



Podrobná zpráva ke dni 27. 8. 2021

Charakterizace viru SARS-CoV-2 v České republice dle diskriminačních PCR a celogenomové sekvenace

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

Úvod:

NRL pravidelně analyzuje data a poskytuje MZČR i laboratořím týdenní přehledový dokument, jehož cílem je monitorovat šíření variant SARS-CoV-2, které se na území ČR vyskytují, poskytovat informace o nových potenciálních i reálných rizicích v souvislosti s šířením a evolucí viru SARS-CoV-2, poskytovat metodické pokyny vyšetřujícím laboratořím a poskytovat další kvalitativní i kvantitativní informace s cílem připravit na datech založené poklady pro laboratorní šetření a adekvátní nastavení protiepidemických opatření v ČR.

Obsah:

Souhrn	Strana 2
Vyhodnocení dat z diskriminační PCR	Strana 3
Odborná doporučení NRL a WHO	Strana 4 - 6
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 7 - 11
Závěr	Strana 12

- V rámci diskriminačních PCR bylo dle celorepublikových dat dostupných ve sledovaném 14-denním období od 13. 8. do 27. 8. 2021 vyšetřeno a nahlášeno do ISIN 2 236 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků (tabulka 1). Suspektní záchyt varianty delta činí ve sledovaném období kolem 95 %.
- Za období 1. 3. 2020 až 27. 8. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno celkem 7 209 SARS CoV-2 pozitivních vzorků, zdrojem jsou interní data NRL a mezinárodní platforma GISAID. V posledním týdnu bylo osekvenováno 439 vzorků, 341 WGS se vztahuje k datu odběru v srpnu.

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

Tabulka 1: Přehled důležitých sad mutací

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

V poslední době se objevují v rámci delta varianty nové kombinace mutací, např. N501Y a E484K, tyto kombinace byly v ČR detekovány v rámci diskriminačních PCR i sekvenace (N501Y) nebo pouze v rámci diskriminačních PCR (E484K). Na výskyt E484K u některých případů delta varianty upozorňuje i Švédsko v rámci interní komunikace zemí EU/EEA.

Diskriminační PCR:

Odborná doporučení NRL pro diskriminační PCR SARS-CoV-2 pozitivních vzorků se nemění. V případě, že laboratoř nevyšetřuje E484K a L452R v jedné reakci, doporučujeme jako první zařadit master mix obsahující próbu pro detekci L452R. Pokud je detekována jedna z těchto mutací jako pozitivní, není aktuálně nutné stanovovat E484K v další PCR. Do úvahy dáváme doporučení na sledování K417N, která je charakteristická pro AY.1 (subvarianta vyštěpená z delty). Tato mutace má podíl na vyšší transmisibilitě i escape charakteru.

- 1. Minimum – vždy povinné: E484K a L452R**
- 2. Možnost : E484K a L452R a N501Y**
- 3. Možnost : E484K a L452R a N501Y a K417N**
- 4. Možnost : E484K, L452R, N501Y, K417N a P681R**

Doporučení se mohou měnit v souvislosti se změnami SARS-CoV-2 a s epidemickou situací. WHO doporučení ze dne 9. srpna 2021 uvádí stejné preferenční mutace (str. 5).

Zdroj file:///C:/Users/sekvenace.orsevn/Downloads/WHO-2019-nCoV-surveillance-variants-2021.1-eng.pdf

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

Dle fylogenetické analýzy a analýzy v nextclade doporučuje NRL tyto WGS revidovat na předchozí straně označené vzorky.

Při zadávání do GISAID je třeba dodržovat následující pravidla:

Pole „Location“ uvádět kraj takto:



South Bohemian Region
South Moravian Region
Hradec Králove Region
Karlovy Vary Region
Liberec Region
Moravian-Silesian Region
Olomouc Region
Pardubice Region
Pilsen Region
Central Bohemian Region
Ustecky Region
Vysocina Region
Zlín Region
Prague Region

Do jména sekvence uvádět akronym laboratoře:



Například:

hCoV-19/Czech Republic/**UMTM**239717/2021
hCoV-19/Czech Republic/**CSQ**0217/2021

GHC	GHC
BP	Bioptická laboratoř
KNL	Krajská nemocnice Liberec
FNP	Fakultní nemocnice Plzeň
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FNO	Fakultní nemocnice Ostrava
CSQ	Fakultní nemocnice Brno

Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

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

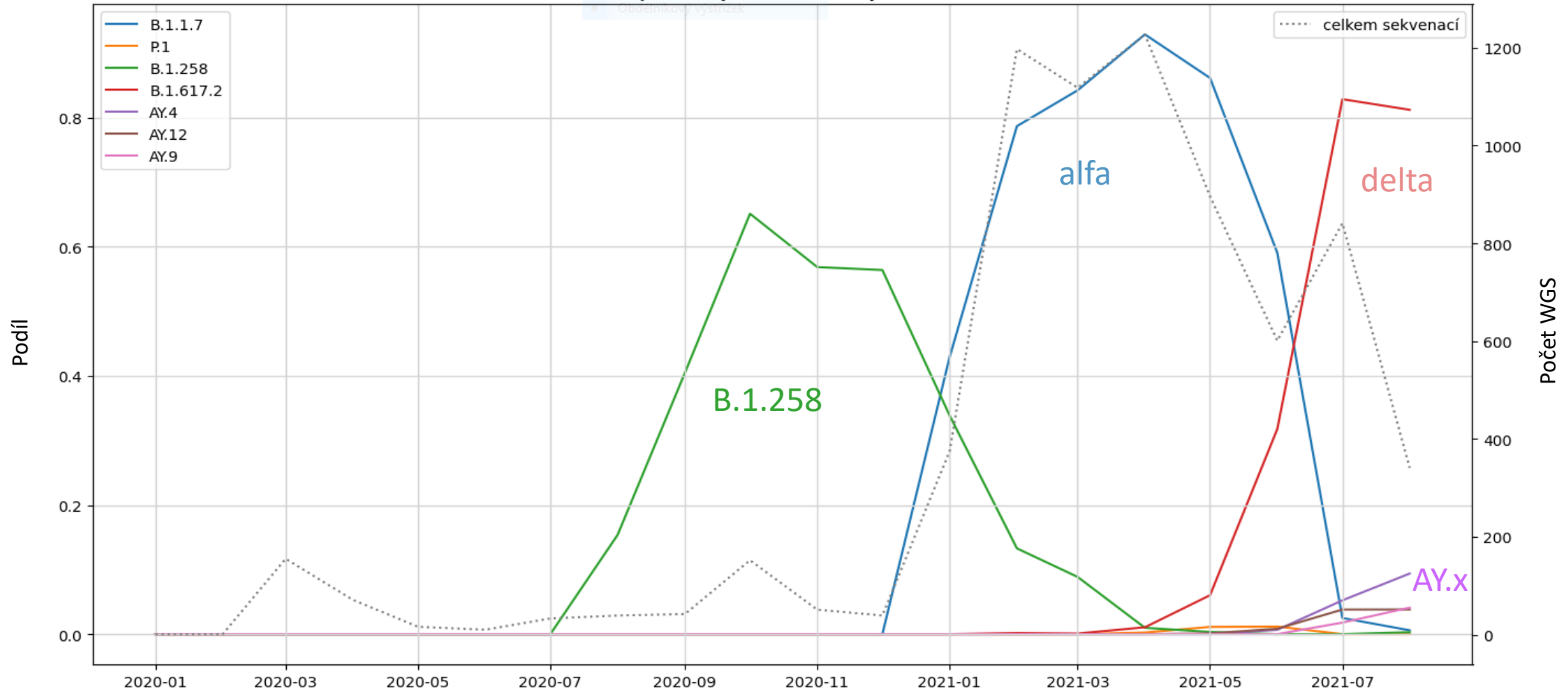
Podíl původní varianty delta je v měsíci srpnu 81,2 %. Nově zaznamenáváme dle celogenomové sekvenace nárůst subvariant delta - AY.12, AY.4 a AY.9, které se šíří například v Izraeli (dominance AY.12), v USA či Spojeném království a dalších zemích včetně ČR (viz tab. 2). Podíl subvarianty AY.4 za měsíc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

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

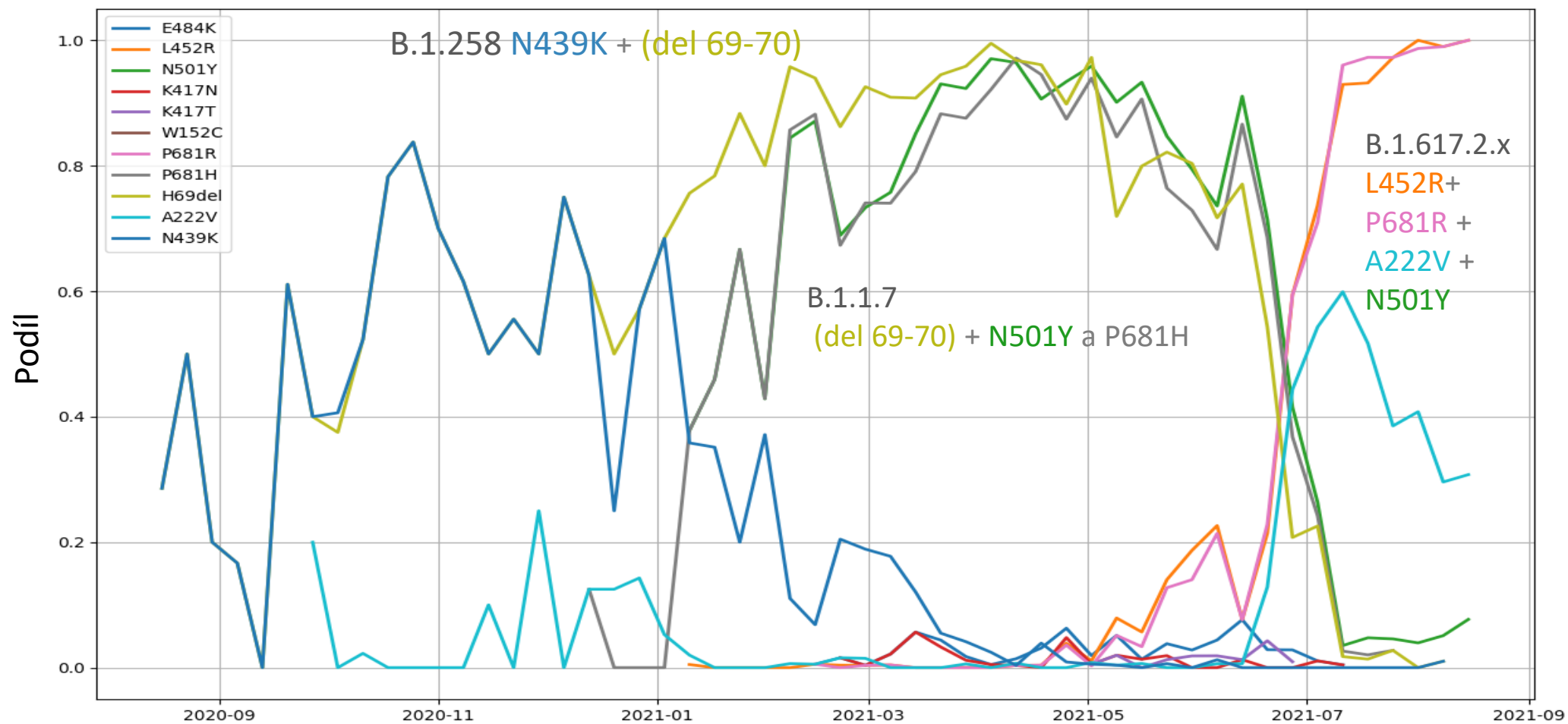
Tabulka 2. Přehled detekcí AY.x (delta +) dle krajů

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

Z grafu je vidět počínající nárůst AY.4, AY.12 a AY.9

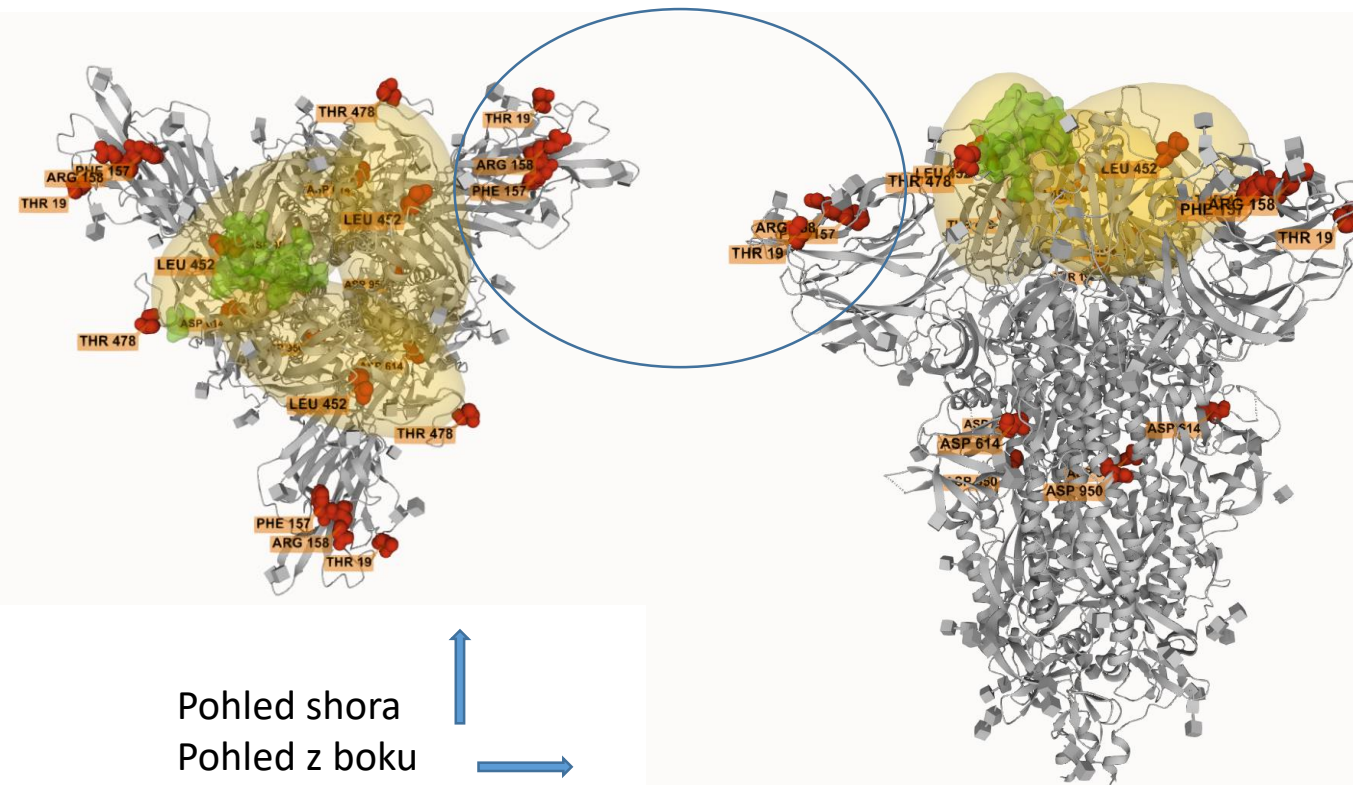


Podíl dominantních mutací ve spike genu SARS-CoV-2 od března 2020



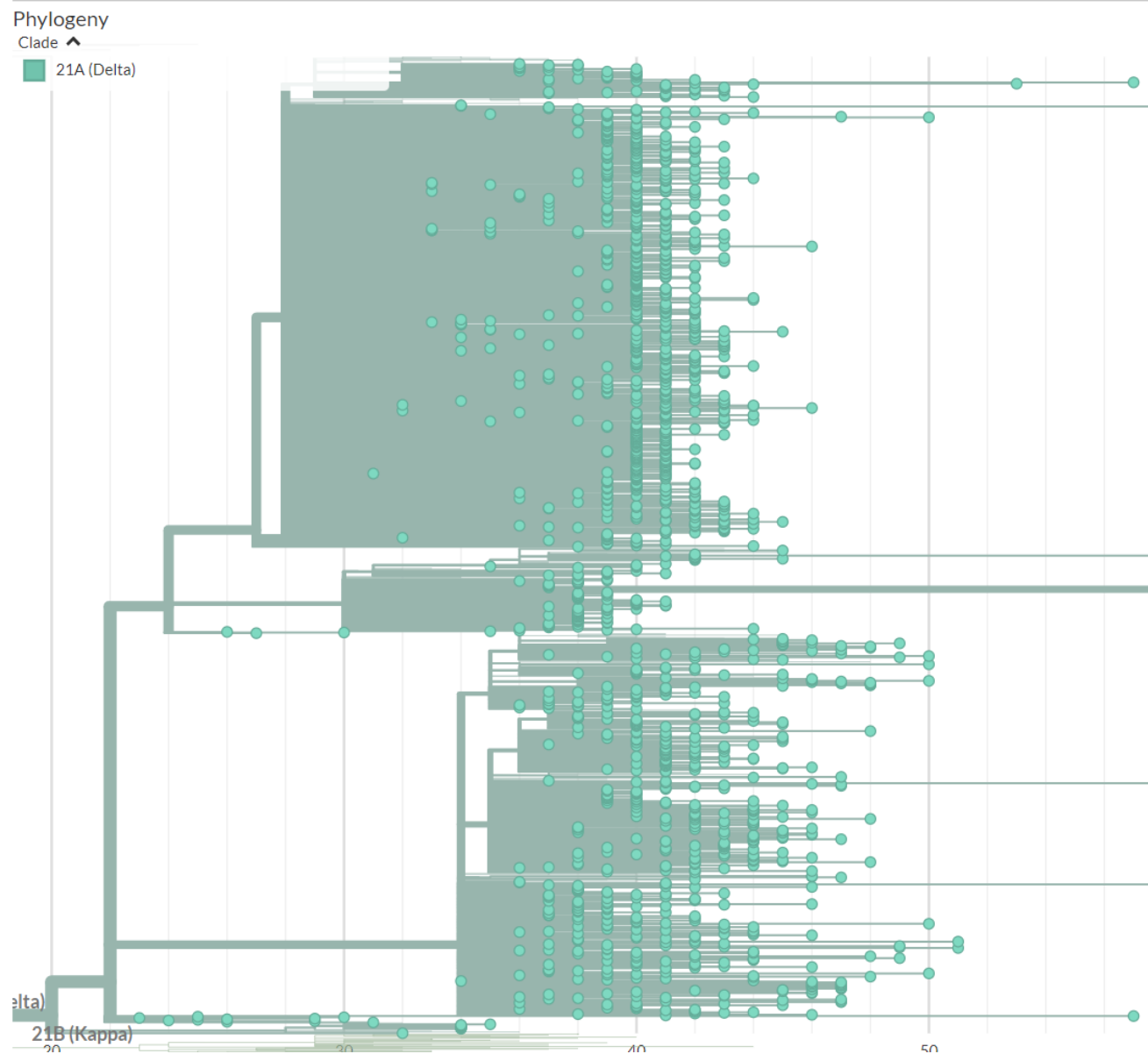
VOC	Varianta	Počet
delta+	AY.12	13
delta+	AY.4	32
delta+	AY.6	1
delta+	AY.9	14
alfa	B.1.1.7	2
	B.1.258	1
beta	B.1.351	1
delta	B.1.617.2	277
Celkem		341

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



<https://molstar.org/>

Fylogenetický strom delta variant SARS-CoV-2 (1 480 WGS)



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

Prioritní mutace ke sledování v rámci diskriminačních PCR jsou shodná v doporučeních WHO a NRL a zahrnují tyto aminokyselinové substituce ve spike proteinu L452R, E484K, N51Y, P681R a K417N.

Vzorků se srpnovým datem odběru bylo sekvenováno 341. Na variantu delta připadá 98,4 % vzorků, z toho je 81,2 % původní varianta delta(B.1.617.2) a výskyt subvarianty AY.4, AY.12 a AY.9 je 9,2%, respektive 3,8% a 4,1%.

Na základě kombinovaných dat z diskriminační PCR za posledních 14 dnů a celogenomové sekvenace SARS-CoV-2 za srpen je zřejmé, že stále přetrvává dominance varianty delta. Narůstá podíl subvariant delty AY.4, AY.12 a AY.9, které jsou pravděpodobně zodpovědné za nárůsty počtu pozitivně testovaných i v dalších zemích. V souvislosti s šířením delta varianty a její poměrně rychlou diverzifikací (viz graf na str.7) lze usuzovat na viditelné působení selekčního evolučního tlaku. V této souvislosti dochází ke konvergentnímu znovuobjevení některých mutací (viz graf na str. 8), které byly typické pro jiné varianty, např. N501Y (alfa), E484K (beta, gama) případně A222V (20A.EU1). Na výskyt E484K u některých případů delta varianty upozorňuje i Švédsko. Tyto mutace jsou cíleny většinou do vazebné oblasti (RBD-S1) nebo do N terminální oblasti spike proteinu. U varianty delta, včetně AY.x subvariant, se objevují mutace i v dalších genech, které kódují například polymerázový komplex a mohou tak ovlivňovat životní cyklus viru a tedy i nepřímo přispívat k transmisibilitě.