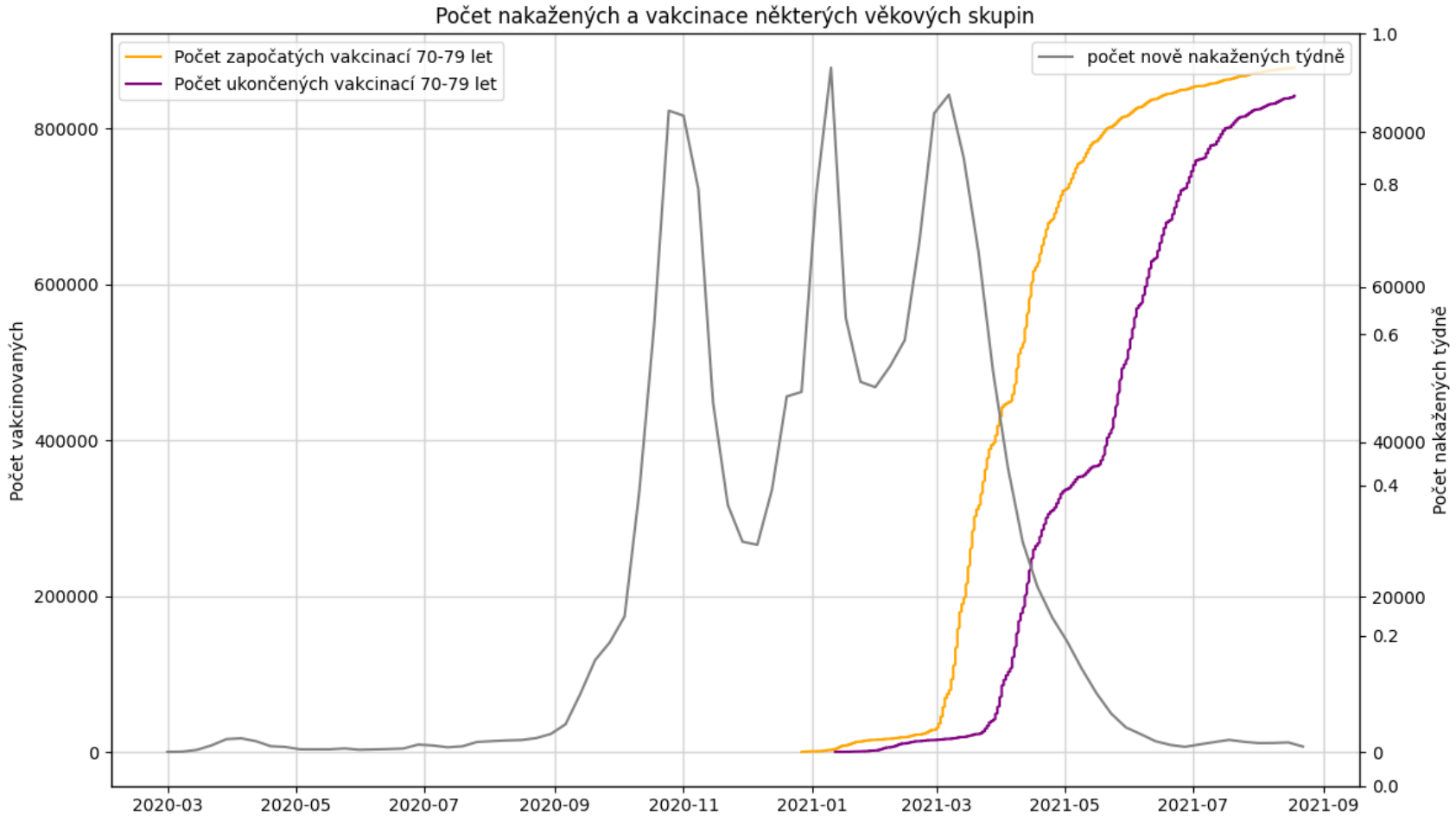
První detekce „Britské varianty“ 20I/501Y.V1

Helena Jiřincová
Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění
SZU
Laboratoř molekulární biologie, SVU Praha
Alexander Nagy

Vakcinace některých věkových skupin a počet nakažených

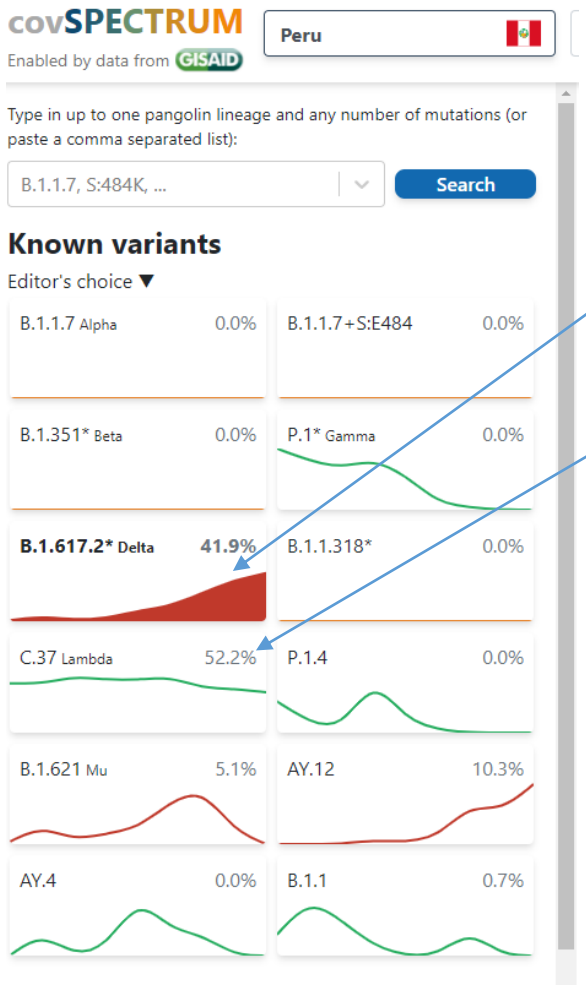


V kontextu změn variant SARS-CoV mezi březnem a červencem, vakcinačním programem je patrná (na příkladu věkové skupiny 70-79 let) *korelace* mezi poklesem počtu nakažených a vakcinací některých rizikových skupin.

Na poklesu počtu nakažených může mít vliv více faktorů (např. klima, opatření, atd.)

Zdroj dat: ÚZIS ČR

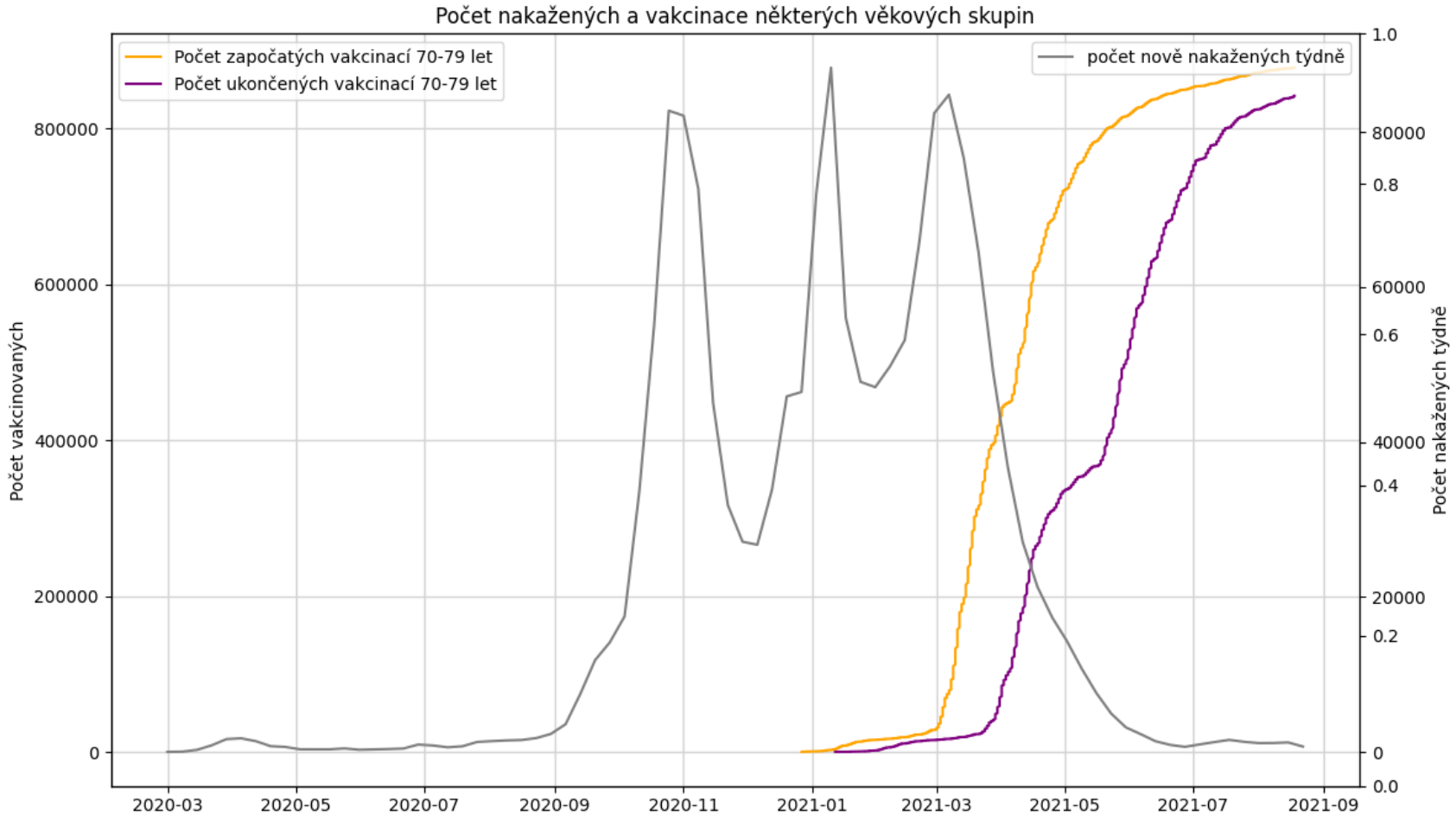
Situace v Peru, lambda vs. delta varianta



Původně v Peru dominantní lambda snižuje svůj podíl na úkor delty. Je tedy pravděpodobné, že varianta delta má oproti lambdě evoluční výhodu ve vyšší míře transmisibility..

Zdroj: https://cov-spectrum.ethz.ch/

Vakcinace některých věkových skupin a počet nakažených

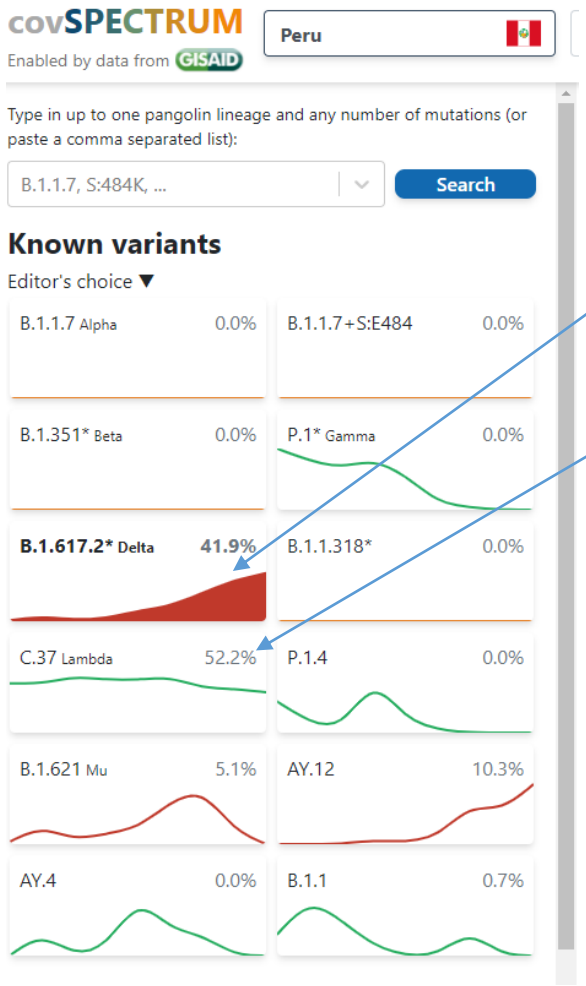


V kontextu změn variant SARS-CoV mezi březnem a červencem, vakcinačním programem je patrná (na příkladu věkové skupiny 70-79 let) *korelace* mezi poklesem počtu nakažených a vakcinací některých rizikových skupin.

Na poklesu počtu nakažených může mít vliv více faktorů (např. klima, opatření, atd.)

Zdroj dat: ÚZIS ČR

Situace v Peru, lambda vs. delta varianta



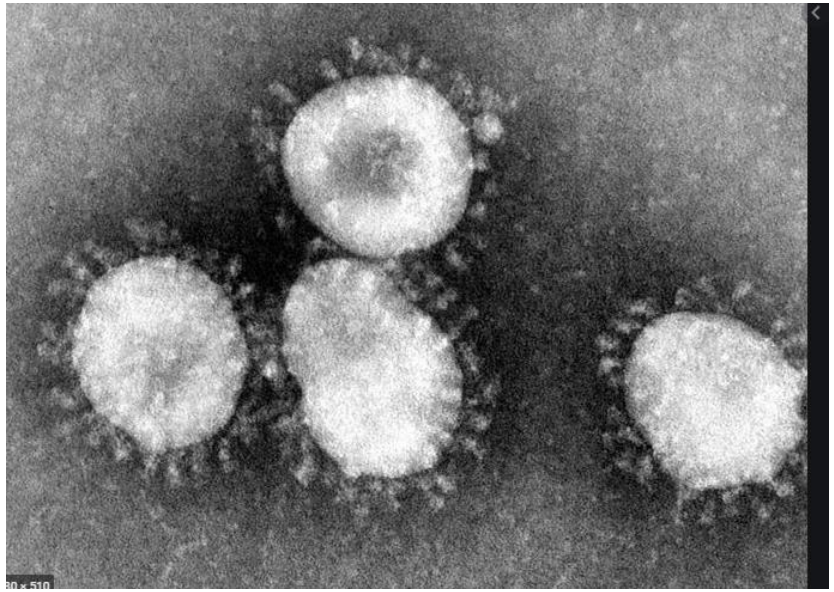
Původně v Peru dominantní lambda snižuje svůj podíl na úkor delty. Je tedy pravděpodobné, že varianta delta má oproti lambdě evoluční výhodu ve vyšší míře transmisibility..

Zdroj: https://cov-spectrum.ethz.ch/

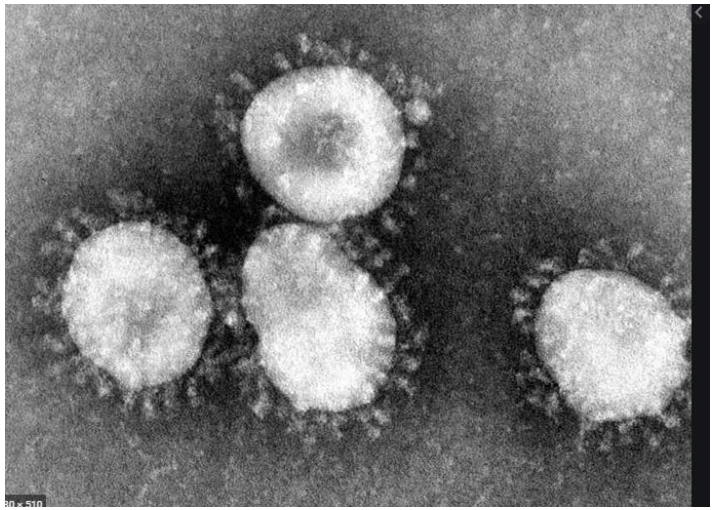
SARS-CoV-2 - diagnostika

Helena Jiřincová

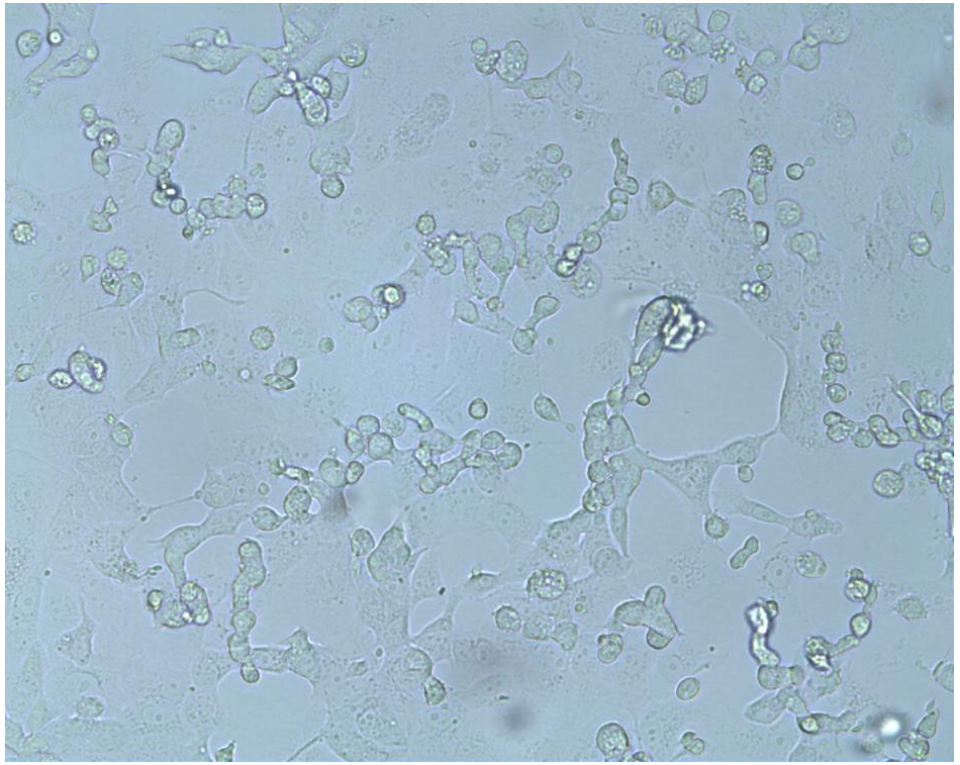
Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění

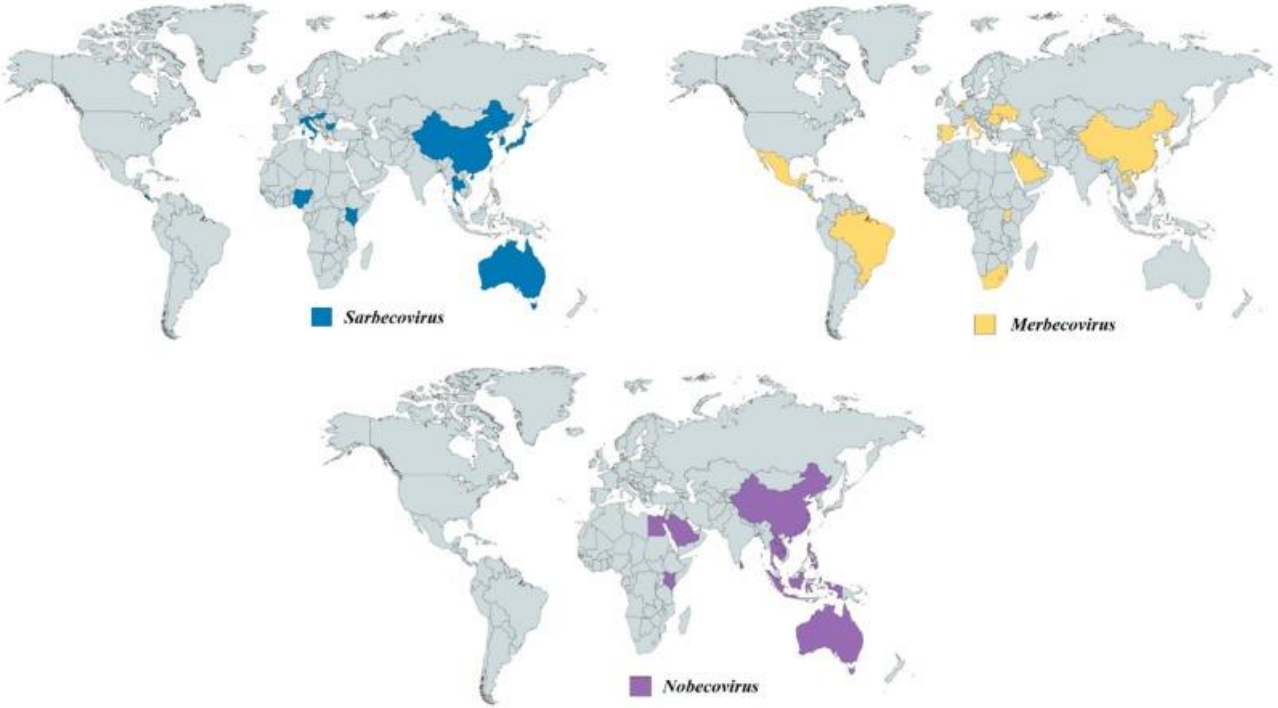


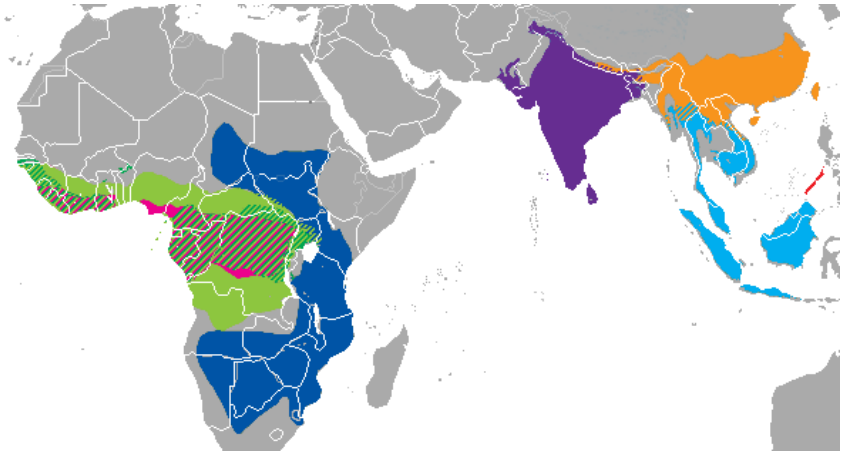
SARS-CoV-2



Helena Jiřincová, SZÚ





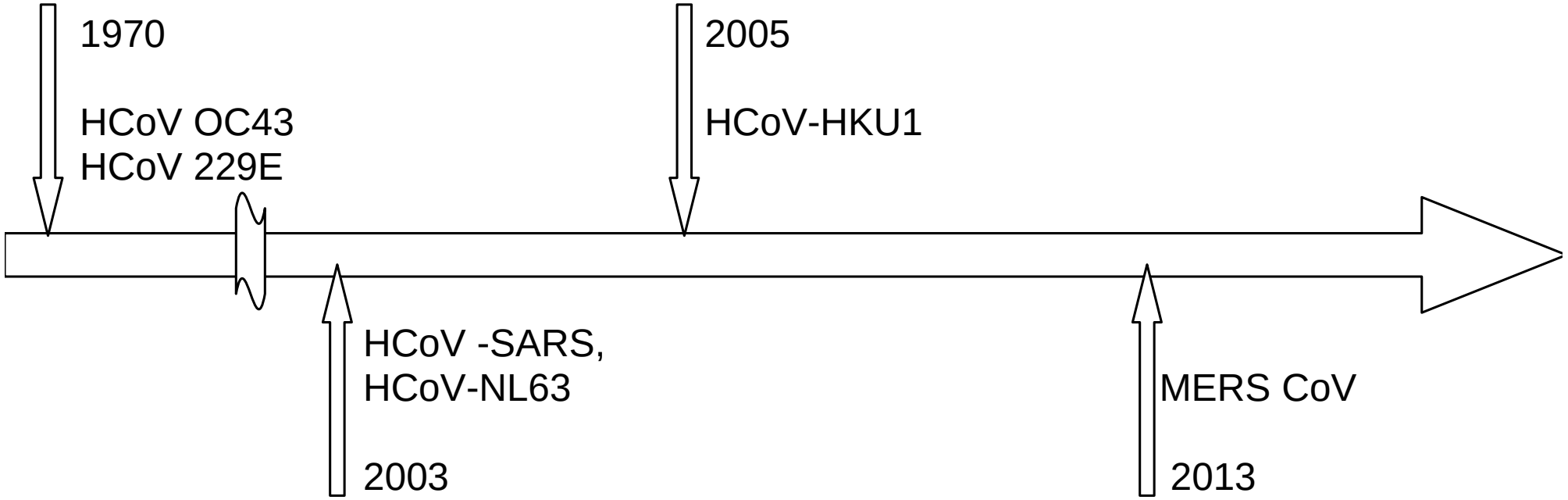


Beta CoV - rozšíření

Human CoV

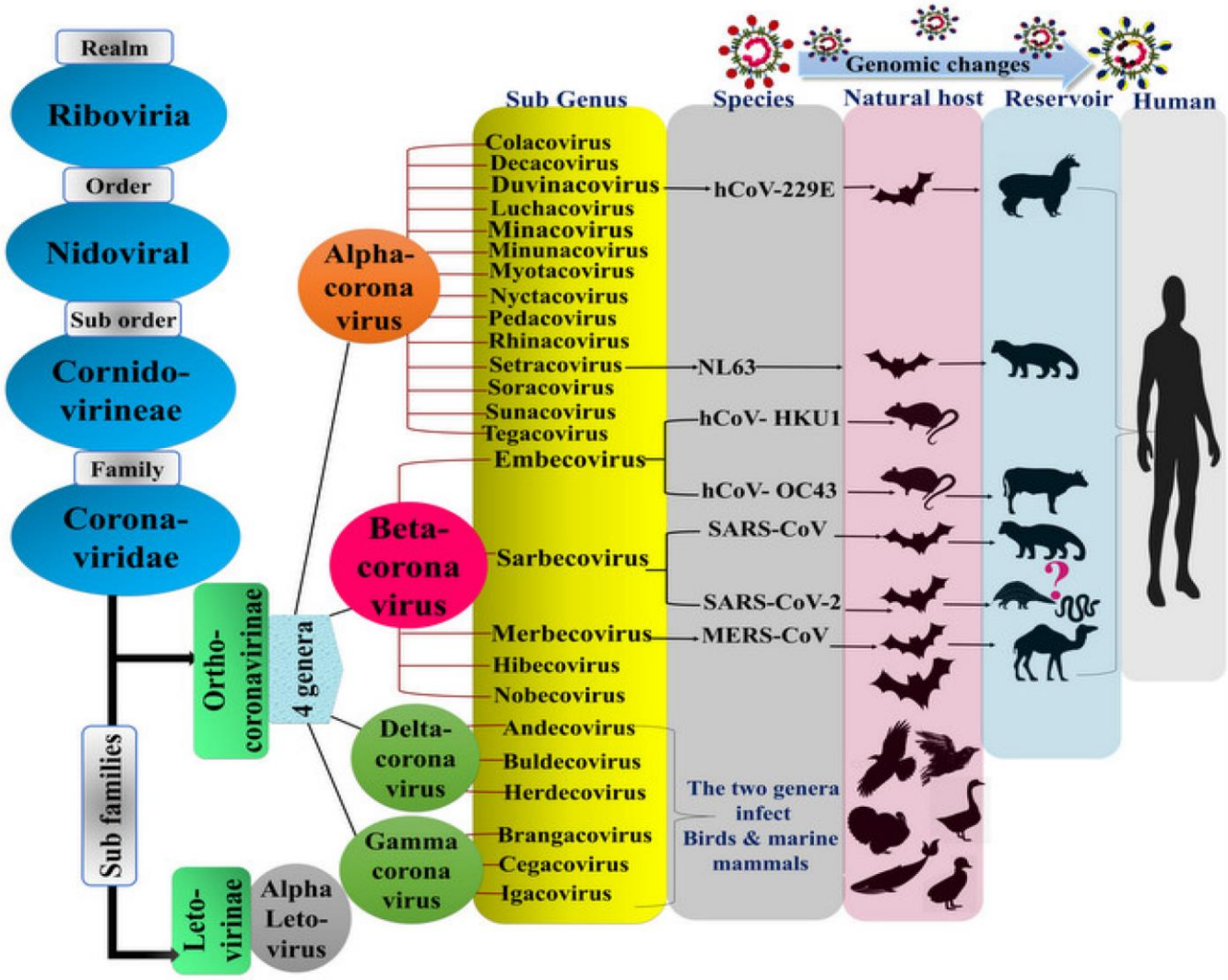
Zastoupení CoV 5 -18% v sezónách2013 – 2019, celosvětově až 30 % ARI.

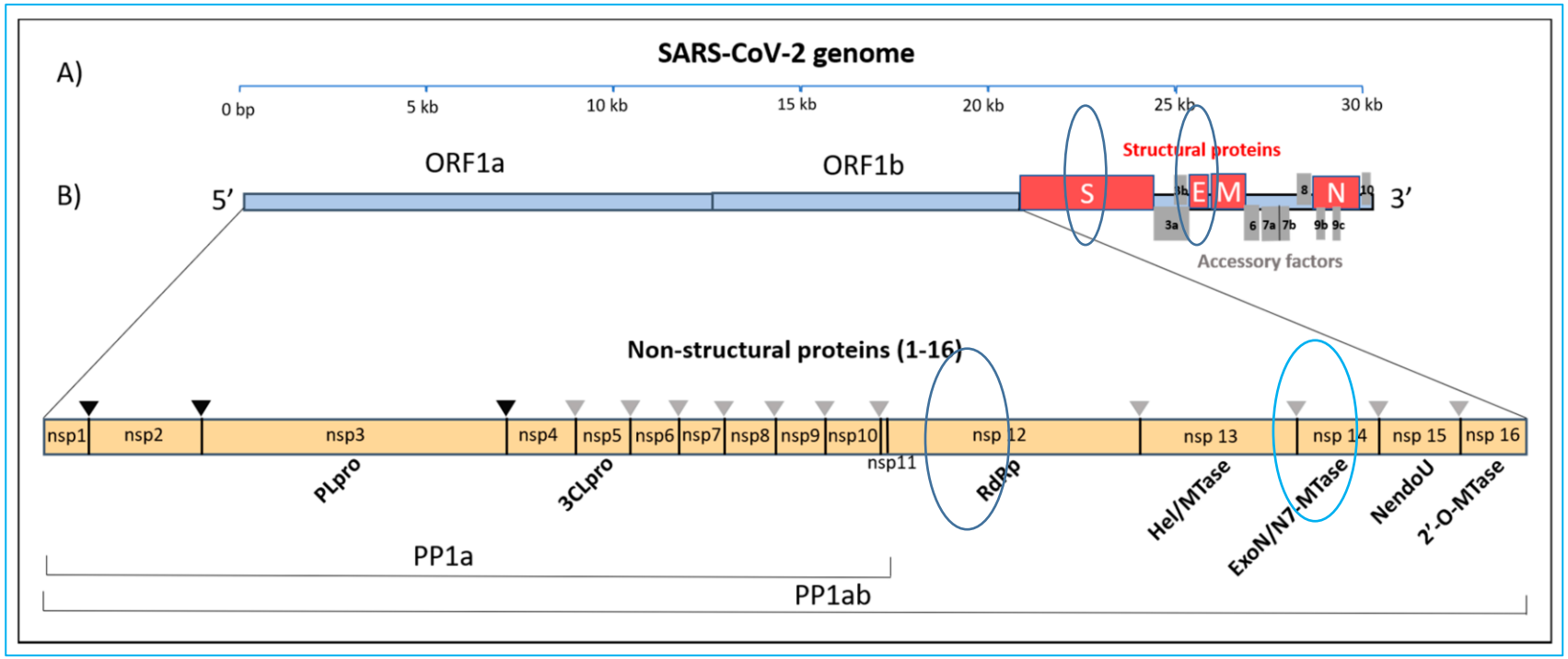
V lidské populaci je doposud známo 6 koronavirů, z nichž 4 byly objeveny v posledních 10 letech.



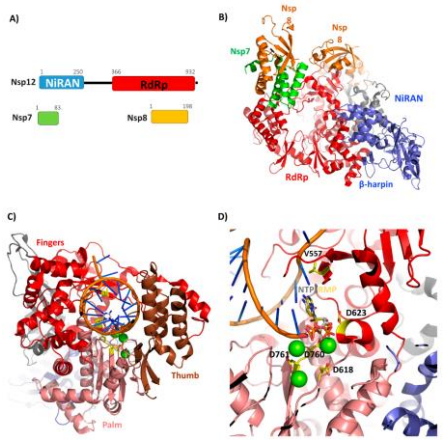
Obr 2 Schematický časový diagram (18)

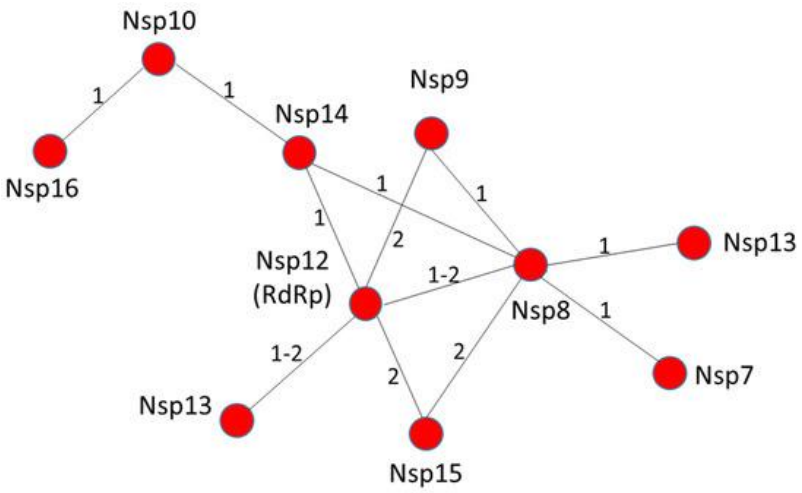
TAXONOMIE


Realm
Riboviria
Order
Nidoviral
Sub order
Cornido-virineae
Family
Corona-viridae
Sub families
Ortho-coronavirinae
Leto-virinae
Alpha Leto-virus
4 genera
Alpha-corona virus
Beta-corona virus
Delta-corona virus
Gamma corona virus
Sub Genus
Colacovirus
Decacovirus
Duvinacovirus
Luchacovirus
Minacovirus
Minunacovirus
Myotacovirus
Nyctacovirus
Pedacovirus
Rhinacovirus
Setracovirus
Soracovirus
Sunacovirus
Tegacovirus
Embecovirus
Sarbecovirus
Merbecovirus
Hibecovirus
Nobecovirus
Andecovirus
Buldecovirus
Herdecovirus
Brangacovirus
Cegacovirus
Igacovirus
Species
hCoV-229E
NL63
hCoV- HKU1
hCoV- OC43
SARS-CoV
SARS-CoV-2
MERS-CoV
The two genera infect Birds & marine mammals
Genomic changes
Natural host
Reservoir
Human

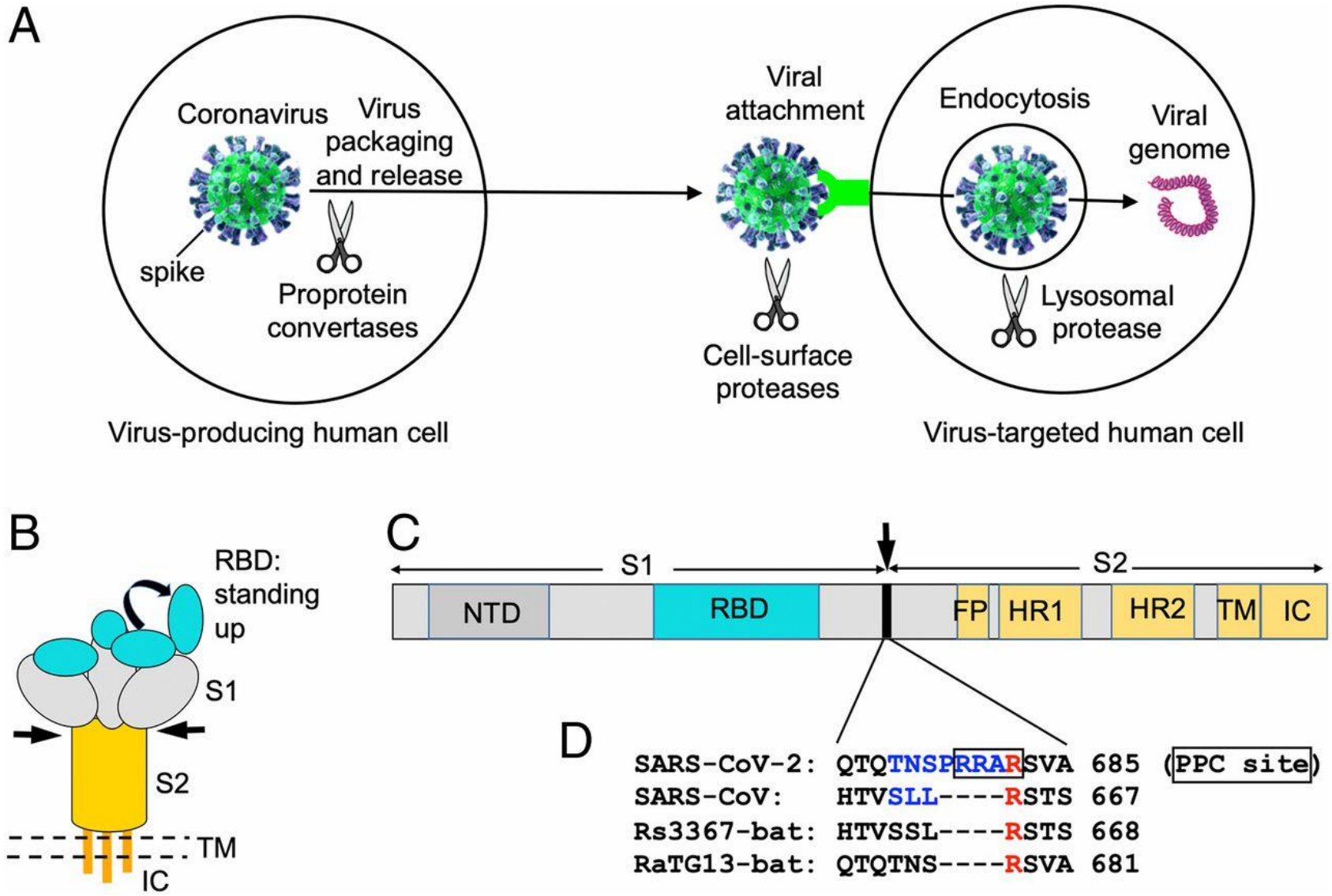


NSP 14 – proofreading exonuclease



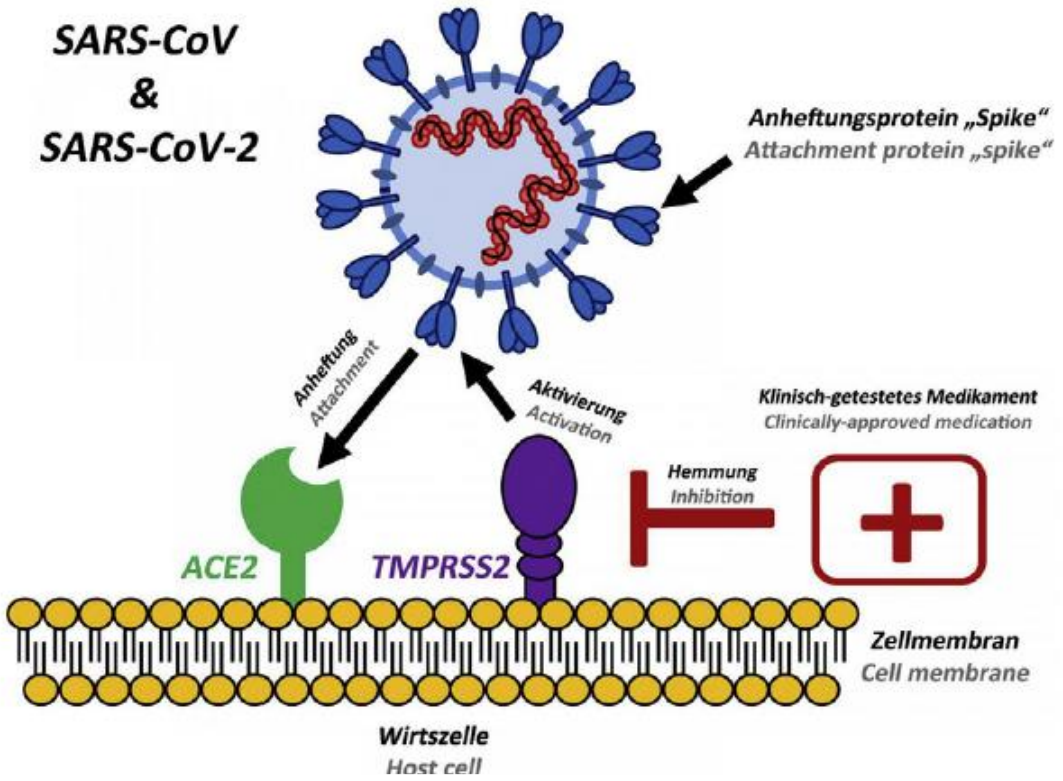


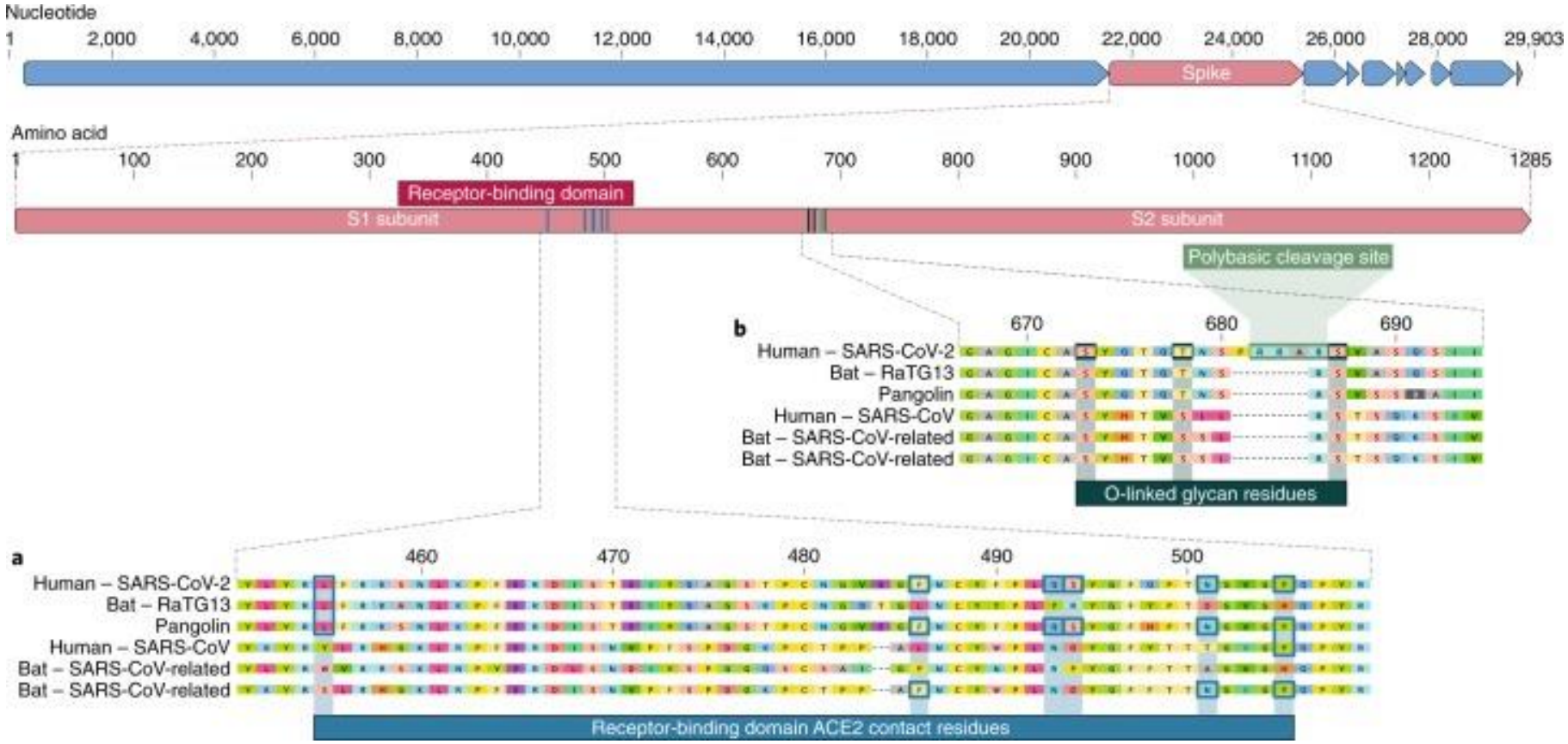
Cells **2020**, *9*(5), 1267; https://doi.org/10.3390/cells9051267

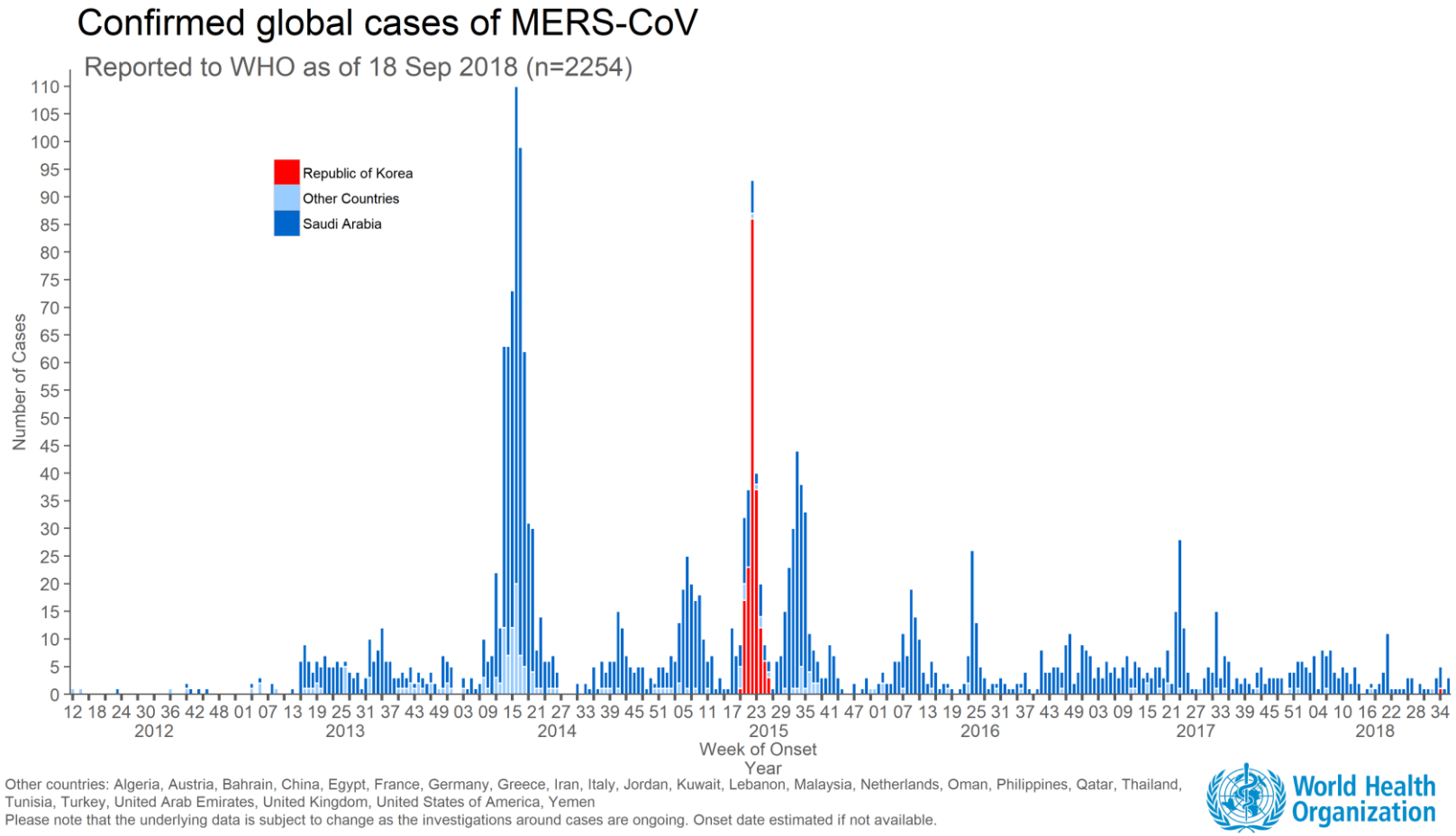

A
Coronavirus
Virus packaging and release
spike
Proprotein convertases
Virus-producing human cell
Viral attachment
Cell-surface proteases
Endocytosis
Viral genome
Lysosomal protease
Virus-targeted human cell
B
RBD: standing up
S1
S2
TM
IC
C
S1
S2
NTD
RBD
FP
HR1
HR2
TM
IC
D
SARS-CoV-2: QTQTNSPRRARSVA 685 (PPC site)
SARS-CoV: HTVSLL----RSTS 667
Rs3367-bat: HTVSSL----RSTS 668
RaTG13-bat: QTQTNS----RSVA 681

Vstup do buňky

vazba na ACE2 – štěpení „RBD“ transmembránovou proteázou




Nucleotide
1
2,000
4,000
6,000
8,000
10,000
12,000
14,000
16,000
18,000
20,000
22,000
24,000
26,000
28,000
29,903
Spike
Amino acid
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1285
Receptor-binding domain
S1 subunit
S2 subunit
Polybasic cleavage site
b
670
680
690
Human – SARS-CoV-2
Bat – RaTG13
Pangolin
Human – SARS-CoV
Bat – SARS-CoV-related
Bat – SARS-CoV-related
O-linked glycan residues
a
460
470
480
490
500
Human – SARS-CoV-2
Bat – RaTG13
Pangolin
Human – SARS-CoV
Bat – SARS-CoV-related
Bat – SARS-CoV-related
Receptor-binding domain ACE2 contact residues



2347 cases / 823 deaths /27 countries from 2012

Klinická manifestace onemocnění

- **celková nevolnost** (nauzea)
- **svalová bolest** (myalgie)
- **horečka**
- **bolest hlavy** (cefalea)
- **snížená chuť k jídlu**
- **kašel (tussis)**
- **rýma** (rhinitis)
- **zánět spojivek** (conjunctivitis)

- **zánět hltanu (pharyngitis)**
- **zánět hrtanu (laryngitis)**
- **zánět průdušnice (tracheitis)**
- **zánět drobných průdušek (bronchiolitis)**
- **zánět plic (pneumonie)**
- **zánět středního ucha (otitis media)**

a další

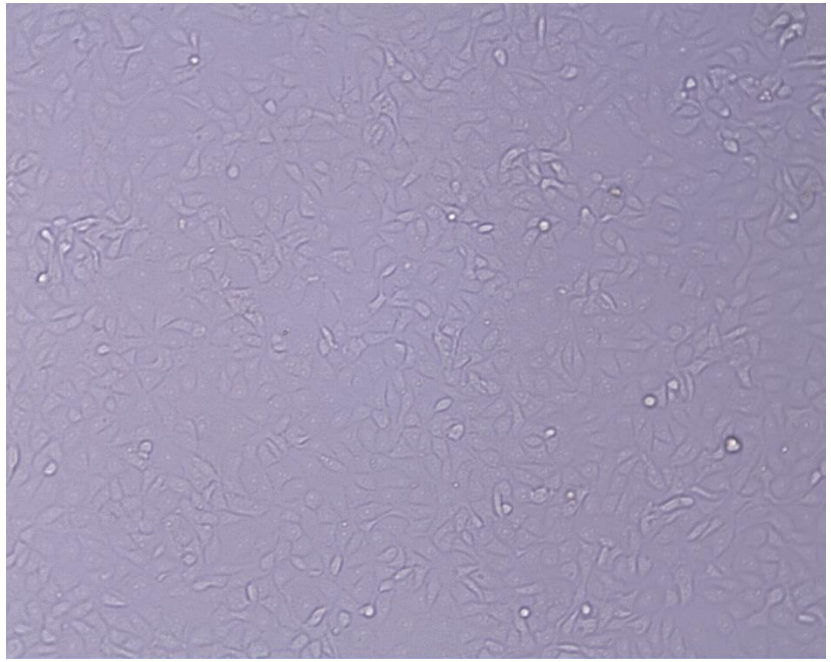
Klinické projevy se týkají často více než jednoho anatomického místa a vyskytují se společně, nemusí být respirační.
Encefalitis, Diarrhea, Myokarditis, Rhabdomyolysis

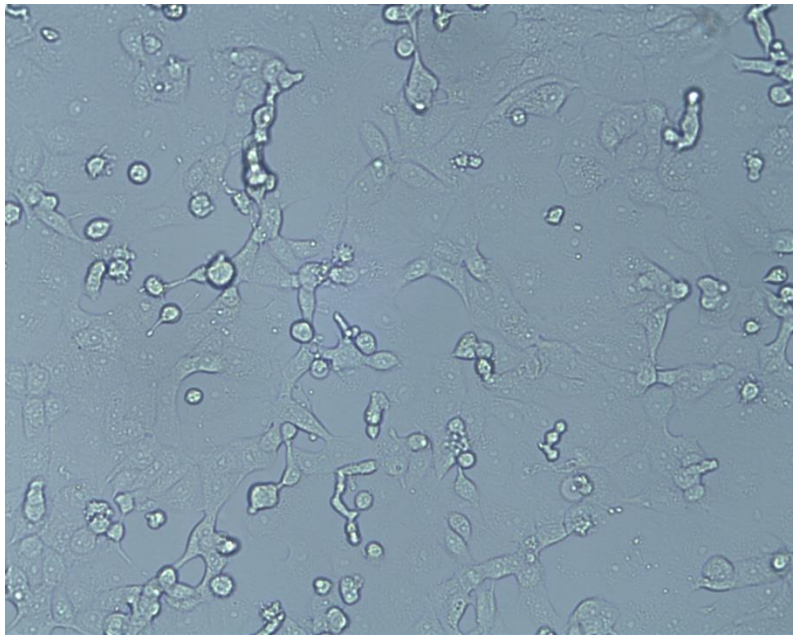
Ztráta čichu a chuti

Nerespirační klinické manifestace hCoV

- Gastroenteritidy
- HCoV-OC43 chronic demyelinating disease and acute encephalomyelitis (Morfopoulou et al., 2016; Murray et al., 1992;Yeh et al., 2004).

Izolace Vero E6 24 a 48 hod





Státní zdravotní ústav

Diagnostika

- Amplifikace RNA (DNA)
- Detekce antigenu/viru imunometody, izolace, biosenzory
- HCD – DCD - sliny

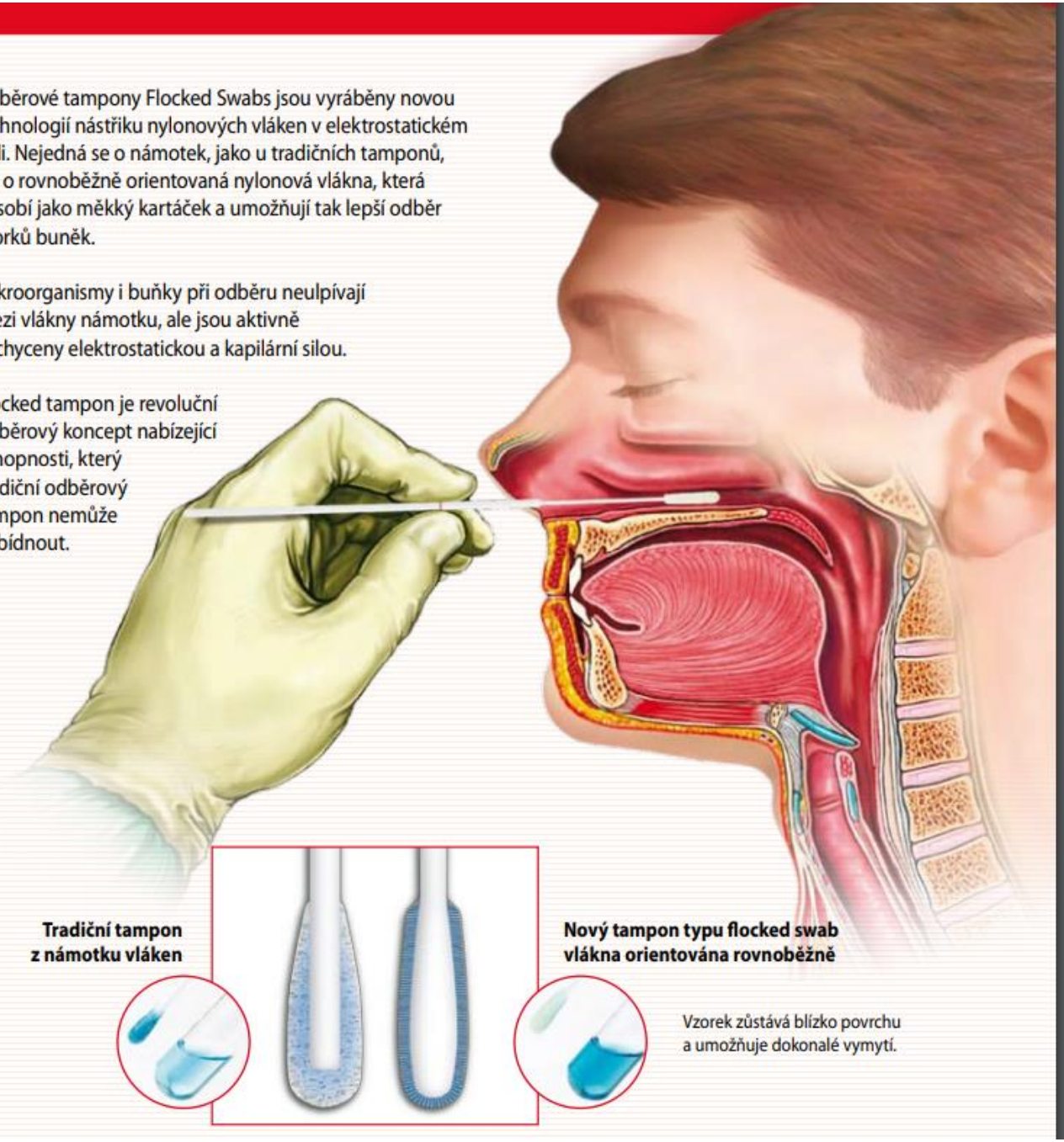
- Detekce protilátek – není diagnostická metoda
  - IgM – IgA – IgG
  - Krev – sliny . Liquor (intratekální)
  - Virus neutralizační – celkové
  - Který antigen – S/N? .- nebo epitop?

  - Sdílené epitopy s hCoVs!!!

Odběrové tampony Flocked Swabs jsou vyráběny novou technologií nástřiku nylonových vláken v elektrostatickém poli. Nejedná se o námotek, jako u tradičních tamponů, ale o rovnoběžně orientovaná nylonová vlákna, která působí jako měkký kartáček a umožňují tak lepší odběr vzorků buněk.

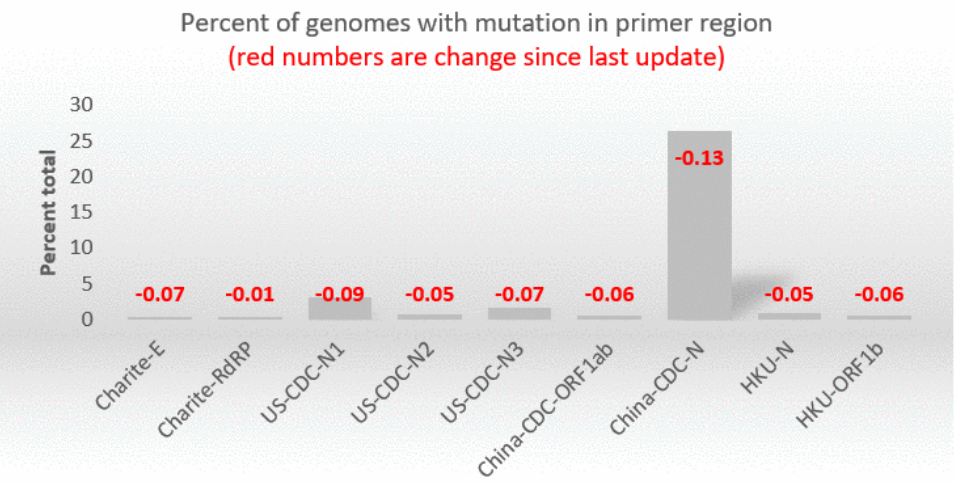
Mikroorganismy i buňky při odběru neulpívají mezi vlákny námotku, ale jsou aktivně zachyceny elektrostatickou a kapilární silou.

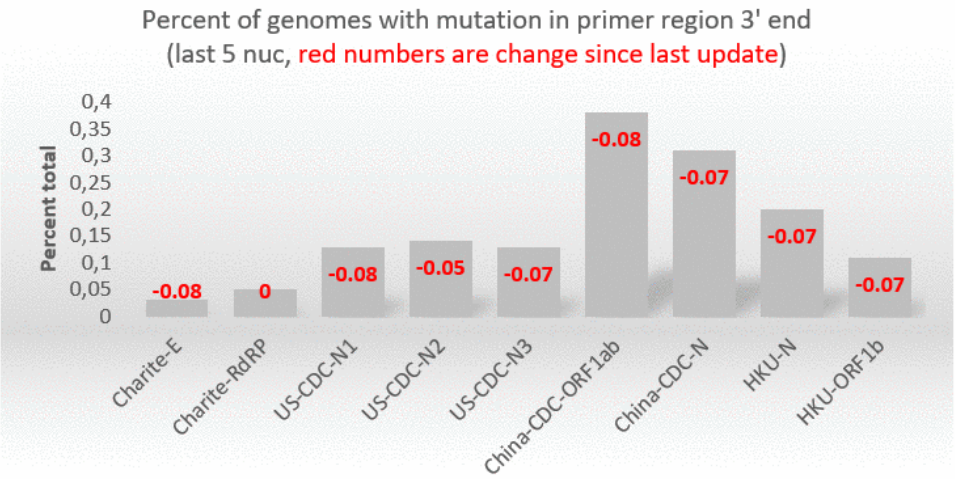
Flocked tampon je revoluční odběrový koncept nabízející schopnosti, který tradiční odběrový tampon nemůže nabídnout.



Vzorek zůstává blízko povrchu a umožňuje dokonalé vymytí.

Common primer check for high quality genomes 2020-06-27





To reduce noise of random mutations ~34,600 available high quality genomes (out of ~49,800) are considered here

This is a simplified summary view of the percent of high quality genomes (defined as <1% Ns and <0.05% unique non-synonymous mutations) with one or more mutations in either forward, probe or reverse primer region. This does not necessarily indicate a primer would not function but serves as a guide to variability of the targeted region. The second Figure shows the same but with mutations in 3' ends for the primer regions (defined as last 5 nucleotides of the primer sequence) which can affect sensitivity partially.

Sources of primer sequences (may have been updated in meantime):
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf
http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcrt-pcr-panel-primer-probes.pdf

by BII/GIS, A*STAR Singapore

Otázky

- Přetrvávající pozitivita Ct
- Seskupení cílů do jednoho kanálu
- Diferenciální qPCR
- Kvantifikace
- Izolace NA
- Poolování

PCR Cycles	Target Copies
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
15	32,768
20	1,048,576
25	33,554,432
30	1,073,741,842

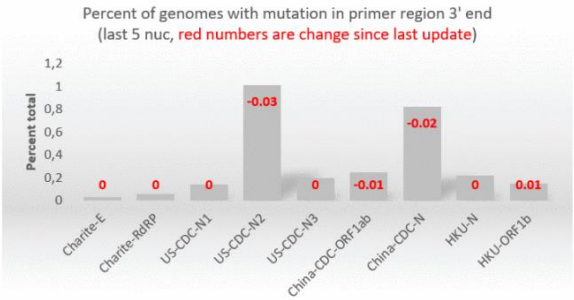
Přetrvávající pozitivita

- CoV v elektronovém mikroskopu
- Ojediněle izolace na VERO

Whole-genome sequencing (WGS)

Mocný nástroj

- Sledování a porozumění dynamice šíření viru v rámci epidemie
  - umožňuje nastavení racionálních opatření
- Monitoring evoluce viru
  - In silico analýza primerů/prob
  - vývoj a aplikace léčiv
  - vývoj vakcín
- Připravenost na budoucnost
  - Aplikace protokolů v případě jiné epidemie
  - Oxford Nanopore technologie – pracovní skupiny:
    - ARTIC protokoly
    - CLIMB bioinformatická podpora

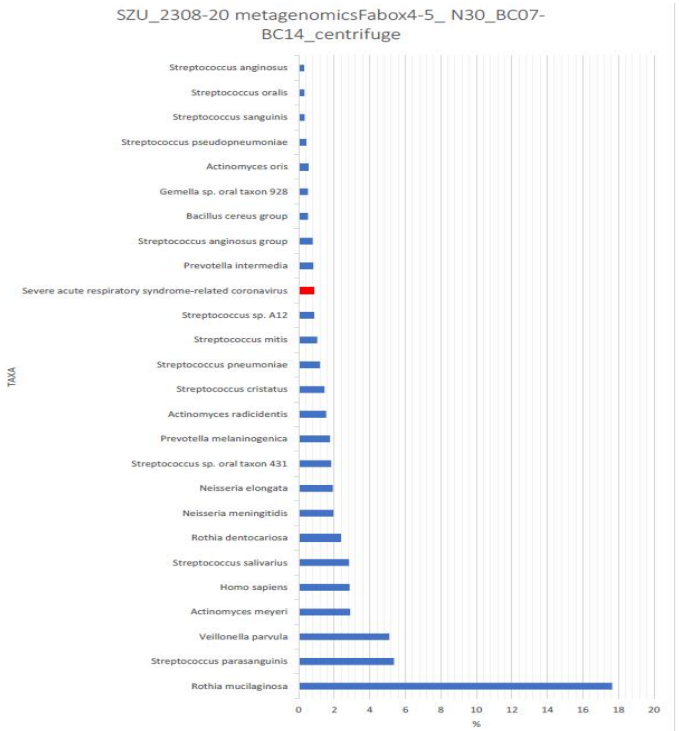


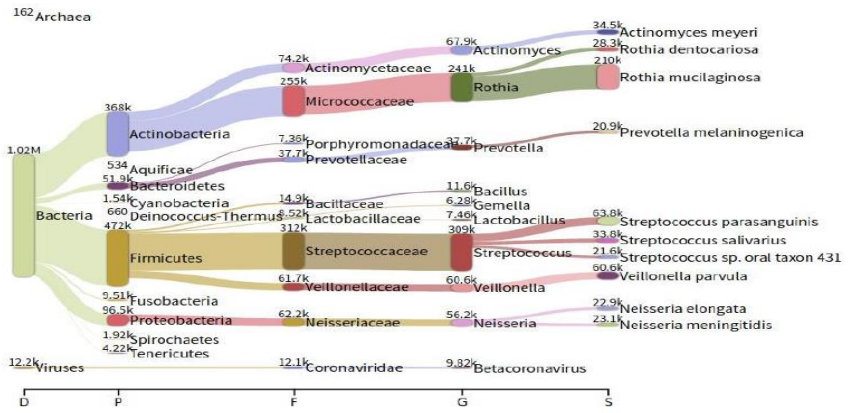
Trasování - pomocný nástroj,
doplnění klasického epidemiologického trasování

WGS užitečnost ověřena - 2014–2016 Ebola outbreak

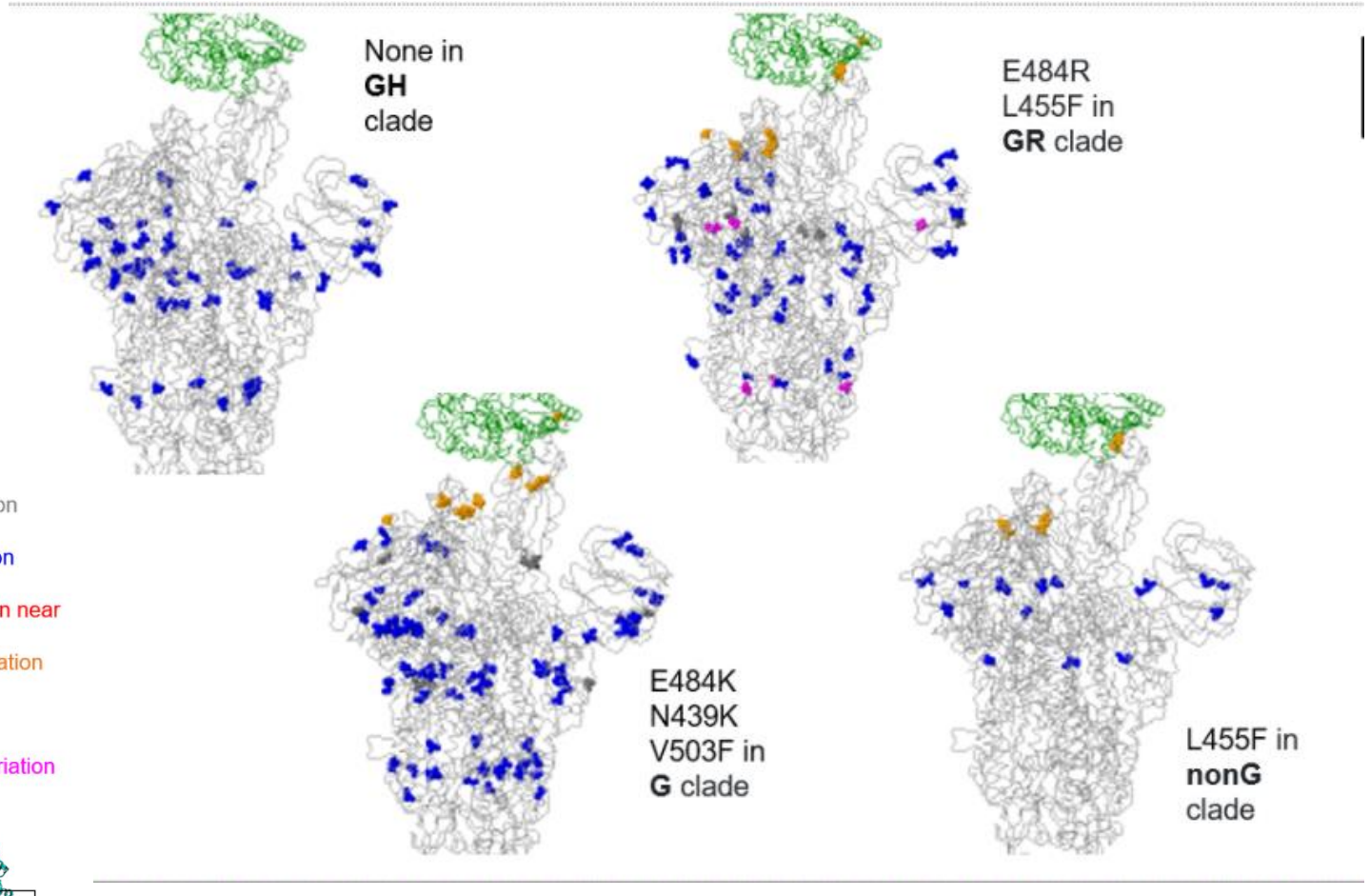
Metodiky

1. Random primers (RNA mikrobiom)
2. ARTIC 400 pb amplikony
3. ARTIC 1200 pb amplikony

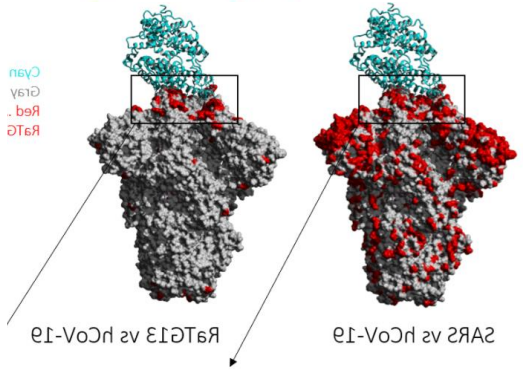




Mutace v SPIKE proteinu u 739 recentních sekvencí

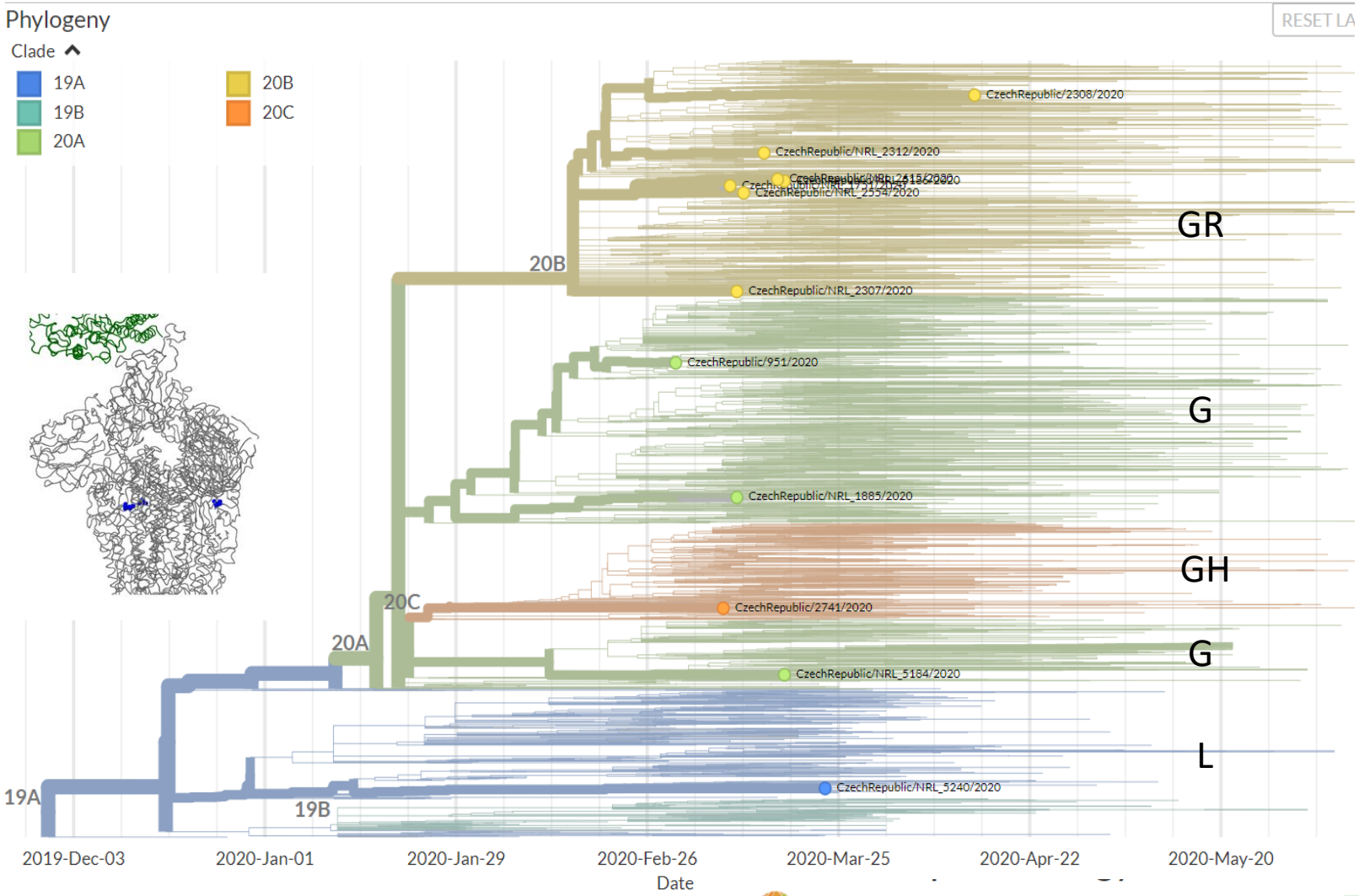


Green … ACE2 human host receptor
Gray … CoV spike glycoprotein trimer
Gray balls … Spike glycoprotein variation occurring once (in EpiCoV)
Blue balls … Spike glycoprotein variation occurring more than once (in EpiCoV)
Red balls … Spike glycoprotein variation near host receptor with effect history
Orange balls … Spike glycoprotein variation near host receptor, or other functional annotation
Cyan … Insertion/deletion
Magenta balls … Spike glycoprotein variation altering potential N-glycosylation sites



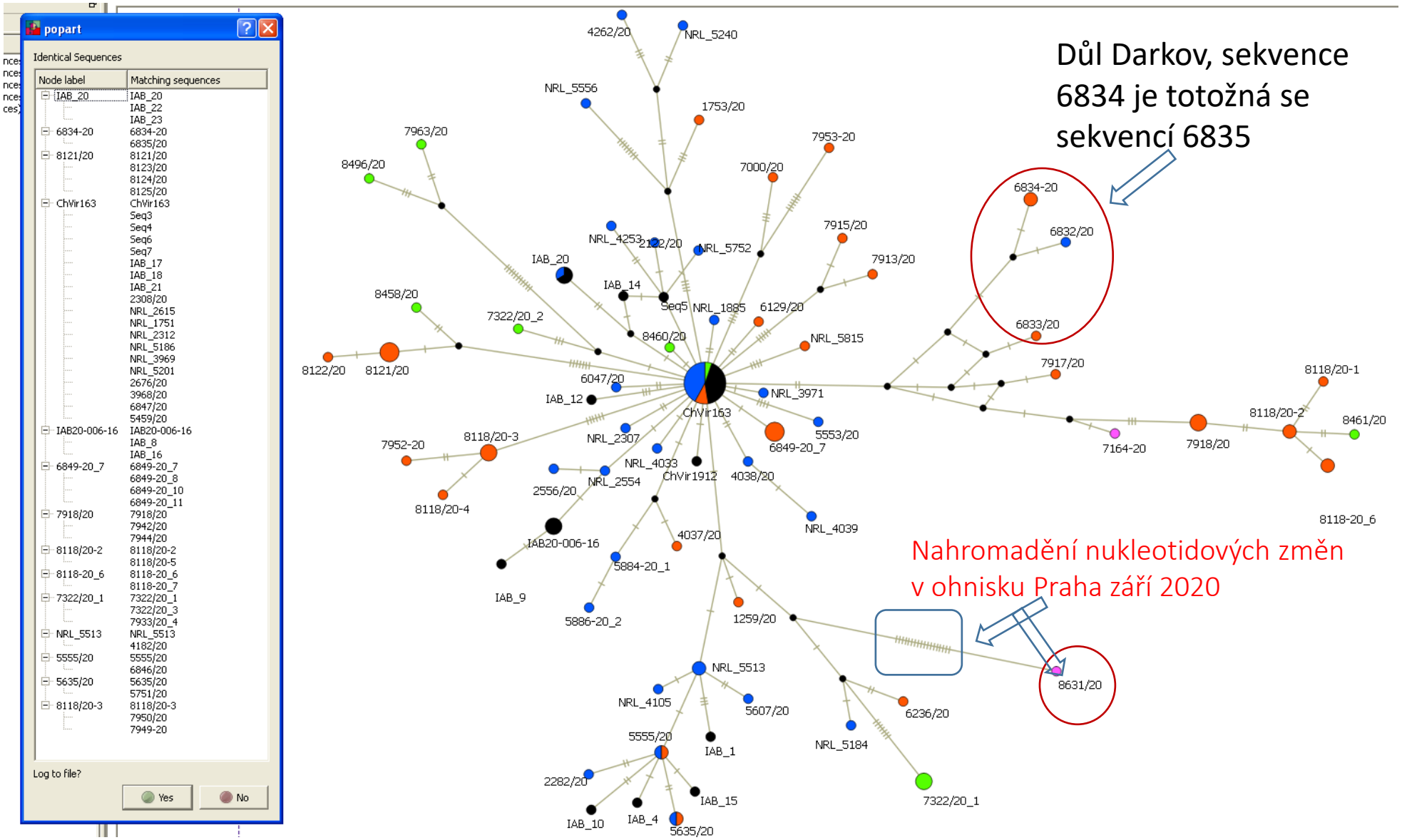
Celosvětové sekvence březen až září 2020
100 000 sekvencí – genomic epidemiology

Showing 12 of 3561 genomes sampled between Mar 2020 and Apr 2020. Filtered to × Alexander Nagy et al (4) × Nagy et al (8).



Maintained by the Nextstrain team. Enabled by data from GISAID

WGS – české kmeny v březen - září



Co potřebujeme vědět

- Je pacient infekční?
- Jakou má pacient prognózu, pro včasnou strategii léčby.

- Varianty – důsledky – reinfekce – vakcinace – léčba – transmisibilita – klinický stav

PCR SARS-CoV-2

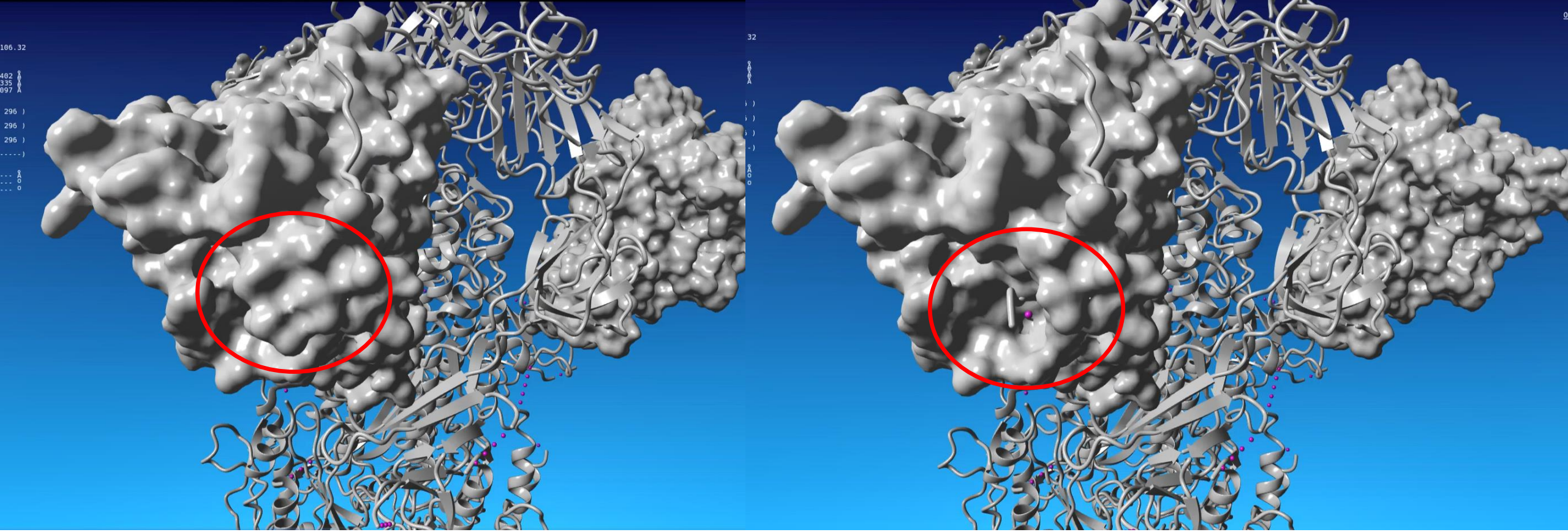
- Konzervativita úseku
- Genomové – subgenomové RNA – virová nálož
- Přetrvávající pozitivita
- Detekce klíčových mutací

Escape – transmisibilní varianty

- Varianty virů s mutacemi, které vedou ke změně konformace – reliéfu povrchových struktur a jsou cílem virus neutralizačních protilátek.

- U viru chřipky zaznamenáno, že stačí záměna jediné AA k vytvoření escape mutace.

- V populaci promořené virem či vakcinované tak, aby se tvořili „virus neutralizační“ protilátky existuje evoluční tlak vedoucí k pozitivní selekci escape variant.



ESCAPE mutanty v ČR?

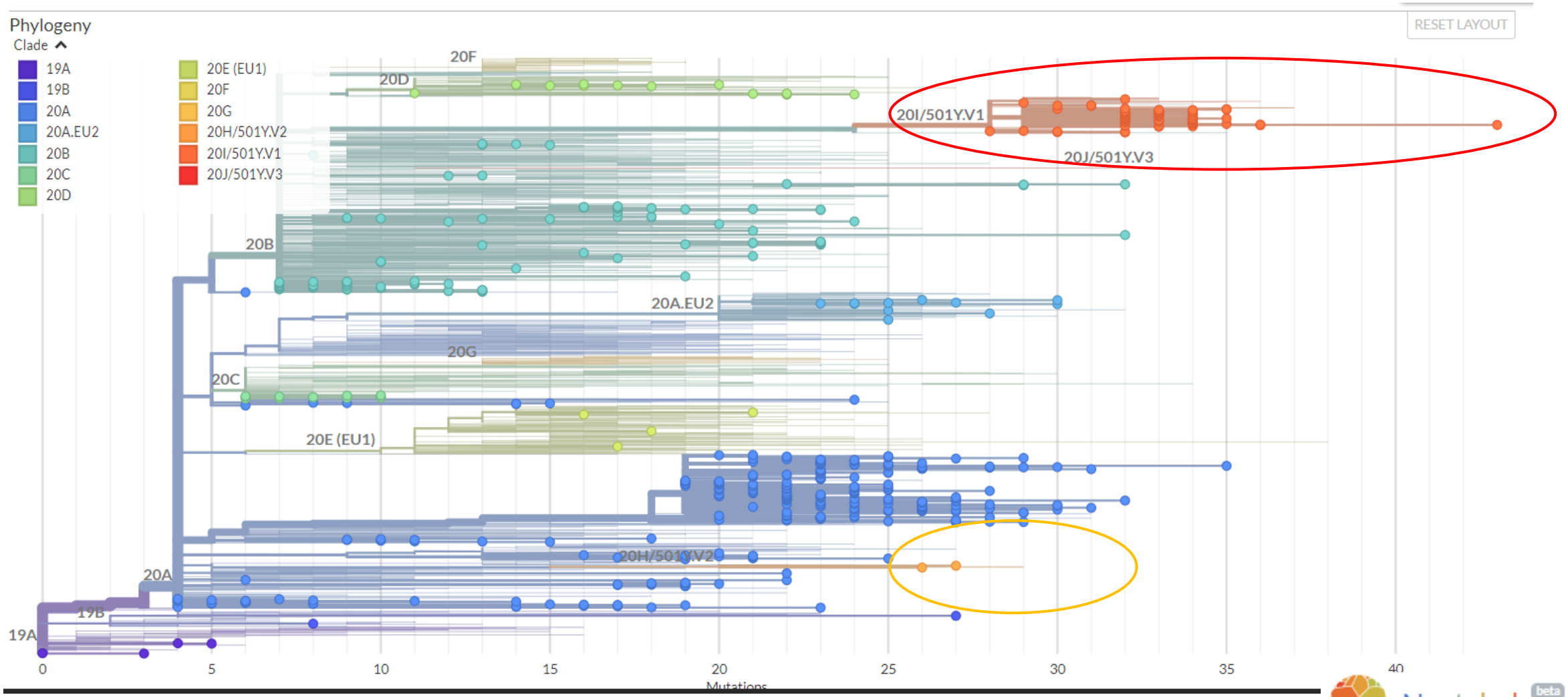
Delece 6 nukleotidů, tedy 2 aminokyselin (69 histidin, 70 valin) v N-terminální doméně spike proteinu - boční pohled

PCR based surveillance

B.1.1.526 (South America) S: A701V, D253G, D614G, **E484K**, L5F and T95I

varianta	Pangolin lineage	417N	417T	L452R	439K	484K	501Y	501T	570D	A701V	V1176F	del 69,70	del 144
		trans	trans	esc	esc/trans	esc	trans	trans		esc	mortalita	esc	esc
Britská	B.1.1.7	-	-	-	-	-/+	+	-	+	-	-	+	+
JAR	B.1.351	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Brazilská	B.1.1.28	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-
Brazilská/Manaus	P.1	-	+	-	-	+	+	-	-		-	-	-
	B.1.525	-	-	-	-	+	-	-	-		-	+	-
Jižní Amerika	B.1.1.526			-		+		-	-	+	-		-
tzv. "česká"	B.1.258	-	-	-	+	-	-	-	-		-	+	-
19B (D614)	A.27	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
19B (D614)	A.28	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Kalifornie	B.429	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Phylogeny treee SARS –CoV-2 Czechia
481 of consensus fasta – NRL and State Veterinary Institute

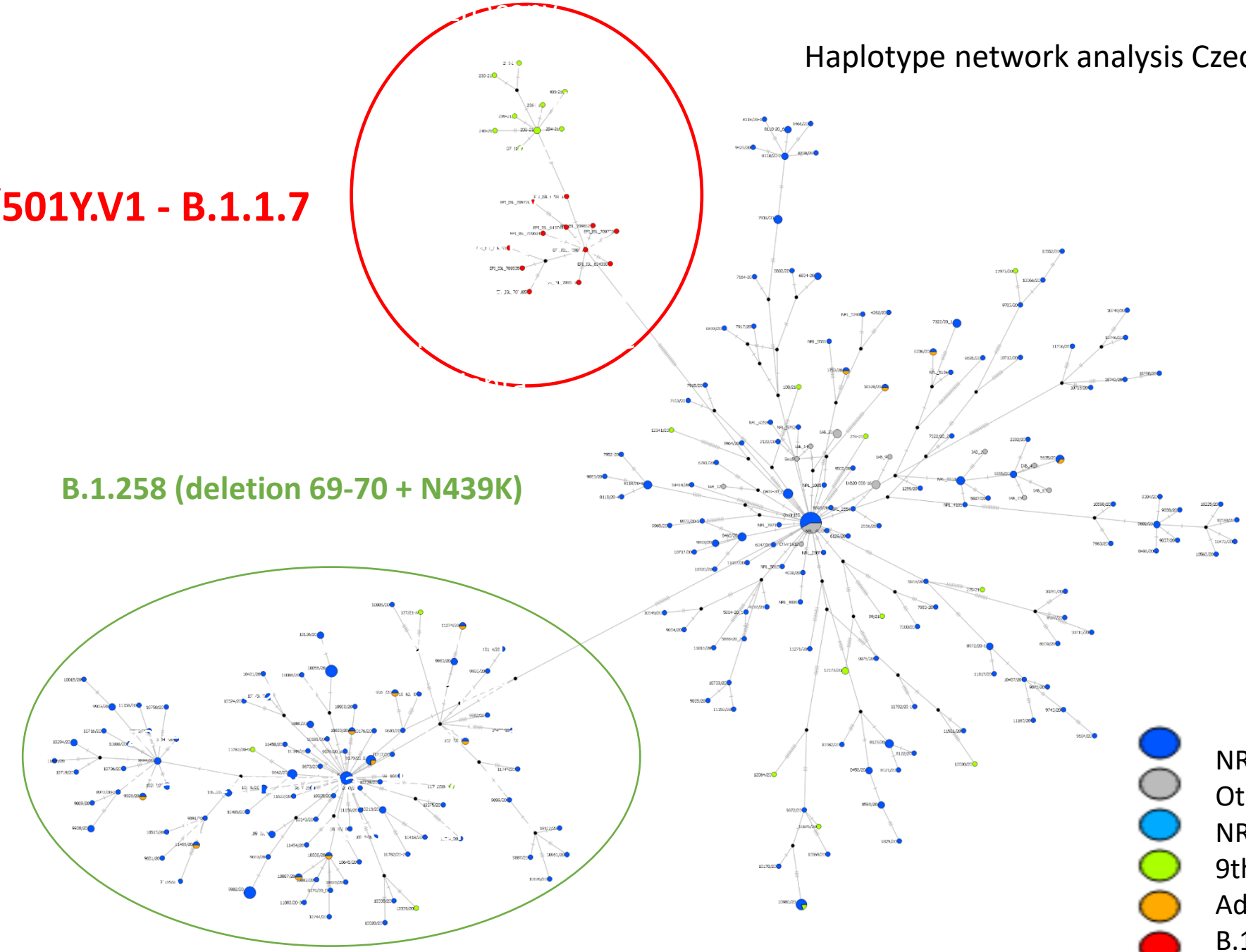


Nextclade beta

Haplotype network analysis Czechia - 19-01-2021

20I/501Y.V1 - B.1.1.7

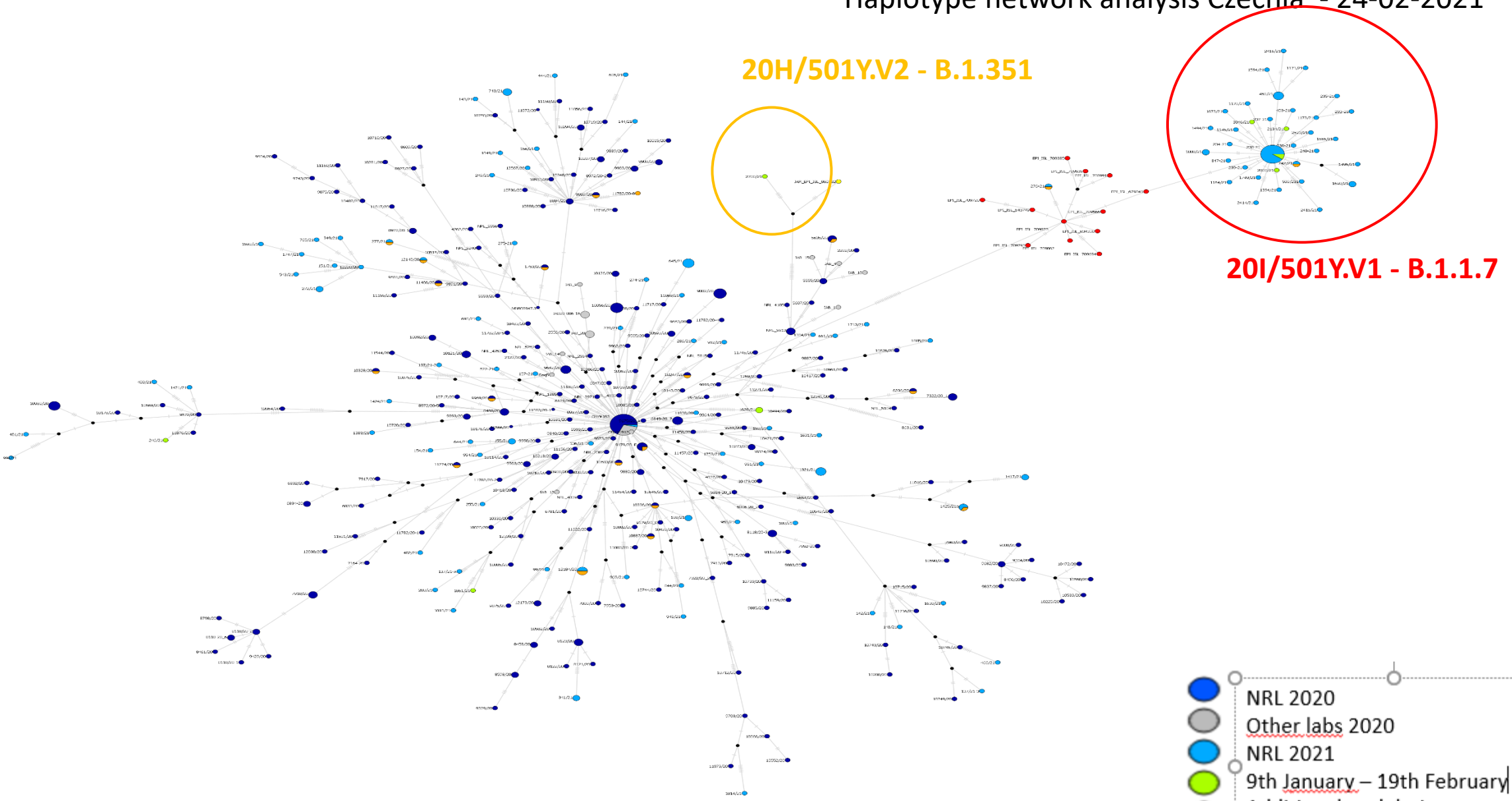
B.1.258 (deletion 69-70 + N439K)



- NRL 2020
- Other labs 2020
- NRL 2021
- 9th January – 19th February
- Additional nt deletion
- B.1.1.7 UK strains

Leigh, J.W. and Bryant, D. (2015), popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol, 6: 1110-1116.

Haplotype network analysis Czechia - 24-02-2021



- NRL 2020
- Other labs 2020
- NRL 2021
- 9th January – 19th February
- Additional nt deletion
- B.1.1.7 UK strains

Leigh, J.W. and Bryant, D. (2015), popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol, 6: 1110-1116. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410

Závěr:

- Pro jednoznačnou intepretaci z nutno použít více metod

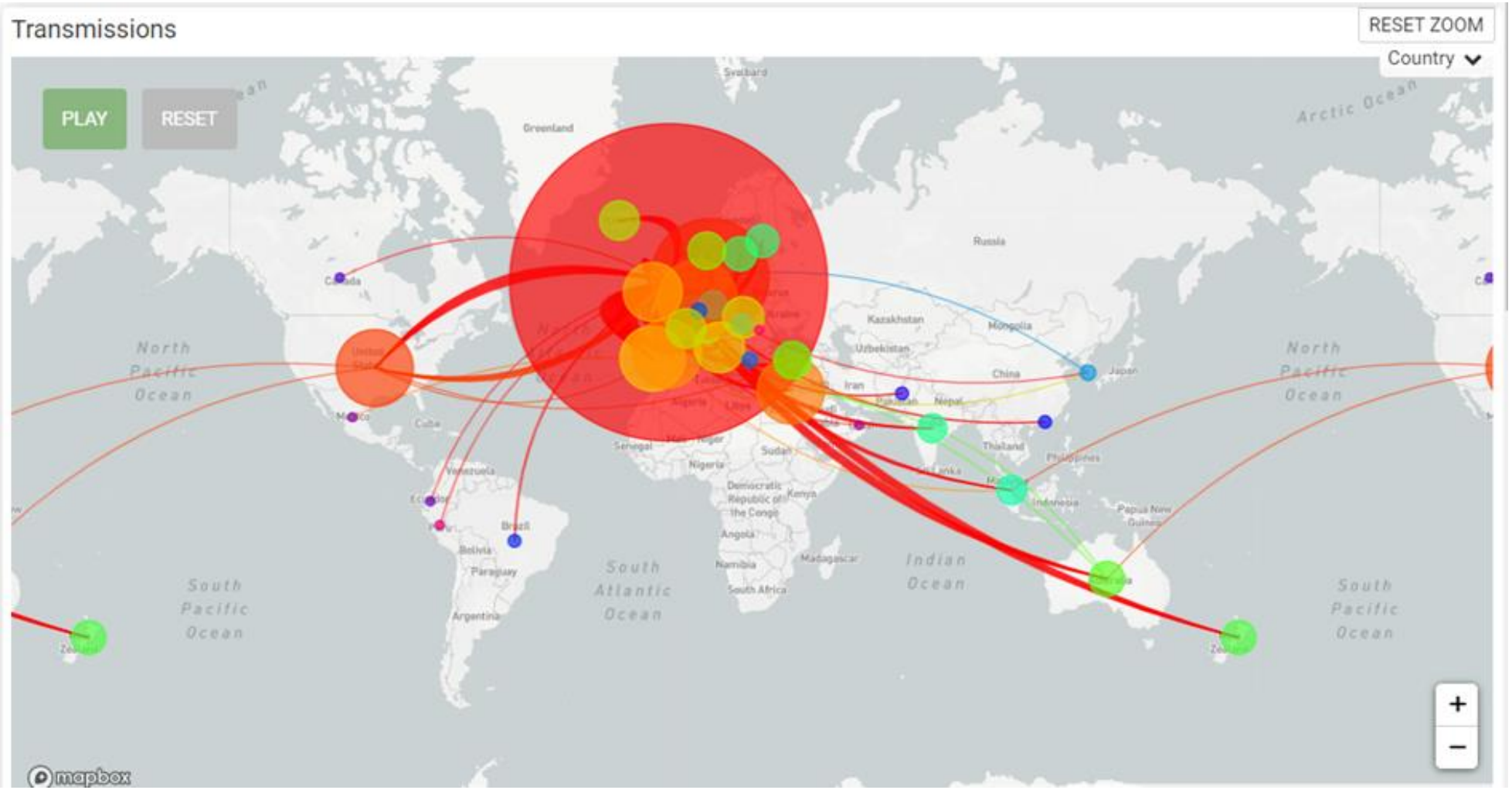
- V případě nejasností opakovat odběr a PCR - dynamika
- Rapid testy napomohou pro stanovení infekčnosti pacienta

- Detekce mutací nikoli variant PCR
- Nutné sledování ohnisek s vyšší trasmisibilitou,
- Nutné sledování atypických klinických projevů

! Nutná opatrnost - unáhlené a nepodložené intepretace!
Nestačí pouze pozitivní negativní – archivace materiálů

Děkuji za pozornost

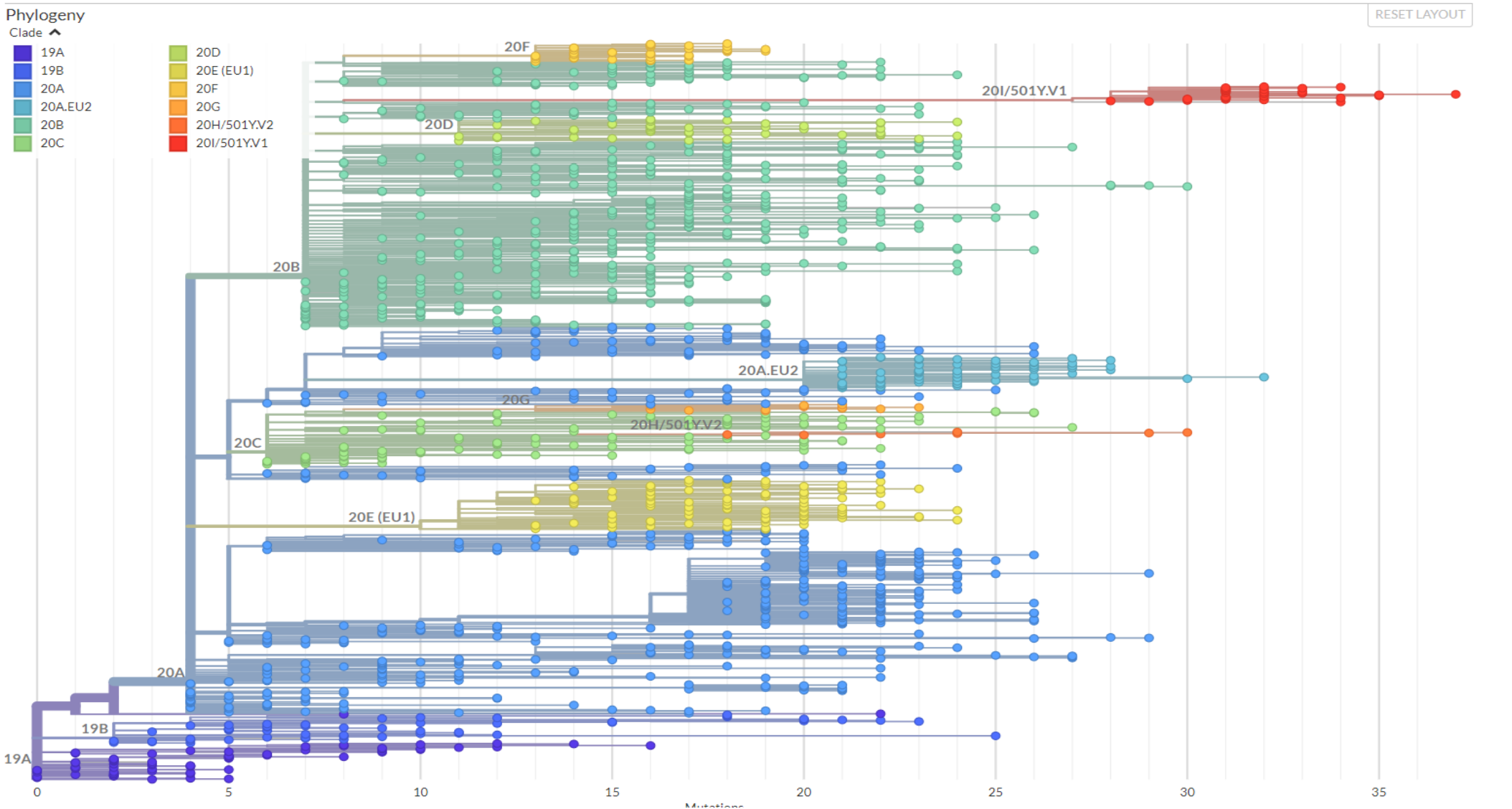
Rozšíření 20I/501Y.V1



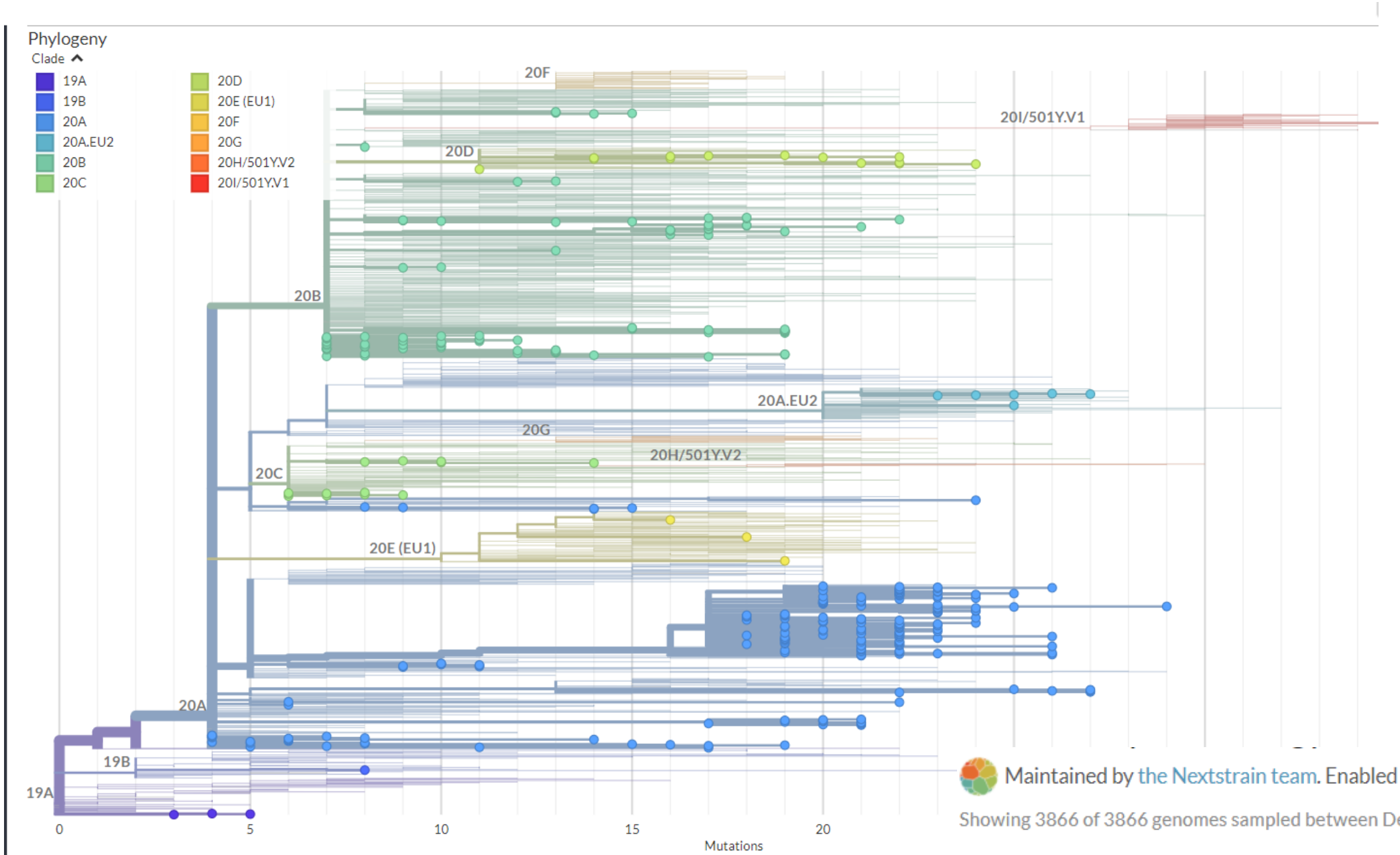
Maintained by the Nextstrain team. Enabled by data from GISAID

Showing 3866 of 3866 genomes sampled between Dec 2019 and Jan 2021.

Global phylogeny – 19-20 taxonomy Nexststrain



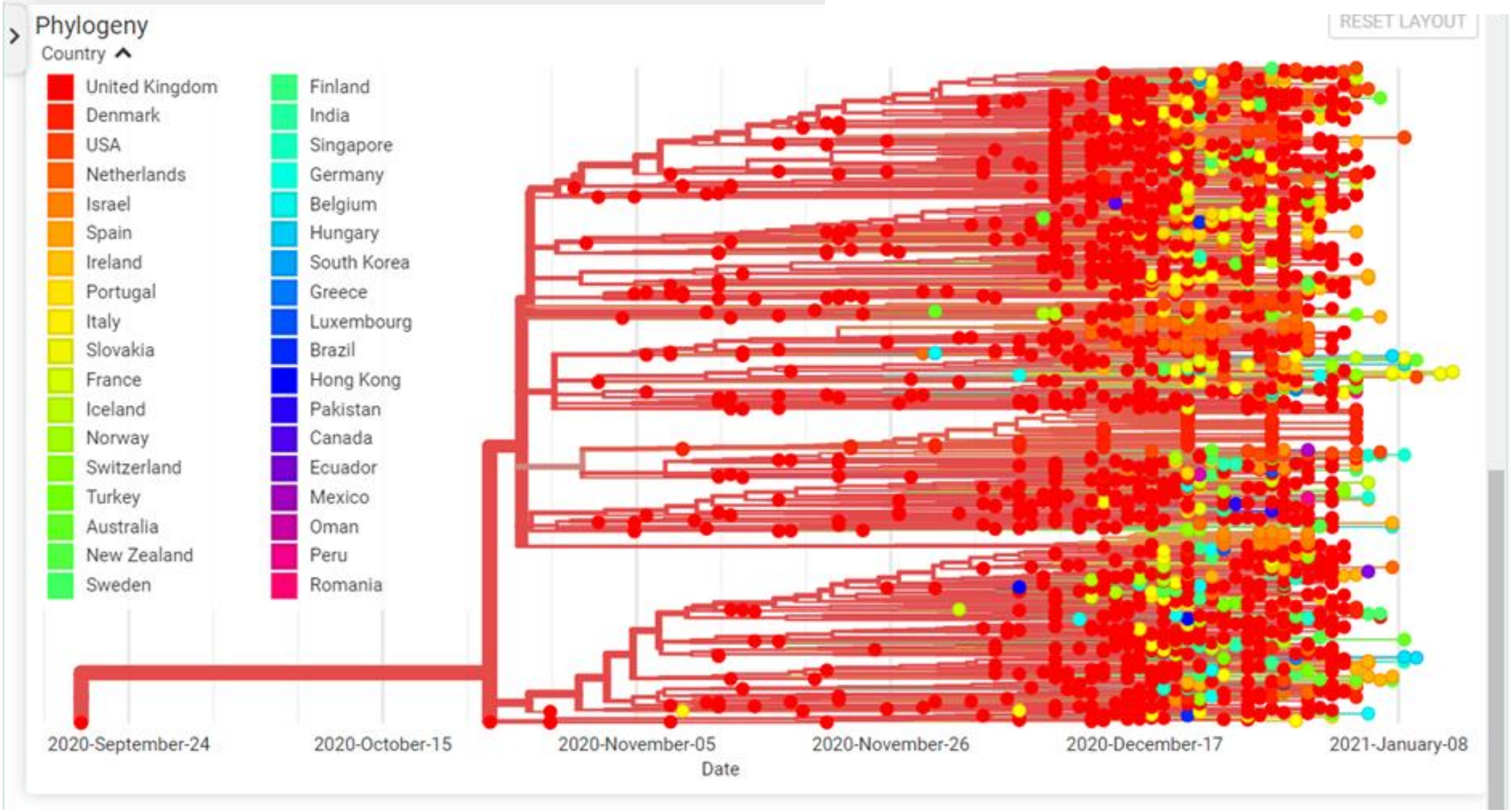
NEXTCLADE – PHYLOGENY CZECHIA



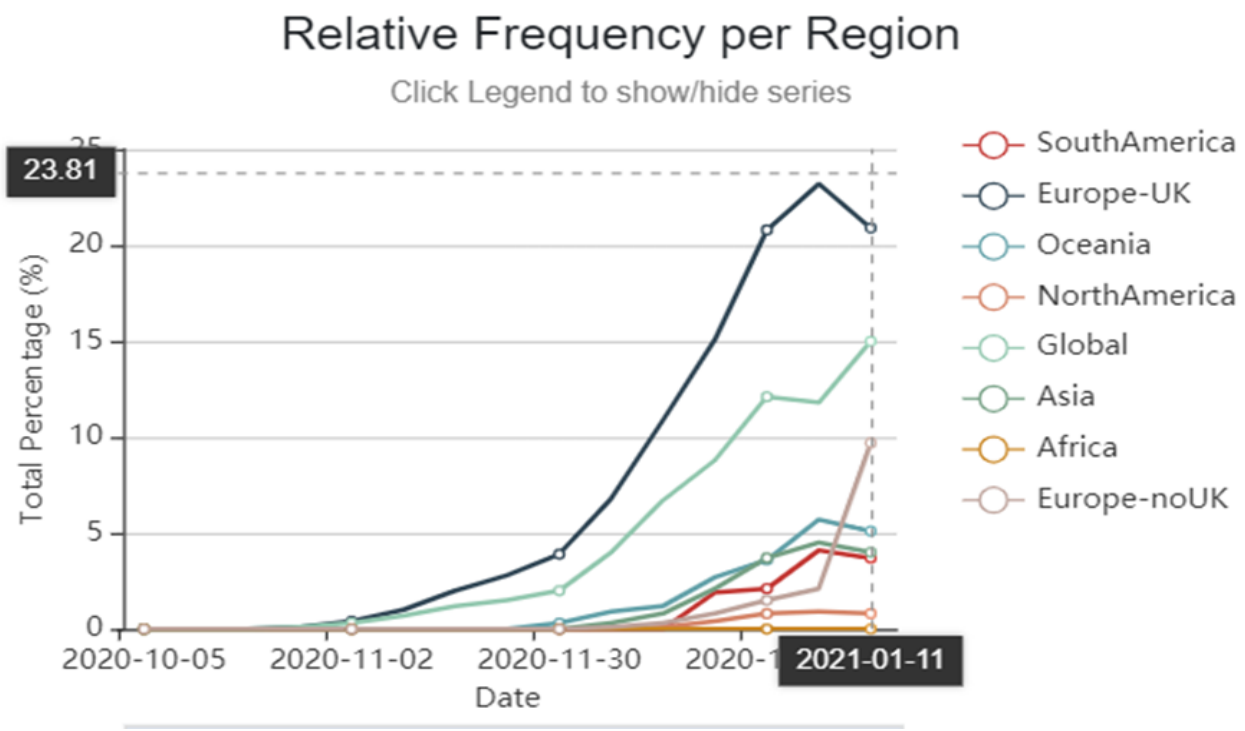
Maintained by the Nextstrain team. Enabled by data from GISAID

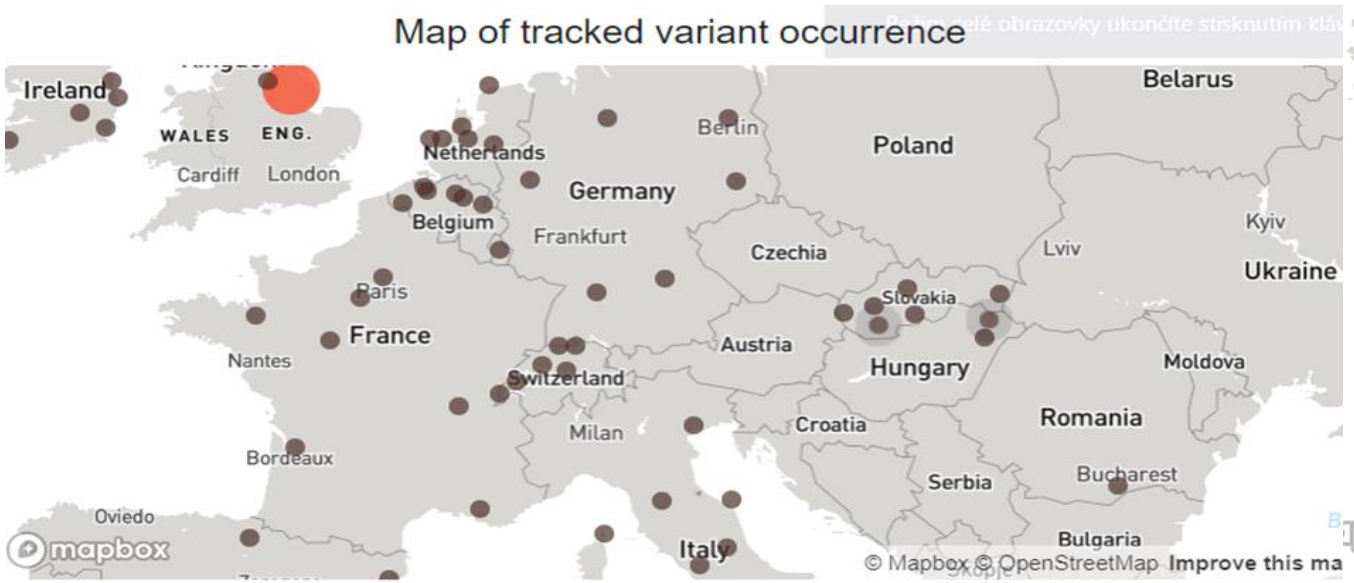
Showing 3866 of 3866 genomes sampled between Dec 2019 and Jan 2021.

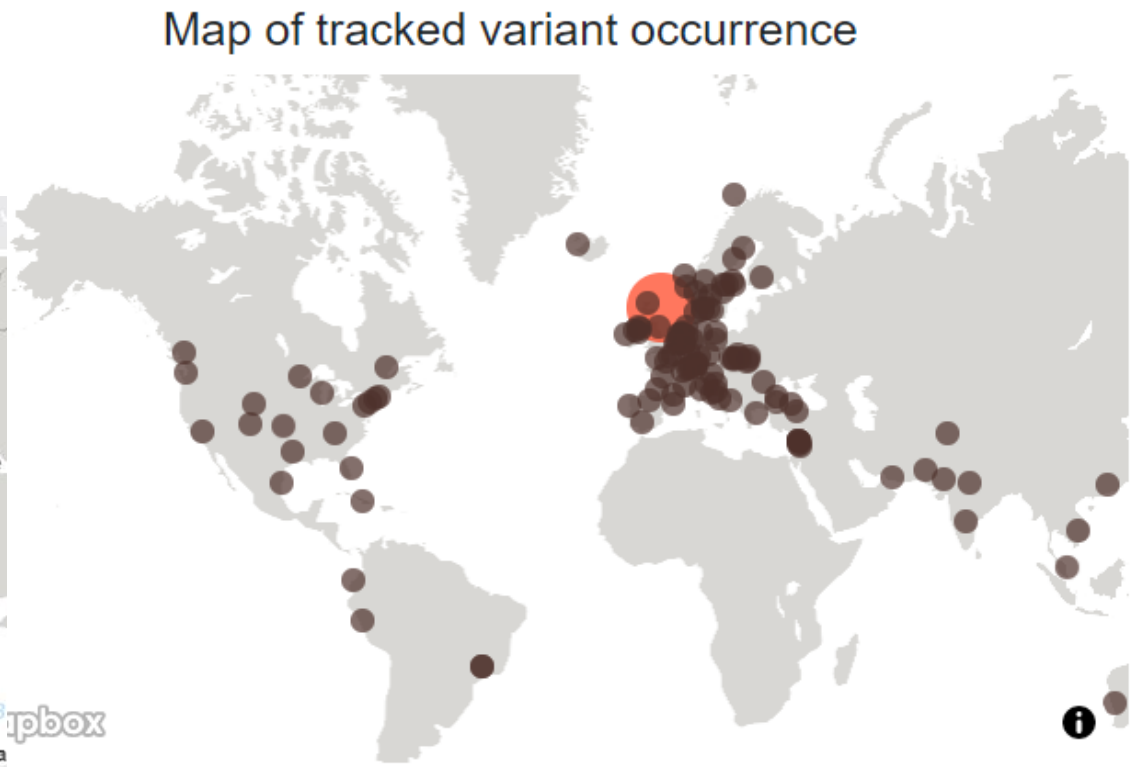
VUI202012/01



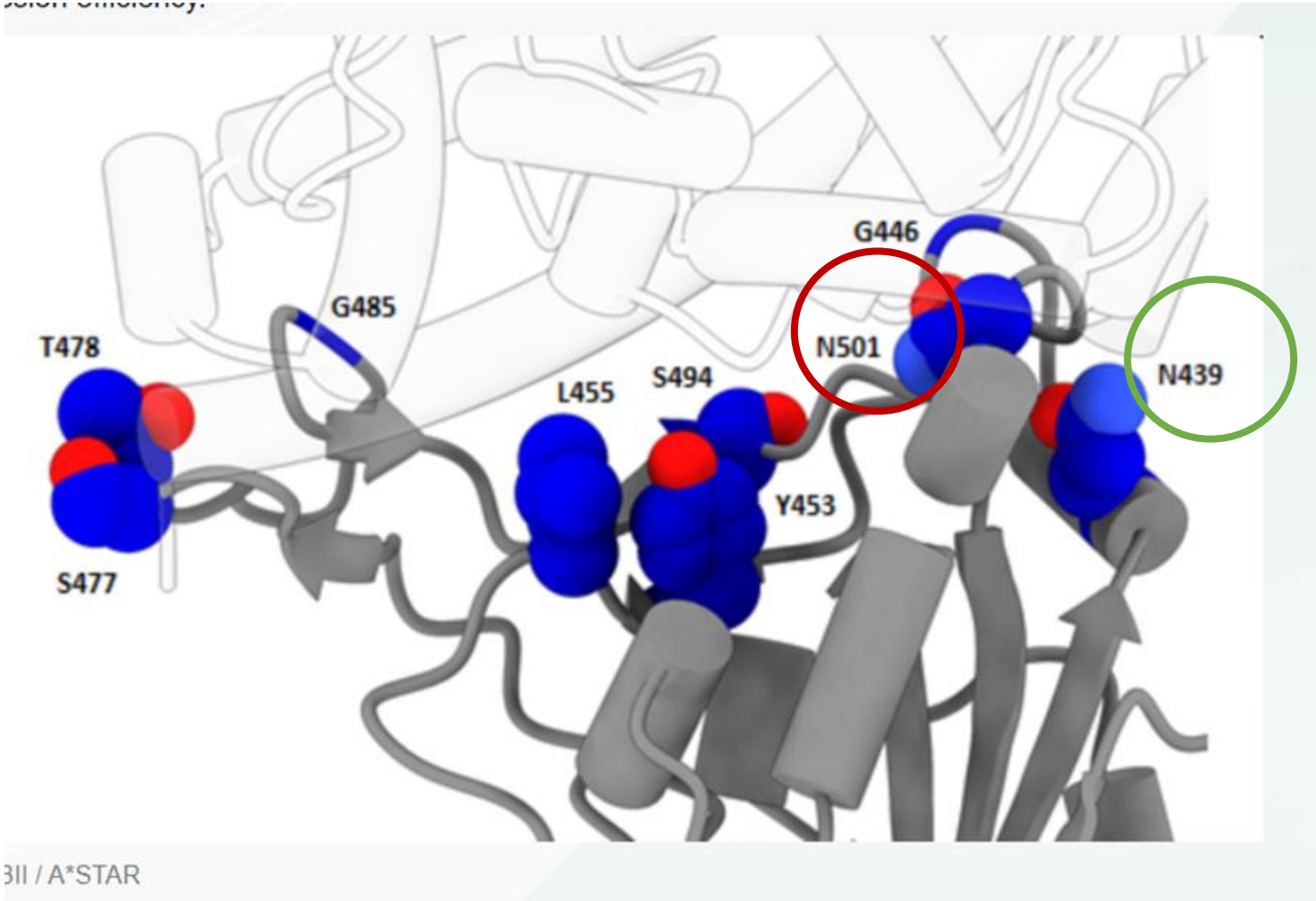
UK variant spread

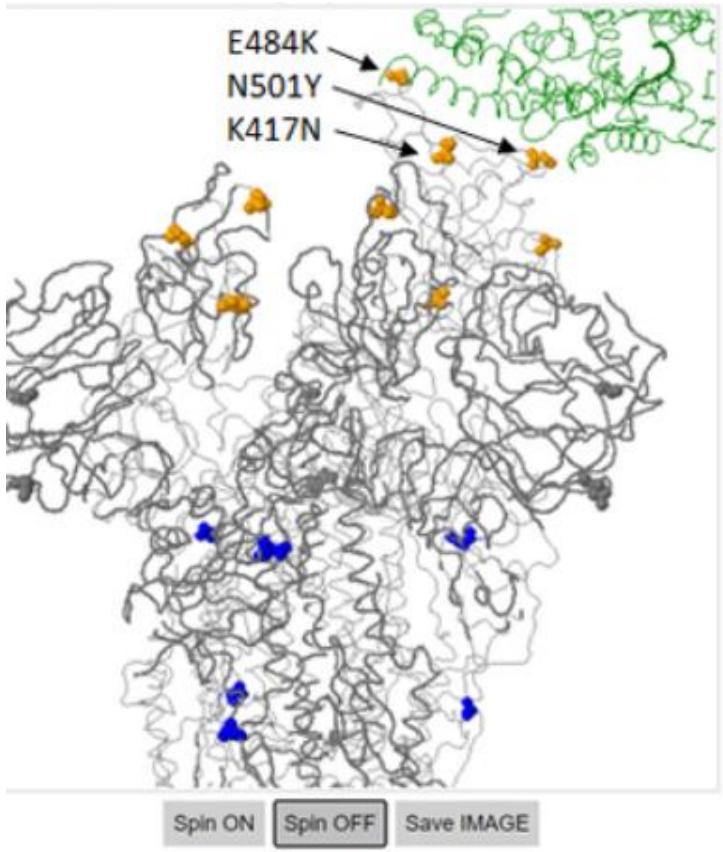






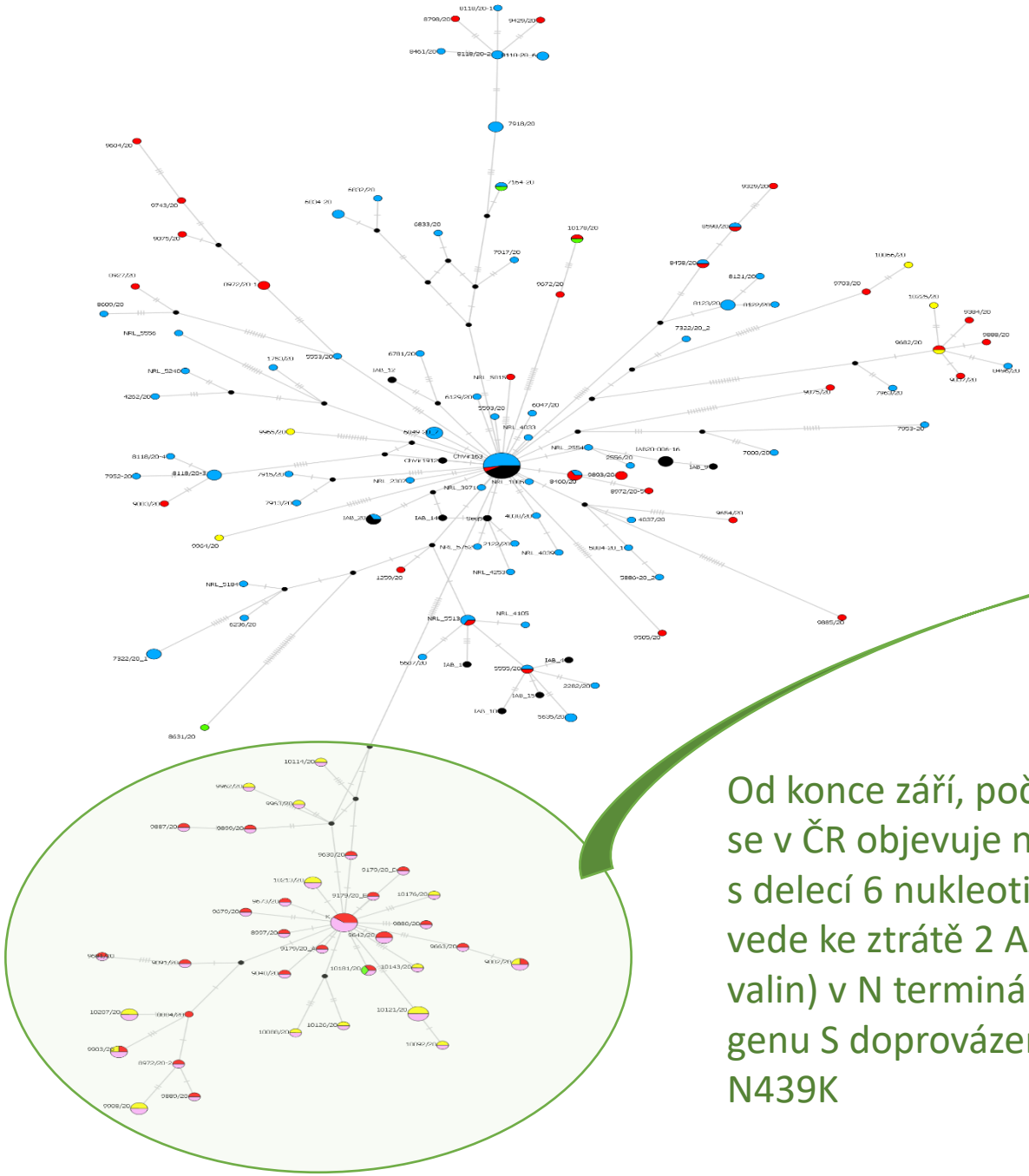
Spike protein changes - RBD



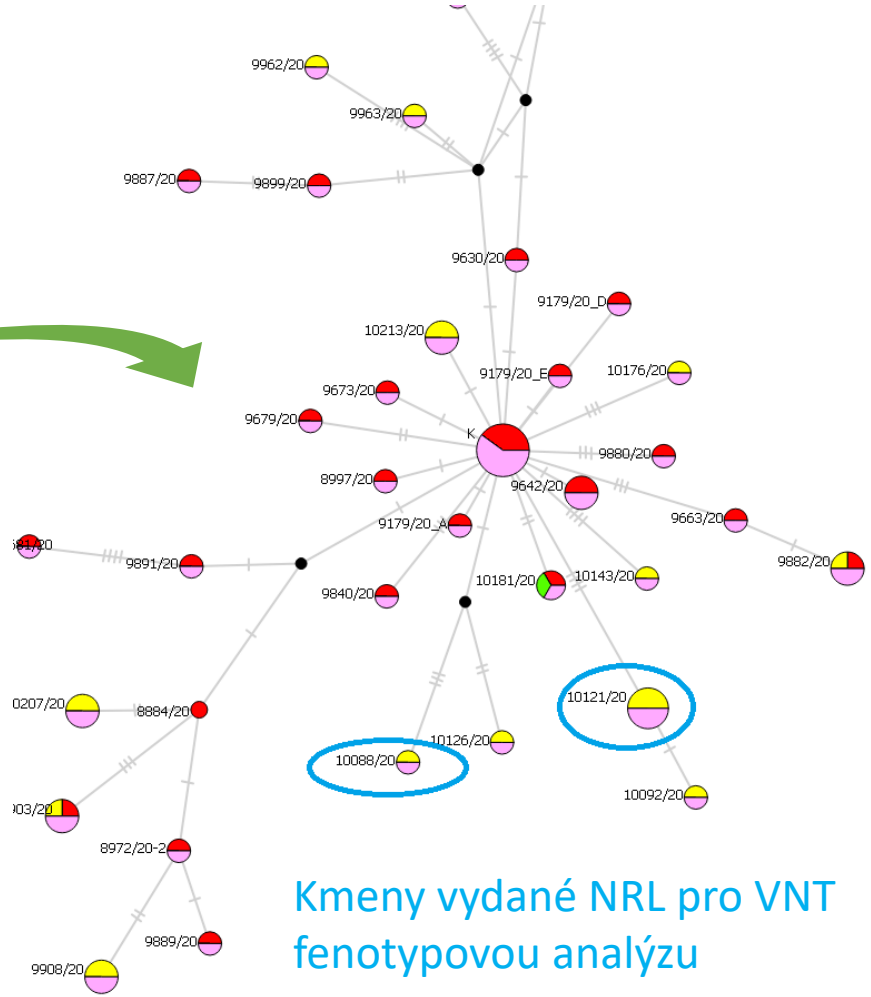


Spike glycoprotein (PDB: 6acj, EM 4.2 Angstrom) in complex with host cell receptor ACE2 (green ribbon).

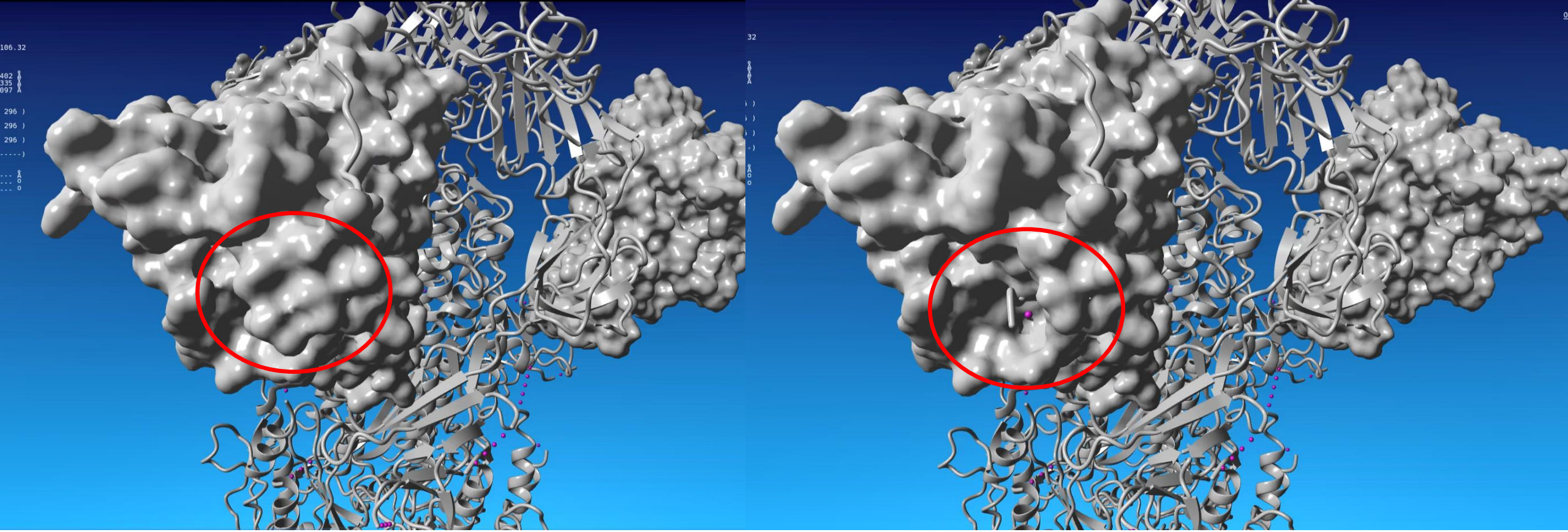
Haplotype network analysis
ČR – WGS SARS-CoV-2, březen – říjen 2020



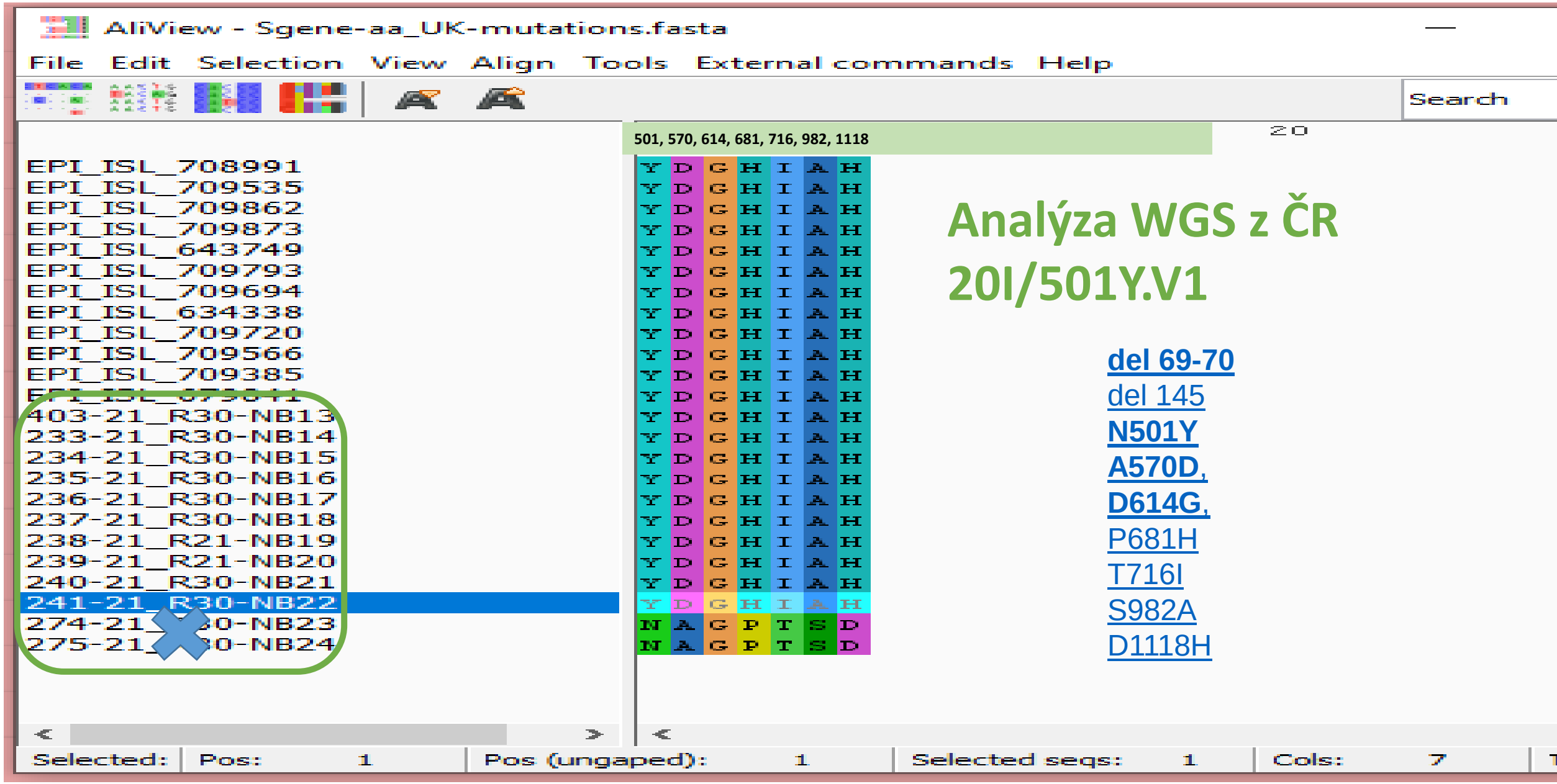
Od konce září, počátku října se v ČR objevuje nová varianta s delecí 6 nukleotidů, což vede ke ztrátě 2 AA (histidin, valin) v N terminální doméně genu S doprovázený substitucí N439K



Kmeny vydané NRL pro VNT fenotypovou analýzu



Delece 6 nukleotidů, tedy 2 aminokyselin (69 histidin, 70 valin) v N-terminální doméně spike proteinu - boční pohled (model dle rentgenostrukturní analýzy – SVU+SZU)

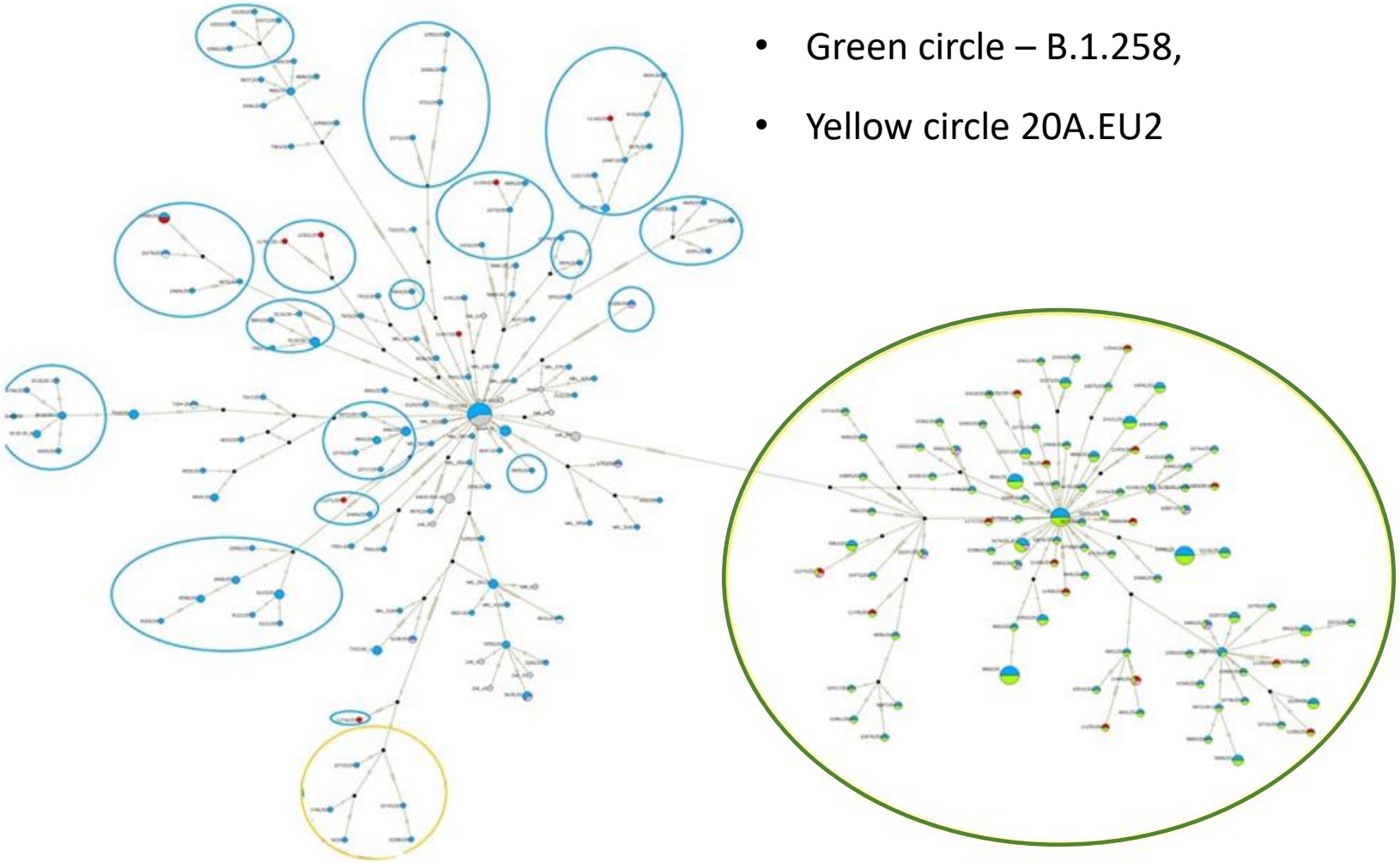


Analýza WGS z ČR 20I/501Y.V1

del 69-70
del 145
N501Y
A570D,
D614G,
P681H
T716I
S982A
D1118H

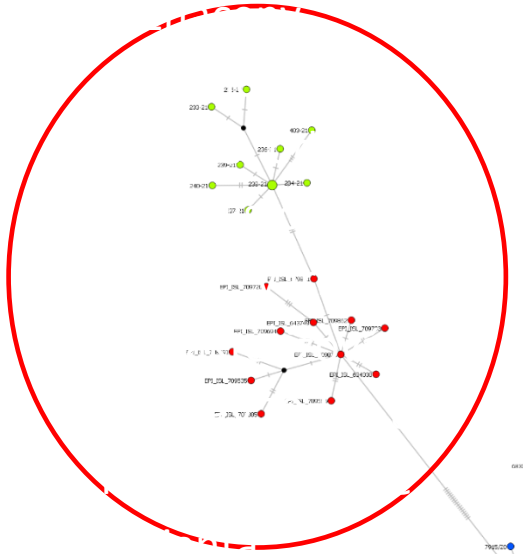
Haplotype network analysis 282 WGS, 25-12-2020

- Blue circle – collection date September -November
- Green circle – B.1.258,
- Yellow circle 20A.EU2

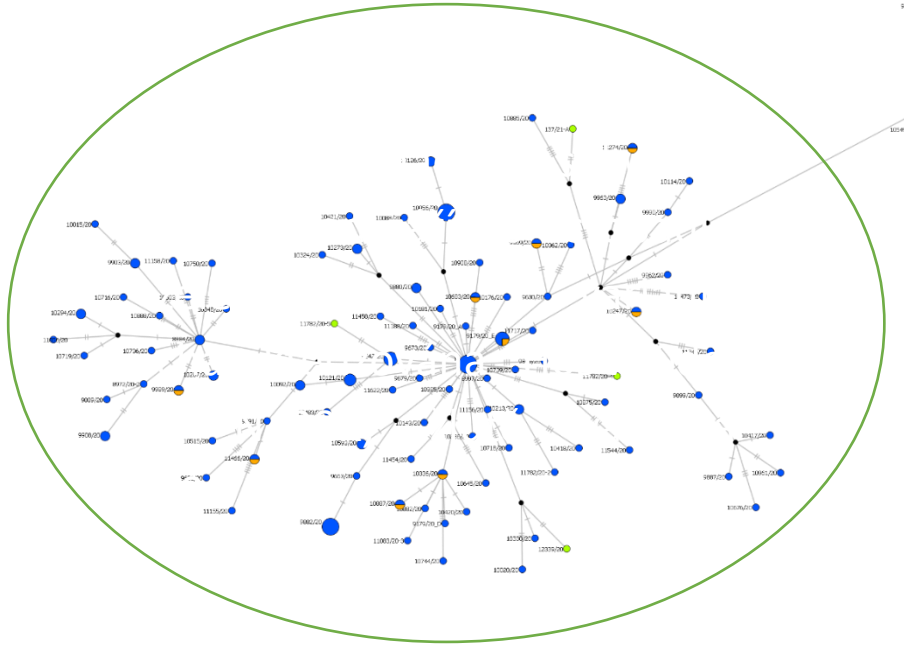


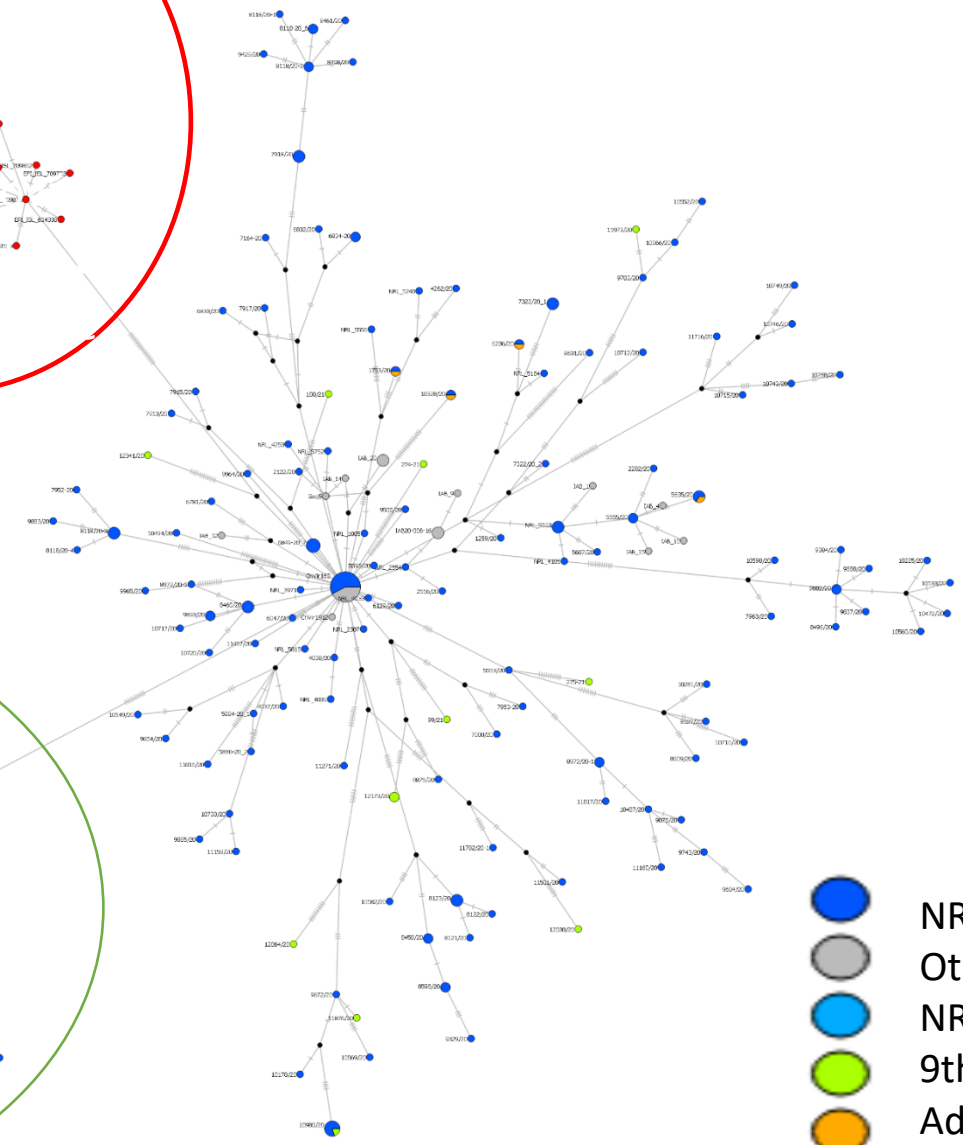
Haplotype network analysis Czechia - 19-01-2021

20I/501Y.V1



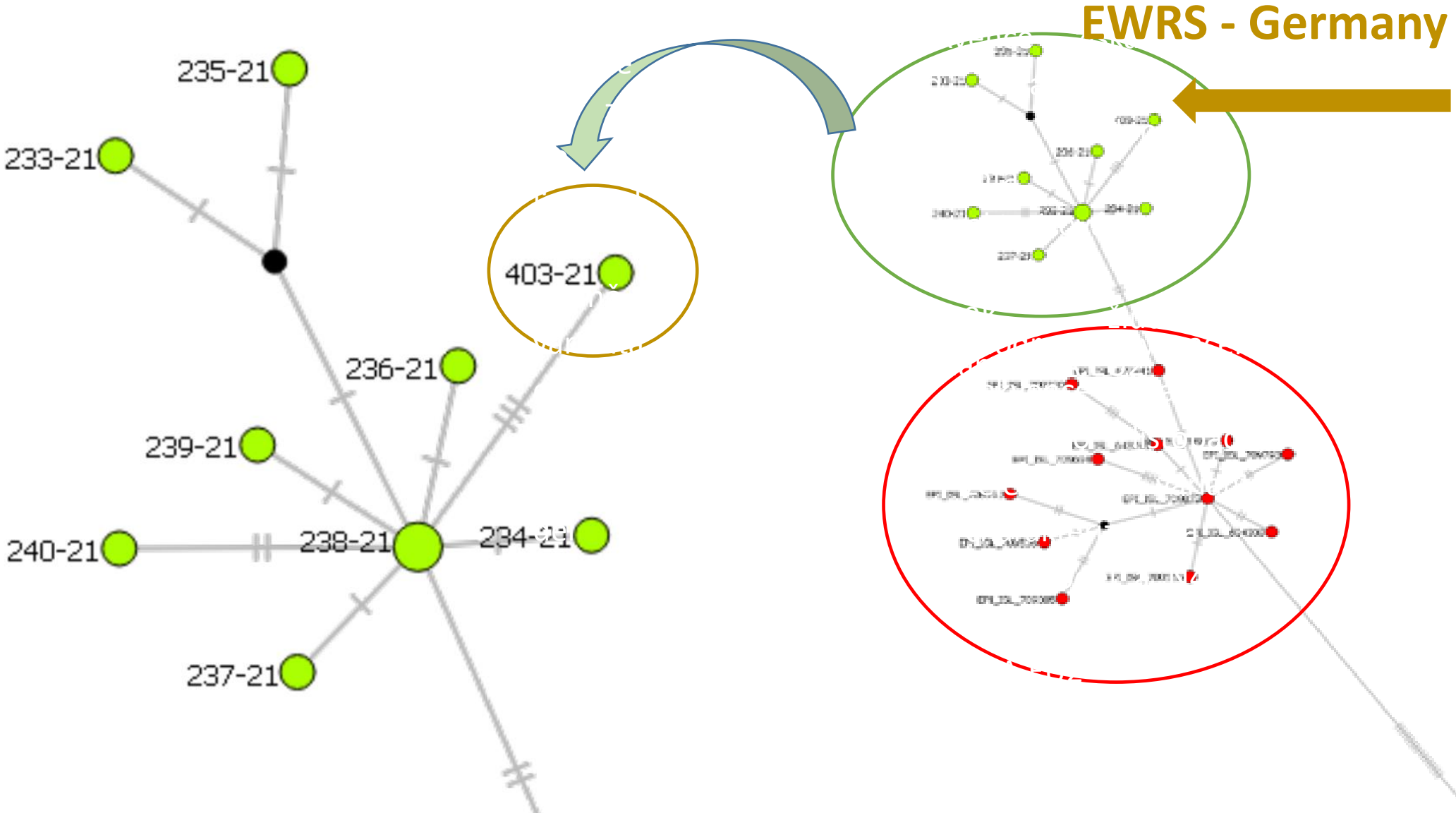
B.1.258 Deletion 69-70 + N439K





- NRL 2020
- Other labs 2020
- NRL 2021
- 9th January – 19th January
- Additional nt deletion
- B.1.1.7 UK strains

20I/501Y.V1 Czechia, England



Suspected 20I/501Y.V1 WGS Czechia

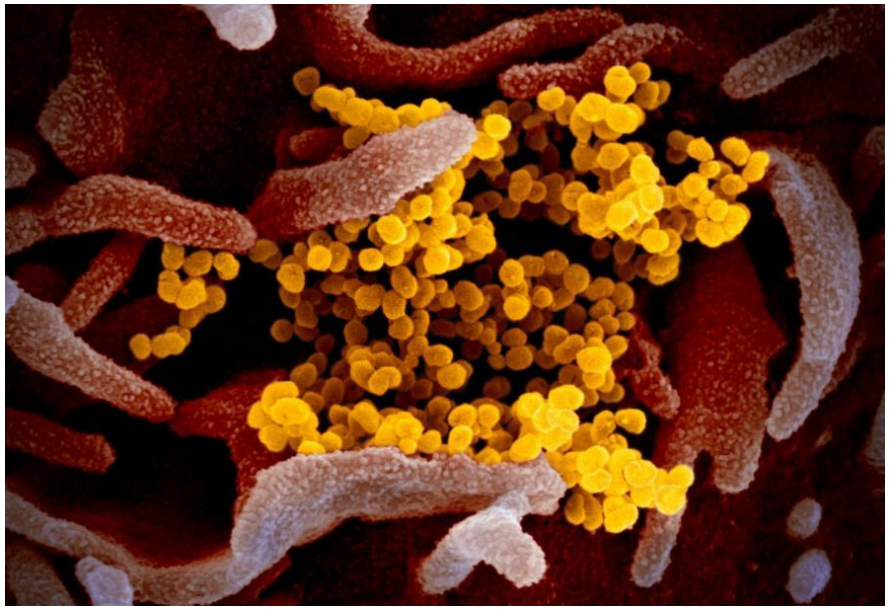
	Collection date	Location	Additional location informatio	Additional host information	Gender	Patient age	Patient status
ic/NRL_403/2021	2021-01-07	Hradec Králové Region /	contact within manufacturing site	contact with positive cases of VUI 202012/01 in Germany, EWRS	Female	52	unknown
ic/NRL_233/2021	2021-01-04	Prague			Male	39	unknown
ic/NRL_234/2021	2021-01-05	Prague	Nursing Home Prague 5		Female	86	Mild clinical signs without hospitalization
ic/NRL_235/2021	2021-01-04	Prague			Female	18	No clinical signs
ic/NRL_236/2021	2021-01-04	Hradec Králové Region / Staré Hrady			Male	66	Mild clinical signs without hospitalization
ic/NRL_237/2021	2021-01-04	Hradec Králové Region / Trutnov			Female	14	No clinical signs
ic/NRL_238/2021	2021-01-04	Prague			Male	49	Mild clinical signs without hospitalization
ic/NRL_239/2021	2021-01-05	Prague		distorted ability to smell and taste	Female	29	Mild clinical signs without hospitalization
ic/NRL_240/2021	2021-01-05	Prague			Female	29	Mild clinical signs without hospitalization
ic/NRL_241/2021	2021-01-05	Prague			Male	25	Mild clinical signs without hospitalization
c/NRL_274/2021	2020-01-06	Prague	arrival at Václav Havel Airport		Female	24	unknown
c/NRL_275/2021	2021-01-05	Prague	arrival at Václav Havel Airport, import from Ukraine		Male	28	unknown

Celogenomová sekvenace nebo sledování mutací PCR jako nástroj trasování?

Helena Jiřincová

NRL pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění

CEM - SZÚ



Doporučení k diskriminačním PCR pro laboratoře – HOT SPOT MUTACE

- Vznik konvergentní nezávislou evolucí v různých lokalitách a v různých variantách.
- PCR - nejrychlejší nástroj - mutace - evoluční zvýšení transmisibility, escape
- **Cílem není určit variantu, ale nalézt hot spot mutaci**

Příklad: L452R či E484K
rezistentce vůči léčebným monoklonálním protilátkám bamlanivimab (BAMLAN - Eli Lilly)
Např. C.36 / B.617.2 B.1.1.7, P.1, P.2, B.1.351/B.1.1.318

? T478K B.1.617/2, B.1.1.519 **T478R** (Tanzánie, Uganda A.VO.1)

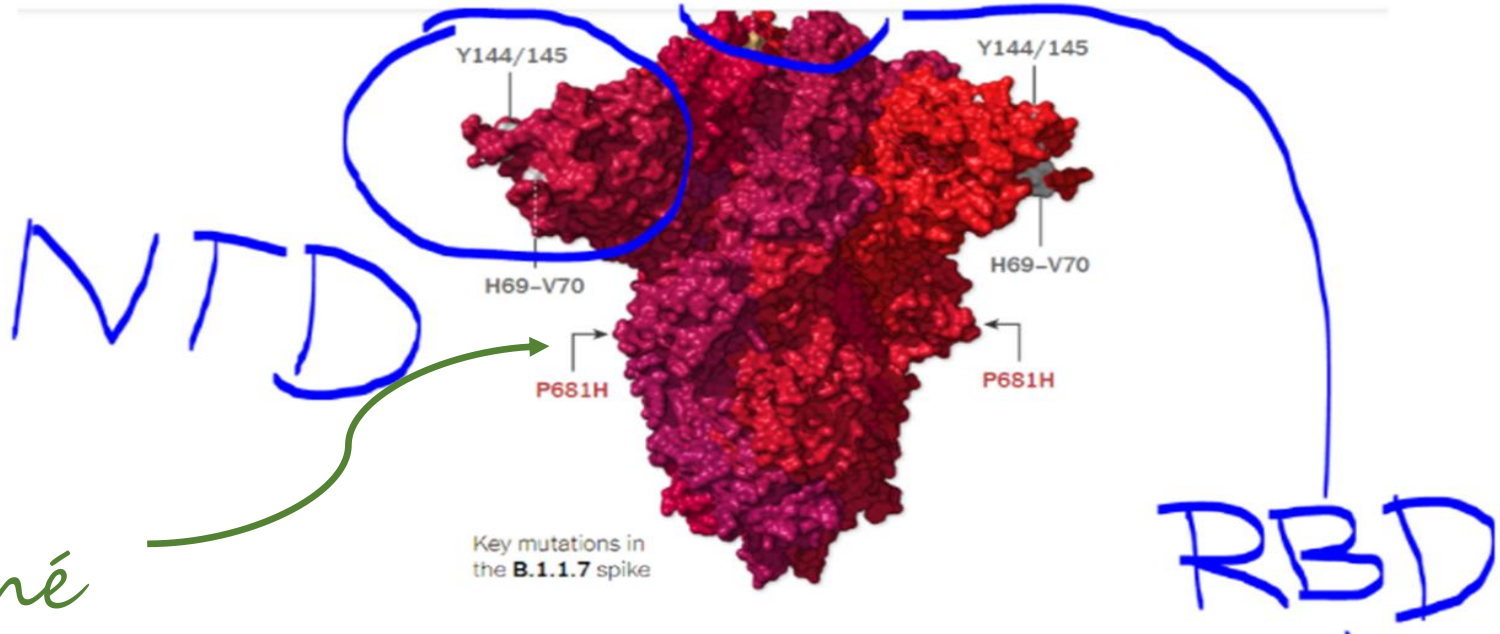
NRL doporučení**: E484K, N501Y, L452R**

Další mutace k úvaze jsou: K417N, P681H/R, E484Q, případně deleci 69-70.

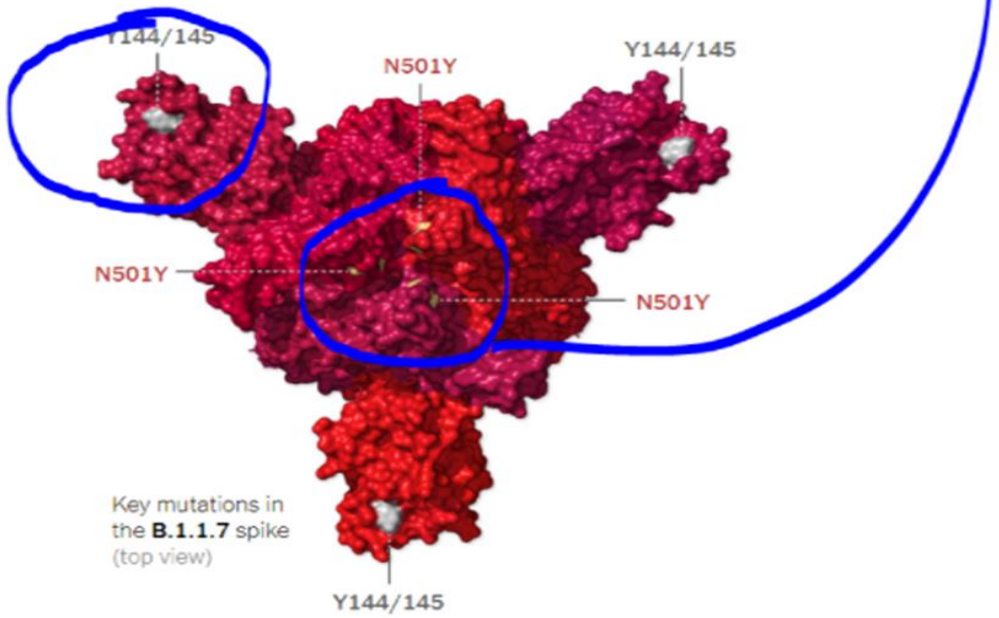
Poslední data naznačují důležitost mutace T478K.

- Import
- Ohniska
- Atypické PCR nálezy
- Reinfekce
- Selhání vakcinace
- Hospitalizace <50 let
- Atypické průběhy

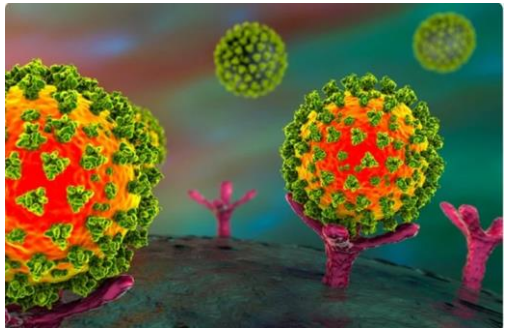
Furinové štěpné místo



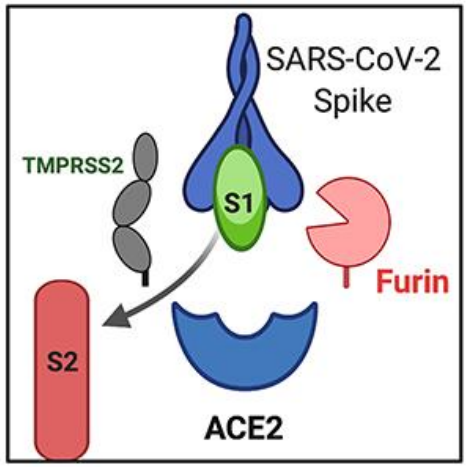
It takes three spike proteins to form one spike, so each mutation appears in three places:



For more on the B.1.1.7 mutations, see: Inside the B.1.1.7

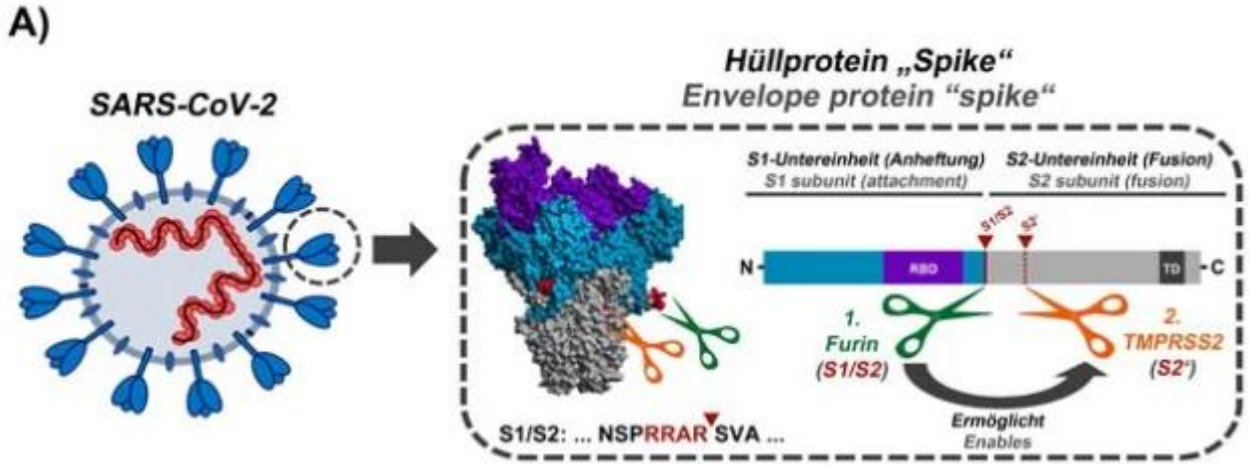


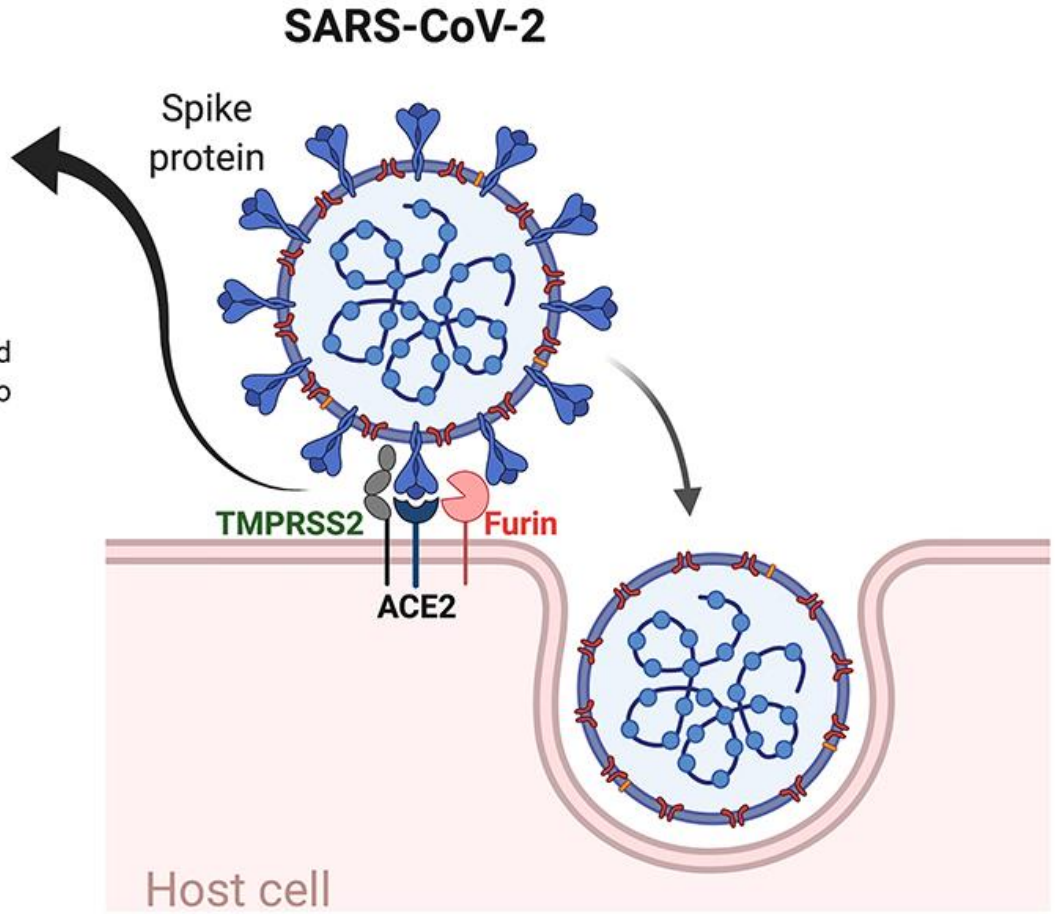
CoV-2 for binding ACE2 as compared to SARS-CoV-1 [15], [17].



S1/S2 subunits cleavage by furin and SARS-CoV-2 genomes penetrate into the host cell

(A) Schematic representation of SARS-CoV-2, the viral spike protein and the cleavage sites for furin (green, S1/S2 position; the cleavage sequence is shown below the protein structure) and TMPRSS2 (orange, S2' position). (B) First, in already infected cells, the enzyme furin cuts the spike protein at the S1/S2 site. The spike protein then mediates viral attachment to a new host cell. In order to efficiently enter the cell, the spike protein still needs to be activated by the enzyme TMPRSS2. Activation by TMPRSS2 is only possible if the spike protein has previously been cleaved by furin. Credit: Markus Hoffmann





Giuseppe Lippi, Carl J. Lavie, Brandon M. Henry and Fabian Sanchis-Gomar

Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (*ACE2*) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)?

De Gruyter | Published online: June 29, 2020
https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0727

Escape mutace v jednotlivých linií

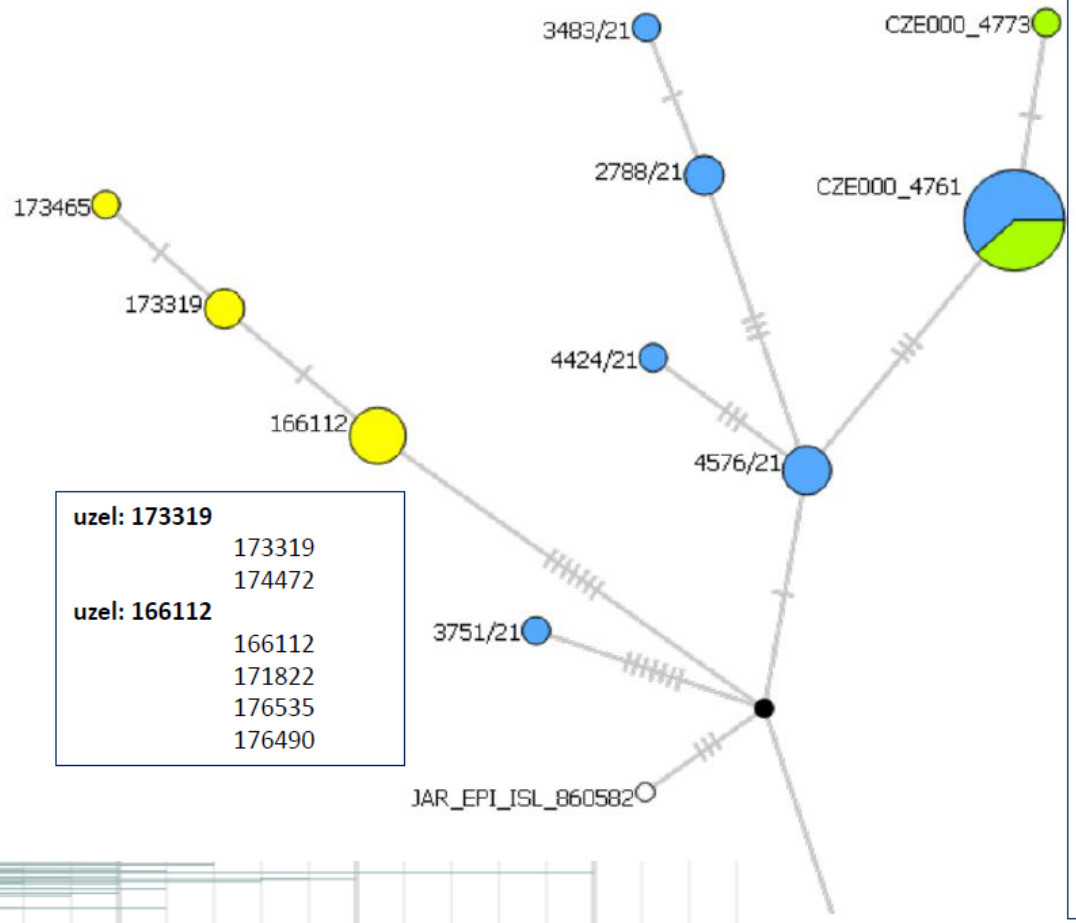
- Import
- Ohniska
- Atypické PCR nálezy
- Reinfekce
- Selhání vakcinace
- **Hospitalizace <50 let**
- Atypické průběhy

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

B.1.351 - ČR

Sekvence v rámci jednoho uzlu jsou zcela identické, jedna kolmá úsečka představuje jednu nukleotidovou změnu

Vzorky 3751, 2788, 3483 představují návaznost na import ze Zanzibaru. Vzorky detekované v Olomouci (žlutě označené) naznačují jedno ohnisko ze společného zdroje, který se liší od ostatních detekovaných variant, kde lze rovněž usuzovat do „společný“ zdroj infekce.



uzel: 173319
173319
174472
uzel: 166112
166112
171822
176535
176490

uzel: CZE000_4761

	CZE000_4761	Ústí n L
	CZE000_4762	Ústí n L
	CZE000_4764	Liberec
	CZE000_4770	Liberec
	CZE000_4774	Liberec
	4421/21	Liberec
	4765-21	Liberec
	4767-21	Liberec
	4771/21	Liberec
	4772/21	Liberec
	4775/21	Liberec
	4776/21	Liberec
	4777-21	Liberec
uzel: 2788/21	2788/21	Hradec Králové
	3244/21	Brno
3483/21		Hradec Králové
4224/21		Brno
3246/21 (ECDC)	nezařazeno	Praha
3751/21 (pitva)		Mělník
4589/21	nezařazeno	Praha
Uzel: 4576/21	4576/21	Praha
	4692/21	Praha
	4744/21	Liberec
4773/21		Liberec

Závěr - PCR nebo sekvenace?

- PCR bez snahy přiřadit variantu
- Hot spot mutace

- WGS – PANGO LINIE
- Varianty (VOC- VUI – VUM)

- **I)mport**
- **Ohniska**
- **Atypické PCR nálezy**
- **Selhání vakcinace**
- **Hospitalizace <50 let**
- **Atypické průběhy**

Doplnit na 5 % pozitivit o:

Náhodný výběr

Závěr 2: Jak se mám v těch číslech/zkratkách vyznat?

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

Alertní varianta

Varianta hodně pozor

- B.1.1.7
- B.1.1.7.+.E484K
- B.1.351 (+ cokoli)
- P.1
- B.1.617.2

Varianta/varianta zájmu

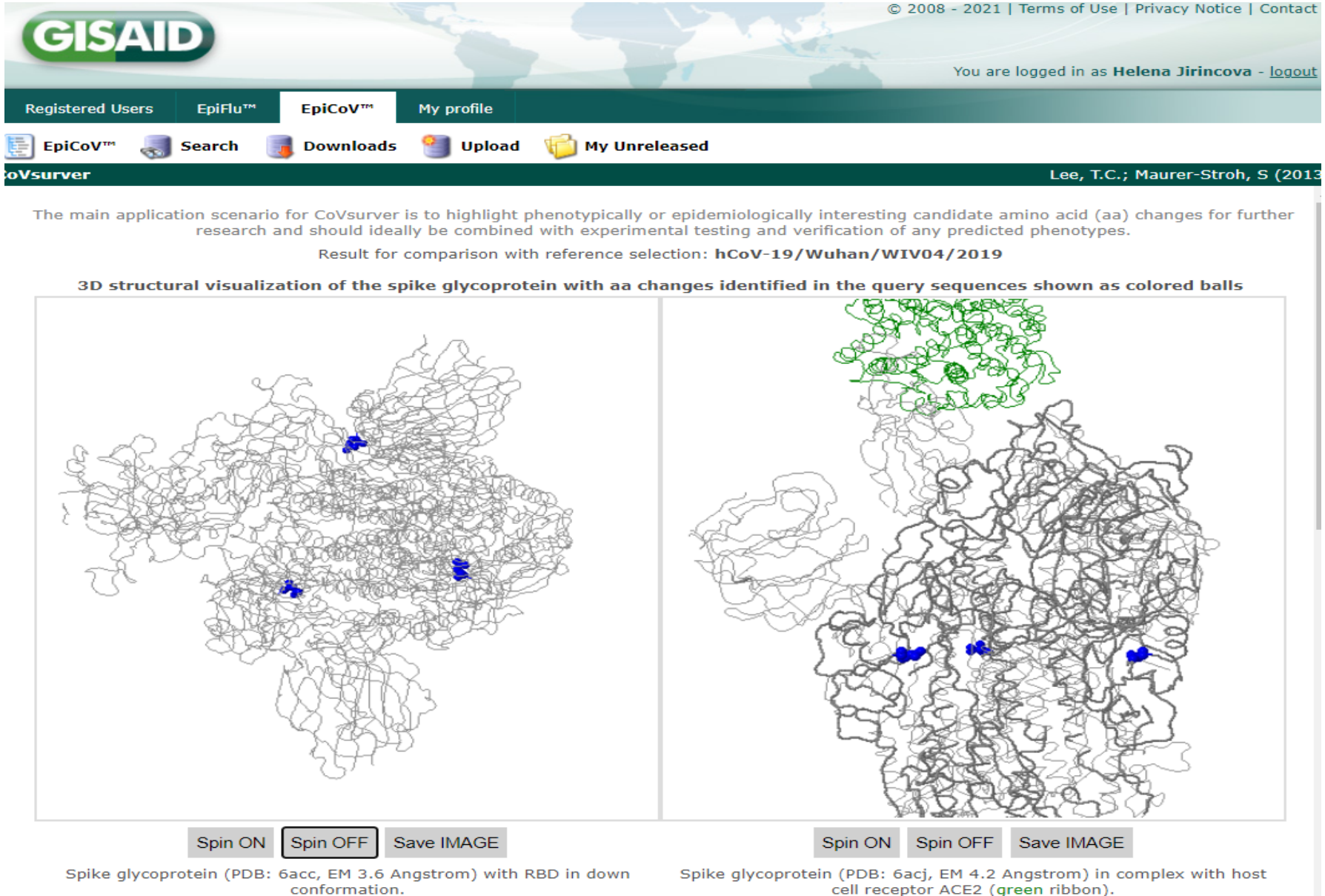
Varianta pozor

- B.1.1.318
- B.1.525
- B.1.617.1
- B.1.620
- C.36

Děkuji za pozornost

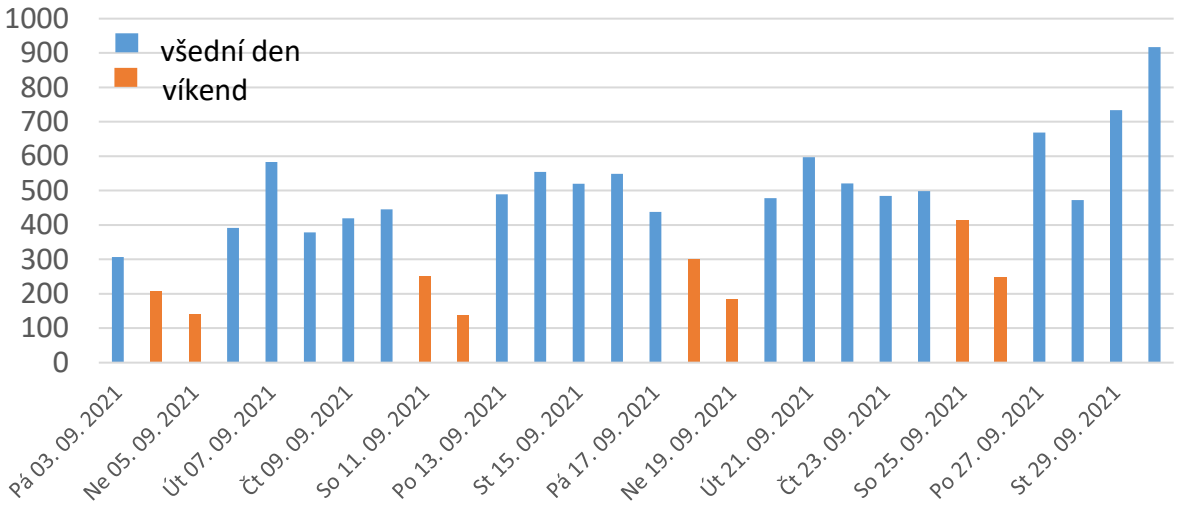
Namasté

Spike D614G – first cases detected in CR

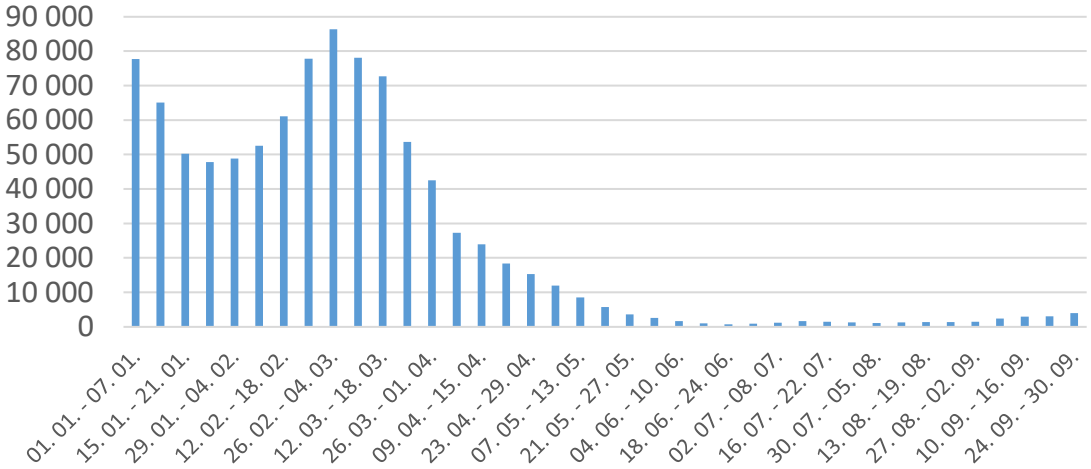


Souhrn a upozornění

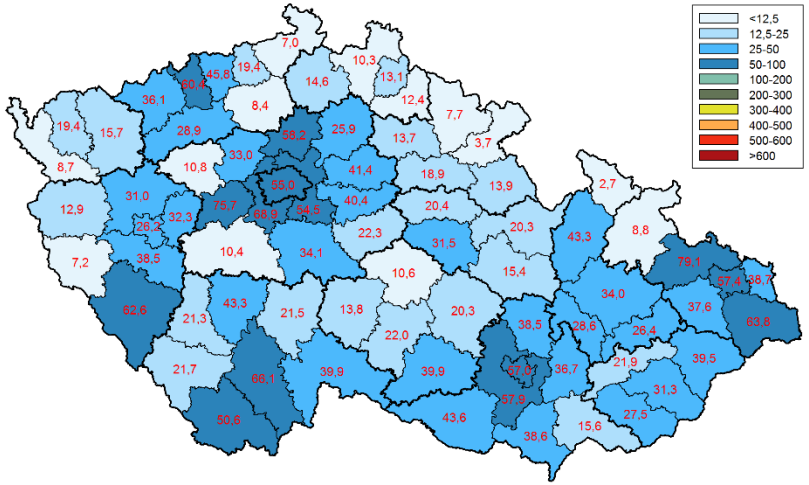
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 30. 9. 2021



Graf 3: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 30. 9. 2021



Odborná doporučení NRL. Diskriminační PCR

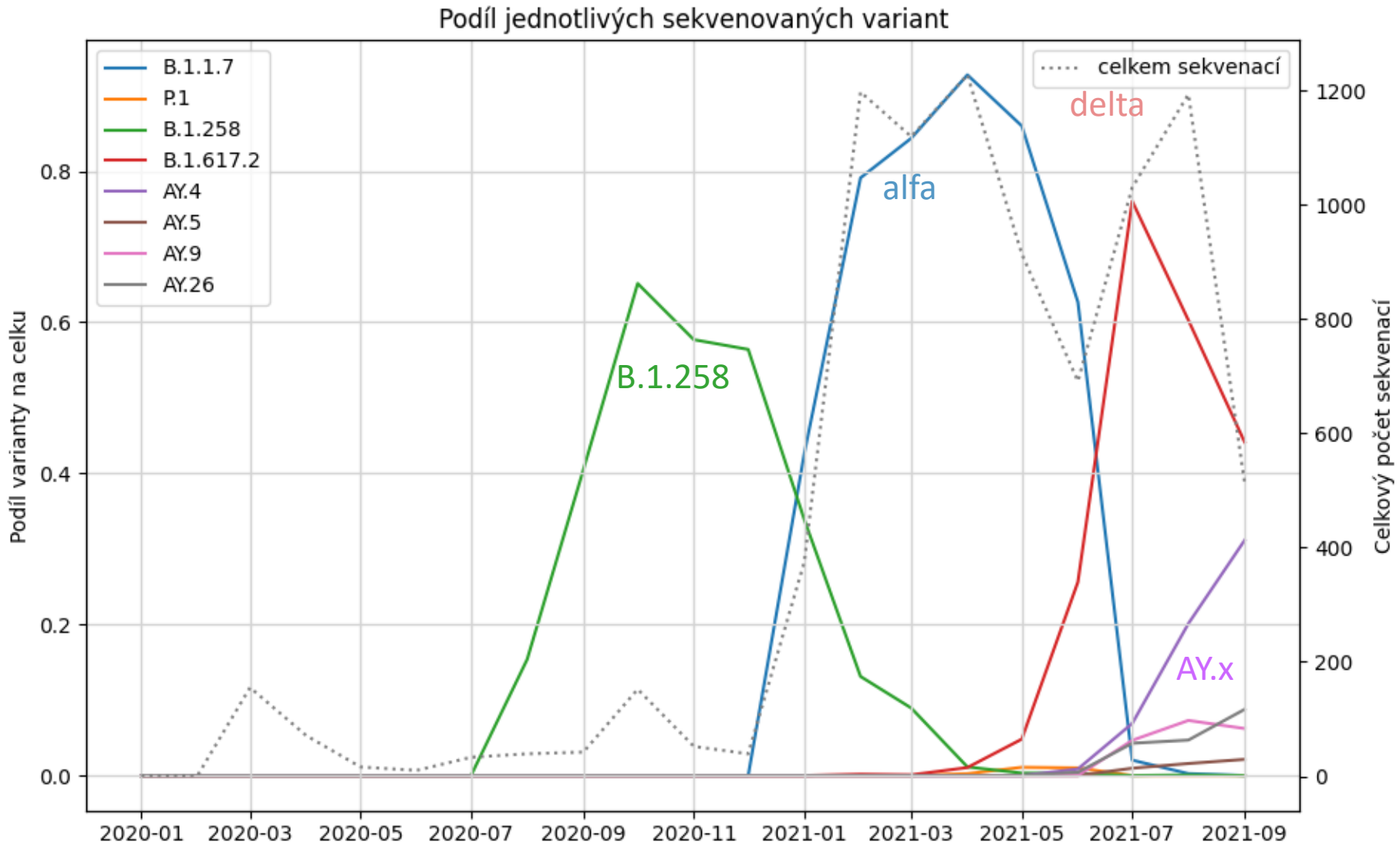
Diskriminační PCR:
Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků se téměř nemění. V případě, že laboratoř nevyšetřuje E484K a L452R v jedné reakci, lze detekci mutace zařadit do druhé reakce. Do úvahy dáváme doporučení na sledování K417N, která je charakteristická pro AY.1 (subvarianta vyštěpená z delty) a N501Y, která se rovněž u některých AY.x objevuje. Mutace K417N má podíl na vyšší transmisibilitě i escape charakteru.

1. **Minimum – vždy povinné L452R a E484K, vzhledem k tomu, že nedochází k dalšímu nárůstu detekcí E484K u L452R pozitivních vzorků, NRL stále doporučuje sledovat nejdříve L452R, vzorky, které tuto mutaci neobsahují posílejte na sekvenaci i bez upozornění UZIS na významný vzorek.**
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. WHO doporučení ze dne 9. srpna 2021 uvádí stejné preferenční mutace (str. 5).
Zdroj: https://apps.who.int/iris/handle/10665/343775

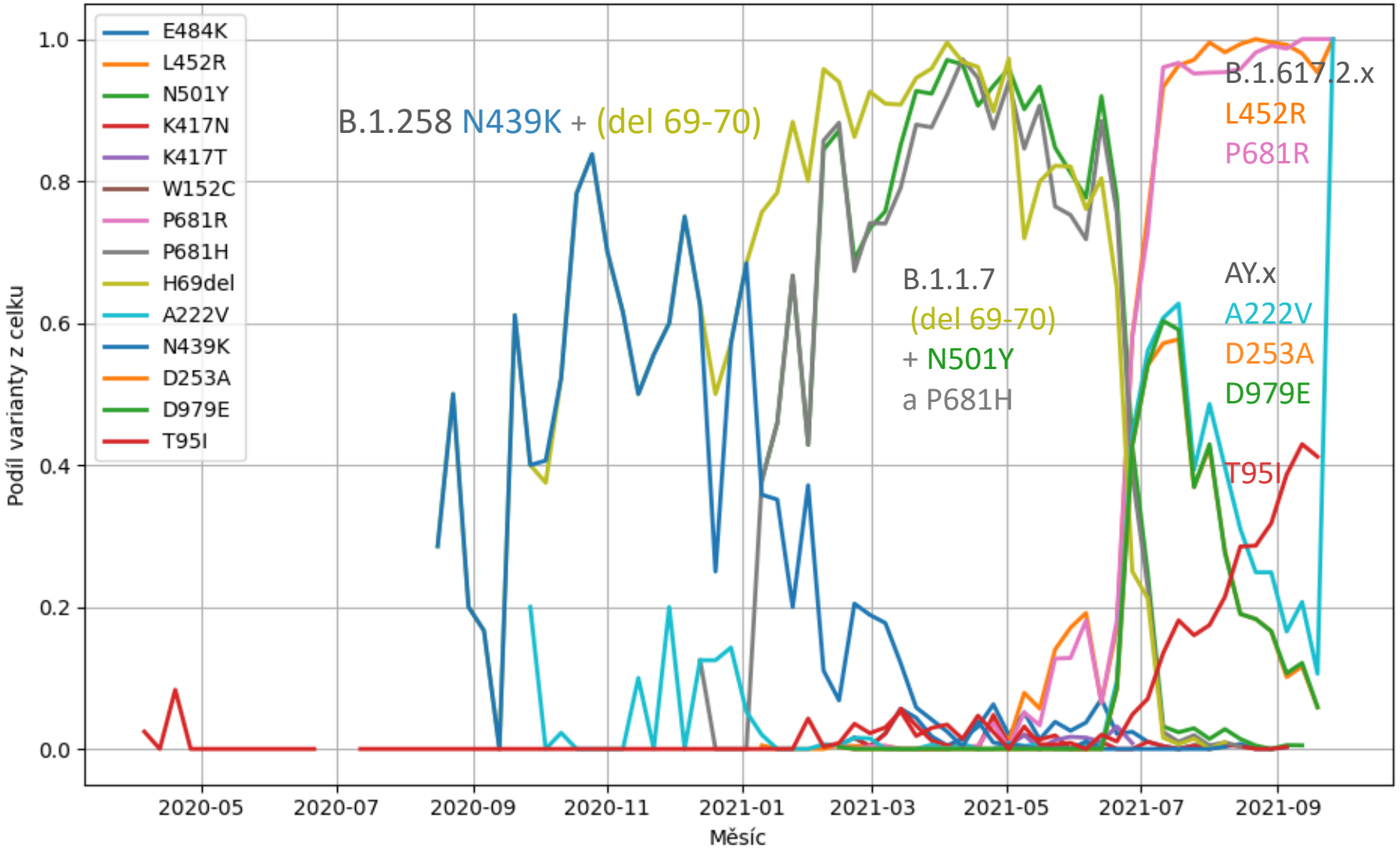
Podíl sekvenovaných variant SARS-CoV-2 dominantních v ČR od března 2020 do září 2021

Graf 4: Přehled významných sekvenovaných variant v ČR jako podíl z celku



Podíl dominantních mutací ve spike genu SARS-CoV-2 od března 2020

Graf č. 5: Podíly jednotlivých spike protein mutací ze všech sekvenací



Trend detekce mutací se od minulého týdne nezměnil.

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	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

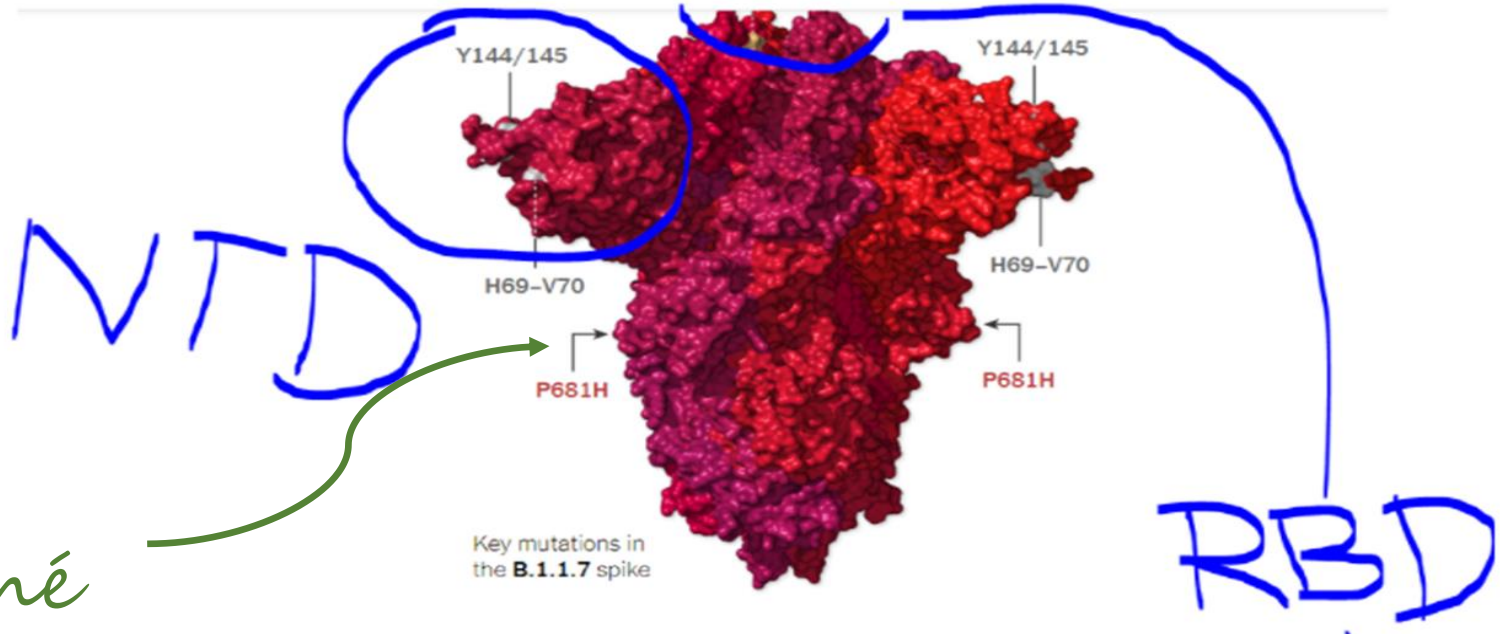
*VOC — variant of concern, VOI — variant of interest, VUM — variant under monitoring (dle ECDC)

Cílem není určit variantu, ale nalézt hot spot mutaci

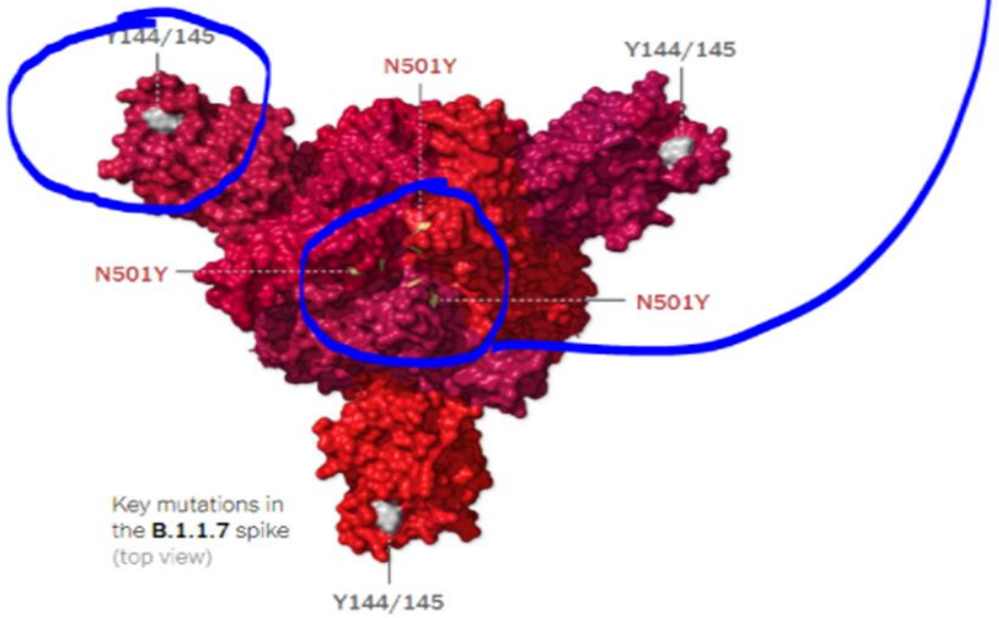
E484K/Q, N501Y, L452R/Q
K417N/T, P681H/R, E484Q,
delece 69-70.

T478K, L452Q, W152C, S477N

Furinové štěpné místo



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

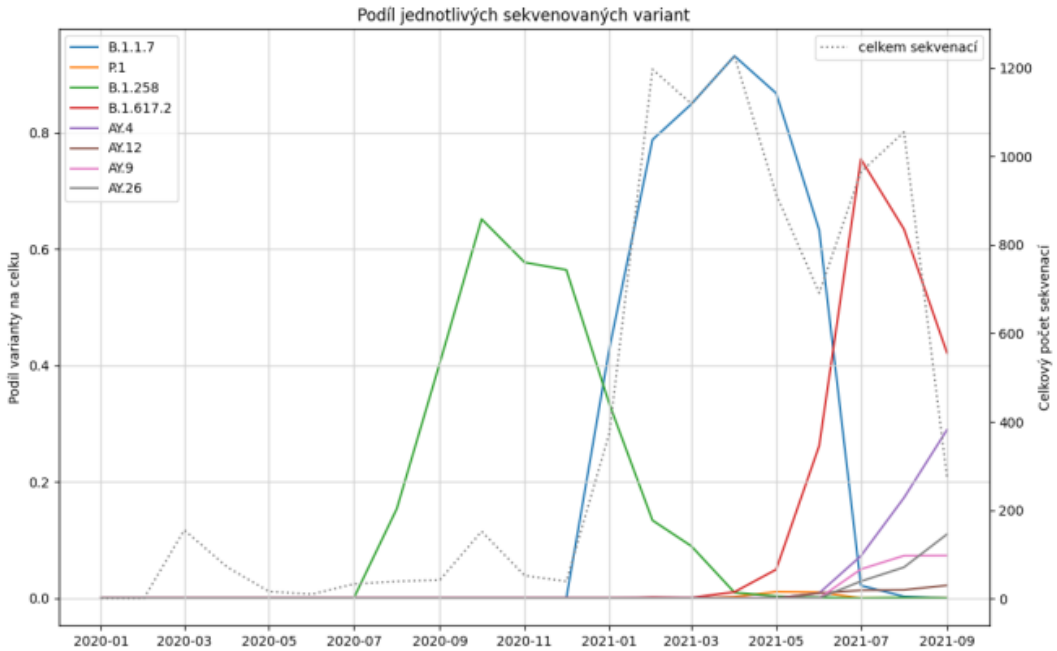


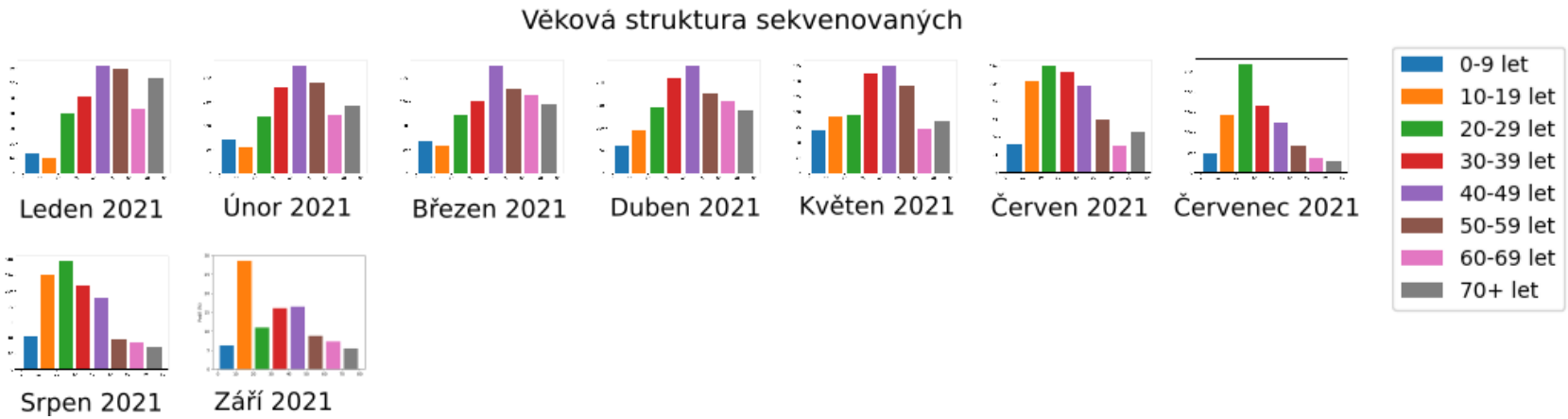
For more on the B.1.1.7 mutations, see: Inside the B.1.1.7

Věková struktura sekvenovaných v kontextu převažujících variant

Graf. č. 6: Věková struktura ve vztahu osekvenovaným vzorkům

V měsících lednu až květnu dominantní věkov skupina 40 – 49 let je od června nahrazen dominující skupinou 20 – 29 let, přičemž od srpn 2021 pozorujeme nárůst i mladších věkovýc skupin, především 10 – 19 let. Tento tren pravděpodobně kopíruje věkovou distribuc pozitivních detekcí a souvisí zřejmě s očkováním sociálním chováním.





You are viewing Sahil's screen View Options

Mapping of Reflex targets to VAM profiles

VAM Profile	Assay mutation profile					Additional rules
	N501Y	E484K	K417N	K417T	SGTF	
VOC-20DEC-02						
VOC-21JAN-02						
Unknown + E484K						
VOC-20DEC-01						Mutation present in N501Y or SGTF
Unknown	all other results					

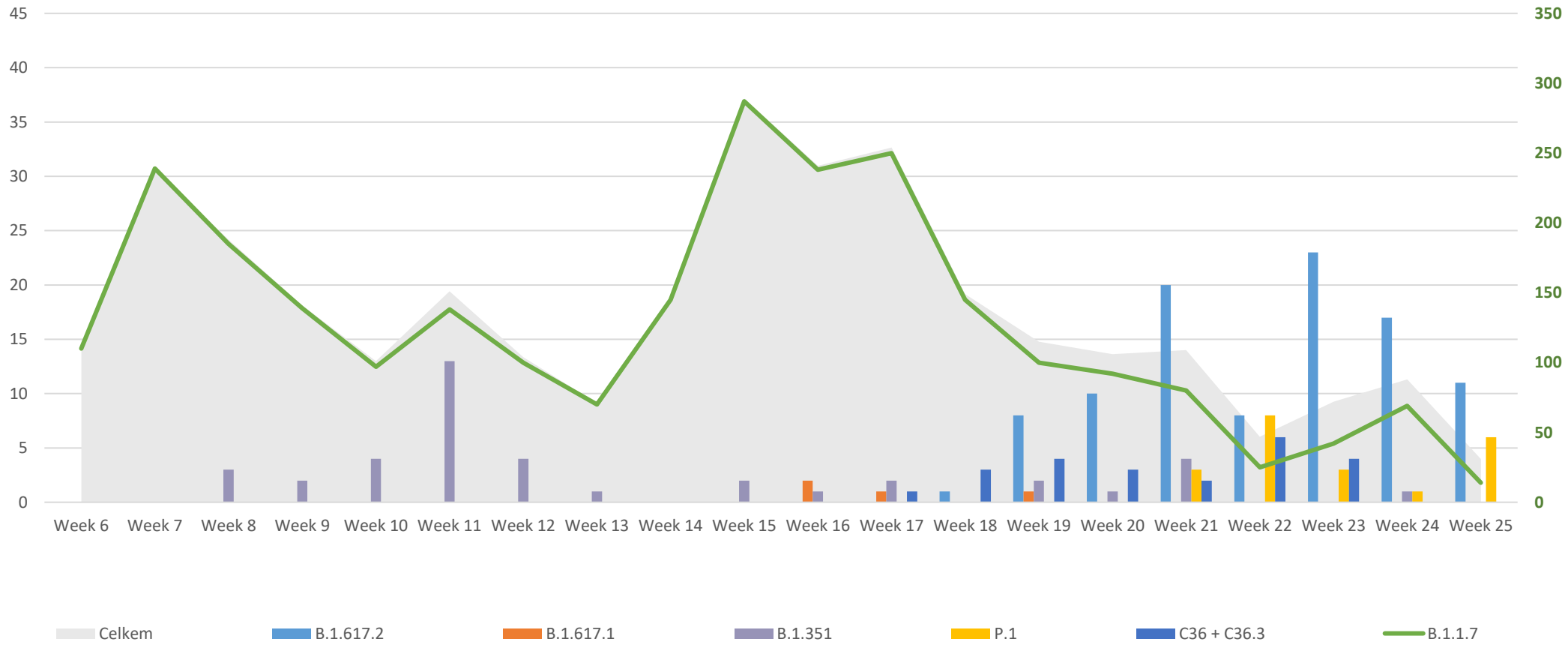
Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 mezi 1. 9. a 1. 10. 2021

Opět proběhla nomenklaturní reklasifikace, aktuálně je definováno 36 subvariant AY.x, přičemž v některých jsou již definovány další sublinie.

Tabulka 2:

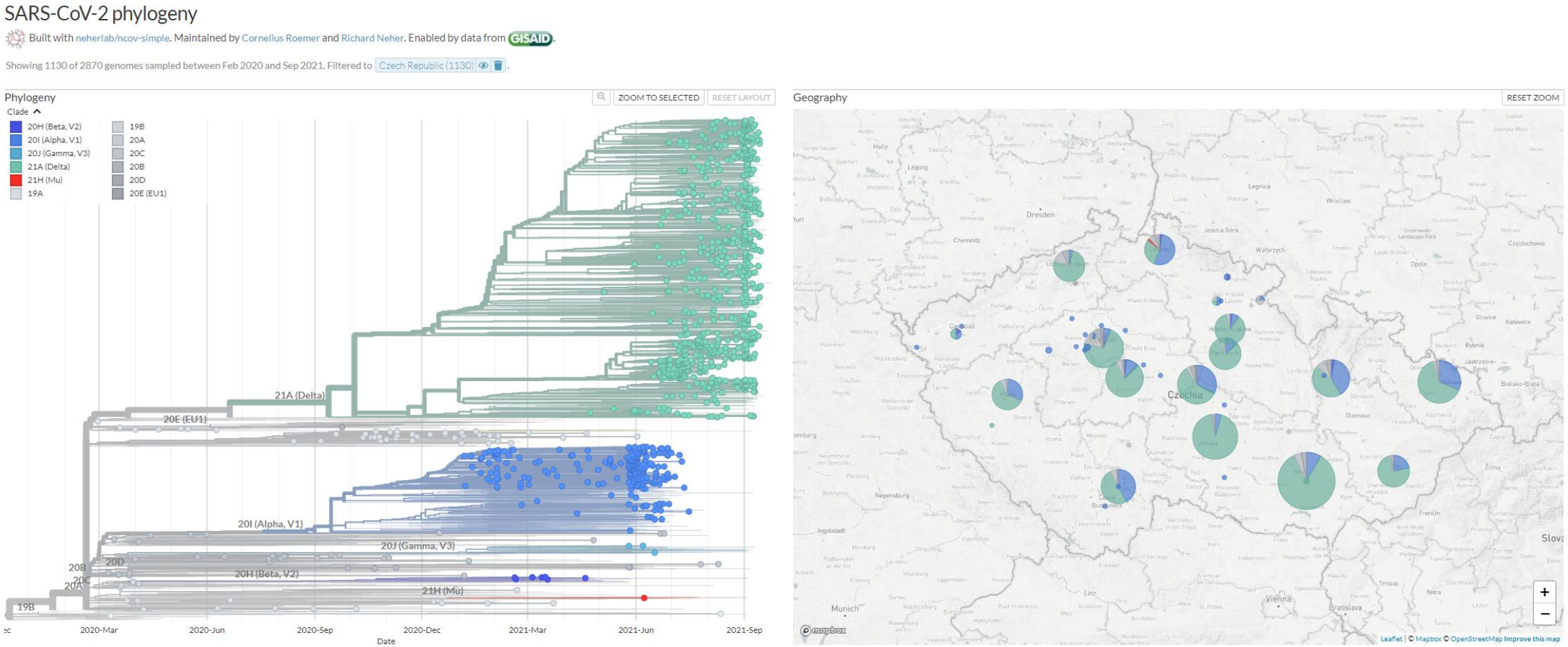
Varianta	Celkem	Podíl (%)	WHO název
B.1.617.2	227	44,16	Delta
AY.4	160	31,13	Delta+
AY.26	45	8,75	Delta+
AY.9	32	6,23	Delta+
AY.5	11	2,14	Delta+
AY.4.1	9	1,75	Delta+
AY.37	9	1,75	Delta+
AY.7.1	7	1,36	Delta+
AY.20	6	1,17	Delta+
AY.21	2	0,39	Delta+
AY.36	2	0,39	Delta+
AY.7.2	1	0,19	Delta+
AY.34	1	0,19	Delta+
AY.23	1	0,19	Delta+
AY.11	1	0,19	Delta+
Celkem	514	100	Delta+

Graf 1: Přehled detekovaných variant SARS – CoV-2 v ČR



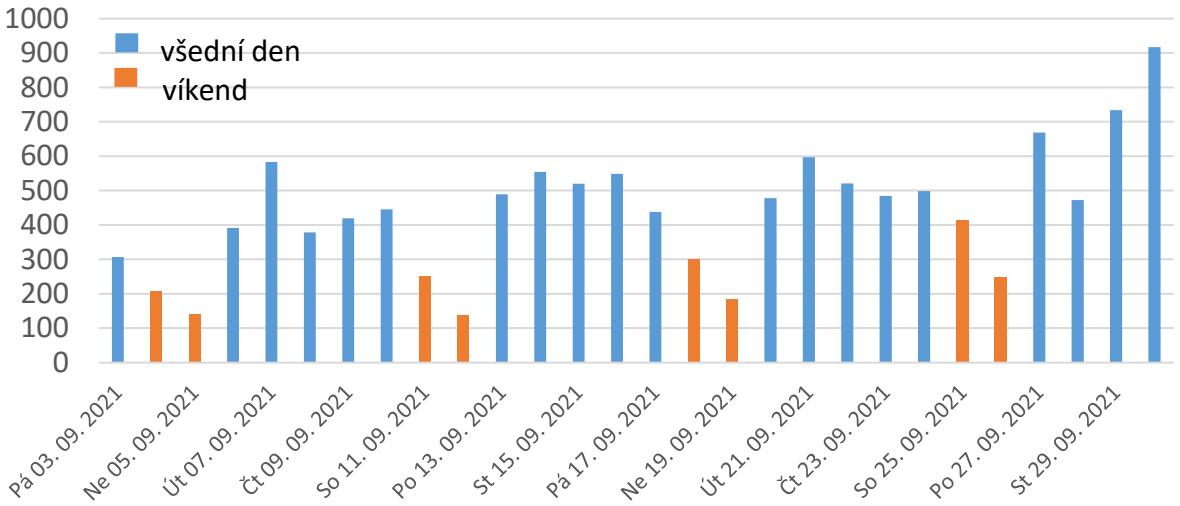
Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 mezi 1. 9. a 1. 10. 2021

Opět proběhla nomenklaturní reklasifikace, aktuálně je definováno 36 subvariant AY.x, přičemž v některých jsou již definovány další sublinie.

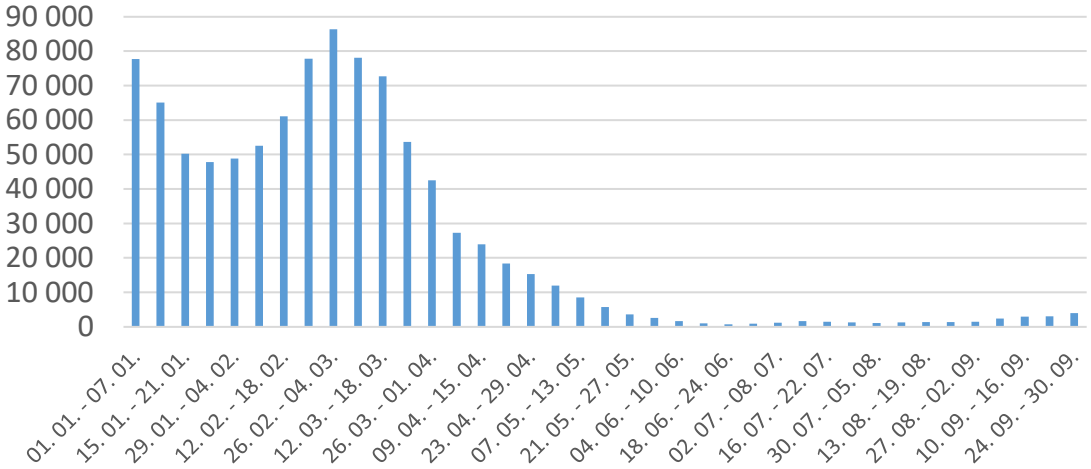


Souhrn a upozornění

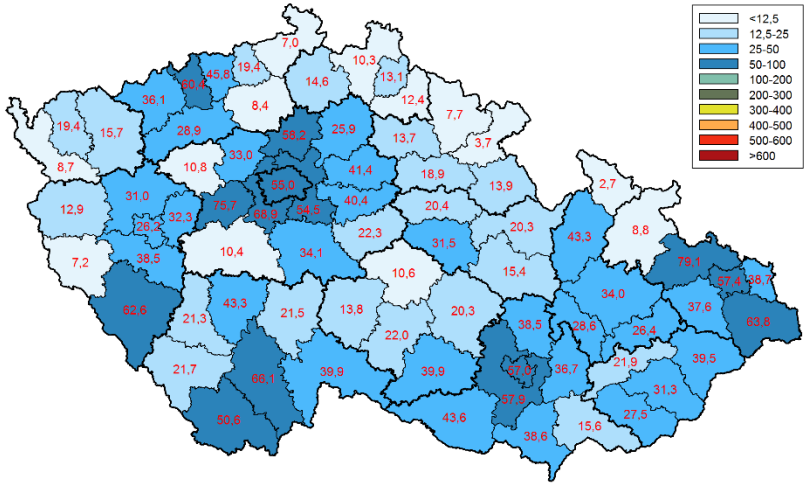
Graf 1: Počty případů covid-19 za posledních 28 dní



Graf 2: Týdenní počty případů covid-19 od 1. 1. 2021 do 30. 9. 2021



Graf 3: 7denní incidence na 100 000 obyvatel covid-19 dle okresů ke dni 30. 9. 2021



Odborná doporučení NRL. Diskriminační PCR

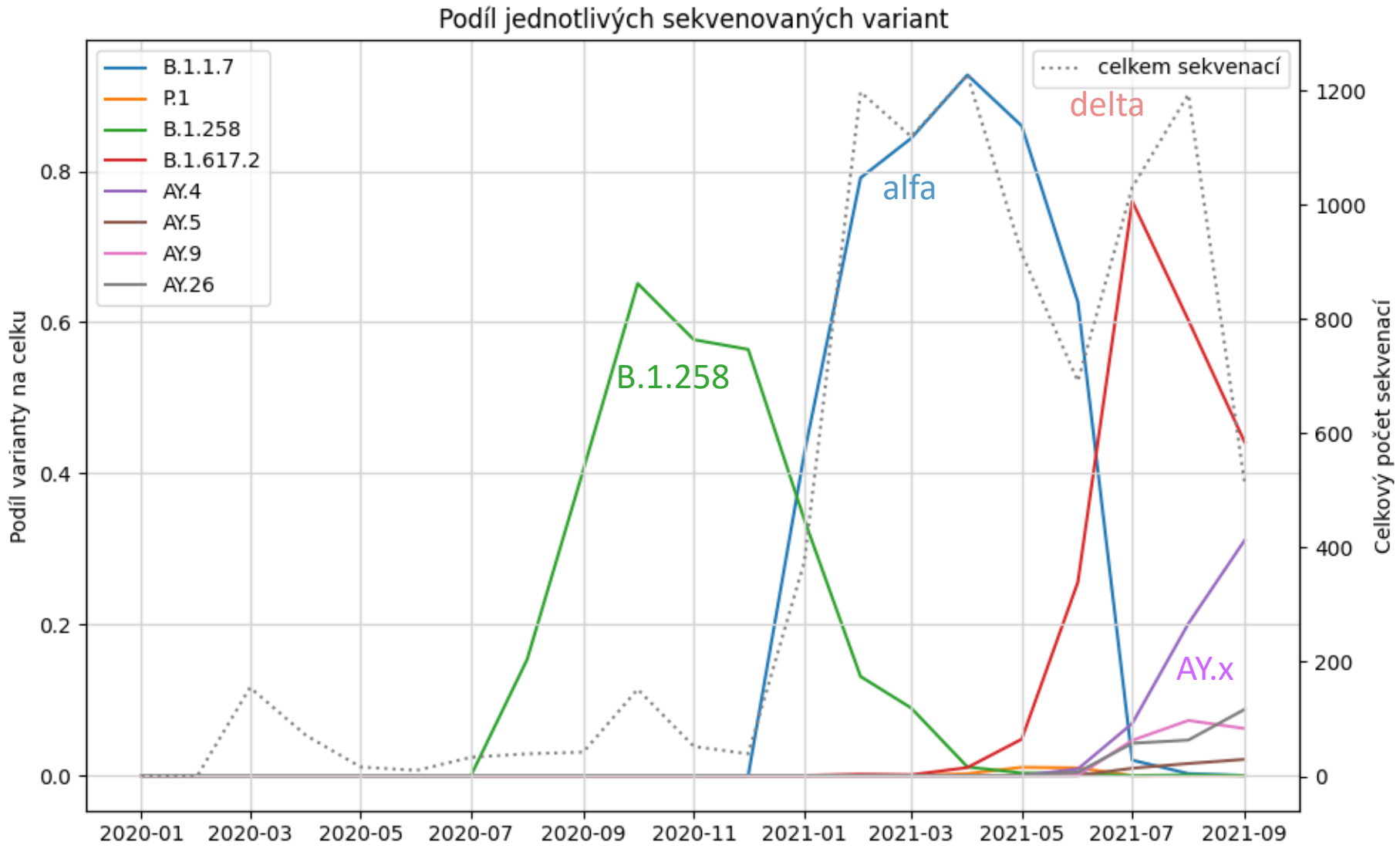
Diskriminační PCR:
Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků se téměř nemění. V případě, že laboratoř nevyšetřuje E484K a L452R v jedné reakci, lze detekci mutace zařadit do druhé reakce. Do úvahy dáváme doporučení na sledování K417N, která je charakteristická pro AY.1 (subvarianta vyštěpená z delty) a N501Y, která se rovněž u některých AY.x objevuje. Mutace K417N má podíl na vyšší transmisibilitě i escape charakteru.

1. **Minimum – vždy povinné L452R a E484K, vzhledem k tomu, že nedochází k dalšímu nárůstu detekcí E484K u L452R pozitivních vzorků, NRL stále doporučuje sledovat nejdříve L452R, vzorky, které tuto mutaci neobsahují posílejte na sekvenaci i bez upozornění UZIS na významný vzorek.**
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. WHO doporučení ze dne 9. srpna 2021 uvádí stejné preferenční mutace (str. 5).
Zdroj: https://apps.who.int/iris/handle/10665/343775

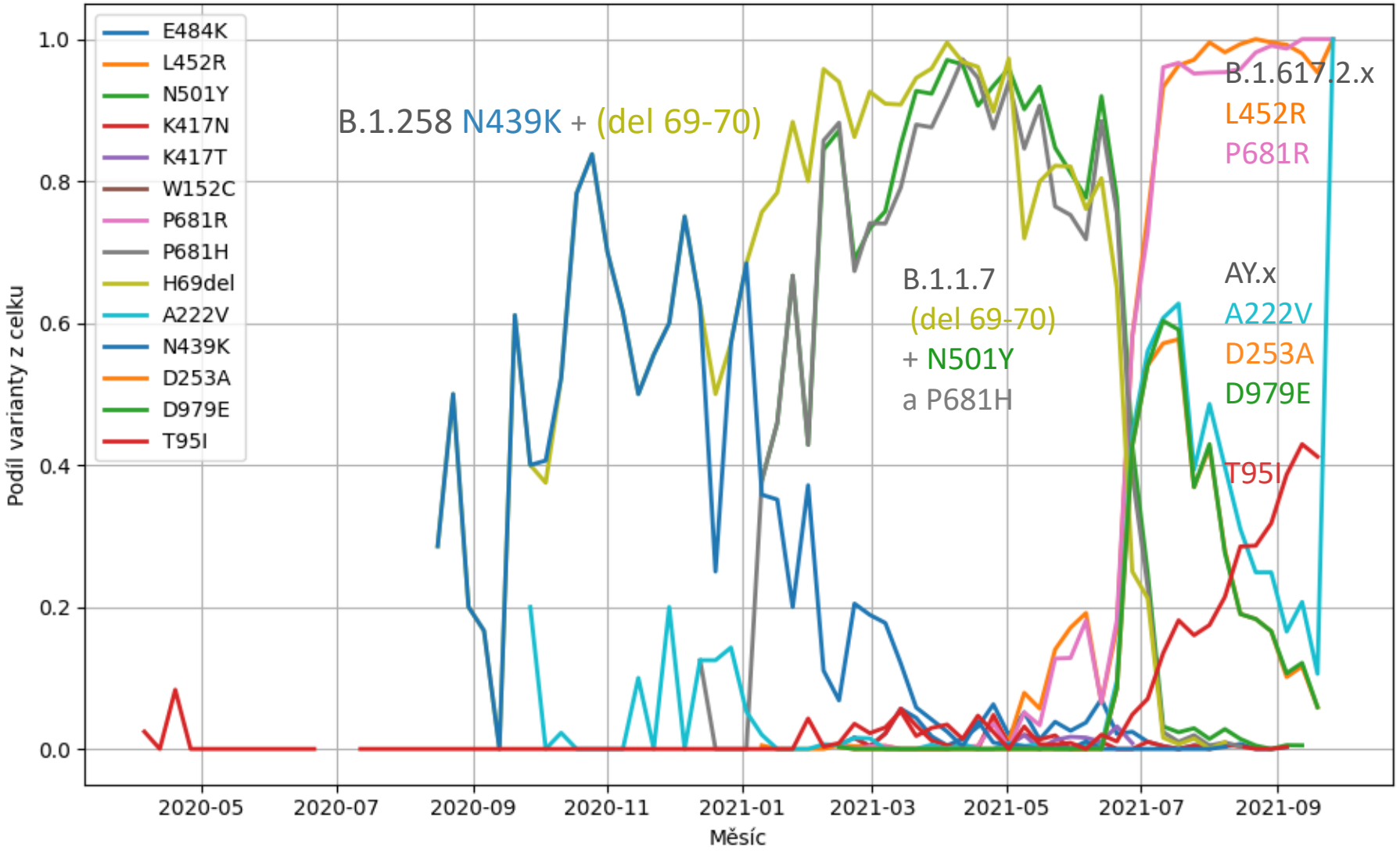
Podíl sekvenovaných variant SARS-CoV-2 dominantních v ČR od března 2020 do září 2021

Graf 4: Přehled významných sekvenovaných variant v ČR jako podíl z celku



Podíl dominantních mutací ve spike genu SARS-CoV-2 od března 2020

Graf č. 5: Podíly jednotlivých spike protein mutací ze všech sekvenací

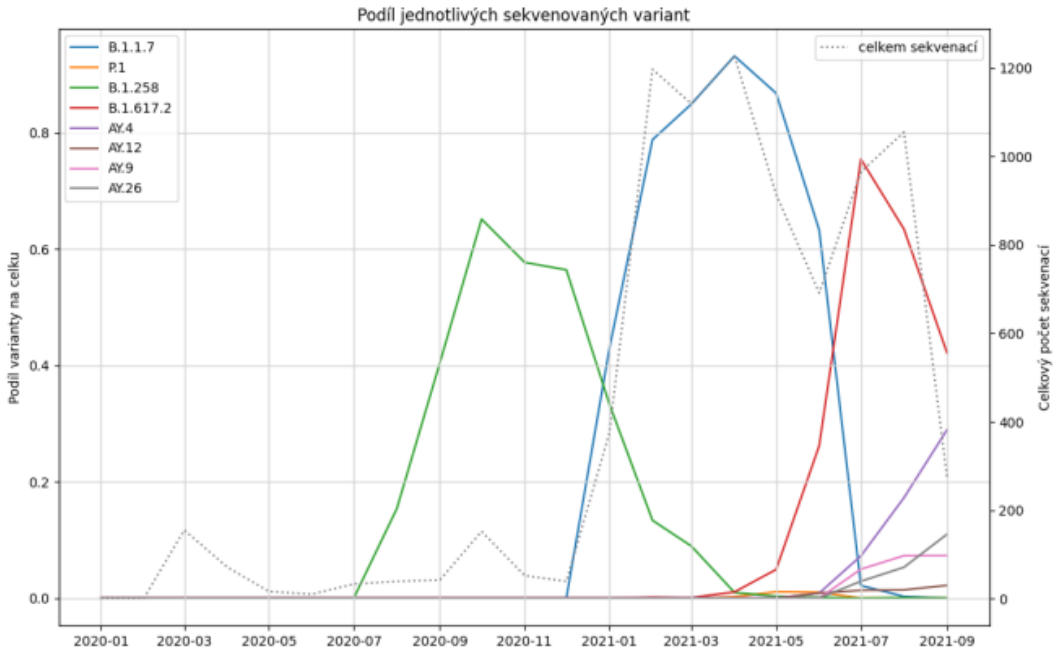


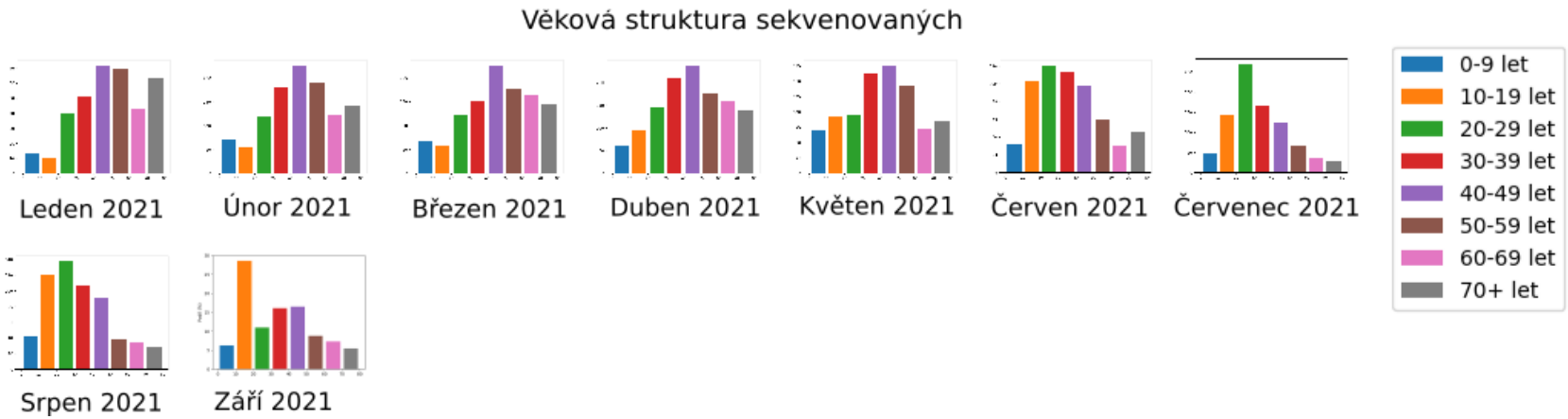
Trend detekce mutací se od minulého týdne nezměnil.

Věková struktura sekvenovaných v kontextu převažujících variant

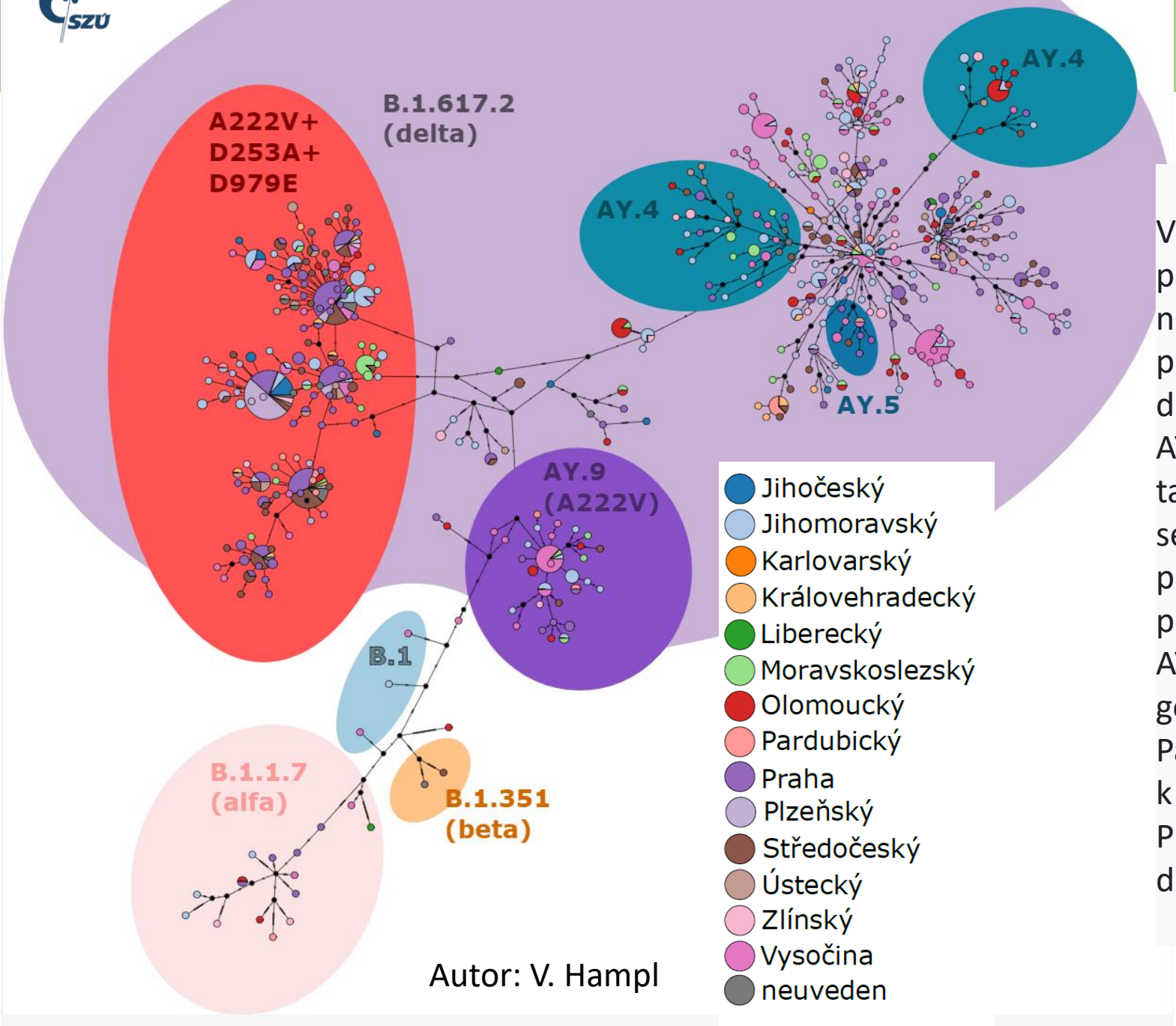
Graf. č. 6: Věková struktura ve vztahu osekvenovaným vzorkům

V měsících lednu až květnu dominantní věkov skupina 40 – 49 let je od června nahrazen dominující skupinou 20 – 29 let, přičemž od srpn 2021 pozorujeme nárůst i mladších věkovýc skupin, především 10 – 19 let. Tento tren pravděpodobně kopíruje věkovou distribuc pozitivních detekcí a souvisí zřejmě s očkováním sociálním chováním.





Haplotype analysis network
909 WGS 2.7.2021 – 31.8. 2021



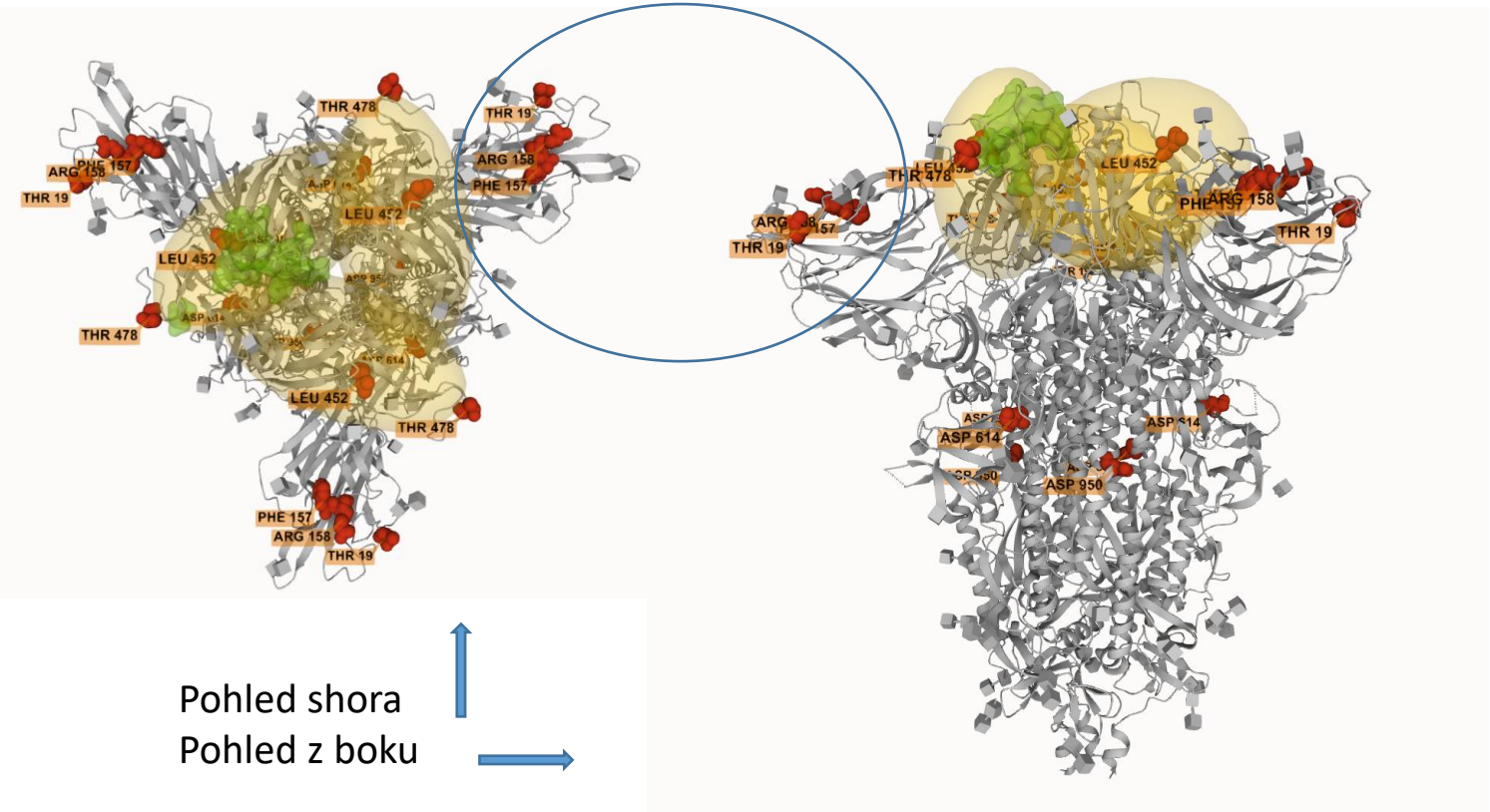
Autor: V. Hampl

V síti jsou místy viditelné malé klastry specifické pro region, ale jejich tvorba je ovlivněna nerovnoměrností odběru vzorků. Zbytek sítě představuje vzorky náležející do odlišné varianty dominantní delty (B.1.617.2) a jejích podskupin AY.4, 5 a 9. Podskupiny AY.12 a AY.21 jsou v síti také přítomny, ale netvoří klastry. Za zmínku stojí seskupení v levé části sítě označené červeně, což představuje vzorky sdílející mutace špičkového proteinu A222V (definující mutace podskupiny AY.9), ale také mutace D253A + D979E. Tyto genotypy nebyly identifikovány algoritmem Pangolin jako AY.9, ale pravděpodobně ještě dojde k nomenklaturním změnám v AY.x taxonomii. Proto je třeba sekvenovat i vzorky určené diskriminační PCR jako delta.

Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 za srpen 2021

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

Aminokyselinové substituce charakteristické pro B,617,2 (delta)



Pohled shora
Pohled z boku

Modře označena N terminální doména
Žlutě vazebné místo

https://molstar.org/

Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 mezi 1. 9. a 1. 10. 2021

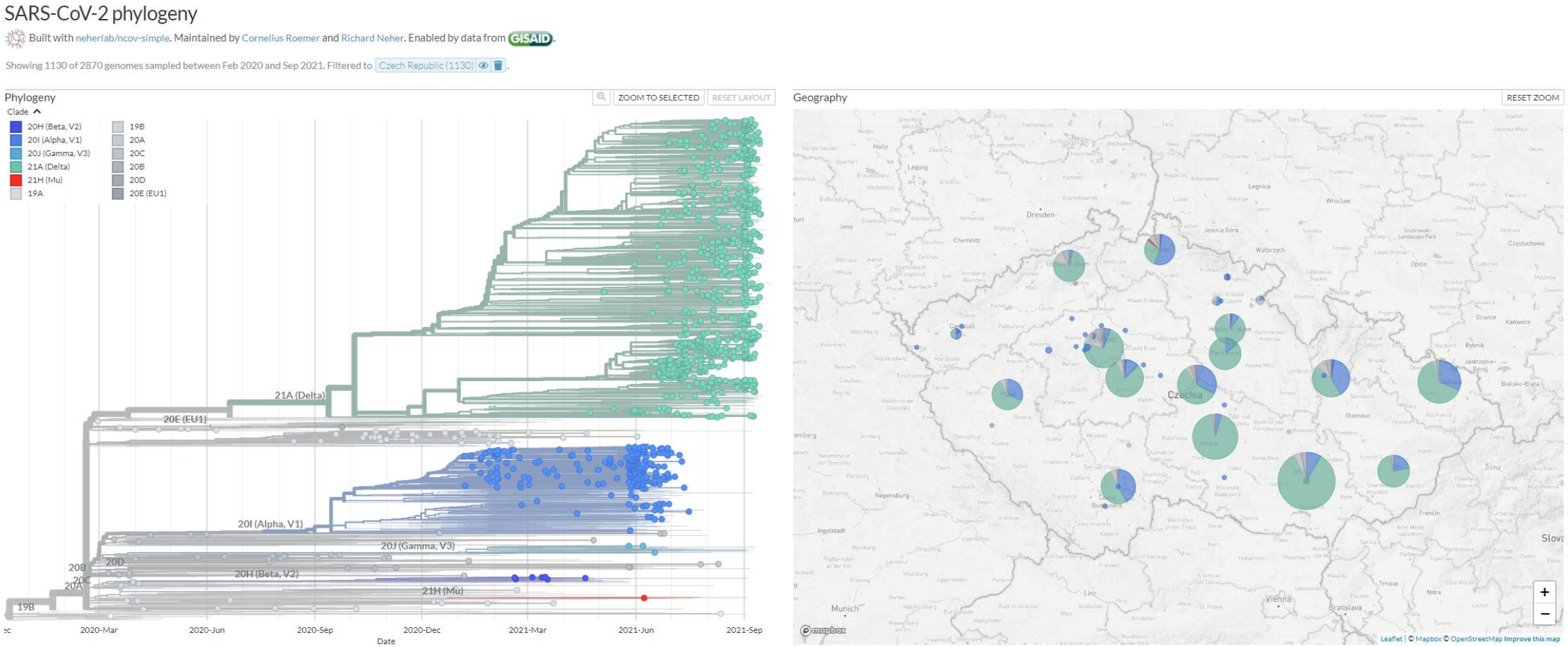
Opět proběhla nomenklaturní reklasifikace, aktuálně je definováno 36 subvariant AY.x, přičemž v některých jsou již definovány další sublinie.

Tabulka 2:

Varianta	Celkem	Podíl (%)	WHO název
B.1.617.2	227	44,16	Delta
AY.4	160	31,13	Delta+
AY.26	45	8,75	Delta+
AY.9	32	6,23	Delta+
AY.5	11	2,14	Delta+
AY.4.1	9	1,75	Delta+
AY.37	9	1,75	Delta+
AY.7.1	7	1,36	Delta+
AY.20	6	1,17	Delta+
AY.21	2	0,39	Delta+
AY.36	2	0,39	Delta+
AY.7.2	1	0,19	Delta+
AY.34	1	0,19	Delta+
AY.23	1	0,19	Delta+
AY.11	1	0,19	Delta+
Celkem	514	100	Delta+

Přehled WGS detekovaných variant SARS-CoV-2 mezi 1. 9. a 1. 10. 2021

Opět proběhla nomenklaturní reklasifikace, aktuálně je definováno 36 subvariant AY.x, přičemž v některých jsou již definovány další sublinie.



Poděkování kolegům spolupodílejících se na celogenomové sekvenaci SARS-CoV-2

Jaromíra Večeřová

Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění, SZU

Lenka Černíková

Laboratoř molekulární biologie, SVU Praha

……a celému týmu NRL pro chřipku a nechřipku, týmu NRL pro enteroviry SZU a týmu laboratoře SVU za poskytnutí časového prostoru pro WGS

Project „Enhancing Whole Genome Sequencing (WGS) and/or Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) national infrastructures and capacities to respond to the Covid-19 pandemic in the European Union and European Economic Area“ had received funding from the European Centre for Disease Prevention and Control under the Grant Agreement number ECDC/HERA/2021/004 ECD.12218.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL

More information about the project: http://www.szu.cz/ecdc-1

NOTE:

Information included reflects only the authors‘ view and the Centre (ECDC) is not responsible for any use that may be made of the information it contains.