

VYUŽITÍ CELOGENOMOVÉ, PARCIÁLNÍ SEKVENACE A DISKRIMINAČNÍ PCR PŘI SLEDOVÁNÍ VARIANT VIRU SARS-COV-2

Celogenomová sekvenace je důležitá pro sledování změn viru SARS-COV-2 v čase.

Celogenomová sekvenace nám umožňuje sledovat změny v genomu (záměny nukleotidů). Ty vedou ke změně složení aminokyselin a tím může dojít k ovlivnění struktury a tedy i vlastností proteinu. V tomto případě je sledován komplex všech změn v genomu viru, není zacíleno pouze na gen kódující bílkoviny tvořící vlastní virovou částici, např. spike protein, ale jsou zjištěny i změny v proteinech, které jsou klíčové pro regulaci životního cyklu viru. Některé změny mohou být významné a pak vést ke snížení účinnosti ochranných protilátek (například v spike proteinu záměna aminokyselin E484K, tedy záměna glutaminu za lyzin, nebo L452R, tedy záměna leucinu za arginin) nebo zlepšit schopnosti šíření viru v populaci nebo v těle infikovaného člověka (např. N501Y, tedy záměna kyseliny asparagové za tyrosin).

Výsledkem celogenomové sekvenace je „přečtení celého genomu viru“. Genom viru obsahuje přibližně 30 000 párů bazí (pb).

Celý proces zpracování vzorku od příjmu k nám do NRL až po získání výsledku přiřazeného k pacientovi trvá 20 - 30 dní (viz schéma). K této době přispívá to, že jsou vzorky do NRL svázeny, zpracovávají v počtu po 94 a předávány do dalších sekvenačních center a jen menší část je sekvenována v NRL (94 vzorků, pod bodem 3 ve schématu), 18 až 36 vzorků je ve zrychleném režimu (6 – 10 dnů, pod bodem 4 ve schématu) sekvenována ve spolupráci s SVU. Pro celý proces je třeba těchto kroků:

1. Izolace RNA
2. Příprava cDNA (přepis genetické informace viru, tedy RNA na jednoláčkovou DNA)
3. Příprava tzv. knihovny
 - namnožení (amplifikace) krátkých úseků (75 – 150 párů bazí), pro technologie sekvenace na biočipu mají tyto úseky délku 1 500 nebo 2 000 pb
 - přisyntetizování (v jednom nebo ve třech krocích) molekul identifikujících vzorek
 - přečištění na magnetických kuličkách po každém výše zmíněném kroku
 - kontrola koncentrace a kvality získané reakční směsi (dle protokolu jedno nebo až po každém kroku)
4. Vlastní sekvenace v sekvenátoru, případně na biočipu (cca 24 – 30 hodin)
5. Vyhodnocení sekvenace (zahrnuje 5 kroků, pro 94 vzorků jeden až 2 pracovní dny dle kvality získané sekvence)

Pro každou sekvenaci je třeba alespoň 94 vzorů, sekvenace menšího počtu vzorků na sekvenátoru vede k dramatickému navýšení nákladů, náklady jsou stejné pro jeden i 94 vzorků) a v důsledku přesekvenování může vést k nevalidním či nepublikovatelným (v GISAID) výsledkům.

Sekvenace v NRL trvá 2 týdny, manuální příprava knihovny je rozdělena na 3 skupiny po 32 vzorcích, každá skupina trvá 2 pracovní dny, tedy celkem 6 pracovních dnů. Následuje 30 hodin strojového času v sekvenátoru a nejméně dva dny pro vyhodnocení a administraci výsledků.

Ke dni 7. 6. 2021 je v databázi GISAID nahráno téměř 1,9mil sekvenací, za ČR je ke stejnému datu do této databáze vloženo 4 089 celogenomových sekvencí., přičemž NRL vložila do této databáze 2 780 sekvencí.

Parciální sekvenace umožňuje číst relativně krátké úseky viru, většinou 800 pb dlouhé, maximální počet vzorků v jedné sekvenaci bývá většinou 16. V tomto případě se sekvenují jen vybrané úseky spike

proteinu, který je určující pro vazbu ochranných protilátek (tzv. virus neutralizačních protilátek) a pro vazbu na buněčný receptor, tedy zásadně ovlivňuje schopnost viru šířit se in vivo a in vitro.

Spike protein je tvořen řetězcem 1 274 aminokyselin, a v něm sledujeme především úseky ovlivňující schopnost šířit se a unikat před protilátkami. To je „RBD“ – doména, kterou se virus váže na receptor a která je zásadní pro vazbu ochranných virus neutralizačních protilátek a N-terminální doménu (NTD), která představuje cíl 10 – 20% virus neutralizačních protilátek. Gen pro spike protein je necelých 3900 pb dlouhý.

Metoda parciální sekvenace spočívá v namnožení, amplifikaci 2 až 3 oblastí genu pro spike protein, které cílí do RBD a NTD. S vysokou mírou přesnosti pak umíme přečíst tyto důležité oblasti spike genu a poměrně přesně určit variantu viru. Nicméně, pro přesné určení varianty a jejích vlastností je třeba znát i změny v dalších částech genomu SARS-CoV-2.

Parciální sekvenace zahrnuje tyto kroky:

1. Izolace RNA
2. Příprava cDNA (přepis genetické informace viru, tedy RNA na jednovláčkovou DNA)
3. Příprava namnožených úseků cca 800 pb dlouhých (mohou být i delší, ale technologie je méně běžná ve virologických laboratořích)
4. přečištění na magnetických kuličkách kontrola koncentrace a kvality získané reakční směsi
5. Vlastní sekvenace na kapiláře
6. Vyhodnocení sekvenace

Celý tento proces trvá 3 až 5 pracovních dnů, v jednom vzorku čteme nejméně 3 úseky, v případě velikosti šarže 16 vzorků je v jednom sekvenačním běhu zařazeno 5 vzorků.

V NRL neprovádíme parciální sekvenaci, ale na několika pracovištích je v rámci sledování variant tato metoda prováděna (např. FN Moto, SVU Jihlava, FN Hradec Králové). Vede k přesnějším výsledkům než diskriminační PCR. Na rozdíl od diskriminační PCR umožní odhalit i neznámé mutace/varianty, je pomalejší než diskriminační PCR, ale je rychlejší, levnější a dostupnější než celogenomová sekvenace, je určitě vhodným doplněním všech metod.

Diskriminační PCR je oproti sekvenaci rychlá, cenově dostupná a pro hlášení epidemiologům velmi efektivní metoda. Umožňuje sledovat pouze známé mutace, které jsou v popředí zájmu (musí existovat komerčně dostupná diagnostická sada) a okamžitě reagovat. Většinou je založena na přítomnosti tzv. diskriminační sondy, která umožní detekovat pouze alelu obsahující mutaci. V některých případech je sonda navržena tak, že divoká a mutovaná alela vykazují pozitivní signál, rozlišení spočívá v analýze teploty tání. V jedné PCR multiplex reakci je možno sledovat 3 – 4 mutace. Výsledky jsou dostupné v řádu hodin až dne. Záleží na tom, jaké kombinace mutací aktuálně sledujeme, jak je laboratoř vybavena. V tomto případě je virus většinou o něco rychlejší, než výrobci PCR souprav. Nejdříve je třeba zjistit, že ta která mutace se objevuje ve více variantách nezávisle na sobě, nebo se objevuje v nové alertní variantě. Výroba těchto komerčních souprav vyžaduje vysokou míru specializace, dostatek pozitivních kontrolních materiálů, je třeba ověřit její funkčnost (validaci) a dokonce ne všechny mutace lze zařadit do jedné multiplexní reakce. V případě kombinace mutace lze na některou variantu usuzovat, v případě detekce jediné sledované mutace, je většinou třeba podrobnější charakterizace sekvenací. V případě sledování více mutací může být vyhodnocení diskriminační PCR interpretačně náročnější.

Ale již nález alertních mutací, znamenajících únik před protilátkami, či rychlejší šíření v populaci, umožňuje epidemiologům přistoupit rychle k nastavení adekvátních opatření vedoucích k zamezení šíření dané varianty.

Například: mutace L452R a E484K patří k escape mutacím (únik před ochrannými protilátkami). Tyto 2 mutace zatím nikdy nebyly zjištěny v jedné variantě. Nález jedné, nebo druhé z těchto mutací pak bez zjišťování dalších mutací nebo bez epidemických souvislostí nevede k vyslovení jednoznačného podezření na určitou variantu, ale je vždy významný a měl by vést k nastavení přísnějších opatření. Přehled variant obsahující mutaci L452R či E484K je uveden na obrázku 1. Všechny alertní varianty obsahují jednu či druhou z těchto mutací. Také mutace N501Y, usnadňující schopnost šíření, byla nalezena ve více variantách a kombinace mutací E484K a N501Y je také výsledkem nezávislého adaptačního vývoje viru vedoucí k vytvoření několika variant. Přehled těchto variant je uveden na obrázku 1. Mutace E484K se vyskytuje nejen v několika variantách, ale vzniká konvergentní nezávislou evolucí u již známých variant (příkladem je varianta alfa B.1.1.7 + E484K). Varianta alfa je známa i v kombinaci s mutací L452R. U několika variant byla v kombinaci s L452R zjištěna mutace S13I, která pozměňuje NTD.

Obr. 1: Přehled variant obsahující mutaci L452R, E484K, N501Y či kombinace. Kombinace L452R + S13I je recentně zjištěna a její význam není zatím zřejmý.

S:E484K

prominent in P.1 B.1.526 B.1.351 R.1 B.1.525 P.2 B.1.1.318 B.1.351.2 P.1.1 P.1.2 B.1.351.3 B.1.619

B.1.620 B.1.621 P.3 B.1.618 B.1.1.523 N.9 AV.1 B.1.177.88 R.2 AT.1 B.1.243.1 N.10 B.1.1.345

S:L452R

prominent in B.1.429 B.1.617.2 B.1.427 B.1.526.1 B.1.617.1 C.16 A.2.5 A.27 L.3 A.2.5.2 B.1.1.487 A.2.5.1 B.1.617.3 B.1.429.1 B.1.604 B.1.617

S:N501Y

prominent in B.1.1.7 P.1 B.1.351 B.1.351.2 P.1.1 B.1.623 P.1.2 B.1.351.3 AP.1 A.27 B.1.621 P.3 B.1.604 XA

S:N501Y & S:E484K

prominent in P.1 B.1.351 B.1.351.2 P.1.1 P.1.2 B.1.351.3 B.1.621 P.3

S:S13I & S:L452R

prominent in B.1.429 B.1.427 B.1.429.1

NRL standardně detekují dvěma diskriminačními PCR tyto mutace v S genu:

K417N, L452R, E484K, E484Q, N501Y a P681R,

Zvažujeme v rámci standardního vyšetření doplnit o del 69-70, T478K, H655Y, S477N, Q677H, případně P681H a N501T, tedy mutace v NTD, RBD. Či štěpném místě pro proteázy furinového typu.

V některých případech lze vyslovit jednoznačné podezření na detekci varianty, v některých případech může být počet variant omezen tak, jak je znázorněno v tabulce 1.

Tab. 1 Kombinace mutací detekovaných běžně v NRL a vyslovení podezření na detekci varianty (červeně pozitivní detekce, černě neprokázána přítomnost mutace):

Detekovaná mutace varianty (červeně pozitivní detekce, černě neprokázána přítomnost mutace)	Suspektní varianta* červeně – VOC (alertní varianta) černě bold VOI (varianta zájmu) černě VUM (sledovaná varianta)
N501Y , K417N, L452R, E484K, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7)
N501Y, E484K , K417N, L452R, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7) + E484K Suspektní gama P.1 Suspektní theta P.3 Suspektní B.1.621
N501Y, E484K, K417N , L452R, E484Q, P681R	Suspektní beta (B.1.351)
N501Y, L452R , K417N, E484K, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7) + L452R Suspektní A.27
E484K , K417N, L452R, E484Q, N501Y, P681R	Suspektní zeta P2, Suspektní iota B.1.526 Suspektní B.1.525, Suspektní B.1.620, Suspektní A.28, Suspektní AT.1, Suspektní B.1.1.318, Suspektní AV.1
L452R , K417N, E484K, E484Q, N501Y P681R	C.16, C.36 + L452R, C.37, B.1.526.1
L452R, P681R , K417N, E484K, E484Q, N501Y P681R	Suspektní delta B.617.2
L452R, E484Q, P681R , K417N, E484K, N501Y P681R	Suspektní kapa B.1.617.1 Suspektní B.1.617.3 Suspektní B.1.617

Pozn. Není-li uvedeno řecké písmeno, nebylo ještě přiřazeno WHO

* VOC – variant of concern, VOI – variant of interest, VUM – variant under monitoring (dle ECDC)

Podmínky pro příjem vzorků k sekvenaci a případně i k diskriminační PCR:

Vždy v případě:

- Importu/rizikový kontakt či podezření na import
- Selhání vakcinace (14 dnů od první dávky včetně aplikace druhé dávky)
- Reinfekce (více než 90 dnů od předchozí pozitivní PCR)
- Hospitalizace/úmrtní osob mladších 50 let
- Náhlého úmrtí
- Neobvyklých klinických příznaků či neobvyklých PCR

Ct pro sekvenaci: maximálně 30 (v závažných případech až + 2 Ct)

Ct pro diskriminační PCR – maximálně 34 (v závažných případech až + 2 Ct)

Údaje na žádance nebo kopie elektronické žádanky (bez přelepeného čarového kódu) doplněné o:

- Číslo žádanky
- Datum odběru
- Identifikační údaje (jméno, příjmení, rodné číslo, PSČ)
- Důvod vyšetření (import/rizikový kontakt), selhání vakcinace, reinfekce, hospitalizace, úmrtí, divná PCR)
- Hodnoty Ct v zasílající laboratoři

V případě selhání vakcinace je nutno uvést tyto údaje: (nebo je nutno zajistit jejich stažení z ISIN):

- Název a šarže vakcíny
- Datum první, případně druhé dávky

Podmínky uchování a transportu vzorku:

- Primární materiál, do 5 dnů od data odběru při chladničkové teplotě (+2 až +8 °C)
- Izolované RNA, do dvou dnů od izolace při chladničkové teplotě (+2 až +8 °C)
- V případě zamražení na -20 °C přijímáme primární materiály a izolované RNA do 1 měsíce od odběru či izolace.
- V případě zamražení na -60 °C a méně, přijímáme primární materiály a izolované RNA kdykoli.

Laboratoře mohou zasílat vzorky dle svého výběru či na základě vyžádání epidemiologa. V případě zasílání hromadných zásilek prosíme materiály a žádanky srovnat, např. do stojánku. Při zasílání je třeba zachovat podmínky pro transport UN3373.

Zpracovaly: 7. 6. 2021

Mgr. Jaromíra Večeřová PhD.

RNDr. Helena Jiřincová

Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění, CEM, SZÚ