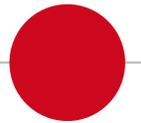


# Sequenziamento del genoma di SARS-CoV-2: workflow a confronto

**Alice Fusaro**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), Padova, Italy*





## ● Obiettivi

# Sviluppo di una metodica di Next Generation Sequencing basata sull'amplificazione target del genoma di SARS-CoV-2

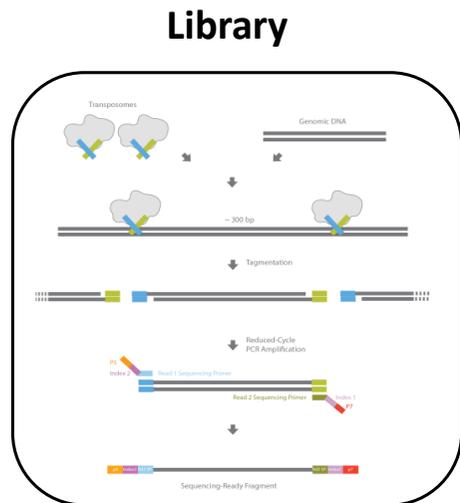
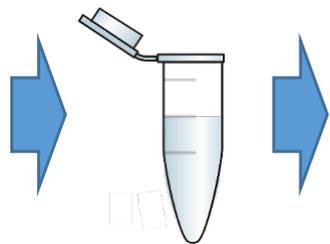
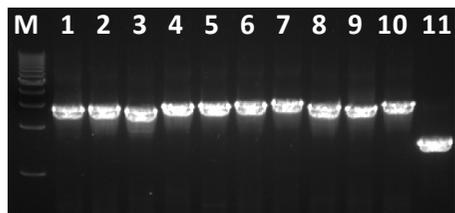
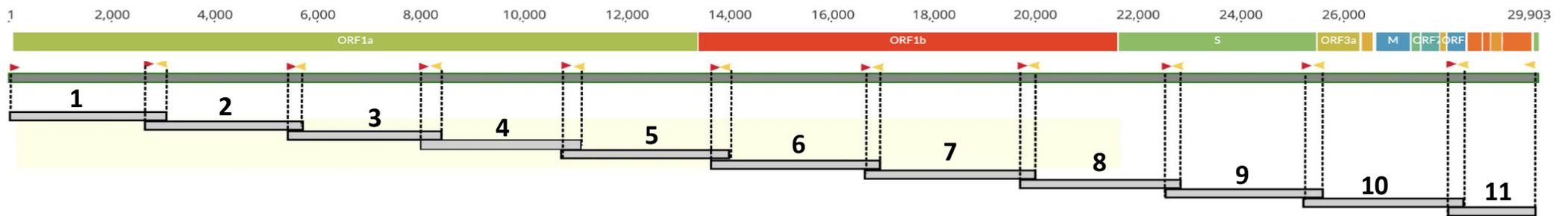
### FASE 1

- Messa a punto e ottimizzazione della metodica

### FASE 2

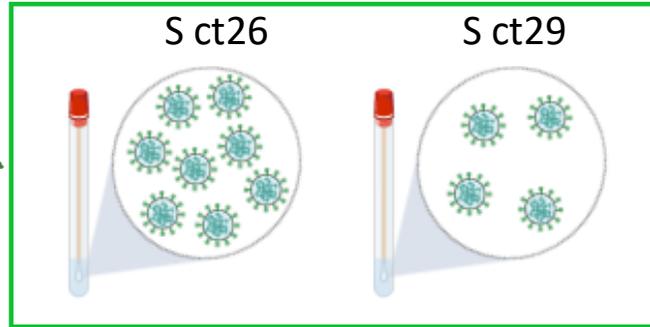
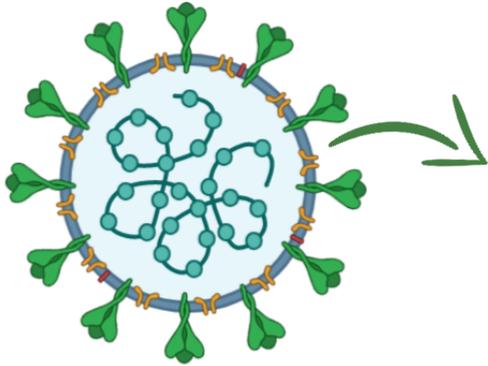
- Verifica delle performance della metodica in campioni di riferimento e campioni clinici considerando: i) diverse concentrazioni virali e ii) diverse matrici
- Comparazione della metodica basata su sequenziamento target con la metodica basata su approccio metagenomico (SISPA: *Sequence-independent, single-primer amplification*)

# FASE 1 - Sviluppo di un protocollo di sequenziamento target

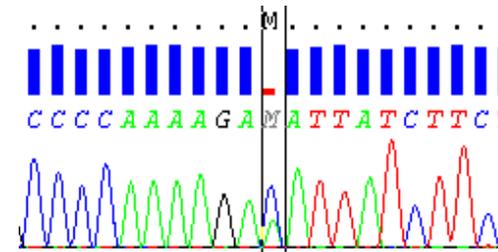
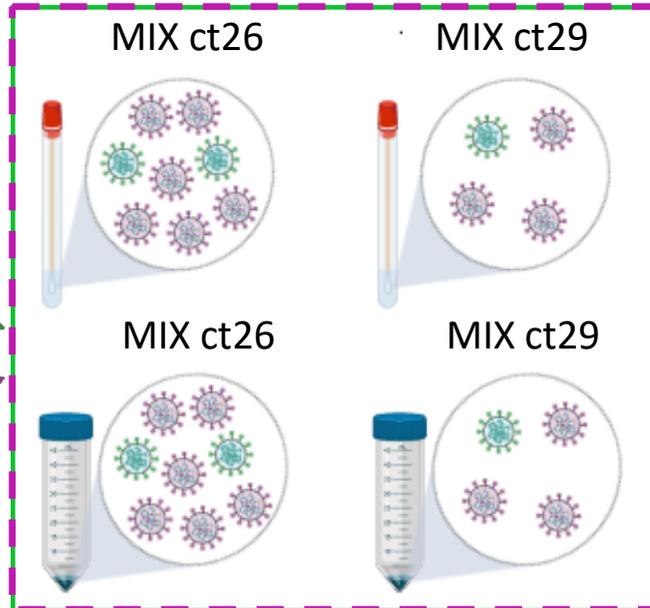
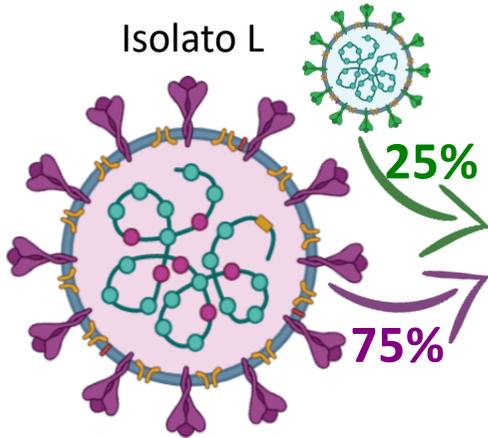


# FASE 2 - Verifica delle performance della metodica – campioni di riferimento

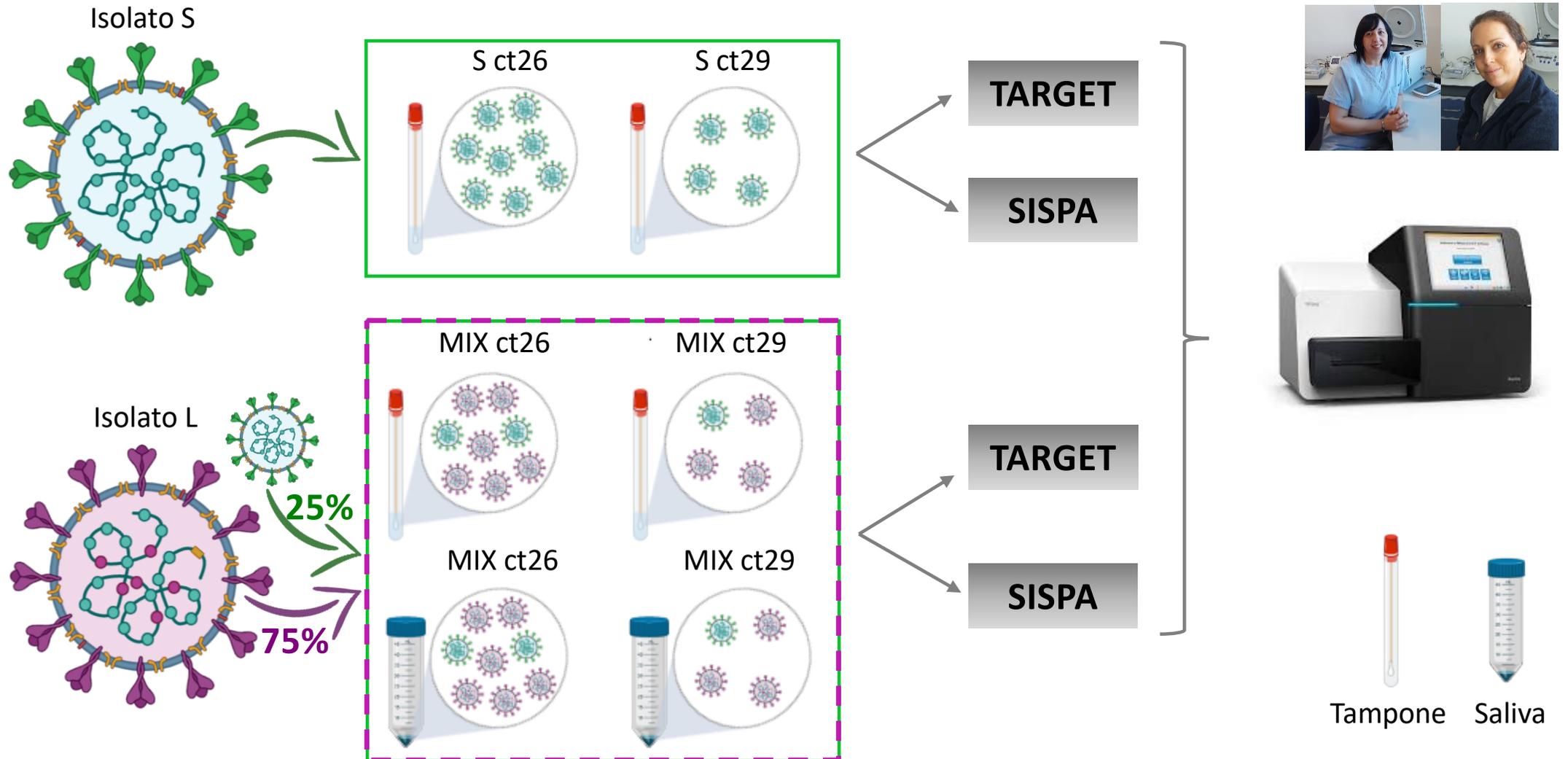
Isolato S



Isolato L



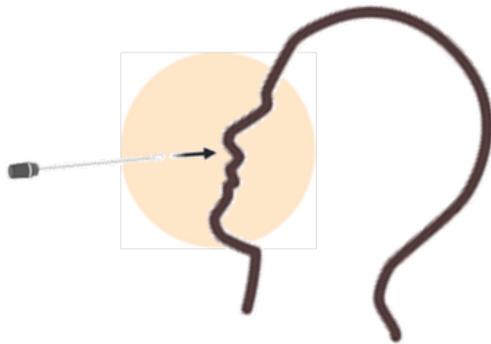
# FASE 2 - Verifica delle performance della metodica – campioni di riferimento



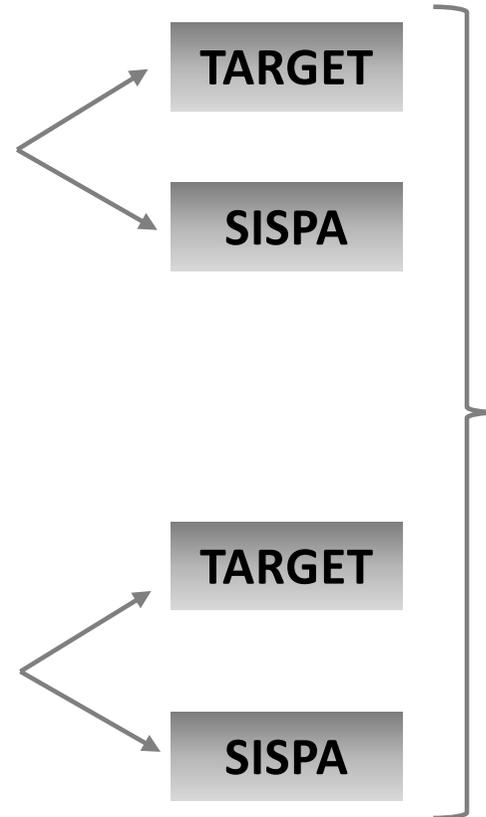
Created with BioRender.com

Ct ottenuti mediante Real-time RT-PCR per gene E utilizzando gli oligonucleotidi sviluppati da Corman et al. (Eurosurveillance, 2020).

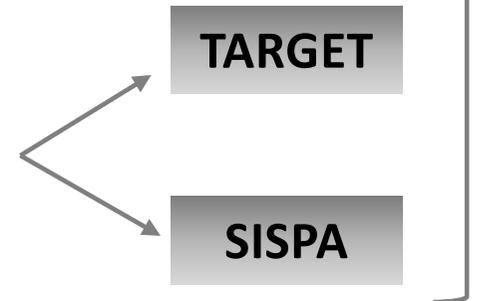
● **FASE 2 - Verifica delle performance della metodica – campioni clinici**



3 campioni  
Ct\* 18, 26, 29



3 campioni  
Ct\* 25, 27, 30



\* Ct ottenuti mediante Real-time RT-PCR per gene E utilizzando gli oligonucleotidi sviluppati da Corman et al. (Eurosurveillance, 2020).

## FASE 2 - Verifica delle performance della metodica – analisi bioinformatica

Controllo qualità e filtraggio delle reads

- *scythe*
- *cutadapt*



Allineamento reference-based

- *BWA*



Chiamata delle varianti

- *LoFreq*



Generazione della sequenza consenso

- *in house perl script*



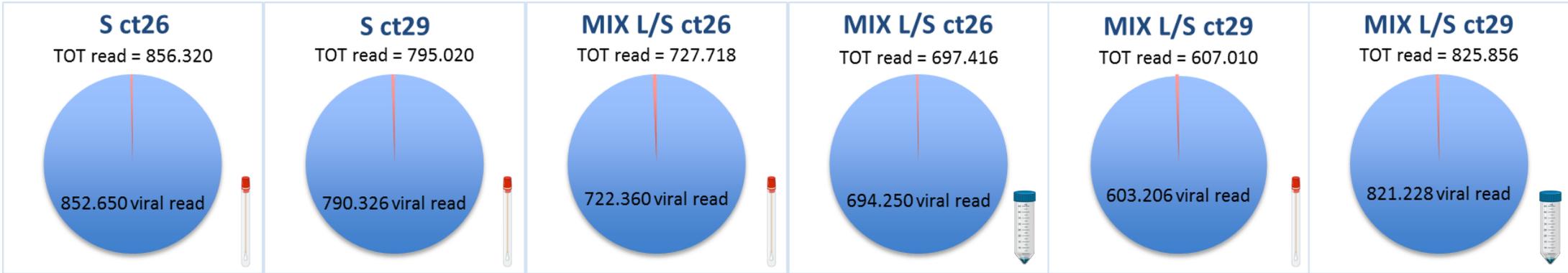
Analisi dei dati



● **Campioni di riferimento – output**

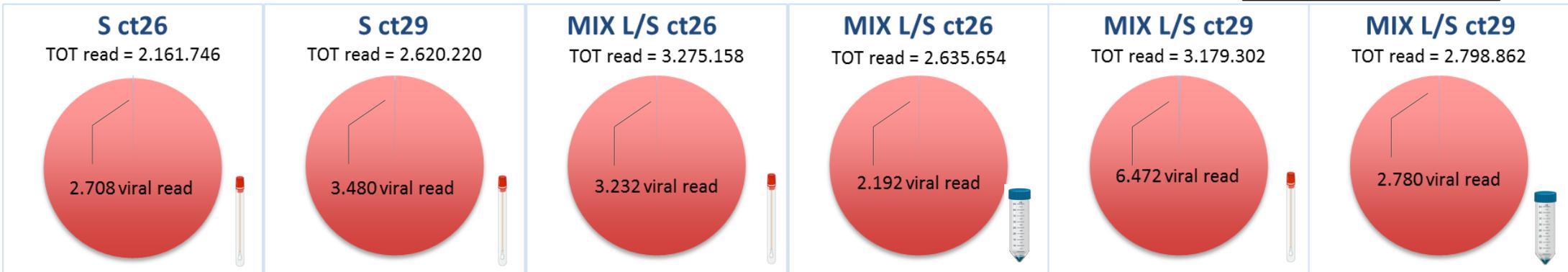
**TARGET**

Read virali > 99%



**SISPA**

Read virali < 1%

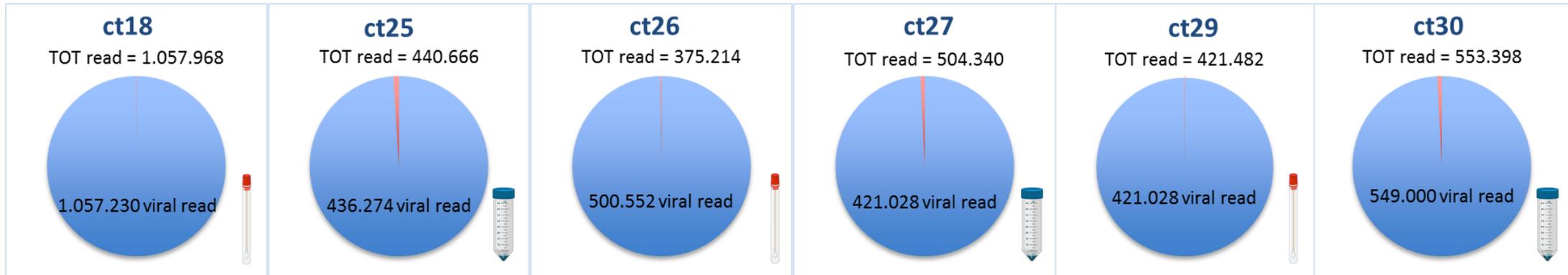


■ % read virali      ■ % read NON virali

**Campioni clinici – output**

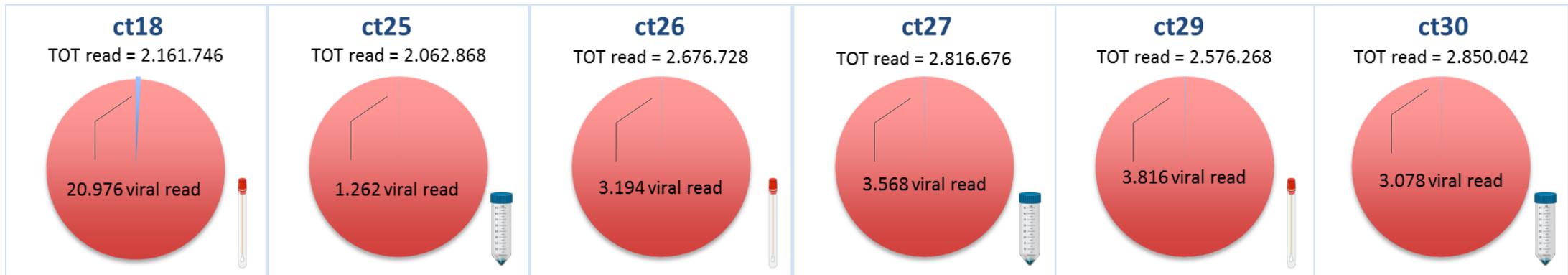
**TARGET**

Read virali > 99%



**SISPA**

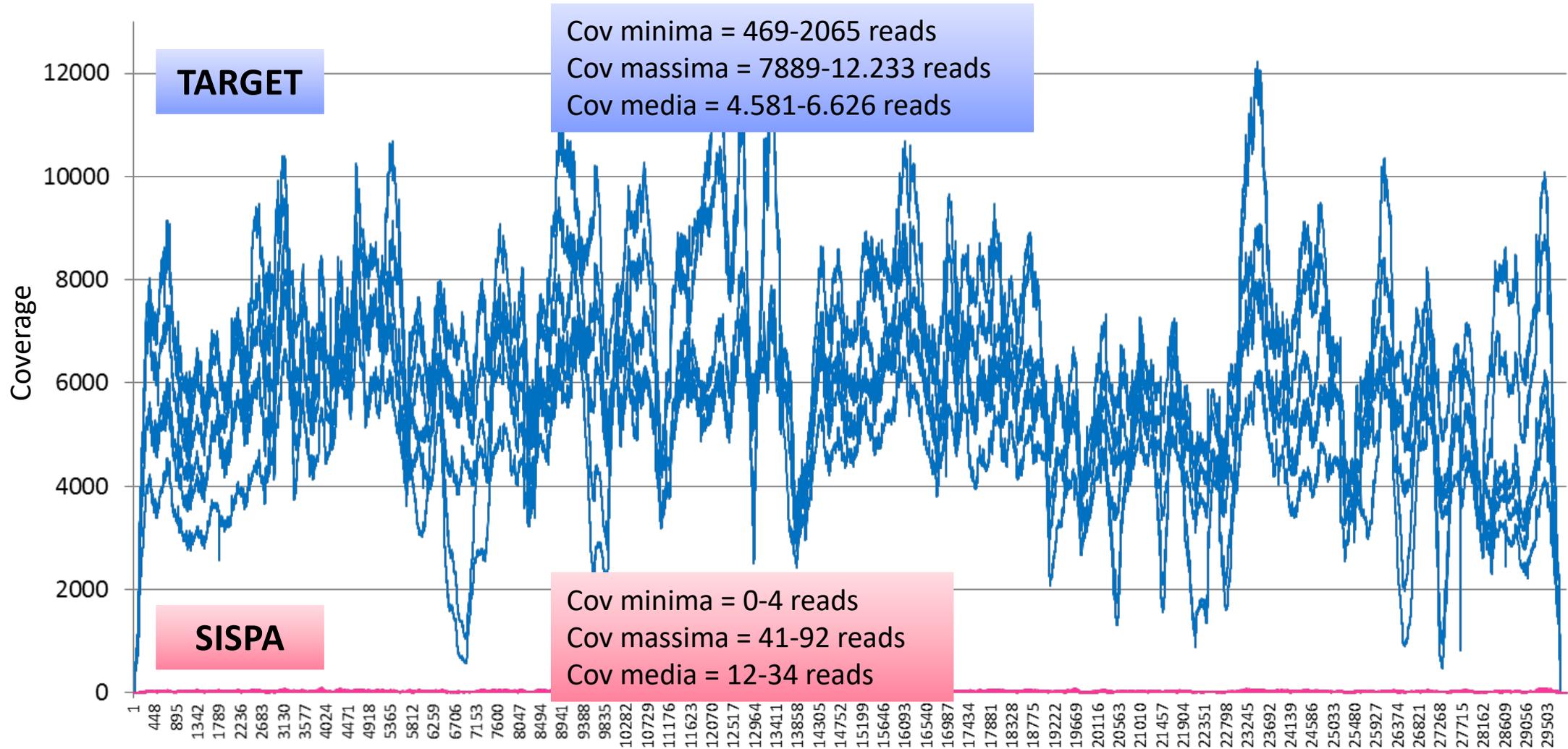
Read virali < 1%



■ % read virali     
 ■ % read NON virali

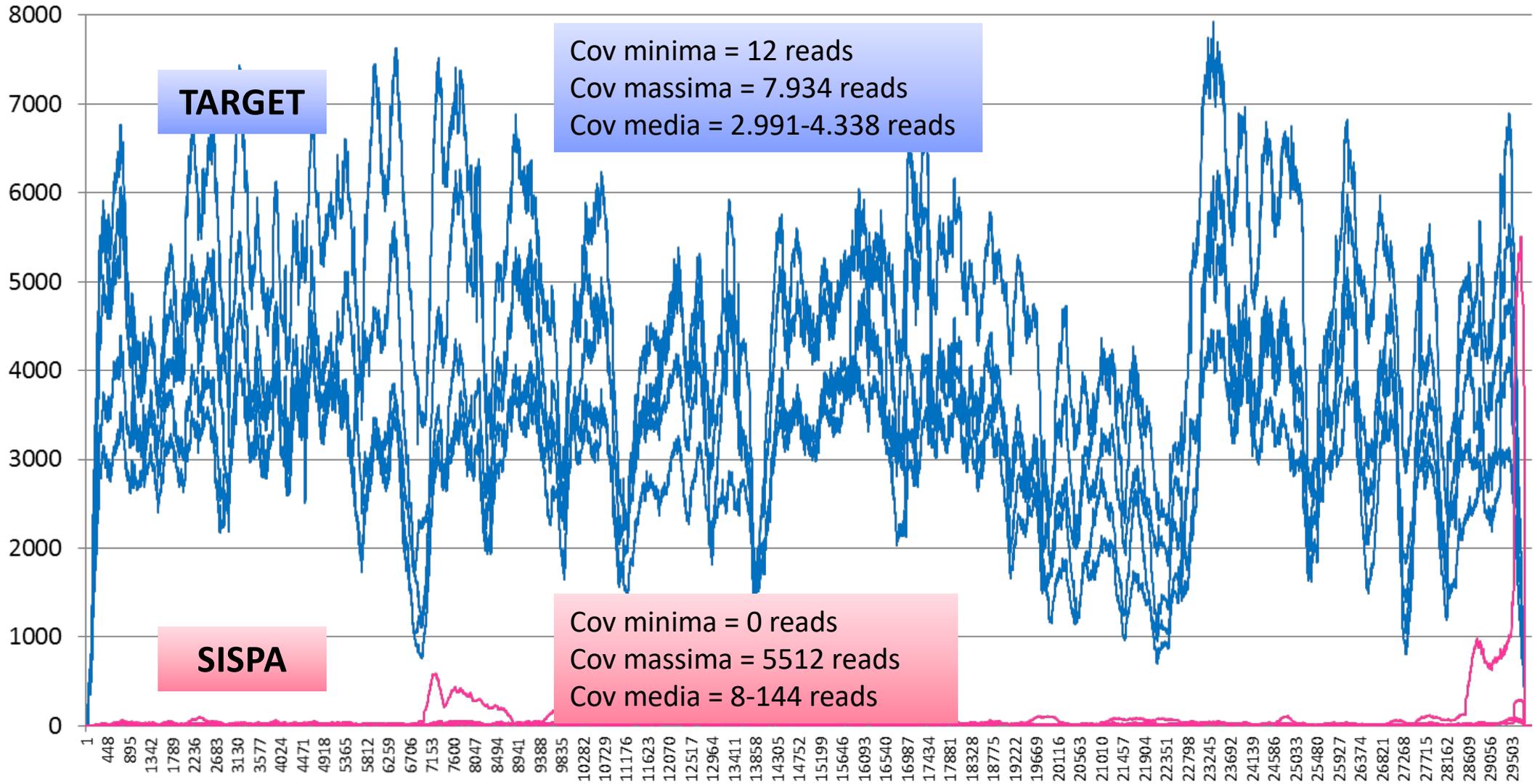


## Coverage – campioni di riferimento



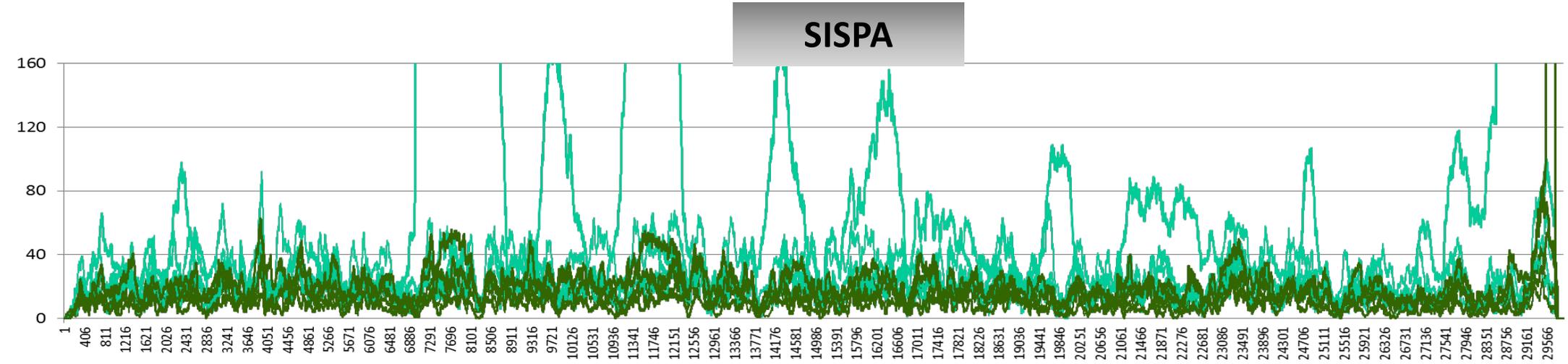
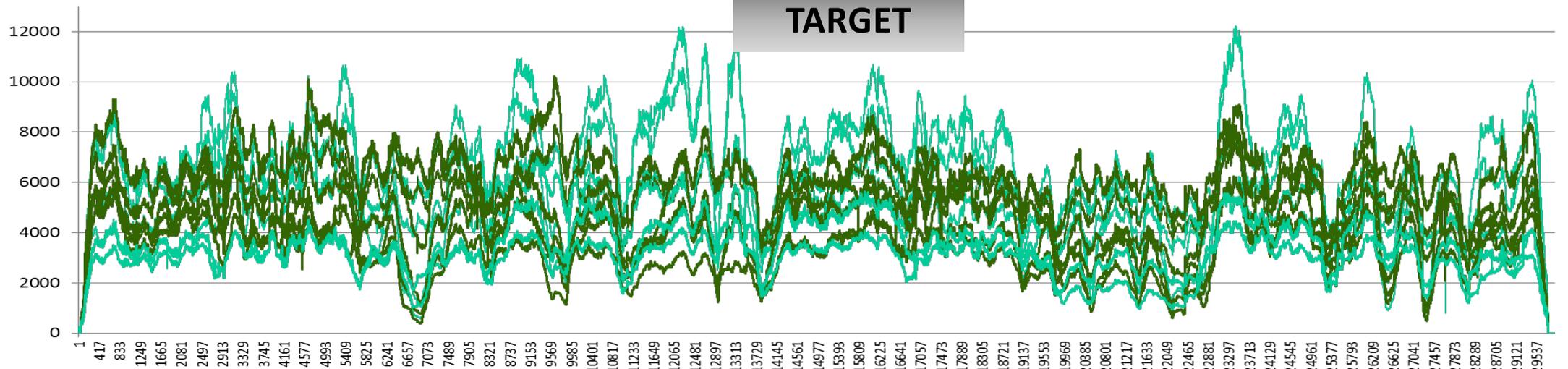


## Coverage – campioni clinici





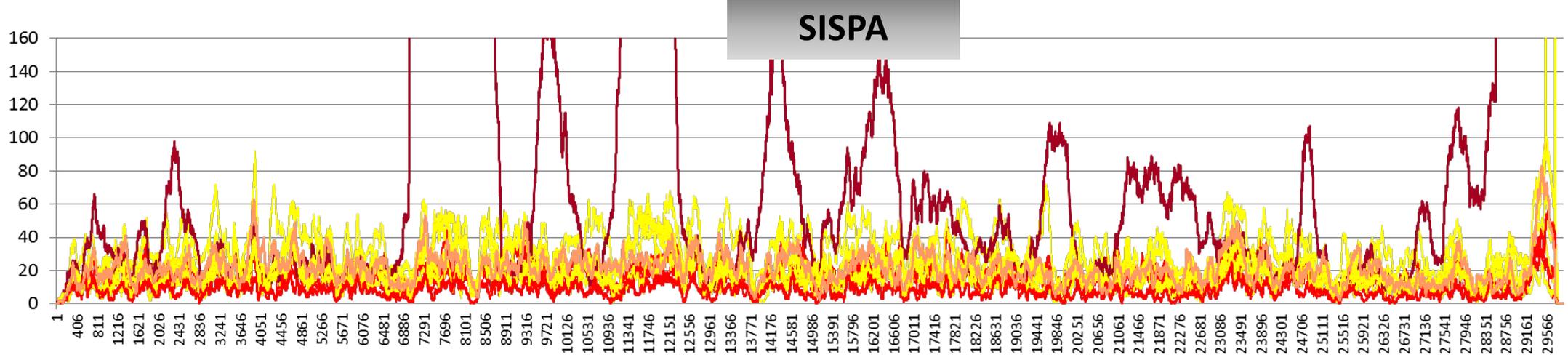
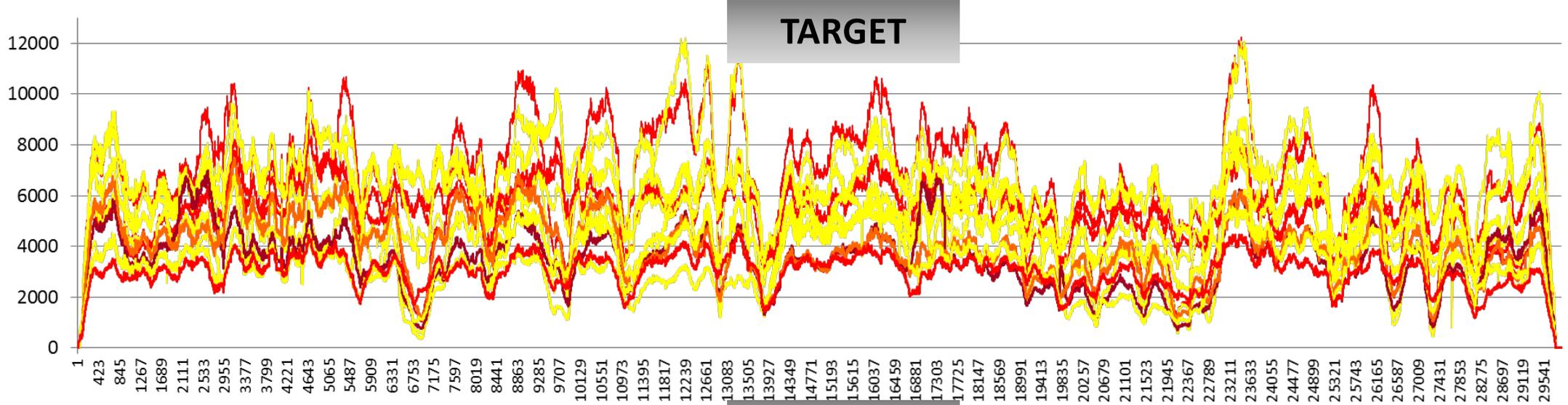
# Matrici – saliva VS tampone



saliva

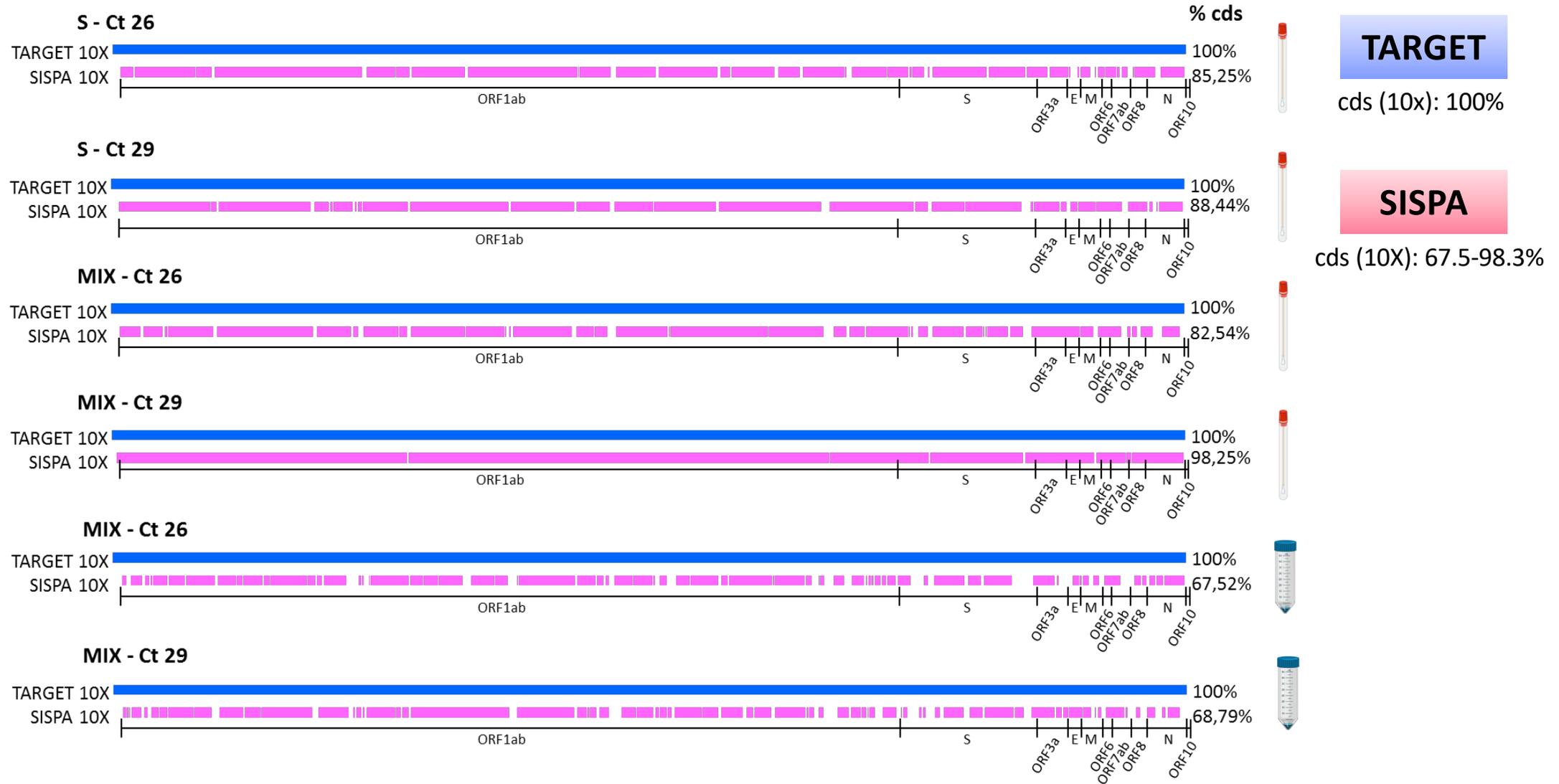
tampone

**Carica virale**

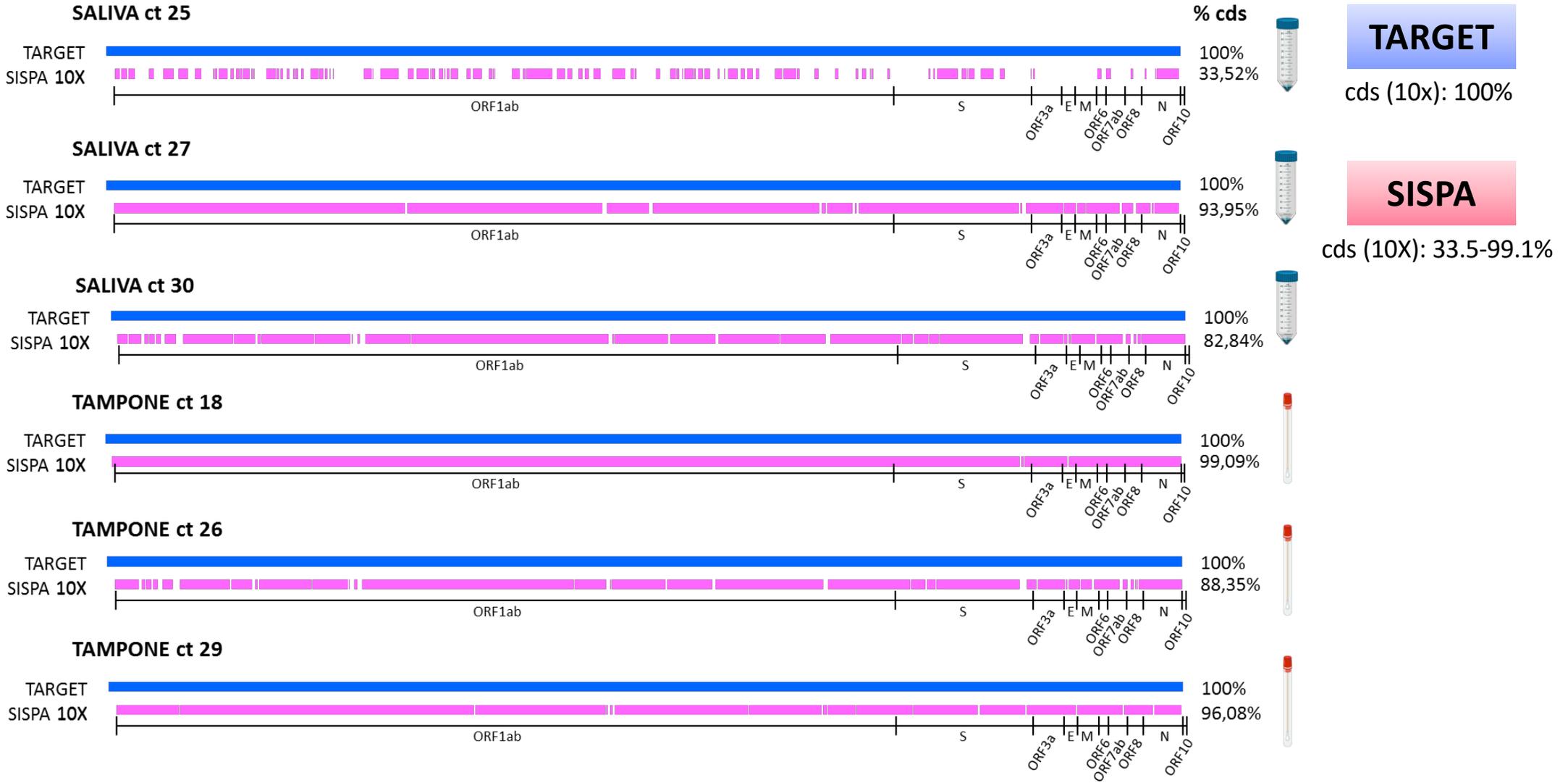


Ct 18
  Ct 25-26
  Ct 27
  Ct 29-30

# Sequenza consenso – campioni di riferimento



# Sequenza consenso – campioni clinici



● Sequenza consenso – campioni di riferimento

TARGET

SISPA

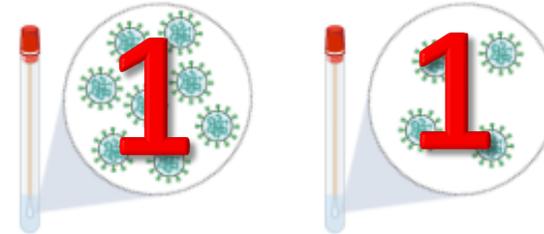
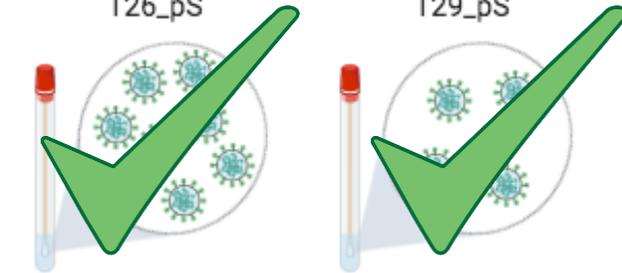
S

T26\_pS

T29\_pS

T26\_pS

T29\_pS



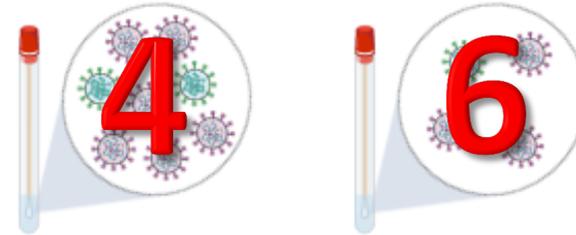
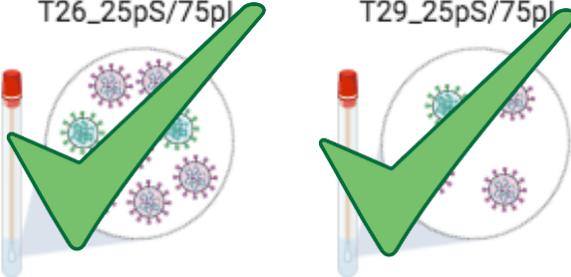
MIX

T26\_25pS/75pL

T29\_25pS/75pL

T26\_25pS/75pL

T29\_25pS/75pL

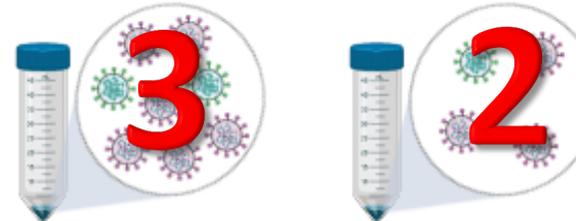


S26\_25pS/75pL

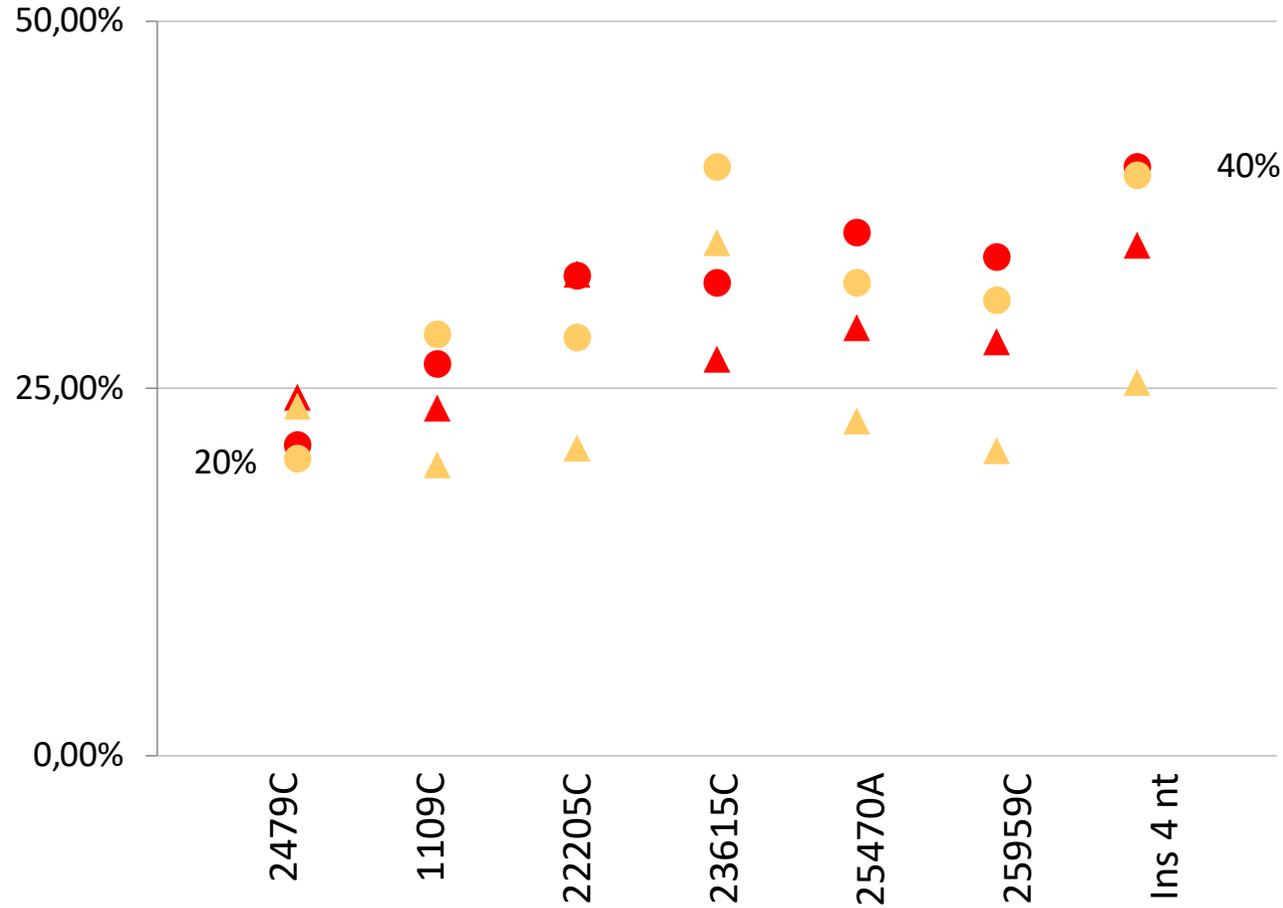
S29\_25pS/75pL

S26\_25pS/75pL

S29\_25pS/75pL

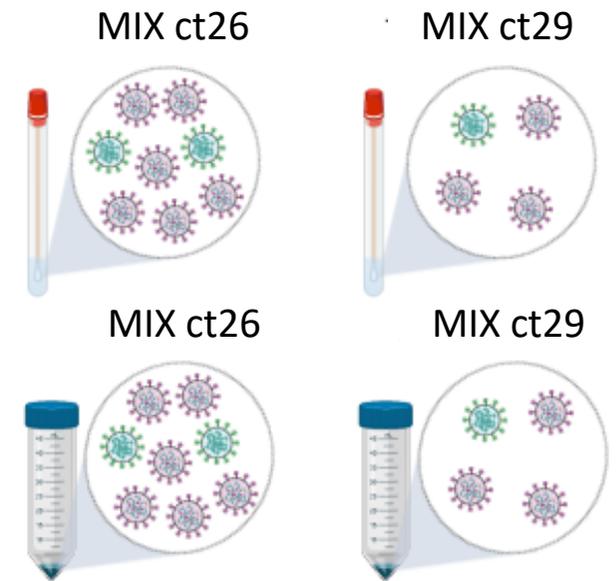


# Varianti minoritarie



○ Saliva      ■ Ct 26  
 △ Tampone      ■ Ct 29

**TARGET**



## ● Conclusioni

### IL PROTOCOLLO TARGET:

- Permette di sequenziare in modo accurato il genoma completo di SARS-CoV-2 da campioni clinici provenienti da diverse matrici, anche con una limitata carica virale (campioni con valori di ct fino a 30\*)
- Grazie al processo di amplificazione del genoma virale, più del 99% delle reads ottenute appartengono a SARS-CoV-2. Ciò permette di aumentare il numero di campioni per corsa, riducendo i costi
- L'elevata profondità di lettura in ciascuna posizione e la coverage omogenea lungo l'intero genoma permettono di studiare la variabilità intra-ospite della popolazione virale

### IL PROTOCOLLO SISPA:

- E' fondamentale aumentare il numero di reads per campione al fine di garantire una profondità di lettura sufficiente per ottenere una sequenza consenso completa e corretta.
- Permette di ottenere il genoma completo solo a partire da campioni con elevata carica virale (ct <18)

\* Ct ottenuti mediante Real-time RT-PCR per gene E utilizzando gli oligonucleotidi sviluppati da Corman et al. (Eurosurveillance, 2020).

## ● Step futuri

---

- Verificare mediante sequenziamento Sanger le differenze nucleotidiche identificate tra le sequenze consenso dei campioni clinici ottenute mediante l'applicazione del protocollo TARGET e SISPA.
- Effettuare una prova di ripetibilità del protocollo target
- Verificare le performance del protocollo target in una piattaforma di sequenziamento alternativa (MinION – Oxford Nanopore) → in collaborazione con IZSAM (Teramo)



## Ringraziamenti

Erika Quaranta



Ambra Pastori



Annalisa Salviato



Isabella Monne



Adelaide Milani



Alessia Schivo

Valentina Panzarin, Alessio Bortolami, Francesco Bonfante