

SARS-CoV-2德尔塔变异株完整传播链及临床特征研究

华大智造ATOPlex技术和MGISEQ-2000测序平台助力破解Delta毒株基因组

广州医科大学附属市八医院、广州医科大学附属第一医院的科研人员基于华大智造ATOPlex技术平台和MGISEQ-2000测序仪，利用多重PCR扩增子建库技术对广州地区159例SARS-CoV-2 Delta VOC本地传播聚集性病例进行了病毒的识别、型别鉴定与溯源。

相关成果已于2021年发表在*EClinicalMedicine*杂志，题为Transmission, viral kinetics and clinical characteristics of the emergent SARS-CoV-2 Delta VOC in Guangzhou, China。

推荐应用：病原微生物 -SARS-CoV-2

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 新冠靶向测序专家

华大智造SARS-CoV-2扩增子建库技术、DNBSEQ测序平台以及配套分析软件，为新冠病毒的识别、型别鉴定与溯源提供强力保障。

• 适配自动化建库设备

华大智造的新冠靶向测序方案可适配自研的自动化设备，从而实现样本的高效提取及建库。



背景介绍

自新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 爆发以来, 全球有几种流行的 SARS-CoV-2 变异株对社会造成了相当沉重的经济负担¹。SARS-CoV-2 Delta 谱系 (B.1.617.2) 被世界卫生组织确定为需要被关注变异 (VOC) 的四种谱系之一, 其在一段时间内成为许多国家的主要毒株², 并继续进化和变异³。国内外卫生系统数据显示 Delta VOC 传播力强⁴, 但国内外尚未充分认识 Delta 变异株的传播链、病毒动力学和临床特征等。因此, 对新冠病毒流行趋势进行监测, 对病毒变异进行追踪, 对新型病毒做出预警显得极为重要。高通量测序技术能完美的解决相关问题且能为全球新冠疫苗株的推荐及抗病毒药物的使用提供数据支撑。

研究描述

2021 年 5 月 21 日至 2021 年 6 月 18 日，广州医科大学附属市八医院共确诊 159 例 Delta 病毒确诊病例，该院联合广州医科大学附属第一医院等单位针对此次疫情采用华大智造的 ATOplex 技术平台和 MGISEQ-2000 测序仪实现了新冠 Delta 病毒的识别、型别鉴定与溯源⁵。

实验方法

样本收集及 RNA 制备

本研究共收集 RT-PCR 检测中 Ct 值 <40 的 419 例拭子样本作为研究对象。其中 159 例为 Delta 病毒确诊病例，均来自 2021 年 5 月 21 日至 2021 年 6 月 18 日在广州医科大学附属市八医院确诊的 Delta 阳性患者；其余 260 例为野生型 SARS-CoV-2 感染病例，来自该院 2020 年 1 月至 2 月的确诊病例。样本在收集后两小时内利用核酸提取试剂盒进行 RNA 提取。

文库制备与测序

分别使用扩增子以及基于杂交捕获的方法进行测序文库制备，使用 ATOplex 新冠 RNA 多重 PCR 建库套装构建扩增子测序文库，杂交捕获的文库亦按之前的方案进行构建获得。

所有样本均在 MGISEQ-2000 平台上进行测序。SARS-CoV-2 基因组使用 nCoV Finder pipeline (https://github.com/BGI-IGRI/nCoV_Meta) 组装，使用华大智造 SARS-CoV-2 Multi-PCR v1.0 (https://github.com/MGI-tech-bioinformatics/SARS-CoV-2_Multi-PCR_v1.0) 对基于扩增子的测序数据和 nCoV Variant detection pipeline (https://github.com/BGI-IGRI/nCoV_Variants) 对基于混合捕获的测序数据进行分析以评估 SARS-CoV-2 突变。此研究中只报道测序深度超过 100X 的突变位点从而保证阳性重测样品中突变检测的可靠性。

系统进化树构建

从 GISAID 数据库 (<http://gisaid.org>) 下载具有代表性的 SARS-CoV-2 基因组序列作为参考序列。将 SARS-CoV-2 全基因组序列与上述参考序列进行比对，并使用 BioEdit 软件 (Version 7.0.5) 手工比对。基于 Kimura 双参数模型，利用 MEGA 6.0.6 程序构建了邻连接 (neighbor-joining, NJ) 系统进化树。Bootstrap 支持值由 1000 个伪复制树中计算获得。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
159 例 Delta 病毒确诊病例，260 例野生型 SARS-CoV-2 感染病例，共 419 例病患样本	<div> ATOplex 新冠 RNA 多重 PCR 建库套装 + 杂交捕获方案</div> <div> MGISEQ-2000 基因测序仪</div>	nCoV Finder pipeline SARS-CoV-2 Multi-PCR v1.0 nCoV Variant detection pipeline BioEdit 软件 MEGA 6.0.6	系统进化树构建

结果

Delta 病毒传播途径主要为近距离接触

该病毒传播网络显示出 157 名感染患者具有明确的传播链 (图 1)。每一代传播以不同颜色的菱形或圆圈表示。第一代患者 (黑色实线菱形, G1) 位于中间, G1 在系统发育上与 1 例输入性病例 (红色虚线菱形, G0) 相关, 彩色箭头表示不同的传播路径。传播方式包括聚餐、家庭、社区 (聊天、偶遇、乘电梯) 和其他方式 (工作、社交)。重症 (虚线) 和危重症 (实线) 用方形标记。星号表示患者位于其他城市。病毒传播途径主要为直接和间接近距离接触, 如饮食、家庭近距离接触和社区联系。通过饮食 (30.8%) 传播最多, 其次是家庭接触 (29.6%) 和社区传播 (18.2%)。每一代都能发现危重患者。在每一代中, 与第二代病毒株相比, 可以检测到系统发育相同的病毒株。

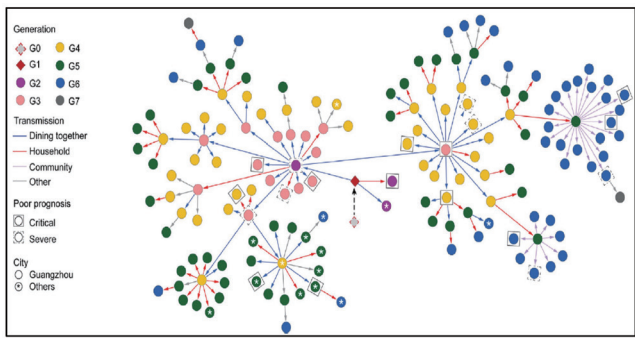


图1.广州市SARS-CoV-2 Delta变异株传播的流行病学传播网络

Delta 潜伏期更短、传播速度更快

图 2 显示了十八岁以下、十八至五十九岁和大于等于六十岁三个年龄组患者的绝对计数 (a) 和比例 (b)。箱形图 / 小提琴图显示了野生株 (深蓝色) 和 Delta 变异株 (土黄色) 在所有患者 (c)、非重症 (d)、重症 (e) 和危重症 (f) 患者之间的潜伏期差异, 通过 Wilcoxon 检验计算 $p < 0.001$ 。根据图 2 可知, Delta 变异株的潜伏期明显短于野生株 (4.0 天 vs 6.0 天, $p < 0.001$); 在非重症组中, Delta 变异株的潜伏期亦明显短于野生株 (4.0 天 vs 7.0 天, $p < 0.001$)。此外, Delta 变异株的传播速度快, Delta 变异株在短短十天内传播了四代, 其中最短的代际传播不超过一天。

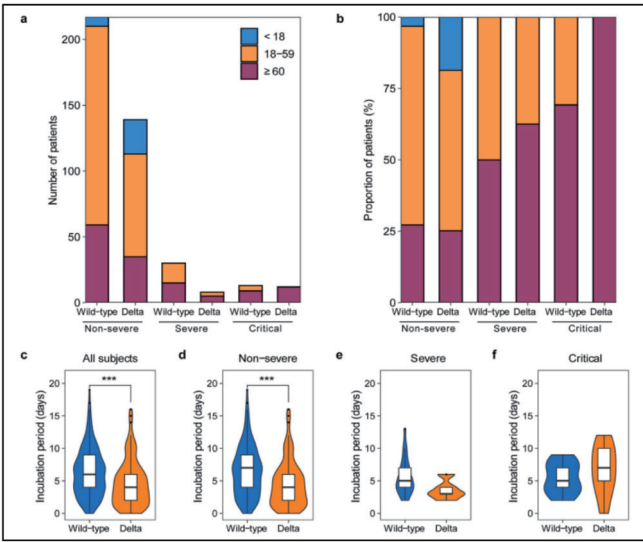


图2.SARS-CoV-2野生株及Delta变异株感染者的潜伏期

Delta 病毒载量更高

如图 3 箱形图 / 小提琴图显示了住院期间最高病毒载量的 Ct 值，与野生株感染患者相比，Delta 变异株的总体 (a)、非严重 (b)、严重 (c) 和危重 (d) 患者的 Ct 值明显上移。在箱线图中，最接近零的方框边界为 25% 分位数，方框内的黑线表示中位数，距离零最远的方框边界表示为 75% 分位数。为显示感染野生型或 Delta VOC 患者的 Ct 值动态，首先计算每一天的算术平均值 (圆点) 和标准误差 (彩色范围)，然后计算连续三天的移动平均值所有受试者 (e) 和具有不同疾病严重程度的患者 (f、h)。病毒载量由 ORF1a/b 基因的 Ct 值表示。

如图 3 所示，比起野生株，Delta 变异株具有较高的病毒载量 (Ct 值中位数 20.6 vs 34.0; $p < 0.001$)，在非重症、重症和危重症患者中此趋势一致。Delta 变异株感染者核酸转阴时间 (Ct 值 >40) 也更长。

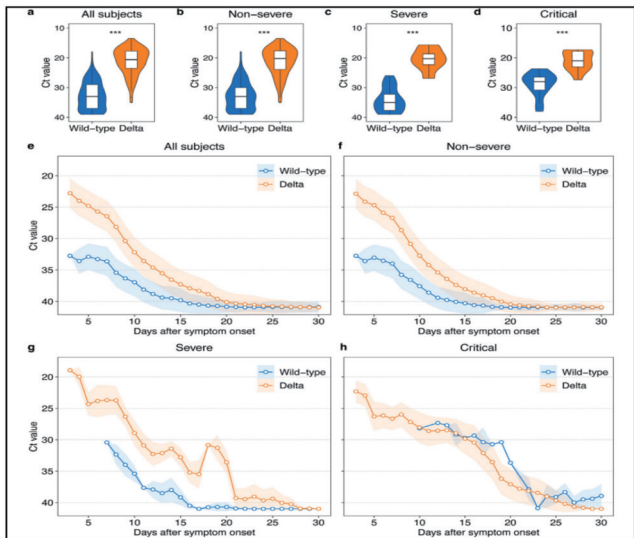


图3.SARS-CoV-2野生株及Delta变异株感染者的病毒载量峰值及动态变化

60 岁以上患者重症风险更高

图 4 显示了 60 岁和 小于 60 岁患者从症状发作到按病毒谱系 (Delta 变异株与野生株) 分类的危急状态时间的 Kaplan-Meier 生存图。单因素分析表明，年龄、性别、合并症 (包括慢性呼吸道疾病、高血压、糖尿病) 和入院 3 天内的症状 (包括发热、呼吸困难) 与病情恶化相关 ($p < 0.05$)。多变量 Cox 回归分析显示 Delta 变异株感染 (HR 2.98 [95%CI 1.29-6.86])、年龄大于 60 岁 (HR 11.13 [95%CI 3.78-32.82])、男性 (HR 3.49 [95%CI 1.45 - 8.41])、呼吸困难 (HR 2.60 [95%CI 1.14-5.93]) 和入院 3 天内发热 (HR 4.77 [95%CI 1.10-20.64]) 是与病情恶化相关的独立危险因素。

在危重症患者中感染 Delta 变异株的所有患者年龄都 ≥ 60 岁，而在野生株中，这一比例只有 69%。其中，感染 Delta 变异株发展为危重症的风险是感染野生型的 2.98 倍。可以认为，老年患者感染 Delta 变异株后更容易发展至危重症。

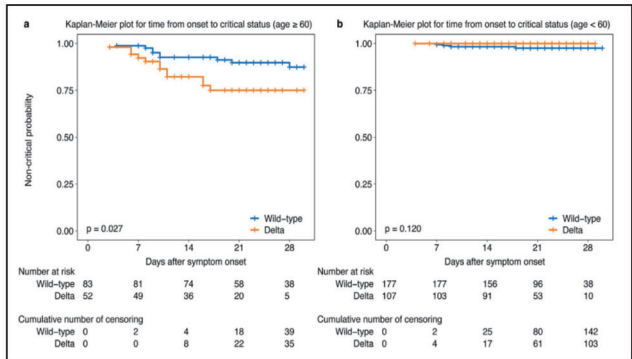


图4.预后因素的 Kaplan-Meier 生存图的病毒载量峰值及动态变化

总结

针对此次疫情，广州医科大学附属市八医院、广州医科大学附属第一医院等采用华大智造自主研发的 ATOplex 技术平台和 MGISEQ-2000 测序仪的测序组合产品成功实现对新冠 Delta 病毒全基因组的测序、比对、分型和溯源，为全国乃至全球进一步抗击病毒、防控疫情提供了可靠的理论依据和先进经验。

华大智造研发的 MGISEQ-2000 测序仪具有的高通量测序技术能够实现对新冠病毒流行趋势的快速监测、对病毒变异进行追踪。同时，华大智造提供自动化、信息化的新冠样本核酸处理，能在大幅缩短病毒核酸提取时间的情况下，满足快速、自动及安全防控的需求。



基因测序仪 MGISEQ-2000RS

参考文献

1. Soria A, Galimberti S, Lapadula G, et al. The high volume of patients admitted during the SARS-CoV-2 pandemic has an independent harmful impact on in-hospital mortality from COVID-19[J]. *PLoS ONE*, 2021, 16(1): e0246170.
2. <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>. Accessed on July 28, 2021.
3. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-sopening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-2-july-2021>.
4. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill* 2021; 26: 2100509.
5. Wang, Y., Chen, R., Hu, F., Lan, Y., Yang, Z., Zhan, C., ... & Tang, X. (2021). Transmission, viral kinetics and clinical characteristics of the emergent SARS-CoV-2 Delta VOC in Guangzhou, China. *EClinicalMedicine*, 40, 101129.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT 生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
	metargetCOVID	970-000228-00
建库试剂	ATOPlex RNA 多重 PCR 建库试剂盒套装 V3.1 (16 RXN)	940-000132-00
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE100)	1000012552

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有，未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2022年10月版

撰稿：韦颖 卫焰杰

责任编辑：王其伟

审稿：江遥