B.1.617.2	94,4	94,4
		4X	BA.1.1		
		1X	BA.2		
94X	BA.1 (omicron)	52X	BA.1	55,3	55,3
		33X	BA.1.1	35,4	90,4
		7X	BA.2	7,4	97,8
		1X	AY.127		
		1X	XE		
337X	BA.2 (omicron)	331X	BA.2.X	98,2	98,2
		3X	XE	0,9	99,1
		2X	XT	0,6	99,7
		1X	BA.1.1	0,3	
191X	BA.5/4 (omicron)	168X	BA.5.X	88	88
		23X	BA.4	12	100

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 cca 36 markerů.

MASS ARRAY

Srovnání s diskriminační PCR (ZÚ Ústí):

Varianta	MassArray	Diskriminační PCR	Mutace	% shody
692X	B.1.617.2 (delta)	692X	L452R+	100
1316X	BA.1 (omicron)	1283X	Y505H+; E484A+; K417N+	
		33X	E484A+; K417N+; T547K-	100
168X	BA.2 (omicron)	63X	Y505H+; E484A+; K417N+	
		105X	E484A+; K417N+; T547K-	100
37X	BA.5/4 (omicron)	37X	L452R+; E484A+;	
			K417N+; T547K-	100

Varianta	MassArray	Diskriminační PCR	Mutace	% shody
2101X	B.1.617.2 (delta)	2101X	L452R+; Y505H -	100
1399X	BA.1 (omicron)	1399X	L452R-; Y505H +	100
1009X	BA.2 (omicron)	1009X	L452R-; Y505H +	100
1X	BA.5/4 (omicron)	1X	L452R+; Y505H +	100

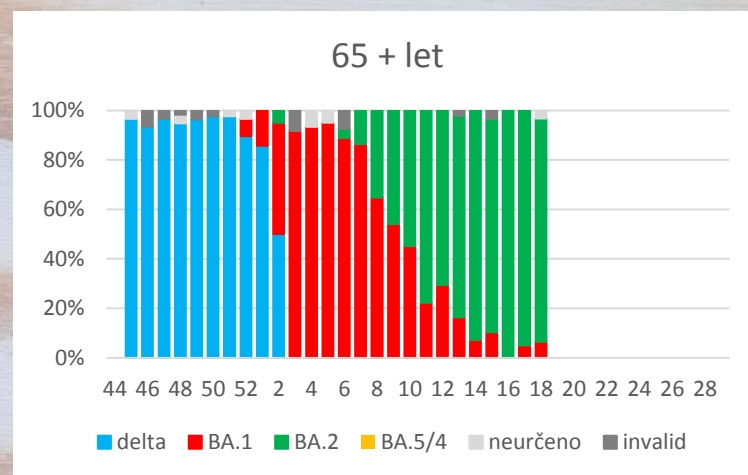
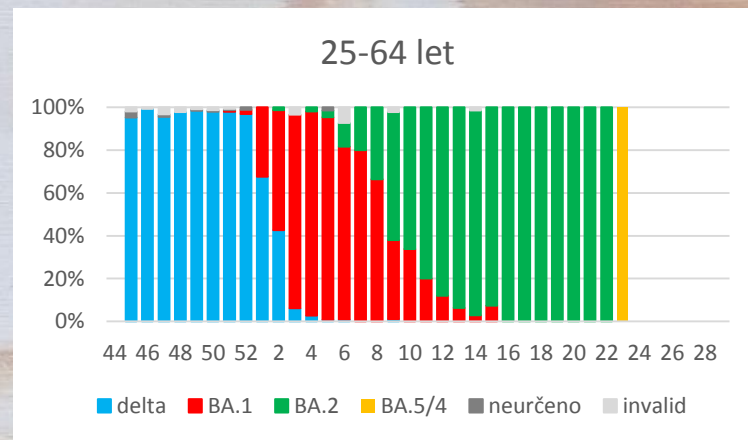
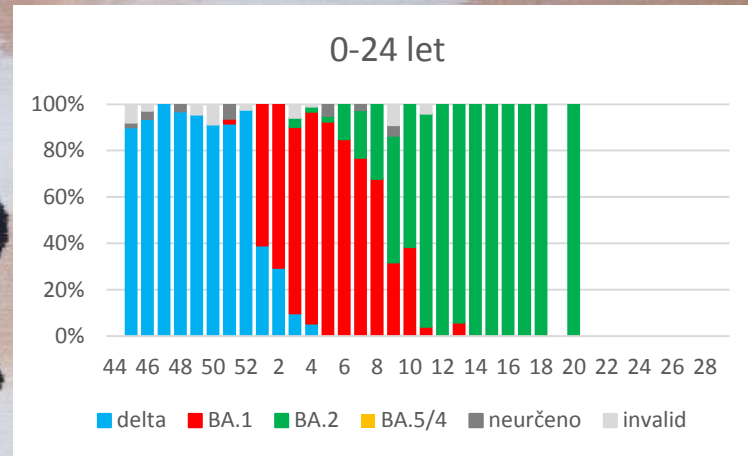
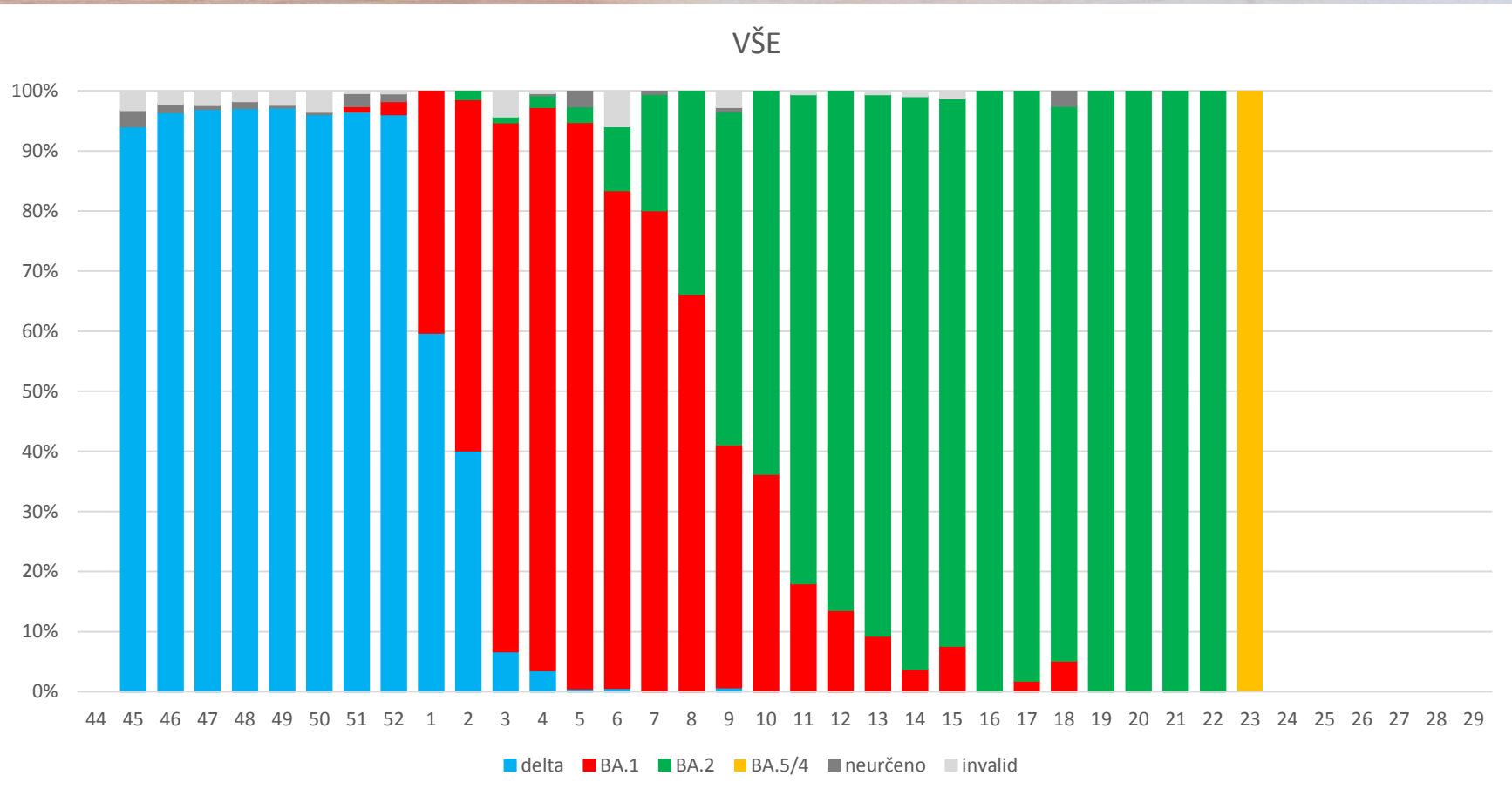
Rozdíl mezi výsledky stanovenými pomocí MA a diskriminační PCR:

- 100% shoda

Běžná diskriminační PCR disponuje menším spektrem prokazovaných mutací a v závislosti na zvolené sestavě detekovaných markerů určuje jednotlivé linie s podobným výkonem jako MA.

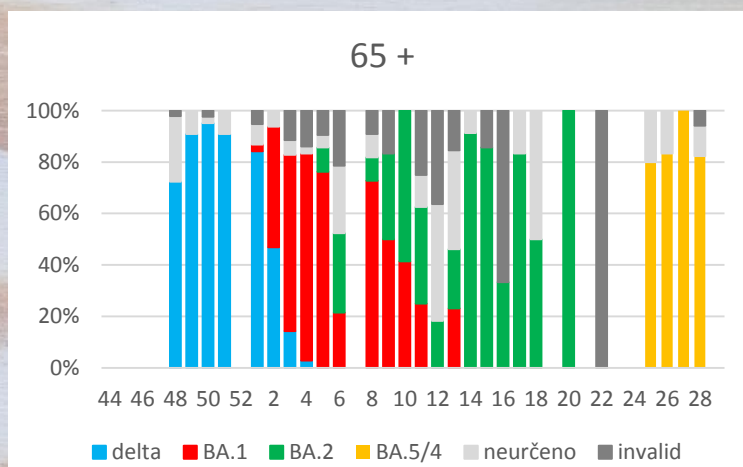
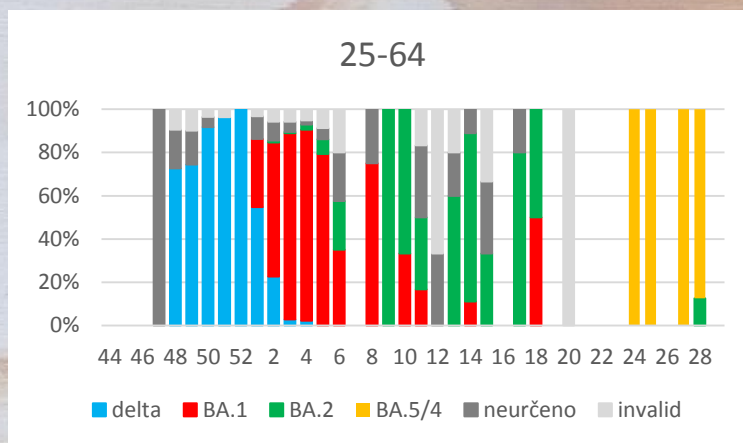
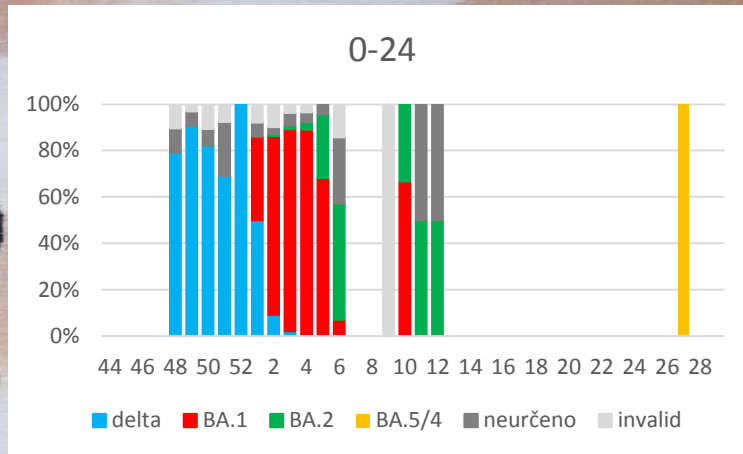
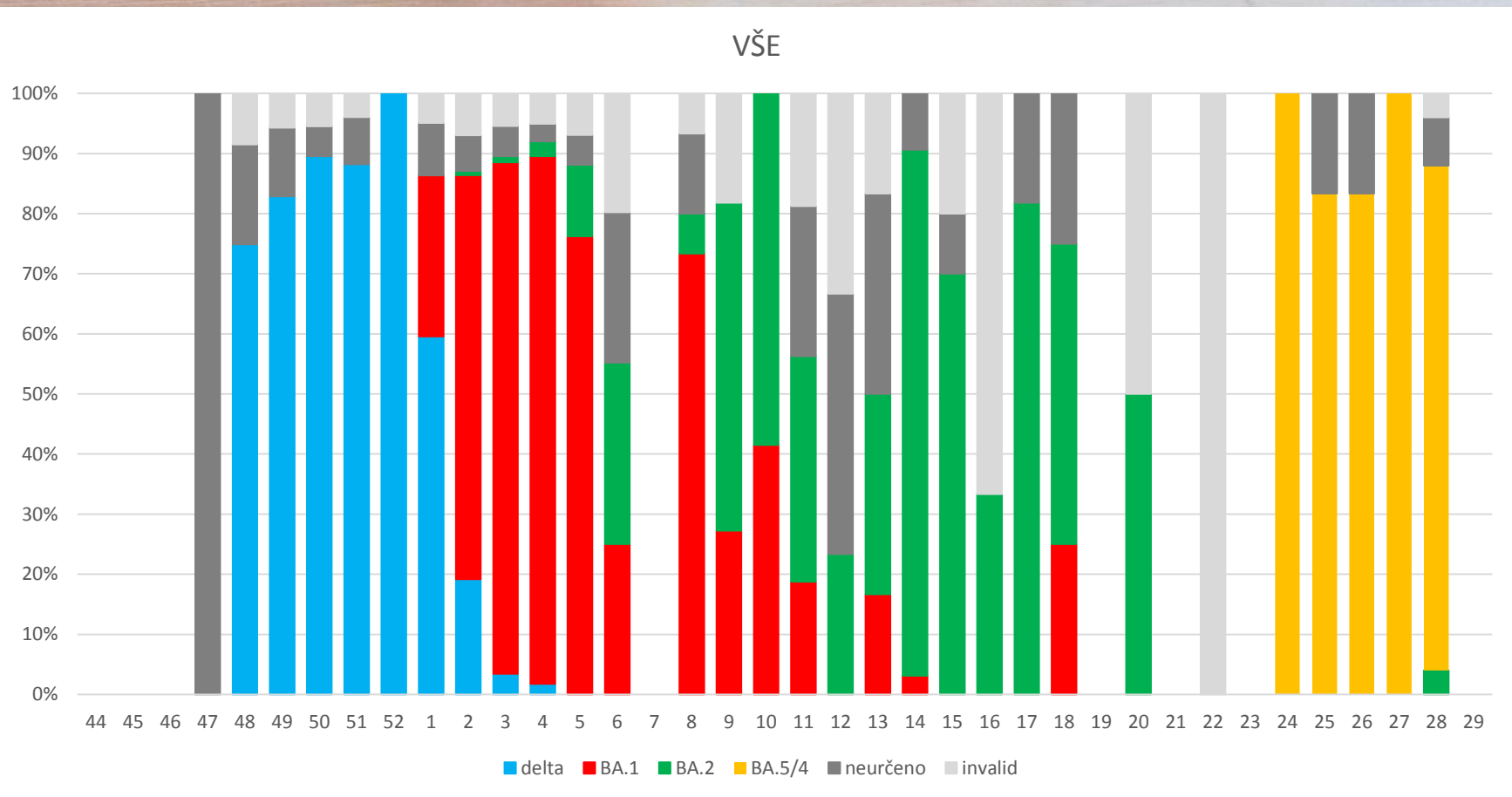
MA přináší oproti diskriminační PCR výhodu širokého spektra prokazovaných mutací.

OSTRAVA; celkem 4 613



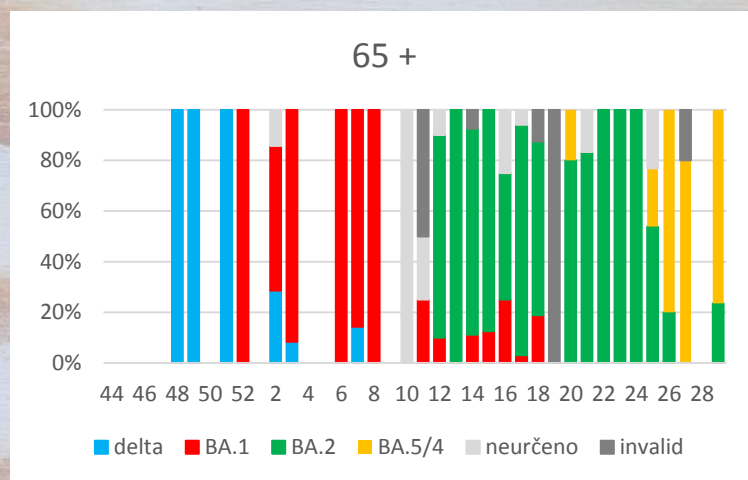
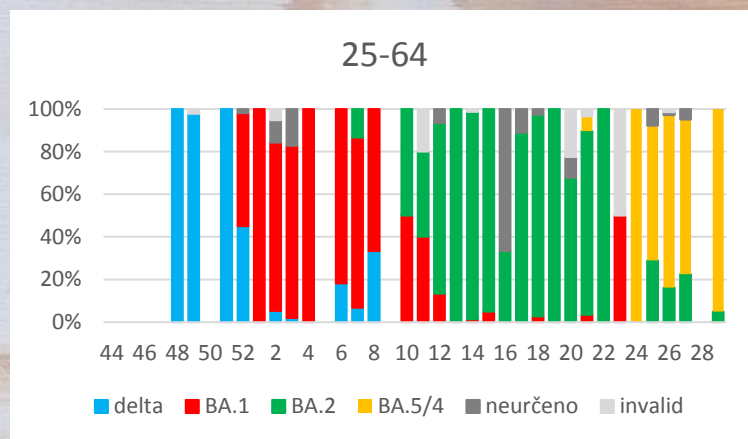
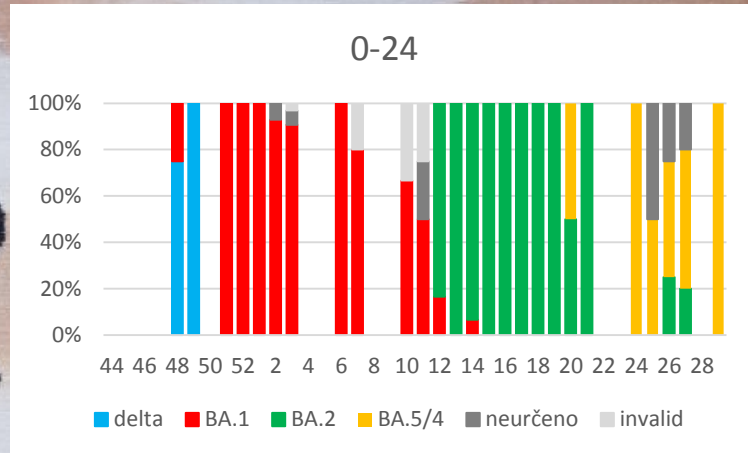
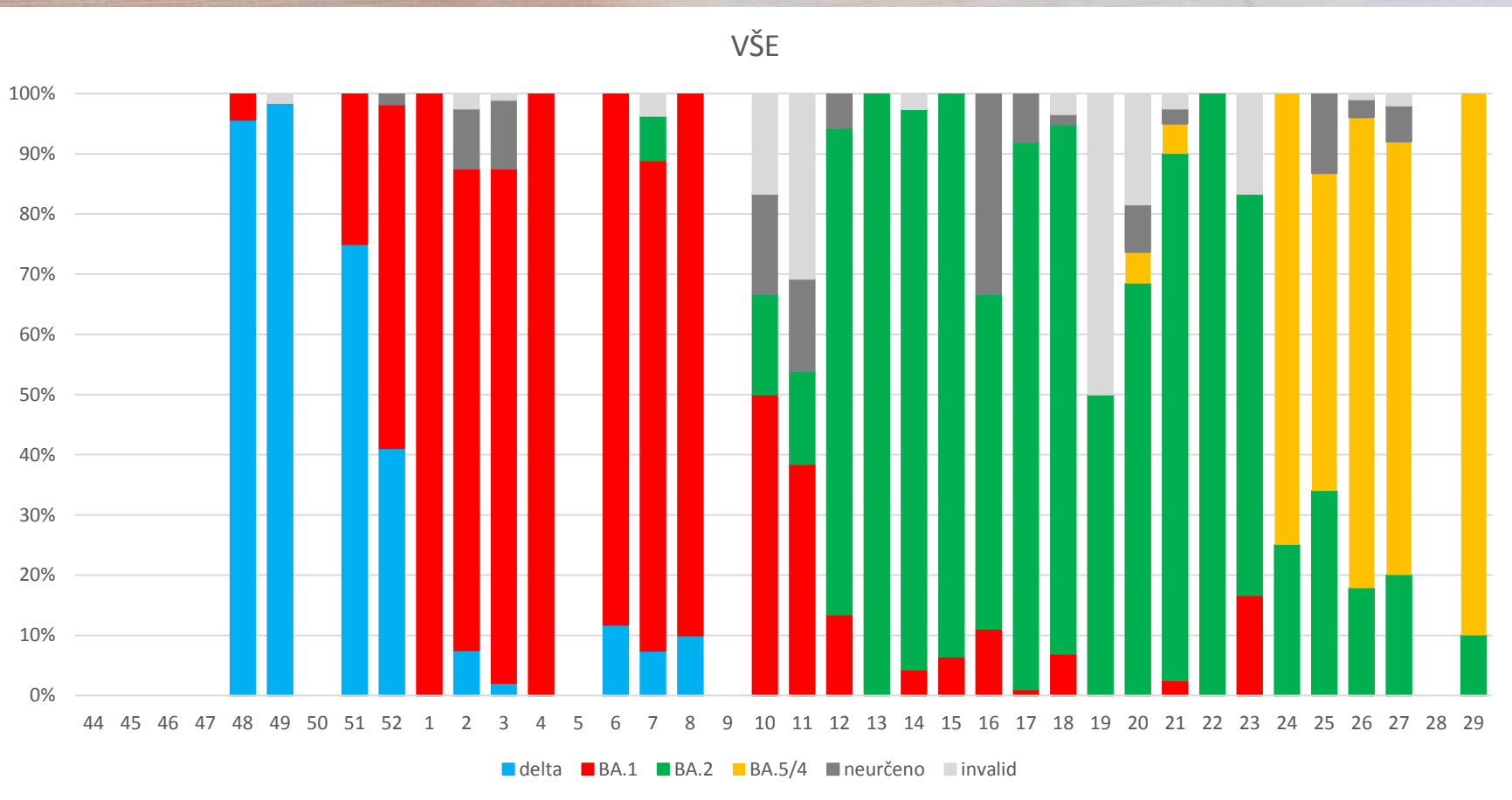
varianta	počet	první	5% ↑	50% ↑	50% ↓	5% ↓	poslední
delta	2101	-	-	-	2.týden	4.týden	3.3.2022
BA.1	1399	23.12.21	1.týden	1.týden	9.týden	15.týden	4.5.2022
BA.2	1009	13.1.22	6.týden	9.týden	-	-	-
BA.5/4	1	6.6.22	-	-	-	-	-

ÚSTÍ; celkem 2 603



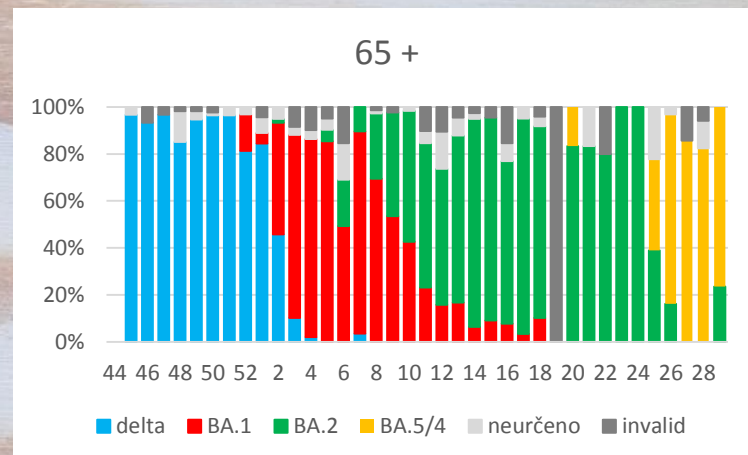
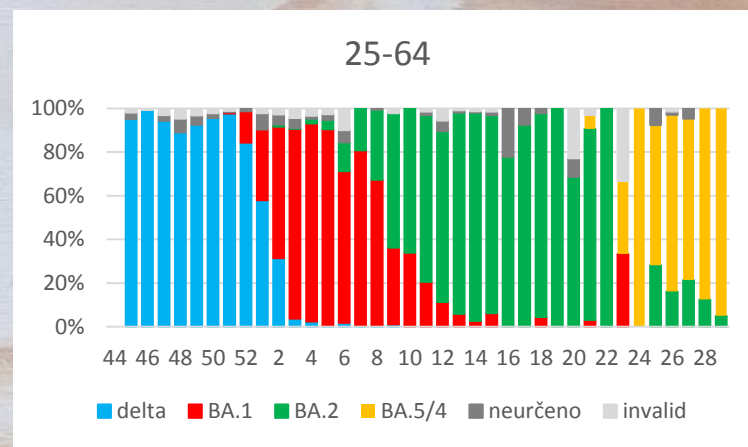
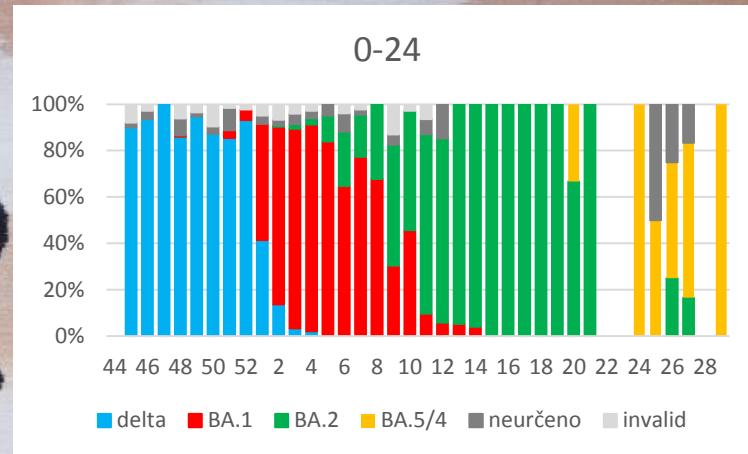
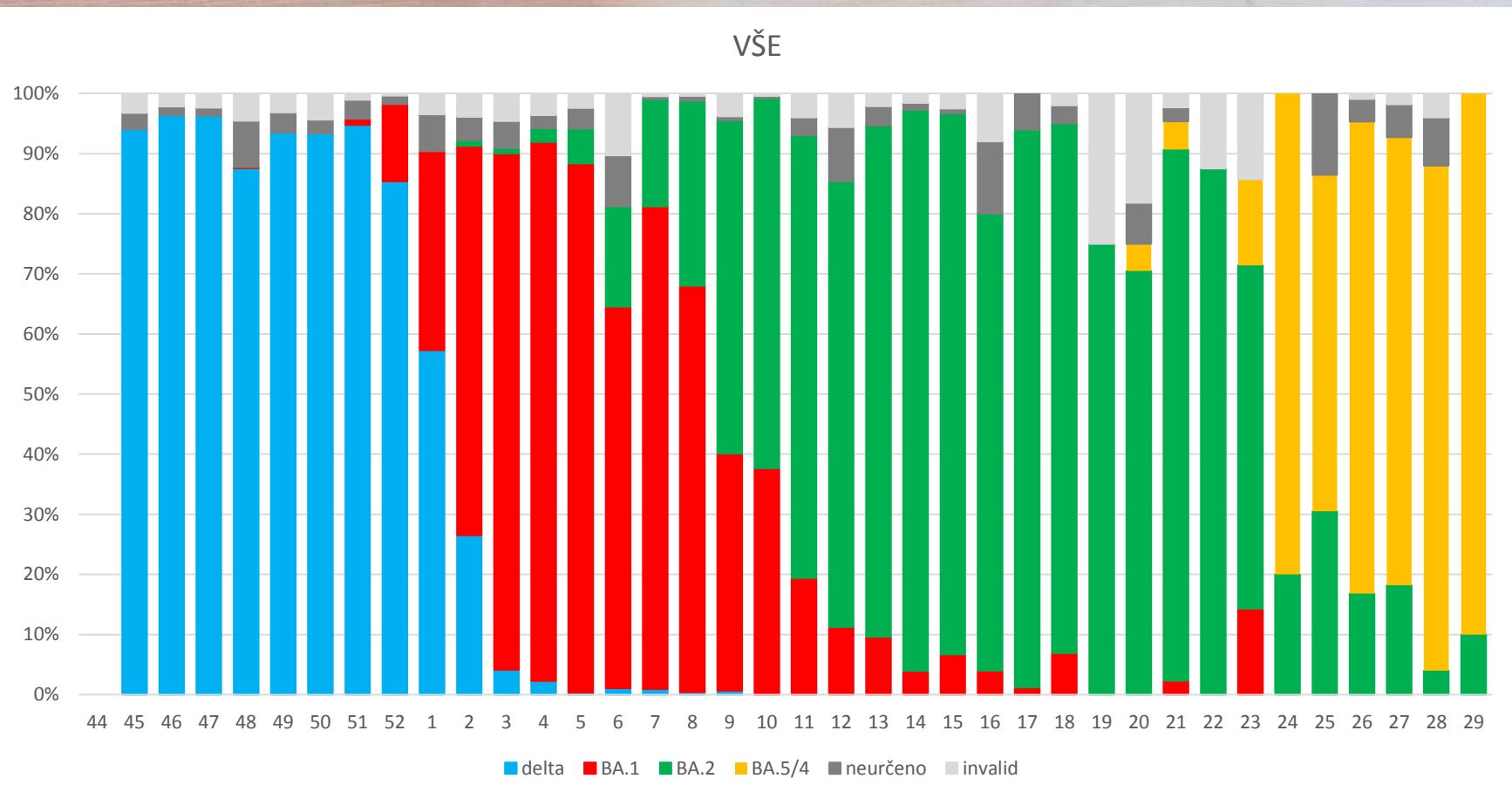
varianta	počet	první	5% ↑	50% ↑	50% ↓	5% ↓	poslední
delta	692	-	-	-	2.týden	3.týden	30.1.2022
BA.1	1316	3.1.22	1.týden	2.týden	9.týden	14.týden	2.5.2022
BA.2	168	15.1.22	5.týden	9.týden	20.týden	-	14.7.2022
BA.5/4	37	14.6.22	24.týden	24.týden	-	-	-

PRAHA; celkem 1 101



varianta	počet	první	5% ↑	50% ↑	50% ↓	5% ↓	poslední
delta	100	-	-	-	52.týden	9.týden	14.2.2022
BA.1	235	26.11.22	48.týden	52.týden	10.týden	19.týden	30.5.2022
BA.2	464	9.2.22	7.týden	12.týden	24.týden	-	-
BA.5/4	205	11.5.22	20.týden	24.týden	-	-	-

VŠE; celkem 8 317



varianta	počet	první	5% ↑	50% ↑	50% ↓	5% ↓	poslední
delta	2893	-	-	-	2.týden	3.týden	3.3.2022
BA.1	2950	26.11.22	52.týden	2.týden	9.týden	19.týden	30.5.2022
BA.2	1641	13.1.22	5.týden	9.týden	24.týden	28.týden	-
BA.5/4	243	11.5.22	23.týden	24.týden	-	-	-

MASS ARRAY

Souhrn:

- Byly úspěšně **instalovány 3 systémy Mass Array** (ZÚ Ostrava, ZÚ Ústí nad Labem, SZÚ Praha) a verifikován **standardní operační postup** pro analýzu variant SARS-CoV-2 v klinickém materiálu.
- Bylo dosaženo **celkové vyšetřovací kapacity až 1500 vzorků týdně**. NRL v době řešení grantu nemůže zajistit souběžné vysocekapacitní testování metodou WGS i metodou MASS ARRAY. NRL v období od 1. 4. 2022 do 1. 9. 2022 osekvenovala (WGS) či zajistila celogenomovou sekvenaci 2 334 vzorků SARS-CoV-2 pozitivních. Pro zvýšení kapacity je třeba dalšího posílení personálu a vyšší míry digitalizace při příjmu vzorků a v rámci laboratorního workflow.
- Bylo **provedeno celkem 9 659 reakcí a získáno celkem 8 275 validních výsledků**, které pokrývaly **šíření jednotlivých variant SARS-CoV-2 v ČR v období 11/2021 – 7/2022 ve třech odlišných lokalitách** (Ostrava, Ústí nad Labem, Praha). Nižší počet analyzovaných vzorků byl důsledkem technických problémů v Ústí nad Labem (dodávka nefunkčního modulu) a v Praze (výpadek CFX 96 a jeho náhrada za nevyhovující T100 cykler od stejného výrobce).

MASS ARRAY

Závěr

Systém MassArray má **potenciál** k posílení kapacity systému rychlé detekce variant SARS-CoV-2 monitorováním velkého souboru mutací ve Spike genu. **Minimalizuje požadavky na bioinformatickou analýzu a snižuje náklady ve srovnání s WGS** a **zvyšuje přesnost a flexibilitu určování cirkulujících variant ve srovnání s omezenými možnostmi diskriminační PCR**. Nevýhodou technologie se po nástupu varianty omikron ukázala **nedostatečná aktualizace primerů pro detekci nových SNP a stejně tak i software pro vyhodnocení**. Pro zachování plné funkčnosti v rutinním provozu vyžaduje technologie kontinuální aktualizaci primerů pro detekci nových SNP, stejným způsobem, jako dochází k aktualizaci primerů u výrobců WGS kitů. Výrobce nabízí bezplatnou aplikaci pro design primerů a organizuje pravidelná školení. Příprava in house primerů může kompenzovat tento nedostatek. Zpoždění v aktualizaci software naopak není závažné, pro vyhodnocení lze použít algoritmus, který NRL používá při vyhodnocení dat shromažďovaných v ÚZIS z výsledků diskriminačních PCR prováděných v ČR .

MASS ARRAY

Reference:

1. Hernandez MM, Banu R, Shrestha P, Patel A, Chen F, Cao L, Fabre S, Tan J, Lopez H, Chiu N, Shifrin B, Zapolskaya I, Flores V, Lee PY, Castañeda S, Ramírez JD, Jhang J, Osorio G, Gitman MR, Nowak MD, Reich DL, Cordon-Cardo C, Sordillo EM, Paniz-Mondolfi AE. RT-PCR/MALDI-TOF mass spectrometry-based detection of SARS-CoV-2 in saliva specimens. *J Med Virol*. 2021 Sep;93(9):5481-5486. doi: 10.1002/jmv.27069. Epub 2021 May 19. PMID: 33963565; PMCID: PMC8242556.
2. Matthew M. Hernandez, Radhika Banu, Ana S. Gonzalez-Reiche, Brandon Gray, Paras Shrestha, Liyong Cao, Feng Chen, Huanzhi Shi, Ayman Hanna, Juan David Ramírez, Adriana van de Guchte, Robert Sebra, Melissa R. Gitman, Michael D. Nowak, Carlos Cordon-Cardo, Ted E. Schutzbank, Viviana Simon, Harm van Bakel, Emilia Mia Sordillo, Alberto E. Paniz-Mondolfi, RT-PCR/MALDI-TOF Diagnostic Target Performance Reflects Circulating SARS-CoV-2 Variant Diversity in New York City, *The Journal of Molecular Diagnostics*, Volume 24, Issue 7, 2022, Pages 738-749, ISSN 1525-1578, doi.org/10.1016/j.jmoldx.2022.04.003.
3. Hernandez MM, Banu R, Gonzalez-Reiche AS, van de Guchte A, Khan Z, Shrestha P, Cao L, Chen F, Shi H, Hanna A, Alshammary H, Fabre S, Amoako A, Obla A, Albuquerque B, Patiño LH, Ramírez JD, Sebra R, Gitman MR, Nowak MD, Cordon-Cardo C, Schutzbank TE, Simon V, van Bakel H, Sordillo EM, Paniz-Mondolfi AE. Robust clinical detection of SARS-CoV-2 variants by RT-PCR/MALDI-TOF multitarget approach. *J Med Virol*. 2022 Apr;94(4):1606-1616. doi: 10.1002/jmv.27510. Epub 2021 Dec 16. PMID: 34877674; PMCID: PMC8854350.

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.

MASS AIRRAY

děkuji za pozornost

Mrázek J.¹, Mikešová R.², Večeřová, J.³, Jiřincová H.³

¹ Zdravotní ústav se sídlem v Ostrava

² Zdravotní ústav se sídlem v Ústí na Labem

³ Státní zdravotní ústav, Praha