



Podrobná zpráva ke dni 6. 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	Strana 4
Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace	Strana 5 - 9
Závěr	Strana 10
Užitečné odkazy a příloha	Strana 11

- V rámci diskriminačních PCR bylo dle celorepublikových dat dostupných ve sledovaném 14-denním období od 23. 7. do 6. 8. 2021 vyšetřeno a nahlášeno do ISIN 1787 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků (tabulka 1). Některé laboratoře ještě nemají export dořešen, přestože vyšetřují v souladu s doporučením NRL a dle pokynu MZ. Suspektní záchyt varianty delta činí ve sledovaném období více než 90 %.
- Za rok 2021 bylo k 6. 8. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 6 155 SARS-CoV-2 pozitivních vzorků, z toho 651 náleželo Česko-Saské přeshraniční spolupráci, která není součástí Národní molekulárně biologické strategie, zdrojem dat je mezinárodní platforma GISAID. V posledním týdnu bylo osekvenováno 376 vzorků, dva v Centru molekulární biologie a genetiky FN Brno, 155 v SVU a 219 v NRL.

V období od 23. 7. do 6. 8. 2021 má NRL k dispozici data z 1787 provedených testů diskriminační PCR, které byly nahlášený do ISIN ze 66 laboratoří v ČR. Na základě analýzy těchto dat NRL zjistila, že delta varianta je přítomná přinejmenším v 90 % SARS-CoV-2 pozitivních případů vyšetřených diskriminační PCR. Varianta alfa je přítomná u necelých 4 % vzorků. Ostatní varianty mají velmi malý podíl odpovídající méně než jednomu procentu vzorků. Varianta AY.1 (delta +) není jednoznačně detekována v žádné z laboratoří.

Přehled důležitých sad mutací uvádíme v následujících doporučeních (strany 4 – 6).

Tabulka 1: Přehled vyhodnocení diskriminačních PCR

Mutace	Celkem	Z toho pozitivních	Podíl ze sady	Interpretace (pouze suspektní varianta)
L452R+	1211	1101	90%	delta
P681R+	394	364	92,3%	delta
N501Y+, E484K+	526	2	<1%	beta, gama, alfa E484K+
E484K-, N501Y-	526	513	97,5%	delta
N501Y+, E484K-	526	12	2,3%	alfa
A570D+	530	19	3,6%	alfa

Diskriminační PVT:

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.

Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace (WGS):

Za rok 2021 bylo k 6. 8. 2021 v ČR celogenomově sekvenováno 6 155 SARS CoV-2 pozitivních vzorků, z toho 651 náleželo Česko-Saské přeshraniční spolupráci, která není součástí Národní molekulárně biologické strategie, zdrojem dat je mezinárodní platforma GISAID. V posledním týdnu bylo osekvenováno 376 vzorků, dva v Centru molekulární biologie a genetiky FN Brno, 155 v SVU a 219 v NRL.

Nově byla definována subvarianta delty jako AY.3, která je charakterizována mutacemi v otevřeném čtecím rámci 1a a 1b, tedy v nestrukturálních genech kódujících většinou subjednotky polymerázového komplexu. Mutace jsou uvedeny na obr. 1 - 3, strany 5 a 6. Mutace ve spike proteinu jsou stejné jako u původní delta varianty. Tato varianta byla zpětnou analýzou sekvenčních dat potvrzena u 19 vzorků (tabulka 3, str. 8). Přehled detekovaných variant v ČR uvádí graf na straně 9.

Obr1



Vyhodnocení dat z celogenomové sekvenace AY.3 subvarianta delta - mutace v ORF1a a ORF1b

Obr2

ORF1a



Obr 2

ORF1b



- **Delta** - B.1.617.2 včetně AY.3, celkem 773 případů, 330 sekvenovaných v aktuálním týdnu
- **AY.1** (Delta+K417N) : 2 případy (Jihomoravský kraj)
- **AY.3** (Delta +změny v Orf1a + Orf1b) : 19 případů (kraje uvedeny v tabulce 3)
- **Beta** - B.1.351: 72 případů (ojedinělé detekce)
kraje: Praha, Moravskoslezský, Středočeský, Plzeňský, Královéhradecký, Olomoucký, Karlovarský, Liberecký, Jihomoravský, Vysočina
- **Gama** - P.1: 23 případů (kraje: Praha, Jihočeský, Pardubický, Jihomoravský, Ústecký)
- **Kappa** B.1.617.1 - 4 případy (z dubna- května, bez dalšího šíření a importu, Praha, Středočeský kraj)
- **Lambda** C.37 - jeden případ bez dalšího šíření (Středočeský kraj)

Tab. 2:
Přehled WGS vložených jednotlivými
sekvenačními centry od 31. 7. do 6. 8. 2021

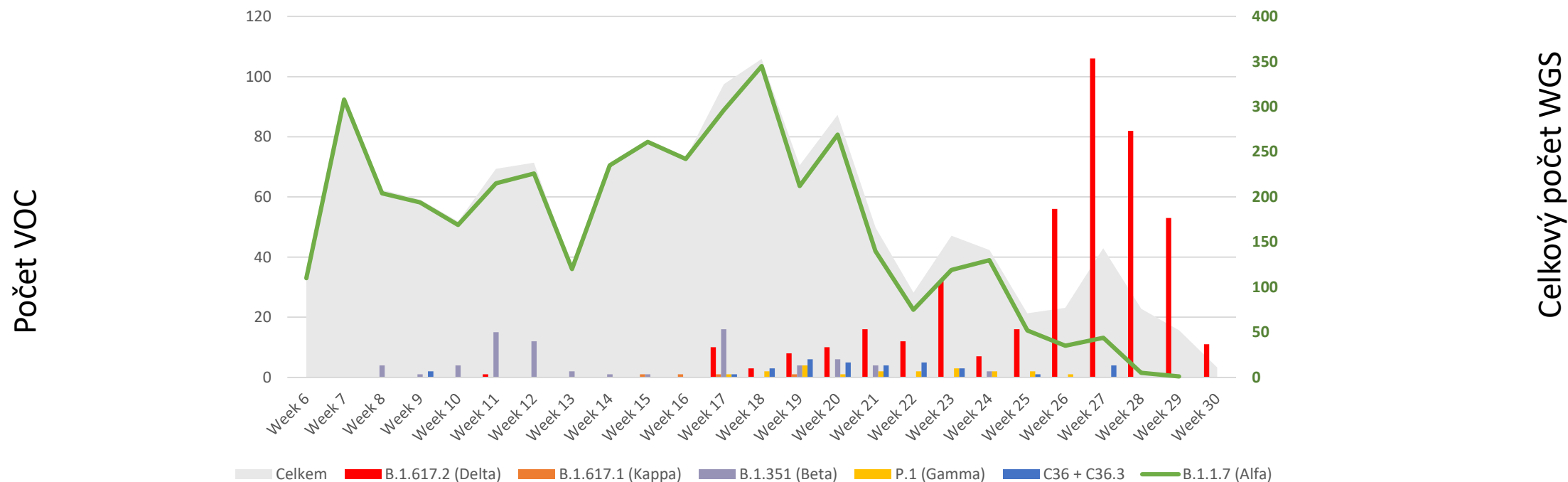
<u>Sekvenační centrum</u>	Počet WGS	% WGS
NRL	219	58,56%
<u>Saxony</u>	0	0,00%
UMTM	0	0,00%
CMBG	2	0,53%
FNB	0	0,00%
SVU	155	41,22%
<u>Bioptická</u>	0	0,00%
<u>IMG CAS</u>	0	0,00%
FNHK	0	0,00%
BC PARU CAS	0	0,00%
<u>BIOCEV</u>	0	0,00%
FN Plzeň	0	0,00%
celkem v týdnu	376	

Tab. 3:
Detekce a % zastoupení AY.3 varianty
v krajích

kraj	AY.3	Podíl
Středočeský	1	0,2%
Liberecký	10	12,2%
Moravskoslezský	1	0,2%
Praha	2	0,2%
Ústecký	2	4,7%
Vysočina	1	1,1%
Nepřirázeno	2	0,1%

AY.3 varianta byla u některých sekvencí zjištěna až po přepočtu sekvenačních dat novým algoritmem

Přehled detekovaných variant SARS – CoV-2 v ČR



Z grafu je jasně patrná narůstající dominance delta varianty a postupná eliminace všech dalších variant , včetně dříve dominantní varianty alfa. Nižší počet vzorků určených jako varianta delta za poslední 2 týdny je dán zpožděním celogenomové sekvenace. Situace se od posledního týdne dramaticky nezměnila, v grafu chybí detekce delta varianty u vzorků z posledního týdne, které spadají datem odběru do různých KT.

V rámci diskriminačních PCR v ČR lze vyslovit podezření na detekci varianty delta u 90 – 97 % vzorků. Dříve dominantní varianta alfa je pravděpodobně detekována u méně než 4 % vzorků. Jiné sledované varianty (VOC/VOI/VUI/VUM) v kohortě diskriminačních PCR na základě vyhodnocení nebyly vyhodnoceny jako suspektní.

Rovněž v kohortě WGS vzorků dominuje delta varianta, alfa varianta se stává minoritní. V ČR je rovněž detekována varianta AY.3, která je charakterizována změnami v nestrukturních genech pro polymerázový komplex, a která byla vyhodnocenou zpětnou analýzou již dříve osekvenovaných vzorků novým výpočetním algoritmem pro vyhodnocení hrubých sekvenačních dat. Zatím je detekována pouze v minimech případů (19 z celkem 773 případů).

Na šíření viru se vždy podílí více faktorů, stejně tak na tom jaké vzorky jsou odebrány. K zásadním vlivům patří i sociální faktory, které NRL nemůže bez spolupráce s dalšími odborníky hodnotit, toto hodnocení je vhodné provést po odeznění epidemické vlny.

Závěr odborných doporučení:

NRL v současné době doporučuje testovat jako minimum **L452R a E484K** mutace, doporučení se ale může změnit ve chvíli, kdy se identifikuje jiná potenciálně významná varianta či mutace. V tomto případě bude NRL v pravidelných zprávách a v metodických doporučeních informovat.

V rámci celogenomové sekvenace doporučuje NRL, aby sentinelová centra přijímala a zpracovávala vzorky z regionu, a to bez ohledu na to, kolik jich je vygenerováno v ISIN jako významných. Stále není dosaženo 10% prosekvenovanosti pozitivních vzorků. V případě nízké incidence je tedy vhodné sekvenovat všechny pozitivní vzorky splňující parametry a kapacitu sekvenačního centra, tedy hodnoty Ct musí být menší než 27 (SVU a Biologické centrum České Budějovice), nebo menší než 30 pro všechna ostatní sekvenační centra. SVU a BC sekvenují technologií Oxford Nanopore. Ve výjimečných případech lze sekvencovat i vzorky s hodnotou Ct33, v tomto případě je nutná domluva se sekvenačním centrem. Je nutné použití speciálních reagensů a postupu pro přípravu knihoven. Dobré výsledky dává v tomto případě souprava Paragon, a Roche nabídku na speciální přípravu enrichment knihoven budeme testovat.

- <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- <https://cov-spectrum.ethz.ch/explore/Czechia/>
- <https://sarscoverage.org/results/CZ.html>