



Podrobná zpráva ke dni 12. 11. 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:

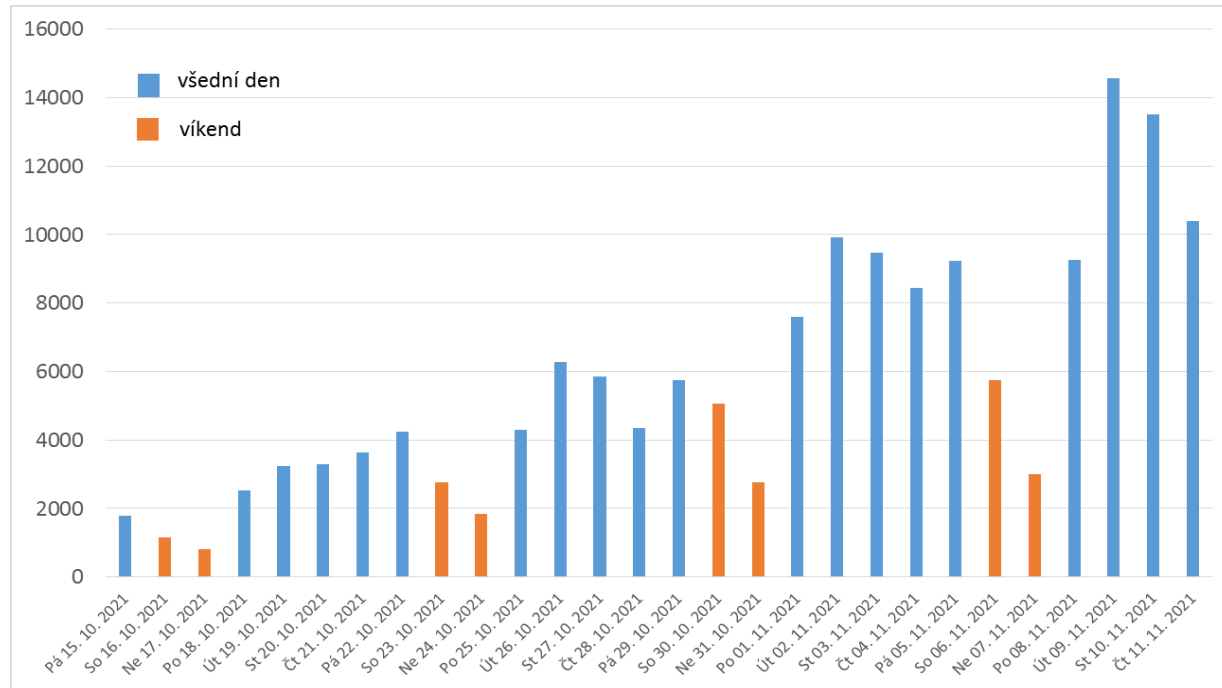
NRL pravidelně analyzuje data a poskytuje MZČR i laboratořím týdenní přehledový dokument, jehož cílem je monitorovat šíření variant SARS-CoV-2, které se na území ČR vyskytují, poskytovat informace o nových potenciálních i reálných rizicích v souvislosti s šířením a evolucí viru SARS-CoV-2, poskytovat 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:

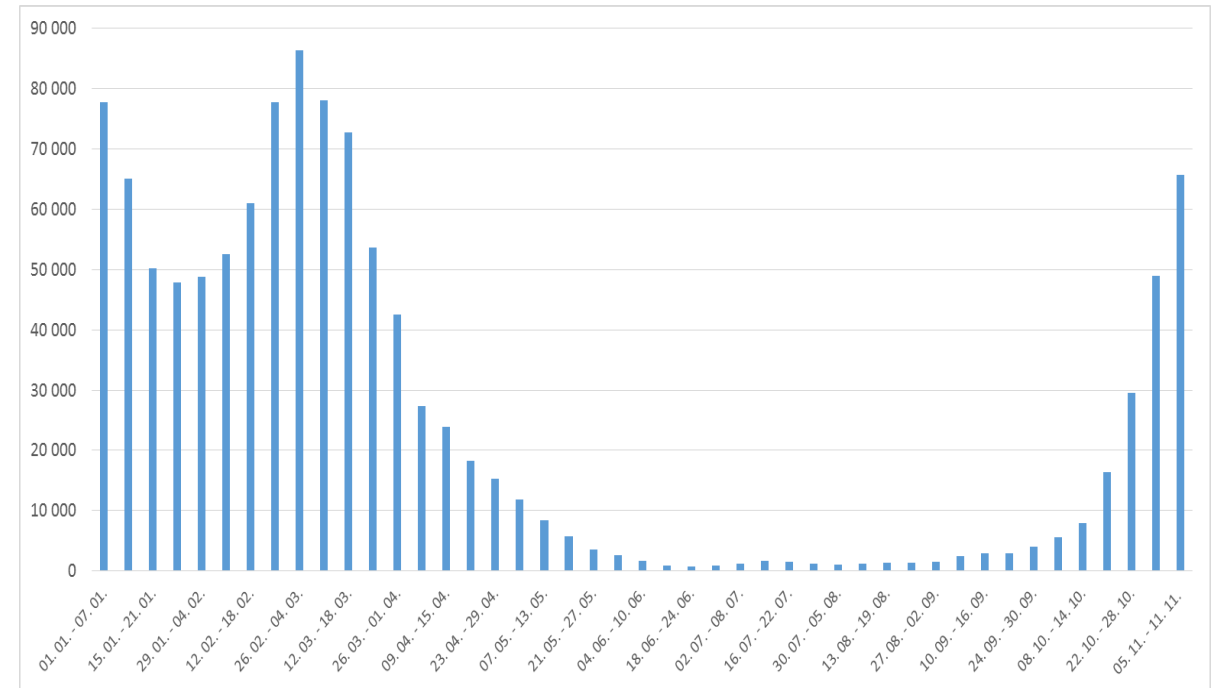
Souhrn a epidemiologický přehled	Strana 2 – 4
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 5 - 6
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 7 – 8
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 9 – 16
Závěr	Strana 17

- V období od 2. 11. do 12. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 56 047 provedených testů diskriminační PCR z celkem 80 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % pozitivních případů (viz tab. 1).
- Za rok 2021 bylo k 12. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 13 110 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 1000 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 12. říjnem a 12. listopadem.
- Přehled aktuální epidemiologické situace:
V ČR bylo za posledních 14 dní (tj. od 29. 10. do 11. 11. 2021) zachyceno 114 683 případů SARS-CoV-2 pozitivních osob, s denním průměrem 8 191,6 případů, což představuje 14denní incidenci 1071,6 na 100 000 obyvatel. Vývoj počtu případů v delším časovém horizontu zobrazují grafy 1 a 2. Za uvedené období bylo nahlášeno 4 833 hospitalizací. Celkový počet hospitalizací ke konci sledovaného období činí 3 557 osob, z toho 501 osob s vážným průběhem. Nejvyšší 7denní incidence covid-19 je aktuálně hlášena v okresech Šumperk, Prostějov, Strakonice a Olomouc, podrobně uvádí situaci graf 3.

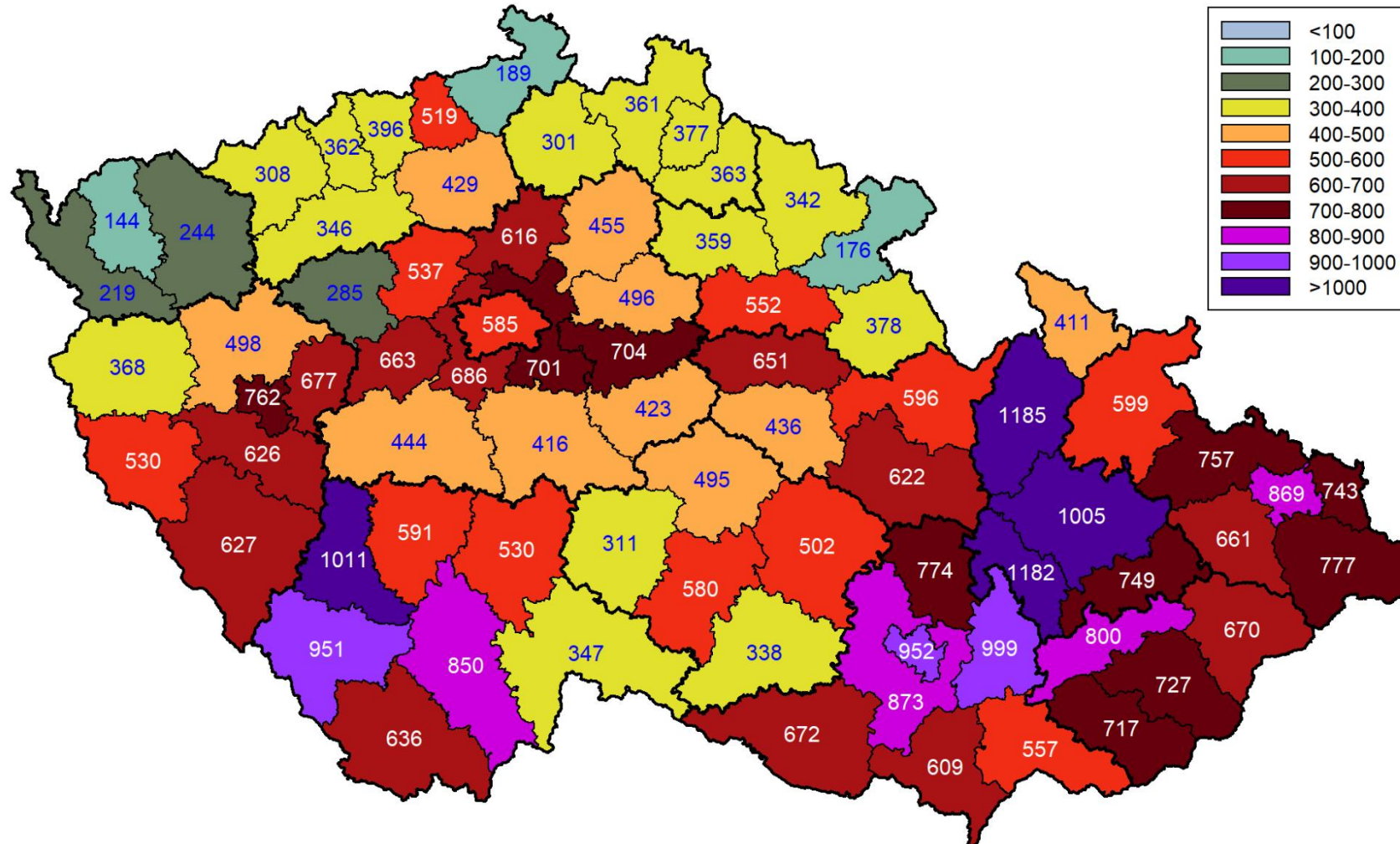
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 11. 11. 2021



Graf 3: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 11. 11. 2021

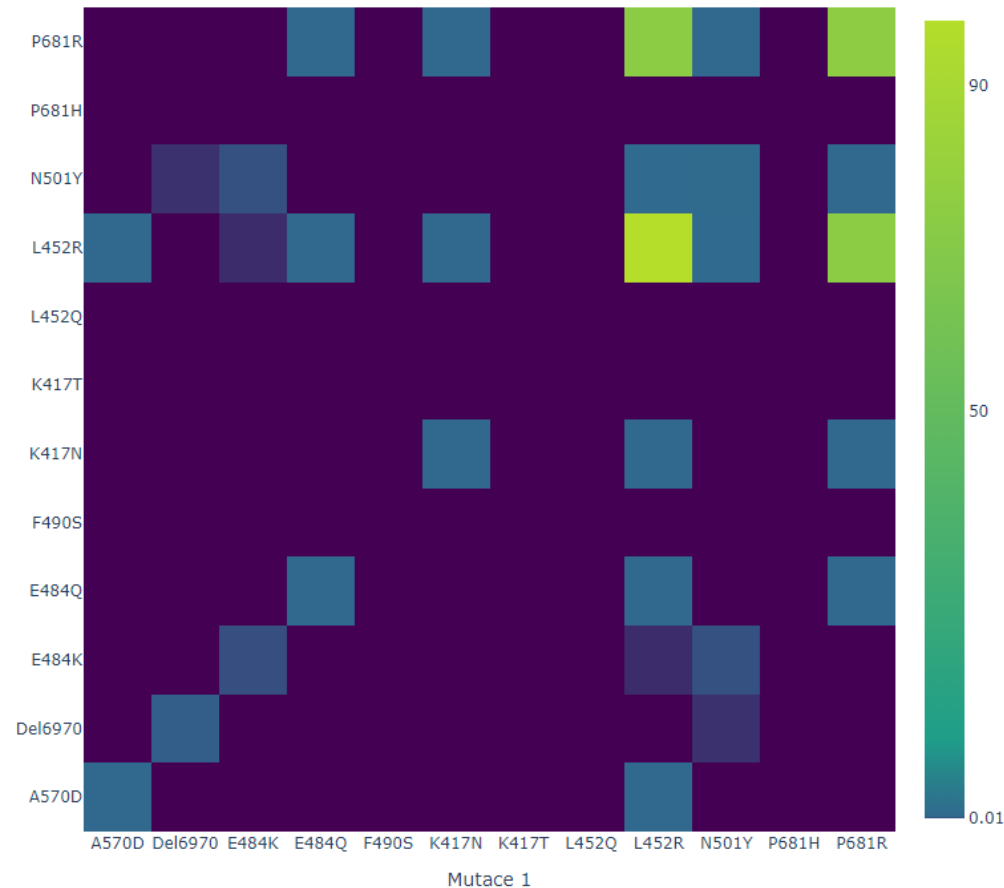


V období od 2. 11. do 12. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 56 047 provedených testů diskriminační PCR z celkem 80 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % pozitivních případů (viz tab. 1).

Tabulka 1: **Přehled zachycených mutací**

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl ze sady	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	54 732	53 659	98 %	delta, delta+
E484K+	38 905	29	0,07 %	beta, gama, alfa E484K+, delta+
L452R+, E484K+	38 881	16	0,04 %	delta+
N501Y+, L452R+	10 501	50	0,48 %	delta+
A570D+	11 740	32	0,27 %	alfa, delta + A570D

Heatmapa diskriminační PCR SARS-CoV-2: 2.11 - 12.11 // pozitivní vzorky k celku



Graf 4: procento pozitivních detekcí ze všech detekcí z dat diskriminační PCR za posledních 10 dní.

Nejčastější kombinace mutací jsou zeleně, odstíny modré jsou kombinace mutací kolem 1% positivity, fialově jsou nepřítomné kombinace.

Diskriminační PCR:

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

- 1. Minimum – vždy povinné L452R i E84K (souvisí s objevením se AY.4.2.)**
- 2. Je možné vyšetřovat L452K + E484K 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 μ l (tedy na reakci)**
- 3. Na sekvenaci posílejte vždy L452R negativní vzorky, nebo L452R + E 484K pozitivní vzorky**
4. V případě, že je denní záchyt pozitivit nad 5 000 musí poskytovatel takto zaslat nebo vyšetřit nejméně 30 % pozitivních vzorků. V případě, že se denní záchyt pohybuje nad 10 000, nejméně 10 % vzorků.
- 5. E484K je možné vyšetřovat pouze u L452R negativních vzorků a to jedenkrát za týden**
- 6. 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>

Dene 3.11.

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	Bioptická laboratoř
KNL	Krajská nemocnice Liberec
FNP	Fakultní nemocnice Plzeň
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FNO	Fakultní nemocnice Ostrava
CSQ	Fakultní nemocnice Brno

Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

Za rok 2021 bylo k 12. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 13 110 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 1000 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 12. říjnem a 12. listopadem.

Podíl původní varianty delta období 12. 10. – 12. 11. je 9,0 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.4, AY.43, AY.39, AY.102, AY.5. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 41,3 %, podíl AY.4 je 8,3 %, podíl AY.39 je 8,1 %, podíl AY.102 činí 5,3 %, podíl AY.20 je 5,1 %, u 8,9% sekvenací v tomto období není v mezinárodní databázi GISAID přiřazena varianta. 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).

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

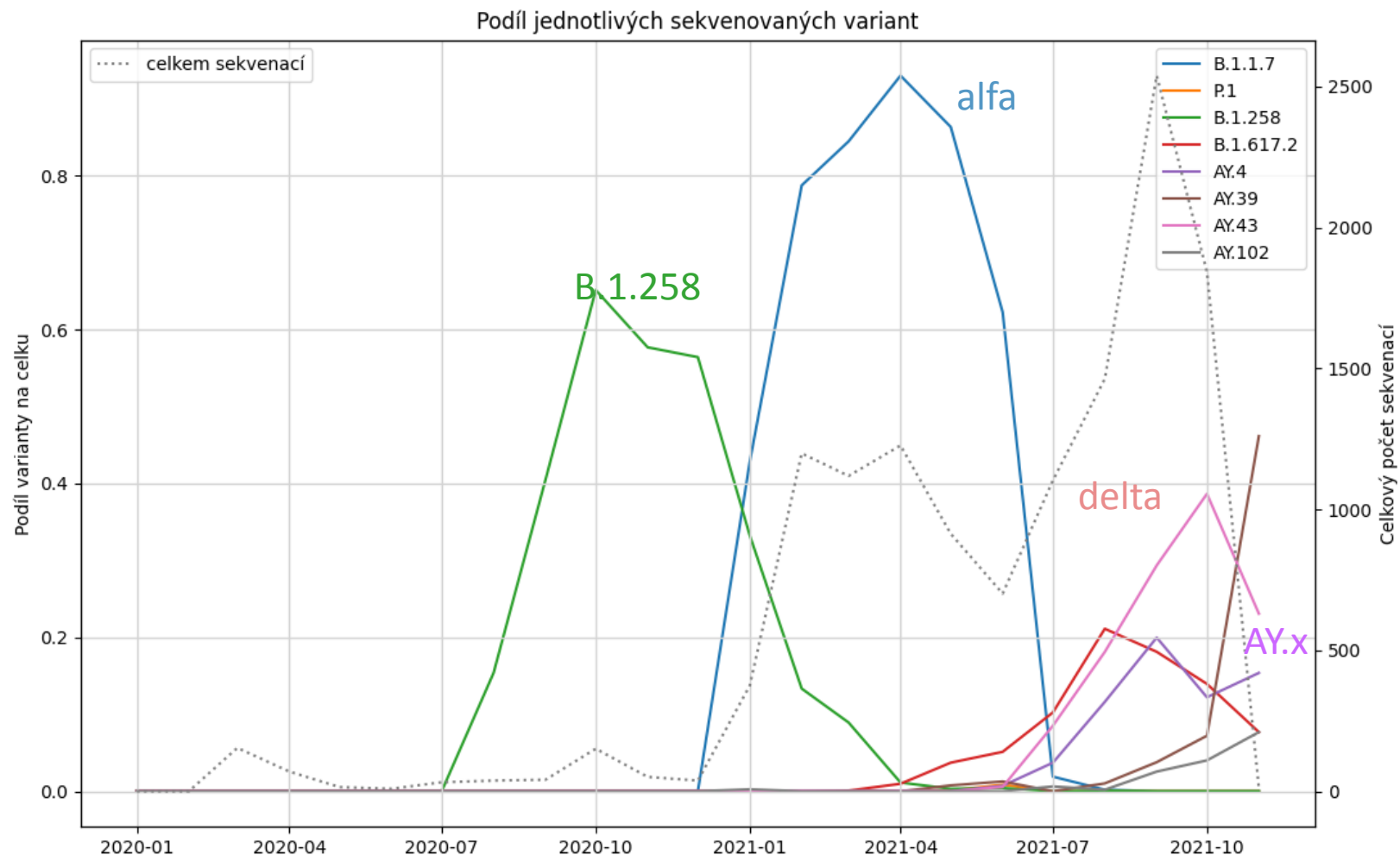
Před 14ti dny došlo k revizi výsledků v databázi Gisaid.org, nově nejvíce sekvenací připadá na variantu AY.43, ke které byly přiřazeny některé starší sekvence a zároveň se rychle šíří. Důvod reklasifikace je větší přesnost přiřazení k variantě.

Od listopadu došlo ke změně výpočetního algoritmu tak, aby byla respektována fylogeneze viru. Je pravděpodobné, že nebude tak často docházet k reklasifikaci variant. Namísto algoritmu Pango learn je využíván algoritmu UShER (Ultrafast Sample placement on Existing tRee).

Pro online určení Pango linie je možné použít odkaz:

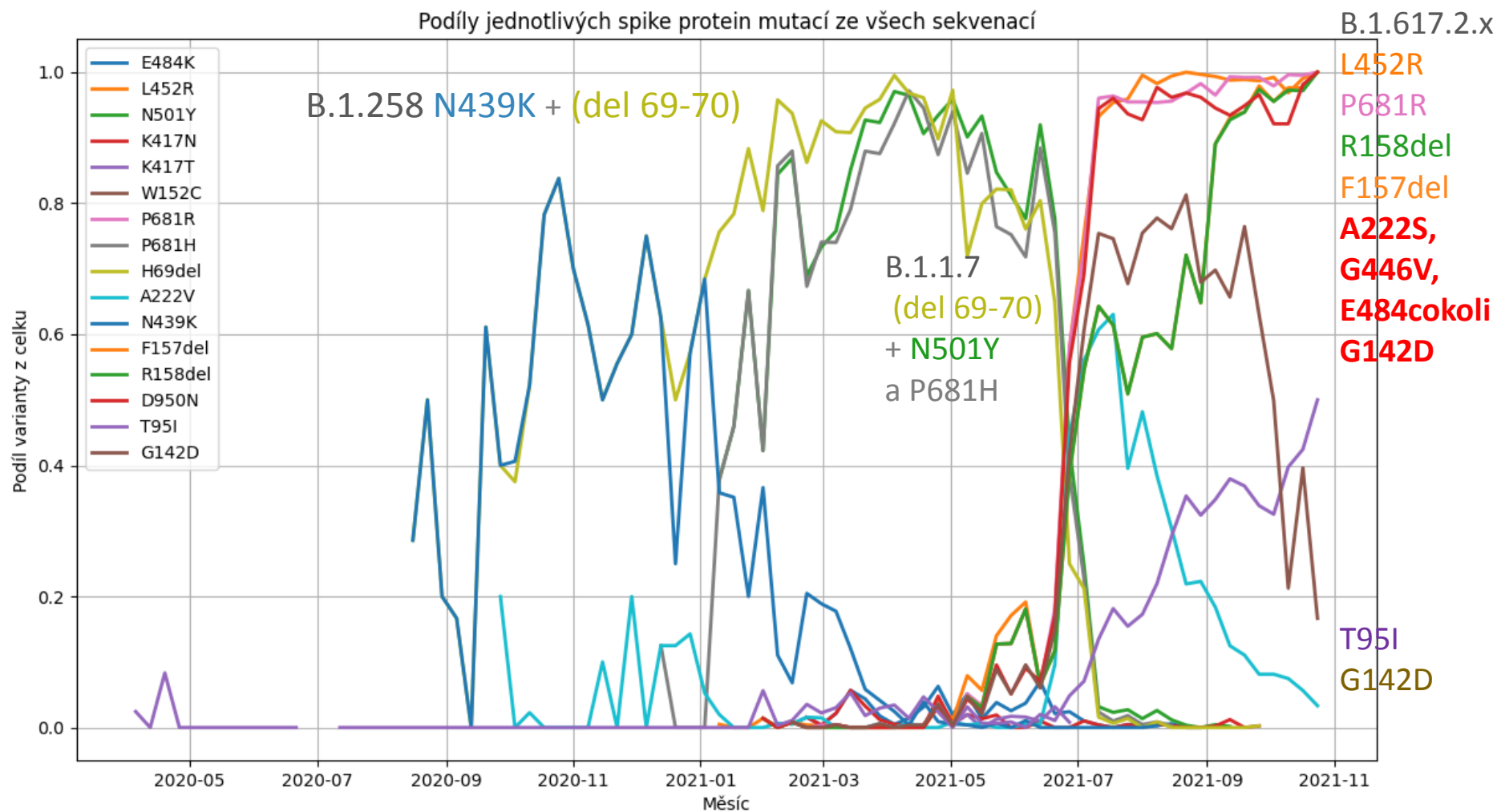
<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPhyloPlace>

Graf 5: Přehled významných sekvenovaných variant v ČR jako podíl z celku



Graf č. 6:

Frekvence G142D a T95I možná souvisí s vyhodnocením sekvenačních dat.
Viz další slide.



A222V

NRL sleduje frekvence mutací T95I a G142D, E484K/A/Q, G446V, A22S. 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. V souvislosti s mutací G142D dochází k výpadkům amplifikace při přípravě sekvenační knihovny kitem CleanPlex® Amplicon Sequencing (Paragon).

<https://www.paragongenomics.com/>

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](#)

Opět se dostává do centra pozornosti mutace E484K, případně E484A, E484Q. Subvarianta delty nesoucí rovněž E484K je klasifikována jako AY.4.2 a v souvislosti s její schopností vyšší rezistence vůči virus neutralizačním protilátkám a mírnému vzestupu v detekcích v zemích EU/EEA nabývá opět na důležitosti paralelní sledování L452R a E484K mutací.

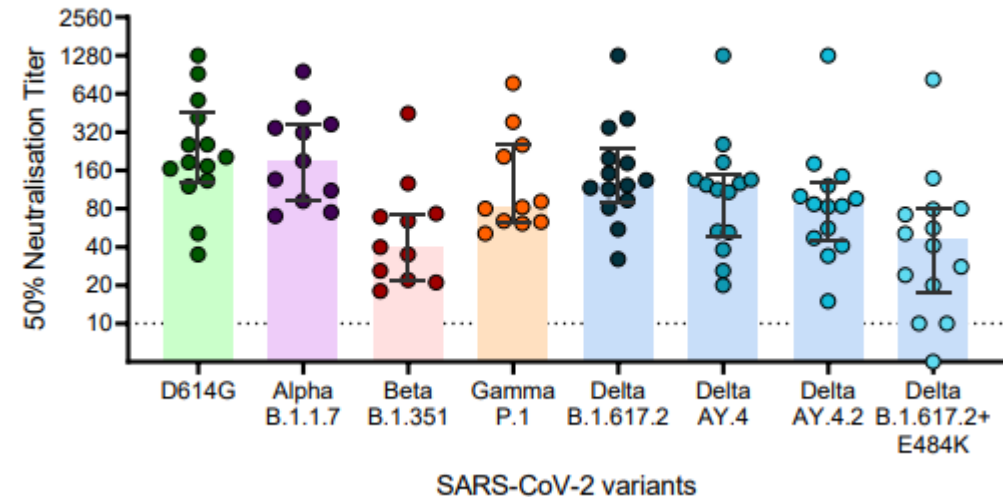
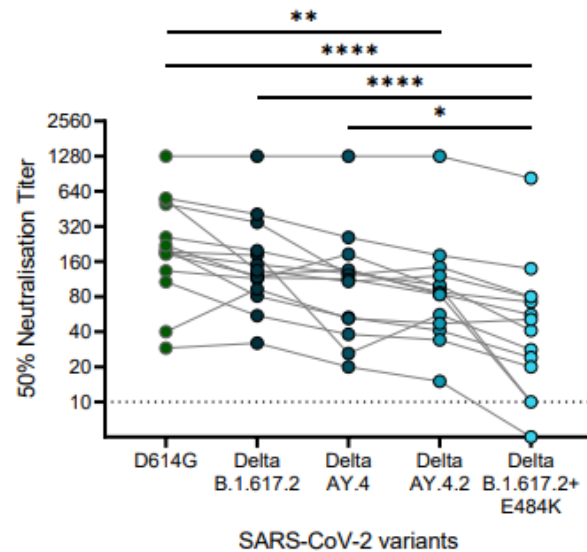
Další pozornost vzbuzuje evolučně primitivnější varianta nesoucí neobvyklou kombinaci mutací, která se objevuje u některých sekvencí, především z Konga:

Emerging B.1.X variant lineage in Europe and Africa with conserved Spike mutations: P9L, E96Q, R346S, Y449N, P681H and T859N #297

Varianta AY 4.2., která je ostře sledovaná např. ve Velké Británii, není odolnější vůči virus-neutralizaci v porovnání s ostatními subvariantami delty. Subvarianta AY.4.2. obsahuje mutace Y145H a A222V, které však dle studie nejsou asociovány s vyšší transmisibilitou nebo imunitním escapem viru.

Odkaz:

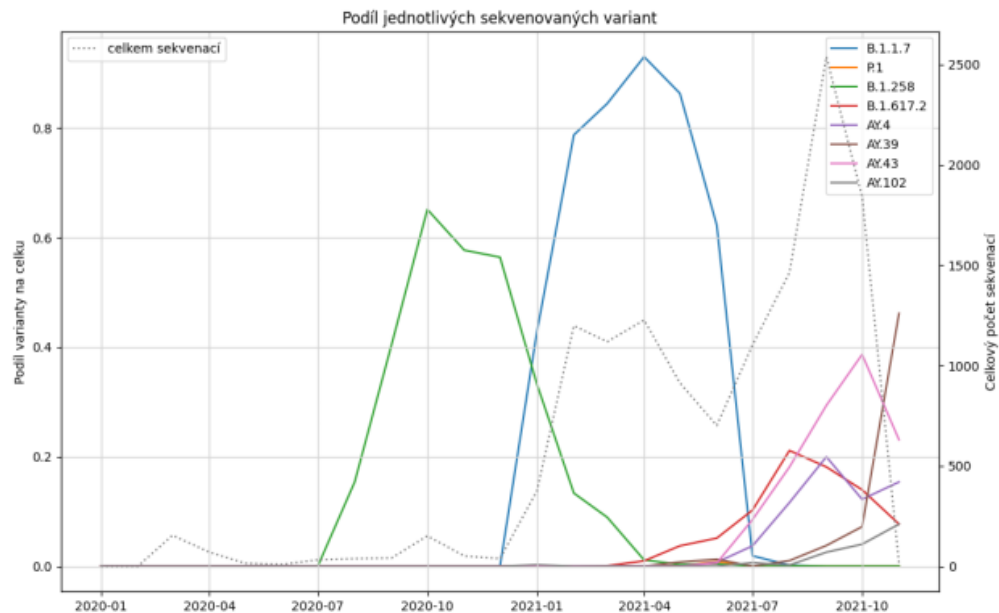
[Neutralisation of SARS-CoV-2 Delta sub-lineage AY.4.2 and B.1.617.2+E484K by BNT162b2 mRNA vaccine-elicited sera \(https://t.co/LSe01fi4sh?amp=1\)](https://t.co/LSe01fi4sh?amp=1)



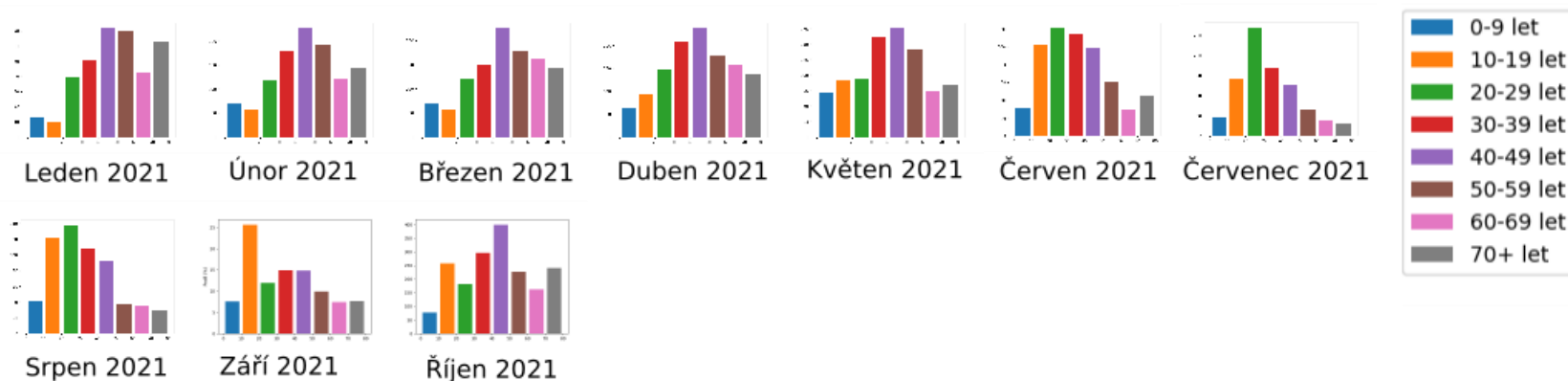
Věková struktura sekvenovaných v kontextu převažujících variant

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 a 40 – 49 let.



Věková struktura sekvenovaných



Tabulka 2:

Varianta	celkem	podíl	Dle WHO
AY.43	413	41,3	Delta+
B.1.617.2	90	9,0	Delta
Nepřiřazeno	89	8,9	
AY.4	83	8,3	Delta+
AY.39	81	8,1	Delta+
AY.102	53	5,3	Delta+
AY.20	51	5,1	Delta+
AY.4.4	19	1,9	Delta+
AY.9.1	15	1,5	Delta+
AY.98	8	0,8	Delta+
AY.46.6	7	0,7	Delta+
B.1	7	0,7	Delta+
AY.7.1	7	0,7	Delta+
AY.42	7	0,7	Delta+
AY.36	7	0,7	Delta+
AY.98.1	7	0,7	Delta+
AY.33	6	0,6	Delta+
AY.44	6	0,6	Delta+
AY.46	6	0,6	Delta+
B	4	0,4	Delta+
AY.34	4	0,4	Delta+
AY.83	3	0,3	Delta+
AY.84	3	0,3	Delta+
AY.4.2	3	0,3	Delta+
Další varianty	21	2,1	
Celkem	1000		

- V období od 2. 11. do 12. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 56 047 provedených testů diskriminační PCR z celkem 80 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % 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 hraje 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 mutace L452R a opět i E484K. Další mutace zatím nejsou stabilně přítomny. V zemích EU/EEA se začíná objevovat subvarianta AY.4.2, která nese kromě mutací typických pro variantu delta i mutaci E484K. Tato varianta, nesoucí 2 mutace významně ovlivňující vazbu virus neutralizačních protilátek vykazuje zatím nejvyšší míru rezistence vůči virus neutralizačním protilátkám a proto je nyní v centru pozornosti. V ECDC je připravována analýza rizika v souvislosti se šířením varianty AY.4.2. Tento náález podporuje metodický pokyn NRL sledovat metodou diskriminačních PCR minimálně pozice L452R a E484K.
- Za rok 2021 bylo k 12. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 13 110 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 1000 sekvenací se vztahuje k datu odběru mezi 12. říjnem a 12. listopadem. Podíl původní varianty delta období 12. 10. – 12. 11. je 9,0 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.4, AY.43, AY.39, AY.102, AY.5. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 41,3 %, podíl AY.4 je 8,3 %, podíl AY.39 je 8,1 %, podíl AY.102 činí 5,3 %, podíl AY.20 je 5,1 %, u 8,9% sekvenací v tomto období není v mezinárodní databázi GISAID přiřazena varianta. 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 souvislosti s nárůstem incidence doporučuje NRL zasílat do sekvenčních center počet vzorků dle kapacit. Na algoritmu pro výběr relevantního podílu vzorků dle sekvenačních kapacit NRL intenzivně pracuje.
Pozn.: data ze sekvenací jsou k dispozici za cca 1-3 týdny od data odběru.

Kolektiv autorů:

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