



Podrobná zpráva ke dni 13. 8. 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 3
Odborná doporučení NRL	Strana 4
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 5 - 11
Závěr	Strana 12
Užitečné odkazy a příloha	Strana 13

- V rámci diskriminačních PCR bylo dle celorepublikových dat dostupných ve sledovaném 14-denním období od 30. 7. do 13. 8. 2021 vyšetřeno a nahlášeno do ISIN 1 738 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků (tabulka 1). Některé laboratoře ještě nemají export dořešen, přestože vyšetřují v souladu s doporučením NRL a dle pokynu MZ. Suspektní záchyt varianty delta činí ve sledovaném období kolem 95 %.
- Za rok 2021 bylo k 13. 8. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno celkem 6 310 SARS CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V posledním týdnu bylo osekvenováno 461 vzorků, pouze 13 WGS se vztahuje k datu odběru v srpnu (FNB 12, UMTM 1). V Národní referenční laboratoři bylo osekvenováno 256 vzorků, v Centru molekulární biologie a genetiky FN Brno – 93 (FNB), ve Fakultní nemocnici Ostrava (FNO) - 21, v Ústavu translační medicíny 34 (UMTM) a v rámci Česko-Saské přeshraniční spolupráce 57 vzorků. Ve 385 případech se jednalo o variantu delta, v 70 případech byla určena varianta alfa. Většinou je varianta alfa přítomna ve vzorcích z března až dubna, které byly vloženy sekvenačním centrem v Drážďanech (v rámci Česko-Saská přeshraniční spolupráce). Vzorky s červencovým datem odběru určené jako varianta alfa se vztahují ke krajům Praha, Olomoucký, Moravskoslezský, Středočeský a Vysočina.
- Přehled variant detekovaných v červenci a srpnu (dle data odběru) je uveden v tabulce 2. Varianty, které nespádají do sledovaných, se ve světě zatím vyskytují s minimální incidencí (do 90 až 1 200 celosvětových detekcí celkem, recentní detekce od června tohoto roku), nicméně mutace zájmu rozhodně napovídají o escape charakteru. Veškeré sekvenované vzorky se srpnovým datem odběru náleží k variantě delta.

V období od 30. 7. do 13. 8. 2021 má NRL k dispozici data z 1738 provedených testů diskriminační PCR z celkem 68 laboratoří. Na základě analýzy těchto dat NRL zjistila, že varianta delta je přítomná kolem 95 % pozitivních případů vyšetřených diskriminační PCR. Varianta alfa je přítomná v méně než 2 % případů. Ostatní varianty hodné obav, označované jako VOC (beta, gama) nejsou pravděpodobně zachyceny. Existuje 8 záchytů, které mohou odpovídat jedné z následujících linií SARS-CoV-2 – AU.2, AU.3, A.28.1, B.1.551, B.1.1.334 nebo B.1.466.2. Ani jedna z těchto linií nespadá do sledovaných variant a objevují se recentně a v minoritních počtech sekvenovaných vzorků (od června 2021, do 300 celosvětových detekcí). Tento záchyt je nový, pochází z více laboratoří, a příslušnost k variantě definitivě určí až celogenomová sekvenace.

Přehled důležitých sad mutací uvádíme v následujících doporučeních (strany 4 – 6).

Tabulka 1: Přehled vyhodnocení diskriminačních PCR

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl ze sady	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	1462	1357	92,8 %	delta
P681R+	421	401	95,2 %	delta
N501Y+, E484K+	609	0	<1%	beta, gama, alfa E484K+
L452R-, P681R+	419	8	1,9 %	neurčená VOI, nebo VUM
N501Y+, E484K-	609	10	1,6 %	alfa
A570D+	372	7	1,88 %	alfa

Diskriminační PVT:

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.

Přehled variant detekovaných v červenci (dle data odběru) detekovaných variant je uveden v tabulce 2. Varianty, které nespádají do sledovaných se ve světě zatím vyskytují s minimální incidencí (do 90 – 1200 WGS celosvětově detekovaných, většinou se jedná o recentní detekce od června tohoto roku). Přítomné mutace zájmu rozhodně napovídají o escape charakteru (E484K, N501Y, P681H, T478K) a o zvýšené transmisibilitě v porovnání s původními kmeny z roku 2020.

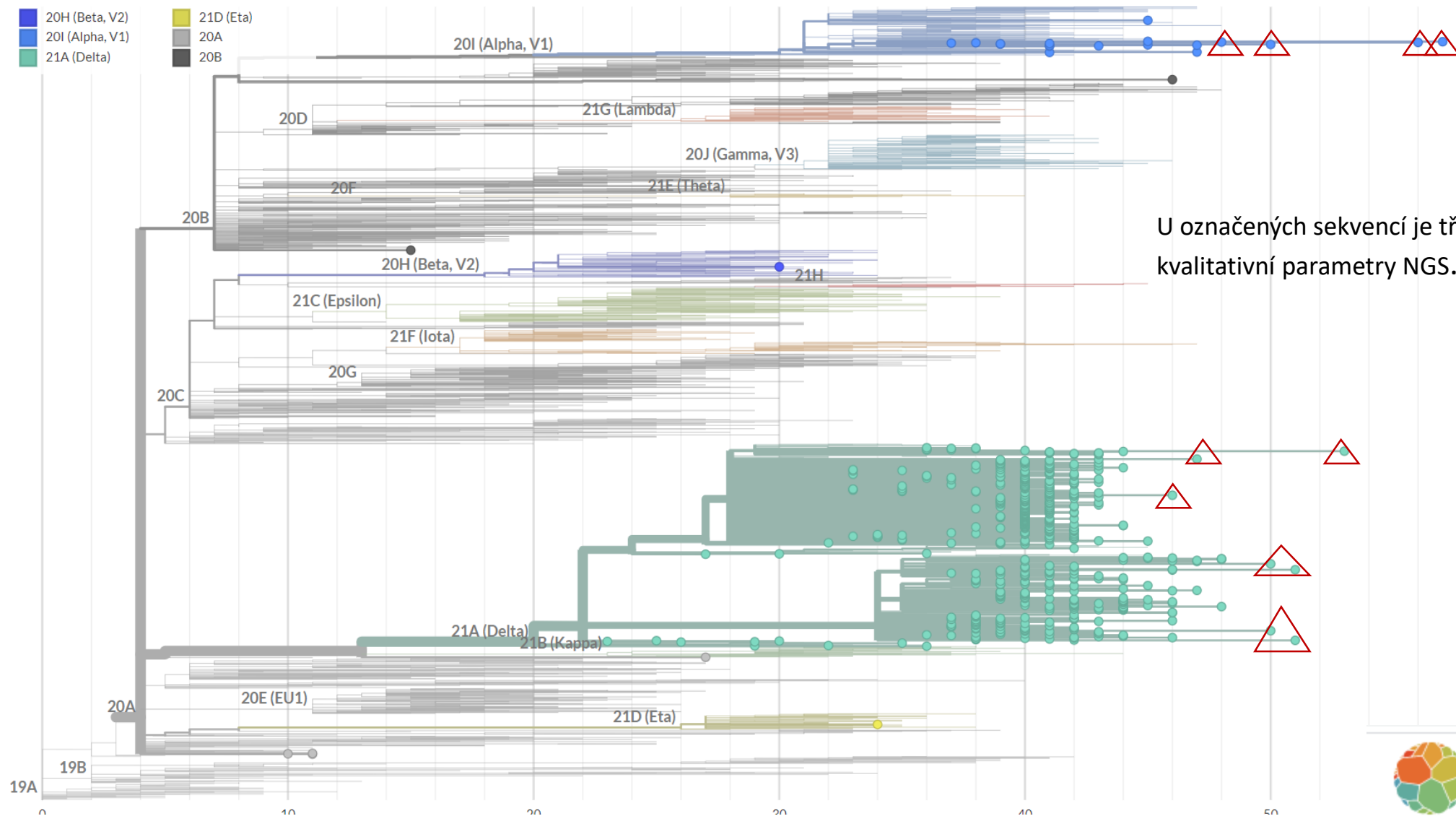
Pango Linie	Počet WGS	Varianta	Sledovaná mutace
AY.1	1	VOI	
AY.3	3	VOI	
AY.3.1	1	VOI	
B.1.1.318	1	VOI	E484K
B.1.1.523	1		E484K
B.1.1.7	18	VOC	
B.1.351	1	VOC	
B.1.525	1	VOI Eta	E484K
B.1.617.2	476	VOC	
B.1.623	1		N501Y, P681H
B.1.629	2		T478K
C.37	2	VOI	

Phylogeny

Clade ^

- 20H (Beta, V2)
- 20I (Alpha, V1)
- 21A (Delta)
- 21D (Eta)
- 20A
- 20B

ZOOM TO SELECTED RESET LAYOUT



U označených sekvencí je třeba zkontrolovat kvalitativní parametry NGS.

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 sekvenace uvádět akronym laboratoře:



Například:

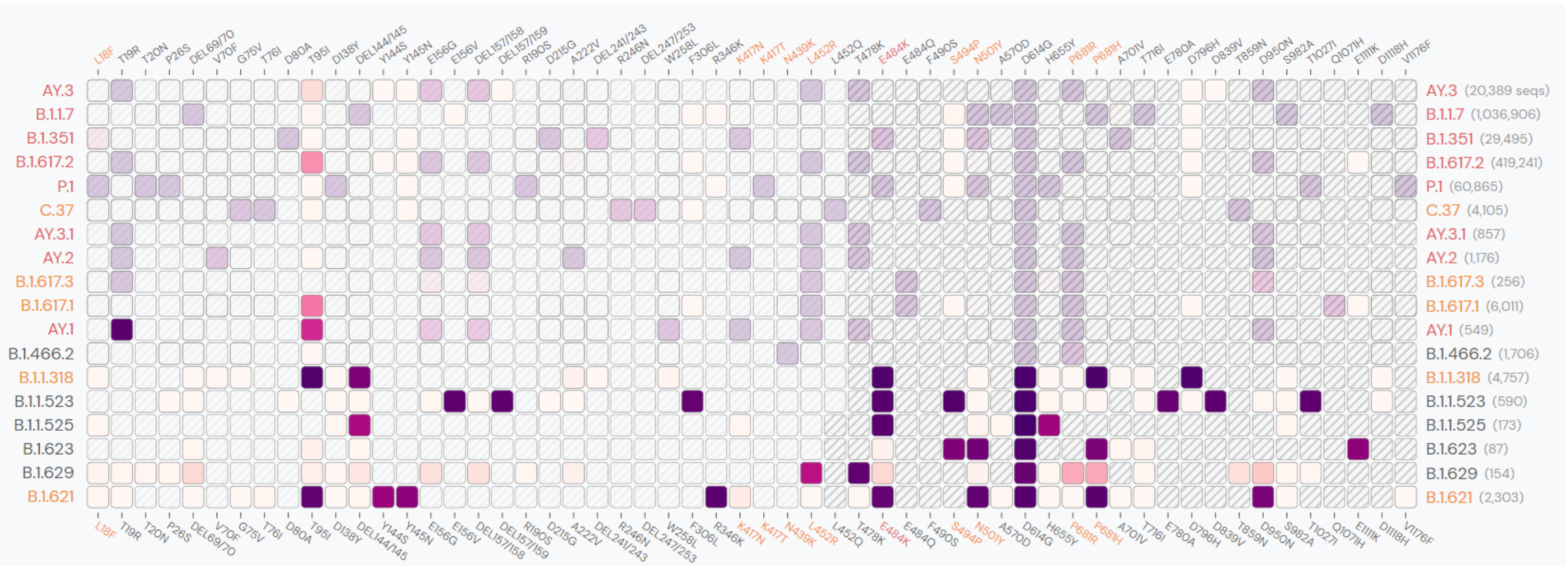
hCoV-19/Czech Republic/UMTM239717/2021
hCoV-19/Czech Republic/CSQ0217/2021

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



Přehled mutací v genu S u variant a linií SARS-CoV-2 detekovaných na území ČR, zvýrazněny jsou linie nesoucí mutaci E484K.

Přehled variant a linií SARS-CoV-2 detekovaných na území ČR, zvýrazněny jsou linie nesoucí mutaci E484K. Tabulka znázorňuje mutace ve spike proteinu u všechny VOC a u dalších linie potvrzených u vzorků s červencovým datem odběru. Pravá strana tabulky udává celosvětový počet WGS.

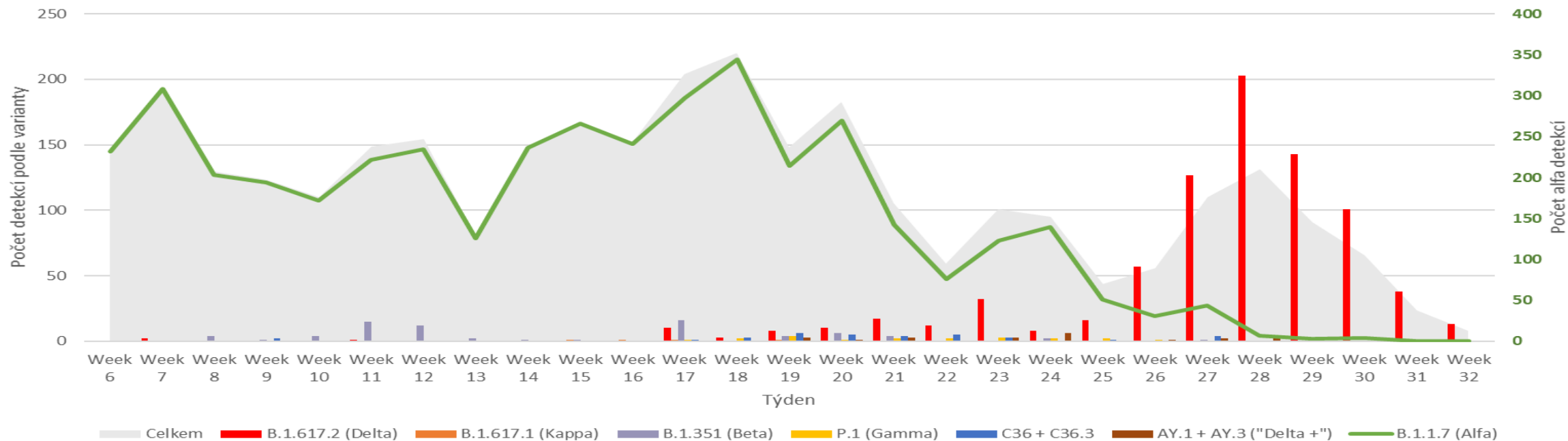


Přehled WGS detekovaných variant VOC viru SARS-CoV-2 v roce 2021 v ČR:

- **Delta** - B.1.617.2 včetně AY.3, celkem 826, 476 pouze B.617.2 za červenec a srpen.
- **AY.1 (Delta+K417N)** 2 případy (Jihomoravský kraj)
- **AY.3** (Delta +změny v Orf1a + Orf1b): 23 případů , včetně jedné AY.3.1 (opět se liší pouze v genech kódujících nestrukturní proteiny)
- **Beta** - B.1.351: 73 případů (ojedinělé detekce), jeden byl vložen v červenci FNO, datum odběru není udán. kraje: Praha, Moravskoslezský, Středočeský, Plzeňský, Královéhradecký, Olomoucký, Karlovarský, Liberecký, Jihomoravský, Vysočina
- **Gamma** - P.1: 23 případů (kraje: Praha, Jihočeský, Pardubický, Jihomoravský, Ústecký)
- **Kappa** B.1.617.1 - 4 případy (z dubna - května, bez dalšího šíření a importu, Praha, Středočeský kraj)
- **Lambda** C.37 - 3 případy (bez dalšího šíření, 1x Středočeský kraj, 2x Jihomoravský kraj detekováno v červenci)
- **B.1.621** – VOI (varianta zájmu) s podobnými změnami ve spike proteinu jako alfa varianta, rozšířená především v Kolumbii, datum odběru spadá do konce června.

Přehled dat z celogenomové sekvenace za ČR (VOC), leden až srpen 2021

Přehled detekovaných variant SARS – CoV-2 v ČR



Z grafu je jasně patrná narůstající dominance delta varianty a postupná eliminace všech dalších variant , včetně dříve dominantní varianty alfa. Nižší počet vzorků určených jako varianta delta za poslední 4 týdny je dán pravděpodobně zpožděním celogenomové sekvenace a nižším počtem sekvenovaných vzorků souvisejících s poměrně nízkou incidencí. Situace se od posledního týdne dramaticky nezměnila.

V rámci diskriminačních PCR v ČR bylo vyšetřeno v období od 30. 7. do 13. 8. 2021 celkem 1 738 vzorků z celkem 68 laboratoří. Podezření na detekci varianty delta bylo vysloveno u 95 % vzorků. Na dříve dominantní variantu alfa lze vyslovit podezření u méně než 2 % vzorků. Existuje záchyt 8 vzorků z více laboratoří, který by mohl odpovídat dosud neurčené VOI nebo VUM.

Vzorků s červencovým datem odběru bylo osekvenováno 508, 481 WGS spadá pod variantu delta (včetně AY.x), 8 pod variantu alfa, v Jihomoravském kraji byly v červenci detekovány dvě varianty lambda, dále byly detekovány dvě další varianty zájmu (VOI – eta a B.1.1.318), další detekované linie jsou poměrně nové a celosvětově se vyskytují minimálně.

Na základě kombinovaných dat z diskriminační PCR za posledních 14 dnů a celogenomové sekvenace SARS-CoV-2 za červenec (vzorky s datem odběru v srpnu jsou zatím v procesu sekvenace).

Je zřejmé, že stále přetrvává dominance varianty delta, v souvislosti s prázdninovým cestováním zřejmě dochází i k minoritním importům jiných linií. Rovněž je vidět další vývoj viru charakterizovaný konvergentně vzniklými stejnými mutacemi, které umožňují částečnou rezistenci vůči virus neutralizujícím protilátkám a vyšší transmisibilitu.

Závěr odborných doporučení:

NRL v stále doporučuje testovat jako minimum **L452R a E484K** mutace, Obě mutace vedou k rezistenci na některé léčebné protilátky a opakovaně vznikají nezávislou konvergentní evolucí u různých linií.

V rámci celogenomové sekvenace doporučuje NRL, aby sentinelová centra přijímala a zpracovávala vzorky z regionu, a to bez ohledu na to, kolik jich je vygenerováno v ISIN jako významných. Sekvence doporučujeme kontrolovat v online režimu nextclade a dbát na upozornění o kvalitě. Rovněž porovnání sekvencí ve fylogenetickém stromu a větší než obvyklá vývojová vzdálenost naznačují, že je třeba sekvenační data přehodnotit. Pomoc všem sekvenačním centrům nabízí IMG ČAV (Michal Kolář, Ph.D.).

U pojmenování vzorků před jejich vložením do GISAID je nutné uvádět před číslem vzorku akronym laboratoře. Do pole „Location“ je třeba udat anglický název kraje, a vždy je nutné vyplnit datum odběru vzorku.

- <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- <https://cov-spectrum.ethz.ch/explore/Czechia/>
- <https://sarscoverage.org/results/CZ.html>