

Προσδιορισμός μεταλλαγμένων στελεχών του SARS-CoV-2 σε δείγματα λυμάτων στην Αττική μέσω νέας μοριακής μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε στο ΕΚΠΑ

Στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), μέσω της συνεργασίας Ερευνητικών Μονάδων των Τμημάτων Βιολογίας, Ιατρικής και Χημείας, στο πλαίσιο έρευνας με επιστημονικό υπεύθυνο τον Καθηγητή **Ανδρέα Σκορίλα**, έχει αναπτυχθεί νέα μοριακή μεθοδολογία ευαίσθητης ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των μεταλλαγμένων στελεχών/παραλλαγών του SARS-CoV-2 σε δείγματα λυμάτων με χρήση μιας σειράς μοριακών μεθόδων και αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing/NGS).

Η συγκεκριμένη υπερευαίσθητη μεθοδολογία είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι δείχνει την παρουσία και την εκατοστιαία αναλογία των μεταλλαγμένων στελεχών στο σύνολο του πληθυσμού μιας πόλης. Επιπλέον, ανιχνεύει έγκαιρα, εντός 2 ημερών, νέες μεταλλάξεις και στελέχη/παραλλαγές που μόλις άρχισαν να εισέρχονται στον πληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό γίνεται με μεγαλύτερη ευκολία και αξιοπιστία η γονιδιωματική επιτήρηση των νέων στελεχών/παραλλαγών του SARS-CoV-2, καθώς και άλλων ιών ή βακτηρίων, δίνοντας την αναγκαία πληροφόρηση για την επιδημιολογική επιτήρηση καθώς και τον ανασχεδιασμό των νέων εμβολίων και φαρμακευτικών πρωτοκόλλων.

Η μεθοδολογία πληροί τις προϋποθέσεις της από 15-3-2021 σχετικής σύστασης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την κοινή προσέγγιση κατά τη δημιουργία συστηματικής επιτήρησης του SARS-CoV-2 και των παραλλαγών του στα λύματα. Επιπροσθέτως, ανιχνεύει εγκαίρως νέα στελέχη/παραλλαγές που αρχίζουν να εισέρχονται στην κοινότητα.

Το σχετικό άρθρο με τίτλο "Novel Nested-Seq Approach for SARS-CoV-2 Real-time Epidemiology and In-depth Mutational Profiling in Wastewater" δημοσιεύτηκε στο έγκριτο διεθνές επιστημονικό περιοδικό "International Journal of Molecular Sciences", ενώ έχει κατατεθεί από το ΕΚΠΑ αίτηση για χορήγηση Εθνικού και Διεθνών Διπλωμάτων Ευρεσιτεχνίας.

Με την εφαρμογή της νέας μεθοδολογίας από διεπιστημονική ομάδα του ΕΚΠΑ που αποτελείται από τους **Ανδρέα Σκορίλα, Νικόλαο Θωμαΐδη, Μαργαρίτη Αυγέρη, Αθηνά Μάρκου, Εύη Λιανίδου, Δημήτριο Γουργιώτη, Θεοδώρα Ψαλτοπούλου, Παναγιώτη Αδαμόπουλο, Λάμπρο Δημητρακόπουλο, Κατερίνα Γαλάνη, Μάριο Διαμαντόπουλο, Μάριο Κωστάκη, Κατερίνα Κοντού, Βασίλη Καπέ, Νικόλαο Βούλγαρη και Θάνο Δημόπουλο** (Πρύτανης ΕΚΠΑ), έχει ολοκληρωθεί η ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών του SARS-CoV-2 σε δείγματα λυμάτων της Περιφερειακής Ενότητας Αττικής, που συλλέχθηκαν σε καθημερινή βάση κατά το διάστημα 01-26/12/2021 από το Κέντρο Επεξεργασίας Λυμάτων της Ψυττάλειας (ΚΕΛΨ). Τα συγκεκριμένα δείγματα υπεβλήθησαν σε έλεγχο ειδικών μεταλλάξεων - γενετικών δεικτών (genetic markers) ολόκληρου του γονιδίου S (Spike) (>50 γενετικοί δείκτες) για τις παραλλαγές ειδικού ενδιαφέροντος (Variants of Concern - VOC) και τις παραλλαγές υπό διερεύνηση (Variants of Interest – VOI).

Ευρήματα:

α. Δείγματα διαστήματος 1-15/12/2021

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν την επικράτηση του στελέχους Delta (B.1.617.2 lineage) σε ποσοστό >99%.

Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε η παρουσία ειδικών μεταλλάξεων (genetic markers):

- Στέλεχος Delta (B.1.617.2 lineage) σε ποσοστό >99% επί του συνόλου των αλληλουχιών.
- Δεν ανιχνεύθηκαν ειδικοί γενετικοί δείκτες του στελέχους Omicron (B.1.1.529 lineage)
- Δεν ανιχνεύθηκαν ειδικές μεταλλάξεις των VOC: Beta (B.1.351) και Gamma (P.1), καθώς και των VOI: Mu (B.1.621) και Lambda (C.37)

β. Δείγματα διαστήματος 16-26/12/2021

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν τη **σημαντική αύξηση του ποσοστού γενετικών δεικτών του στελέχους Omicron (B.1.1.529 lineage) σε ποσοστό 34,4%, και την ταυτόχρονη σημαντική μείωση των αντίστοιχων γενετικών δεικτών του στελέχους Delta (B.1.617.2 lineage).**

Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε:

- η παρουσία ειδικών μεταλλάξεων (genetic markers) του τμήματος “receptor-binding domain/RBD” της Spike του στελέχους Omicron (B.1.1.529 lineage) σε ποσοστό 34,4% (γενετικοί δείκτες: G339D, S371L, S373P, K417N, N440K, G446S)
- η παρουσία ειδικών μεταλλάξεων (genetic markers) εκτός του RBD τμήματος της Spike του στελέχους Omicron (B.1.1.529 lineage) σε ποσοστό 7,9% (γενετικοί δείκτες: P681H, N856K, N969K, L981F)
- Δεν ανιχνεύτηκαν ειδικές μεταλλάξεις των VOC: Beta (B.1.351) και Gamma (P.1) καθώς και των VOI: Mu (B.1.621) και Lambda (C.37)

Επιπροσθέτως, για την εκτίμηση της ημερήσιας μεταβολής μερικών ανευρεθέντων και επιβεβαιωμένων με τη μέθοδο αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) γενετικών δεικτών μεταλλαγμένων στελεχών στα λύματα, έγινε ανάλυση με πέντε διαφορετικές RT-PCR μεθοδολογίες. Οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες επιτρέπουν την ανίχνευση των μεταλλάξεων: α) N501Y (στελέχη A, B, Γ, Ο), β) delH69/V70 (στελέχη A, Ο), γ) K417N (στελέχη B, Ο), δ) K417T (στέλεχος Γ), και ε) P681R (στελέχη Δ, Κ). **Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει ότι το στέλεχος/παραλλαγή Όμικρον ανιχνεύεται στα δείγματα από 20 έως 23 Δεκεμβρίου, ενώ στα δείγματα από 24 έως 28 Δεκεμβρίου παρατηρείται σημαντική αύξηση.**

Τα συνολικά ευρήματα της γονιδιακής ανάλυσης δείχνουν ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος Omicron εμφανίζει έντονη δυναμική επικράτησής του στην κοινότητα με σταδιακή αντικατάσταση του μέχρι σήμερα επικρατούντος στελέχους Delta. Ταυτόχρονα, η αλληλούχηση του γονιδιώματος του ιού αναδεικνύει σημαντική μεταβλητότητα της ποσοστιαίας αναλογίας ειδικών μεταλλάξεων του γονιδίου S που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Spike υπογραμμίζοντας τη διαφορετική σημασία και βαρύτητα αυτών στη συμπεριφορά του ιού, καθώς και στον αξιόπιστο και ειδικό προσδιορισμό του.