

Zkušenosti s celogenomovou sekvenací SARS-CoV-2

Ing. Lucie Mrázková, Ph.D
NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění
lucie.mrazkova@szu.gov.cz

Dostupné sekvenační technologie

- ▶ Polovodičové sekvenování - Genexus
- ▶ Můstková amplifikace - Illumina (MiSeq, MiSeqDX)
- ▶ Nanopore - GridION



Obrázek 1: a) Genexus, b) čip do Genexusu, c) Illumina MiSeqDx, d) flow cela do Illumina platform, e) Oxford Nanopore GridION, f) flow cela pro Oxord Nanopore. Zdroj: foto autora (a – d: vybavení SZÚ budova 12, e – f: vybavení MHRA, Londýn).

Srovnání sekvenačních technologií pro použití u respiračních virů

RNA viry	Velikost genomu v kb
SARS-CoV-2	29,9
Influenza A/B	13,5
Respirační syncytiální virus (RSV)	15,0
Enteroviry (vč. Polioviru)	7,4
Rhinoviry (HRV)	7,2

	Genexus	Illumina	Nanopore
Laboratorní práce	10 min	3 dny	4 hodiny
Doba přípravy knihoven		3 dny	4 hodiny
Doba sekvenace	24 hodin	10 hodin	2 hodiny
Doba úpravy výstupních dat	2 hodiny	4 hodiny	2 hodiny
Formát výstupních dat	FASTA/FASTQ	FASTQ	FASTQ
Délka 1 readu	300 - 350 b	100 - 150 b	30 kb
Cena za 1 vzorek	12 000 Kč	3500 Kč	1000 Kč
Kapacita vzorků na 1 běh	16	96	96*
Problémy	čtení více než 4 homopolymerů	klesající přesnost s délkou čtení	nižší přesnost

Tabulka 1: Přehled velikosti genomu u různých respiračních virů. Zdroj: National Center for Biotechnology Information. NCBI Virus - Viral Sequences [online]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine, 2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabulka 2: Srovnání dostupných NGS technologií. Zdrojová data pro výpočet cen sekvenování byla čerpána z objednávek sekvenačních reagentů a nezahrnují pořizovací cenu přístroje. Ceny jsou stanoveny pro SARS-CoV-2. Ostatní data jsou čerpána z materiálů výrobců a disertační práce autorky.

Kriteria pro výběr vzorků na sekvenace

- ▶ Vážné průběhy, věková skupina, reinfekce do 60 dní od prodělání, onemocnění po 14 dní od vakcinace, neobvyklý materiál (např. likvor, krev), import z rizikové oblasti, ohniska výskytu
- ▶ CT < 30 (ideálně pod 25)
- ▶ Vzorek zamražený (i při přepravě)
- ▶ Vyplnění klinických příznaků
- ▶ Doporučení sekvenací z roku 2022 je vzorků 1000-1500 vzorků za sezónu (2023 v GISAID 2022 vzorků, 2024 v GISAID 398 vzorků, 2025 v GISAID 106 vzorků)

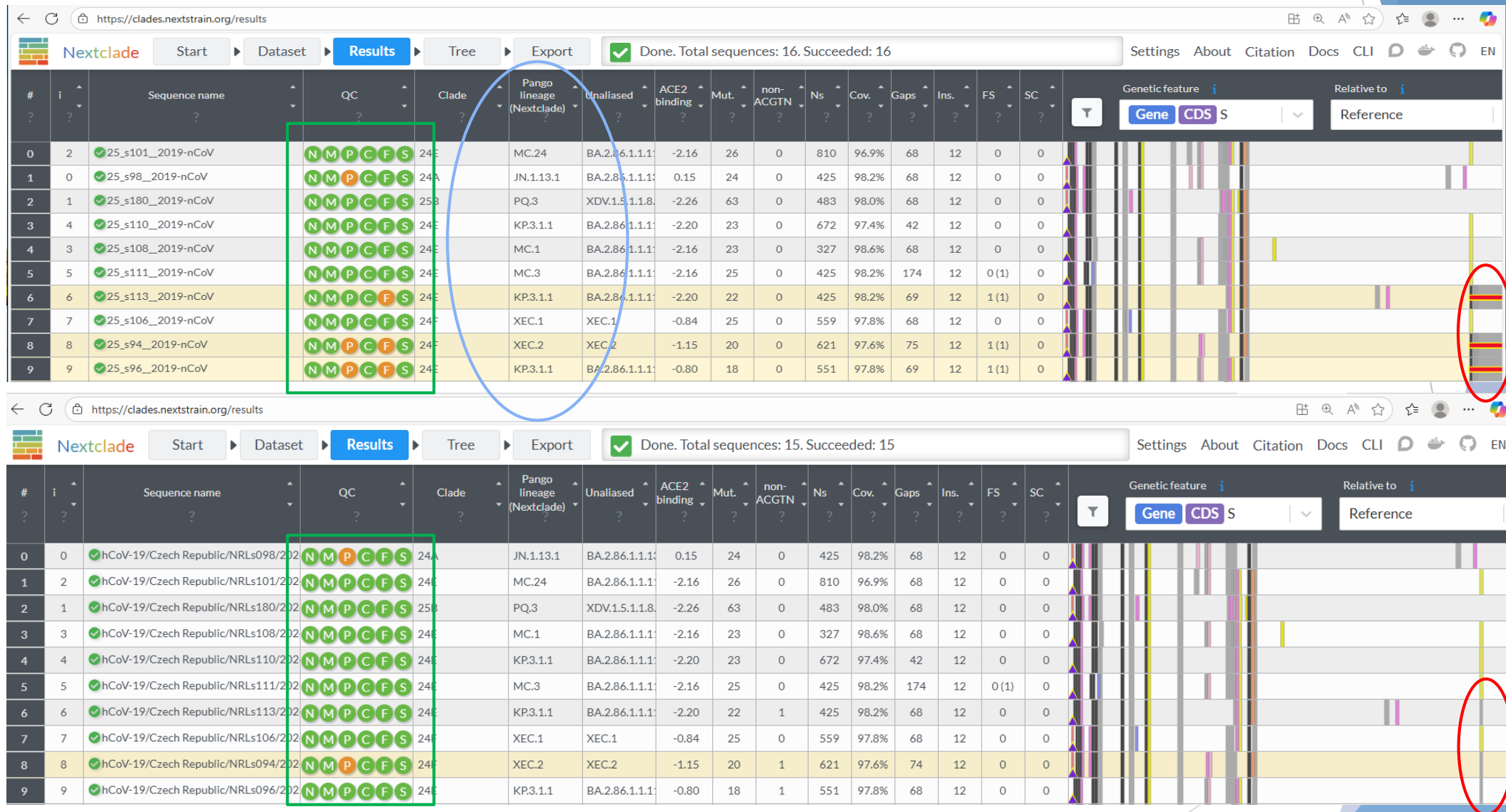
Kontrola výstupních dat na sekvenátoru

- ▶ Kontrola histogramu
- ▶ Zjištění hloubky čtení (pro každý vzorek je důležité mít minimálně 40 readů aby data byla dostatečně spolehlivá)
- ▶ Zobrazení Q skóre a zjištění procenta neúspěšných čtení/basecallingu

Zpracování sekvenačních dat

- ▶ Analýza dat ve FASTA formátu prostřednictvím NextClade (zjištění linie, frameshiftů)
- ▶ Oprava raw dat (dohledání v Integrative Genomics Viewer IGV)
- ▶ Nahrání opravených dat do databáze GISAID
- ▶ Fylogenetická analýza (celogenomová, strukturální proteiny, jednotlivé segmenty, geny, ...) v porovnání zachycených vzorků s vakcinálními kmeny (programy Geneious Prime, Mega,)
- ▶ Hlášení do informačního systému infekčních nemocí (ISIN)
- ▶ Porovnání aminokyselinových substitucí (outbreak.info)
- ▶ Statistická analýza fenotypových projevů (nedostatek dat)

Analýza v NextClade

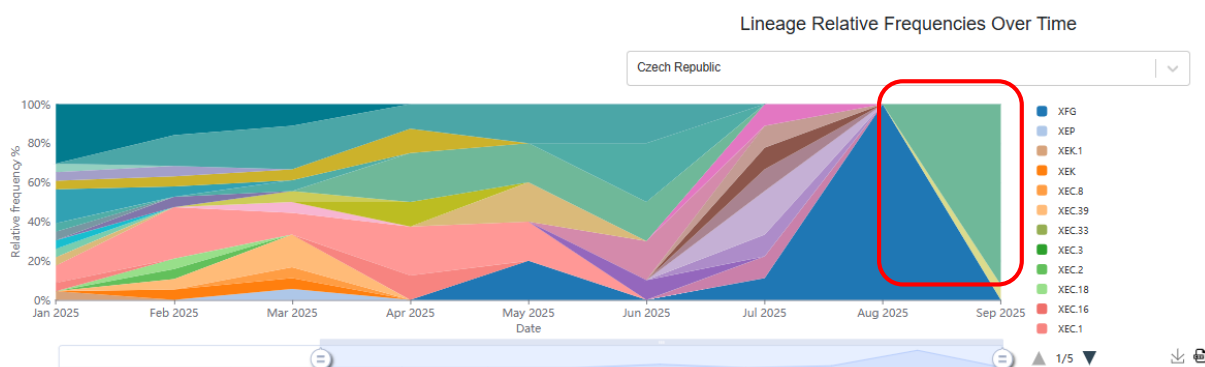


NextClade

Zdroj: NextClade. NextClade Web [online]. Basel: Nextstrain, 2020. Dostupné z: <https://clades.nextstrain.org>

Databáze GISAID

- Nahrání dat do databáze Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)
- Možnost stažení a zobrazení světových dat
- Možnost vizualizace mutací
- Problémy s aktualizací linií nahraných sekvencí (automatické vyhodnocení často řadí podle staršího klasifikačního systému)



GISAID

© 2008 - 2025 | Terms of Use | Privacy Notice | Help

You are logged in as **Lucie Mrazkova** - [logout](#)

Registered Users | EpiFlu™ | **EpiCoV™** | EpiRSV™ | EpiPox™ | EpiArbo™ | My Profile

EpiCoV™ | Search | Downloads | Upload

Search ▼ Reset filters

EPI_ISL ID: Virus name: EPI_SET ID: ☐ Complete [?]

Location: Host: ☐ High coverage [?]

Collection: to Submission: to ☐ Low coverage excluded [?]

Clade: Lineage: Variant: ☐ With patient status [?]

AA Substitutions[?] Nudl Mutations[?] ☐ Collection date complete [?]

☐ Under investigation

Text Search:

☐	VIRUS NAME	LINEAGE	ACCESSION ID	COLLECTED	SUBMITTED	☐	LEN	HOST	LOCATION	ORIGINAT
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs190/2025	NY.1.6	EPI_ISL_20132150	2025-07-26	2025-08-18	☐	29,773	Human	Europe / Czech F	Gener
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs189/2025	XFG	EPI_ISL_20132149	2025-08-02	2025-08-18	☐	29,773	Human	Europe / Czech F	Gener
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs188/2025	NY.3.3	EPI_ISL_20132148	2025-07-30	2025-08-18	☐	29,770	Human	Europe / Czech F	Univer
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs186/2025	PQ.1	EPI_ISL_20132147	2025-07-28	2025-08-18	☐	29,775	Human	Europe / Czech F	Silesiz
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs185/2025	PQ.1	EPI_ISL_20132146	2025-07-28	2025-08-18	☐	29,785	Human	Europe / Czech F	Silesiz
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs183/2025	XFG	EPI_ISL_20132145	2025-07-15	2025-08-18	☐	29,773	Human	Europe / Czech F	Gener
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs182/2025	NW.1	EPI_ISL_20132144	2025-07-16	2025-08-18	☐	29,779	Human	Europe / Czech F	Regio
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs181/2025	XDV	EPI_ISL_20132143	2025-07-14	2025-08-18	☐	29,777	Human	Europe / Czech F	Regio
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLc3267/2025	PQ.13	EPI_ISL_20084506	2025-07-12	2025-07-22	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Motol
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs180/2025	PQ.3	EPI_ISL_20082394	2025-06-09	2025-07-21	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Militar
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-168/2025	JN.1.40	EPI_ISL_20070767	2025-06-15	2025-07-08	☐	29,599	Human	Europe / Czech F	Nemo
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-163/2025	XFG	EPI_ISL_20069325	2025-05-15	2025-07-09	☐	29,655	Human	Europe / Czech F	Public
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-162/2025	XEC	EPI_ISL_20069324	2025-05-09	2025-07-09	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Gener
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-177/2025	NB.1.8.1	EPI_ISL_20066637	2025-06-16	2025-07-08	☐	29,744	Human	Europe / Czech F	Fakult
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-176/2025	JN.1.11	EPI_ISL_20066636	2025-06-09	2025-07-08	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Fakult
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-175/2025	LP.7	EPI_ISL_20066635	2025-05-19	2025-07-08	☐	29,744	Human	Europe / Czech F	Fakult
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-174/2025	JN.1.11	EPI_ISL_20066634	2025-05-13	2025-07-08	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Fakult
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-171/2025	JN.1.40	EPI_ISL_20066631	2025-06-06	2025-07-08	☐	29,724	Human	Europe / Czech F	Zdrav
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-170/2025	JN.1.40	EPI_ISL_20066630	2025-05-14	2025-07-08	☐	29,691	Human	Europe / Czech F	Zdrav
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-169/2025	JN.1.18	EPI_ISL_20066629	2025-06-15	2025-07-08	☐	29,691	Human	Europe / Czech F	Nemo
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-167/2025	NB.1.8.1	EPI_ISL_20066628	2025-06-11	2025-07-08	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Nemo
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-166/2025	JN.1.18	EPI_ISL_20066627	2025-06-11	2025-07-08	☐	29,691	Human	Europe / Czech F	Labor
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-165/2025	JN.1.11	EPI_ISL_20066626	2025-06-03	2025-07-08	☐	29,688	Human	Europe / Czech F	Labor
☐	hCoV-19/Czech Republic/NRLs-164/2025	JN.1.18	EPI_ISL_20066625	2025-06-06	2025-07-08	☐	29,741	Human	Europe / Czech F	Labor

Total: 38 viruses

<< < 1 > >>

Charts | EPI_SET | Select | Analysis | Download

Zdroj: GISAID. EpiCoV™ Database: SARS-CoV-2 genome sequences [online].

München: GISAID, 2008. Dostupné z: <https://www.gisaid.org/>

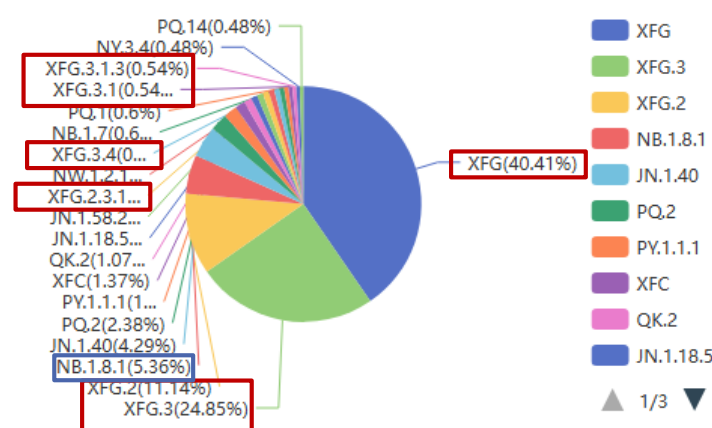
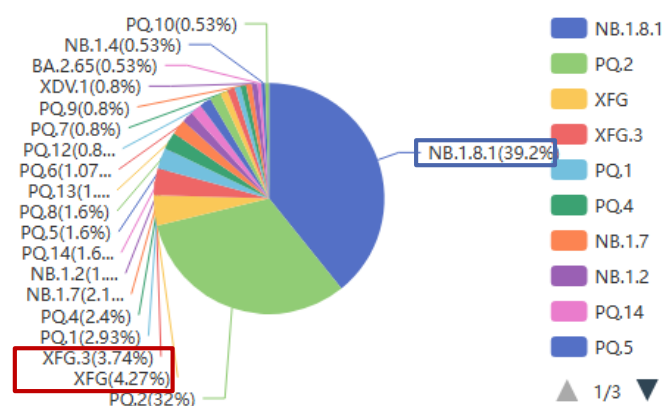
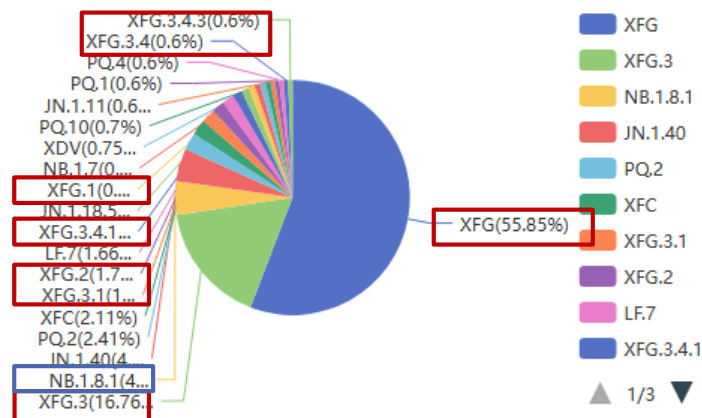
Situace ve světě

Kontrola monitorovaných a sledovaných variant zachycených v populacích každý týden ve zprávě (pro zvýšení výpovědní hodnoty se udává poslední měsíc)

► Evropa 3.9.- 3.10. 2025

Asie 3.9.- 3.10. 2025

Severní Amerika 3.9.- 3.10. 2025

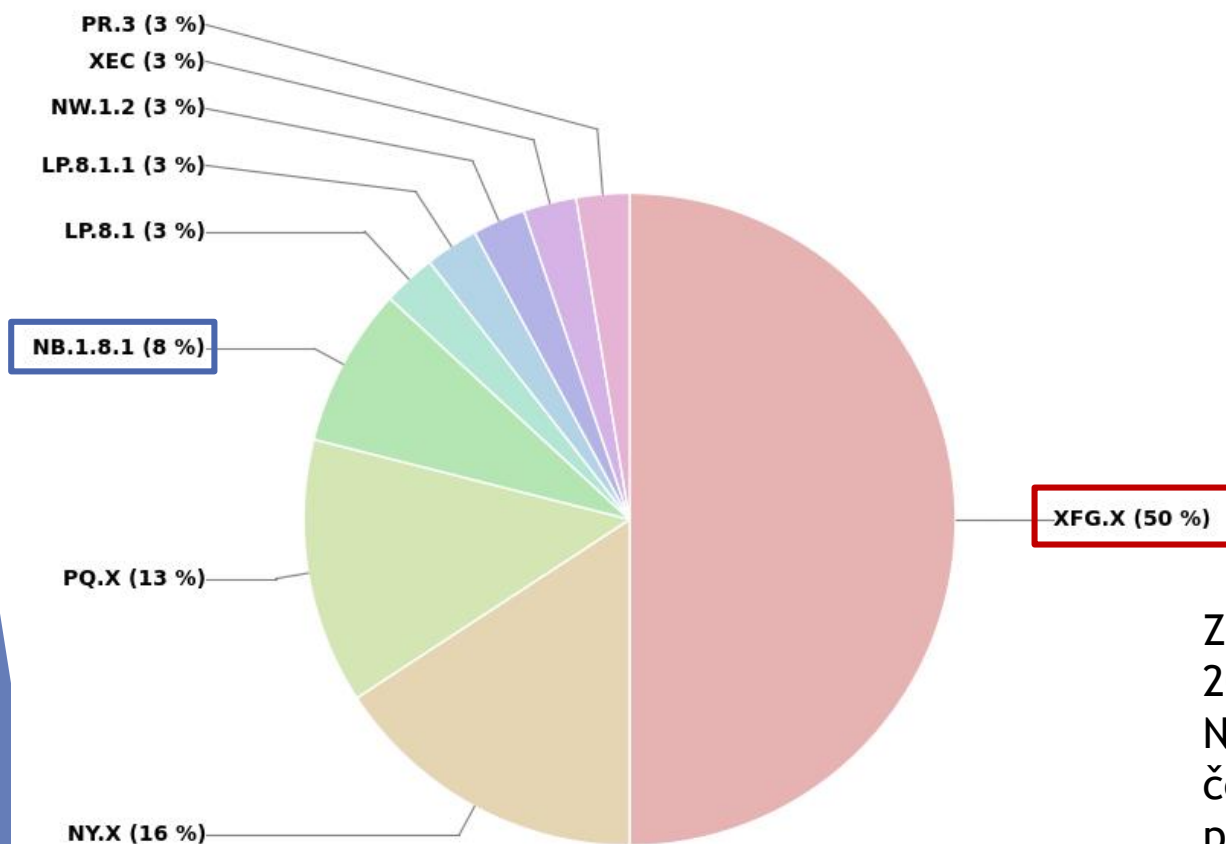


	Evropa	Asie	Severní Amerika
total	2175	391	1837
NB.1.8.1	93	147	90
XFG	1130	16	678
XFG.2	34	2	187
XFG.3	338	14	417

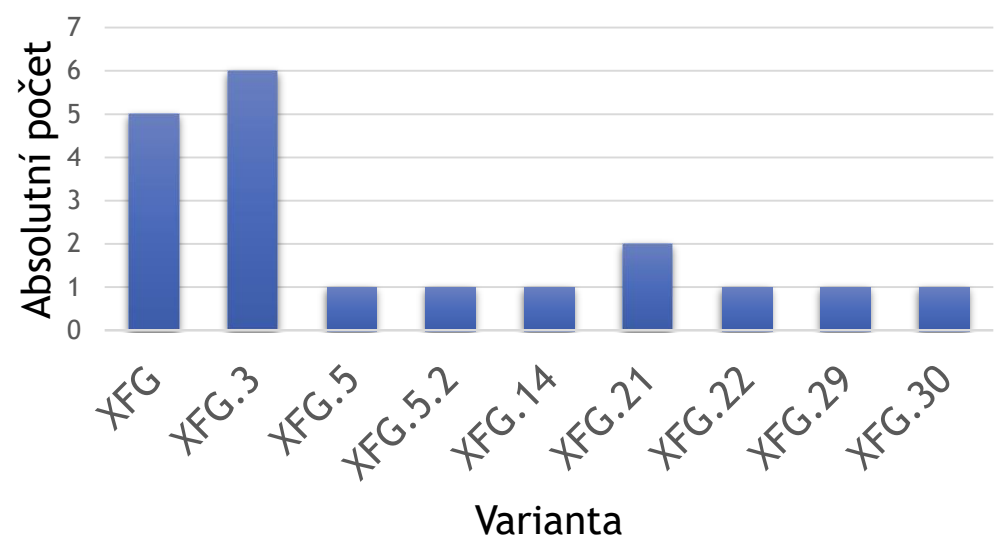
Výsledky sekvenování SARS-CoV-2 v ČR v období 9. 5.- 23. 9. 2025

Výpočet procentuálního zastoupení variant SARS-CoV-2 (linie určené v Nextclade)

Graf detekovaných variant SARS-CoV-2 v ČR v období 9. 5.- 23. 9. 2025



Zastoupení detekovaných linií XFG



Z 41 celogenomově sekvenovaných vzorků z období květen - září 2025 s datem odběru 9. 5. - 23. 9. 2025, byla v ČR varianta Nimbus (NB.1.8.1) potvrzena u 3 vzorků s datem odběru červen-červenec 2025. Varianty PQ.X a PR vykazují fylogenetickou příbuznost s variantou Nimbus (NB.1.8.1). Od srpna byly převážně zachyceny varianty XFG.

Analýza v Geneious Prime

The screenshot displays the Geneious Prime software interface. The main window shows a list of sequences and alignments on the left, a central alignment view with a consensus sequence, and a right-hand panel with various analysis options. A 'Tree' dialog box is open, showing settings for the 'Geneious Tree Builder'. The dialog includes options for 'Genetic Distance Model' (Tamura-Nei), 'Tree Build Method' (Neighbor-Joining), 'Outgroup' (No Outgroup), 'Resampling Method' (None), 'Random Seed' (XFG.30_216), 'Number of Replicates' (100), 'Support Threshold %' (50), and 'Topology Threshold %' (50). The 'Consensus Tree Options' section is also visible, showing a list of sequences and their support values.

Tree Dialog Box Settings:

- Genetic Distance Model: Tamura-Nei
- Tree Build Method: Neighbor-Joining
- Outgroup: No Outgroup
- Resampling Method: None
- Random Seed: XFG.30_216
- Number of Replicates: 100
- Support Threshold %: 50
- Topology Threshold %: 50

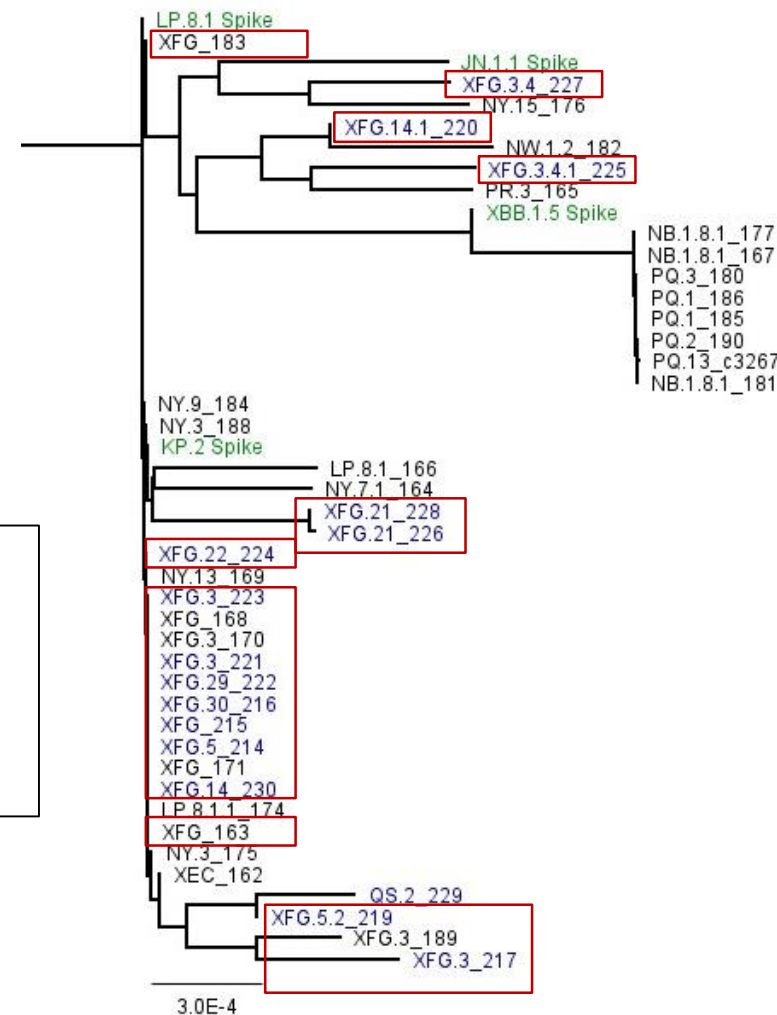
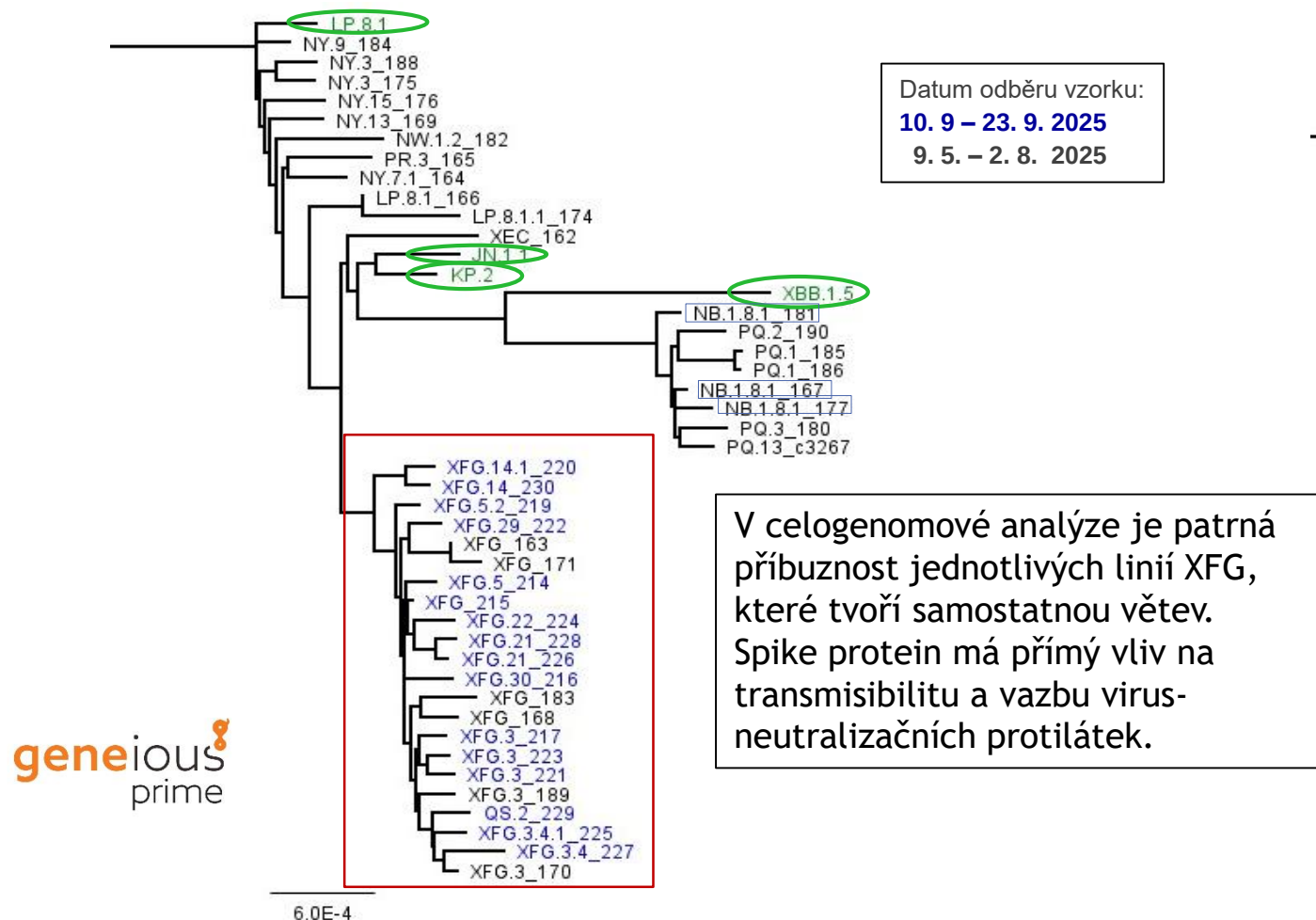
Consensus Sequence View:

The consensus sequence view shows a sequence of 29,877 nucleotides. The sequence is displayed in a color-coded format (A, C, G, T) and includes a scale bar at the bottom indicating the position of the sequence.

Fylogenetická analýza SARS-CoV-2 v ČR

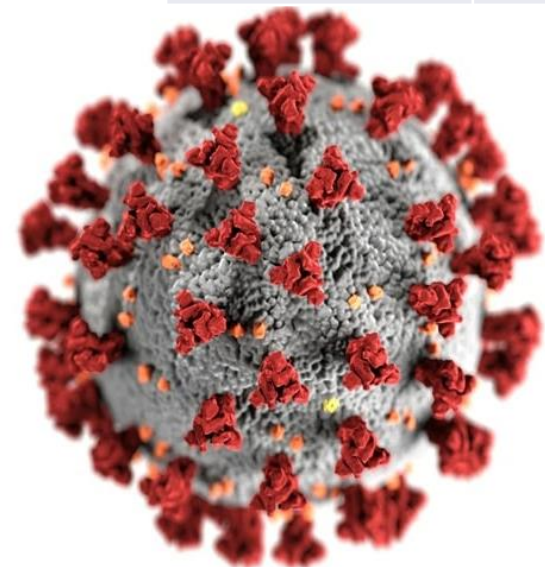
Dendrogram - fylogenetická celogenomová sekvenační analýza (41 vzorků + 4 **vakcinální kmeny od 2023**)

Dendrogram - fylogenetická analýza Spike proteinu (41 vzorků + 4 **vakcinální kmeny od 2023**)



Vakcinální kmeny SARS-CoV-2 v letech 2024 a 2025

Rok	Vakcinální kmen	Označení vakcíny	Cílová varianta	Výrobce
2025	LP.8.1	Comirnaty LP.8.1	LP.8.1.1 (odvozená od JN.1)	Pfizer/BioNTech
2024	XBB.1.5	Comirnaty XBB.1.5	Omicron XBB.1.5	Pfizer/BioNTech
		Spikevax XBB.1.5	Omicron XBB.1.5	Moderna
		Nuvaxovid XBB.1.5	Omicron XBB.1.5	Novavax



Tabulka 3: Přehled vakcinálních kmenů. Zdroj: National Center for Biotechnology Information. NCBI Virus - Viral Sequences [online]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine, 2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Obr. 2: Model SARS-CoV-2, Zdroj: HOLMES, Niamh. COVID-19 Infection in Pregnancy Raises Risk of Preterm Birth [online]. London: European Medical Journal, 2025-10-31. Dostupné z: <https://www.emjreviews.com/respiratory/news>

Děkuji kolegům z NRL pro chřipku a
nechřipková respirační virová
onemocnění a Vám za Vaši pozornost



Obr. 3: Fotografie pracovníků NRL pro chřipku a nechřipková respirační onemocnění. Zdroj: foto autora.