



Podrobná zpráva ke dni 26. 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, SZÚ

Úvod:

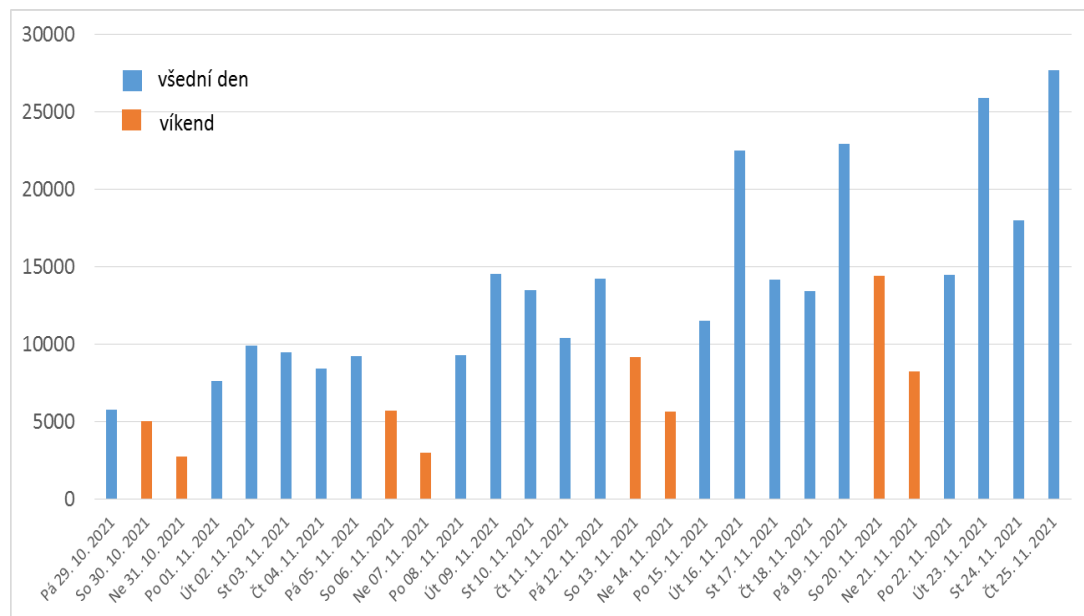
NRL pravidelně analyzuje data a poskytuje MZČR i laboratořím týdenní přehledový dokument, jehož cílem je monitorovat šíření variant SARS-CoV-2, které se na území ČR vyskytují, poskytovat informace o nových potenciálních i reálných rizicích v souvislosti s šířením a evolucí viru SARS-CoV-2, poskytovat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

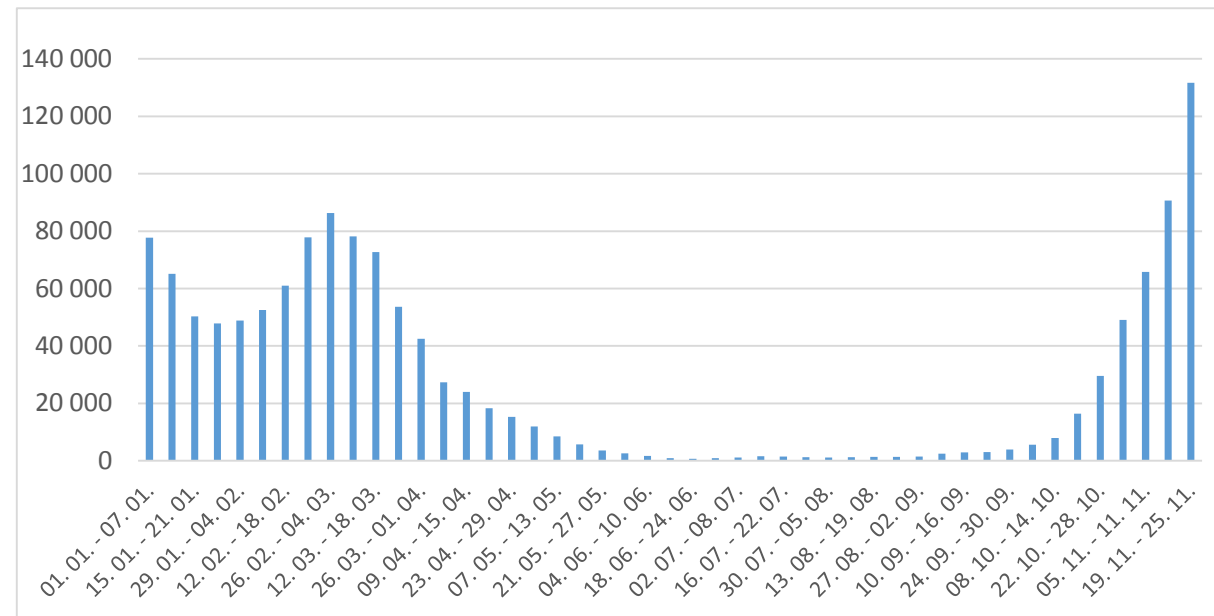
Souhrn a epidemiologický přehled	Strana 2 – 4
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 5
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 6 – 9
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 10 – 22
Závěr	Strana 23 - 24

- V období od 12. 11. do 26. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 61 773 provedených testů diskriminační PCR, což představuje necelých 28 % ze všech pozitivních testů. Diskriminační PCR bylo provedeno celkem v 76 laboratořích. Na variantu delta (včetně subvariant AY.x) připadá dle diskriminační PCR přibližně 98 % pozitivních případů (viz tab. 1).
- Za rok 2021 bylo k 26. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 15 009 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V této databázi je zveřejněno celkem 759 sekvenací s datem odběru mezi 26. říjnem a 26. listopadem.
- Přehled aktuální epidemiologické situace:
V ČR bylo za posledních 14 dní (tj. od 12. 11. do 25. 11. 2021) zachyceno 222 396 případů SARS-CoV-2 pozitivních osob, s denním průměrem 15 885,4 případů, což představuje 14denní incidenci 2 078,1 na 100 000 obyvatel. Vývoj počtu případů v delším časovém horizontu zobrazují grafy 1 a 2. Za uvedené období bylo nahlášeno 8 075 hospitalizací. Celkový počet hospitalizací ke konci sledovaného období činí 6 024 osob, z toho 686 osob s vážným průběhem. Nejvyšší 7denní incidence covid-19 je aktuálně hlášena v okresech Šumperk, Prostějov, Olomouc a Vyškov, podrobně uvádí situaci graf 3a. Na grafu 3a je vidět aktuální situace v porovnání se stavem před 7 dny, viz graf 3b. Z porovnání je vidět postupné šíření epidemie z východu republiky na západ.

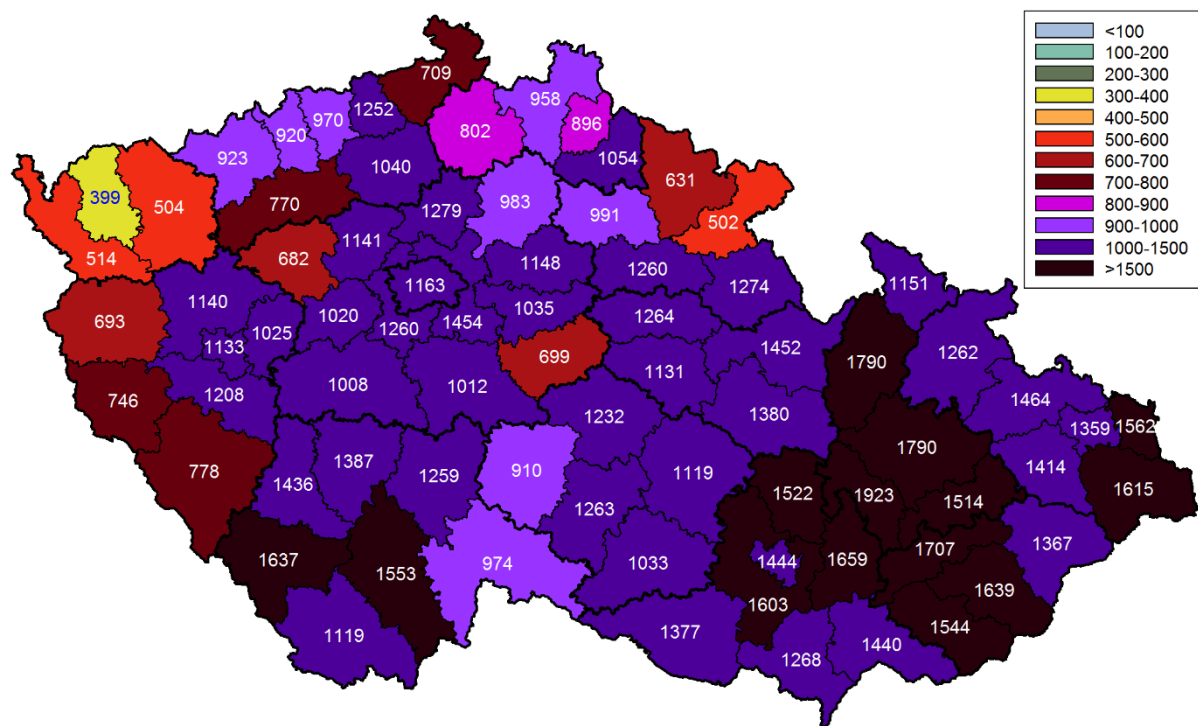
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



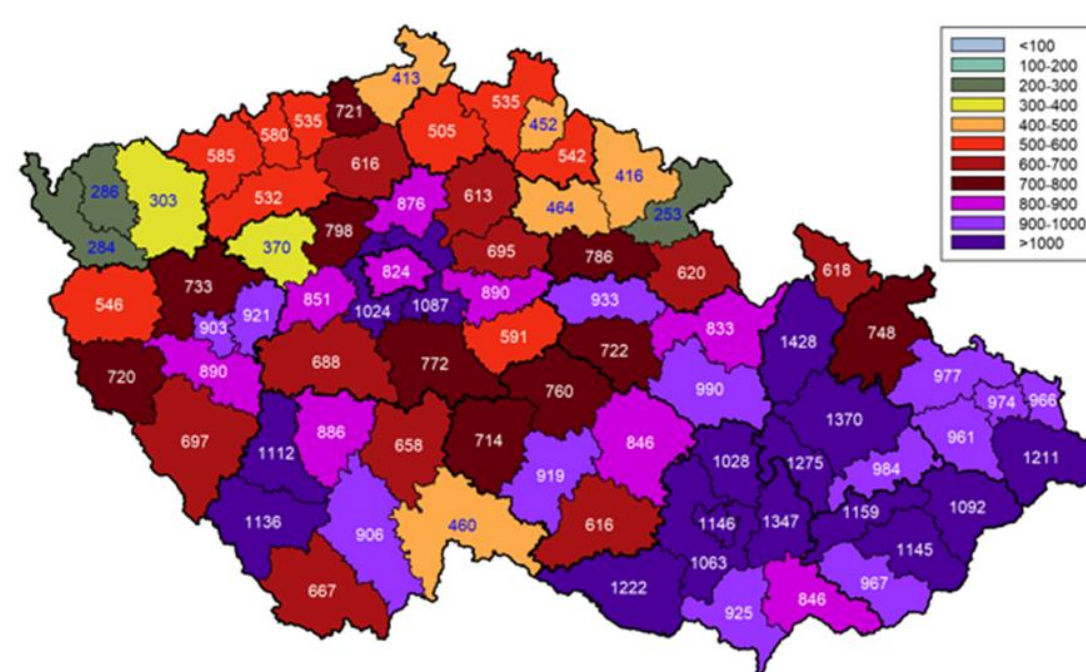
Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 25. 11. 2021



Graf 3a: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 25. 11. 2021



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



V období od 12. 11. do 26. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 61 773 provedených testů diskriminační PCR. 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+	68	15621	0,44 %	alfa, delta + A570D
E484K+	97	39059	0,25 %	beta, gama, alfa E484K+, delta +
L452R+	59139	60479	97,78 %	delta, delta+
L452R+ a E484K+	96	38939	0,25 %	delta+
L452R+ a N501Y+	2	3206	0,06 %	delta+
L452R- a del69_70+	0	463	0 %	susp. omikron
L452R- a N501Y+	0	3206	0 %	susp. omikron
L452R- a K417N+	0	127	0 %	susp. omikron

Diskriminační PCR:

Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků je zmírněna na 0 %, ale v souvislosti s VOC omikron je nutné ledovat více mutací:

**Minimum – u 10 % pozitivních detekcí E484K + N501Y nebo K417N nebo P681H, je možné vyšetřovat i L452K.
Na sekvenaci posílejte vždy L452R negativní vzorky, a všechny vzorky pozitivní na jakoukoli výše zmíněnou mutaci.
Dle MZ je povinné takto vyšetřovat všechny importy z Afriky, Belgie, Izraele, Hongkongu a Turecka.**

Další podrobnosti viz slide 17.

Diskriminační PCR:

Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků je zmírněna na 10 %, ale v souvislosti s VOC omikron je nutné sledovat více mutací:

Minimum – u 10 % pozitivních detekcí a u všech importů:

Vždy jednu z mutací nebo jejich kombinaci:

- 1. N501Y -K417N -P681H – del 69-70** (N501Y může u soupravy Kogene vykazovat falešnou negativitu!)
- 2. v případě kapacity vyšetřovat také E484K**
- 3. L452K**

Na sekvenaci posílejte vždy L452R negativní vzorky a všechny vzorky pozitivní na jakoukoli výše zmíněnou mutaci.

Dle MZ je povinné takto vyšetřovat všechny importy z Afriky, Belgie, Izraele, Hongkongu a Turecka. NRL doporučuje vyšetřovat všechny případy importu.


Preferenčně samostatně nebo v kombinaci sledovat: **N501Y + K417N +P681H+del69-70**, tyto by měly být pozitivní (ne každá taková PCR funguje, je možné, že kodón je jiný, kvůli degeneraci kódu a kvůli možnému jinému poolu tRNA, a **některé soupravy nemusí N501Y detekovat! (pozor na Kogene v tomto smyslu, Seegene vypadá OK)**). Tyto mutace mohou být pozitivní i v deltě, ale současně musí být u **omikronu L452R negativní** (u delty je tato SNP vždy pozitivní), a současně T478K pozitivní (je vždy pozitivní i u delty), ale nevím, zda některá ze souprav cílí na tuto mutaci.

Je také možnost dále testovat JEN L452R a v případě negativity považovat tento vzorek za suspektní omikron.

Všechny suspektní omikron je nutné sekvenovat, a zajistit vzorek na izolaci viru (tedy odebraný do virologického transportního média) a tento zaslat neprodleně do NRL.

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: 

Prosím, uvádějte pouze jedinou syntaxi, včetně dodržení typu písma.

Do jména sekvence uvádět vždy akronym laboratoře: 

Například:

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

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

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

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

Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

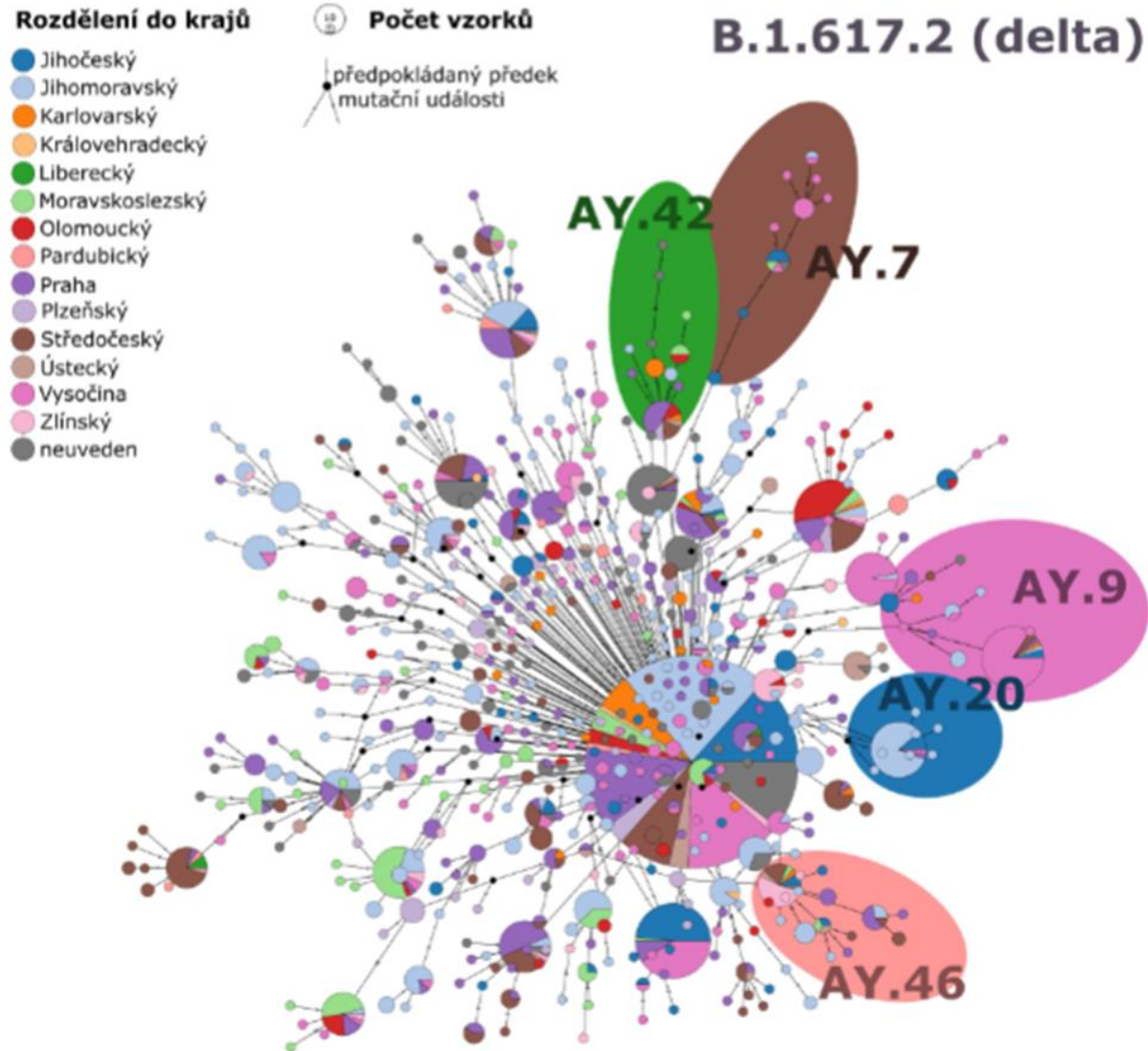
Za rok 2021 bylo k 26. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 15 009 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V této databázi je zveřejněno celkem 759 sekvenací s datem odběru mezi 26. říjnem a 26. listopadem.

Podíl *původní* varianty delta ve výše uvedeném období klesl na 4,87 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst nových subvariant delty - AY.43, AY.122, AY.4, AY.39. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 28,99 %, podíl AY.122 je 21,61 %, podíl AY.4 je 11,2 %, AY.39 činí 5,53 %, podíl AY.4.2 činí v daném období pouze méně než 2 %. % (celkově bylo v roce 2021 detekováno 22 sekvencí AY.4.2). U 2,5 % sekvenací v daném 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 spike proteinu. 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	Počet	Podíl	Die WHO
AY.43	220	28,99 %	Delta+
AY.122	164	21,61 %	Delta+
AY.4	85	11,20 %	Delta+
AY.39	42	5,53 %	Delta+
B.1.617.2	37	4,87 %	Delta
AY.20.1	32	4,22 %	Delta+
AY.102	20	2,64 %	Delta+
AY.113	15	1,98 %	Delta+
AY.7.1	12	1,58 %	Delta+
AY.121	11	1,45 %	Delta+
AY.84	10	1,32 %	Delta+
AY.4.2	10	1,32 %	Delta+
AY.98.1	10	1,32 %	Delta+
AY.4.4	10	1,32 %	Delta+
AY.34	8	1,05 %	Delta+
AY.9.1	8	1,05 %	Delta+
AY.98	7	0,92 %	Delta+
AY.46	6	0,79 %	Delta+
AY.36	5	0,66 %	Delta+
AY.108	4	0,53 %	Delta+
AY.44	3	0,40 %	Delta+
AY.45	3	0,40 %	Delta+
AY.33	2	0,26 %	Delta+
AY.89	2	0,26 %	Delta+
AY.1	2	0,26 %	Delta+
AY.46.6	2	0,26 %	Delta+
B.1.558	1	0,13 %	
B.1	1	0,13 %	
AY.4.5	1	0,13 %	Delta+
B	1	0,13 %	
AY.75.1	1	0,13 %	Delta+
AY.20	1	0,13 %	Delta+
AY.46.2	1	0,13 %	Delta+
AY.42	1	0,13 %	Delta+
AY.70	1	0,13 %	Delta+
AY.5	1	0,13 %	Delta+
Nezařazeno	19	2,50 %	
Celkem	759	100	



Varianta B.1.1.529 obsahuje více než 30 mutací v genu pro spike protein, tedy neobvyklé množství na nově objevenou variantu. Rovněž v dalších genech byly detekovány mutace. Pozornost může budit mutace v ORF 14, tedy v genu, který kóduje RNA opravný enzym, 3' - 5' RNA exonukleázu (podílí se na opravě chyb vznikajících při tvorbě RNA řetězce, tedy při replikaci viru v případě zařazení chybné báze). Některé z mutací jsou známy a byly detekovány u několika variant VOC, VOI, k jejichž vývoji došlo konvergentní evolucí. Jedná se tedy o mutace, které přinášejí zcela jasnou evoluční výhodu, některé jsou zcela nové. Znepokojení rovněž vzbuzuje první pozorovaná inserce u SARS-CoV-2. Dne 26.11.2021 v odpoledních hodinách proběhlo mimořádné zasedání WHO k přijetí opatření týkajících se B.1.1.529 a pro tuto variantu bylo přijato označení omikron.

ECDC již rozeslalo prostřednictvím EWRS upozornění všem zemím zapojeným v tomto systému a již tuto variantu zařadilo mezi VOC.

Varianta je pravděpodobně fylogeneticky odvozená od původních kmenů linie B.1 SARS-CoV-2 cirkulujících v první polovině roku 2020 (viz obr. 2). Výčet mutací přikládáme níže. Ve vědecké komunitě se spekuluje, že je pravděpodobné, že první pacient byl imunokompromitován. Vzhledem k epidemické situaci v Africe se spekuluje o souběhu s infekcí HIV. Kombinace mutací současně i zastoupení již známých mutací vede k podezření na vysokou transmisibilitu (del 69-70, N501Y, P681H, S477N) a na escape charakter (K417N, E484A, N501Y). Vysokou transmisibilitu implikuje kombinace mutací zasahující jak N-terminální oblast s výraznou změnou reliéfu spike proteinu, tak změny ve vazebné oblasti a současně změna v těsné blízkosti polybazického štěpného místa, která ovlivňuje rovněž intracelulární transmisibilitu, tedy rychlejší rozvoj nemoci.

Varianta se poprvé objevila 11. listopadu v Botswaně, 13. listopadu byla parciálně sekvenována v Hongkongu a 14. listopadu byla zachycena v Jižní Africe (všechny záchyty jsou lokalizovány v provincii Guanteng, ve stejné provincii leží město Johannesburg). První detekce byla zachycena u importu z Afriky v Hongkongu a následně došlo k objevení časnějších sekvencí v Botswaně. Izrael oznámil detekci B.1.1.529 u importu z Malawi. Vzhledem k malému počtu celogenomových sekvencí z Botswany nelze vyloučit komunitní přenos. JAR intenzivně sekvenuje vzorky z Guantengu. Kombinace již známých mutací přináší výhodu pro virus, ale současně umožňuje i detekci pomocí diskriminačních PCR. V GISAID je k dnešnímu dni 26.11.2021 vloženo 66 sekvencí, 2 z Hongkongu (import z Afriky), 6 z Botswany a 58 z JAR. Tuto variantu lze detekovat stávajícími diskriminačními PCR, a to dle doporučení NRL a rovněž metodou parciální i celogenomové sekvenace.

Zachování terapeutické účinnosti dosud známých preparátů zatím nebylo ověřeno, ale je zřejmé, že podání monoklonálních protilátek bude vždy vyžadovat jejich kombinaci, důvodem jsou mutace v N-terminální oblasti viru, ve vazebném místě.

Země s potvrzeným výskytem:

Botswana, Hongkong, Izrael, Lesotho, Malawi, Namibie, JAR, Zimbabwe, Belgie

Ovlivnění diagnostické PCR: metody, které využívají k PCR průkazu amplifikaci ve spike genu, mohou být v důsledku nahromadění mutací falešně negativní.



VOC omikron - B.1.1529 (3)

Spike mutace:

A67V, **Δ69-70**, T95I, G142D/Δ143-145, Δ211/L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, **K417N**, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, **N501Y**, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, **P681H**, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Non-spike mutace:

NSP3 gen: K38R, V1069I, Δ1265/L1266I, A1892T;

NSP4 gen: T492I;

NSP5 – P132H;

NSP6 – Δ105-107, A189V;

NSP12 – P323L;

NSP14 gen: I42V; E – T9I;

M gen: D3G, Q19E, A63T;

N gen: P13L, Δ31-33, R203K, G204R

Mutace, které je možné detekovat diskriminační PCR:

Δ69-70, K417N, N501Y, P681H,

Mutace typické pro více nebo jednu VOC/VOI:

Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, K417N, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Doporučení pro laboratoře:

Dle aktuální **situace doporučuje NRL sledovat**: E484K a současně jednu z již známých mutací: N501Y, K417N, del69-70, P651H, případně doplnit o L452R a/nebo T478K. Pro uvedené mutace ČR běžně má k dispozici diagnostické soupravy, které detekci těchto mutací umožňují. E484K se v nové variantě B.1.1.529 nevyskytuje, ale je typická pro delta + E484K, jejíž incidence v Evropě mírně trvale vzrůstá (ECDC a WHO důrazně doporučují monitoring šíření), a která má jasný escape charakter, tedy nejvyšší míru rezistence vůči protilátkám.

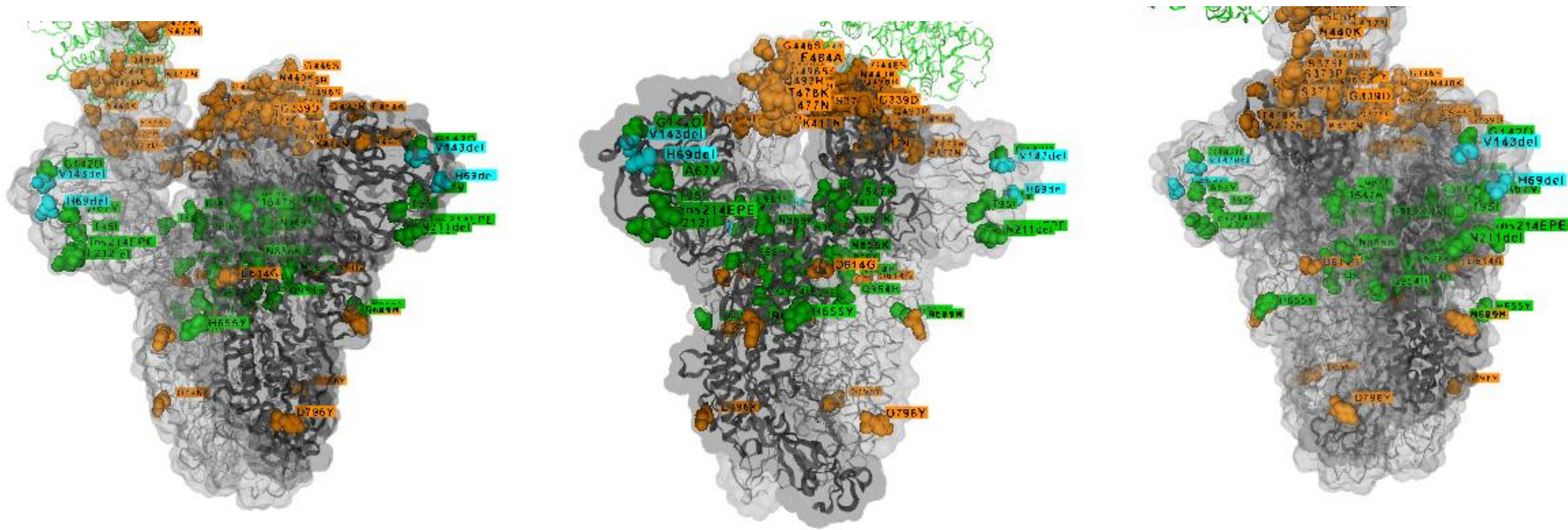
Doporučení pro sekvenace:

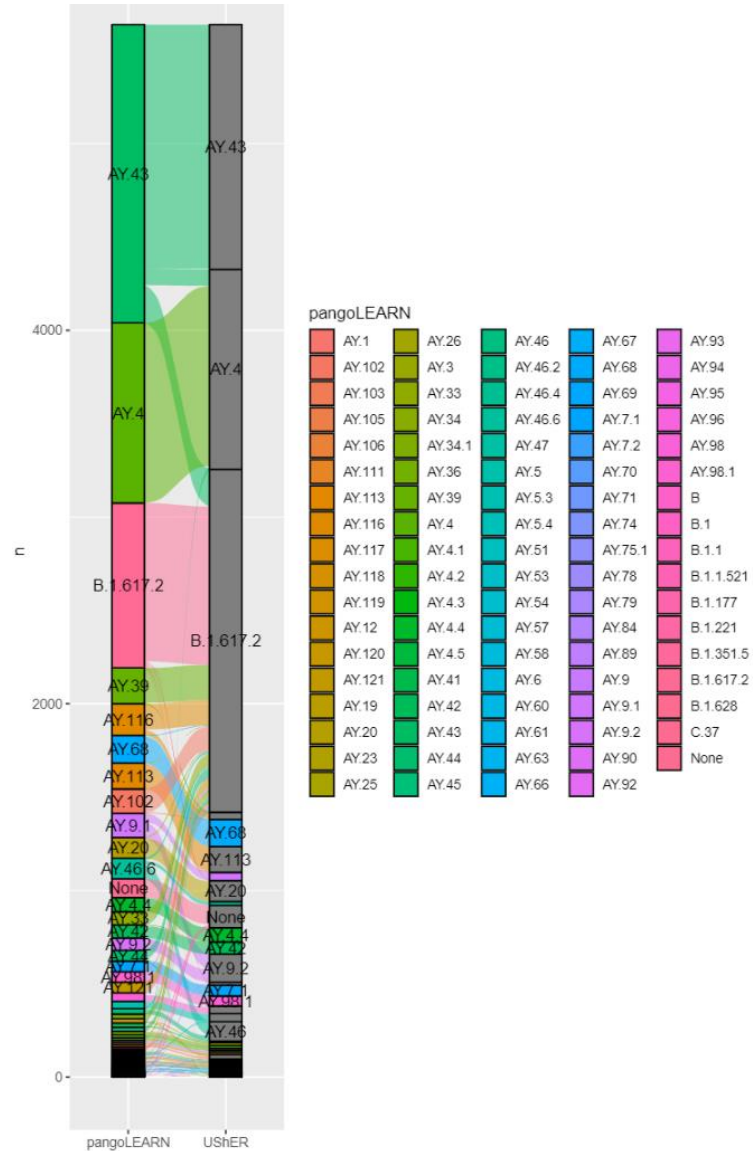
WGS – celogenomové sekvenace

Zcela zásadní je podpořit a posílit sekvenační kapacitu v rámci Národní molekulárně biologické surveillance SARS-CoV-2, zajistit její kontinuitu, včetně financování, nejméně do konce roku 2023.

Parciální sekvenace dle Sangera:

Podpořit v rámci Národní molekulárně biologické surveillance SARS-CoV-2 laboratoře, které tuto metodu používají.

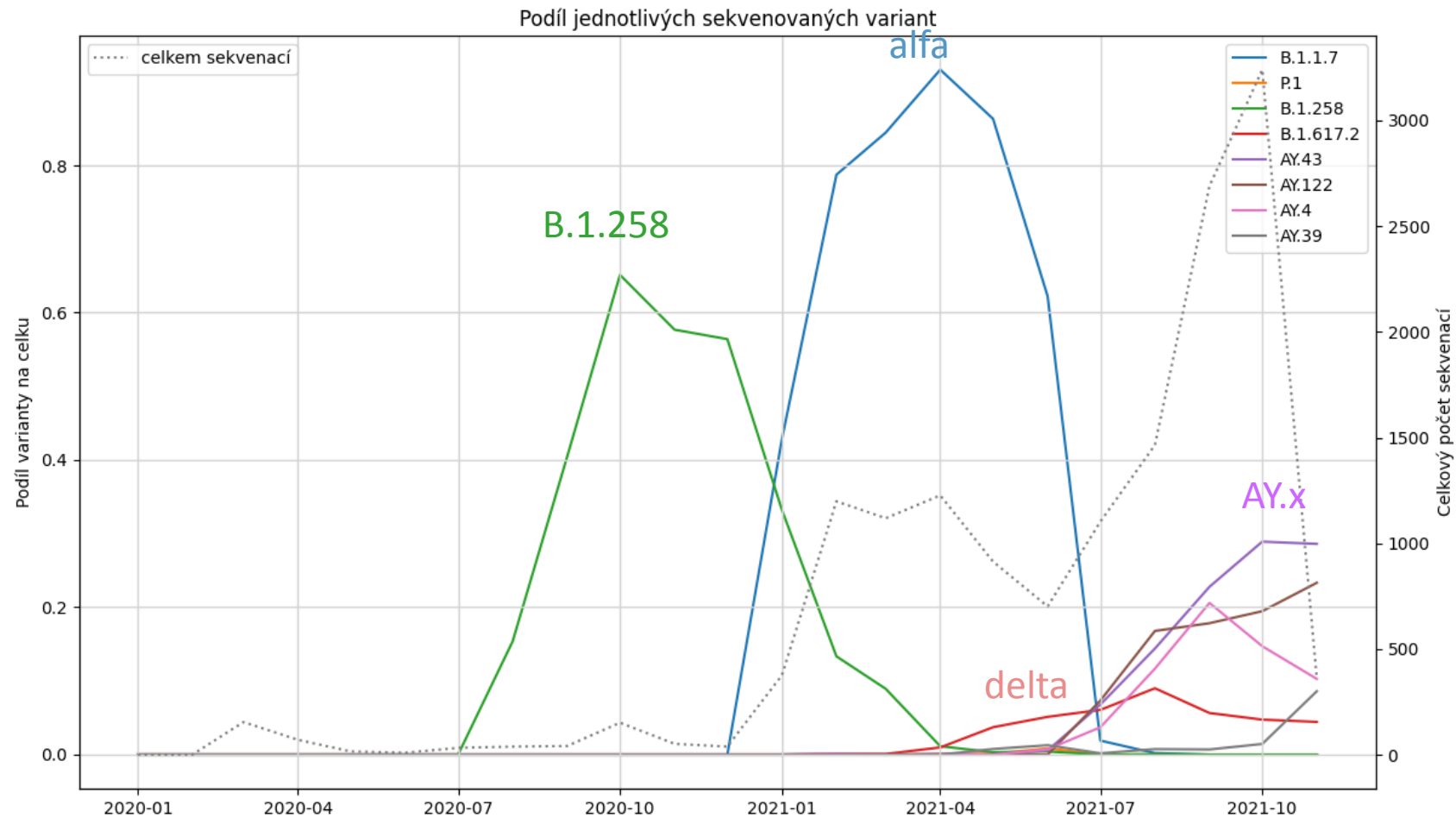




Převzato z COG.cz

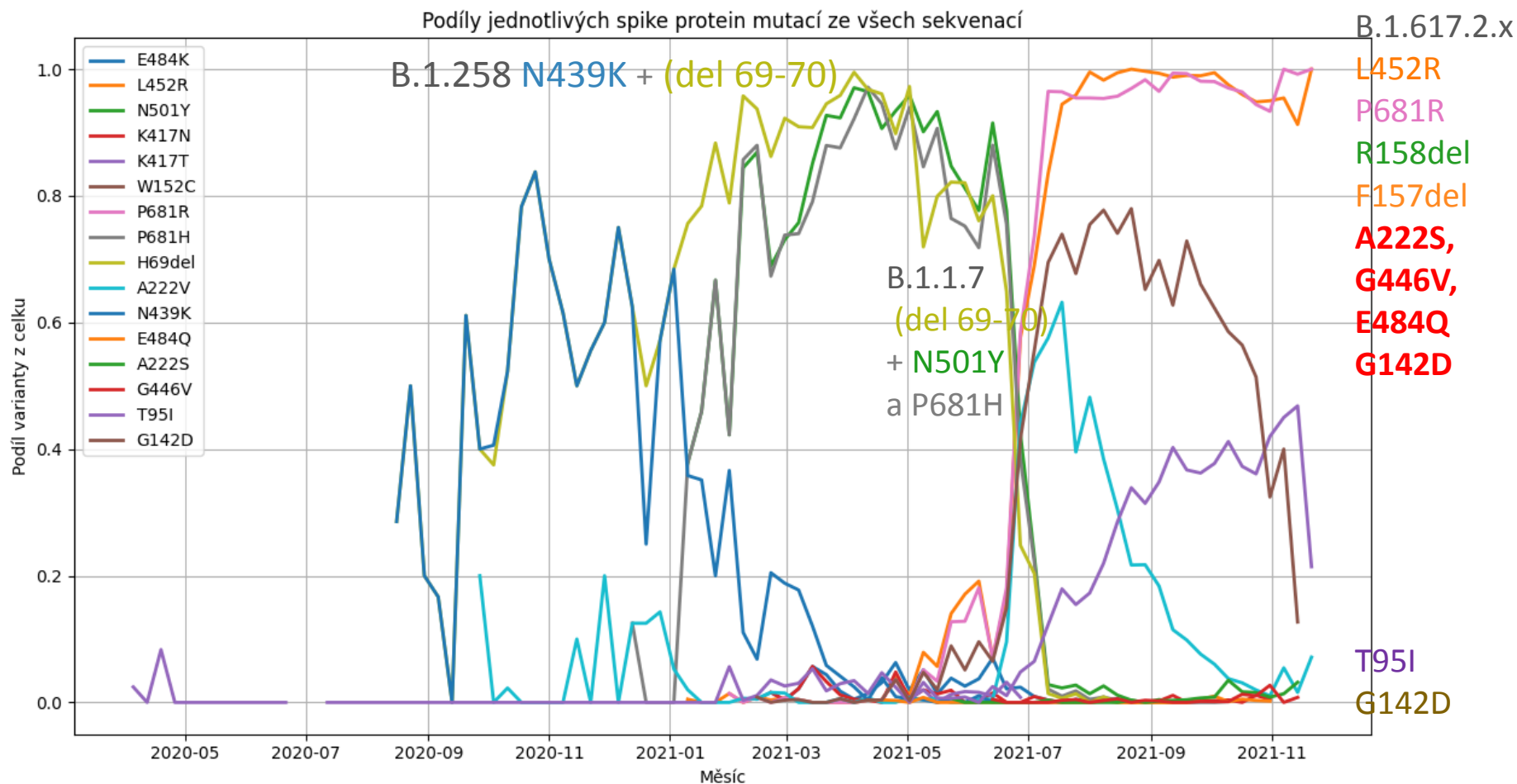
[lineageAssignments.pdf](#)

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



Graf č. 5:

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

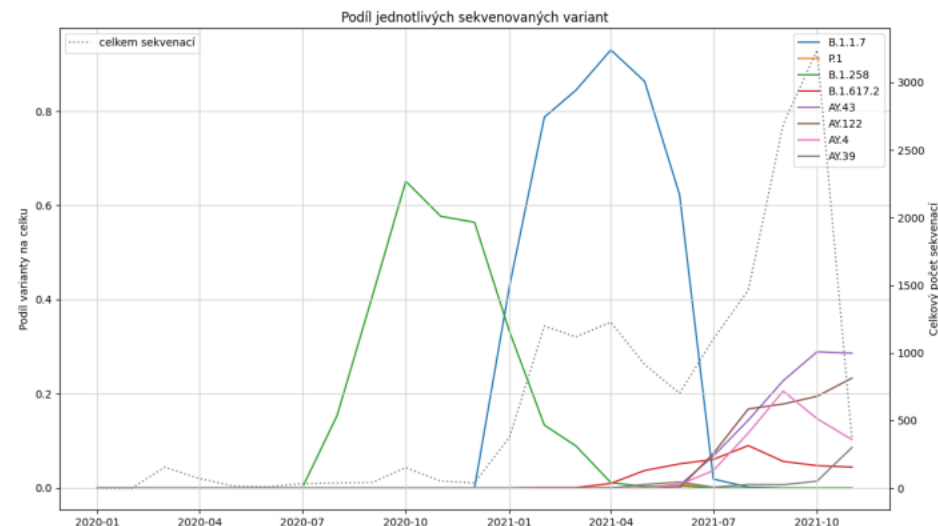


A222V

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.



Věková struktura sekvenovaných



V období od 12. 11. do 26. 11. 2021 má NRL k dispozici data z 61 773 provedených testů diskriminační PCR (delta + AY.x tvoří 98%)

Za rok 2021 bylo k 26. 11. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 15 009 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V této databázi je zveřejněno celkem 759 sekvenací s datem odběru mezi 26. říjnem a 26. listopadem.

Podíl původní varianty delta ve výše uvedeném období klesl na 4,87 %. Dle celogenomové sekvenace zaznamenáváme nárůst nových subvariant delty - AY.43, AY.122, AY.4, AY.39. Podíl subvarianty AY.43 v tomto období činí 28,99 %, podíl AY.122 je 21,61 %, podíl AY.4 je 11,2 %, AY.39 činí 5,53 %, podíl AY.4.2 činí v daném období pouze méně než 2 %. U 2,5 % 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 spike proteinu. 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.

Dle aktuální situace doporučuje NRL sledovat: i E484K, ale především jednu z již známých mutací: N501Y, del69-70, P651H, případně doplnit o L452R a /nebo T478K. Kromě T478K jsou v ČR běžně k dispozici diagnostické soupravy, které detekci těchto mutací umožňují. E484K se v nové variantě B.1.1.529 nevyskytuje, ale je typická pro delta + E484K, jejíž incidence v Evropě mírně trvale vzrůstá (ECDC a WHO důrazně doporučují monitoring šíření), a která má jasný escape charakter, tedy nejvyšší míru rezistence vůči protilátkám.

V souvislosti s objevením se nové VOC omikron se opět ukazuje role diskriminačních PCR jako nezastupitelná. Užitečnost by lépe vynikla v případě nižší incidence. Čím vyšší incidence, tím méně kapacit zbývá pro toto vyšetření a tím větší pravděpodobnost skrytého šíření nežádoucí varianty.

Země s potvrzeným výskytem omikron: Botswana, Lesotho, Malawi, Namibie, JAR, Zimbabwe

Země s potvrzeným importem: Hongkong, Izrael, Belgie

Kolektiv autorů:

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