



Podrobná zpráva ke dni 22. 10. 2021

Charakterizace viru SARS-CoV-2 v České republice dle diskriminačních PCR a celogenomové sekvenace

Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění, SZU

Úvod:

NRL pravidelně analyzuje data a poskytuje MZČR i laboratořím týdenní přehledový dokument, jehož cílem je monitorovat šíření variant SARS-CoV-2, které se na území ČR vyskytují, poskytovat informace o nových potenciálních i reálných rizicích v souvislosti s šířením a evolucí viru SARS-CoV-2, poskytovat metodické pokyny vyšetřujícím laboratořím a poskytovat další kvalitativní i kvantitativní informace s cílem připravit na datech založené poklady pro laboratorní šetření a adekvátní nastavení protiepidemických opatření v ČR.

Obsah:

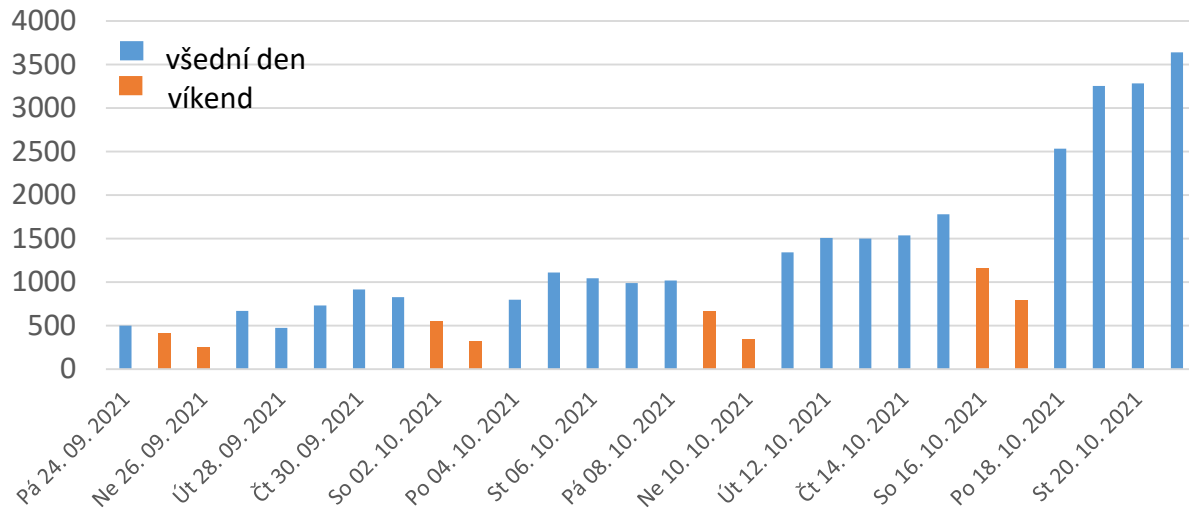
Souhrn a epidemiologický přehled	Strana 2 – 4
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 5
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 6 – 8
In silico analýza	Strana 9 - 10
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 11 – 17
Závěr	Strana 18

- V období od 8. 10. do 22. 10. 2021 má NRL k dispozici data z 19 793 provedených testů diskriminační PCR z celkem 81 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 93,7 % pozitivních případů (viz tab. 1).
- Za rok 2021 bylo k 22. 10. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 10 347 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 527 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 22. zářím a 22. říjnem.
- Přehled aktuální epidemiologické situace:
V ČR bylo za posledních 14 dní (tj. od **8. 10. do 21. 10. 2021**) zachyceno **24 334** případů SARS-CoV-2 pozitivních osob, s denním průměrem **1738,1** případů, což představuje 14denní incidenci **227,4** na 100 000 obyvatel. Vývoj počtu případů v delším časovém horizontu zobrazují grafy 1 a 2. Za uvedené období bylo nahlášeno **1 027** hospitalizací. Celkový počet hospitalizací ke konci sledovaného období činí **771** osob, z toho **136** osob s vážným průběhem. Nejvyšší 7denní incidence covid-19 je aktuálně hlášena v okresech České Budějovice a Ostrava-město, podrobně uvádí situaci graf 3.

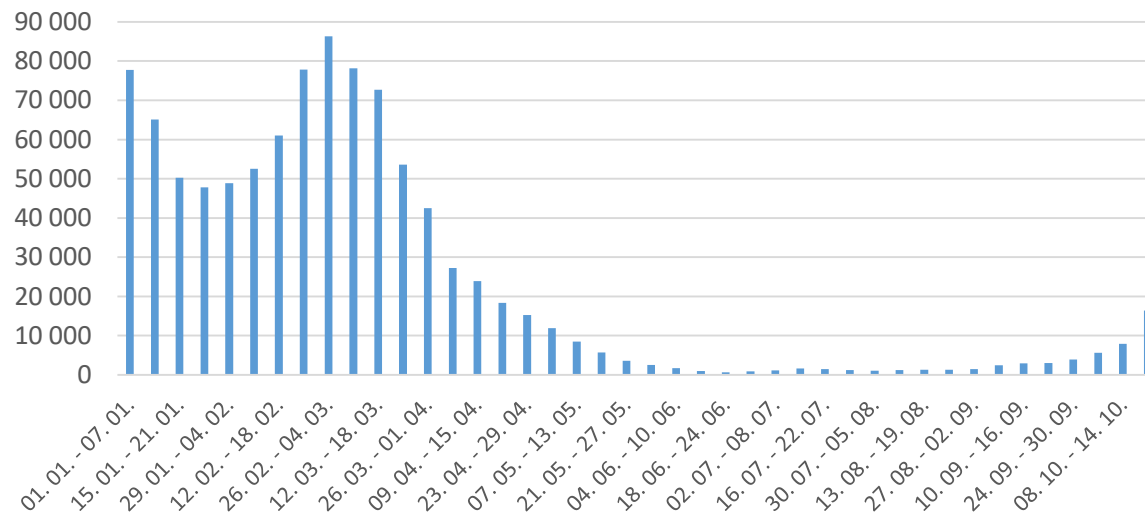
Upozornění:

- **26.10.2021 se koná online konzultační den – covidový speciál**, informace alena.janypkova@szu.cz

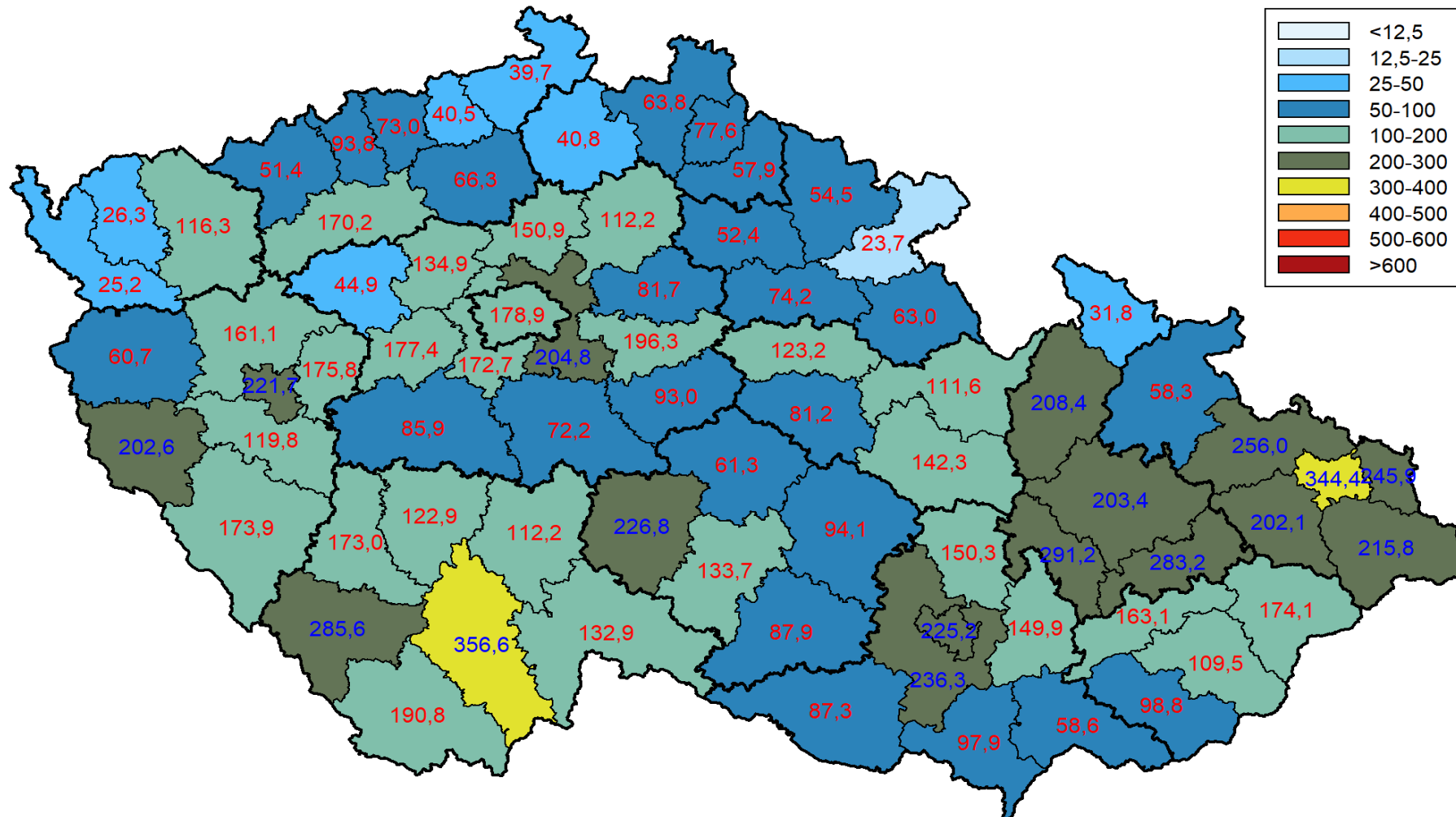
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 21. 10. 2021



Graf 3: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 21. 10. 2021



V období od 8. 10. do 22. 10. 2021 má NRL k dispozici data z 19 793 provedených testů diskriminační PCR z celkem 81 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 93,7 % pozitivních případů (viz tab. 1).

Tabulka 1: **Přehled zachycených mutací**

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl ze sady	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	18 939	17 745	93,7 %	delta, delta+
E484K+	14 754	14	0,1 %	beta, gama, alfa E484K+, delta+
L452R+, E484K+	14 589	5	0,03 %	delta+
N501Y+, L452R+	4 791	5	0,1 %	delta+
A570D+	4 051	39	1 %	Alfa, nebo delta + A570D (malá pravděpodobnost, zatím necelých 200 WGS delta + A570D v GISAID)

Diskriminační PCR:

Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků je zmírněna na:

- 1. Minimum – vždy povinné L452R, v případě nedostatku kapaci je možné takto vyšetřovat pouze každý třetí vzorek**
- 2. Je možné vyšetřovat L452K v multiplexní PCR společně s „diagnostickou PCR“, pokud je daná souprava v tomto smyslu certifikována a pokud limit detekce je $LOD \leq 10$ kopií RNA/ 5 – 10 ul (tedy na reakci)**
- 3. Na sekvenaci posílejte vždy L452R negativní vzorky**
- 4. E484K je možné vyšetřovat pouze u L452R negativních vzorků a to jedenkrát za týden**
- 5. Rozšířené spektrum mutací doporučených ke sledování se nemění. Např:**
 - Možnost : E484K a L452R a N501Y
 - Možnost : E484K a L452R a N501Y a K417N
 - Možnost : E484K, L452R, N501Y, K417N a P681R

WHO doporučení: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343775>

Dle fylogenetické analýzy a analýzy v nextclade doporučuje NRL tyto WGS revidovat na předchozí straně označené vzorky.

Při zadávání do GISAID je třeba dodržovat následující pravidla:

V poli „Location“ uvádět kraj takto:



South Bohemian Region
South Moravian Region
Hradec Kralove Region
Karlovy Vary Region
Liberec Region
Moravian-Silesian Region
Olomouc Region
Pardubice Region
Pilsen Region
Central Bohemian Region
Ustecky Region
Vysocina Region
Zlin Region
Prague Region

Do jména sekvence uvádět vždy akronym laboratoře:



Například:

hCoV-19/Czech Republic/**UMTM**239717/2021
hCoV-19/Czech Republic/**CSQ**0217/2021

GHC	GHC
BP	Biopstická laboratoř
KNL	Krajská nemocnice Liberec
FNP	Fakultní nemocnice Plzeň
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FNO	Fakultní nemocnice Ostrava
CSQ	Fakultní nemocnice Brno

V souvislosti s možností selhání diagnostiky PCR v důsledku nukleotidových záměn upozorňuje NRL na povinnost výrobců provádět pravidelnou in-silico analýzy detekčního systému a na případné disproporce upozornit zákazníky.

K nejspolehlivějším detekčním systémům patří stále detekce oblasti konzervativní pro všechny viry ze skupiny Sarbecoviridae:

Charité Germany E-gene

Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR (Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.3.2000045>)

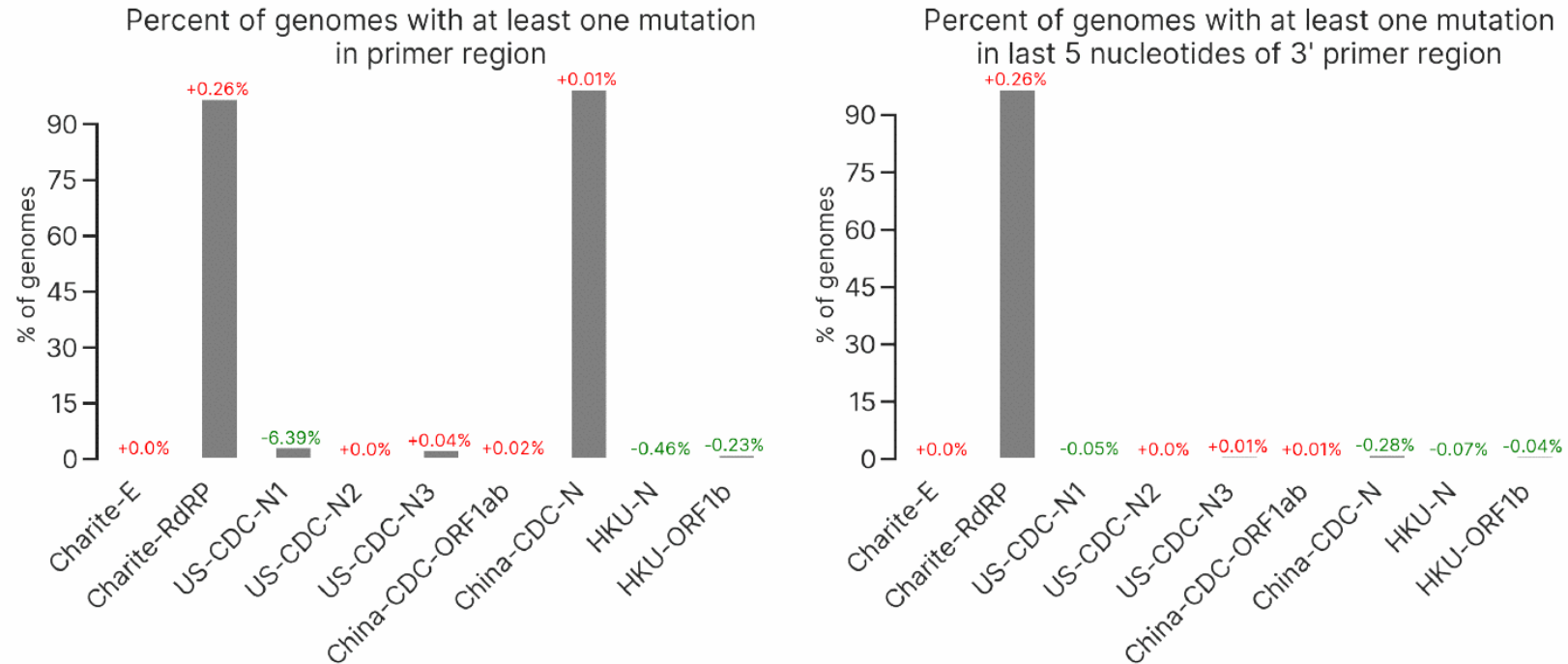
Primer/Probe	Type	Length	Sequence
E_Sarbeco_F	F	26	5'-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3'
E_Sarbeco_P1	P	26	5'-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-3'
E_Sarbeco_R	R	22	5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3'

Uploaded: 2020-09-14

Last scanned: 2021-02-03 08:09:55

V rámci analýzy Nextclade je automaticky in-silico analýzou vyhodnocena i kohorta ECDC/CDC a WHO doporučených metod (výsledky na stranách)

Common Primer Check for High Quality Genomes 2021-10-22

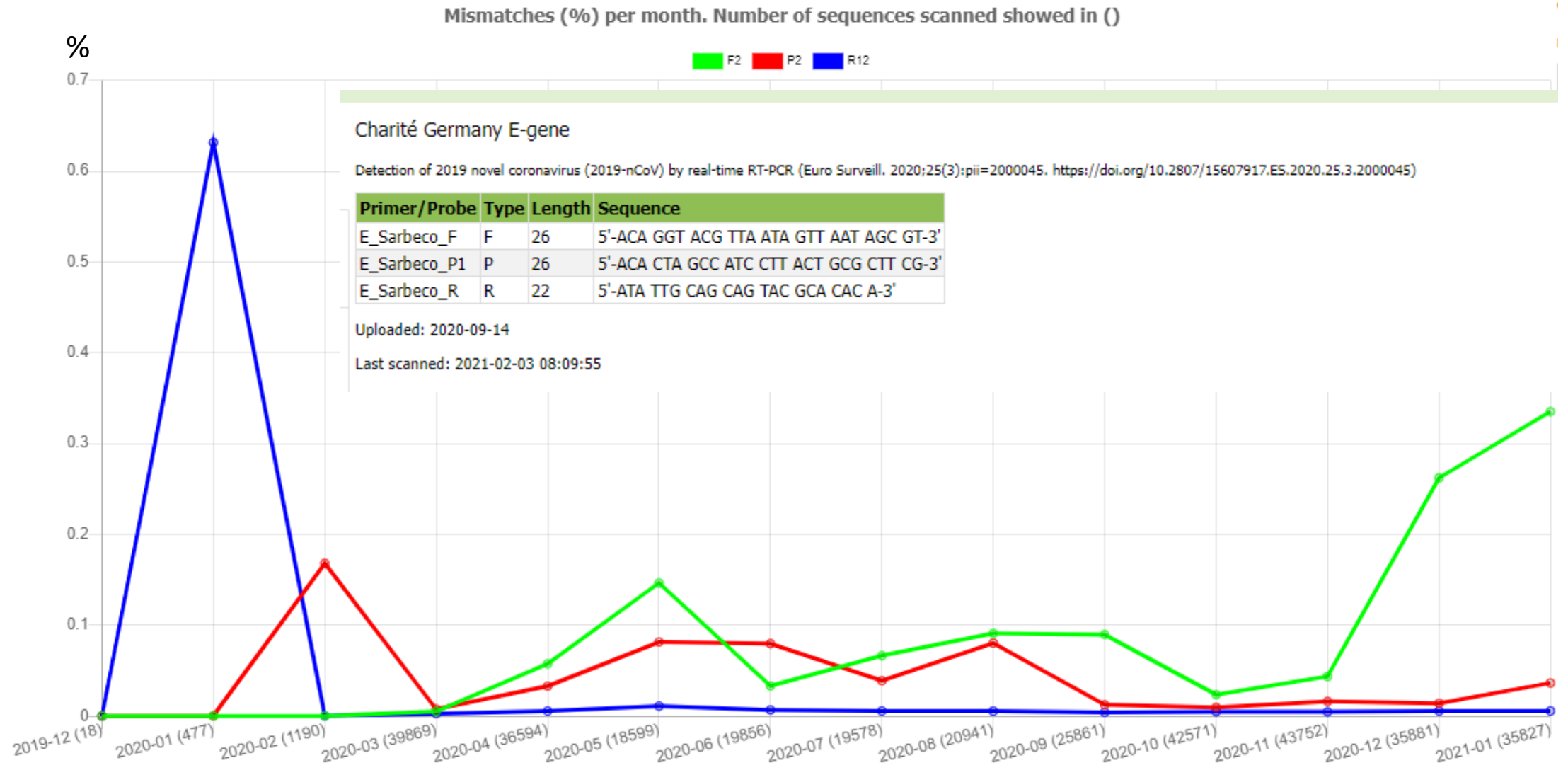


To reduce noise of random mutations ~ x139,166 available high quality genomes (out of x139,166 entries) **submitted in the past 90 days** are considered here. Each bar is annotated with the change in percentage since the previous update.

This is a simplified summary view of the percent of high quality genomes (defined as <1% Ns and <0.05% unique non-synonymous mutations) with one or more mutations in either forward, probe or reverse primer region. This does not necessarily indicate a primer would not function but serves as a guide to variability of the targeted region. The second Figure shows the same but with mutations in 3' ends for the primer regions (defined as last 5 nucleotides of the primer sequence) which can affect sensitivity partially.

Sources of primer sequences (may have been updated in meantime):
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf>
http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-pcr-panel-primer-probes.pdf>

Výsledky in-siliko analýzy PCR Charité pro E gen (Sarbeco)



Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

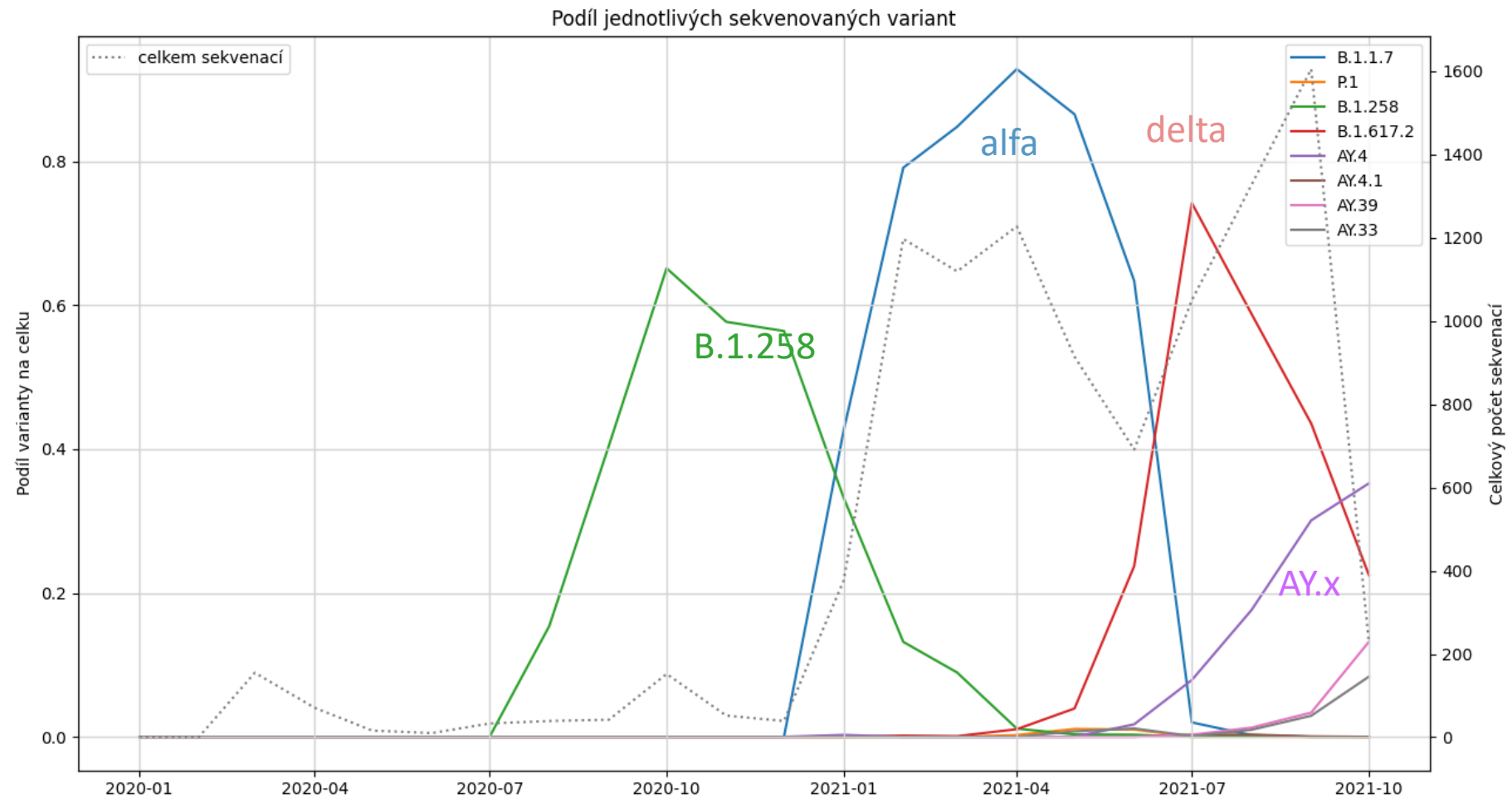
Za rok 2021 bylo k 22. 10. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 10 347 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 527 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 22. zářím a 22. říjnem.

Podíl původní varianty delta období 22. 9. – 22. 10. je 24,86 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.4, AY.33 a AY.39. Podíl subvarianty AY.4 v tomto období činí 36,24 %, podíl AY.33 činí 9,87 %, podíl AY.39 je 8,73 %. Podíl dalších subvariant AY.x činí méně než pět procent každá. Celkový přehled všech sekvenovaných variant v tomto období ukazuje tabulka 2. Vývoj podílu jednotlivých sekvenovaných variant zobrazuje graf 4. AY.x varianty se liší jen málo v aminokyselinové sekvenci S proteinu, AY.9 a AY.26 nese navíc mutaci ve spike A222V. Změny jsou komplexní, zasahují i do dalších genů, včetně těch nestrukturálních a často představují tiché mutace (mutace pouze na nukleotidové úrovni, ne však na aminokyselinové úrovni).

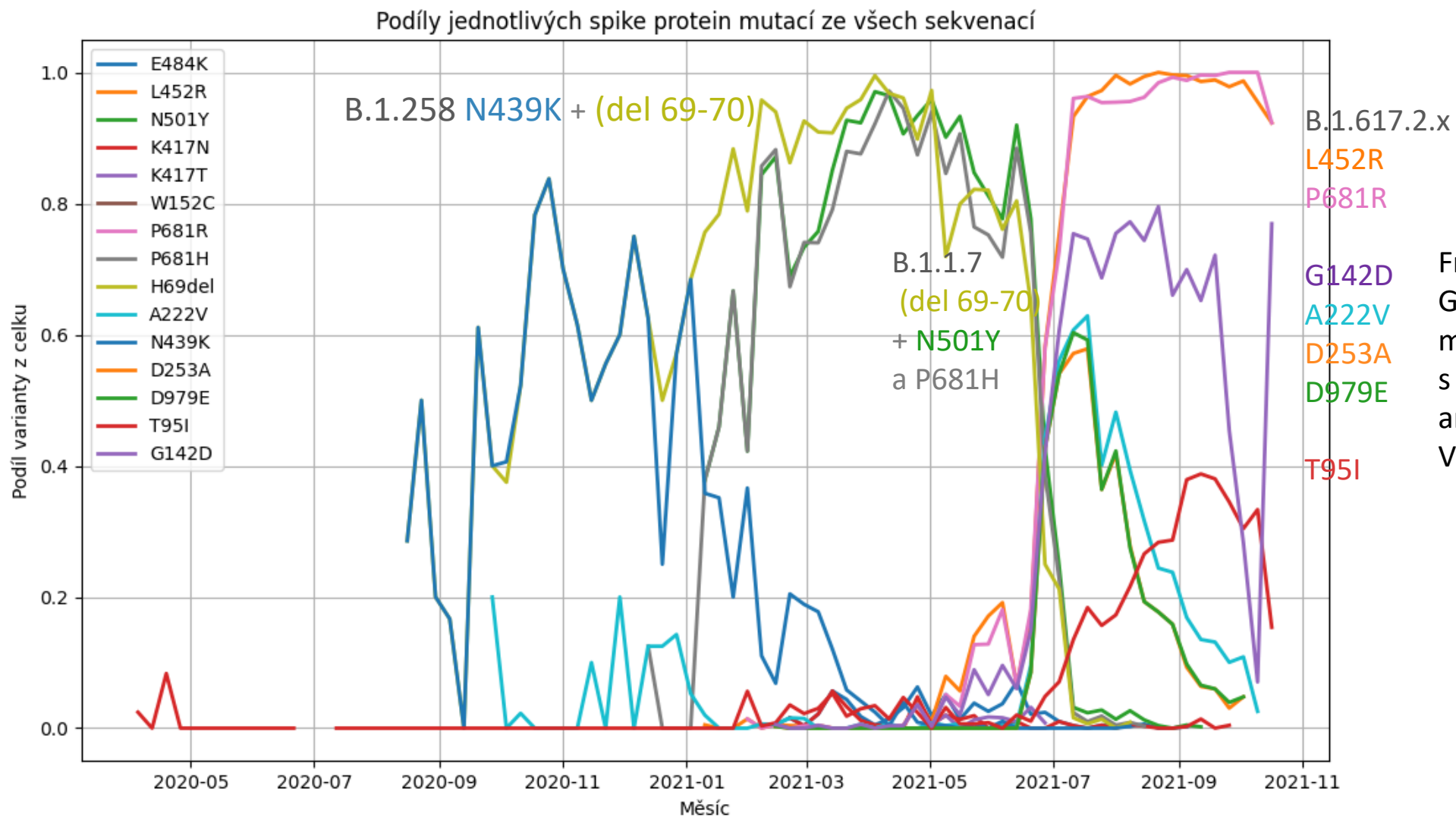
V případě AY.33 zatím nedochází k selhání PCR diagnostiky, ketou používá NRL.

Pozn.: data ze sekvenací jsou k dispozici za cca 1-3 týdny od data odběru.

Graf 4: Přehled významných sekvenovaných variant v ČR jako podíl z celku



Graf č. 5:



Frekvence G142 a T95I možná souvisí s technickým artefaktem. Viz další slide.



Frekvence mutací T95I a D152G pravděpodobně souvisí s technickým artefaktem

NRL sleduje frekvence mutací T95I a D152G. Ve vědecké komunitě zazněly hypotézy, že vyšší frekvence souvisí s kompeticí v rámci evoluce viru. Pre-print vědeckého článku uveřejněného na medrxiv.org naznačuje, že se může jednat o technický artefakt způsobený špatným nasedáním primeru v rámci sekvenace.

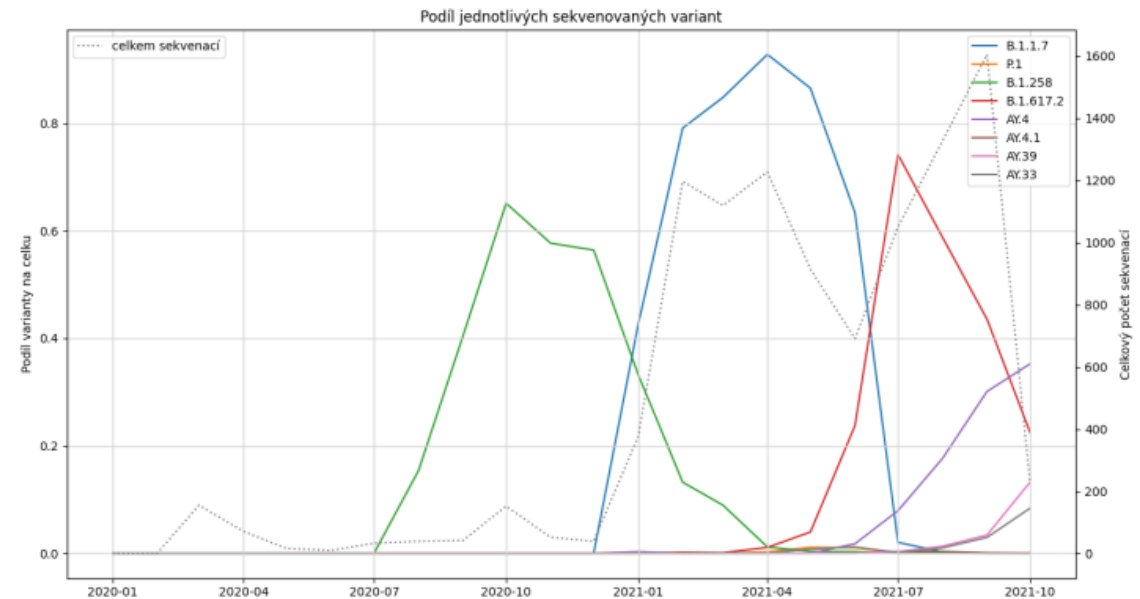
Více zde:

[Variation at Spike position 142 in SARS-CoV-2 Delta genomes is a technical artifact caused by dropout of a sequencing amplicon | medRxiv](#)

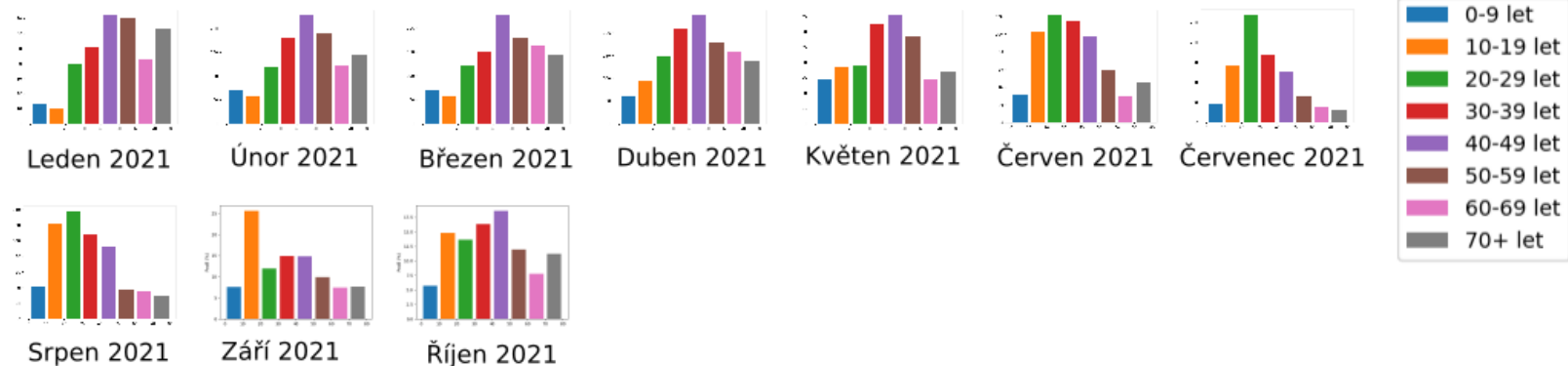
Věková struktura sekvenovaných v kontextu převažujících variant

Graf. č. 6: Věková struktura ve vztahu k osekvenovaným vzorkům

V měsících lednu až květnu dominantní věková skupina 40 – 49 let byla od června nahrazena dominující skupinou 20 – 29 let, přičemž od srpna 2021 pozorujeme nárůst i mladších věkových skupin, především 10 – 19 let. V říjnu jsou ve věkových skupinách sekvenovaných opět více zastoupeny skupiny 30 - 39, 40 – 49 a 50 – 59 let.



Věková struktura sekvenovaných



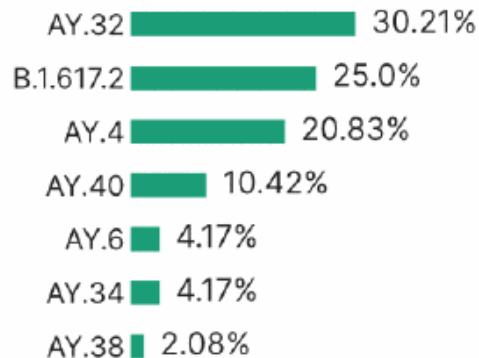
Tabulka 2:

Varianta	celkem	podíl (%)	Dle WHO
AY.4	191	36,24	Delta
B.1.617.2	131	24,86	Delta+
AY.33	52	9,87	Delta+
AY.39	46	8,73	Delta+
AY.9	24	4,55	Delta+
AY.20	24	4,55	Delta+
AY.34	23	4,36	Delta+
AY.26	19	3,61	Delta+
AY.4.5	4	0,76	Delta+
AY.7.1	3	0,57	Delta+
AY.25	2	0,38	Delta+
AY.4.2	2	0,38	Delta+
AY.7	1	0,19	Delta+
AY.5	1	0,19	Delta+
AY.10	1	0,19	Delta+
AY.12	1	0,19	Delta+
AY.38	1	0,19	Delta+
AY.4.4	1	0,19	Delta+
Celkem	527	100	

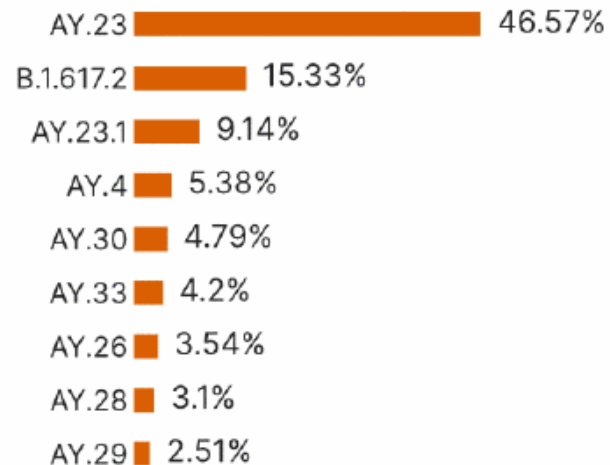


Distribuce subvariant A.x na jednotlivých kontinentech za poslední měsíc (22/9/21- 24/10/21), zdroj WHO

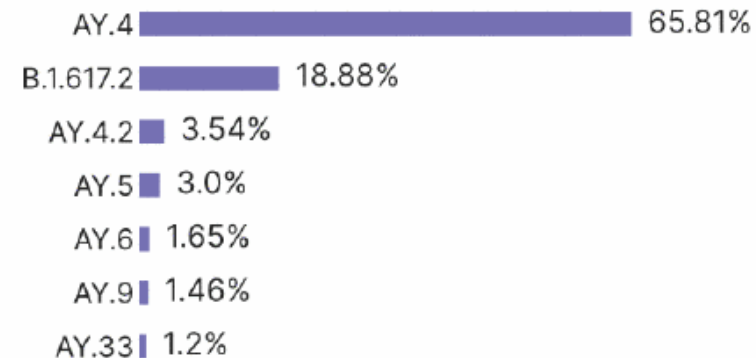
Africa (+96 sequences)



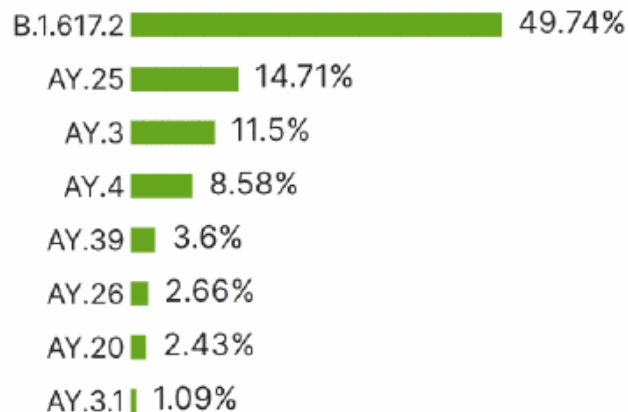
Asia (+1,357 sequences)



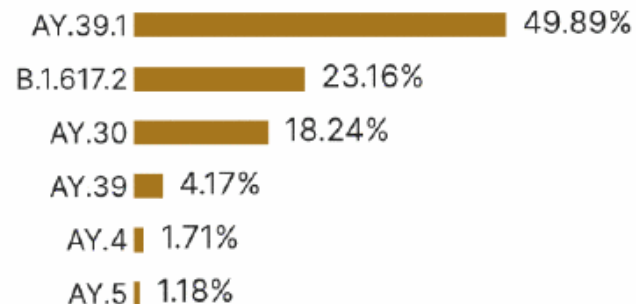
Europe (+124,787 sequences)



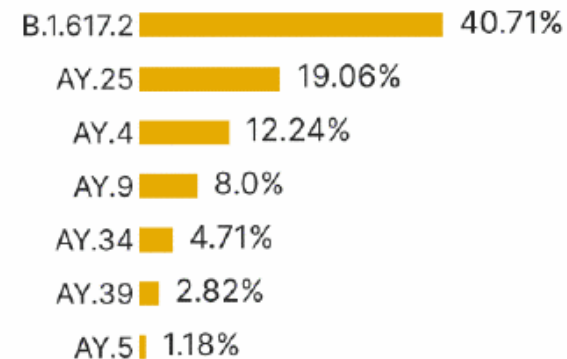
North America (+37,570 sequences)



Oceania (+1,870 sequences)



South America (+425 sequences)



V období od 8. 10. do 22. 10. 2021 má NRL k dispozici data z 19 793 provedených testů diskriminační PCR z celkem 81 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 93,7 % pozitivních případů (viz tab. 1).

Přestože se může zdát, že vzhledem k jasné dominanci delta varianty nemá smysl konfirmovat pozitivní nálezy diskriminační PCR, z detekovaných mutací vyplývá, že role těchto PCR je nezastupitelná. Opakovaně se potvrzuje, že diskriminační PCR vzhledem k rychlé odezvě hrají důležitou roli v monitoringu variant viru, a je stále důležité i část PCR identifikovaných variant sekvenovat, jak dokazují stále častěji detekované nové sublinie u varianty delta. Prioritní mutace doporučené NRL se stále ukazují jako zásadní pro sledování evoluce viru.

Doporučujeme vždy detekovat přítomnost obou povinně sledovaných mutací E484K a L452R.

Za rok 2021 bylo k 22. 10. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 10 347 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 527 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 22. zářím a 22. říjnem.

Podíl původní varianty delta období 22. 9. – 22. 10. je 24,86 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.4, AY.33, AY.39, které se šíří i v dalších zemích. Podíl subvarianty AY.4 v tomto období činí 36,24 %.

Pozorujeme nárůst varianty AY.4, kde dochází k divergentní evoluci a vzniku nových subvariant. AY.4 je v tuto chvíli dominantní varianta v ČR, přičemž u AY.4.2 probíhá diskuze, zda je nakažlivější než původní varianta delta. V ČR byly zachyceny celogenomovou sekvenací prozatím 2 vzorky této varianty, která se rapidně šíří např. ve Velké Británii.

Zatím není aktuální selhání PCR diagnostiky v důsledku štěpení delta varianty na subvarianty.

Kolektiv autorů:

RNDr. Helena Jiřincová, MUDr. Jan Moskalyk, RNDr. Alena Fialová, Ph.D., MUDr. Monika Liptáková