

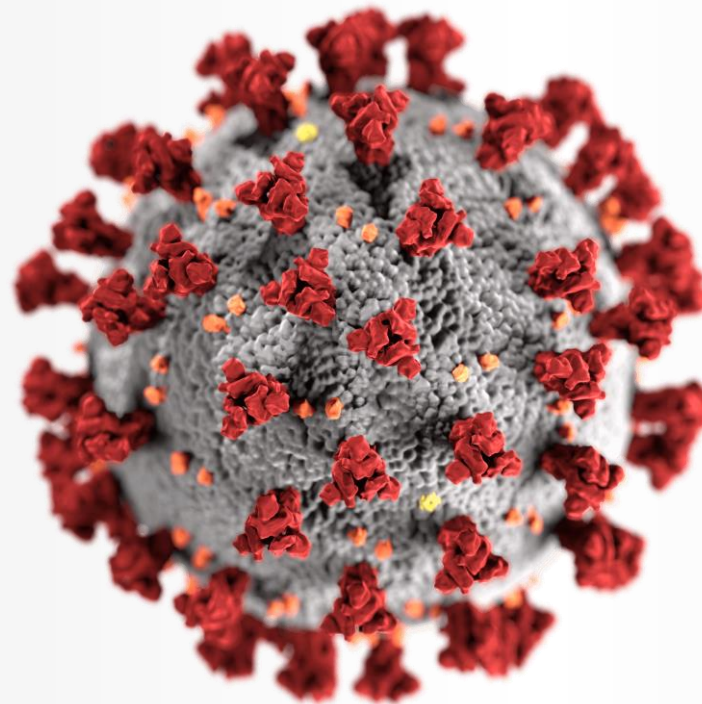
# Covid-19 och sekvensering

Martin Sundqvist, Överläkare, Med Dr

Paula Mölling, Molekylärbiolog, Docent

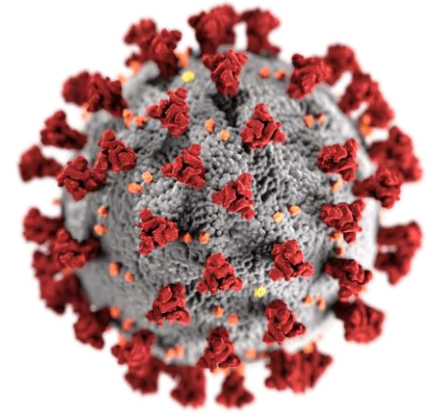
Laboratoriemedicinska kliniken, Klinisk Mikrobiologi, Universitetssjukhuset Örebro

Institutionen för medicinska vetenskaper, Örebro universitet



# SARS-CoV-2

- Tillhör Coronavirus familjen
- 7 typer kan drabba människor
  - oftast enklare förkylning
  - Men även SARS, MERS
- SARS-CoV-2
  - Orsakar Covid-19
    - Asymptomatisk infektion
    - Mild övre luftvägsinfektion
    - Allvarlig pneumoni → Sjukhus/IVA-vård
    - Hyperinflammation → Sjukhus/IVA-vård
    - Död





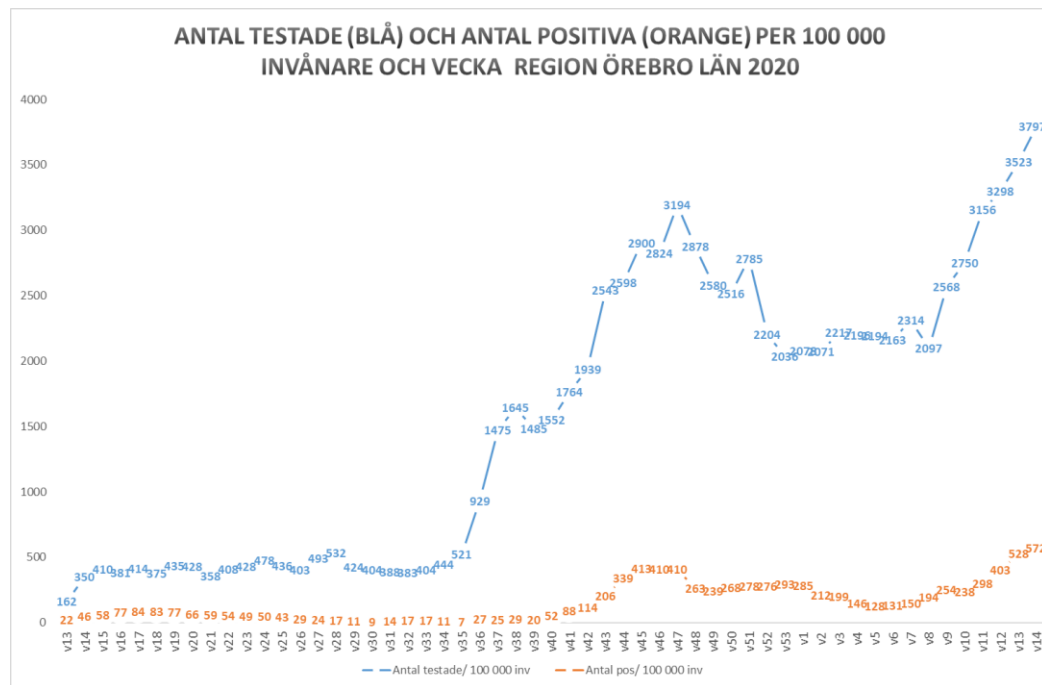
# SARS-CoV-2 pandemi

- December (sannolikt tidigare) 2019 Kina, Wuhan
- Sprids vidare till närliggande områden
- Mitten av feb ökade antal fall i Iran o Italien
  - Sprids till övriga Europa och USA
- Spridning till alla kontinenter
  - Klassas som Pandemi av WHO 11 mars 2020
  - 1 okt 2020: 34 miljoner sjukdomsfall, >1 miljon avlidna
  - 17 april 2021: >140 miljoner sjukdomsfall, >3 miljoner avlidna



# Provtagning för aktuell covid-19 i Sverige

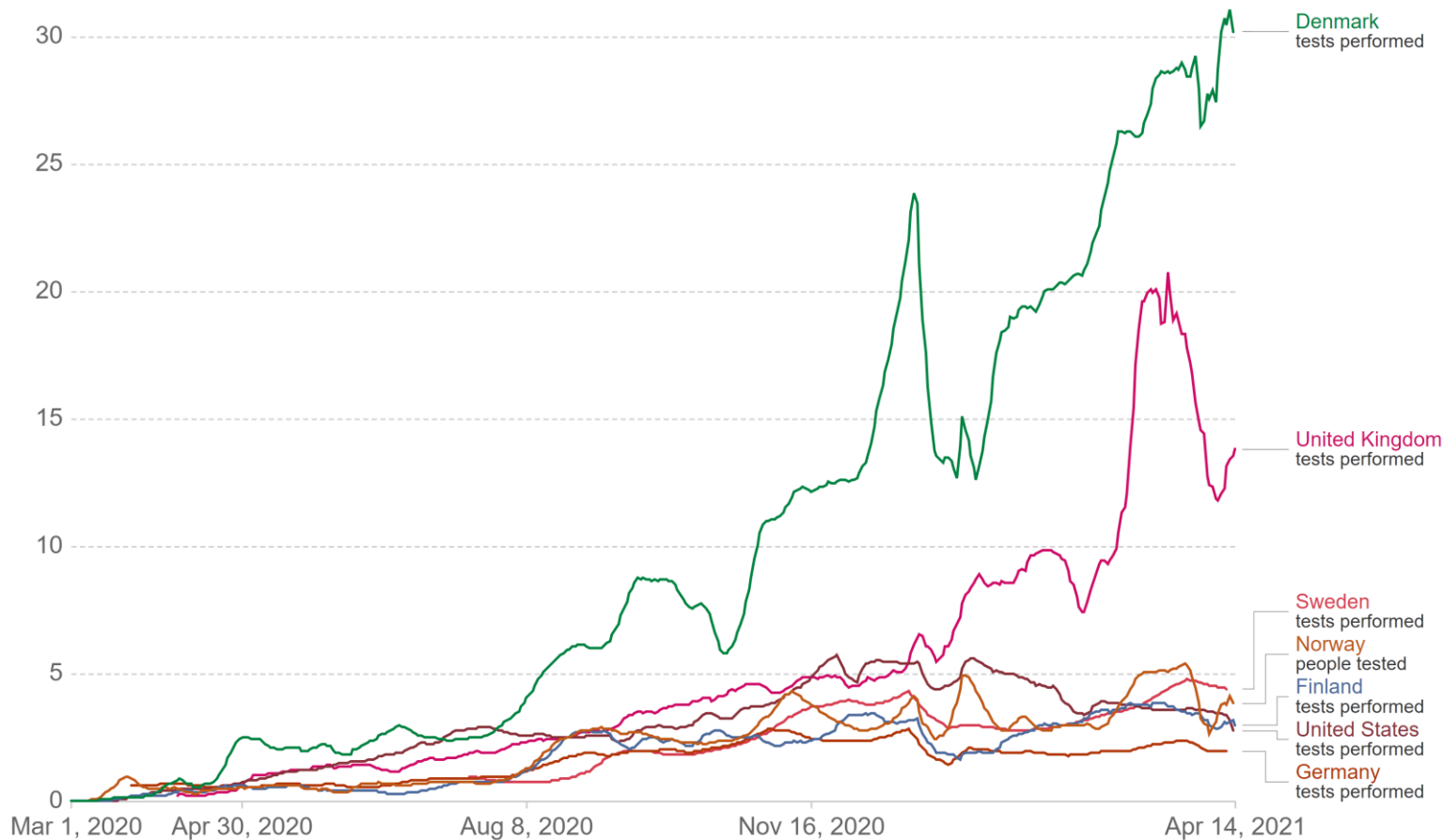
- Februari-juni 2020
  - ffa provtagning av de med symtom som sökte vård + vårdpersonal
- Från juni 2020
  - i de flesta regioner i princip öppen provtagning av alla med symtom på covid-19
- Från november 2020
  - varierande grad av provtagning även av asymtomatiska (som del av smittspårning och antigen tester i vissa regioner)
- I RÖL >260 000 PCR prover tagits
  - ca 10 000-11 000 tester/vecka



~18% positiva  
(allmänheten)



## Daily new COVID-19 tests per 1,000 people



Source: Official data collated by Our World in Data

CC BY



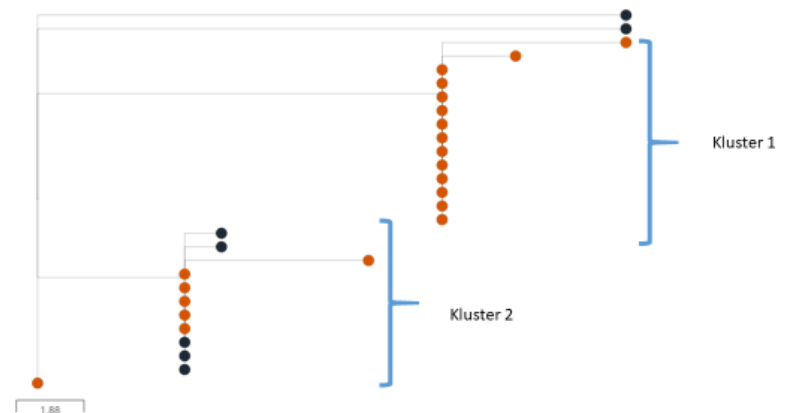


# Antigen-tester

- Provtagning
  - NPH
  - Näsa
  - Saliv
- Analys av vårdpersonal
- Känslighet
  - Om prov taget inom 5 dagar från symtomdebut >90%
  - Höga virusnivåer >95%
  - NPH>Näsa>saliv
- Självtester
  - Prov från näsa eller saliv
  - Nästan lika hög känslighet som personaltagna NPH-tester (antigen)
- Positiva prov bör följas upp med PCR för verifiering och ev typning
- Negativ test utesluter inte covid-19 vid symtom

# Sekvensering av SARS-CoV-2, Varför?

- Övervakning (inklusive utlandsresa)
  - Förändrad epidemiologi
  - Mutationer → aa-förändringar → förändrade egenskaper
    - infektivitet
    - replikation
    - Undvika immunförsvaret (även vaccin)
- Vaccinövervakning
- Utbrottstypning







# Folkhälsomyndighetens nationella övervakning

- minst 10% av alla positiva SARS-CoV-2 ska sekvenseras per region
- Eurofins sekvenserar fr.o.m vecka 4 ca 100-300 prover per vecka från Region Örebro län.
- Region Örebro Län sekvenserar fr.o.m vecka 9 för ca 20-40 prover per vecka
  - Utbrott
  - Vaccingenombrott
  - Inneliggande patienter
- Alla resultat ska rapporteras till SMINET, GENSAM och GISAID

# Sekvensering av SARS-CoV-2

## Plattformer

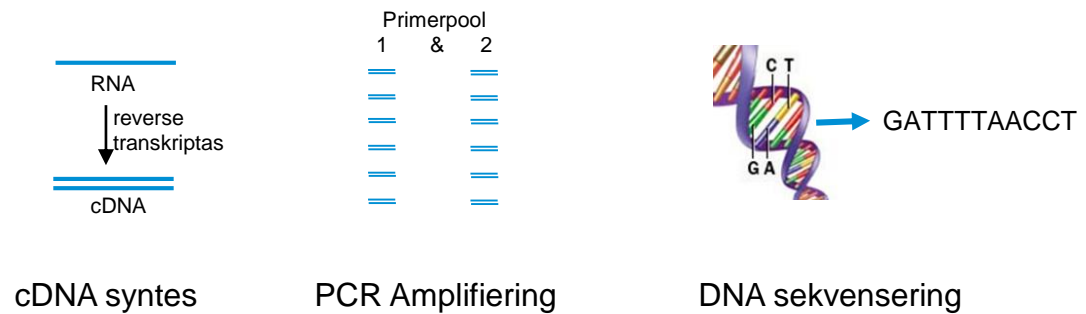
- Short-read
  - Illumina
  - Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific)
- Long-read
  - Nanopore (Oxford Nanopore Technologies)



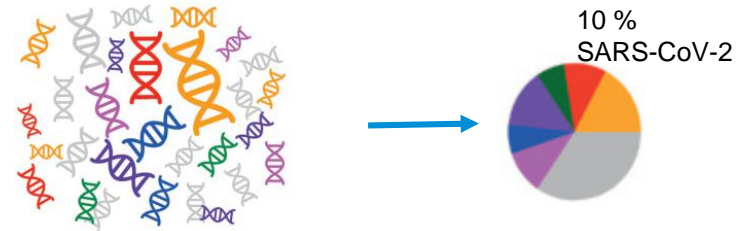
# Sekvensering av SARS-CoV-2

## Tekniker

- Riktad SARS-CoV-2 sekvensering  
– amplicon baserad (ARTIC protocol)

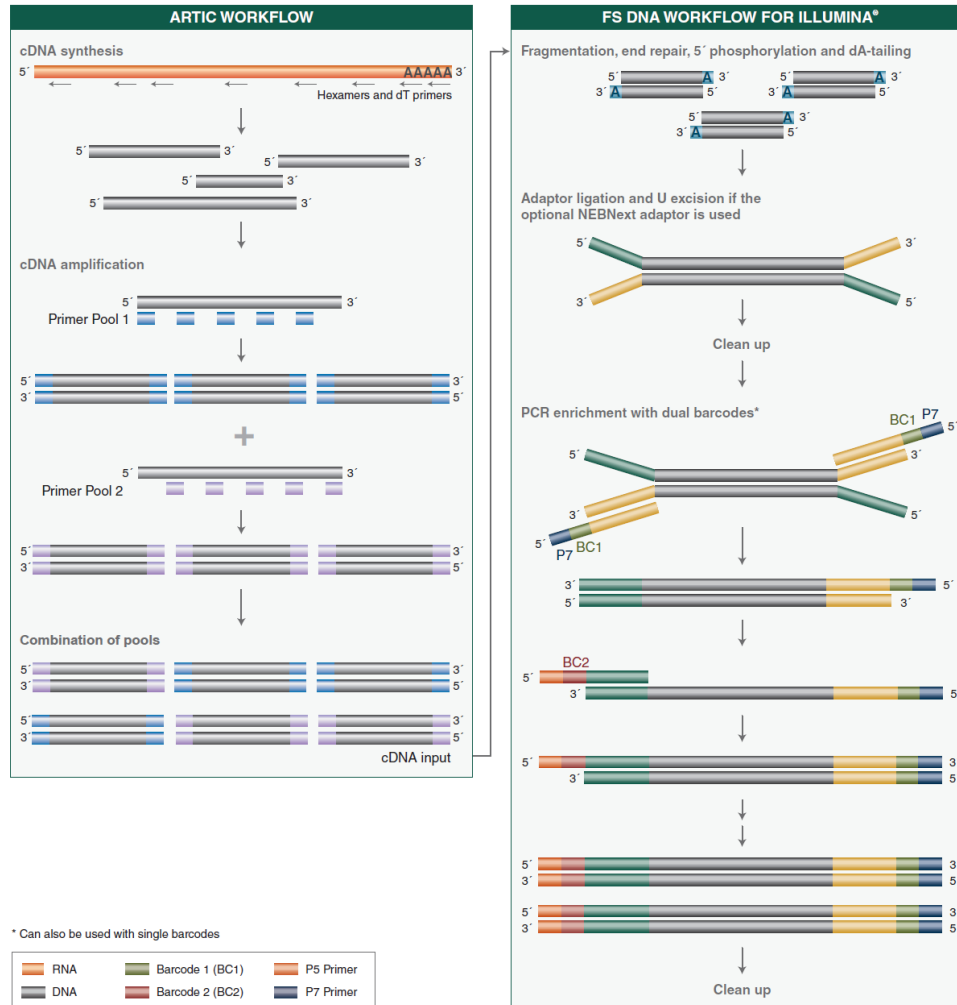


- Metagenomik sekvensering  
– allt sekvenseras i provet (humant, bakterier, virus etc)



# SARS-CoV-2 sekvensering i Region Örebro Län

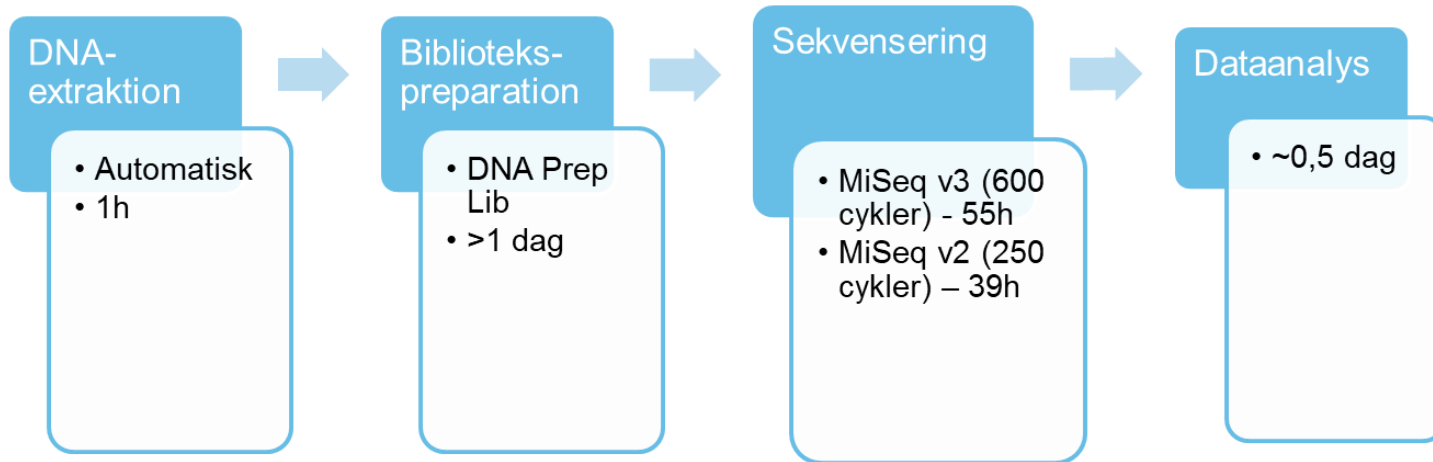
SARS-CoV-2 ARTIC V3 + Library Prep Kit (illumina)



Sekvensering idag  
 - MiSeq (Illumina)



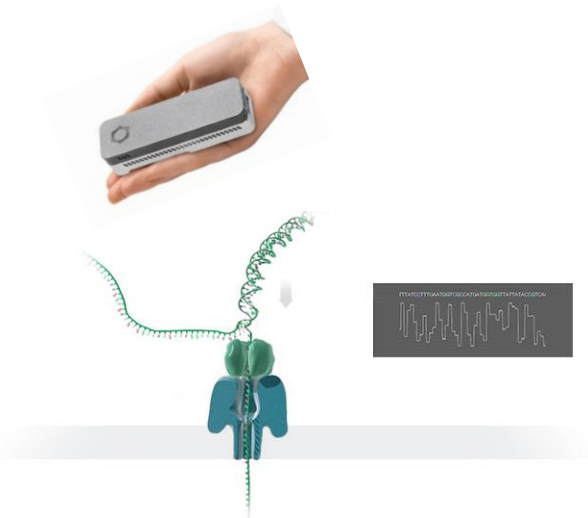
# Hur lång tid tar det?



*~10 bakteriegenom + ~30 SARS-CoV-2 genom per vecka tar ca 4-5 dgr*

# SARS-CoV-2 sekvensering med Nanopore

MinION  
Ion Realtime Sequencing  
(Oxford Nanopore Technologies)



<https://nanoporetech.com/how-it-works>

- ARTIC protokoll



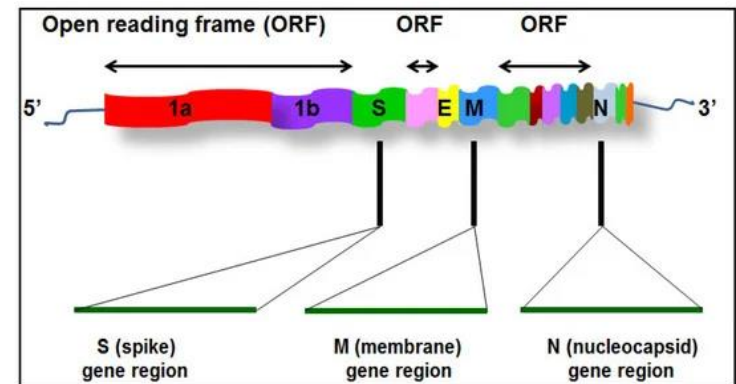
**8 hr**

RNA to  
answer

*OBS! 8 h för ett prov  
1,5-2 dygn för 24-48/240 prov*

# Vad gör vi med alla SARS-CoV-2 sekvenserna?

- Letar mutationer och typer i ORF 1-10, ~29,903 bp genom
  - NextStrain clade (grov uppdelning)
  - Pangolin lineage (något finare uppdelning)



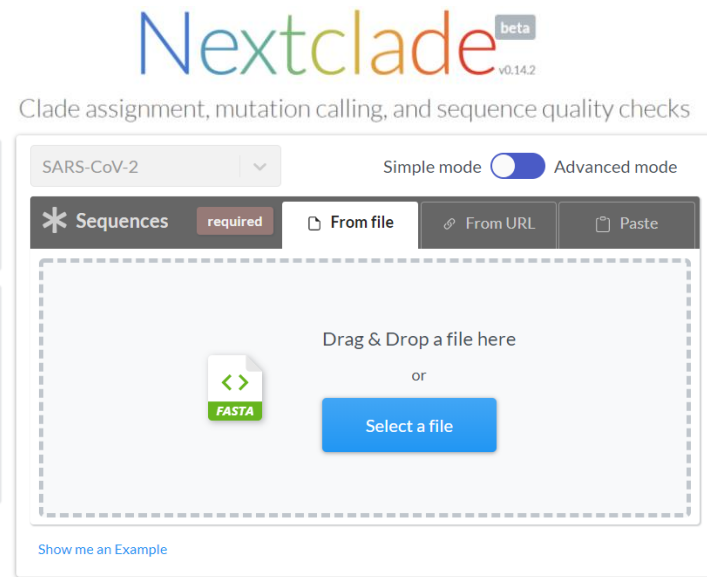
- Delar data med andra
  - Nationellt: Folkhälsomyndigheten via GENSAM, GMS
  - Internationellt: GISAID



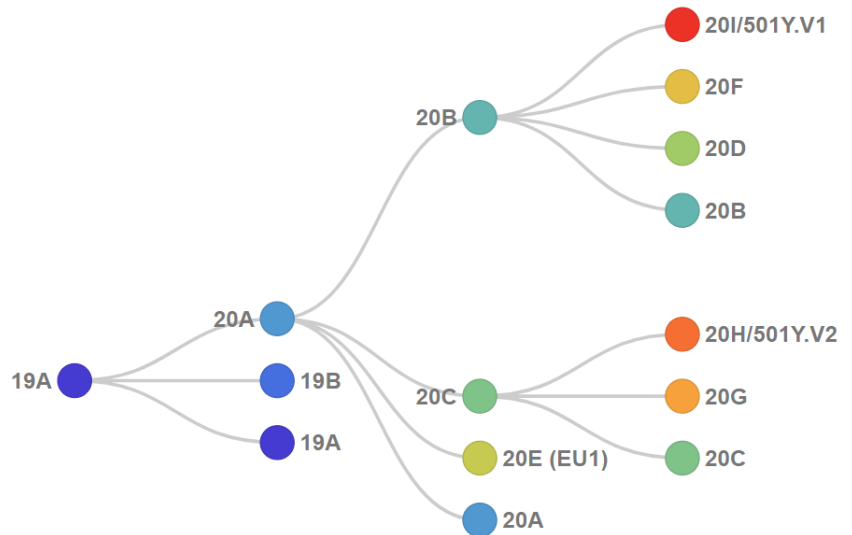


# NextStrain clade

- <https://clades.nextstrain.org/>

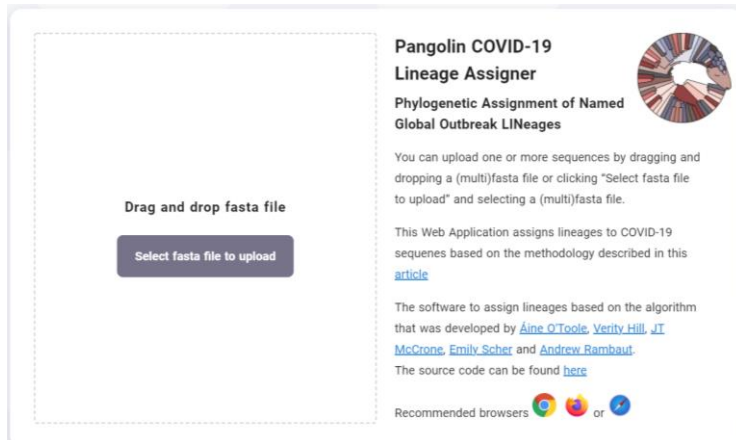


- Nomenklatur av s.k. clades:  
19A, 20A, 20 B etc



# Pangolin lineage

- <https://pangolin.cog-uk.io/>






**Pangolin COVID-19 Lineage Assigner**  
Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages

You can upload one or more sequences by dragging and dropping a (multi)fasta file or clicking "Select fasta file to upload" and selecting a (multi)fasta file.

This Web Application assigns lineages to COVID-19 sequences based on the methodology described in this [article](#)

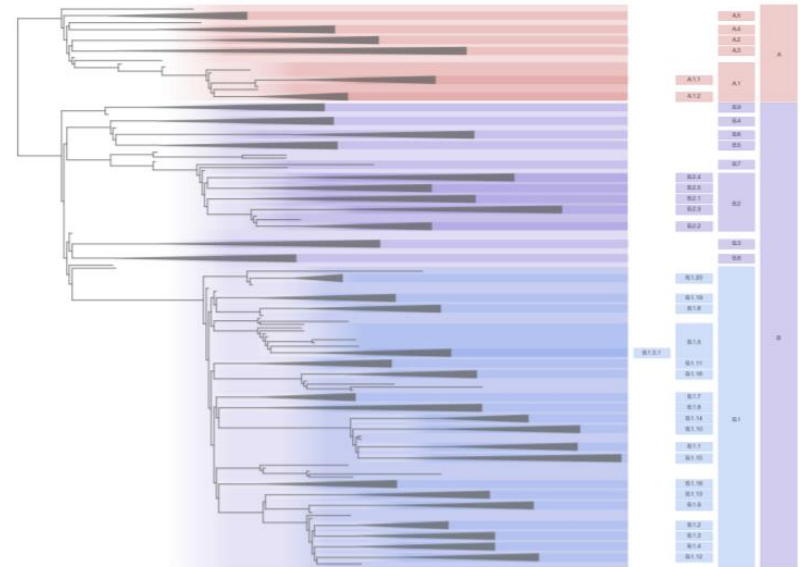
The software to assign lineages based on the algorithm that was developed by [Aine O'Toole](#), [Verity Hill](#), [JT McCrone](#), [Emily Scher](#) and [Andrew Rambaut](#). The source code can be found [here](#)

Recommended browsers   or 

Drag and drop fasta file

Select fasta file to upload

- lineage B, B1, B.1.1.7 osv



- *alt. automatiskt via SeqSphere*

# VOC - variants of concern

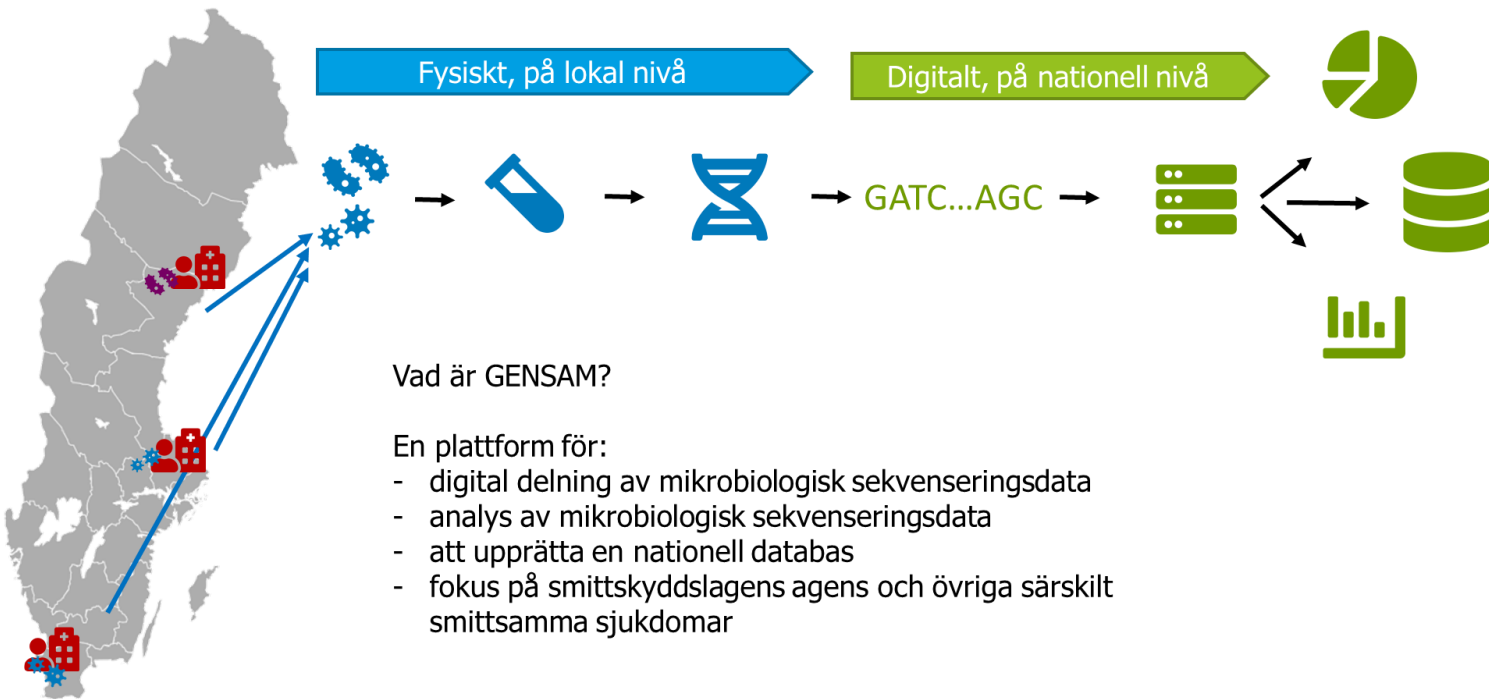
- *Hittills* finns tre VOC´s som “övervakas” världen över (Pangolin / NextClade):

B.1.1.7 lineage / 20I/501Y.V1 - England

B.1.351 lineage / 20H/501Y.V2 - Sydafrika

P.1 lineage / 20J/501Y.V3 - Brasilien

# GENSAM - Gemensam nationell hantering av sekvenseringsdata inom klinisk mikrobiologi



Vad är GENSAM?

En plattform för:

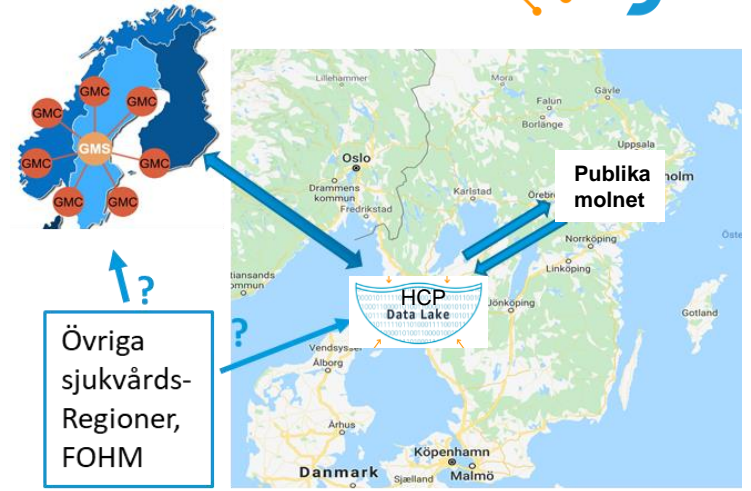
- digital delning av mikrobiologisk sekvenseringsdata
- analys av mikrobiologisk sekvenseringsdata
- att upprätta en nationell databas
- fokus på smittskyddslagens agens och övriga särskilt smittsamma sjukdomar

*GENSAM projektet har nu fokus på SARS-CoV-2*

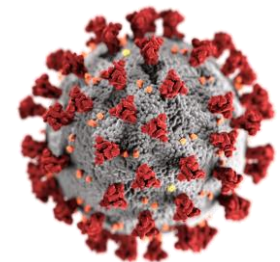
# Genomic Medicine Sweden (GMS) - Mikrobiologi

Gemensamma nationella riktlinjer för sekvensering och möjlighet till datadelning i real-tid för att:

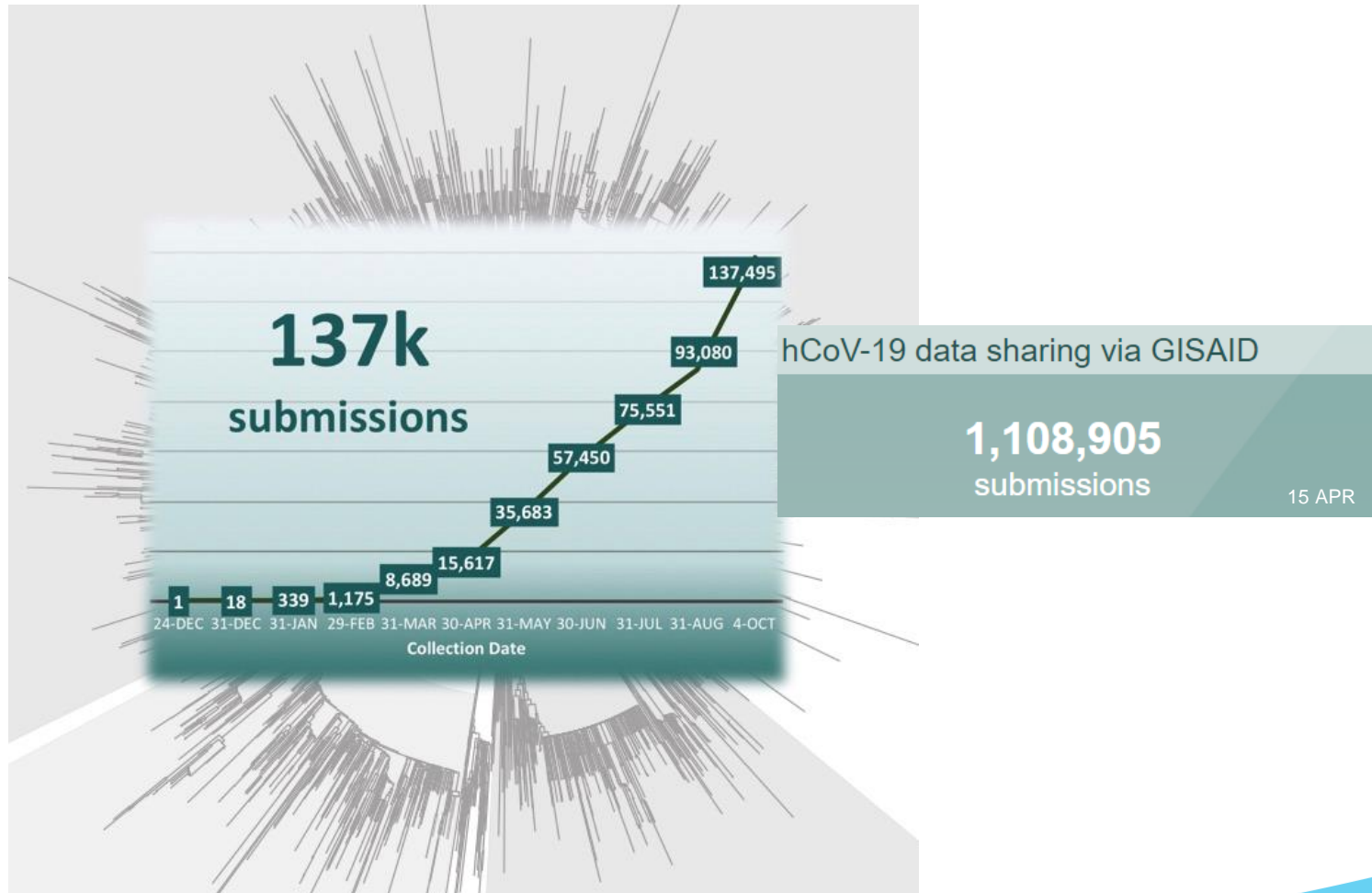
- minska smittspridning
- övervaka antibiotikaresistens
- upptäcka infektioner av okänt ursprung
- spåra och förstå Covid-19
  - SARS-CoV-2 är nu prioritet och används för att snabba på hela uppbyggnaden av GMS infrastrukturen för att dela data och analysresultat mellan alla regioner!



HCP, Hitachi Content Platform



# GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) – delar data från hela världen i realtid





# Men vad ska vi leta efter då?

- VOC
- Problem mutationer som förändrar viruset så att vi behöver justera samhällets/vårdens åtgärder
- Men listan ändras hela tiden så viktigt med internationell och nationell samordning
  - WHO
  - ECDC
  - FoHM
- Problematiska mutationer riskerar att uppkomma i alla miljöer där viruset sprids och med allt ökande immunitetsgrad så selekteras de som fortsatt kan spridas

Listan hämtad från ECDCs övervakning

Total number of genotyped viruses for the reporting week
Number of cases with B.1.1.7+E484K variant of concern (mutations: del 69-70, del 144, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) for the reporting week
Number of B.1.351 variant cases (defined by mutations: D80A, D215G, E484K, N501Y, A701V) for the reporting week
Number of Denmark cluster 5 cases associated with mink (defined by mutations: del 69-70, Y453F, I692V, M1229I).
Number of P.1 variant (mutations: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, V1176F)
Number of cases with E484K (detected via a PCR-based assay specific for E484K) for the reporting week
Number of cases with N501Y (detected via a PCR-based assay specific for N501Y) for the reporting week
Number of cases with ORF1a deletion (del 3675-3677) for the reporting week
Number of variant virus cases with deletion in S-gene (defined by mutation: del 69-70 or by negative S-gene RT-PCR) not associated with the UK variant.
Number of cases with the B.1.1.7 variant of concern (defined by mutations: del 69-70, del 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) for the reporting week
Number of cases with Y453F associated with farmed minks (defined by mutation: Y453F).



# Vad letar vi särskilt just nu?

- B.1.1.7 + E484K
- B.1.351 (Sydafrika)
- P.1 (Brasilien)
- Den nya varianten i Indien (B.1.167)?
- Fler?





# Sverige (urval) vs Europa i GISAID

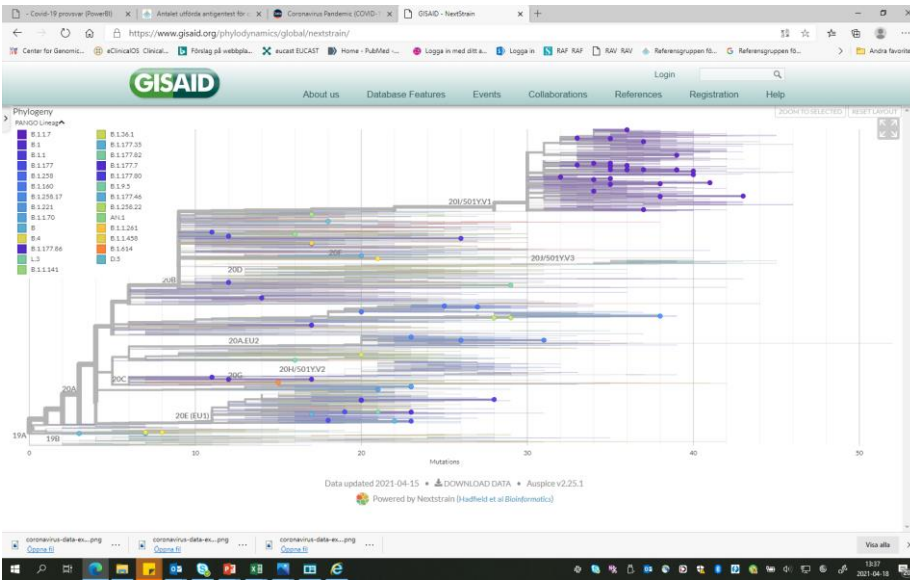


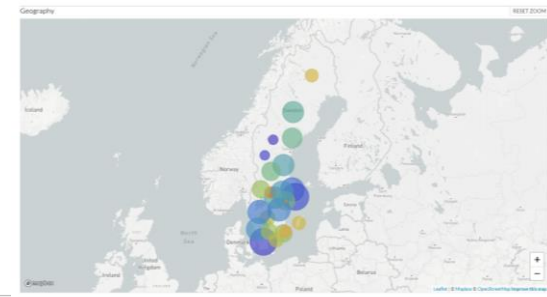
<https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>

# Sverige (urval) vs Europa i GISAID

Mutationer på X-axeln (0-50)

Tid på X-axeln (hela pandemin)



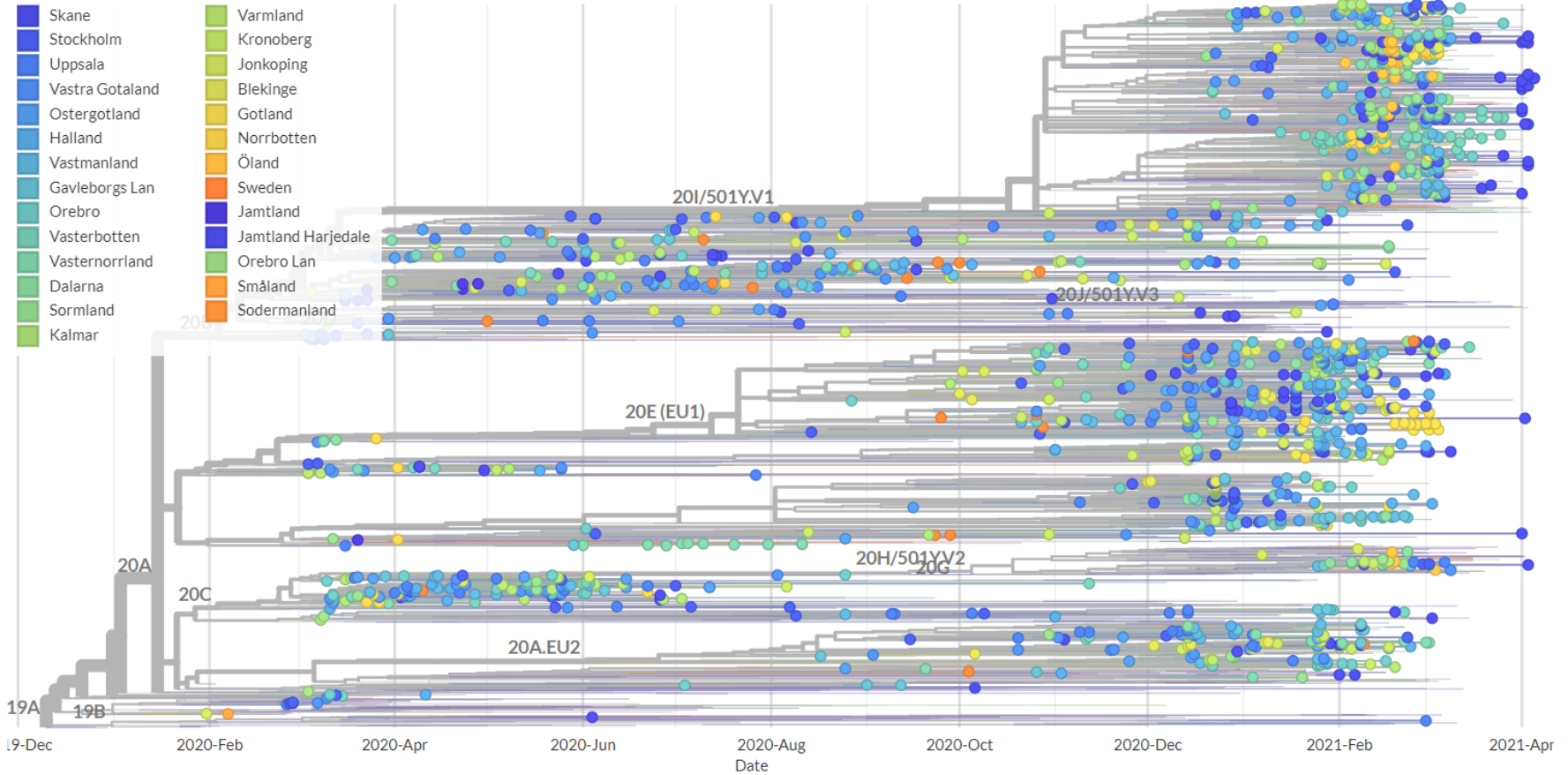


# Sverige vs Europa, fler stammar

## Phylogeny

Admin Division ^

- Skåne
- Stockholm
- Uppsala
- Västra Götaland
- Östergötland
- Halland
- Västmanland
- Gävleborgs Lan
- Örebro
- Västerbotten
- Västernorrland
- Dalarna
- Sörmland
- Kalmar
- Varmland
- Kronoberg
- Jönköping
- Blekinge
- Gotland
- Norrbotten
- Öland
- Sweden
- Jamtland
- Jamtland Harjedale
- Örebro Lan
- Småland
- Södermanland



Diversity



# Finns det risk att vi sekvenserar för mycket?

- Ja, risken finns att sekvenseringen inte blir kostnadseffektiv
- Viktigt att urvalet är så brett som möjligt
- Viktigt att det finns möjlighet att dela sekvenser framöver med t.ex. forskningsprojekt (GISAID är ett bra exempel)
- För att hitta nya varianter krävs dock viss baselinenivå vilket i RÖL ligger på 60 sekvenser i månaden vid låg smittspridning. (Enl FOHM)

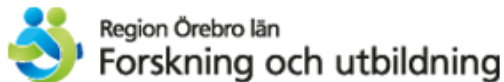




# Sammanfattning

- Bedömningen är att fortsatt storskalig sekvensering (minst 10% av alla positiva + vaccingenombrott) är viktigt för övervakning av ffa sannolikheten för vaccineffekt
- De nationella projekten GMS och GENSAM kommer ge möjlighet till förenklade flöden för lab som vill börja sekvensera och samordnar oss som redan sekvenserar.
- SARS-CoV-2 ger oss möjlighet att etablera lokal sekvensering vilket har betydelse för framtida smittskydd

# Tack för er uppmärksamhet!



Bianca Stenmark  
Anita Koskela von Sydow  
Anna Fagerström  
Sara Thulin-Hedberg  
Ronza Hadad  
Gunlög Rasmussen  
Mfl.



Magnus Johansson  
Naveed Asghar  
Mårten Lindqvist  
Mfl.





# Forskning lokalt

Epidemiologisk övervakning av SARS-CoV-2 med både genetiska och kliniska data från patienter med COVID-19 i Region Örebro län

- Viruset: *Undersöka stabiliteten av SARS-CoV-2 arvsmassa, över tid och under infektion, och samspelet till andra mikroorganismer i förhållande till grad av COVID-19 sjukdom*  
*Paula Mölling - Beviljad medel från Nyckelfonden 2020*
- Värden: *Studera interaktioner mellan virus och värd hos patienter med COVID-19 och det kliniska utfallet*  
*Gisela Helenius - Beviljad medel från Nyckelfonden 2020*