

# Národní strategie molekulárně – biologické surveillance SARS-CoV-2

## Obsah

1	Úvod .....	2
2	Cíle Národní strategie molekulárně - biologické surveillance .....	2
3	První stupeň surveillance – cílená detekce mutací .....	2
3.1	Použité metody .....	3
3.1.1	Nepřímá detekce mutací .....	3
3.1.2	Přímá detekce mutací .....	3
3.1.3	Sekvence Spike proteinu .....	3
3.2	Vyhodnocení výsledků .....	4
4	Druhý stupeň surveillance – celogenomové sekvenování .....	4
4.1	Počet vzorků k sekvenaci .....	4
4.2	Plošné sekvenování za účelem detekce variant viru a monitorování jejich rozšíření .....	5
4.2.1	Sentinelové laboratoře (ve smyslu plošné surveillance) .....	5
4.2.2	Výběr vzorků pro sekvenaci .....	5
4.2.3	Ostatní terénní laboratoře podílející se na vyšetřování vzorků na SARS-CoV-2 .....	6
4.2.4	Centrální Sekvenační centra .....	6
4.2.5	Lokální Sekvenační centra .....	7
4.3	Analýza získaných dat a její dopady .....	7
5	Předpokládané náklady .....	8
6	Odkazy na zdroje informací .....	8

## 1 Úvod

Genetická informace virů, včetně SARS-CoV-2 způsobujícího onemocnění COVID-19, se neustále mění. Tyto genetické změny (mutace) se vyskytují v průběhu času a mohou vést ke vzniku nových variant viru, které mohou mít odlišné biologické vlastnosti. Mnoho mutací neovlivňuje schopnost viru šířit se nebo způsobit onemocnění, protože nemění strukturu hlavních proteinů podílejících se na infekci. Tyto jsou v průběhu evoluce eliminovány a nahrazeny variantami viru s mutacemi, které jsou pro virus výhodnější.

Během pandemie COVID-19 byl zdokumentován vznik několika variant viru SARS-CoV-2, které se rozšířily napříč několika kontinenty. Zdá se, že se tyto varianty šíří snadněji a rychleji než jiné varianty, což může vést k více případům onemocnění COVID-19. Zvýšení počtu případů pak zatěžuje systém zdravotní péče, vede k většímu počtu hospitalizací a potenciálně více úmrtí.

Možné důsledky vznikajících variant jsou následující:

- A) Schopnost rychlejšího šíření viru
- B) Schopnost způsobit mírnější nebo závažnější onemocnění; změnu klinických projevů onemocnění nebo onemocnění doposud nerizikové populace
- C) Schopnost vyhnout se detekci specifickými virovými diagnostickými testy
- D) Snížená náchylnost k terapeutickým látkám, jako jsou monoklonální protilátky.
- E) Schopnost vyhnout se přirozené imunitě nebo imunitě vyvolané vakcínami

Je proto důležité sledovat varianty viru cirkulující v populaci, zejména z hlediska přítomnosti klíčových mutací, které se vyskytují v důležitých oblastech genomu.

## 2 Cíle Národní strategie molekulárně – biologické surveillance

- pochopit národní a mezinárodní souvislosti šíření viru SARS-CoV-2;
- zavést molekulárně – biologické metody pro monitorování a cílený rychlý screening pozitivních vzorků na přítomnost mutací spojených s nežádoucími vlastnostmi viru (**= první stupeň surveillance, viz bod 3**);
- vytvořit síť Sentinelových laboratoří pro sběr pozitivních vzorků pro plošné monitorování variant SARS-CoV-2 cirkulujících v populaci a síť Sekvenačních center, která provedou celogenomovou sekvenaci (**= druhý stupeň surveillance, viz bod 4**);
- kromě plošného sběru vzorků se soustředit na sekvenování SARS-CoV-2 ve specifických klinických a epidemiologických situacích (**viz bod 4.2.3**);
- soustředit se na vyhledávání mutací a variant viru, které mohou mít dopady na potenciální účinek budoucí léčby, včetně vzniku rezistence na vakcíny;
- usnadnit mezinárodní spolupráci na zvládnutí pandemie COVID-19 prostřednictvím otevřeného sdílení dat sekvenčních dat SARS-CoV-2;
- z dlouhodobého hlediska vybudovat v České republice kapacitu pro zvládnutí velkých epidemií v rámci státem řízených organizací, agentur veřejného zdraví a akademických institucí.

## 3 První stupeň surveillance – cílená detekce mutací

Jedná se o cílený a specifický screening pozitivních vzorků na přítomnost nejčastějších mutací popsanych u globálně sledovaných variant SARS-CoV-2. Pro dosažení maximálních výsledků je žádoucí, aby se do screeningu mutací zapojilo co nejvíce terénních laboratoří, které se podílí na

testování SARS-CoV-2 v České republice. V současnosti se jedná zejména o sledování výskytu mutací N501Y a E484K (aktuálně zejména přítomných u variant B.1.1.7, B.1.351 a P1). Na přítomnost těchto mutací je žádoucí testovat všechny vzorky pozitivní na SARS-CoV-2. Pokud laboratoř tyto, případně i další mutace detekuje, je povinná hlásit tato zjištění do Informačního systému infekčních nemocí (ISIN), kde k těmto informacím následně mají přístup příslušné Krajské hygienické stanice (KHS). Ty tuto informaci využijí k přednostnímu trasování kontaktů nakaženého. Cílem je se zamezit šíření zejména nebezpečných variant viru. O tom, jaké mutace je nutné aktuálně sledovat budou laboratoře pravidelně informovány prostřednictvím Národní referenční laboratoře pro chřipku a nechřipková respirační virová onemocnění Státního zdravotního ústavu (NRL SZÚ).

### 3.1 Použité metody

#### 3.1.1 Nepřímá detekce mutací

Nukleotidové záměny nebo delece v příslušném genu se mohou projevit v podobě zvýšení Ct hodnoty detekce SARS-CoV-2 v tomto genu (nejčastěji Spike genu) nebo úplného selhání detekce tohoto genu. Toto je způsobeno neúplnou homologií sekvencí v místě nasedání primerů nebo sondy pro RT-PCR. Z tohoto důvodu je nadále žádoucí, aby diagnostické soupravy pro RT-PCR obsahovaly alespoň dva různé diagnostické cíle, zejména pokud je diagnostika založena na detekci úseku v N a S kódující oblasti. V testujících laboratořích je nutné sledovat neobvyklé laboratorní nálezy, zejména významný rozdíl Ct hodnot mezi detekovanými geny. Toto platí zejména u vzorků se SARS-CoV-2 detekovaným s Ct pod 30, u slabších pozitivit mohou být rozdíly méně zjevné. V případě podezření na výskyt mutací, které by mohly mít dopad na správné fungování diagnostické soupravy zjištěné výrobcem nebo dodavatelem, je nutné neprodleně informovat o tomto zákazníky a NRL SZÚ.

#### 3.1.2 Přímá detekce mutací

Pro vyhledávání známých mutací u pozitivních vzorků je možné použít komerční diagnostické soupravy, které jsou založeny nejčastěji na multiplex RT-PCR. U souprav lze snadno odlišit wild-type a mutantní variantu viru. Tyto diagnostické soupravy jsou často založeny na detekci jednoho konzervativního úseku. V tomto případě je pravidelná 1x za měsíc prováděná in-silico analýza naprosto nezbytná. **Do ISIN je třeba hlásit konkrétní zachycené mutace, nikoli vlastní interpretace** či vlastní závěry nálezu, o jakou variantu viru by se mohlo jednat (to je možné až na základě celogenomové sekvenace). Informace je interpretována v ISIN automaticky s tím, že je příslušná KHS informována, že ve vzorku byla detekována/byly detekovány mutace, které jsou spojené se specifickými nežádoucími biologickými vlastnostmi viru (rychlejší šíření, obejití imunitní odpovědi atd.). Využití multiplex RT-PCR pro screening vzorků na přítomnost mutací je velmi vhodné, protože se jedná o rychlou a spolehlivou metodu. Provedení detekce mutací, jeho vyhodnocení a hlášení do ISIN musí následovat bezprostředně po pozitivní detekci SARS-CoV-2. U komerčních souprav je nutné, aby výrobce/dodavatel informoval zákazníka do jakých cílových míst (mutací) je souprava zacílená, nikoliv pouze zjednodušenou interpretaci (jakou variantu detekuje). Druh použité diagnostické soupravy je nutné pro každou laboratoř specifikovat v aplikaci CFA.

#### 3.1.3 Sekvenace Spike proteinu

K detekci mutací může být také využito Sangerovo sekvenování části SARS-CoV-2 genomu, nejčastěji Spike genu. Pro spolehlivé rozlišení mezi cirkulujícími variantami, by oblast, která je sekvenována, měla pokrývat alespoň celou N-koncovou a receptorovou vazebnou doménu (RBD) (aminokyseliny 1-541, 1623 bp). Ideálně by měly být sekvenovány aminokyseliny Spike genu 1-800 (2 400 bp) nebo celý Spike gen, aby se také sledovalo štěpné místo S1 / S2 a další oblasti zájmu. Výhodou Sangerova sekvenování je snazší provedení a vyhodnocení výsledků. Vzhledem k dostupnosti by však mělo být před Sangerovým sekvenováním upřednostněno celogenomové sekvenování (viz dále) a to jak z časových, tak finančních důvodů.

### 3.2 Vyhodnocení výsledků

Vzhledem k tomu, že mutace mohou vznikat nezávisle u různých variant viru, nemůže být výsledkem cílené detekce mutací přesné zařazení vzorku ke konkrétní variantě (**to je možné až na základě celogenomového sekvenování**). Na základě detekce konkrétní mutace nebo kombinace mutací lze vyslovit jen **podezření na výskyt varianty viru** se specifickými biologickými vlastnostmi. Vzhledem k tomu, že počet vzorků podrobených celogenomovému sekvenování bude řádově menší než počet vzorků otestovaných výše uvedenými metodami, je cílená detekce mutací zcela zásadní pro prospektivní monitorování nežádoucích variant viru v populaci. Výsledky analýzy detekce mutací ze všech testujících laboratořích budou prováděny pravidelně minimálně na krajské a národní úrovni měly by být k dispozici na týdenní bázi.

## 4 Druhý stupeň surveillance – celogenomové sekvenování

Cílem využití celogenomového sekvenování je získat možnost prospektivně sledovat přítomnost a zastoupení konkrétních nebo i nových variant SARS-CoV-2 v České republice.

Toto je nutné obecně pro:

- Včasnou detekci a charakterizaci objevujících se variant viru SARS-CoV-2;
- Zkoumání dynamiky přenosu viru;
- Modelování antigenních vlastností viru za účelem posouzení rizika úniku vakcinaci
- Výběr virů pro složení vakcíny;
- Posouzení dopadu mutací na používané diagnostické metody - molekulární diagnostika, sérologické metody;
- Zkoumání vztahu mezi kmeny / liniemi a epidemiologickými údaji – účinnost přenosu, závažnost onemocnění, rizikové skupiny atd.;
- Posouzení a potvrzení reinfekcí;
- Monitorování rozvíjejících se variant v populacích divokých/domácích/na farmách chovaných zvířat, která mohou mít dopad na zdraví člověka;
- Podněcování dalšího výzkumu základního výzkumu k potvrzení relevance pozorovaných mutací v patogeneze onemocnění (např. infekčnost, vazba na receptory);
- Posouzení dopadu mutací na účinnost antivirotik;

### 4.1 Počet vzorků k sekvenaci

Počet vzorků, které je nutné sekvenovat je dle mezinárodních doporučení odhadován na 1-5 % všech pozitivních vzorků za dané časové období. Počet sekvenovaných vzorků by měl umožnit nejen zachytit novou variantu viru, ale také objasnit její % zastoupení v populaci, případně sledované geografické oblasti. Dle doporučení ECDC by surveillance variant SARS-CoV-2 v České republice, při týdenním počtu 25 000 – 50 000 pozitivních vzorků, **měla zahrnovat sekvenování asi 1000–1500 vzorků týdně**. Kromě plošné surveillance je nutné také sekvenovat vzorky s významným klinickým nebo epidemiologickým podtextem (např. selhání vakcinace/ reinfekce/ těžký průběh u dětí a pacientů do 50 let bez komorbidit/ detekce SARS-CoV-2 v neobvyklém materiálu/ import z rizikových oblastí/ neobvyklý kumulativní výskyt případů).

## 4.2 Plošné sekvenování za účelem detekce variant viru a monitorování jejich rozšíření

### 4.2.1 Sentinelové laboratoře (ve smyslu plošné surveillance)

Pro účely národní surveillance je nutné rovnoměrně sbírat vzorky z laboratoří z celé České republiky. Předpokládá se zapojení 10-20 laboratoří, na které budou kladeny zvláštní nároky pro zpracování a uchování klinických vzorků. Z každé laboratoře bude k sekvenaci zasíláno 70-100 vzorků týdně. V případě lokálního nálezu závažné varianty viru bude vhodné tento počet navýšit sběrem z dalších laboratoří ze stejného regionu.

V Sentinelových laboratořích bude nutné:

- Skladovat všechny pozitivní vzorky minimálně po dobu jednoho týdne – z toho maximálně 72 hodin při 2-8 °C, pak nutnost skladování při -80°C.
- Vzorky zaslané k sekvenaci uchovávat dlouhodobě nebo alespoň do uveřejnění sekvencí.
- V případě záchytu kmene s unikátními biologickými vlastnosti vzorek zaslat k izolaci viru do NRL SZÚ.
- K sekvenovaným vzorkům poskytnout základní informace (metadata), která jsou nutná k zaslání do mezinárodních databází (typ vzorku, datum odběru, pohlaví, věk, klinický stav – pokud je znám, lokalita (místo pobytu pacienta – ze žádanky), číslo vzorku v LIS, název a adresa laboratoře).
- K sekvenaci zaslat alespoň adekvátní množství izolované RNA se SARS-CoV-2 detekovaným do Ct 30. Konkrétní podmínky budou záležet na nastavení spolupráce mezi Sentinelovou laboratoří a Sekvenačním centrem.
- Vzorky pro sekvenaci bude je nutné označit jako: surveillance/vakcinace/reinfekce/těžký průběh/neobvyklý materiál/import. Tato kategorizace je nutná pro následné vyhodnocování dat (viz Tabulka 1).

### 4.2.2 Výběr vzorků pro sekvenaci

Výběr vzorků je závislý na cíli sekvenace a dostupných finančních prostředcích. Pro účely surveillance musí být vybrány reprezentativní kmeny virů z různých geografických oblastí, časových období, od pacientů s různými demografickými charakteristikami a napříč spektrem závažnosti onemocnění. Pro cílené monitorování (aby bylo možné účinněji sledovat vývoj variant viru a změny v jeho genomu), by strategie výběru vzorků měla zahrnovat výběr vzorků od pacientů, kteří prodělali vakcinaci, vzorků od pacientů s prokázanou reinfekcí, varianty objevující se v populacích zvířat nebo varianty se zvýšeným přenosem, zejména pokud nejsou vysvětleny jinými epidemiologickými faktory a další typy vzorků, které již byly zmíněny výše (viz Tabulka 1).

Indikace k sekvenaci		Označení pro ISIN	Sbírá Sentinelová laboratoř?	Sbírají ostatní laboratoře?
1	Náhodný výběr z pozitivních vzorků rovnoměrně z celého týdne, toto může být upřesněno podle aktuální epidemiologické situace (výskyt známých dominantních variant). Je nutné vyhnout se rodinným a jiným známým klastrům. V případě svozu vzorků z více regionů ČR preferovat ty z kraje, ve kterém sídlí Sentinelová laboratoř.	surveillance	ano	ne
2	Infekce u vakcinovaného jedince; pozitivita >14 dní po první dávce vakcíny	vakcinace	ano	ano
3	Reinfekce; nová pozitivita >60 dní od předchozí infekce	reinfekce	ano	ano
4	Pacient s těžkým průběhem infekce, u dětí a mladých pacientů bez komorbidit	těžký průběh	ano	ano
5	Detekce SARS-CoV-2 v neobvyklých materiálech (krev, likvor)	neobvyklý materiál	ano	ano
6	Import/návrat z rizikové země/oblasti	import	ano	ano
7	Vzorky z ohnisek infekce – bude aktuální po snížení celkového počtu případů v populaci České republiky	cluster	ne	ano

#### 4.2.3 Ostatní terénní laboratoře podílející se na vyšetřování vzorků na SARS-CoV-2

Sběr klinicky a epidemiologicky relevantních vzorků by neměl být omezen pouze na Sentinelové laboratoře. Je proto nutné, aby všechny testující laboratoře uchovávaly pozitivní vzorky alespoň po dobu 72 h, možno při teplotě 2-8°C. V případě zjištění přítomnosti varianty se specifickými biologickými vlastnostmi (selhání vakcinace, reinfekce, obzvláště závažný průběh atd.) mohou být laboratoře vyzvány k zaslání izolované RNA nebo přímo klinických vzorků k sekvenaci do NRL SZÚ nebo nejbližšího spolupracujícího Sekvenačního centra. Seznam Sekvenačních center včetně informací o možnostech přijetí primárních vzorků bude zveřejněn a bude všem testujícím k dispozici.

#### 4.2.4 Centrální Sekvenační centra

Sekvenační centra mohou být laboratoře zdravotnických zařízení, akademická pracoviště nebo komerční laboratoře, se kterými bude pro účely Národní surveillance navázána dlouhodobá spolupráce. Cílem této spolupráce bude těsné propojení Sekvenačního centra se Sentinelovou laboratoří pověřenou sběrem vzorků. To by mělo zajistit vysokou úspěšnost při sekvenaci a eliminovat nežádoucí vlivy dané např. kvalitou izolované RNA.

Pro účely Sekvenačního centra v Národní surveillance bude nutné akceptovat tyto předpoklady:

- Osekvenovat předem domluvený počet vzorků (nejčastěji cca 100–200 vzorků). Vzorky budou zaslány 1 x týdně z jedné nebo více Sentinelových laboratoří. **Očekáváme, že alespoň 90 % vzorků bude osekvenováno a výsledky nahlášeny do 7-10 dnů od příjmu vzorku. Delší časová prodleva není žádoucí a bude se týkat pouze vzorků sekvenovaných v rámci ECDC podpory.**
- Propojení výsledků celogenomových sekvenací s epidemiologickými daty bude provedeno v registru ISIN. Sekvenačnímu centru bude zřízen přístup pro nahrání získaných výsledků v DASTA formátu. Zasláná data (Pangolin linie a GISAID Accession number) budou hodnocena na týdenní bázi.
- **Podmínkou účasti na Národní surveillance bude neprodleně sdílet výsledky sekvenací v národních i mezinárodních databázích.** Dle doporučení WHO je na národní úrovni doporučené sdílení i hrubých sekvenačních dat. Získaná primární data bude vhodné skladovat, nejlépe na centrálním úložišti.
- Při zpracování sekvencí akceptovat obecně stanovená pravidla (nároky na kvalitu konsenzus sekvencí, pokrytí atd.), která mají za cíl sjednotit zpracování výsledků sekvenací v rámci České republiky a zajistit srovnatelnost výsledků napříč Sekvenačními centry.

#### 4.2.5 Lokální Sekvenační centra

Kromě centrálních sekvenačních center se do Národní surveillance mohou zapojit také menší Sekvenační centra, která budou schopná zpracovat menší počet vzorků v krátkém časovém intervalu. Na tato centra se budou vztahovat stejné podmínky pro zpracování sekvencí a zveřejnění získaných výsledků.

### 4.3 Sekvenování neklinických vzorků

Sekvenování virových kmenů z neklinických vzorků (např. enviromentální vzorky) bude v případě nutnosti prováděno v laboratořích SZÚ nebo jím pověřených laboratořích. Strategie odběru a metodika zpracování těchto vzorků se bude řídit mezinárodními doporučeními, zejména doporučením Evropské komise.

### 4.4 Analýza získaných dat a její dopady

Data získaná celogenomovým sekvenováním jsou velmi komplexní. Jedním z výstupů je přiřazení vzorku ke konkrétní variantě viru pomocí zápisu Pangolin linie. Tato informace bude uložena v ISIN, společně s odkazem na uloženou sekvenci v databázi GISAID. Součástí analýzy získaných dat musí být pravidelné automatické reporty z ISIN nebo jiného vhodného programu o počtu a procentuálním zastoupení detekovaných variant viru a jeho změnách za časovou jednotku (týden, měsíc) a to jak na lokální (krajské), tak národní úrovni. Součástí reportu musí být také výčet variant vhodných zřetele, aby bylo i na lokální úrovni včas zasáhnout v případě detekce varianty viru s nežádoucími biologickými vlastnostmi.

Dalším z výstupů by měla být korelace získaných sekvenačních výsledků (včetně detekovaných privátních mutací) s poskytnutými údaji ke vzorku. Tento přístup by mohl pomoci detekovat varianty viru spojené s výše uvedenými klinickými situacemi (surveillance/vakcinace/reinfekce/těžký průběh/neovykklý materiál/import) v budoucnu se na ně zaměřit.

V případě, že bude detekována varianta viru s nežádoucími vlastnostmi je nutné neprodleně zahájit intenzivní sběr vzorků z dané lokality k ověření této skutečnosti. Následně se soustředit na nastavení

vhodných protiepidemických opatření, hlavně účinného trasování a testování kontaktů, abychom získali nad šířením varianty kontrolu.

## 5 Předpokládané náklady

Předpokládané náklady budou krýt materiální a personální náklady Sentinelových laboratoří na přípravu vzorků k sekvenaci (zejména novou izolaci RNA), dopravu vzorků a náklady Sekvenačních center na provedení sekvenace a vyhodnocení výsledků.

## 6 Odkazy na zdroje informací

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/sequencing-sars-cov-2>

<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/surveillance-definitions>

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html>

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance.html>

[https://ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation\\_covid19\\_monitoring\\_wastewaters.pdf](https://ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation_covid19_monitoring_wastewaters.pdf)