Celogenomová sekvenace v ČR 2021 – souhrnná zpráva NRL za duben a květen k 28. 5. 2021

K 28.5.2021 bylo za ČR osekvenováno celkem 4 439 vzorků, do GISAID vloženo 2 903 celogenomových sekvencí, 1 536 sekvencí ještě do GISAID vloženo nebylo. Za duben a květen bylo osekvenováno 1 226 vzorků. V rámci sledování alertních variant bylo v několika nezávislých klastrech a v několika sekvenačních centrech potvrzeno 21 případů B.1.351 tedy JAR varianty (VOC varianta nesoucí 3 mutace ve vazebném místě na receptor ACE2). V NRL byly potvrzeny 3 případy importu B.1.1.318 (varianta nesoucí escape mutaci E484K a mutaci v oblasti furinového štěpného místa P681H). Stejnou kombinaci mutací nese sledovaná varianta B.1.620, která byla v ČR detekována ve sledovaném období ve 3 případech.

Celogenomovou sekvenací bylo potvrzeno celkem 22 případů B.1.617.x (indická varianta), a pět vzorků B.1.617. 1 , která je kategorizována jako sledovaná varianta (VUM) a 17 případů B.1.617.2, která byla v rámci ECDC překlasifikováno na variantu zájmu VOC, z původní klasifikace VUI/VOI. Varianta B.1.617.2 je dominantní v JV Asii (Indie, Nepál) a je v současnosti v centru pozornosti z hlediska transmisibility a možnosti úniku před vakcinací. Epidemiologické šetření probíhá, alarmující skutečností jsou komunitní záchyty bez návaznosti na import.

V rámci sekvenační surveillance bylo detekováno 9 případů C.36. Tato linie je charakterizována substitucí L452R (escape mutace). Ve dvou případech nese tato varianta navíc deleci v N terminální doméně na pozici 69 -70 (obr. 1). Tato delece je typická pro původně podzimní dominantní variantu v ČR (B.1.258) a pro britskou variantu (B.1.1.7).

V rámci diskriminačních PCR vyšetření v NRL sekvenačně vyšetřujeme:

- 31 detekcí E484K, z toho jedenkrát v kombinaci s N501Y – tedy podezření na britskou variantu s mutací E484K (VOC)
- 4x podezření na jihoafrickou variantu B.1.351 (VOC)
- 19 detekcí L452R, tedy podezření na B.1.617.x (VUM/VOC) nebo C.36 (VUM).

Většina importů B.1.617.x a C.36 v měsíci květnu je spojena s cestovatelskou anamnézou do Egypta, ale jsou detekovány i komunitní záchyty.

Závěr: stále přetrvává dominance B.1.1.7, ale detekce 4 sledovaných variant (VUM) a dvou variant zájmu (VOC) je poměrně znepokojivý fakt (tabulka 2, graf 1), který by měl vést k intenzivnějšímu sledování příjezdů a příletů. Stejně tak změna klasifikace B.1.617.2 z VUM na VOC (ECDC klasifikace) a šíření této varianty v Anglii (graf 2 a 3), v Evropě i ve světě přispívá k podpoře přijetí opatření zabraňujícím importu dalších variant.

Doporučení k diskriminačním PCR pro laboratoře–NRL k 28. 5. 2021

V současnosti jsou diskriminační PCR nejrychlejší nástroj, který umožní detekovat mutace, které přinášejí evoluční výhodu viru ve smyslu zvýšení transmisibility, či úniku před tlakem protilátek. Je zcela jednoznačné, že některé z těchto variant jsou rezistentní vůči léčebným monoklonálním protilátkám. Příkladem je preparát bamlanivimab (BAMLAN - Eli Lilly). Proto je vhodné před podáním léčby provést takovou PCR, která umožní odhalit substituci L452R či E484K. Vliv substituce E484Q na rezistenci viru vůči tomuto preparátu není dostatečně podložen důkazy. Obě tyto mutace mohou vést v rozdílné míře ke snížení účinnosti vakcinace i ke snížení protektivity protilátek vytvořených po předchozím onemocnění. Některé další mutace ovlivňují transmisibilitu. Mnoho z nich vzniká konvergentně nezávislou evolucí v různých lokalitách a v různých variantách. Cílem těchto PCR není, určit tu kterou variantu, ale nalézt mutaci, která může být významná z hlediska rezistence viru vůči protilátkám a jeho schopnosti se šířit.

NRL doporučuje vyšetřovat především tyto mutace: E484K, N501Y, L452R
Další mutace k úvaze jsou: K417N, P681H/R, E484Q, případně deleci 69-70.
Poslední data naznačují důležitost mutace T478K.

Důležité mutace ve spike proteinu jsou uveřejněny ECDC zde: https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern

Spike Protein Substitution	Common Pango Lineages with Spike Protein Substitutions[c]
L452R	B.1.526.1 B.1.429 B.1.427 B.1.617.2 B.1 B.1.617.1 C.36 A.2.5
E484K	P.1 B.1.526 B.1.1.318 B.1.351 B.1.525 R.1 B.1.621 B.1 B.1.1

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

Tabulka 1: Aktuální přehled variant a mutací zájmu

NLČP klíče a kódy pravidelně AKTUALIZOVÁNY uveřejněny např. zde: https://dastacr.cz/SARS-CoV-2.html

NČLP klíč →		50805		50803	51360		51354						50793	50811		50813		50795		51352	51350		51339	50791			50797	50815		50785			51346	51358			50799	51348	50807	50837	50789	50907	50809	51344	50839
NČLP kód (PCR) →							W152C						K417N	K417T		L452R		N439K		T478R	T478K		E484Q	E484K			N501Y	N501T		A570D			H655Y	Q677H			P681H	P681R	A701V	V1176F	Del69-70	Del141-14	Del144	Del145-14	F888L
varianta - původ - první detekce	Detekce v ČR	NČLP klíč MTV (sekvenace) ↓		Pangolin lineage	Nextstrain	ECDC/CDC klasifikace	W152C	INS	R346K	V367F	P384V	Q414K	K417N	K417T	N450K	L452R	L452Q	N439K	S477N	T478R	T478K	V483A	E484Q	E484K	F490S	S494P	N501Y	N501T	E516Q	A570D	Q613H	A653V	H655Y	Q677H	N679K	G699S	P681H	P681R	A701V	V1176F	del 69,70	del 141 - 143	del 144	del Y145-H146	F888L
		GTYPCOV																																											
Vlastnosti →							esc NT						rans/es	trans		esc							esc	esc			trans	trans		?			trans				trans	trans	trans	mortal	esc	esc	esc	-	?
Britská	ano	VOC2020		B.1.1.7	20I/501Y.V1	VOC																					+			+							+				+		+		
Britská + E484K	ano	B117484		B.1.1.7	20I/501Y.V1	VOC																		+			+			+							+				+		+		
Britská + S494P		B117494		B.1.1.7	20I/501Y.V1	VUM																				+	+			+							+				+		+		
Britská + L452K		B117452		B.1.1.7	20I/501Y.V1	VUM										+											+			+							+				+		+		
JAR	ano	501Y.V2		B.1.351	20H/501Y.V2	VOC							+											+			+												+						
Brazilská		B1128		B.1.1.28		VUI																		+																					
Brazilská ex Manaus		P.1		P.1	20J/501Y.V3	VOC								+										+			+						+							+					
Nigerie		B1525		B.1.525		VOI													+					+										+							+		+		+
Jižní Amerika/USA		B11526		B.1.526		VUM																		+															+						
NY - USA		B15261		B.1.526.1		VUM										+																													
USA		B15262		B.1.526.2		VUM												+																											
tzv. "česká" ale nečeská!	ano	20A		B.1.258														+/-																							+				
?		A27		A.27	19B (D614)	VUM										+											+					+	+												
?		A28		A.28	19B (D614)	VUM																						+					+												
Kalifornie		B1427		B.1.427	20C (20C/S:452R)	VOI										+																													
Kalifornie (+transmisibilita)		B1429		B.1.429	20C (20C/S:452R)	VOI	+									+																													
Nigerie - no transmission		B1207		B.1.207		VUI																															+								
Brazilská	ano	P.2		P.2 (B.1.1.248)		VUM																		+																+					
UK - Liverpool + E484K		A231		A.23.1		VUM				+														+							+														
?/UK/Florida	ano	B11318		B.1.1.318		VUM																		+													+						+		
Filipíny		B.3		P.3		VOI																		+			+										+					+			
UK Antigua		B13241		B.1.324.1		VUI																		+																					
Francie		B1616		B.1.616		VOI																+											+			+									
Indie		B1617		B.1.617	20A/21A	VOI/VOC										+							+																						
Indie	ano	B16171		B.1.617.1	20A/21A	VOI										+							+															+							
Indie	ano	B16172		B.1.617.2	20A/21A	VOC										+					+																	+							
Indie		B16173		B.1.617.3	20A/21A	VOI/VOC										+							+															+							
Indie (Bengálsko, říjen 2020)		B1618		B.1.618		VUI																		+																				+	
?	ano	B1620		B.1.620		VOI/VUI													+					+													+								
Kolumbie		B1621		B.1.621		VOI			+															+													+								
Mexiko		B11519		B.1.1.519		VUM															+																								
?		B12142		B.1.214.2		VUM		214TDR				+			+																														
UK		A231367		A.23.1		VUM				+														+							+														
?	ano	C16		C.16		VUM										+																													
Egypt + L452R	ano	C36		C.36*		VUM										+																		+							?				
Peru		C37		C.37		VUM											+								+																				
JAR + P384L		B1351384		B.1.351	20H/501Y.V2	VUM					+		+											+			+												+						
JAR + E516Q		B1351516		B.1.351	20H/501Y.V2	VUM							+											+			+		+										+						
Rusko		AT1		AT.1		VUM		679GIAL																+											+										
UK		AV1		AV.1		VUM												+						+													+								
Tanzánie		AVOIV2		nelze přiřadit	A.VOI.V2															+				+									+				+					+			

trans - zvýšení transmisibility

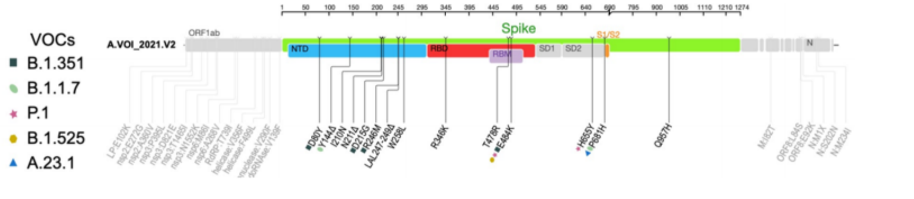
esc - únik před tlakem protilátek

další mutace v individuálních listech

D614G - obdoba Q613H	usnadnění vazby na ACE2, všechny B a vyšší varianty D614G obsahují
alertní mutace	
N terminální doména - vazba protilátek	
blízko furinového štěpného místa - ovlivnění vazby na receptor	
dle jedné práce zvýšení patogenity	
receptor binding doména	spike mutation of interest

INS = inzerce

* C.36 +del39-70 bude pravděpodobně řazena jako C.36.3 https://github.com/cov-lineages/pango-designation/issues/80

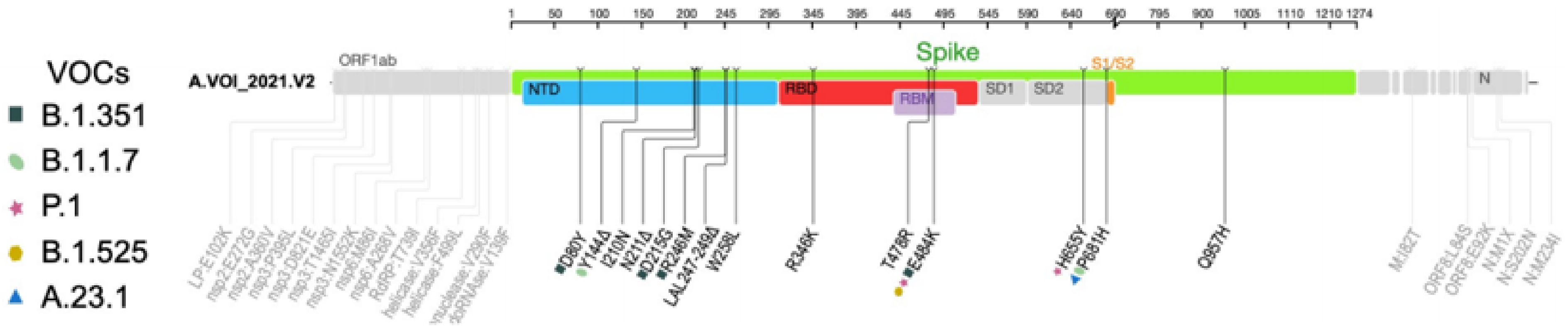


Supplemental Fig S4: Genome map of the A.VOI.V2, with mutations annotated by presence in other VOCs

A novel variant of interest of SARS-CoV-2 with multiple spike mutations detected through travel surveillance in Africa
Authors: de Oliveira T, Lutucuta S, Nkengasong J, Morais J, Paixao JP, Neto Z, Afonso P, Miranda J, David K, Ingles L, Amilton P A P R R C, Freitas H R, Mufinda F, Tessema K S , Tegally H, San E J, Wilkinson E, Giandhari J, Pillay S, Giovanetti M, Naidoo Y, Katzourakis A, Ghafari M, Singh L, Tshiabuila D, Martin D, Lessells R.

VOC – variant of concern
VUI – variant under investigation
VOI – variant of interest (CDC/WHO terminologie)
VUM – variant under monitoring (ECDC terminologie)

Obr. 1: Mapa oblastí spike se fenotypově významnými mutacemi



Supplemental Fig S4: Genome map of the A.VOI.V2, with mutations annotated by presence in other VOCs

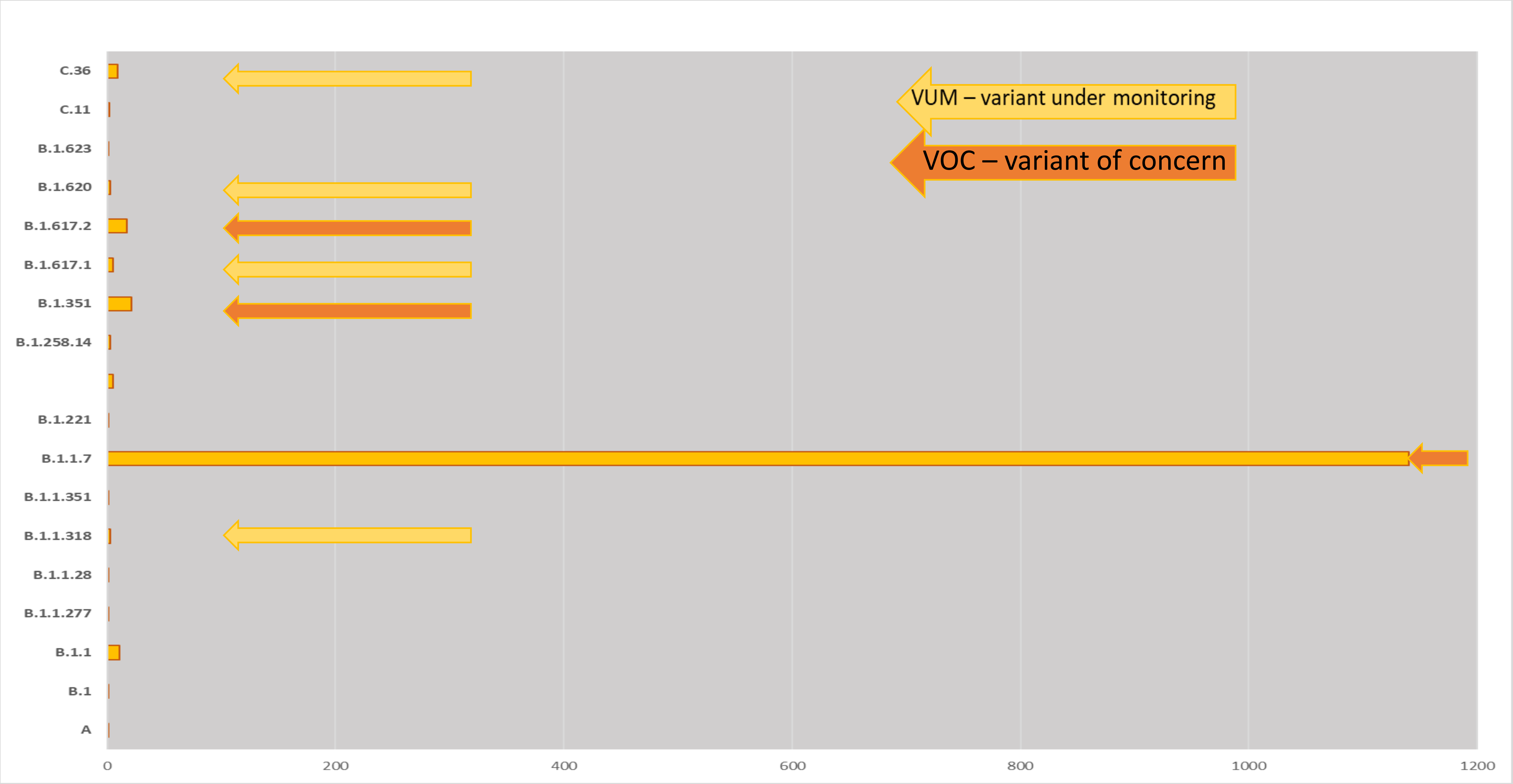
A novel variant of interest of SARS-CoV-2 with multiple spike mutations detected through travel surveillance in Africa
Authors: de Oliveira T, Lutucuta S, Nkengasong J, Morais J, Paixao JP, Neto Z, Afonso P, Miranda J, David K, Ingles L, Amilton P A P R R C, Freitas H R, Mufinda F, Tessema K S , Tegally H, San E J, Wilkinson E, Giandhari J, Pillay S, Giovanetti M, Naidoo Y, Katzourakis A, Ghafari M, Singh L, Tshiabuila D, Martin D, Lessells R.

Tab. 2: Přehled detekovaných variant zájmu (VOC) či sledovaných variant (VUM) za duben a květen (ECDC klasifikace)

	A	1
	B.1	1
	B.1.1	11
	B.1.1.277	1
	B.1.1.28	1
VUM	B.1.1.318	3
	B.1.1.351	1
VOC	B.1.1.7	1140
	B.1.221	1
	B.1.258	5
	B.1.258.14	3
VOC	B.1.351	21
VUM	B.1.617.1	5
VOC	B.1.617.2	17
VUM	B.1.620	3
	B.1.623	1
	C.11	2
VUM	C.36	9
	None	37

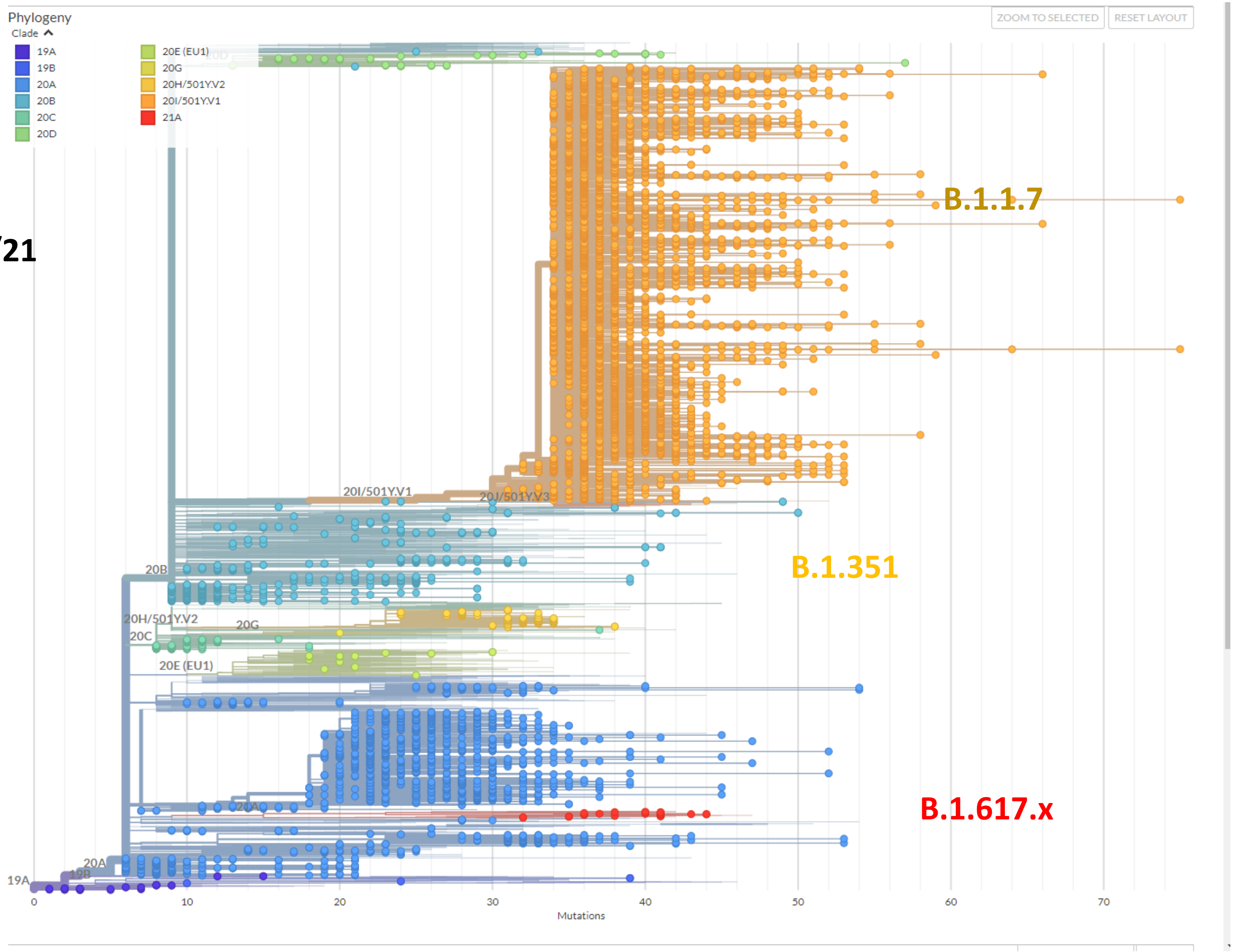
B.1.1.7	20I/501Y.V1	VOC
B.1.1.7	20I/501Y.V1	VOC
B.1.1.7	20I/501Y.V1	VUM
B.1.1.7	20I/501Y.V1	VUM
B.1.351	20H/501Y.V2	VOC
B.1.1.28		VUI
P.1	20J/501Y.V3	VOC
B.1.525		VOI
B.1.526		VUM
B.1.526.1		VUM
B.1.526.2		VUM
B.1.258		
A.27	19B (D614)	VUM
A.28	19B (D614)	VUM
B.1.427	20C (20C/S:452R)	VOI
B.1.429	20C (20C/S:452R)	VOI
B.1.207		VUI
P.2 (B.1.1.248)		VUM
A.23.1		VUM
B.1.1.318		VUM
P.3		VOI
B.1.324.1		VUI
B.1.616		VOI
B.1.617	20A/21A	VOI/VOC
B.1.617.1	20A/21A	VOI
B.1.617.2	20A/21A	VOC
B.1.617.3	20A/21A	VOI/VOC
B.1.618		VUI
B.1.620		VOI/VUI
B.1.621		VOI
B.1.1.519		VUM
B.1.214.2		VUM
A.23.1		VUM
C.16		VUM
C.36		VUM
C.37		VUM
B.1.351	20H/501Y.V2	VUM
B.1.351	20H/501Y.V2	VUM
AT.1		VUM
AV.1		VUM
nelze přiřadit	A.VOI.V2	

Graf 1: Přehled linií SARS-CoV-2 detekovaných v dubnu a květnu ČR



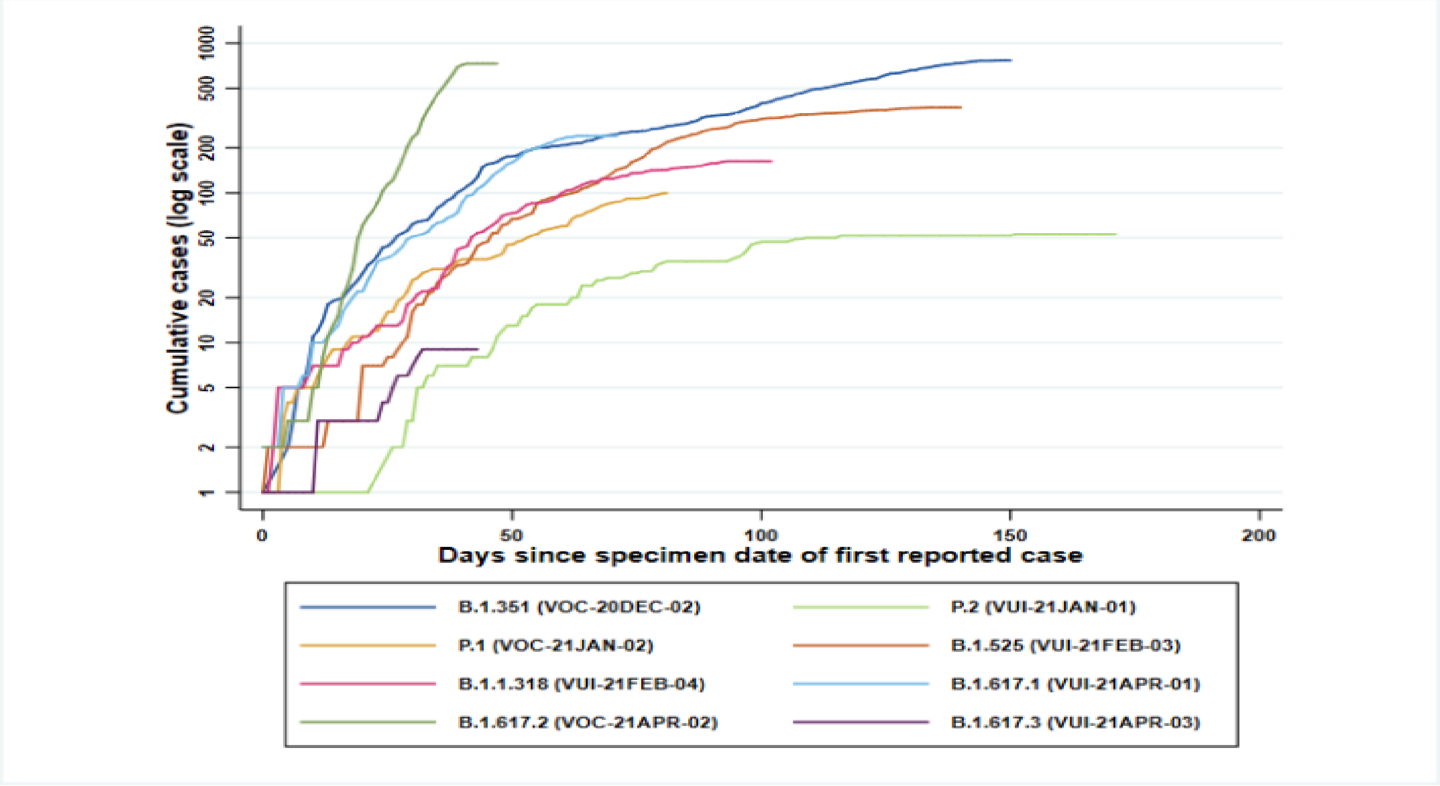
Obr. 2:
Fylogenetická analýza WGS 2020/21

(Nextclade)



Graf. 2: Kumulativní data detekovaných variant k 5.5.2021 v Anglii

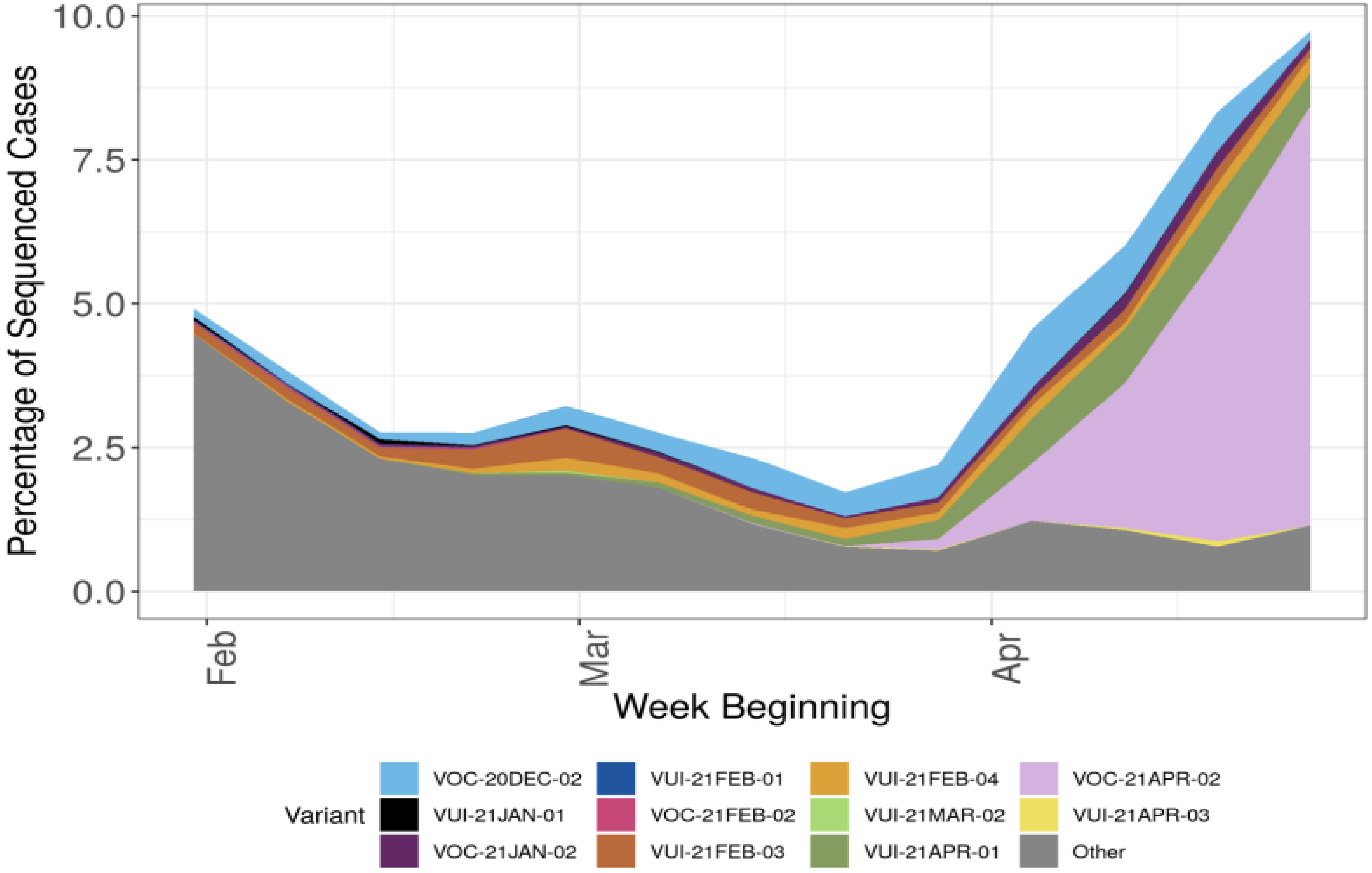
Figure 1. Cumulative cases in England of variants indexed by days since first reported, data as of 5 May 2021 (Find accessible data used in this graph in underlying data). Figure 1 demonstrates the rapid identification of B.1.617.2 cases over a short period.



https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/984274/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_10_England.pdf

Graf 3: Prevalence variant v Anglii

Figure 3. Variant prevalence for all England available case data from 1 February 2021 as of 4 May 2021
(VOC-20-DEC-01, B.1.1.7, not shown. Excluding cases where the specimen date was unknown)
(Find accessible data used in this graph in underlying data)



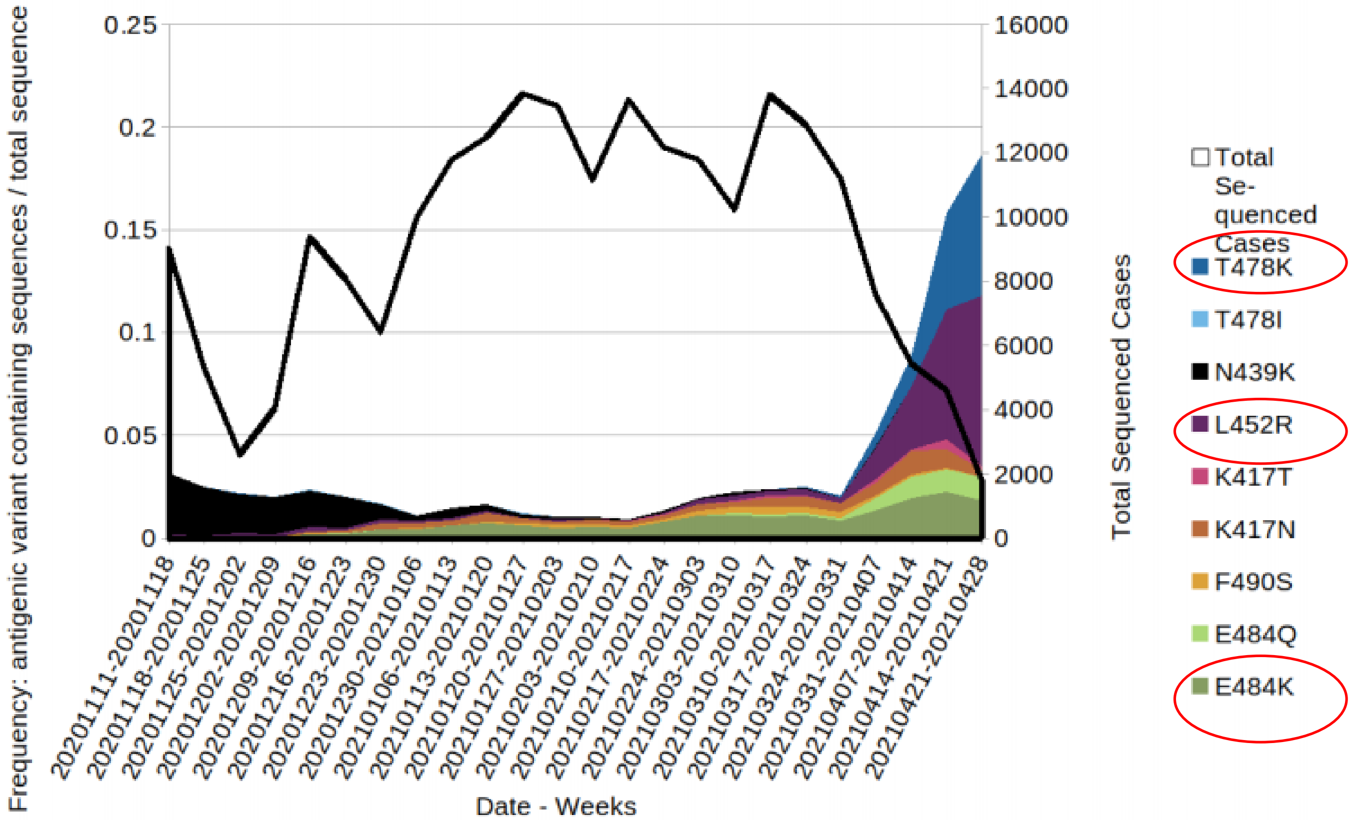
B.1.1.7

B.1.617.2

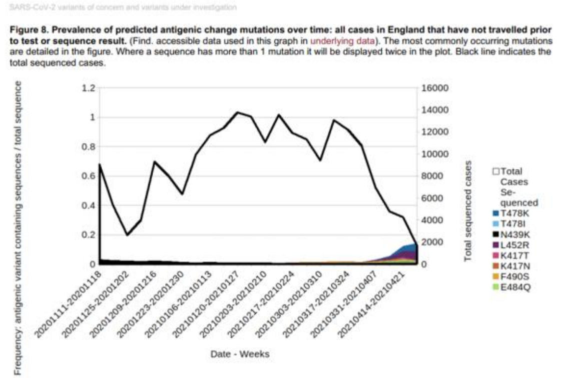
https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/984274/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_10_England.pdf

Prevalence hot-spot mutací v Anglii

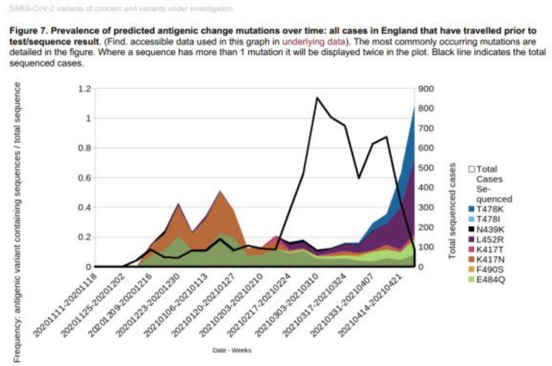
Figure 6. Prevalence of predicted antigenic change mutations over time: all cases in England
(Find. accessible data used in this graph in underlying data). Mutations potentially associated with antigenic change are monitored as part of horizon scanning. Figure 6 shows the proportion of these mutations over time in the all England genomic dataset, illustrating the increase in L452R. The most commonly occurring mutations are detailed in the figure. Where a sequence has more than 1 mutation it will be displayed twice in the plot. Black line indicates the total sequenced cases.
The supplementary data for figures is available.



Bez cestovní anamnézy

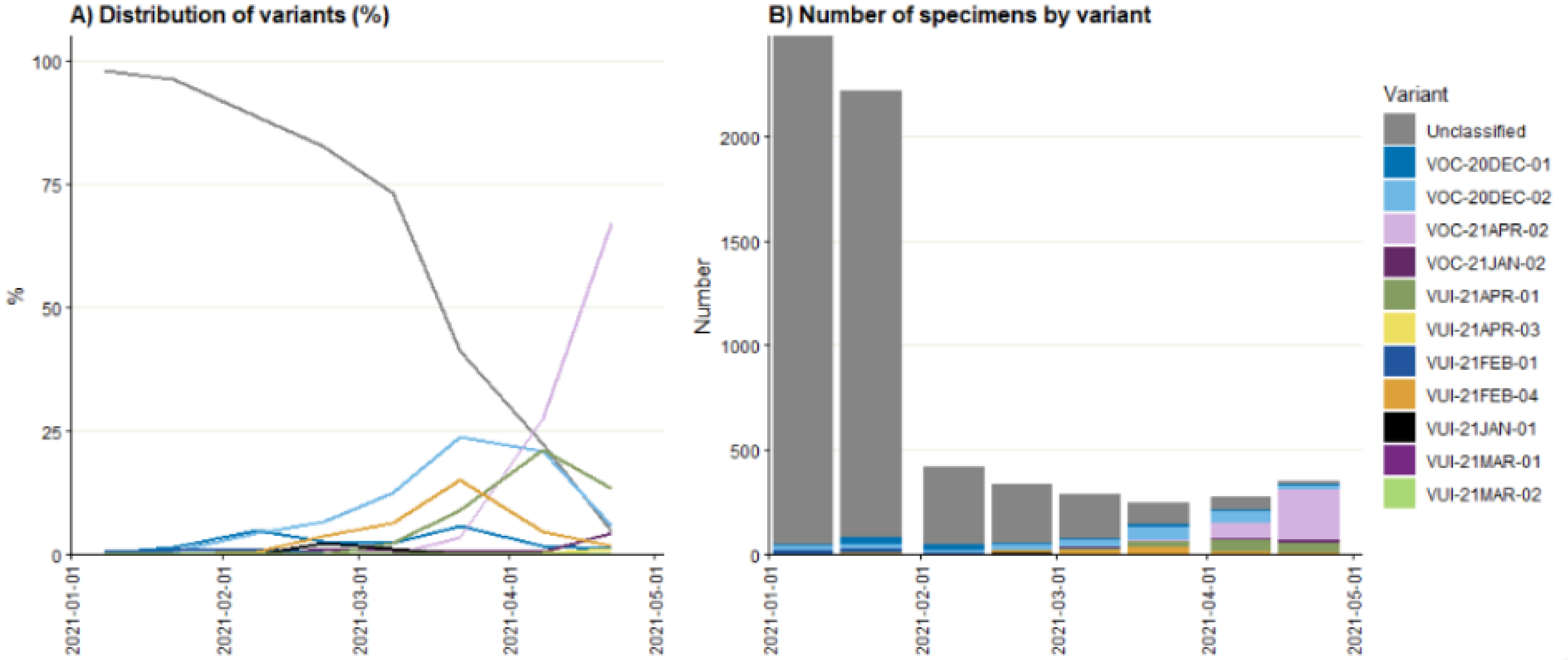


Cestovatelé



Vzrůstající počet detekcí B.1.617.2

Figure 15. Distribution of variants among sequenced S gene positive SARS-CoV-2 specimens, by half-months as of 3 May 2021. Specimen dates between 1/1/2021 and 26/04/2021 (latest period incomplete. Find accessible data used in this graph in underlying data).



B.1.617.2

Přehled detekčních souprav pro diskriminační PCR

NRL prosí výrobce a distributory o aktualizaci a případně doplnění. Zvýrazněné jsou ty soupravy, které nabízejí vhodnou kombinaci z hlediska současné situace. Přehledná tabulka je přílohou zprávy.

Název kitu	Výrobce	Distributor	Detekované mutace*																											
			del69-70	D80A	K417N	A570D	E484K	N501Y	P681H	1176F	RdRP WT	Ngene D3L	NSP6 106/107/108 d	W152C	L452R	K417T	P681R	E484Q	N439K	S477N	D614G	A222V	T265I	Q677H	T478K	* Y144 del	Spike L242, L244	ORF1ab S3675_F3677 deletion	wt (S gen)	wt (E gen)
Bosphore N501Y Detection Kit v1 *	Anatolia Geneworks	GALI spol. s r.o.				X			X																		X				
Bosphore SARS-CoV-2 Variant Detection Kit v1 *	Anatolia Geneworks	GALI spol. s r.o.				X			X																		X				
Bosphore SARS-CoV-2 Variant Detection kit v2	Anatolia Geneworks	GALI spol. s r.o.					X	X	X																						
RealLine SARS-CoV-2 Variants	Bioron	GALI spol. s r.o.	X		X		X	X																							
KIT C68/88 SARS-COV-2 VARIANT SET 1 (9424407190)	Roche	Roche	X				X	X																							
VirSNiP SARS del69,70 + 484K + 501Y (9443924001)	TibMol Biol	Roche	X				X	X																							
VirSNiP SARS B117 (Spike del+501) (9429506001)	TibMol Biol	Roche	X					X																							
VirSNiP SARS B1351 (484K+501Y) (9429522001)	TibMol Biol	Roche					X	X																							
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike A23063T N501Y (9405577001)	TibMol Biol	Roche						X																							
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike del H69_V7 (9405674001)	TibMol Biol	Roche	X																												
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike D614G (9405666001)	TibMol Biol	Roche																			X										
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike P681H (9409572001)	TibMol Biol	Roche							X																						
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike E484K (9429549001)	TibMol Biol	Roche					X																								
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike A570D (9429557001)	TibMol Biol	Roche				X																									
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike K417N (9429565001)	TibMol Biol	Roche			X																										
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike V1176F (9431837001)	TibMol Biol	Roche								X																					
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike L452R (9459022001)	TibMol Biol	Roche													X																
LightMix® Kit SARS-CoV-2 E+N UBC (09482407001)	TibMol Biol	Roche	Detekce genu E a N + detekce libovolné								N WT																				
Další kity, které detekují mutace neuvedené v tabulce																															
VirSNiP SARS-CoV-2 Spike Y453F (mink) (9405658001)	TibMol Biol	Roche																													
PowerChek SARS-CoV-2 ?utaation deletion kit ver.1	Kogene	Svebn Biolabs			X		X	X				X																			
PowerChek SARS-CoV-2 ?utaation deletion kit ver.2	Kogene	Svebn Biolabs			X		X	X			X	X			X		X	X													
V435-96FRT/B SARS-CoV-2 British Variant Real-TM	Sacace	Dynex	1																										1	1	
V435-96FRT/V SARS-CoV-2 Variant Typing Real-TM	Sacace	Dynex	1		1		1	1																							1
4224-0010 PKamp™ VariantDetect™ SARS-CoV-2 RT-PCR a	PerkinElmer	Dynex	1																									1	1		
CoviDetect™ COVID-19 4-plex Mutation RT-PCR Assay	PentaBase	Dynex			1		1	1	1																						
CoviDetect™ COVID-19 Mutation N501Y Simplex	PentaBase	Dynex						1																							
CoviDetect™ COVID-19 Mutation P681H Simplex	PentaBase	Dynex							1																						
CoviDetect™ COVID-19 Mutation E484K Simplex	PentaBase	Dynex					1																								
CoviDetect™ COVID-19 Mutation Del69-70 Simplex	PentaBase	Dynex	1																												
CoviDetect™ COVID-19 Mutation Del69-70/N439K Multiplex	PentaBase	Dynex	1																1												
CoviDetect™ COVID-19 Mutation N501Y/P681H Multiplex	PentaBase	Dynex						1	1																						
CoviDetect™ COVID-19 Mutation N439K Simplex	PentaBase	Dynex																	1												
CoviDetect™ COVID-19 Mutation A222V Simplex	PentaBase	Dynex																				1									
CoviDetect™ COVID-19 Mutation K417N Simplex	PentaBase	Dynex														1															
CoviDetect™ COVID-19 Mutation L452R Simplex	PentaBase	Dynex													1																
CoviDetect™ COVID-19 Mutation S477N Simplex	PentaBase	Dynex																		1											
CoviDetect™ COVID-19 Mutation Q677H Simplex	PentaBase	Dynex																						1							
mutace, které nejsou v tabulce:																															
CoviDetect™ COVID-19 Mutation A701V Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation L18F Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation DelY144 Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation Del242-244 Simplex	PentaBase	Dynex																										1			
CoviDetect™ COVID-19 Mutation Y453F Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation H655Y Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation F476L Simplex	PentaBase	Dynex																													
CoviDetect™ COVID-19 Mutation V553L Simplex	PentaBase	Dynex																													
NovaPrime Plus SARS-CoV-2	Novatec	Covpoint					X	X																							
NovaType ID	Novatec	Covpoint				X		X																							
NovaType II SARS-CoV-2	Novatec	Covpoint			X		X	X																							
NovaType III SARS-CoV-2 (launch in June)	Novatec	Covpoint			X										X			X													
NovaType Select L452R SARS-CoV-2	Novatec	Covpoint													X																
NovaType Select (launch in July): basic kit with free selectable Primer Probes for the mutations. Mutations here are indicated are the first ideas to start the development. Not fixed yet.	Novatec	Covpoint			X											X	X								X						
gb SARS-CoV-2 Variant SA/BR, UK	GeneriBiotech					X	X				X																				
Allplex™ SARS-CoV-2 Variants I Assay	Seegene		X				X	X			X																				
Allplex TM SARS CoV 2 Variants II Assay	Kogene Biotech	Medista													x		x	x													
DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit	Diana Biotechnologies					X																									
DBdirect™ COVID-19 Multiplex RT-PCR Kit + primer additive S:E484K	Diana Biotechnologies					X	X																								
EliGene® COVID19 UKV/SAV RT	Elisabeth Pharmacon			X					X																						
GeneProof SARS-CoV-2 Vaccine Escape PCR Kit	GeneProof						X	X																							
GeneProof SARS-CoV-2 South African/UK Typing PCR Kit	GeneProof		X?	X?			X?	X?																							
COVID-19 Variant Catcher	Clonit		X				X	X																							
PhoenixDx® SARS-CoV-2 Mutant Screen [N501Y]	PhoenixDx																														
PhoenixDx® SARS-CoV-2 Mutant Screen [K417N]	PhoenixDx				X																										
PhoenixDx® SARS-CoV-2 Mutant Screen [E484K]	PhoenixDx						X																								
DIOS-RT-qPCR SCR	Institute of Aplied Biotechnologies						X?	X?																							
SARS-CoV-2/UK/SA Variant Triplex	id solutions		X					X																							
SARS-CoV-2 / N501Y / E484K Quadruplex kit	id solutions						X	X																							
ViroQ SC2 Variant	BAG Diagnostics						X	X		X																					
cobas® SARS-CoV-2 Variant Set 1 Test	Roche		X				X	X																							
RIDA GENE SARS-CoV-2 Lineage	r-biopharm											X	X																		
COVID-19Mutation N501Y Simplex	PentaBase							X																							
COVID-19Mutation E484K Simplex	PentaBase						X																								
Supermultiplex	Sacace	?	X		X		X	X																							
Covid-19 SARSCoV2 variant typing Real TM	Sacace		x		x		x	x																							