



Podrobná zpráva ke dni 3. 9. 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	Strana 2
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 4
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 5, 6
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 7 - 15
Závěr	Strana 16

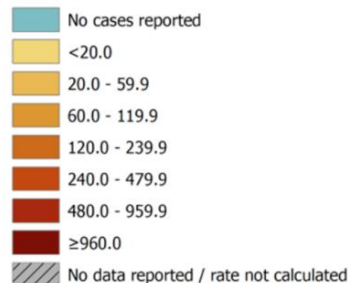
- V rámci diskriminačních PCR v ČR bylo vyšetřeno v období od 20. 8. do 3. 9. 2021 celkem 2 353 vzorků z celkem 74 laboratoří. Podezření na detekci varianty delta bylo vysloveno u 95 % vzorků. Varianta alfa je pod 2 % případů.
- Vzorků se srpnovým datem odběru bylo sekvenováno 491. Výskyt původní delta varianty klesá na 66 % a vzrůstá nárůst delta subvarianty AY.4 a to na 19,8 %.

- SZU bude 14.9. distribuovat EHK vzorky, sada bude obsahovat všechny VOC, proto NRL doporučuje nespotřebované izoláty RNA využít jako pozitivní kontroly pro používané diskriminační PCR soupravy.

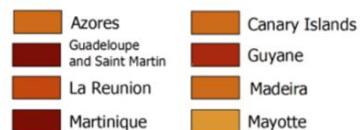
Aktuální situace v Evropě dle ECDC



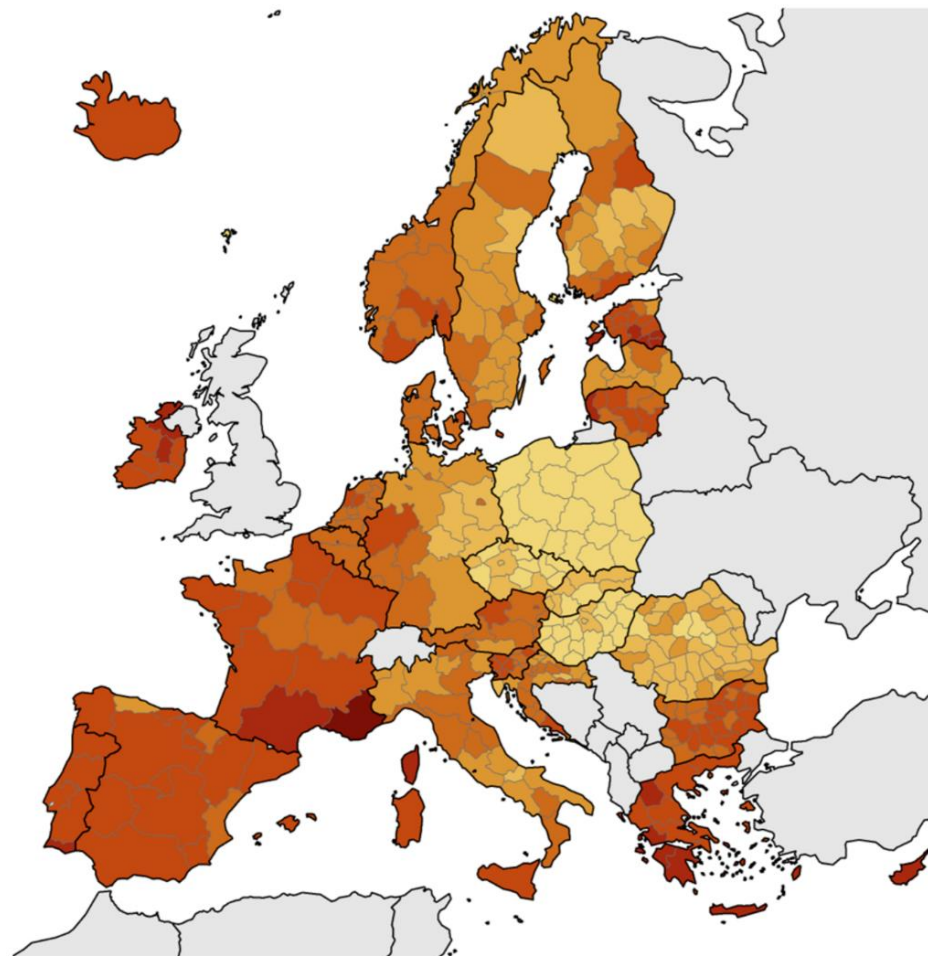
14-day COVID-19 case notification rate per 100 000 population 2021-w33 to 2021-w34



Regions not visible in the main map extent



Countries not visible in the main map extent



Administrative boundaries: © EuroGeographics © UN-FAO © Turkstat. ©Kartverket ©Instituto Nacional de Estadística - Statistics Portugal.

Čtrnáctidenní incidence COVID-19 na 100 000 obyvatel v 33 a 34 kalendářním týdnu 2021.

Z grafu je patrná nižší incidence COVID-19 v ČR, Polsku, Slovensku, Maďarsku i Rumunsku.

V období od 20. 8. do 3. 9. 2021 má NRL k dispozici data z 2 353 provedených testů diskriminační PCR z celkem 74 laboratoří. Na základě analýzy těchto dat NRL zjistila, že na variantu delta připadá stále přibližně 95 % pozitivních případů vyšetřených diskriminační PCR (viz tab. 1). Variantě alfa náleží méně než 2 % vzorků. Podíl delta varianty s E484K a N501Y se nezvyšuje, spíše klesá, a výskyt těchto variant je ojedinělý.

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl sady ze	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	2079	1970	94,7 %	delta
E484K+	1688	27	1,5 %	beta, gama, alfa E484K+, delta+
L452R+, E484K+	1615	4	0,2 %	delta+
N501Y+, L452R+	561	1	0,1 %	delta+
A570D+	520	4	1,7 %	alfa

V poslední době se objevují v rámci delta varianty nové kombinace mutací, např. N501Y a E484K, tyto kombinace byly v ČR detekovány v rámci diskriminačních PCR i sekvenace (N501Y) nebo pouze v rámci diskriminačních PCR (E484K). Na výskyt E484K u některých případů delta varianty upozorňuje i Švédsko v rámci interní komunikace zemí EU/EEA. V českých sekvencích detekujeme nárůst A222V, D253A (N terminální doména) a D979E podrobněji viz: „haplotype analysis network“ . Viz strana 12.

Diskriminační PCR:

Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků se nemění. V případě, že laboratoř nevyšetřuje E484K a L452R v jedné reakci, doporučujeme jako první zařadit master mix obsahující próbu pro detekci L452R. Pokud je detekována jedna z těchto mutací jako pozitivní, není aktuálně nutné stanovovat E484K v další PCR. Do úvahy dáváme doporučení na sledování K417N, která je charakteristická pro AY.1 (subvarianta vyštěpená z delty). Tato mutace má podíl na vyšší transmisibilitě i escape charakteru.

- 1. Minimum – vždy povinné: E484K a L452R**
- 2. Možnost : E484K a L452R a N501Y**
- 3. Možnost : E484K a L452R a N501Y a K417N**
- 4. Možnost : E484K, L452R, N501Y, K417N a P681R**

Doporučení se mohou měnit v souvislosti se změnami SARS-CoV-2 a s epidemickou situací. WHO doporučení ze dne 9. srpna 2021 uvádí stejné preferenční mutace (str. 5).

Zdroj: <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:

Pole „Location“ uvádět kraj takto:



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

Do jména sekvence uvádět 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 3. 9. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 7 290 SARS CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. Celkem 491 WGS se vztahuje k datu odběru v srpnu.

Podíl původní varianty delta je v měsíci srpnu 66,8 %. Zaznamenáváme dle celogenomové sekvenace nárůst subvariant delta varianty - AY.4, AY.12 a AY.9, které se šíří například v Izraeli (dominance AY.12), ve Spojených státech, nebo ve Spojeném království (dominance AY.4) a dalších zemích Evropy včetně ČR (viz tab. 2). Podíl subvarianty AY.4 vynech rapidně vrůstá na úkor původní delta varianty a od začátku srpna k 3. 9. činí již **19,8 %**, podíl AY.9 je 7,9 %, podíl AY.12 je 3,1 %. (graf na straně 8). Ostatní varianty představují méně než jedno procento.

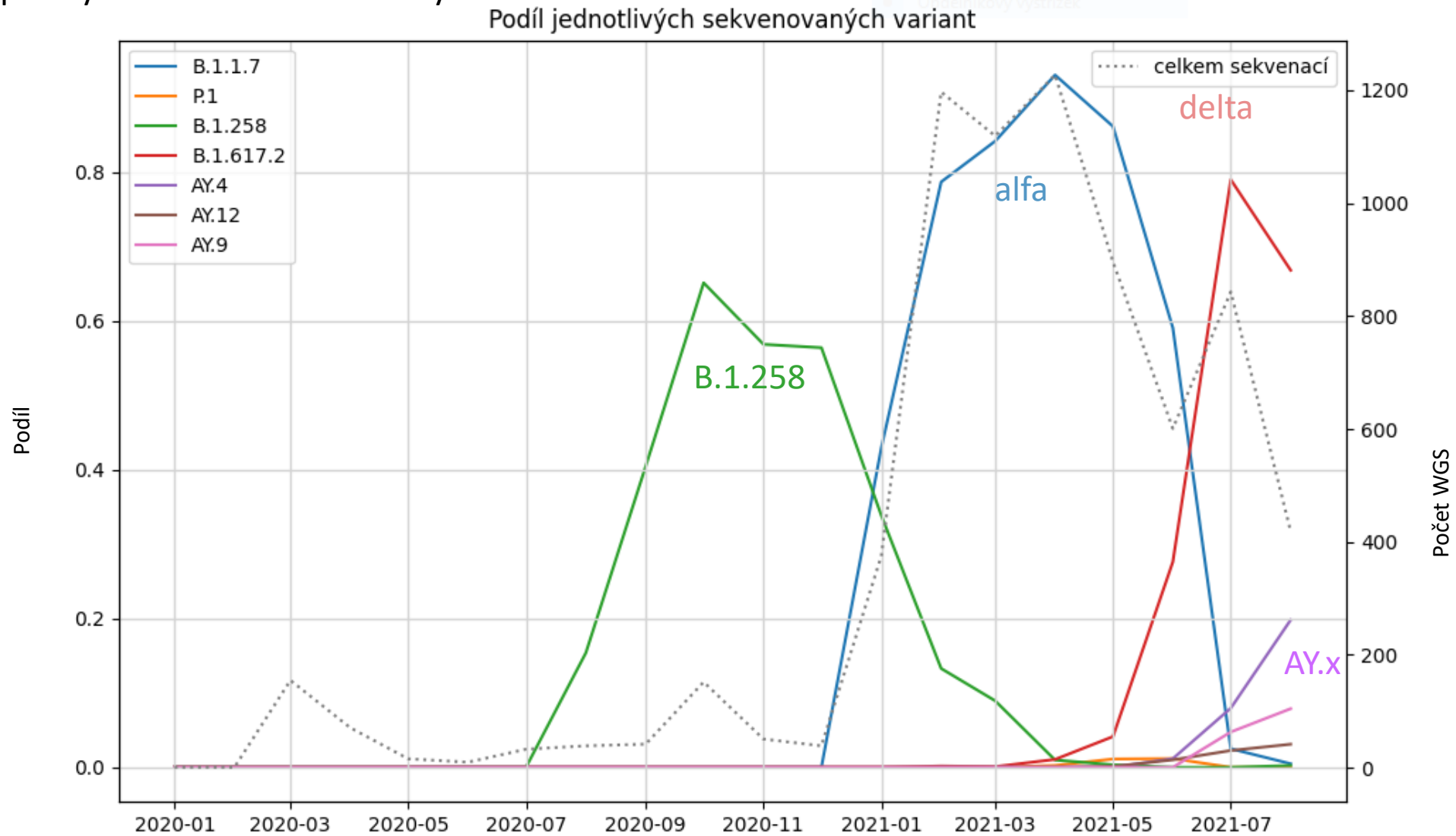
Pozn.: data ze sekvenací jsou k dispozici za cca 1-3 týdny od data odběru.

Tabulka 2. Přehled detekcí AY.x (delta +) dle krajů

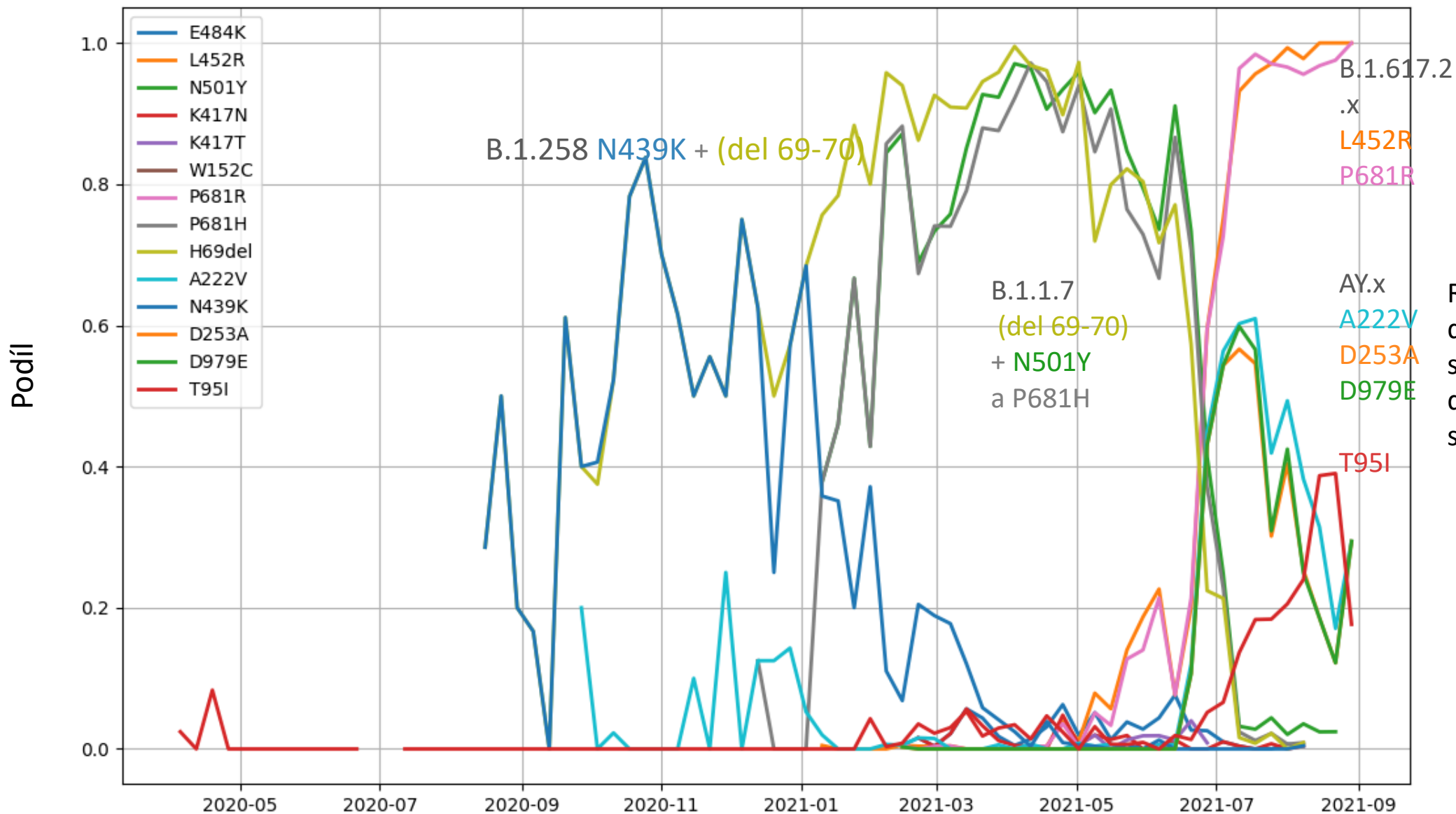
Kraj	Varia nta	Počet
Nezařazeno	AY.12	10
Jihomoravský kraj	AY.12	3
Olomoucký kraj	AY.4	25
Pardubický kraj	AY.4	3
Moravskoslezský kraj	AY.4	11
Praha	AY.4	5
Vysočina	AY.4	9
Středočeský kraj	AY.4	1
Nezařazeno	AY.4	6
Ústecký kraj	AY.4	1
Zlínský kraj	AY.4	3
Jihomoravský kraj	AY.4	18
Královéhradecký kraj	AY.4	1
Jihomoravský kraj	AY.6	1
Středočeský kraj	AY.9	2
Vysočina	AY.9	3
Moravskoslezský kraj	AY.9	10
Pardubický kraj	AY.9	2
Olomoucký kraj	AY.9	2
Jihomoravský kraj	AY.9	8
Nezařazeno	AY.9	2
Praha	AY.9	3
Zlínský kraj	AY.9	1
Celkem		127

Podíl variant SARS-CoV-2 dominantních v ČR od března 2020 sekvenace

Z grafu je patrný nárůst AY.4 subvarianty.



Podíl dominantních mutací ve spike genu SARS-CoV-2 od března 2020



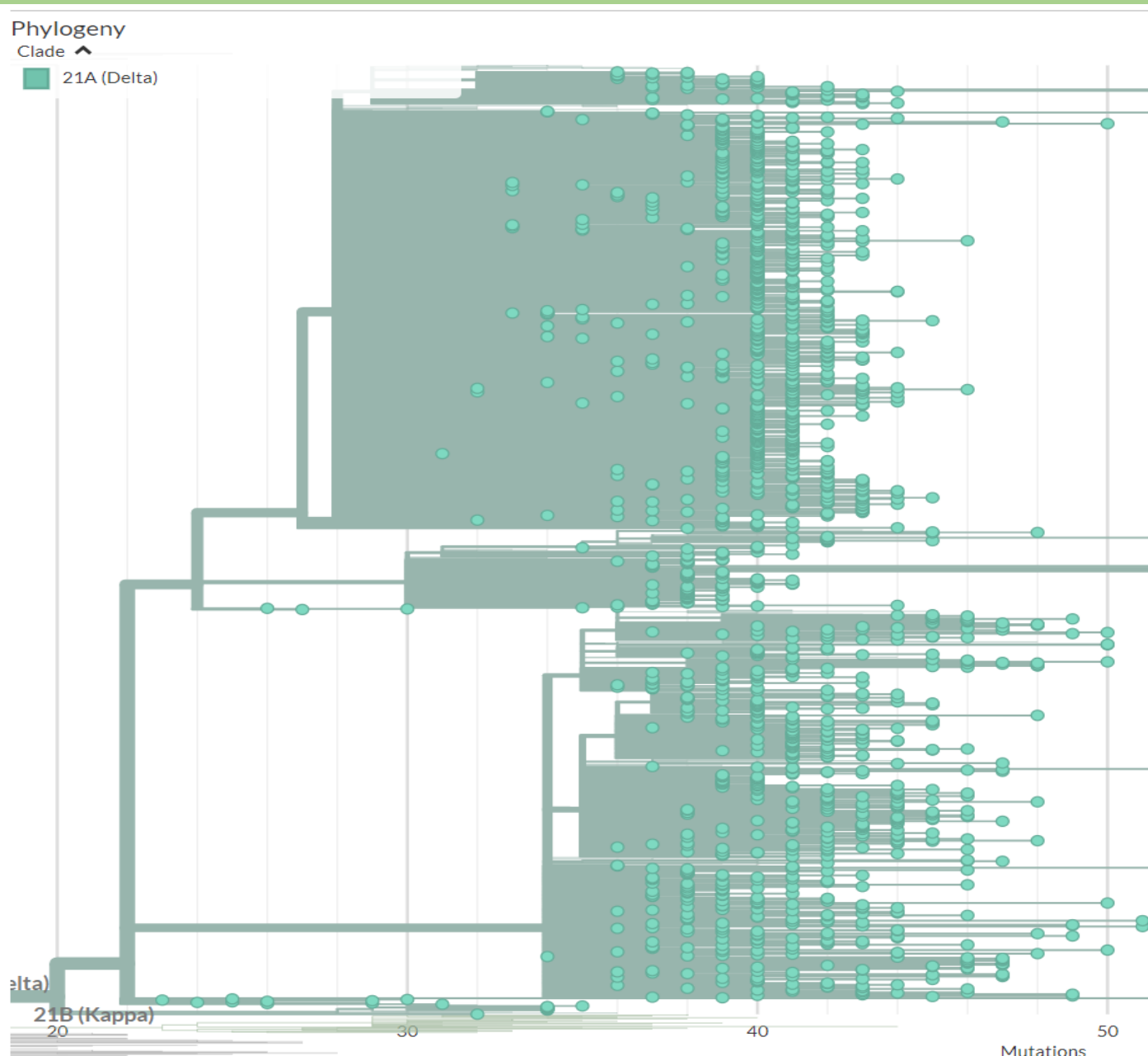
Relativní pokles detekovaných substitucí může být dán zpožděním sekvenačních dat.

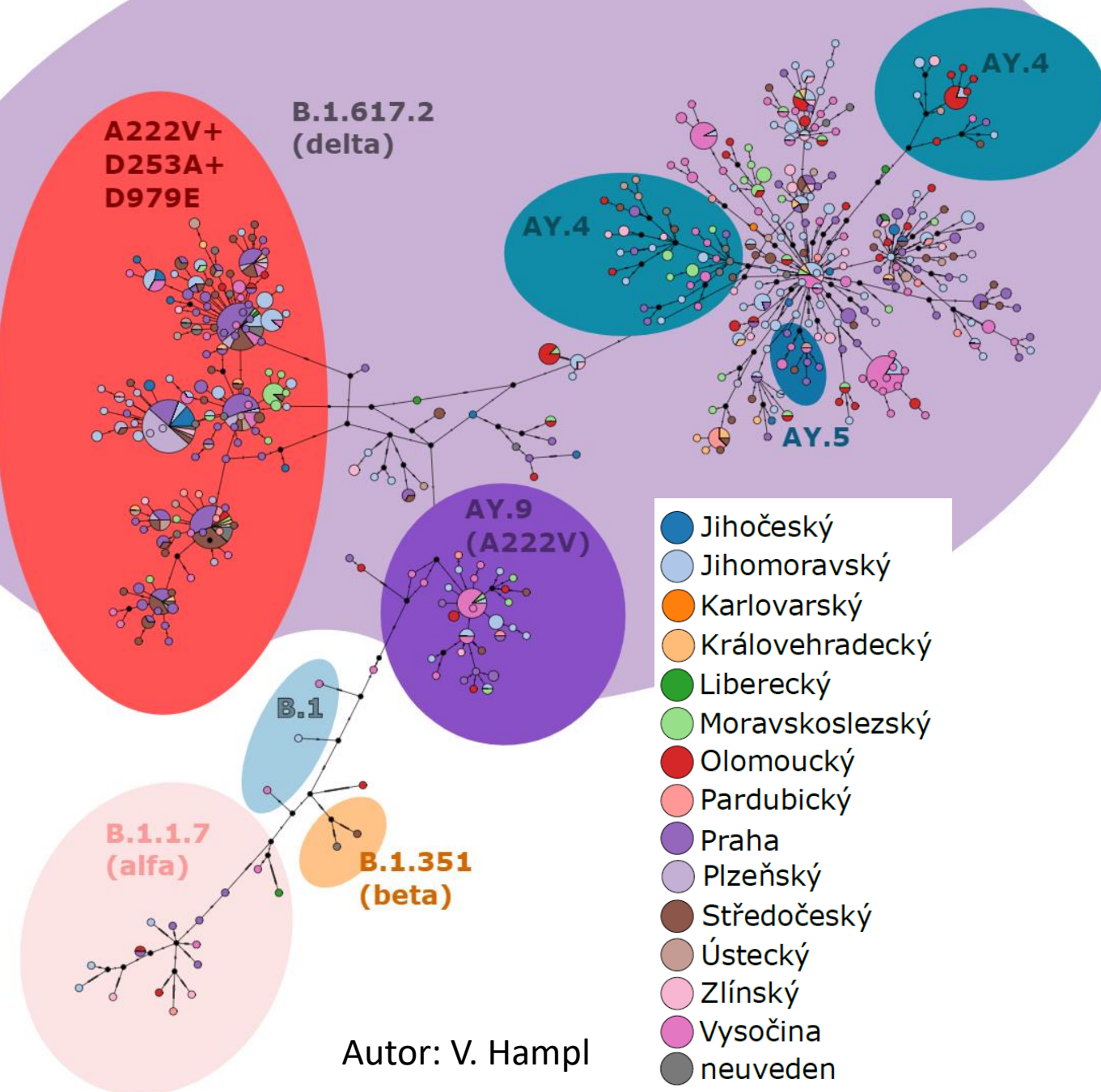
Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 za srpen 2021

Opět proběhla nomenklaturní reklasifikace, aktuálně je definováno 25 subvariant AY.x, přičemž v některých jsou již definovány další linie.

Varianta	celkem	podíl	Dle WHO
B.1.617.2	280	66,83 %	Delta
AY.4	83	19,81 %	Delta +
AY.9	33	7,88 %	Delta +
AY.12	13	3,10 %	Delta +
B.1.1.7	2	0,48 %	Alfa
A.2.5.3	2	0,48 %	
AY.6	1	0,24 %	Delta +
AY.5	1	0,24 %	Delta +
B.1.258	1	0,24 %	
B.1.351	1	0,24 %	
AY.10	1	0,24 %	Delta +
AY.7.2	1	0,24 %	
Celkem	419	100 %	

Fylogenetický strom delta variant SARS-CoV-2 (1 500 WGS)





V síti jsou místy viditelné malé klastry specifické pro region, ale jejich tvorba je ovlivněna nerovnoměrností odběru vzorků. Zbytek sítě představuje vzorky náležející do odlišné varianty dominantní delty (B.1.617.2) a jejích podskupin AY.4, 5 a 9. Podskupiny AY.12 a AY.21 jsou v síti také přítomny, ale netvoří klastry. Za zmínku stojí seskupení v levé části sítě označené červeně, což představuje vzorky sdílející mutace špičkového proteinu A222V (definující mutace podskupiny AY.9), ale také mutace D253A + D979E. Tyto genotypy nebyly identifikovány algoritmem Pangolin jako AY.9, ale pravděpodobně ještě dojde k nomenklaturním změnám v AY.x taxonomii. Proto je třeba sekvenovat i vzorky určené diskriminační PCR jako delta.

Currently designated Variants of Interest:

WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	Multiple countries, Dec-2020	17-Mar-2021
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	United States of America, Nov-2020	24-Mar-2021
Kappa	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	India, Oct-2020	4-Apr-2021
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	Peru, Dec-2020	14-Jun-2021
Mu	B.1.621	GH	21H	Colombia, Jan-2021	30-Aug-2021

*includes all descendent lineages. The full list of Pango lineages can be found here: https://cov-lineages.org/lineage_list.html; for FAQ, visit: <https://www.pango.network/faqs/>

C.1.2 byla poprvé identifikována v květnu 2021 JAR a to ve dvou provinciích (Mpumalanga and Gauteng), nyní je potvrzena nejméně v 6 z 9 provincií Jihoafrické republiky. Pangolineage klasifikace jí byla přiřazena v červenci 2021. V GISAID celkem je 129 WGS.

Detekce z jiných částí světa mimo subsaharskou Afriku jsou ojedinělé. V ČR zachycena nebyla.

ECDC ji zařadilo do kategorie VUM (under monitoring).

Některé z mutací ve spike proteinu jsou již známé z výskytu u jiných linií, některé se doposud vyskytovaly spíše minoritně. Ze známých mutací je to např. E484K, N501Y (alfa, beta gama, delece 144/145 (alfa), T478K (delta), H655Y (gama), T716I (alfa, AY.2), jedna z mutací se vyskytuje poblíž furinového štěpného místa (N679K), a již byla taktéž popsána.

Většina mutací spadá do N-terminální oblasti, vazebného místa a furinového štěpného místa, což jsou typické variabilní oblasti spike proteinů.

Jedná se o konvergentně vzniklé mutace, které přináší evoluční výhodu pro virus, a pravděpodobně povedou k vyšší transmisibilitě, a rovněž k escape charakteru. Celková charakteristika viru z hlediska transmisibility a escape charakteru zatím není k dispozici, vzhledem k oblastem, kde je detekována. Přesto i v zemích subsaharské Afriky zatím jasně dominuje delta varianta.

Vzhledem k tomu, že v ČR jsou povinné diskriminační PCR a předepsané povinné mutace jsou v rámci těchto PCR detekovány, lze předpokládat, že při zachování protiepidemických opatření by tato varianta neměla laboratorně uniknout.

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.20.21262342v1>

V ČR byl potvrzen jeden záchyt této varianty z července tohoto roku (import z Kolumbie bez dalšího šíření). Ve spike proteinu obsahuje známé substituce typické pro alfu, betu, gamu, např. N501Y, E4884K, P681H (vyskytují se u jedné nebo u všech těchto VOC), ale i jiné varianty, nebo substituce na místech, kde jsou z jiných variant známé delece (pozice 144 a 145), lze shrnout, že kromě S346K jsou všechny mutace v spike genu známé z předchozích sledovaných variant, dávají viru evoluční výhodu a vznikají konvergentní evolucí.

Ještě v červenci byly detekce vázány v především na Kolumbii.

Nyní je výskyt potvrzen na celém Americkém kontinentu, v Evropě a v Asii. Aktuálně se jedná o více než 4900 sekvencí

Asie. Hong Kong a Japonsko, 4 sekvence, Evropa 22 zemí + ČR (vzhledem k frameshiftu ve WGS nelze vložit na GISAID), na Slovensku 3 detekce: Bratislava, Dunajská Streda, Trnava (květen 2021), první detekce v Evropě ve Španělsku od letošního března.

Incidence v Kolumbii stále stoupá, ale celosvětově je na ústupu a ani prediktivní modely zatím nenaznačují, že by se měla obstat v konkurenci s deltou.

V ČR povinně sledované mutace i doporučené mutace pro sledování SARS CoV-2 diskriminačními PCR tuto variantu detekují.

Opět se potvrzuje, že doporučení NRL a metodické pokyny určující povinně sledované mutace a doporučené mutace jsou vybrány adekvátně a zatím tedy není důvod ke změně.

V rámci diskriminačních PCR v ČR bylo vyšetřeno v období od 20. 8. do 3. 9. 2021 celkem 2 353 vzorků z celkem 74 laboratoří. Podezření na detekci varianty delta bylo vysloveno u 95 % vzorků. Varianta alfa je pod 2 % případů.

Vzorků se srpnovým datem odběru bylo sekvenováno 491. Výskyt původní delta varianty klesá na 66 % a vzrůstá nárůst **delta subvarianty AY.4 a to na 19,8 %**. Vzorky obsahující mutaci L452R a N501Y patří pravděpodobně do jedné ze sublinií delta varianty AY.x.

Výskyt dalších prioritně sledovaných mutací E484K a N501Y je u delta varianty dle diskriminační PCR zatím ojedinělý. Delta varianta je typicky charakterizována mutacemi L452R a P681R, ale v rámci evoluce viru pozorujeme u jednotlivých subvariant již známé aminokyselinové substituce i některé nové. Obecně lze shrnout, že definované prioritní mutace přinášejí viru výhodu a proto se nezávisle objevují u více sledovaných variant, jedná se o přirozený proces. Většina záměn ve spike genu je soustředěna do oblasti N-terminální domény, vazebného místa na receptor (tedy do oblastí kde dochází k vazbě virus neutralizačních protilátek) a furinového štěpného místa.

Přestože se může zdát, že vzhledem k jasné dominanci delta varianty nemá smysl konfirmovat pozitivní nálezy diskriminační PCR, je stále role těchto PCR 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 stále sekvenovat. Prioritní mutace doporučené NRL se stále ukazují jako zásadní pro sledování evoluce viru.

Přestože v posledním týdnu WHO změnila klasifikaci dvou variant, B.1.621 a C.1.2, není to důvod k vážnému znepokojení, ale nelze říci, že virus nás do budoucna nemůže nepříjemně překvapit. V rámci celé evoluce a současné diverzifikace SARS-CoV-2 je vidět setrvalý evoluční tlak, který představuje stále umožňujeme globálně šíření v částečně imunní populaci, tímto dáváme viru velkou evoluční příležitost