



## توالی یابی نسل جدید برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2

وحیده حمیدی صوفیانی: دانشجوی دکتری تخصصی ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران  
پریسا زینالی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

✉ **عماد بهبودی:** دانشجوی دکتری تخصصی ویروس‌شناسی پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران (\* نویسنده مسئول)  
emadbhoubodi69@gmail.com

### نامه به سردبیر

#### سردبیر محترم

توالی یابی نسل جدید (NGS) یک فناوری توالی یابی موازی انبوه است که توان عملیاتی، مقیاس پذیری و سرعت فوق العاده بالایی را ارائه می‌دهد. این فناوری برای تعیین ترتیب نوکلئوتیدها در کل ژنوم یا مناطق هدف DNA یا RNA استفاده می‌شود. NGS علوم زیستی را متحول کرده است و به آزمایشگاه‌ها اجازه می‌دهد تا کارهای متنوعی را انجام دهند و سیستم‌های بیولوژیکی را در سطحی که قبلاً ممکن نبوده مطالعه کنند. تکنولوژی توالی یابی نسل جدید در بسیاری از آزمایشگاه‌ها در سرتاسر جهان برای بررسی‌های ساختمان ژنتیکی به کار می‌رود اما تاکنون این تکنولوژی در تشخیص بیماری‌های عفونی به ندرت مورد استفاده قرار گرفته است. اکثر روش‌های توالی یابی نسل جدید مبتنی بر فرآیند خاتمه زنجیره هستند. بدین ترتیب که با اضافه کردن دی‌توکسی نوکلئوتید لیبل شده با فلوروسانت واکنش PCR خاتمه می‌یابد و خوانش توالی صورت می‌گیرد (۱). این تکنولوژی امکان نقشه برداری کل ژنوم را با هزینه مقرون به صرفه ارائه می‌دهد. در حال حاضر پاندمی کووید ۱۹ و ویروس سارس کورونایروس ۲ عامل این بیماری که دارای تغییرات ژنومی زیاد است و باعث رخدادهای غیر معمول در بالین می‌شود بیش از پیش توجه دانشمندان را به سمت سطوح بالاتری از بررسی‌های ژنتیکی جلب نموده است (۲، ۳). تکنیک توالی یابی نسل جدید در به دست آوردن اطلاعات ضروری در مورد یک پاتوژن در ابتدای شیوع عفونی مفید است و می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی برای عفونت کووید ۱۹ استفاده شود (۴) و همچنین می‌تواند در شناسایی دقیق عفونت همزمان در بیماران کووید ۱۹ مفید واقع شود. اپیدمیولوژی ژنومی سارس کورونایروس ۲ منجر به شناسایی چندین جهش از سویه اصلی ووهان-سارس کورونایروس ۲ شده است. در طول بهار سال ۲۰۲۰، یک جهش غیر مترادف که منجر به جایگزینی پروتئین D614G در اسپایک ویروس می‌شود در توالی‌های گزارش شده غالب شد و در نتیجه میل ترکیبی بالاتر برای گیرنده ACE2، تکثیر ویروسی را تقویت کرد. از تابستان ۲۰۲۰، ظهور انواع اصلی ویروسی مشاهده شده است (۵). مشخص شده است که این گونه‌ها مسئول اپیدمی‌های متوالی در مناطق مختلف جغرافیایی هستند. موارد عفونت مجدد با ژنوتیپ‌های سارس کورونایروس ۲ متفاوت از ژنوتیپ‌هایی که برای اولین بار بیماران را آلوده کرده‌اند نیز ثبت شده است (۶). به منظور ردیابی تکامل ویروس در طول زمان، بسیاری از آزمایشگاه‌ها ژنوتیپ ویروس را بررسی کرده‌اند. آزمایشگاه‌های مجهز به قابلیت توالی یابی کل ژنوم، تعداد زیادی جهش را گزارش کرده‌اند که در طول زمان افزایش یافته است. با این حال، تفاوت‌های قابل توجهی بین کشورها وجود دارد و در برخی موارد هیچ پایگاه داده‌ای در مورد ویروس‌های در گردش وجود ندارد (۷). تجزیه و تحلیل جهش‌های سارس کورونایروس ۲ به ویژه زمانی که اپی‌توپ‌های دخیل در القای پاسخ‌های ایمنی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند بسیار مهم است، زیرا ممکن است منجر به فرار ایمنی، با پیامدهای بالقوه برای اثربخشی واکسن (و ایمونوتراپی) شود. چنین رویدادی می‌تواند برای یک منطقه جغرافیایی مشخص، شاهی از افزایش انتقال مرتبط با یک سری جهش‌های مرتبط با عملکرد باشد. گونه‌های سارس کورونایروس ۲ داشتن مجموعه‌ای از جهش‌های مرتبط با پاتوژن ویروس تعریف می‌شوند و بسیاری از گونه‌های آن اکنون توسط سازمان جهانی بهداشت و سایر آژانس‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان به دقت تحت نظارت هستند (۸). واریانت‌ها ممکن است مستقیماً با دودمان مطابقت داشته باشند زیرا با شرایط یکسان گسترش می‌یابند، اما برخی از گونه‌ها اینطور نیستند (مثلاً E484K-B.1.1.7 یک واریانت است، اما با یک اصل و نسب خاص مطابقت ندارد زیرا بارها به طور مستقل تکثیر شده است). تعدادی از انواع نگران کننده (VOCs) توسط WHO ثبت شده است، که می‌توان به واریانت آلفا (B.1.1.7)، با

۲۳ جهش (۱۳ جهش غیر مترادف، چهار حذف و شش جهش مترادف)، و با قابلیت انتقال بیشتر و افزایش مرگ و میر؛ و واریانت بتا (B.1.351)، گاما، دلتا و امیکرون BA-1 و BA-2 با ۳۰ جهش در اسپایک اشاره نمود. برخی از همین جهش‌ها اخیراً نیز با اثربخشی کم واکسن مرتبط دانسته شده‌اند. همچنین از انواع واریانت‌های مورد توجه (VOIs) میتوان به مو و لامبدا اشاره کرد. رخداد عفونت‌های همزمان باکتریایی و ویروسی مرسوم است و شناخت عفونت همزمان در به کارگیری پروسه درمان مناسب برای غلبه به بیماری می‌تواند کمک کننده باشد. توالی یابی نسل جدید شامل تکنیک‌های مختلفی میباشد که می‌توان به Shotgun, Nanopore Metagenomics, Target enrichment, Illumina, Ion torrent اشاره کرد. این تکنیک‌ها به‌عنوان رویکردی جدید در تشخیص کرونا و ویروس‌ها محسوب می‌شوند (۱). اما قابل ذکر است که هر یک از آنها مزایای متفاوتی در فرآیند تشخیص دارند. به عنوان مثال Shotgun Metagenomics می‌تواند حضور پاتوژن جدیدی که شناخته شده نیست، را تایید کند و بر این اساس آنالیزهای ژنوتایپینگ و آنالیز واریانت‌های مختلف روی عامل پاتوژن جدید قابل انجام خواهد بود (۸). این در حالیست که Target enrichment با شناسایی وجود ویروس کرونا و سایر ویروس‌های تنفسی کلیدی در یک نمونه با استفاده از پنل ویروس‌های تنفسی، نمونه هدف را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (۹). در این بین Nanopore assay روشی است که برای تصحیح خطا مورد استفاده قرار می‌گیرد بدین ترتیب که با مقایسه نسخه‌های ژنوم متعدد ترکیب شده در یک ترکیب واحد و با تجزیه و تحلیل خوانش‌های تولید شده از رشته‌های مثبت و منفی نرخ خطای هر خوانش را کاهش می‌دهد. Ion torrent از دیگر روش‌های توالی یابی است که نوعی فناوری توالی یابی نیمه هادی محسوب می‌شود و دارای تراشه‌ای است که خاصیت pH متری حساسی دارد و یون‌های هیدروژن آزاد شده طی ردیف شدن نوکلئوتیدها جهت سنتز زنجیره ژنومی را شناسایی می‌کند. با اینحال روش‌های اشاره شده از برخی جنبه‌های دیگر از یکدیگر متمایز هستند، یکی از پارامترهایی که در روش‌های بیان شده متفاوت است، آستانه حد تشخیص می‌باشد که تحت عنوان (LOD) نیز شناخته می‌شود (۱۰). به طوری که در روش Illumina پارامتر حد تشخیص، کمتر از ۵۰۰ کپی در هر میلی لیتر بیان شده است و در Ion torrent و Nanopore assay میزان حد تشخیص بیان شده به ترتیب ۲۰ کپی و ۱۰ کپی در هر واکنش می‌باشد. همه‌گیری کووید-۱۹ باعث تلاش‌های بی‌سابقه‌ای برای کشورها شده است. توسعه استراتژی‌های نظارتی مؤثر بر اساس تعیین توالی ژنوم عامل ایجاد کننده کووید ۱۹ با بیش از ۱۰۰۰۰۰ ژنوم کامل در مخازن اختصاصی مانند EpiCov سپرده شده است و دانشمندان این داده‌ها را پرورش داده‌اند. مطالعات در مورد پویایی تکاملی ویروس، و شناسایی انواع مرتبط بالینی با تکنیک‌ها و تجهیزات مختلف انجام شده است و بر این اساس میتوان بدین نتیجه رسید که روش‌های بیان شده دارای حساسیت‌های تشخیصی متفاوتی هستند که بسته به هدف انجام مطالعات محققان می‌توانند به انتخاب یکی از روش‌های اشاره شده بپردازند. اگر چه در گذشته NGS برای تشخیص موتاسیون‌های بیماری اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون کاملاً موفق گزارش نشده است ولی با وجود موارد اشاره شده و به واسطه‌ی شناخت پتانسیل عظیم کاربردهای توالی یابی نسل جدید این احتمال وجود دارد که تکنیک‌های مختلف ذکر شده‌ی توالی یابی نسل جدید به زودی به اولین رویکرد تشخیصی در آزمایشگاه‌های بالینی تبدیل شوند و از آنجایی که با پاندمی کووید ۱۹ مواجه هستیم تکنیک توالی یابی نسل جدید می‌تواند به عنوان رهیافت تشخیصی امیدوار کننده‌ای مدلل شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Hamidi-Sofiani V, Zeynali P, Behboudi E. Next Generation Sequencing for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection. Razi J Med Sci. 2022;29(1):23-27.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



## Letter to The Editor

### Next Generation Sequencing for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection

**Vahideh Hamidi-Sofiani:** Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

**Parisa Zeynali:** Department of Biochemistry and Biophysics, Metabolic Disorders Research Center, School of Medicine, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

**Emad Behboudi:** Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran (\* Corresponding author) emadbehboudi69@gmail.com

#### Letter to The Editor

##### Dear Editor

Next-Generation Sequencing (NGS) is a massive parallel sequencing technology that offers ultra-high throughput, scalability, and speed. This technology is used to determine the order of nucleotides throughout the genome or target regions of DNA or RNA. NGS has revolutionized the biological sciences, allowing laboratories to perform a variety of applications and study biological systems at a level that was not previously possible. Next generation sequencing technology is used in many laboratories around the world to study genetic structure, but so far this technology has rarely been used to diagnose infectious diseases. Most next generation sequencing methods are based on the chain termination process. Thus, with the addition of deoxy-nucleotide labeled with fluorescent ends the PCR reaction and sequence reading is performed (1). This technology makes it possible to map the entire genome at an affordable cost. Currently, the COVID-19 pandemic and SARS-CoV-2, the causative agent of this disease, which has many genomic changes and causes unusual occurrences in the clinic, has increasingly attracted the attention of scientists to higher levels of genetic studies (2, 3). The next generation sequencing technique is useful in obtaining essential information about a pathogen at the beginning of an infectious outbreak and can be used as a diagnostic method for COVID-19 infection (4) and can also be useful in accurately identifying concurrent infections in COVID-19 patients. The genomic epidemiology of SARS-CoV-2 has led to the identification of several mutations in the Wuhan SARS-CoV-2 strain. During the spring of 2020, a non-synonymous mutation leading to the replacement of the D614G in Spike protein dominated the reported sequences, resulting in a higher affinity for the ACE2 receptor, enhancing viral replication. Since the summer of 2020, the emergence of major viral variants has been observed (5). These variants have been shown to be responsible for successive epidemics in different geographical areas. Cases of re-infection with SARS-CoV-2 genotypes different from genotypes that first infected patients have also been reported (6). In order to track the evolution of the virus over time, many laboratories have examined the genotype of the virus. Laboratories equipped with the ability to sequence the entire genome have reported a large number of mutations that have increased over time. However, there are significant differences between countries and in some cases, there is no database of circulating viruses (7). Analysis of SARS-CoV-2 mutations is especially important when the epitopes involved in inducing host immune responses affect the host, as they may lead to immune escape, with potential implications for vaccine (and immunotherapy) efficacy. Such an event could be evidence of an increase in transmission associated with a series of performance-related mutations for a given geographic area. SARS-CoV-2 species are defined by a set of mutations associated with the pathogenesis of the virus, and many species are now closely monitored by the World

Health Organization and other public health agencies around the world (6). Variants may be directly related to lineage because they spread under the same conditions, but some species do not (e.g. B.1.1.7 - E484K is a variant, but does not conform to a particular lineage because it reproduces independently many times). A number of variants of concern (VOCs) have been categorized by the WHO, which can be recognized as the alpha variant (B.1.1.7), which has 23 mutations (13 non-synonymous mutations, four deletions, and six synonymous mutations), and more transferability and increased related mortality; beta variants (B.1.351), Gamma, Delta, and Omicron BA-1 and BA-2 with 30 mutations in Spike mentioned. Some of these mutations have recently been linked to low vaccine efficacy. Mu and Lambda can also be mentioned as variants of interest (VOIs). Co-occurring bacterial and viral infections are common, and recognizing co-infection can be helpful in applying the appropriate treatment process to overcome the disease. The next generation sequencing involves a variety of techniques, including Illumina, Ion torrent, Target enrichment, Nanopore, Metagenomics Shotgun. These techniques are considered a new approach in the diagnosis of coronaviruses (1). But it is worth noting that each of them has different advantages in the diagnosis process. For example, Shotgun Metagenomics can confirm the presence of a new pathogen that is not known, and based on this, genotypic analyzes and analysis of different variants on the new pathogen can be performed (8). Target enrichment, on the other hand, evaluates the target sample by identifying the presence of coronavirus and other key respiratory viruses in a sample using the respiratory virus panel (9). Nanopore assay, meanwhile, is a method used to correct the error by reducing the error rate of each reading by comparing multiple genome versions combined into a single combination and by analyzing readings generated from positive and negative strands. Gives. Ion torrent is another sequencing method that is a kind of semiconductor sequencing technology and has a chip that has a sensitive pH sensor and identifies the hydrogen ions released during the alignment of nucleotides for the synthesis of the genomic chain. However, the mentioned methods are different from some other aspects, one of the parameters that are different in the expressed methods is the detection threshold, which is called (LOD) (10). In Illumina method, the detection limit parameter is less than 500 copies per milliliter, and in ion torrent and Nanopore assay, the detection limit is 20 copies and 10 copies per reaction, respectively. The COVID-19 epidemic has sparked unprecedented efforts for nations. The development of effective monitoring strategies is based on sequencing the genome of the causative agent with more than 100,000 complete genomes deposited in dedicated repositories such as EpiCov, and scientists have developed this data. Studies on the evolutionary dynamics of the virus, and the identification of clinically relevant types with different techniques and equipment have been performed, and based on this, it can be concluded that the methods have different diagnostic sensitivities that depend on the purpose of the study, researchers can choose one. Pay attention to the mentioned methods. Although NGS has not been completely successful in diagnosing congenital glycosylation disorders in the past, given the enormous potential of next-generation sequencing applications, it is likely that the various next-generation sequencing techniques mentioned will soon become the first diagnostic approach in clinical laboratories, and since pandemic, we expect the next generation sequencing technology could be a promising diagnostic approach.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

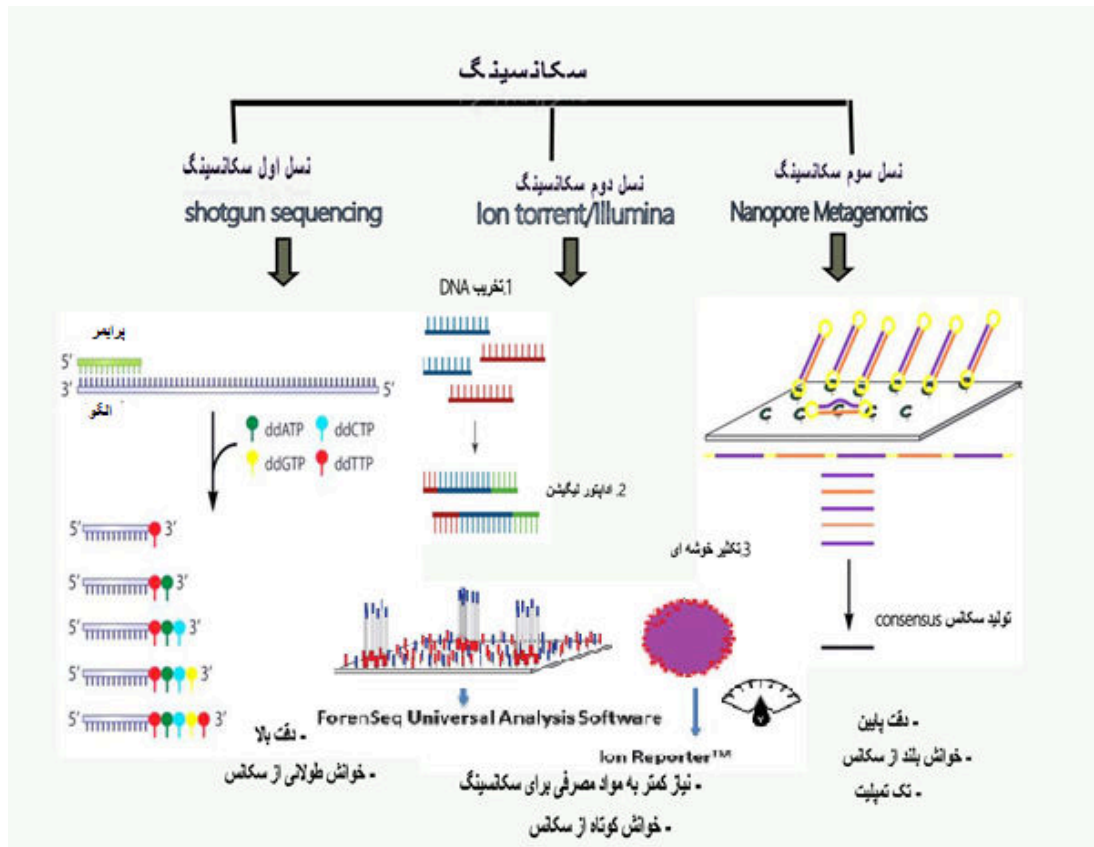
#### Cite this article as:

Hamidi-Sofiani V, Zeynali P, Behboudi E. Next Generation Sequencing for Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection. *Razi J Med Sci.* 2022;29(1):23-27.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

Received: 29/01/2022

Published: 03/04/2022



## References

1. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;43(2).
2. Zandi M, Behboudi E, Soltani S. Role of glycoprotein hemagglutinin-esterase in COVID-19 pathophysiology? *Stem Cell Rev Rep.* 2021;1-2.
3. Behboudi E, Hamidi-Sofiani V, Zeynali P. Review of Therapeutic Candidates for the New Corona Virus (COVID-19). *Razi J Med Sci.* 2020;27(8):65-77.
4. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265-9.
5. Behboudi E, Hamidi-Sofiani V. New mutations causing the 2019 novel Coronavirus (2019-nCoV) epidemic. *Tehran Univ Med J.* 2020;78(3):188.
6. Behboudi E, Hamidi V, Gholizadeh F, Grala EM, Ghelmani Y, Nakhaie M, et al. Association between ABO blood groups and rhesus antigen and susceptibility to COVID-19 in the Yazd hospital. *New Microbes New Infect.* 2021;44:100934.
7. Moore SC, Penrice-Randal R, Alruwaili M, Dong X, Pullan ST, Carter DP, et al. Amplicon based

MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomic characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19. *medRxiv.* 2020:2020.03.05.20032011.

8. <https://emeaillumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/ngs-coronavirus-app-note-1270-2020-001.pdf>.

9. <https://www.nature.com/articles/d42473-020-00120-0>.

10. McNaughton AL, Roberts HE, Bonsall D, de Cesare M, Mokaya J, Lumley SF, et al. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Sci Rep.* 2019;9(1):7081.