



Podrobná zpráva ke dni 19. 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:

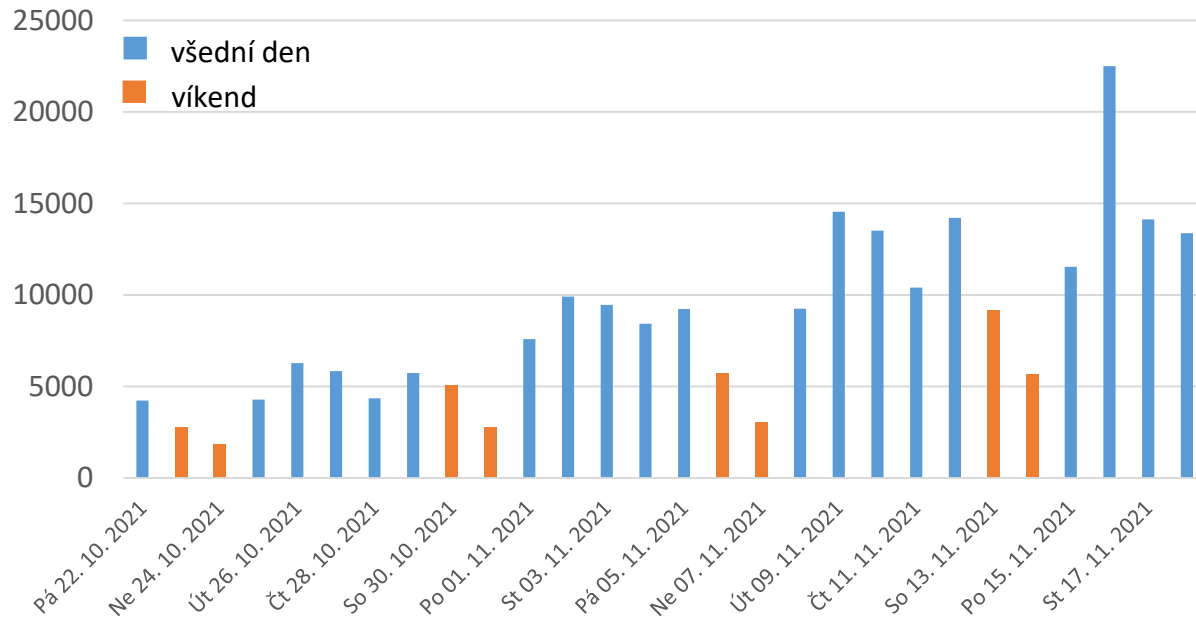
NRL pravidelně analyzuje data a poskytuje MZČR i laboratořím týdenní přehledový dokument, jehož cílem je monitorovat šíření variant SARS-CoV-2, které se na území ČR vyskytují, poskytovat informace o nových potenciálních i reálných rizicích v souvislosti s šířením a evolucí viru SARS-CoV-2, poskytovat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

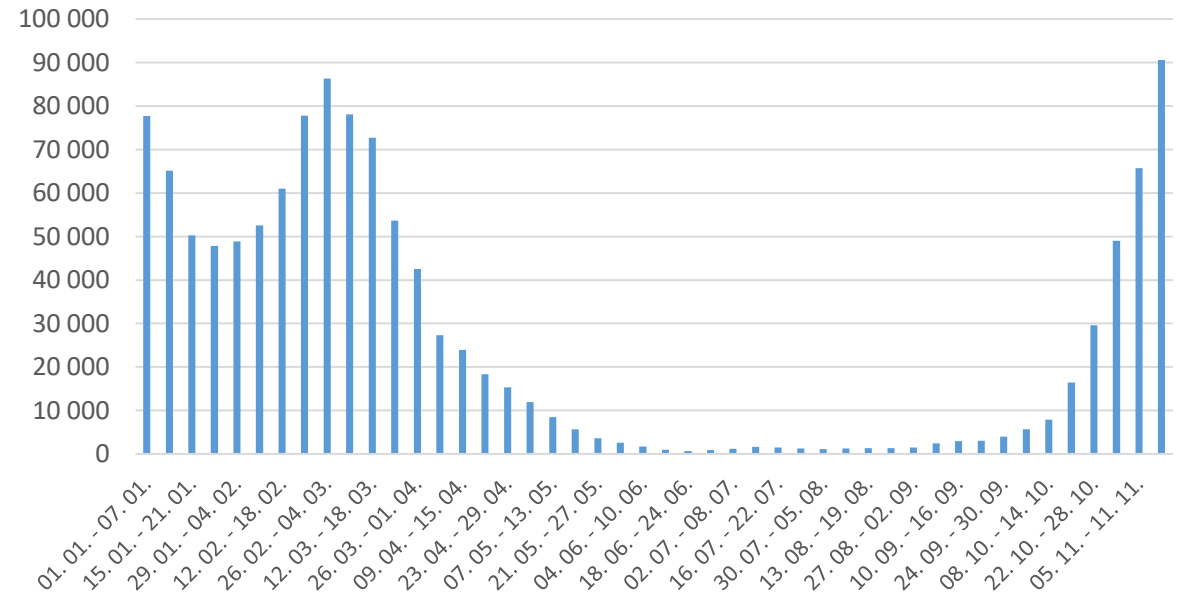
Souhrn a epidemiologický přehled	Strana 2 – 4
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 5 - 6
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 7 – 8
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 9 – 17
Závěr	Strana 18

- V období od 11. 11. do 19. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 50 744 provedených testů diskriminační PCR z celkem 76 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % pozitivních případů (viz tab. 1).
- Za rok 2021 bylo k 19. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 14 492 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Je k dispozici celkem 1250 sekvenací s datem odběru mezi 19. říjnem a 19. listopadem.
- Přehled aktuální epidemiologické situace:
V ČR bylo za posledních 14 dní (tj. od 5. 11. do 18. 11. 2021) zachyceno 156 353 případů SARS-CoV-2 pozitivních osob, s denním průměrem 11 168 případů, což představuje 14denní incidenci 1 461 na 100 000 obyvatel. Vývoj počtu případů v delším časovém horizontu zobrazují grafy 1 a 2. Za uvedené období bylo nahlášeno 6 280 hospitalizací. Celkový počet hospitalizací ke konci sledovaného období činí 4 750 osob, z toho 673 osob s vážným průběhem. Nejvyšší 7denní incidence covid-19 je aktuálně hlášena v okresech Šumperk, Olomouc, Vyškov a Prostějov, podrobně uvádí situaci graf 3.

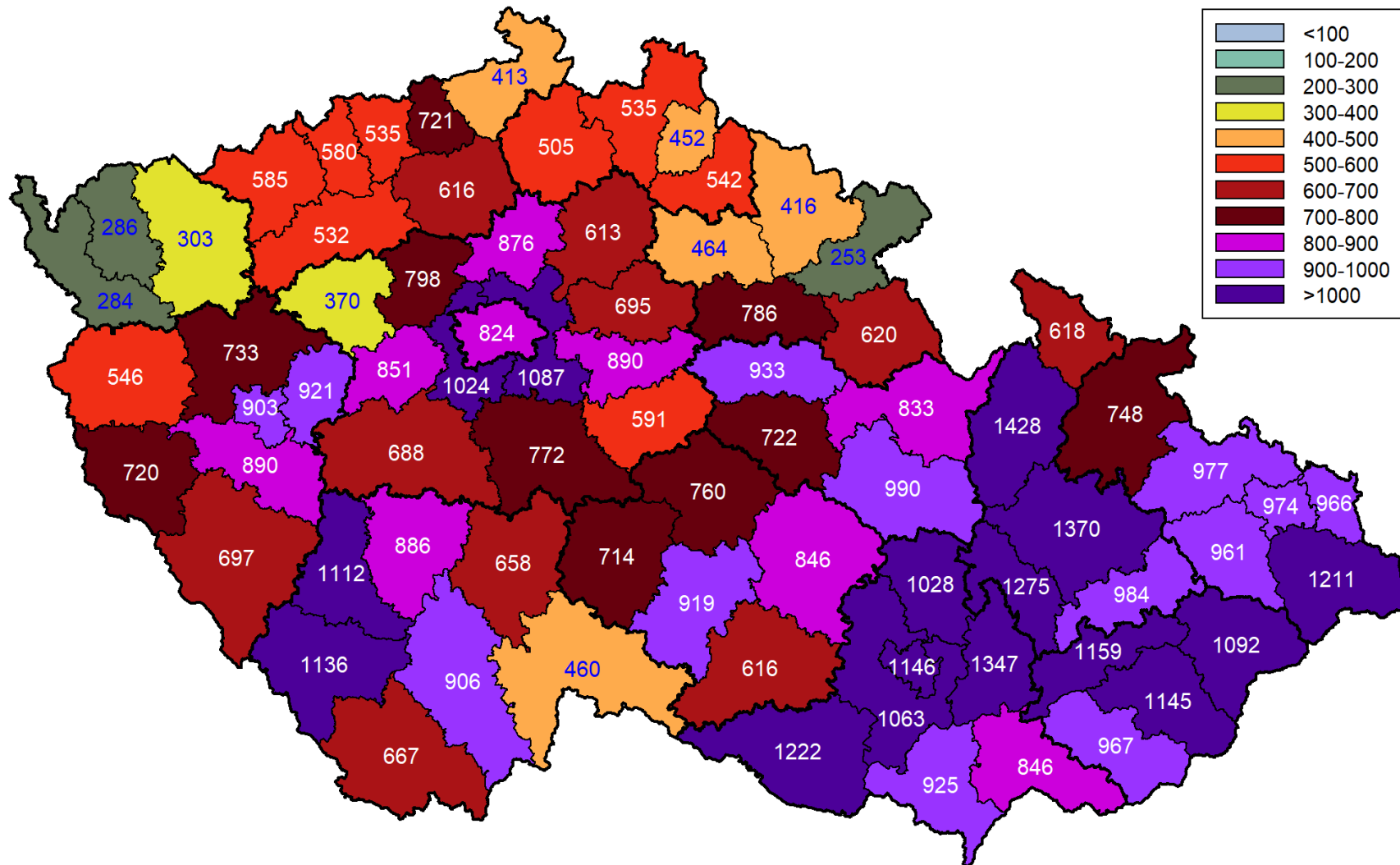
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 18. 11. 2021



Graf 3: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 18. 11. 2021

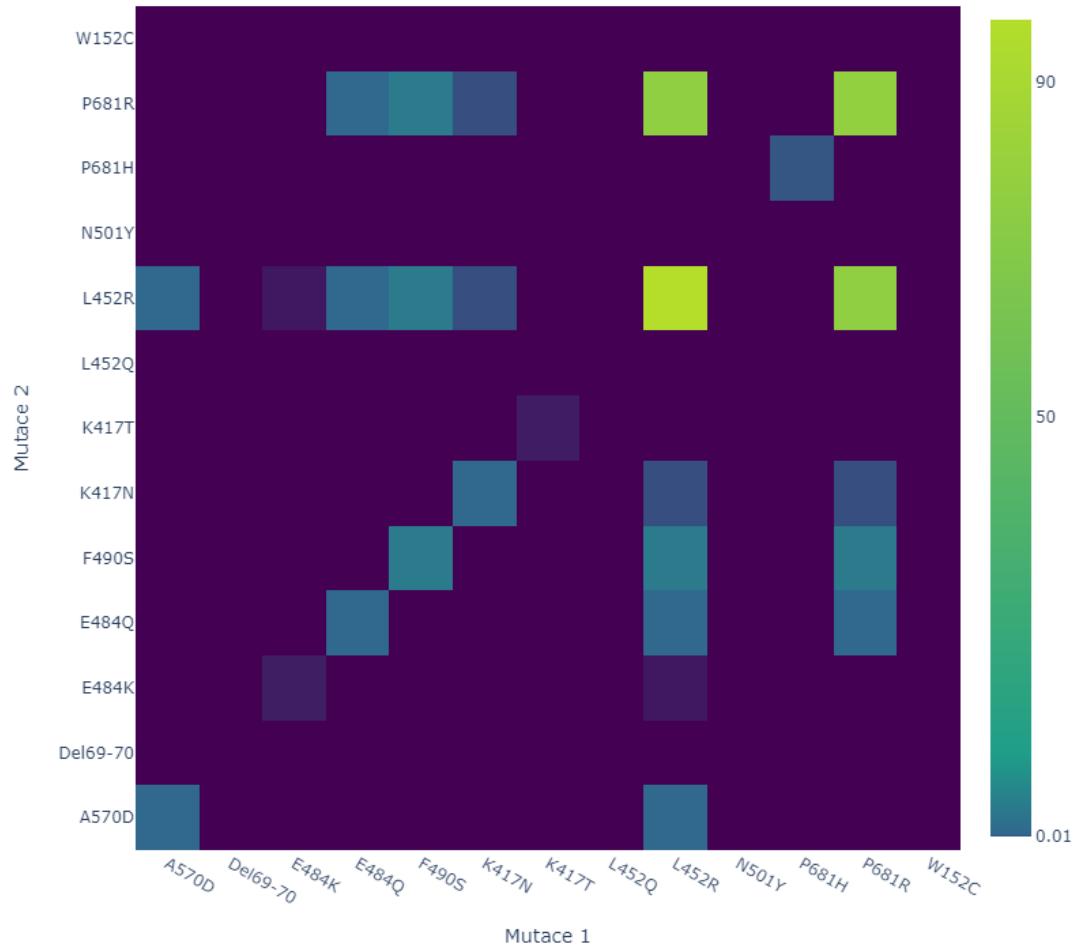


V období od 11. 11. do 19. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 50 744 provedených testů diskriminační PCR z celkem 76 laboratoří. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % pozitivních případů (viz tab. 1).

Tabulka 1: **Přehled zachycených mutací**

Mutace	Pozitivních	Celkem	Procento v sadě	Interpretace (pouze suspektní varianta)
A570D+	39	12231	0,32 %	alfa, delta + A570D
E484K+	9	32929	0,03 %	beta, gama, alfa E484K+, delta+
L452R+	48583	49891	97,38 %	delta, delta+
L452R+ a E484K+	7	32894	0,02 %	delta+
L452R+ a N501Y+	0	4802	0,00 %	delta+

Heatmapa disk. PCR SARS-CoV-2 k 2021_11_19 pozitivní vzorky k celku (8 dní)



Graf 4: procento pozitivních detekcí ze všech detekcí z dat diskriminační PCR za posledních 8 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 E484K , NRL doporučuje provádět pouze v případě multiplex PCR umožňující současnou detekci vRNA i mutací, nicméně, v tomto duchu není vydána aktualizace MO MZ.**
- 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. E484K je možné vyšetřovat namísto L452R, pro záchyt rezistentnější varianty delta vůči virus neutralizačním protilátkám**
- 5. Rozšířené spektrum mutací doporučených ke sledování se nemění a v případě jejich detekce poslat vzorky na sekvenaci. 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	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 19. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 14 492 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Je k dispozici celkem 1250 sekvenací s datem odběru mezi 19. říjnem a 19. listopadem.

Podíl *původní* varianty delta ve výše uvedeném období je 9,68 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.43, AY.4, AY.39, AY.116. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 33,12 %, podíl AY.4 je 11,36 %, podíl AY.39 je 10,88 %, podíl AY.116 činí 5,04 %, podíl AY. 4.2. činí v daném období pouze méně než 1 %, celkem bylo v ČR potvrzeno 15 případů (od 30. 8. 2021) této subvarianty a tendence je stoupající. U 4,4 % sekvencí v tomto období není v mezinárodní databázi GISAID přiřazena varianta. Trend nárůstu detekce lze v současné situaci spojit s AY.39. Podíl dalších subvariant AY.x činí méně než pět procent každá. Nově se objevuje varianta B.1.628, která nese některé ze sledovaných mutací nebo některé mutace typické pro jiné VOC (beta, gama) ve spike (L18F, T95I, R158S, P681H, T1027I) a je zařazena jako monitorovaná varianta (VUM). Tato varianta byla detekována u vzorků pocházejících z Jihomoravského a Olomouckého regionu. 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 genu A222V. NRL rozšiřuje spektrum sledovaných mutací dle situace ve světě. 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.

Tabulka 2:

Varianta	celkem	podíl	Dle WHO
AY.43	414	33,12 %	Delta+
AY.4	142	11,36 %	Delta+
AY.39	136	10,88 %	Delta+
B.1.617.2	121	9,68 %	Delta
AY.116	63	5,04 %	Delta+
AY.20	56	4,48 %	Delta+
AY.102	34	2,72 %	Delta+
AY.113	21	1,68 %	Delta+
AY.7.1	19	1,52 %	Delta+
AY.98.1	19	1,52 %	Delta+
AY.121	15	1,20 %	Delta+
AY.4.4	14	1,12 %	Delta+
AY.9.1	14	1,12 %	Delta+
AY.44	12	0,96 %	Delta+
AY.84	12	0,96 %	Delta+
AY.98	12	0,96 %	Delta+

Varianta	celkem	podíl	Dle WHO
AY.46.6	9	0,72 %	Delta+
AY.120	8	0,64 %	Delta+
AY.4.2	8	0,64 %	Delta+
AY.42	7	0,56 %	Delta+
B.1	6	0,48 %	
AY.33	6	0,48 %	Delta+
AY.46	5	0,40 %	Delta+
AY.36	4	0,32 %	Delta+
B	4	0,32 %	
B.1.628	4	0,32 %	
AY.1	4	0,32 %	Delta+
AY.46.4	3	0,24 %	Delta+
AY.92	3	0,24 %	Delta+
AY.45	3	0,24 %	Delta+
AY.5	2	0,16 %	Delta+
Další	16	1,28%	
Nezařazeno	55	4,40 %	
Celkem	1250	100	

Před 21ti 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.

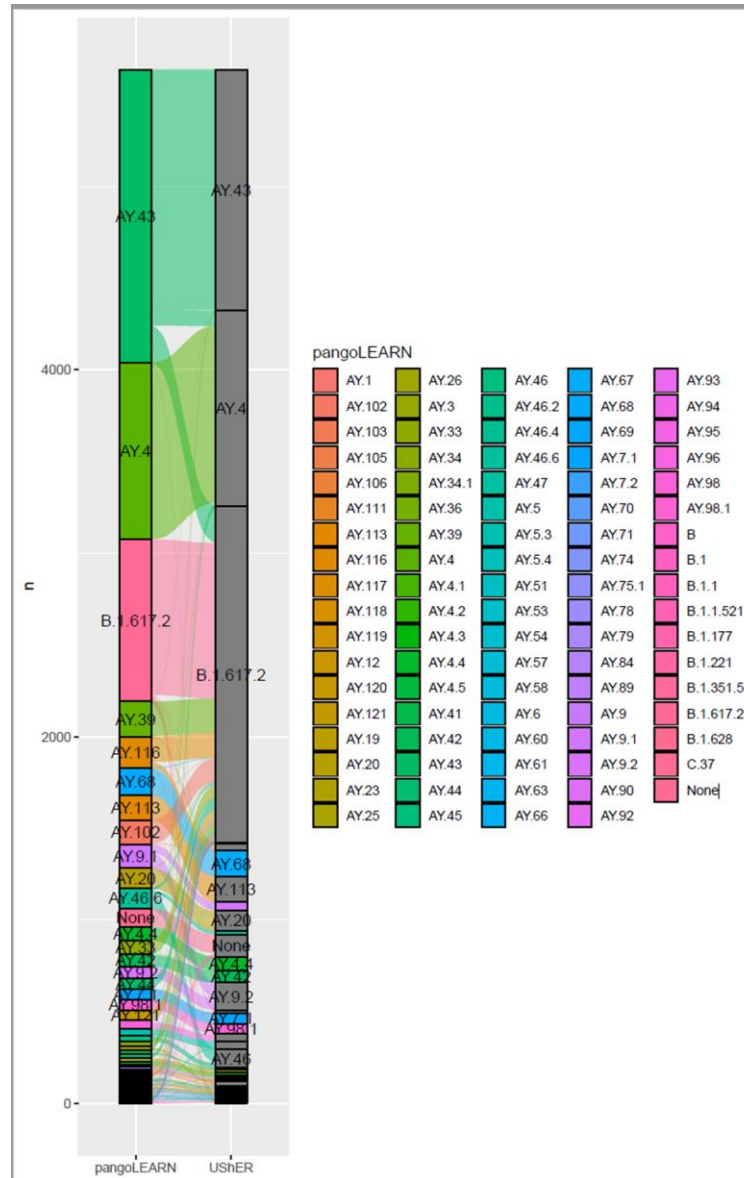
Od listopadu došlo ke změně výpočetního algoritmu tak, aby byla respektována fylogeneze viru. Je pravděpodobné, že nebude tak často docházet k reklasifikaci variant. Namísto algoritmu Pango learn je využíván algoritmu UShER (Ultrafast Sample placement on Existing tRee).

Pro online určení Pango linie je možné použít odkaz:

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

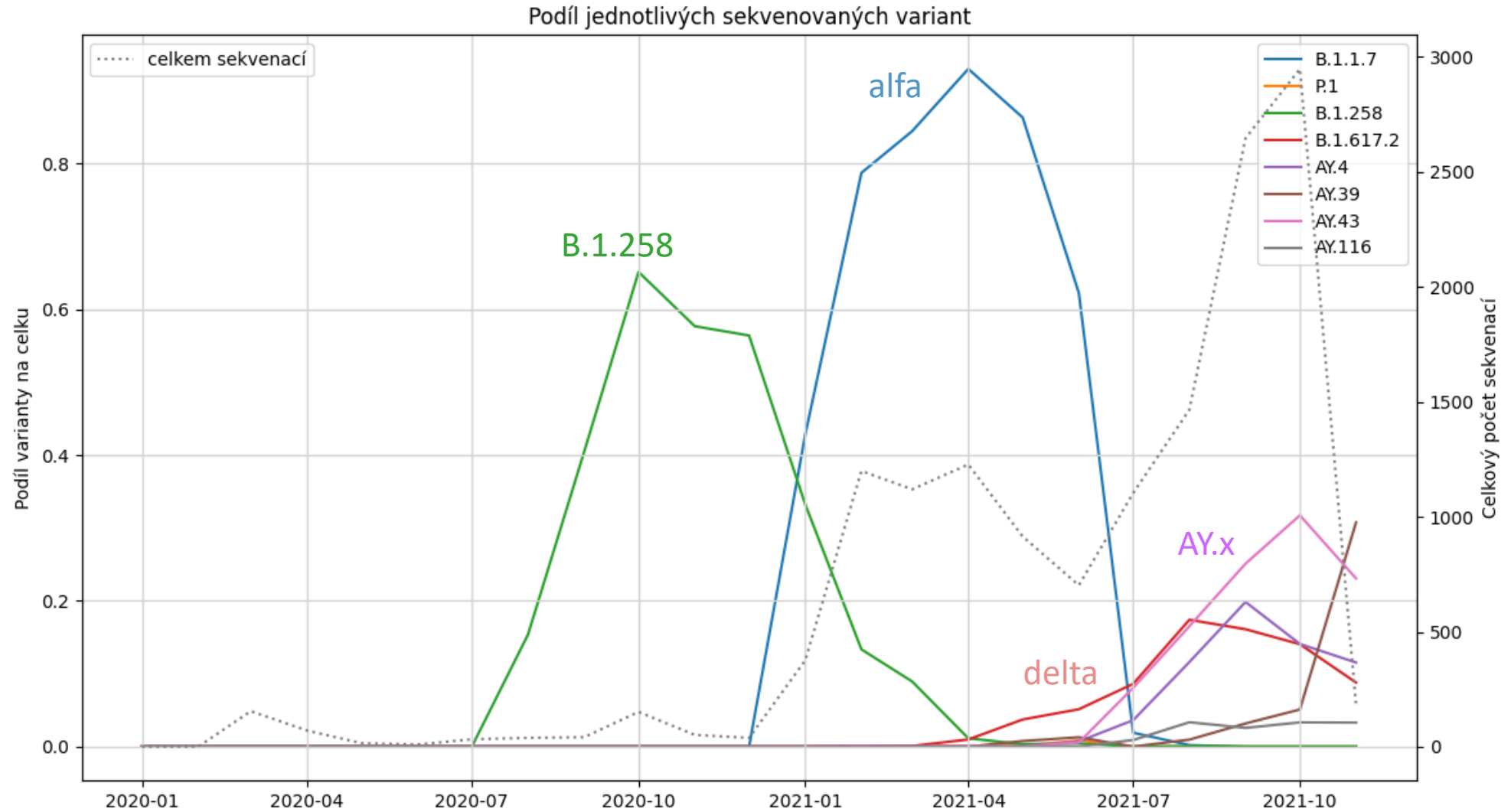
Letní varianta detekována v ČR a charakterizována D235A, D979E byla zařazena po AY.68.

AY.x – reklasifikace variant - vztah Pango learn a UShER klasifikace



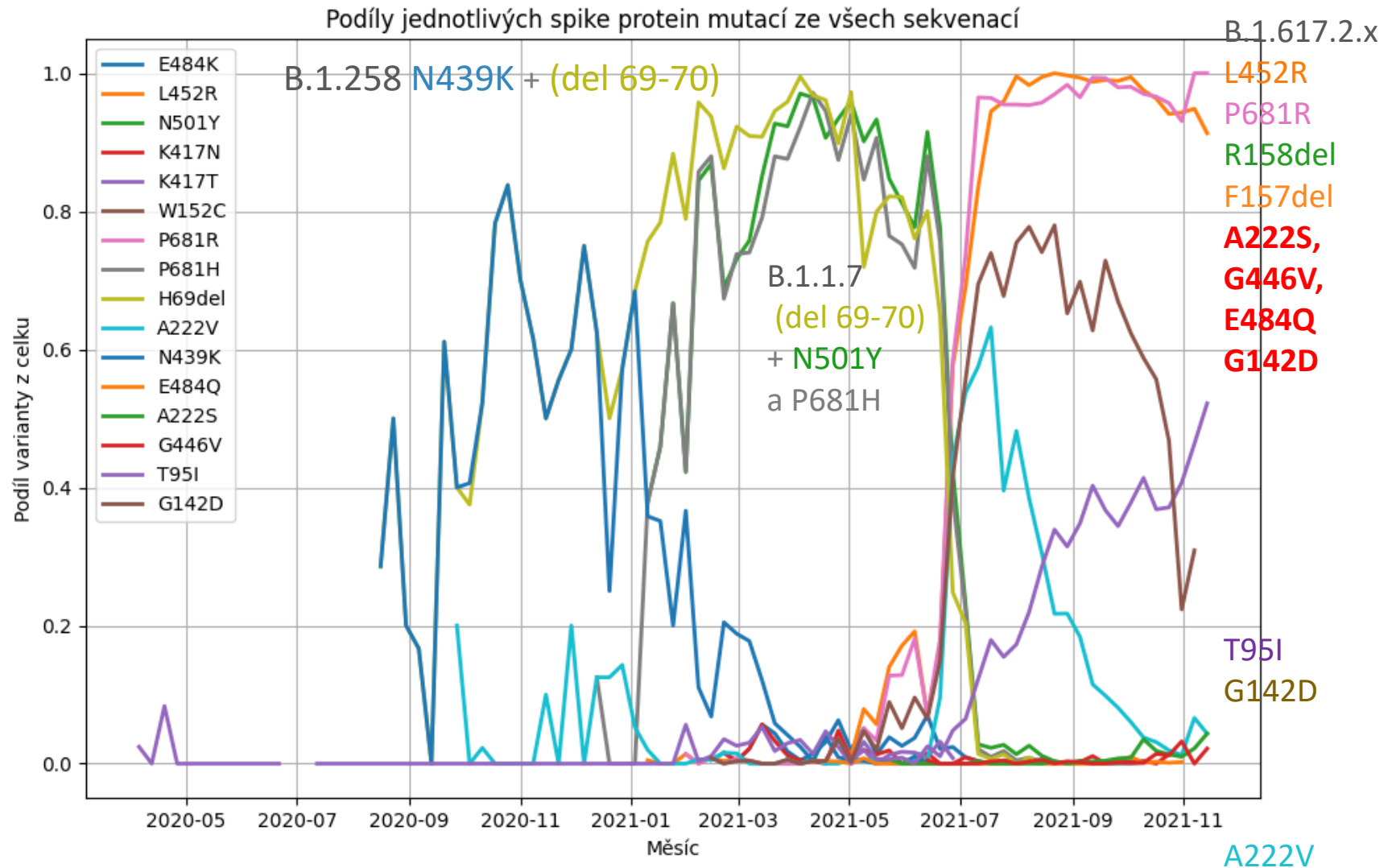
Převzato z COG.cz
[lineageAssignments.pdf](https://cog.cz/lineageAssignments.pdf)

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.



NRL sleduje frekvence mutací T95I a G142D, E484K/A/Q, G446V, A222S. 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). Výrobce / distributor již připravil novou verzi primeru, která tento výpadek eliminuje.

<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 AY.4.2 vykazuje nyní díky své transmisibilitě v centru pozornosti vědecké komunity.

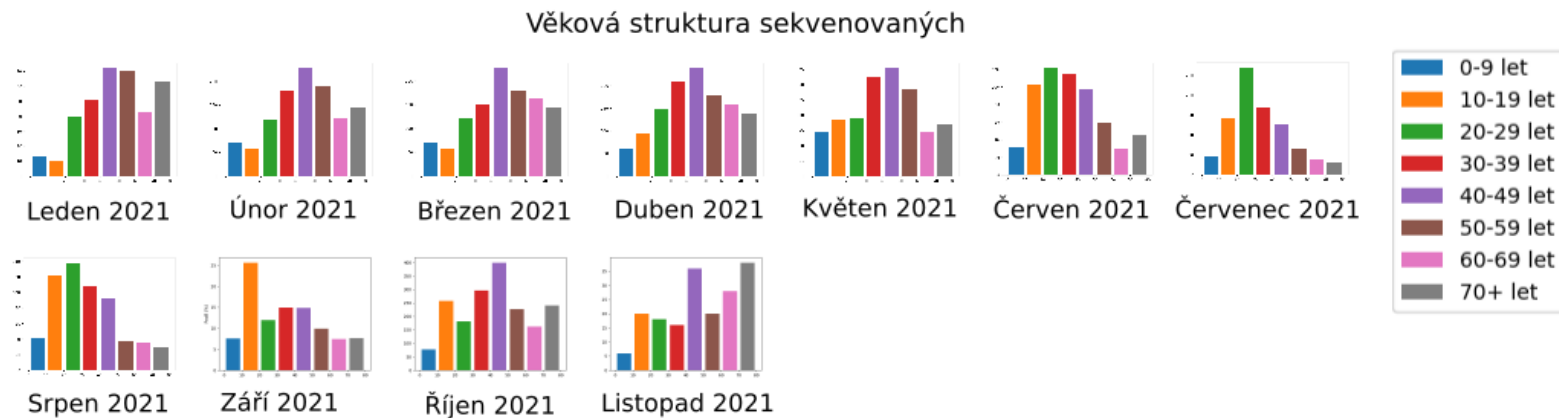
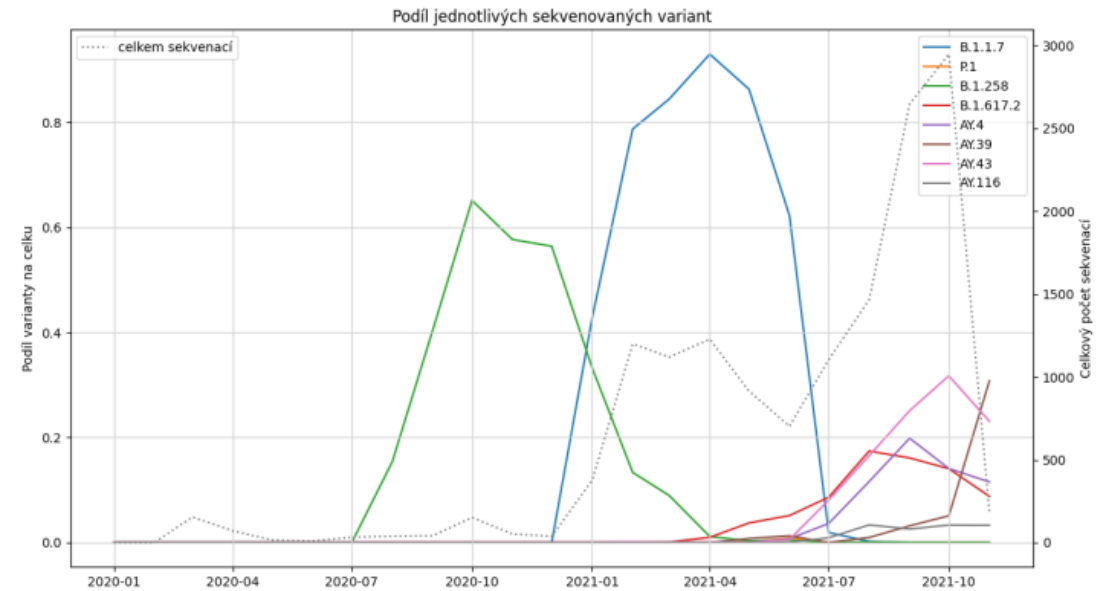
Další pozornost vzbuzuje evolučně primitivnější varianta nesoucí neobvyklou kombinaci mutací, která se objevuje u některých sekvencí, především z Konga a nově byla zařazena jako B.1.640, v ČR zatím nebyla prokázána:

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

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. V listopadu pak zaznamenáváme nárůst mezi nejvyššími věkovými skupinami. Tento jev neodpovídá věkové distribuci v případě sledování positivity PCR testů, ale je definice vzorků určených k sekvenaci a tedy algoritmu ÚZIS použitého k vyhodnocení.



- V období od 11. 11. do 19. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 50 744 provedených testů diskriminační PCR z celkem 76 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. V současné situaci je zřejmě nutné tyto testy omezit, neboť v důsledku míry positivity jsou kapacity laboratoří již nedostačující. 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. Proto je nutné snažit se omezit počet pozitivních detekcí po 2 000 až 5 000 denně. Prioritní mutace doporučené NRL se stále ukazují jako zásadní pro sledování evoluce viru. Doporučujeme vždy detekovat přítomnost mutace L452R a opět i E484K, v současné situaci pouze E484K a to pouze v těch případech, kdy je možné zařadit toto sledování do jediné multiplex PCR spolu s průkazem v RNA. Další mutace zatím nejsou stabilně přítomny. V zemích EU/EEA se začíná objevovat subvarianta AY.4.2, která nese dispozice k vyšší transmisibilitě. V ECDC je připravována analýza rizika v souvislosti se šířením varianty AY.4.2.

V ECDC/WHO dochází rovněž k přehodnocení VOC/VOI/VUM variant, bližší podrobnosti zde: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.

- Za rok 2021 bylo k 19. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 14 492 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Je k dispozici celkem 1250 sekvenací s datem odběru mezi 19. říjnem a 19. listopadem.

Podíl *původní* varianty delta ve výše uvedeném období je 9,68 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst subvariant delta varianty - AY.43, AY.4, AY.39, AY.116. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 33,12 %, podíl AY.4 je 11,36 %, podíl AY.39 je 10,88 %, podíl AY.116 činí 5,04 %. U 4,4 % sekvenací v tomto období není v mezinárodní databázi GISAID přiřazena varianta. Podíl dalších subvariant AY.x činí méně než pět procent každá. Podíl AY. 4.2. činí v daném období pouze méně než 1 %, celkem bylo v ČR potvrzeno 15 případů (od 30. 8. 2021) této subvarianty a tendence je stoupající. 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 Letní varianta detekována v ČR a charakterizována D235A, D979E byla zařazena po AY.68. Nově se objevuje varianta B.1.628, která nese některé ze sledovaných mutací nebo některé mutace typické pro jiné VOC (beta, gama) ve spike genu.

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