

V ČR bylo k 14.6.2021 do GISAID vloženo v roce 2021 4 200 sekvencí, v měsíci květnu 942 sekvencí a v měsíci červnu 789 sekvencí.

V NRL bylo v rámci detekce VOC prolázáno celkem:

- 27 případů delta - B.1.617.2 (Praha, Královehradecký kraj, Moravskoslezský kraj, Liberecký kraj, Ústecká kraj, Vysočina), dalších 6 případů byly osekvenovány v rámci přeshraniční spolupráce se Saskem
- 4 případy kappa B.1.617.1 (Praha)
- 39 případů beta - B.1.351 (Praha, Moravskoslezský kraj, Středočeský kraj, Plzeňský kraj, Královehradecký kraj)
- 20 případů beta - B.1.351 bylo detekováno v Olomouckém kraji
- 7 případů gama P.1 prokázáno v 6 vzorcích z Pardubického kraje a v jednom z Prahy

V rámci cílené celogenomové sekvenace jsme v NRL ve spolupráci s SVU v tomto týdnu osekvenovali 35 vzorků zaslaných na základě epidemického šetření situace v kraji (Liberecký kraj) či na základě PCR nálezu.

Přestože ve standardním režimu sekvenace stále ještě dominuje varianta alfa (B.1.1.7), v cíleně vybraných vzorcích jsme prokázali tuto variantu pouze v jedné třetině. Za poslední týden bylo celogenomovou sekvenací prokázáno 160 sekvencí této varianty (UMTM Olomouc a ECDC support). Výsledky nenáhodné WGS surveillance potvrzují setrvalý import nových variant od konce dubna a nyní již i možné komunitní šíření. Na vývoj směrem k této situaci NRL upozorňovala ve zprávách již od 7. 5. 2021.

Ve 35 cíleně vybraných vzorcích jsme prokázali ve více než dvou třetinách jednu z alertních variant (tedy variant of concern dle definice ECDC/CDC a WHO).

Poprvé jsme detekovali variantu gama P.1 (původně označována brazilská ex Manaus), a to celkem v sedmi vzorcích z Prahy a Pardubického kraje. Protože v Pardubickém kraji byla detekována varianta gama v 6 případech, může se jednat o ohnisko.

Metodou diskriminační PCR byly detekovány mutace N501Y a E484K, při vyloučení K417N. Dle této kombinace mutací nelze stanovit, že se jedná o variantu gama, ale stejně závažným nálezem může být i alfa + E484K (britská varianta s další escape substitucí).

Variantu beta (B.1.351, JAR) jsme detekovali kromě Moravskoslezského kraje, kde jsou lokální ohniska již řešena, v jednom případě i v Praze.

Ve shodě s některými jinými evropskými zeměmi narůstá počet detekcí varianty delta (B.1.617.2), která byla prokázána v 9 vzorcích z Libereckého kraje, v jednom vzorku z Prahy, v jednom vzorku z Ústeckého kraje a v jednom vzorku z Vysočiny. Ve dvou případech byla detekována ve vzorcích od cizinců, u kterých nemáme adresu k dispozici.

V neposlední řadě je třeba zmínit nález varianty alfa se substitucí E484K. Takto pozměněná varianta si zachovává vlastnosti pro ni typické a navíc se vyznačuje tzv. escape mutací (E484K), tedy mutací vedoucí k úniku před tlakem protilátek a k rezistenci na některé léčebné monoklonální protilátky (bamlanivimab).

Za pozornost rovněž stojí, že v Praze jsme zachytili všechny 3 tyto varianty, které jsou v popředí zájmu.

V rámci vyšetřování nárůstu pozitivních detekcí v Jihočeském kraji bylo do NRL zasláno více než 55 vzorků. V první zásilce 24 vzorků bylo za pomoci diskriminačních PCR, provedených v zasílající laboratoři a v NRL, detekována přítomnost 8 aminokyselinových záměn (mutací). V tomto případě lze s velkou mírou jistoty konstatovat, že v 11 vzorcích se jedná o variantu delta (B.1.617.2 – viz tabulka 1) a v 10 vzorcích o variantu alfa (B.1.1.7). Evoluce viru daná současnými podmínkami a celosvětové sekvenační úsilí vede často k aktualizaci taxonomie viru a tedy změnám v označení, proto lze přesnou variantu určit až celogenomovou sekvenací.

Diskriminační PCRd - doporučení – nabídka pro laboratoře:

NRL standardně detekují dvěma diskriminačními PCR tyto mutace v S genu:

K417N, L452R, E484K, E484Q, N501Y a P681R

Zvažujeme v rámci standardního vyšetření doplnit o del 69-70, T478K, H655Y, S477N, Q677H, případně P681H a N501T, tedy mutace v NTD, RBD. Či štěpném místě pro proteázy furinového typu.

V některých případech lze vyslovit jednoznačné podezření na detekci varianty, v některých případech může být počet variant omezen tak, jak je znázorněno v tabulce 1 a.

PHE UK ve své zprávě z 11.6. uvádí zjednodušenou kombinaci mutací (tabulka 1b):

Ad sekvenace:

Jen pro úplnost připomínáme podmínky pro zasílání (příloha 1) a ještě jednou zdůrazňuji, že zcela nutné je číslo žádanky. K tomuto číslu se párují výsledky diskriminačních PCR a sekvenací. Dalším důležitým údajem nutným pro sekvenaci je hodnota Ct. Prosím p důsledné uvádění této hodnoty. **Upozorňuji, že vzorky s Ct nad 31 nelze sekvenovat.**

Ad diskriminační PCR:

Prosím, aby laboratoře, které používají uzavřený detekční systém a nemohou tedy provádět tyto diskriminační PCR oznámily, nebo laboratoře, kterým provozní podmínky brání tyto PCR provádět, napsaly krátké oznámení na adresu: alena.janypkova@szu.cz

RNDr. Helena Jiřincová,

NRL pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění

Tab. 1a: Kombinace mutací detekovaných běžně v NRL a vyslovení podezření na detekci varianty (červeně pozitivní detekce, černě neprokázána přítomnost mutace):

Detekovaná mutace varianty (červeně pozitivní detekce, černě neprokázána přítomnost mutace)	Suspektní varianta* červeně – VOC (alertní varianta) černě bold VOI (varianta zájmu) černě VUM (sledovaná varianta)
N501Y , K417N, L452R, E484K, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7)
N501Y , E484K , K417N, L452R, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7) + E484K Suspektní gama P.1 Suspektní theta P.3 Suspektní B.1.621
N501Y , E484K , K417N , L452R, E484Q, P681R	Suspektní beta (B.1.351)
N501Y , L452R , K417N, E484K, E484Q, P681R	Suspektní alfa (B. 1.1.7) + L452R Suspektní A.27
E484K , K417N, L452R, E484Q, N501Y, P681R	Suspektní zeta P2, Suspektní iota B.1.526 Suspektní B.1.525, Suspektní B.1.620, Suspektní A.28, Suspektní AT.1, Suspektní B.1.1.318, Suspektní AV.1
L452R , K417N, E484K, E484Q, N501Y P681R	C.16, C.36 + L452R, C.36.3 C.37, B.1.526.1
L452R , P681R , K417N, E484K, E484Q, N501Y P681R (extramurálně del69-70, N417T)	Suspektní delta B.617.2
L452R , E484Q , P681R , K417N, E484K, N501Y P681R	Suspektní kapa B.1.617.1 Suspektní B.1.617.3 Suspektní B.1.617

Pozn. Není-li uvedeno řecké písmeno, nebylo ještě přiřazeno WHO

* VOC – variant of concern, VOI – variant of interest, VUM – variant under monitoring (dle ECDC)

Tab. 1a: Kombinace mutací doporučená PHE

(https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/993879/Variants_of_Concern_VOC_Technical_Briefing_15.pdf)

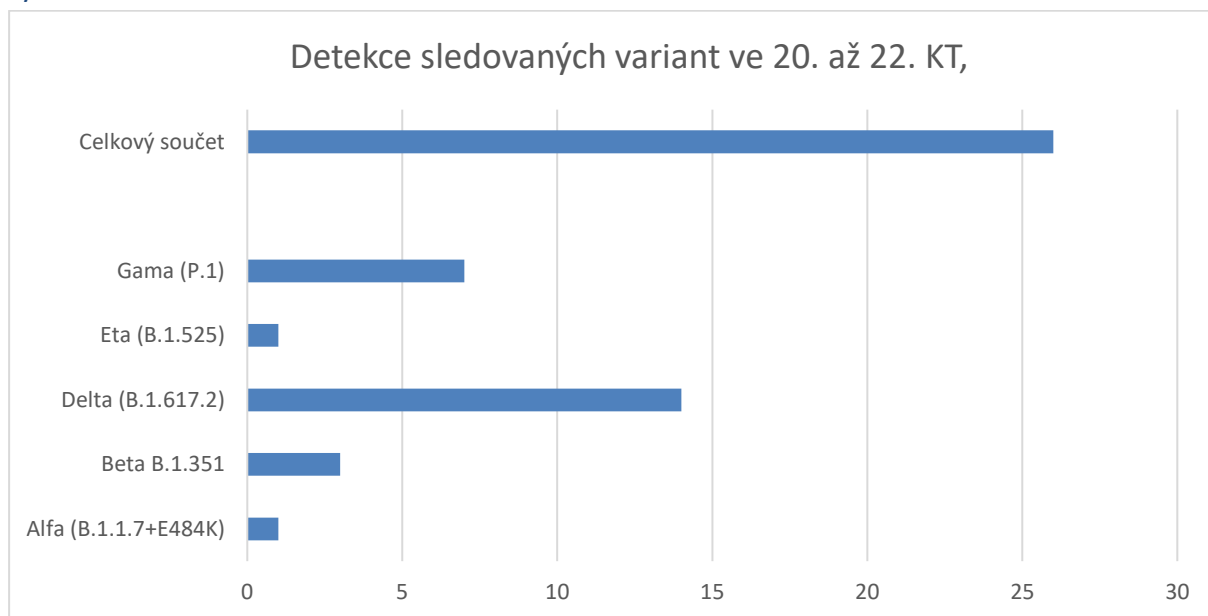
Table 3. Rules-based decision algorithm (RBDA) to identify variant and mutation (VAM) profiles from genotype assay mutation profiles. N501Y target was replaced by P681R in May 2021. Mutations are categorised black (must be present), orange (must not be confirmed absent), blue (may be present or absent), green (must not be confirmed present)

Variant	Public Health Management Level	Assay mutation profile				
		P681R	N501Y	E484K	K417N	K417T
Delta*#	3	Black	Green	Green	Blue	Green
Beta	3	Green	Orange	Orange	Black	Green
Gamma	2	Green	Orange	Orange	Green	Black
Undetermined with E484K	2	Blue	Blue	Black	Blue	Blue
Undetermined	1	All other results				

*Genotyping assay for B.1.617 cannot distinguish between Kappa, Delta and B.1.617.3 and all results are treated as probable Delta given the current dominance of this lineage.

#Delta with K417N will now also be reported. The clade currently present in the UK is AY.1.

Graf 1: Přehled detekovaných variant celogenomovou sekvenací ve 20. až 22. kalendářním týdnu



Tabulka 2: Přehled detekovaných variant v rámci cílené surveillance ve 20. až 22. kalendářním týdnu

VOC*/VOI*	Počet
Variant of concern	
Variant of interest	
Alfa (B.1.1.7+E484K)	1
Beta B.1.351	3
Delta (B.1.617.2)	14
Eta (B.1.525)	1
Gama (P.1)	7

Tabulka 3: Přehled detekovaných variant v rámci cílené surveillance v jednotlivých krajích ve 20. až 22. kalendářním týdnu

Kraj	Počet detekcí	Detekované VOC/VOI
cizinec bez adresy	2	Delta (B.1.617.2)
Liberecký kraj	9	Delta (B.1.617.2)
Moravskoslezský kraj	3	Beta B.1.351 + Eta (B.1.525)
Pardubický kraj	6	Gama (P.1)
Praha	3	Beta B.1.351 + Gama (P.1) + Delta (B.1.617.2) +
Ústecký kraj	1	Delta (B.1.617.2)
Vysočina	1	Delta (B.1.617.2)
Zlínský kraj	1	Alfa (B.1.1.7+E484K)

Tabulka 4: Přehled všech detekcí dle data odběru a kraje ve 20. až 22. kalendářním týdnu

Dat. Odběru	KT	Kraj	VOC*/VOI*
			Variant of interest
			Variant of concern
12.05.2021	20	Moravskoslezský kraj	Eta (B.1.525)
14.05.2021	20	Pardubický kraj	Gama (P.1)
15.05.2021	20	Pardubický kraj	Gama (P.1)
15.05.2021	20	Pardubický kraj	Gama (P.1)
15.05.2021	20	Pardubický kraj	Gama (P.1)
16.05.2021	21	Praha	Gama (P.1)
17.05.2021	21	Pardubický kraj	Gama (P.1)
17.05.2021	21	Pardubický kraj	Gama (P.1)
17.05.2021	21	Zlínský kraj	Alfa (B.1.1.7+E484K)
17.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
17.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
17.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
18.05.2021	21	Ústecký kraj	Delta (B.1.617.2)
18.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
20.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
20.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
22.05.2021	21	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
24.05.2021	22	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
24.05.2021	22	cizinec bez udání adresy	Delta (B.1.617.2)
24.05.2021	22	cizinec bez udání adresy	Delta (B.1.617.2)
24.05.2021	22	Liberecký kraj	Delta (B.1.617.2)
24.05.2021	22	Praha	Delta (B.1.617.2)
25.05.2021	22	Vysočina	Delta (B.1.617.2)
25.05.2021	22	Praha	Beta B.1.351
25.05.2021	22	Moravskoslezský kraj	Beta B.1.351
25.05.2021	22	Moravskoslezský kraj	Beta B.1.351
NA	20-21	bez rozlišení	(Alfa) B.1.1.7

Příloha 1:

Podmínky pro zasílání vzorků k sekvenaci a případně i k diskriminační PCR:

Vždy v případě:

- Importu/rizikový kontakt či podezření na import
- Selhání vakcinace (14 dnů od první dávky včetně aplikace druhé dávky)
- Reinfekce (více než 90 dnů od předchozí pozitivní PCR)

- Hospitalizace/úmrťí osob mladších 50 let
- Náhlého úmrťí
- Neobvyklých klinických příznaků či neobvyklých PCR

Ct pro sekvenaci: maximálně 30 (v závažných případech až + 2 Ct)

Ct pro diskriminační PCR – maximálně 34 (v závažných případech až + 2 Ct)

Údaje na žádance nebo kopie elektronické žádanky (bez přelepeného čarového kódu) doplněné o ::

- Číslo žádanky – **nepřelepujte ani číslo ani čarový kód elektronické žádanky**
- Datum odběru
- Identifikační údaje (jméno, příjmení, rodné číslo, PSČ)
- Důvod vyšetření (import/rizikový kontakt), selhání vakcinace, reinfekce, hospitalizace, úmrťí, divná PCR)
- Hodnoty Ct v zasílající laboratoři

V případě selhání vakcinace je nutno uvést tyto údaje: (nebo je nutno zajistit jejich stažení z ISIN)

- Název a šarže vakcíny
- Datum první, případně druhé dávky

Podmínky uchovávání a transportu vzorku:

- Primární materiál, do 5 dnů od data odběru při chladničkové teplotě (+2 až + 8 °C)
- Izolované RNA, do dvou dnů od izolace při chladničkové teplotě (+2 až + 8 °C)
- V případě zamražení na – 20 °C přijímáme primární materiály a izolované RNA do 1 měsíce od odběru či izolace.
- V případě zamražení na – 60 °C a méně, přijímáme primární materiály a izolované RNA kdykoli.

Laboratoře mohou zasílat vzorky dle svého výběru či na základě vyžádání epidemiologa. V případě zasílání hromadných zásilek prosíme materiály a žádanky srovnat, např. do stojánku- Připzasílání je třeba zachovat podmínky pro transport UN3373.