

## PRAVIDELNÁ TÝDENNÍ ZPRÁVA NRL

27. 8. 2021

### Charakterizace viru SARS-CoV-2 v ČR dle diskriminačních PCR a celogenomové sekvenace

#### Úvod:

Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění (NRL) Státního zdravotního ústavu (SZÚ) pravidelně analyzuje celorepubliková data z diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, která má k dispozici Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) a data z celogenomové sekvenace pozitivních vzorků, která zveřejňuje platforma GISAID. Na základě této analýzy NRL poskytuje MZČR tento přehledový dokument. Jeho 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 i další kvalitativní i kvantitativní informace, s cílem poskytnout kvalifikované informace pro adekvátní nastavení protiepidemických opatření v ČR.

#### Vyhodnocení dat z diskriminační PCR (plovoucí datový interval za 2 týdny z ÚZIS):

V období od 13. 8. do 27. 8. 2021 má NRL k dispozici data z 2 236 provedených testů diskriminační PCR z celkem 72 laboratoří. Na základě analýzy těchto dat NRL zjistila, že varianta delta je přítomná přibližně v 95 % pozitivních případů vyšetřených diskriminační PCR (viz tab. 1). Variantě alfa náleží pod 2 % vzorků.

Tabulka 1: Přehled důležitých sad mutací

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl ze sady	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	2088	1975	94,5 %	delta
E484K+	1708	32	1,8 %	beta, gama, alfa E484K+
L452R+, E484K+	413	4	1 %	delta+
N501Y+, L452R+	537	3	0,5 %	delta+
A570D+	464	8	1,7 %	alfa

## Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

Za rok 2021 bylo k 27. 8. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 7 209 SARS CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V posledním týdnu bylo osekvenováno 439 vzorků, 341 WGS se vztahuje k datu odběru v srpnu.

Podíl původní varianty delta je v měsíci srpnu 81,2 %. Nově zaznamenáváme dle celogenomové sekvenace nárůst subvariant delta varianty - AY.12, AY.4 a AY.9, které se šíří například v Izraeli (dominance AY.12), ve Spojených státech, nebo ve Spojeném království a dalších zemích včetně ČR (viz tab. 2). Podíl subvarianty AY.4 za měsíc srpen v ČR je 9,4 %, AY.12 pak 3,8 % a AY.9 se vyskytuje v 4,1 %.

Vzhledem k faktu, že všechny AY.x lze taxonomicky a nomenklaturně zařadit jako delta +, lze konstatovat, že jednoznačně dominuje delta varianta a detekce odpovídají 98 % až 99 % záchytu.

Tabulka 2: Přehled detekcí AY.x dle krajů v měsíci srpnu

Kraj	Varianta	Počet
Zlínský kraj	AY.12	1
Jihomoravský kraj	AY.12	9
Vysočina	AY.12	2
Nepřiřazeno	AY.12	1
Vysočina	AY.4	12
Pardubický kraj	AY.4	1
Zlínský kraj	AY.4	1
Olomoucký kraj	AY.4	1
Moravskoslezský kraj	AY.4	3
Jihomoravský kraj	AY.4	9
Praha	AY.4	5
Jihomoravský kraj	AY.9	1
Pardubický kraj	AY.9	2
Vysočina	AY.9	3
Moravskoslezský kraj	AY.9	8
Jihomoravský kraj	AY.6	1

Tabulka 3: Přehled WGS detekovaných variant v srpnu 2021 v ČR

Varianta	Počet
AY.12	13
AY.4	32
AY.6	1
AY.9	14
B.1.1.7	2
B.1.258	1
B.1.351	1
B.1.617.2	277
Celkem	341

**Doporučení NRL a WHOz 9. 8. 2021 (file:///C:/Users/sekvenace.orsevn/Downloads/WHO-2019-nCoV-surveillance-variants-2021.1-eng.pdf:**

### **Doporučená strategie WHO pro odběr vzorků**

- a) detekce variant, které jsou v oběhu jen v nízké míře
- b) sledování relativní prevalence variant v průběhu času a v rámci geografických oblastí
- c) zkoumání konkrétních případů, které jsou relevantní pro veřejné zdraví.

**Obecně je možné cíle a) a b) naplnit prostřednictvím rutinního sledování randomizovaného vzorku.**

Cíl c) vyžaduje cílený vzorek.

Tato doporučení se shodují s doporučeními NRL na změnu definování algoritmu pro určení významného vzorku. V současnosti v ČR převažuje cílená surveillance. Změna algoritmu výběru významného vzorku ÚZISem a obnovení surveillance povede k randomizované surveillance. Z WHO dokumentu vyplývá, že doporučení NRL jsou oprávněná. SZÚ (NRL ve spolupráci s Oddělením epidemiologie) vydalo v květnu 2020 doporučení pro nastavení strategie surveillance ARI/ILI, která by odpovídala vstupu nového agens do populace. V současnosti připravují tato pracoviště aktualizaci strategie surveillance tak, aby odpovídala aktuální proměnlivé situaci. Plánujeme předložení návrhu surveillance počátkem září.

### **Prioritní mutace ke sledování v rámci diskriminačních PCR – doporučení WHO a NRL:**

Rovněž mutace, které NRL doporučuje pro sledování metodou diskriminačních PCR, jsou shodné s těmi doporučenými WHO:

Jedná se o **L452R, E484K, N51Y, P681R a K417N**. Přehled je uveden v příloze.

### **Závěr:**

V rámci diskriminačních PCR v ČR bylo vyšetřeno v období od 13. 8. do 27. 8. 2021 celkem 2 236 vzorků z celkem 72 laboratoří. Podezření na detekci varianty delta bylo vysloveno u 95 % vzorků. Varianta alfa je pod 2 % případů.

Vzorků se srpnovým datem odběru bylo sekvenováno 341. Na variantu delta připadá 98,4 % vzorků, z toho je 81,2 % původní varianta delta (B.1.617.2) a výskyt subvarianty AY.4, AY.12 a AY.9 je 9,2%, respektive 3,8% a 4,1%. Celkový přehled všech detekovaných variant v měsíci srpnu je uveden v tabulce 3.

Na základě kombinovaných dat z diskriminační PCR za posledních 14 dnů a celogenomové sekvenace SARS-CoV-2 za srpen je zřejmé, že stále přetrvává dominance varianty delta. Narůstá podíl subvariant delty AY.4, AY.12 a AY.9, které jsou pravděpodobně zodpovědné za nárůsty počtu pozitivně testovaných i v dalších zemích.

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 s ČR.

RNDr. Helena Jiřincová

MUDr. Jan Moskalyk

MUDr. Jan Kynčl Ph.D.

**Příloha: Prioritní mutace ke sledování v rámci diskriminačních PCR – doporučení WHO a NRL:**

**Tab: Převzato z WHO doporučení z 9. 8. 2021**

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/343775>

Významná mutace	Doména rizika pro veřejné zdraví	Dosud zdokumentované fenotypové účinky	Varianta vzbuzující obavy / varianta vyvolávající zájem
L452R	<i>Transmisibilita</i>	Může zvyšovat neúčinnost prostřednictvím stabilizace interakce s receptorem ACE-2 (pro spike-angiotenzin konvertující enzym-2) a vyvinula se nezávisle na sobě u řady variant (23)	<b>VOC</b> Gama
	<i>Escape protilátek</i>	Snížená neutralizace rekonvalescentní plazmou a monoklonálními protilátkami (mAbs); konkrétně uniká neutralizaci protilátkou, která představuje základ bamlanivimabu, konkrétního léčiva na bázi mAb (24)	<b>VOI</b> Ióta, kappa, lambda
E484K	<i>Transmisibilita</i>	Zvýšená afinita na receptor (ACE-2), přičemž navázání může být stabilizováno přítomností K417N. Má významný dopad na posunutí hlavního místa kontaktu mezi vazebnou doménou pro receptor (RBD) a reziduy ACE-2; in vitro evoluce směrem k většímu navázání na receptor ACE-2 vedla k mutacím S:E484K, S:N501Y a S:S477N, které byly jako první selektovány (25,26)	<b>VOC</b> Alfa beta gama
	<i>Escape protilátek</i>	Bylo zaznamenáno, že E484K je escape mutace před monoklonální protilátkou, která neutralizuje SARS-CoV-2; kombinace E484K, K417N a N501Y (která je součástí B.1.351 a P.1) indukuje větší konformační změnu než N501Y sama o sobě; k selekci došlo, když byl kultivován virus vezikulární stomatitidy (rVSV)/SARS-CoV-2 S) v přítomnosti vakcínou vyvolaných mAbs (27,28)	<b>VOI</b> Et a iót a Kappa
N501Y	<i>Transmisibilita</i>	Vyšší afinita na receptor ACE-2. In vitro evoluce pro posílení vazby na receptor ACE-2 vedla k mutacím S:E484K, S:N501Y a S:S477N, které byly selektovány jako první (25,26,29)	<b>VOC</b> Alfa beta Gama
	<i>Escape protilátek</i>	Objevení a neustálá konvergentní evoluce variant N501Y se kryje s významným globálním posunem, pokud jde o selektivní prostředí SARS-CoV-2. Přesná příčina tohoto selektivního posunu není známa, ale nárůst sérové positivity a/nebo uvolnění opatření pro prevenci přenosu jsou v této souvislosti zjevnými kandidáty. K selekci došlo, když byl kultivován virus vezikulární stomatitidy (rVSV)/SARS-CoV-2 S) v přítomnosti vakcínou vyvolaných mAbs (29)	<b>VOI</b>
K417N	<i>Escape protilátek</i>	V rámci studie mapy escape mutací byla identifikována jako jedna z mutací, která by mohla uniknout rozpoznání ze strany protilátek; k selekci došlo, když byl kultivován virus vezikulární stomatitidy (rVSV)/SARS-CoV-2 S) v přítomnosti vakcínou vyvolaných mAbs; kombinace E484K, K417N a N501Y (která je součástí B.1.351 a P.1) indukuje větší konformační změnu než N501Y sama o sobě (25,27,30,31)	<b>VOC</b> Beta delta gama
P681H/R	<i>Transmisibilita</i>	V bezprostřední blízkosti místa štěpení furinem v místě vazby S1/S2. Posiluje systematickou infekci a fúzi membrán. Ve funkční testovací studii byly spiky obsahující mutace P681H a P681R efektivněji štěpeny a předpokládá se jejich role při zvyšování transmisibility a patogenity (32,33)	<b>VOC</b> Alfa <b>delta</b> VOI Kappa



**Odborná doporučení NRL**

**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.**