

## Celogenomová sekvenace v ČR 2021 – souhrnná zpráva NRL k 29. 6. 2021

Ke dni 25.6.2021 bylo za ČR osekvenováno a do GISAID vloženo 4 523 celogenomových sekvencí. K datu 29.6. tento počet stoupl na 4 714 WGS. Za rok 2021 bylo vloženo do GISAID databáze 4 432 sekvencí. Zatím do GISAID databáze nebyly vloženy sekvence získané v rámci Česko- saské přeshraniční spolupráce, která byla zahájena v únoru 2021. V rámci této spolupráce bylo osekvenováno více než 500 vzorků, ve 46 případech byla prokázána varianta delta. Sledováním alertních variant metodou celogenomové sekvenace bylo celkem v několika nezávislých klastrech a v několika sekvenčních centrech potvrzeno a v GISAID publikováno 65 případů importu B.1.351 (JAR varianty). Varianta gama (P.1) byla potvrzena ve 21 případech (Pardubický kraj, Praha, Brno, Mělník). Varianta delta byla potvrzena celkem v 118 případech (včetně přeshraniční spolupráce). Nově byl ve Středočeském kraji potvrzen záchyt jednoho případu varianty lambda (C.37, dominantní varianta v Peru). Tato varianta je pravděpodobně navázána na zdroj v Německu (dle výsledků sekvenační analýzy, obr. 8). Celkový přehled detekovaných linií SARS-CoV-2 je uveden v grafu 1 a v tabulce 2, detekci VOC variant v porovnání s doposud majoritní variantou alfa znázorňuje graf č.2.

V souvislosti s vyšší mírou positivity v Jihočeském kraji bylo do NRL k datu 24. 6. zasláno a vyšetřeno 177 vzorků.

Přehled výsledků diskriminačních PCR v NRL a Jihočeské univerzitě :

Podezření na variantu alfa: 168 vzorků

U jednoho vzorků prokázána kombinace N501Y + E484K, tento výsledek nelze jednoznačně interpretovat, suspektní alfa (B. 1.1.7 + E484K, suspektní gama P.1, suspektní theta P.3, suspektní B.1.621).

U jednoho vzorku detekován soubor mutací poukazující na variantu delta (L452R a P681R pozitivní, E484K, E484Q, N501Y a K417N negativní).

Výsledky diskriminačních PCR v NRL bez pozitivní detekce žádné z vyšetřovaných mutací: 8

Výsledky celogenomové sekvenace 42 vzorků: ve 39 případech byla potvrzena varianta alfa, u jednoho vzorku byla detekována varianta alfa + E484K. Ve 2 případech se získat kvalitní celogenomovou sekvenci nepodařilo.

Celogenomová sekvenace dalších vzorků probíhá.

NRL se v rámci surveillance SARS-CoV- 2 soustřeďuje na monitoring šíření a importu nových variant viru v ČR. NRL doporučuje důsledně používat diskriminační PCR u všech jasně PCR pozitivních vzorků s Ct menším než 34 a rovněž u pozitivních antigenních testů. Primárním cílem jsou fenotypově významné mutace. Tedy mutace, které vedou k vytvoření tzv. escape variant či variant s vyšší transmisibilitou. Jako nejdůležitější sledované mutace doporučuje NRL E484K a L452R, tyto mutace mohou vést k rezistenci vůči některým léčebným monoklonálním protilátkám (např. bamlanivimab , tedy BAMLAN - Eli Lilly).

NRL dále doporučuje především sledování tzv. hot spot pozic ve **vazebné doméně spike proteinu (RBD)** a v oblasti, která je zásadní pro rychlý vstup do buňky (**furinové štěpné místo**) tedy pozice K417N/T, E484Q, N501Y, P681H/R, případně, T478K . Další oblastí vhodnou pro sledování mutací je **N-terminální doména**, která je také cílem virus neutralizačních protilátek stejně jako RBD, např. tedy delecí 69-70, případně substituci W152C. Od 1.7. 2021 budou tyto PCR testy hrazeny ze zdravotního pojištění.

Souhrnné doporučení pro výběr mutací vyšetřovaných diskriminačními PCR:

- E484Q/K a L452Q/R**, ideálně doplněno o:
- N501Y, N417K/T, P681H/R**, případně o další :
- del69-70, T478R, S477N, W152C, A222V**.

Oblasti, kam je třeba cílit diskriminačními PCR jsou vyznačeny na obrázku 2.

Nedílnou součástí surveillance variant je celogenomová sekvenace. Od ledna zvyšujeme kapacity celogenomové sekvenace vlastními silami, a současně využíváme ECDC/PHE celogenomové sekvenační podpory. V rámci přeshraniční spolupráce se Saskem využíváme celogenomové sekvenační kapacity nabídnuté Saskem (jedná se o Liberecký a Ústecký kraj). Dne 11.6. NRL ve spolupráci s LS MZ zorganizovala webinář, kterým byla oficiálně zahájena národní sekvenační strategie. Další webinář byl zorganizován v pátek 25. 6.. Síť laboratoří zapojených do sekvenační strategie je v tabulce 3. NRL klade důraz na cílenou sekvenaci v následujících případech - selhání vakcinace, reinfekce, sledování klastrů, sledování těžkých onemocnění u osob mladších 50 let věku případně jakýchkoli atypických PCR či klinických nálezů. V současné době, kdy je podíl pozitivních záchytů nízký, doporučuje NRL předat na sekvenaci všechny jasné pozitivní vzorky ať již z PCR či antigenního testování.

NRL již zahájila přípravu vzorků pro podzimní kolo EHK, laboratoře, které se chtějí dodatečně přihlásit by tak měly učinit ideálně co nejdříve, alespoň do konce července.

V rámci izolace kmenů na buněčné kultuře NRL úspěšně namnožila všechny sledované varianty. Kromě alfa, beta, gama, delta a kappa varianty NRL disponuje i některými dalšími. Přesný seznam udává přehled uvedený v tabulce 4. NRL prosí o spolupráci v tomto směru - sekvenační a sentinelové laboratoře by měly uchovávat vzorky určené na sekvenaci do doby vyhodnocení. V případě detekce nové varianty, prosíme zaslat tuto aliquotu do NRL. NRL veškeré pozitivní materiály vydává v rámci podpory zdarma. Živý virus vydáváme jen laboratořím oprávněným k nakládání s virem dle SUJB rozhodnutí nebo jej vydáváme pouze v koncentraci odpovídající klinickému vzorku.

Závěr:

V ČR je stále majoritní B.1.1.7, britská varianta, nicméně celogenomovou sekvenací bylo již potvrzeno 120 případů B.1.617.2. Od června evidujeme průkazy varianty gama, a to především v Pardubickém kraji a na Mělnicku. V posledním týdnu jsme prokázali první detekci varianty lambda. 11. června byla zahájena sekvenační surveillance dle Národní sekvenační strategie, a od 1. 7. budou hrazeny ze zdravotního pojištění diskriminační PCR. Obě tyto skutečnosti by měly zásadně zlepšit metodiku sledování SARS-CoV-2 v České republice. V současné době je incidence pozitivit nízká, proto se může stát, že sekvenační centra budou muset ve sběru vzorků kooperovat a bude menší počet osekvenovaných vzorků v absolutním čísle, ale procento osekvenovaných vzorků vzroste. Vzhledem k nízkému počtu pozitivních detekcí doporučuje NRL zasílat na sekvenaci všechny pozitivní vzorky s Ct nižším než 30. Pro diskriminační PCR je vhodné vybírat positivity s Ct menším než 34, ale lze použít i hraniční hodnoty Ct, záleží na citlivosti použité diskriminační PCR. Ve většině případů citlivost těchto PCR klesá.

RNDr. Helena Jiřincová, NRL pro chřipku a nechřipková respirační onemocnění SZU, Praha

# Tab. 1: Souhrnná sekvenační data

- Celkem v GISAID vloženo 4 523
- Celkem v GISAID vloženo za rok 2021 4 241
- **Celkem v GISAIDU - ECDC podpora 1 980**
  
- **Alfa B.1.1.7 3 314 z toho alfa + E484K 10**
- **Beta B.1.351 65**
- **Gamma P.1 21**
- **Delta B.1.617.2 120**
- **Zeta P.2 5**
- **B.1.620 3**
- **B.1.1.318 4**
- **Kapa B.1.617.1 5**
- **Eta B.1.525 2**
- **C.36 17**
- **C.36.3 1**
- **Lambda C.37 1**
- **B.1.258 a subvarianty 369**

(dominantní linie na podzim a na přelomu roku 2020/2021)

Column: clade

The result of the clade assignment of a sequence, as defined by Nextstrain. Currently known clades are depicted in the schema below.



Fig.1. Illustration of phylogenetic relationship of clades, as defined by Nextstrain

VOC – variant of concern

VUI – variant under investigation

VOI – variant of interest (CDC/WHO terminologie)

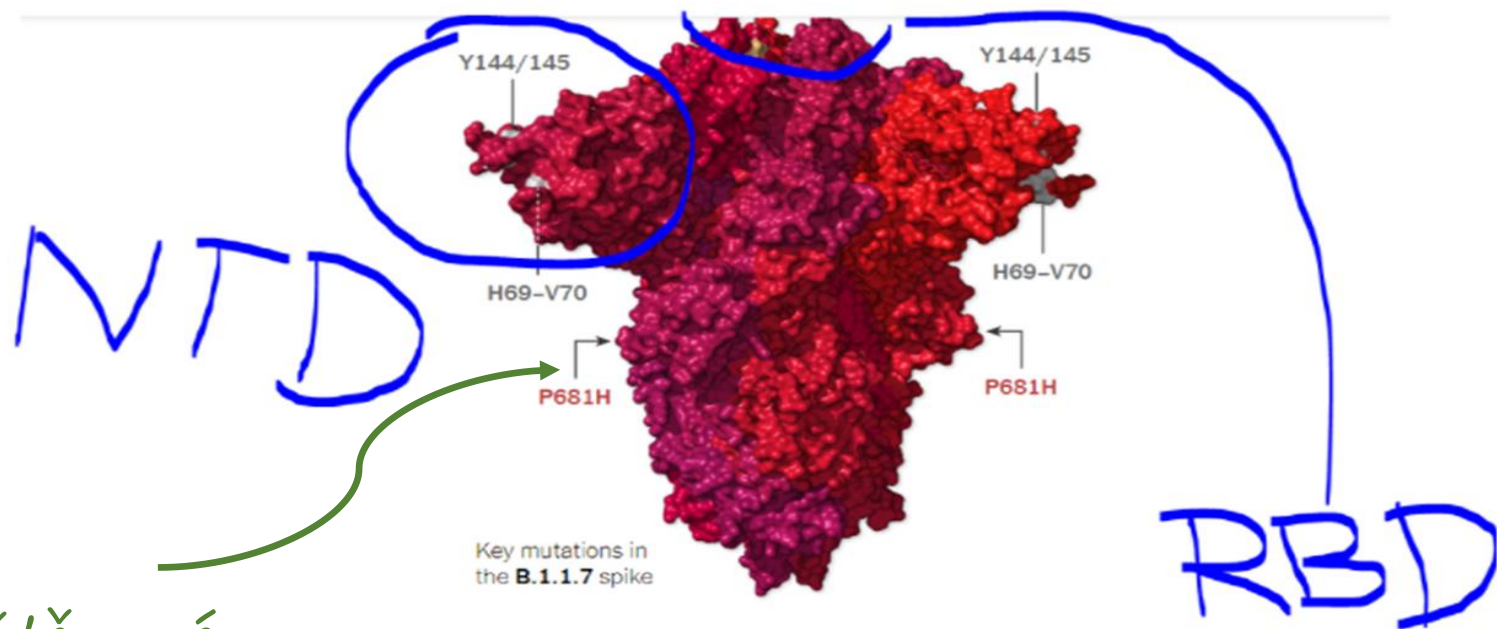
VUM – variant under monitoring (ECDC terminologie)

Tab. 2: Přehled krajů s detekovanými alertními variantami jinými než alfa (VOC- VOI –VUM - VUI)

- Beta - B.1.351, 65 případů  
Praha, Moravskoslezský kraj, Středočeský kraj, Plzeňský kraj, Královehradecký kraj, Olomoucký kraj
- Gama - P.1, 21 případů  
9 x Pardubický kraj, 6 x Mělník, 2 x Hradec Králové, 1 x Praha, 1 x Brno a 2 x Hradec Králové
- Delta - B.1.617.2, 120 případů:  
Praha, Královehradecký kraj, Moravskoslezský kraj, Liberecký kraj, Ústecký kraj, Vysočina
- Kappa B.1.617.1 - 5 případů (Praha)
- Lambda C.37 - 1 případ– Středočeský kraj

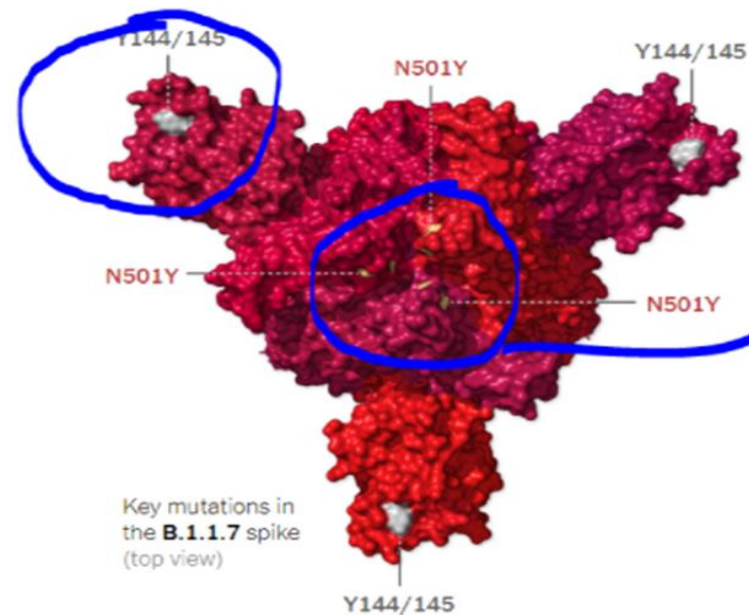
# Tab. 3: Sekvenační a sentinelové laboratoře

Kraj	Sentinelová laboratoř	Sekvenační centrum
Praha	FN Bulovka	NRL SZÚ + ÚMG AV ČR
Karlovarský	Sang Lab – klinická laboratoř s.r.o.	FN Plzeň
Plzeňský	Fakultní nemocnice Plzeň	FN Plzeň
Jihočeský	Nemocnice České Budějovice	Biologické centrum AV ČR
Ústecký	Masarykova nem. Ústí nad Labem o.z.	Saxony crossborder NGS + SVÚ Praha
Liberecký	Krajská nemocnice Liberec	Saxony crossborder NGS + SVÚ Praha
Královehradecký	Oblastní nemocnice Trutnov a.s.	NRL SZÚ + SVÚ Praha
Pardubický	Orlickoústecká nemocnice	FN Hradec Králové
Královehradecký	FN Hradec Králové	FN Hradec Králové
Pardubický	Pardubická krajská nemocnice a.s.	FN Hradec Králové
Moravskoslezský	Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě	NRL SZÚ
Moravskoslezský	Spadia Lab s.r.o.	FN Ostrava
Olomoucký	ÚMTM, LF LP a FN Olomouc	ÚMTM, LF LP a FN Olomouc
Zlínský	Krajská nemocnice T. Bati a.s.	ÚMTM LF LP a FN Olomouc
Vysočina	Nemocnice Jihlava p.o.	FN Brno
Jihomoravský	FN Brno	FN Brno
Jihomoravský	Fakultní nemocnice U sv. Anny	FN Brno



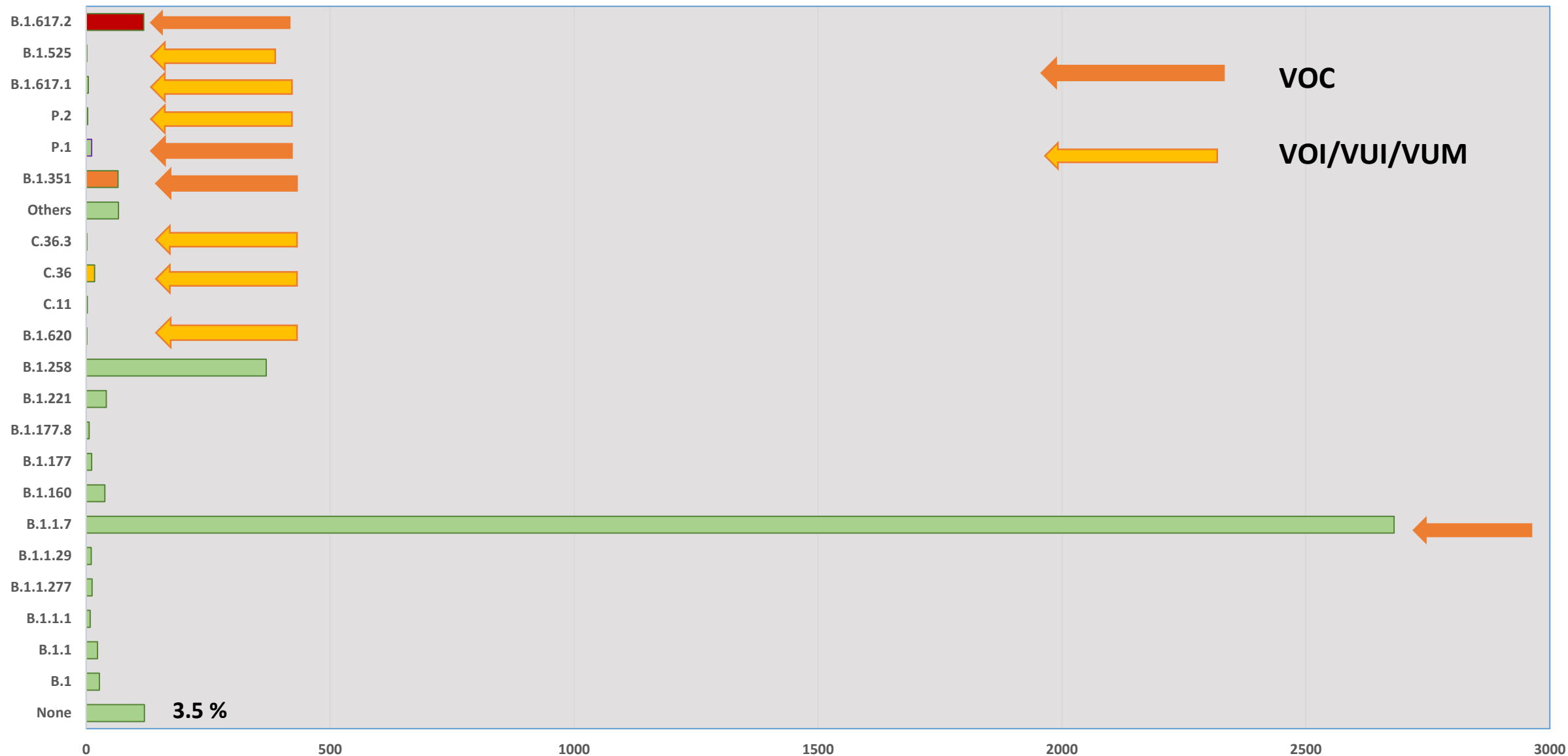
*Furinové štěpné místo*

It takes three spike proteins to form one spike, so each mutation appears in three places:



Obr. 2: Doporučené oblasti spike proteinu pro diskriminační PCR

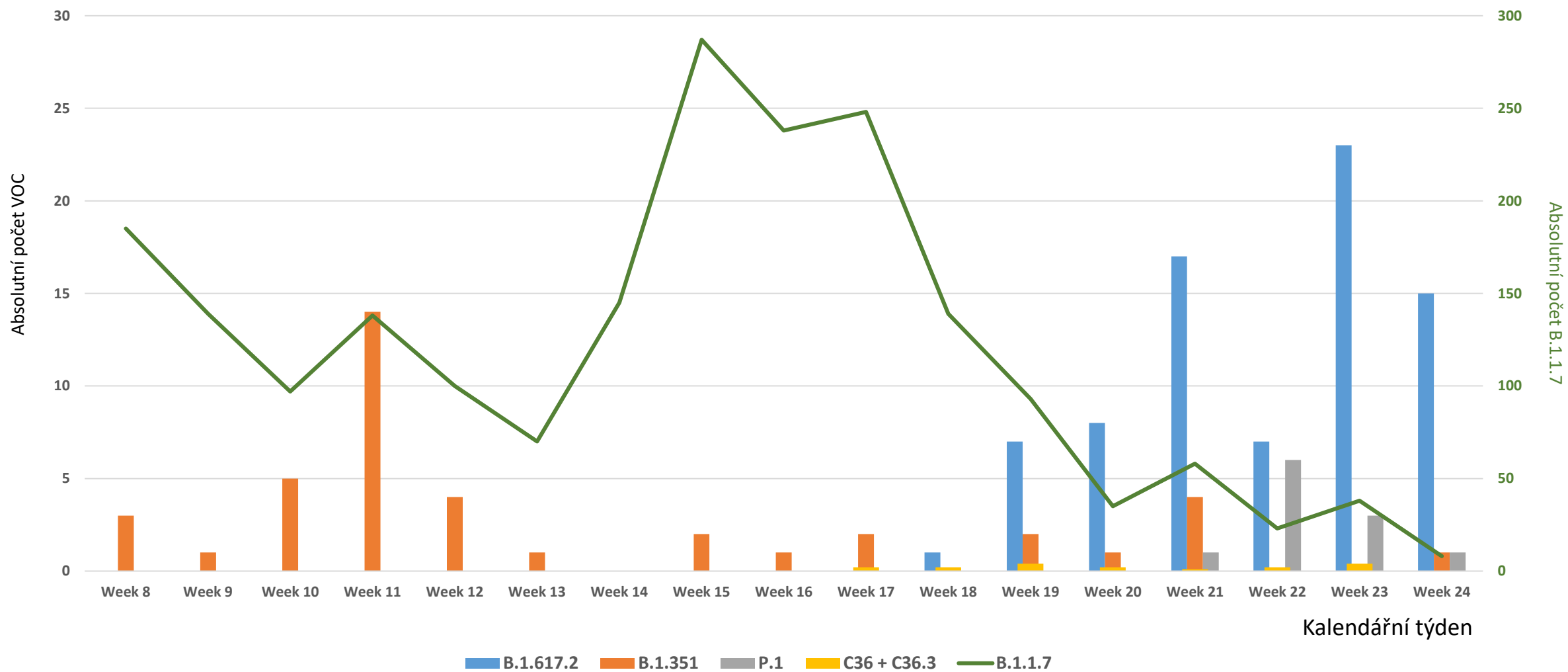
# Graf 1: Přehled detekovaných variant v roce 2021





# Graf 2: Přehled detekcí variant budících pozornost VOC v kalendářních týdnech 8 až 24 2021, měřítko alfa (B.1.1.7) 1:10 (data ke 24. 6. 2021)

(data pouze z NRL, nezapočítány 30 WGS beta z Olomoucka a 1 WGS gama z Brna ani 20 WGS delta z Liberecka)



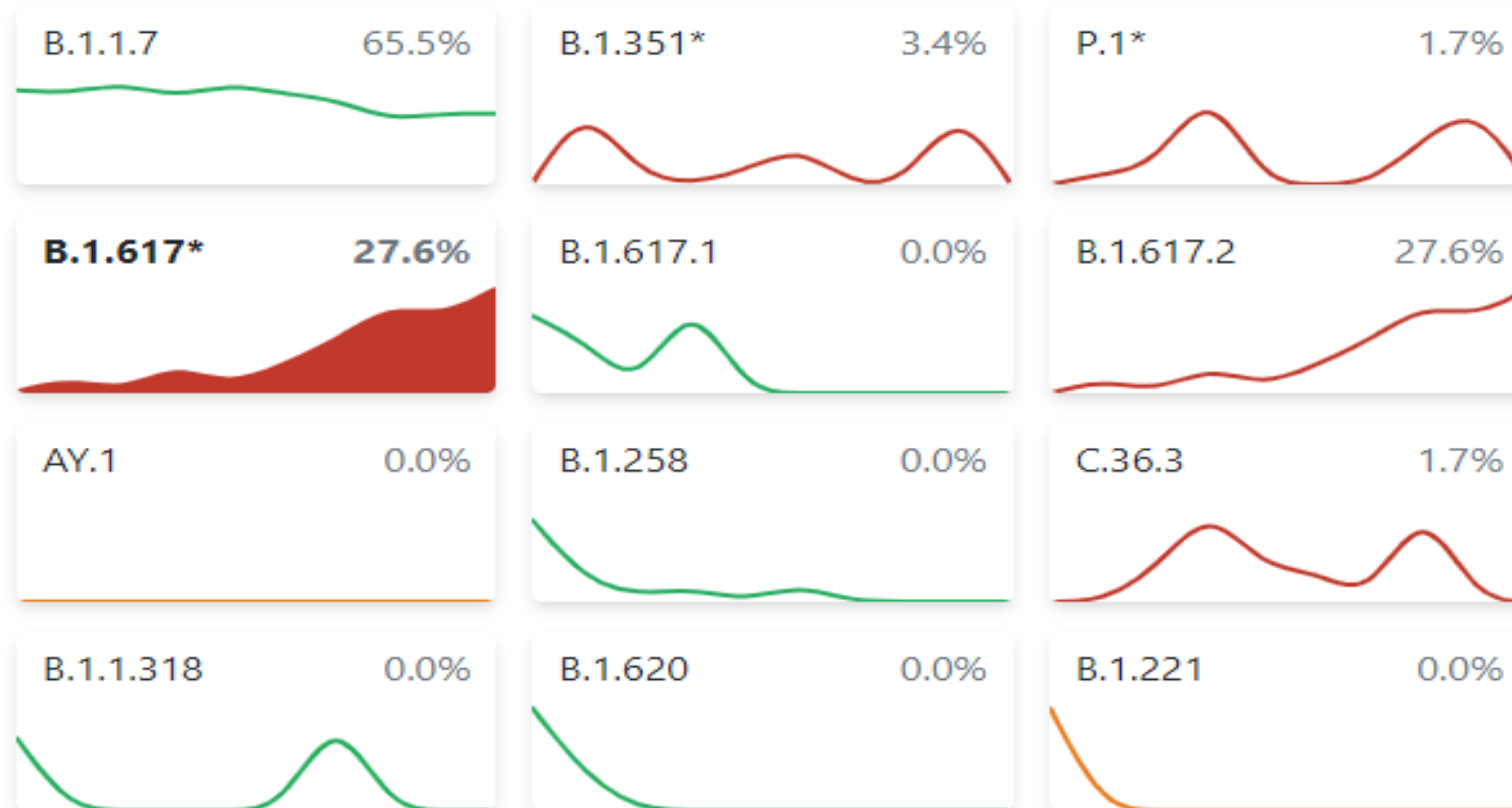
Graf 3: Přehled detekcí sledovaných variant (data z GISAIDU k 25.6.2021)

## Known variants

covSPECTRUM

Enabled by data from GISAID

Search pangolin lineage (B.1, B.1.1.7, B.1.\*)



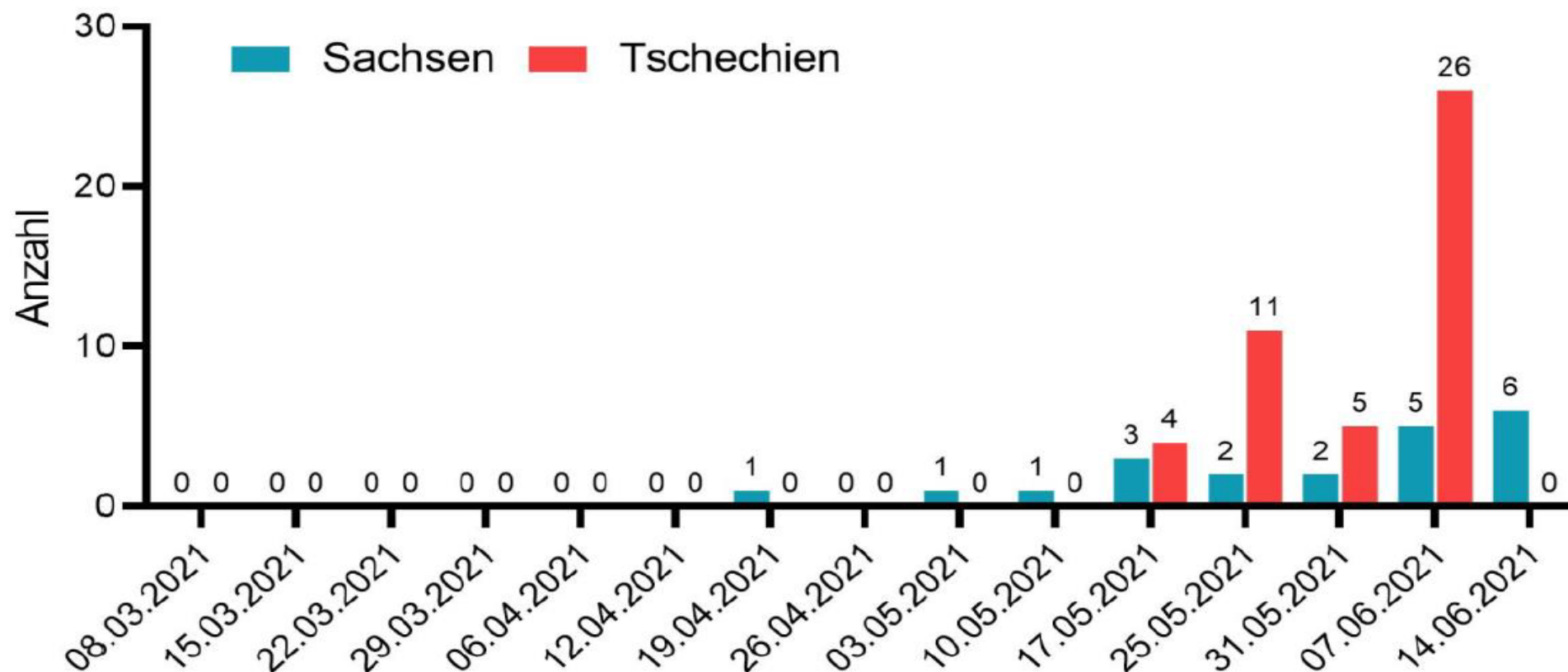
Graf 4: Průkaz varianty delta ve vzorcích sekvenovaných v rámci Česko – saské přeshraniční spolupráce, převzato ze zprávy

SARS-CoV-2 Cross-Border Sequencing Project

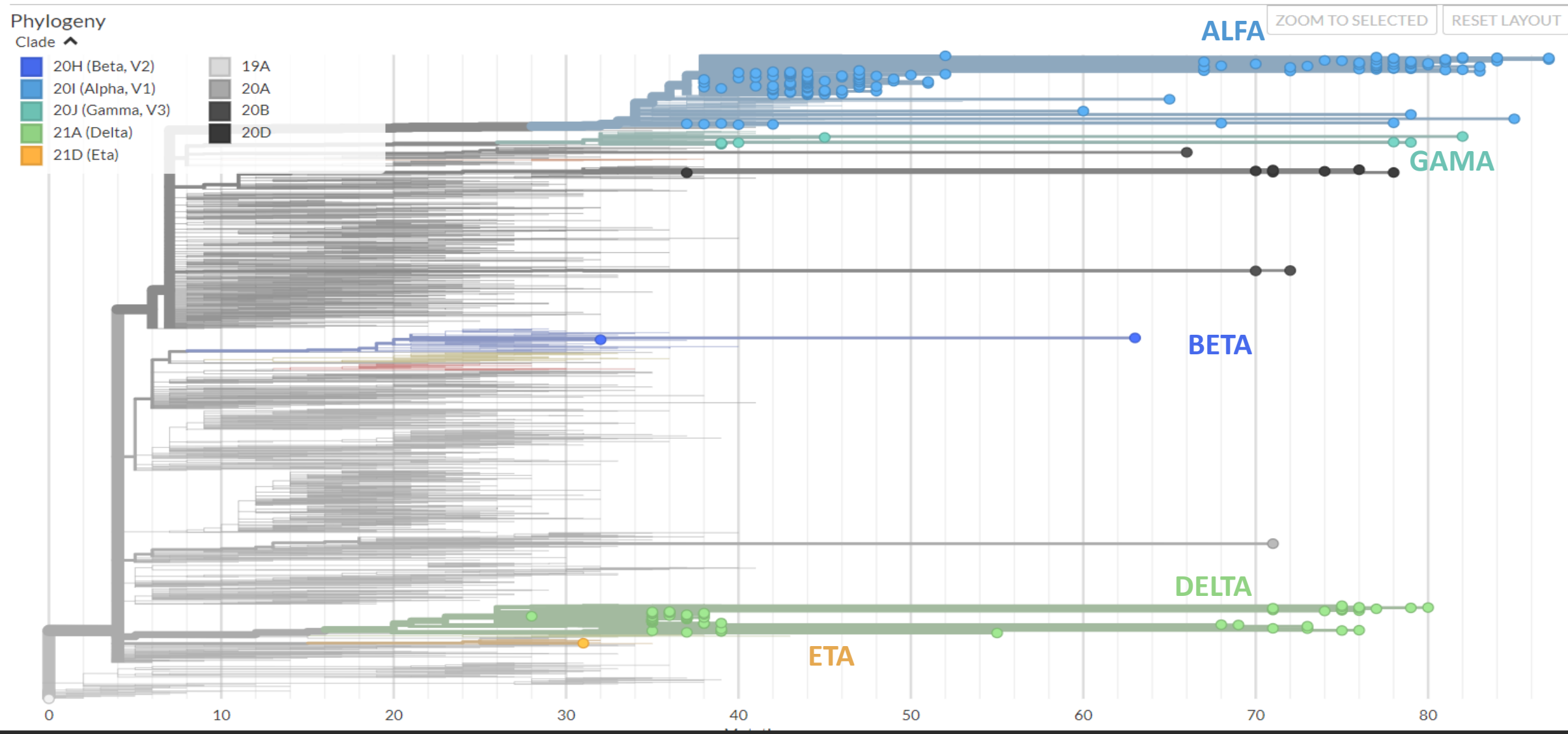
Results 25.06.2021

Samples from: Saxony, Usti nad labem, Liberec, Boleslawiec

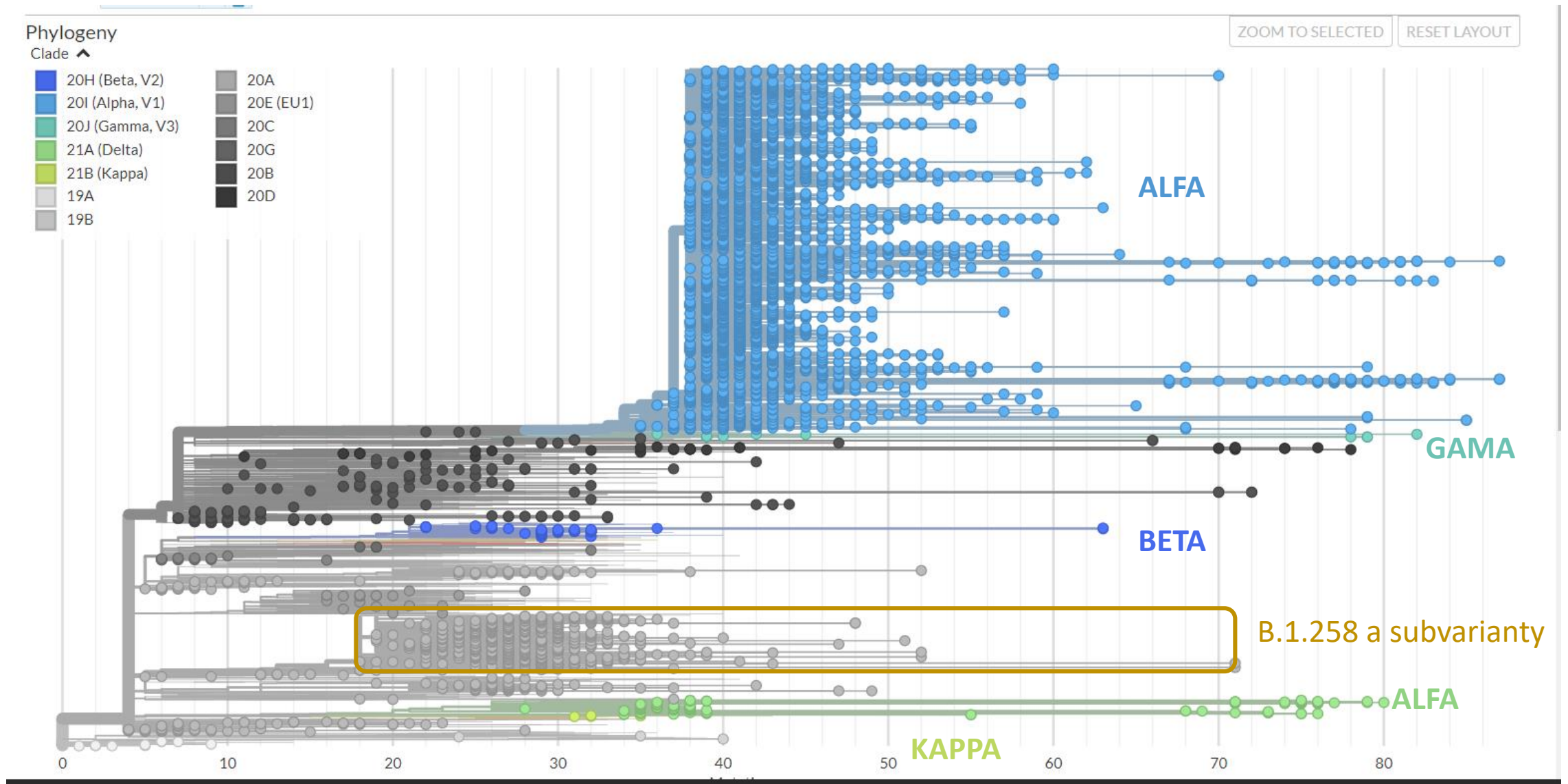
### B.1.617.2



Obr.2: Fylogenetický strom červen 2021 - NRL vzorky



Obr.3: Fylogenetický strom vytvořený z 4 435 celogenomových sekvencí



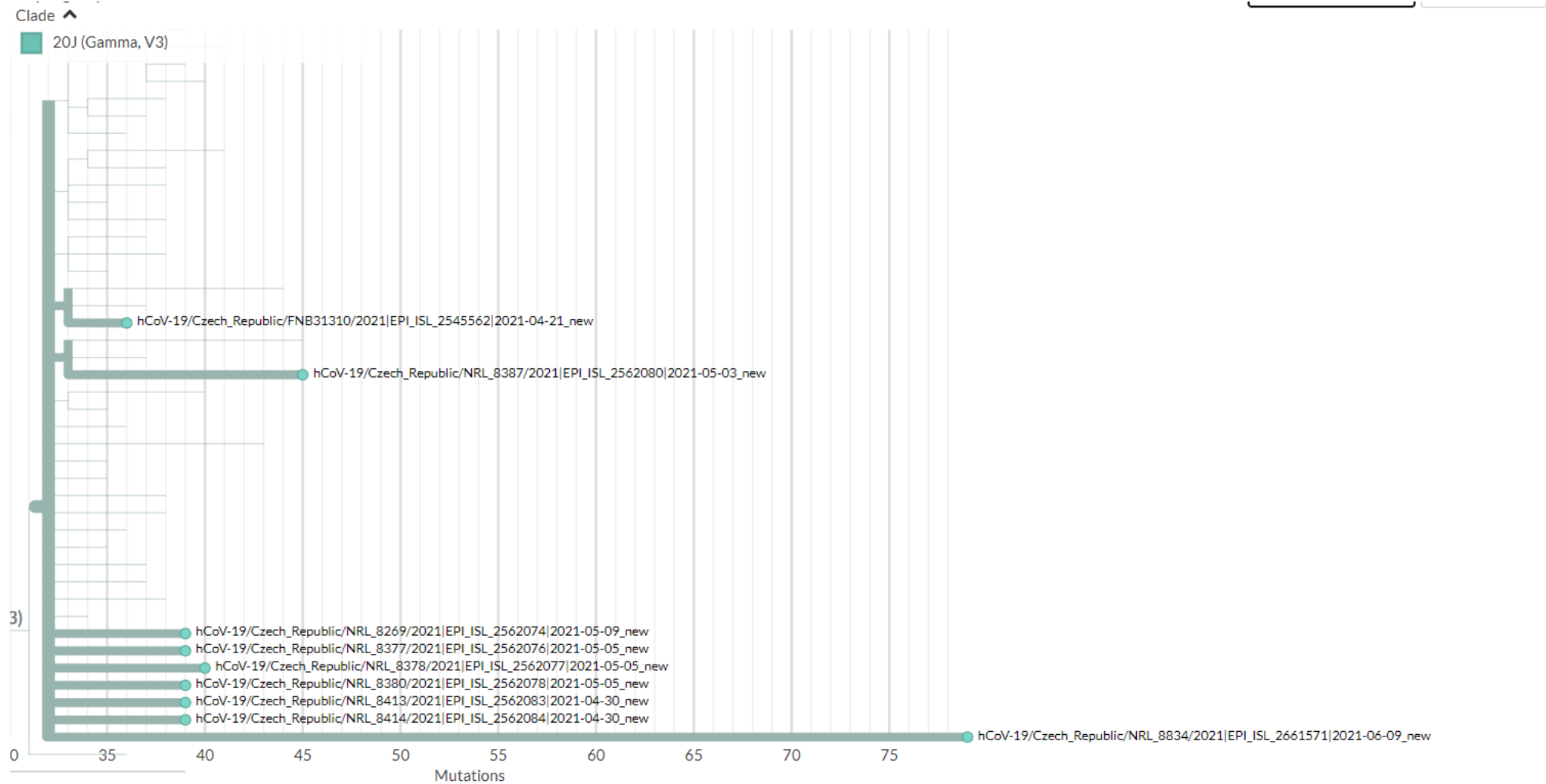
# Obr.4: Fylogenetický strom pro variantu beta na území ČR (65 sekvencí)



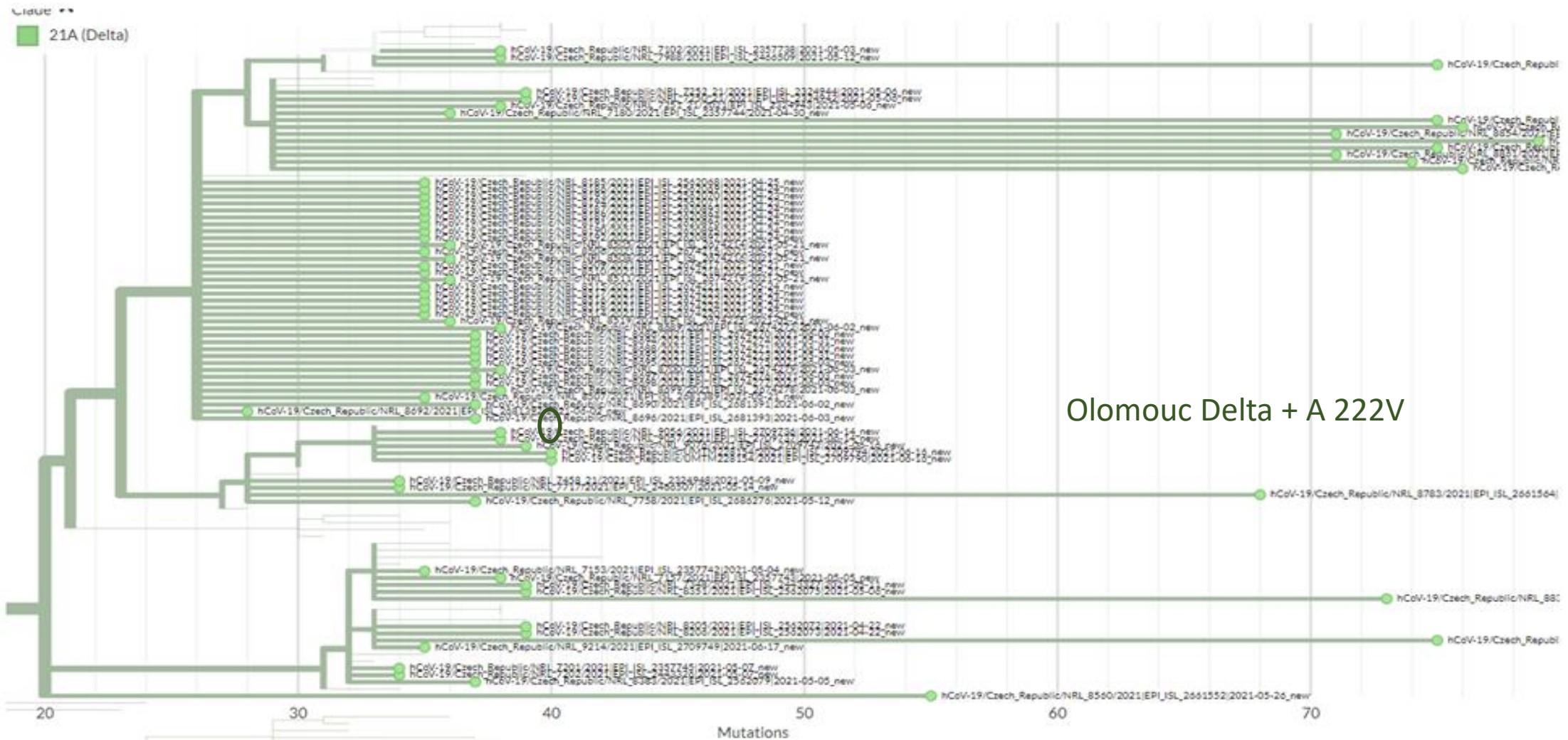
Diversity

ENTROPY EVENTS AA NT

Obr.5: Fylogenetický strom pro 9 celogenomových sekvencí varianty gama na území ČR



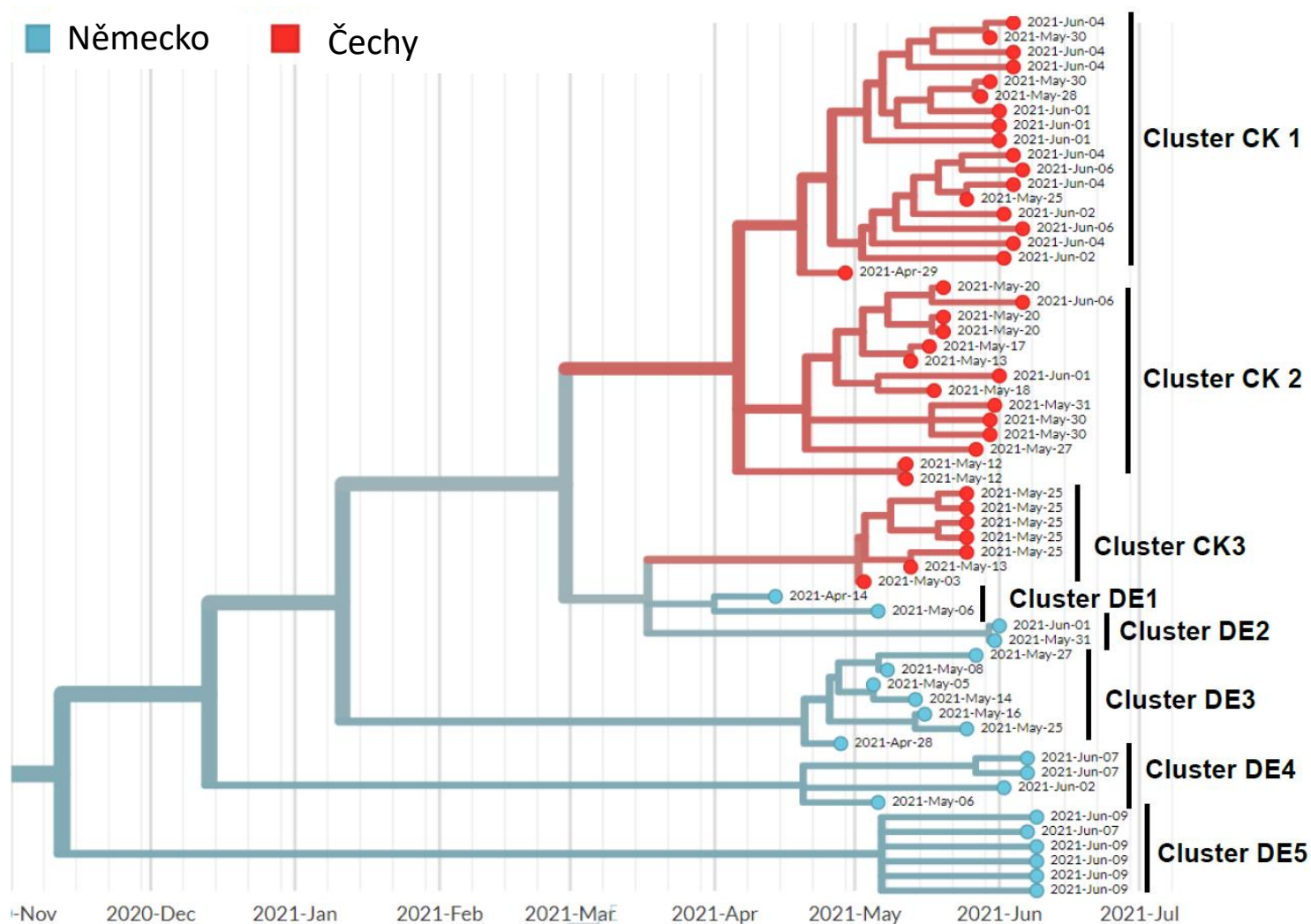
Obr.6: Fylogenetický strom pro variantu delta na území ČR (72 sekvencí z GISAID, bez sekvencí ze Saska)



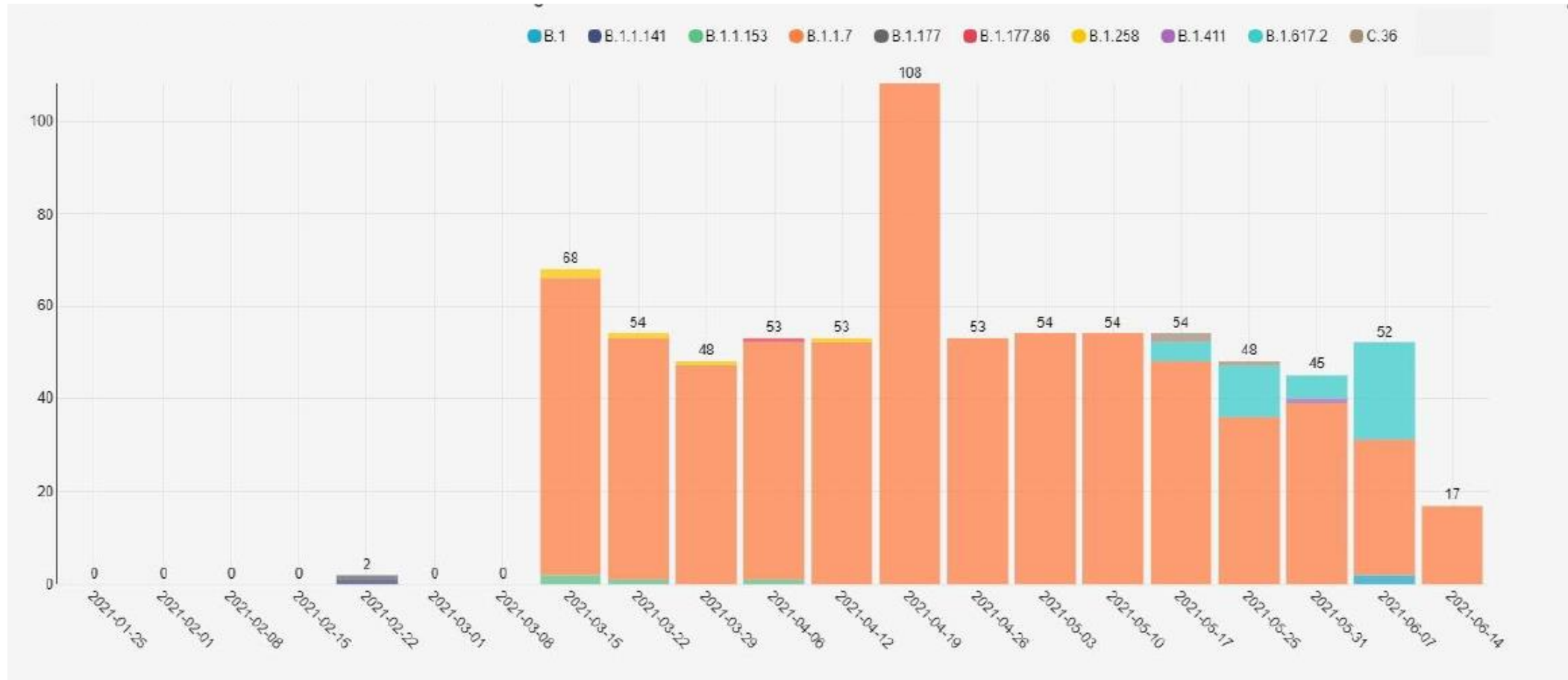
Olomouc Delta + A 222V



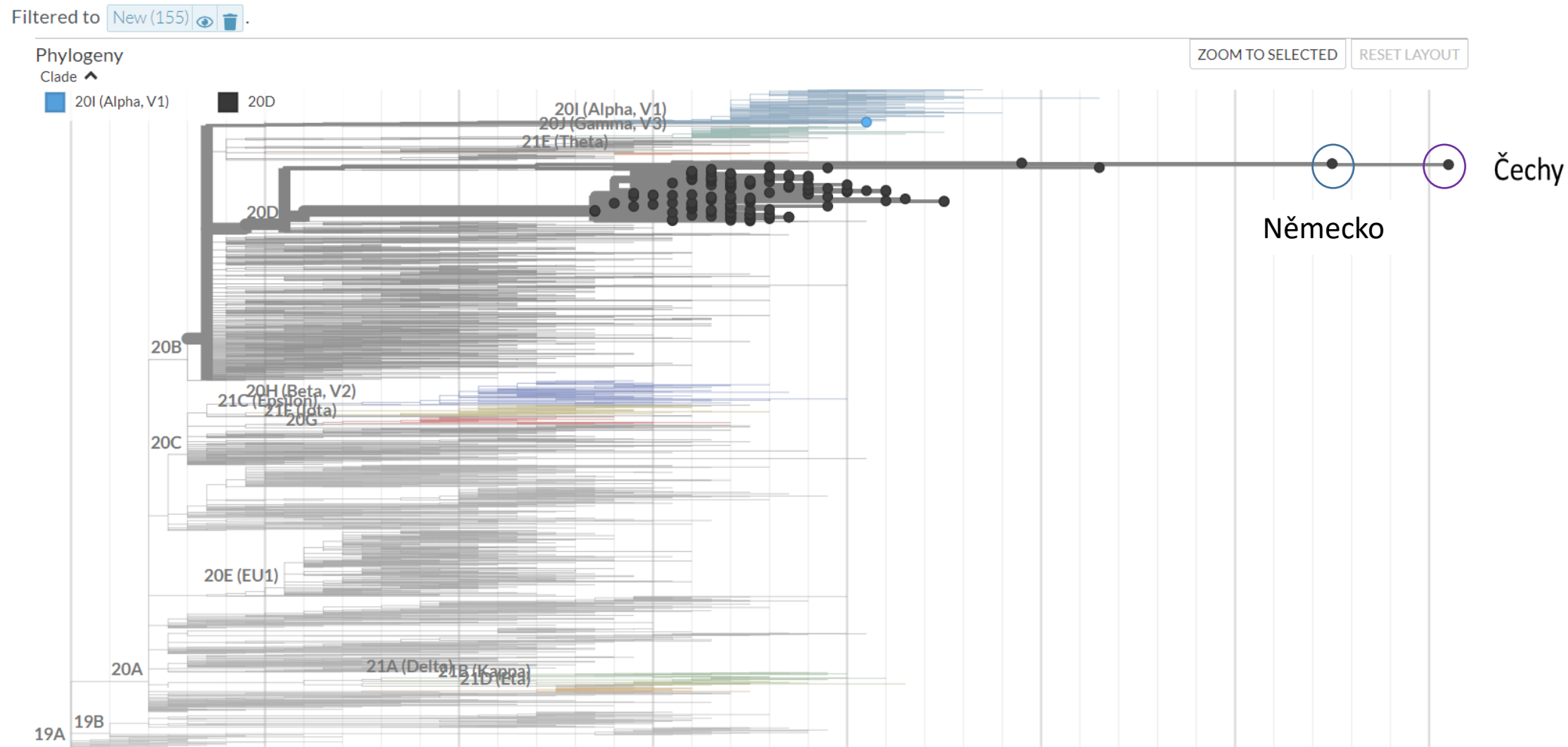
Obr.7: Fylogenetický strom varianty delta vyplývající z Česko-saské přeshraniční spolupráce



Graf 5: Přehled sekvenačně potvrzených detekcí v rámci Česko – saské přeshraniční spolupráce



# Obr. 8: Evropské detekce varianty lambda – C.37



Tab. 4: Přehled kmenů v NRL, možno získat pro standardizaci metod, pro sledování virus neutralizačního titru či pro výzkumné účely.

- B.1.258
  - B.1.1.318
  - P.1.1.248
  - B.1.351
  - B.1.1.7
  - B.1.617.1
  - B.1.617.2
  - P.1
- 
- Lambda variantu (C.37), C.36.3 a B.1.525 zatím NRL pro malé množství původního materiálů zatím nemá.