

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti detekce SARS-CoV-2 viru pomocí RT-qPCR

Bakalářská práce

2021

Michaela Surovcová

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Possibilities of SARS-CoV-2 Virus Detection Using the RT-qPCR Method  
Bachelor Thesis

2021

Michaela Surovcová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Surovcová**  
Osobní číslo: **C18282**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Možnosti detekce SARS-CoV-2 viru pomocí metody RT-qPCR**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se metodou kvantitativní PCR s reverzní transkripcí (RT-qPCR). V úvodní části se zaměřte na princip metody, možnosti jejího využití a diskutujte výhody a nevýhody ve srovnání s ostatními způsoby detekce.
2. Dále popište základní strukturu nového typu koronaviru SARS-CoV-2 a uveďte, na jaké oblasti jeho genomu je RT-qPCR konkrétně cílena.
3. Nakonec vypracujte přehled dostupných RT-qPCR kitů pro detekci SARS-CoV-2, zmiňte jejich základní charakteristiku a srovnání.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o současném stavu studované problematiky.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Možnosti detekce SARS-CoV-2 viru pomocí RT-qPCR jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.7.2021

Michaela Surovcová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou chtěla poděkovat Mgr. Jankovičové Barboře, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině, přátelům a všem, co mě podporovali v mém studiu.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá detekcí SARS-CoV-2 viru, který aktuálně způsobuje pandemii onemocnění COVID-19 projevující se těžkým akutním respiračním syndromem. Zaměřuje se především na detekci viru pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase s reverzní transkripcí. Uveden je také přehled dostupných komerčních kitů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, komerční kity, detekce

## **TITLE**

Possibilities of SARS-CoV-2 Virus Detection Using the RT-qPCR Method

## **ANNOTATION**

Bachelor's thesis deals with the detection of SARS-CoV-2 virus, which currently causes pandemic disease COVID-19 manifesting with severe acute respiratory syndrome. It focuses mainly on virus detection using real-time polymerase chain reaction with reverse transcription. An overview of available commercial kits is also listed.

## **KEYWORDS**

SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, commercial kits, detection

## Obsah

1	Úvod .....	12
2	SARS-CoV-2 virus .....	13
2.1	Taxonomické zařazení .....	13
2.2	Strukturní charakteristika .....	13
2.3	Vstup koronaviru do hostitelské buňky .....	14
2.4	Klinické příznaky onemocnění COVID-19 .....	15
2.5	Možnosti detekce infekce SARS-CoV-2 virem .....	16
2.5.1	Testy na průkaz specifických protilátek .....	16
2.5.2	Testy na průkaz antigenu .....	18
2.5.3	LAMP testy .....	18
3	Detekce SARS-CoV-2 viru pomocí kvantitativní RT-PCR .....	19
3.1	Odběr vzorku .....	19
3.2	Izolace RNA .....	20
3.2.1	Fenol-chloroformová extrakce .....	20
3.2.2	Manuální izolace pomocí spin-kolonek .....	21
3.2.3	Automatizovaná izolace pomocí magnetických částic .....	22
3.3	Reverzní transkripce .....	23
3.4	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....	25
3.5	Možnosti detekce .....	26
3.6	Přístrojové vybavení .....	28
3.7	Grafický průběh reakce .....	28
3.8	Senzitivita a specifita RT-qPCR testu na průkaz SARS-CoV-2 viru .....	29
4	Komerční RT-qPCR kity pro detekci SARS-CoV-2 .....	30
4.1	Experimentální uspořádání RT-qPCR kitů .....	30
4.2	Cílové oblasti využívané při detekci SARS-CoV-2 .....	31
4.3	Srovnání kitů pro detekci SARS-CoV-2 .....	33
4.4	Kity pro detekci SARS-CoV-2 bez extrakce .....	35
4.5	Odlišení infekce virem SARS-CoV-2 od chřipky .....	36
4.6	Detekce mutací viru SARS-CoV-2 .....	37
5	Závěr .....	40
6	Zdroje .....	41



## Seznam obrázků a tabulek

<b>Obrázek 1</b> - Popis struktury koronaviru .....	14
<b>Obrázek 2</b> - Schéma vstupu koronaviru do hostitelské buňky .....	15
<b>Obrázek 3</b> - Hodnocení Rapid testu .....	17
<b>Obrázek 4</b> - Vizuální detekce pozitivního a negativního vzorku pomocí metody LAMP .....	18
<b>Obrázek 5</b> - Schéma správného odběru z nosohltanu .....	20
<b>Obrázek 6</b> - Schéma izolace nukleových kyselin pomocí spin-kolonek .....	22
<b>Obrázek 7</b> - Schéma magnetické částice používané pro izolaci nukleových kyselin .....	23
<b>Obrázek 8</b> - Schéma reverzní transkripce .....	24
<b>Obrázek 9</b> - Schéma PCR .....	26
<b>Obrázek 10</b> - Amplifikační křivka qPCR .....	29
<b>Obrázek 11</b> - Schéma přípravy analýzy kitem gb SARS-CoV-2 Influenza A/B (Generi Biotech) .....	37
<b>Tabulka 1</b> - Přehled kitů pro detekci SARS-CoV-2 od společnosti Generi Biotech .....	32
<b>Tabulka 2</b> - Přehled kitů pro detekci SARS-CoV-2 od ostatních společností .....	34
<b>Tabulka 3</b> - Výsledky porovnání jednotlivých kitů .....	35
<b>Tabulka 4</b> - Přehled kitů pro odlišení infekce virem SARS-CoV-2 od chřipky .....	37
<b>Tabulka 5</b> - Mutace viru SARS-CoV-2 .....	38
<b>Tabulka 6</b> - Přehled kitů pro detekci mutací viru SARS-CoV-2 .....	39

## Seznam zkratek

<b>ACE2</b>	angiotenzin-konvertující enzym 2
<b>cDNA</b>	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<b>CLIA</b>	chemiluminiscenční imunoanalýza
<b>Covid-19</b>	koronavirové onemocnění 2019 (z angl. Coronavirus disease 2019)
<b>Ct</b>	cyklus prahu (z angl. Cycle treshold)
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>DNáza</b>	deoxyribonukleáza
<b>dsDNA</b>	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotidtrifosfát
<b>ELISA</b>	enzymová imunosorbentní analýza (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
<b>FAM</b>	6-karboxyfluorescein
<b>GUSB</b>	$\beta$ -glukuronidáza
<b>HCoV</b>	lidský koronavirus (z angl. Human coronavirus)
<b>HE</b>	hemaglutinin-esteráza
<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>IgA</b>	imunoglobulin A
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>IPC</b>	interní pozitivní kontrola
<b>IVD</b>	<i>in vitro</i> diagnostika
<b>LAMP</b>	smyčkově zprostředkovaná izotermická reakce (z angl. Loop-mediated isothermal amplification)
<b>LED</b>	elektroluminiscenční dioda (z angl. Light-emitting diode)

<b>LOD</b>	limit detekce
<b>LUX</b>	světlo při prodloužení (z angl. Light-Upon extension)
<b>MERS-CoV</b>	koronavirus způsobující blízkoovýchodní respirační syndrom (z angl. Middle east respiratory syndrome coronavirus)
<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina
<b>Oligo-dT</b>	oligo-deoxythymín
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec (z angl. Open reading frame)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase chain reaction)
<b>RAT</b>	rychlý antigenní test
<b>RdRP</b>	RNA-dependentní RNA polymeráza
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RNáza</b>	ribonukleáza
<b>RT</b>	reverzní transkripce
<b>RT-qPCR</b>	polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí
<b>RVS</b>	respirační syncytiální virus
<b>SARS-CoV-2</b>	těžký akutní respirační syndrom (z angl. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
<b>Taq</b>	bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
<b>UV</b>	ultrafialová záření

# 1 Úvod

Nový typ koronaviru (SARS-CoV-2) je původcem virového onemocnění Covid-19 (z angl. Coronavirus disease 2019), které se projevuje těžkým respiračním syndromem a bylo poprvé objeveno v čínském Wu-chanu na konci roku 2019. V několika následujících měsících se rozšířilo do celého světa a způsobilo celosvětovou pandemii. Toto vysoce infekční onemocnění se přenáší pomocí kapének vzduchem a také přímým kontaktem s nakaženou osobou. Virus napadá především horní a dolní cesty dýchací, což se projevuje ztíženým dýcháním, dušností, kašlem a dalšími příznaky. Nemoc způsobuje komplikace především u pacientů s vážným onemocněním, starším lidem, ale mohou se vyskytnout i u zdravých jedinců. Pacienti s těžkým průběhem často končí hospitalizování v nemocnicích, kde jsou odkázáni na plicní ventilaci. I přes veškerá opatření a péči zdravotníků, může toto onemocnění končit smrtí.

Abychom předcházeli šíření nemoci, zavedly jednotlivé státy mimořádná opatření, týkající se zejména dodržování hygienických návyků, omezení kontaktu osob ve skupinách, zákazu hromadných akcí a dalších omezení, dle rozvíjejícího se počtu nakažených. Osoby, které nákaza postihla, nebo se s nákazou setkaly, mají nařízenou karanténu, kdy musí zůstat alespoň 10 dní doma. Důležitou úlohou, aby se zamezilo šíření koronaviru, je také jeho testování. Diagnostiku Covid-19 je možno provádět více způsoby založenými jak na vyšetření přítomnosti nukleové kyseliny (metoda PCR, LAMP) nebo povrchových proteinů viru (antigenní testy RAT), tak i na průkazu specifických protilátek, vytvořených při imunitní reakci lidského organismu na infekci SARS-CoV-2.

Nejcitlivější metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR) v reálném čase (q) s reverzní transkripcí (RT), která je založena na průkazu virové nukleové kyseliny. Vzorek se odebírá z horních cest dýchacích, stěrem z nosohltanu a je důležité jej umístit do zkumavky obsahující virové transportní médium. Tato metoda zjišťuje především přítomnost E genu a genu RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRP). RT-qPCR je velice spolehlivá a přesná laboratorní metoda pro detekci, studium a sledování průběhu koronavirové infekce a bude hlavní náplní této bakalářské práce.

## 2 SARS-CoV-2 virus

### 2.1 Taxonomické zařazení

Virus SARS-CoV-2 (z angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) se řadí mezi koronaviry a je nově objeveným kmenem z čeledi *Coronaviridae* (podčeď *Orthocoronavirinae*, řád *Nidovirinales*). Jedná se o obalené, pozitivně orientované, jedno-řetězcové RNA viry. Čeď je dále členěna na rody *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, které mohou infikovat savce a *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus*, primárně infikující ptáky. SARS-CoV-2 virus patří do rodu *Betacoronavirus*, jeho rezervoárem jsou savci, zejména netopýři a hlodavci, z nichž se může nákaza přenést na člověka. Onemocnění, které následně vzniká, se označuje Covid-19 (z angl. coronavirus disease 2019) a projevuje se jako těžký akutní respirační syndrom [1].

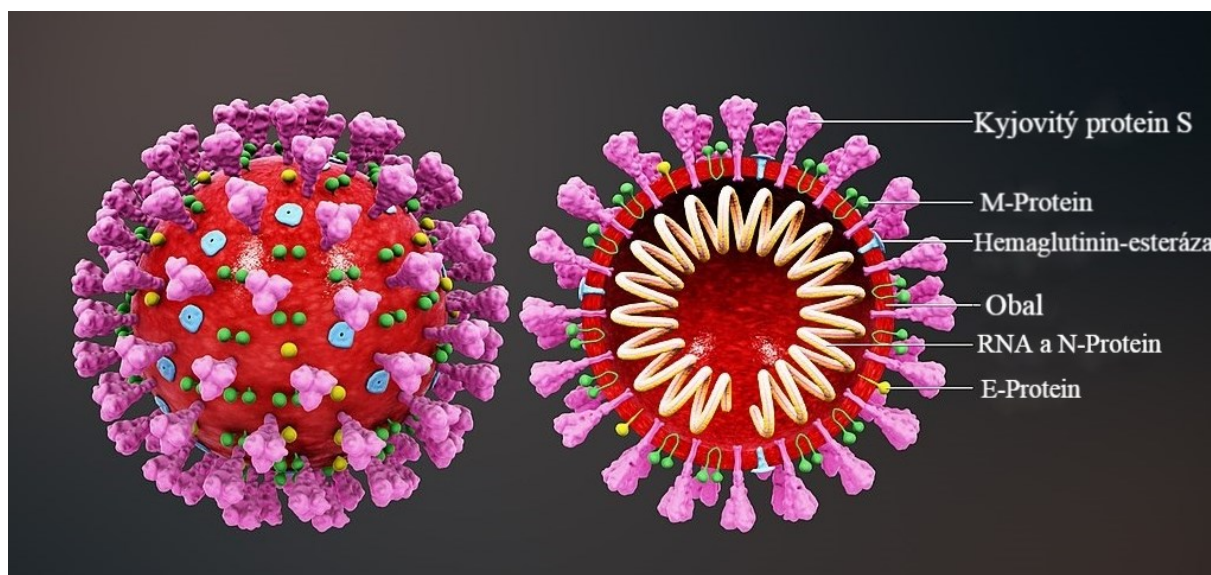
Mezi další známé lidské koronaviry patří např. MERS-CoV (z angl. Middle East respiratory syndrome coronavirus), který se jako první objevil v létě roku 2012 v Saudské Arábii. Tento typ lidského koronaviru způsobuje vysokou horečku, kašel, dušnost, akutní infekci dýchacích cest a multiorgánovou dysfunkci, která nakonec může vést k úmrtí infikovaných jedinců. Hlavním hostitelským rezervoárem jsou dle virologických studií velbloudi, ze kterých se můžou sporadicky infikovat lidé. Jedná se tedy o zoonózu. Mnohem častěji je ovšem přenos z člověka na člověka. Další smrtící zoonotický koronavirus je SARS-CoV (z angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus). Toto infekční onemocnění se poprvé objevilo v roce 2002 v Číně a poté se rozšířilo do celého světa. U infikovaných jedinců se onemocnění projevuje horečkou, zimnicí, ztuhlostí, kašlem a z patologických aspektů jsou přítomné lymfopenie, trombocytopenie, zvýšené hladiny laktátdehydrogenázy a kreatinkinázy. Mezi hlavní rezervoáry, u nichž se předpokládá pravděpodobný přenos na člověka, patří netopýři a cibetky. Díky přísným opatřením se v roce 2004 dostalo šíření koronaviru pod kontrolu, avšak předpokládalo se, že se může nákaza vrátit. Existují další známé koronaviry, které způsobují respirační komplikace. Jedná se o HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 a HKU1. Nákaza těmito koronaviry má za následek mírné až středně těžké infekce horních cest dýchacích [2, 3, 4, 5].

### 2.2 Strukturní charakteristika

Obal koronavirů je složen z lipidové membrány, ve které jsou uloženy virové povrchové proteiny. Konkrétně jde o nukleokapsidový (N) protein, který obklopuje genom RNA, dále

S glykoprotein, matrixový (M) protein, obalový (E) protein a (HE) hemaglutinin-esterázu, související s fúzním proteinem viru chřipky C (viz Obr. 1). Právě kyjovitý protein S, vyčnívající z membrány, dodává viru charakteristický halo efekt, jeví se jako koruna (latinsky corona) v elektronovém mikroskopu. Dle tohoto vzhledu dostal koronavirus svůj název [1].

Genom koronaviru má velikost až 31 kb, což jej řadí mezi největší z RNA virů. Na 5' konci genomu se nachází vedoucí sekvence, která hraje klíčovou roli v replikaci. Zahrnuje gen replikázu, jenž se skládá ze dvou otevřených čtecích rámců ORF 1a a ORF 1b. Následují 4 ORF, které pokračují sekvencemi pro strukturní proteiny (S, M, E, N) směrem k 3' konci. Virus dále obsahuje řadu doplňkových proteinů, jejichž funkce je většinou neznámá a zpravidla není nezbytná pro replikaci viru [1, 6].

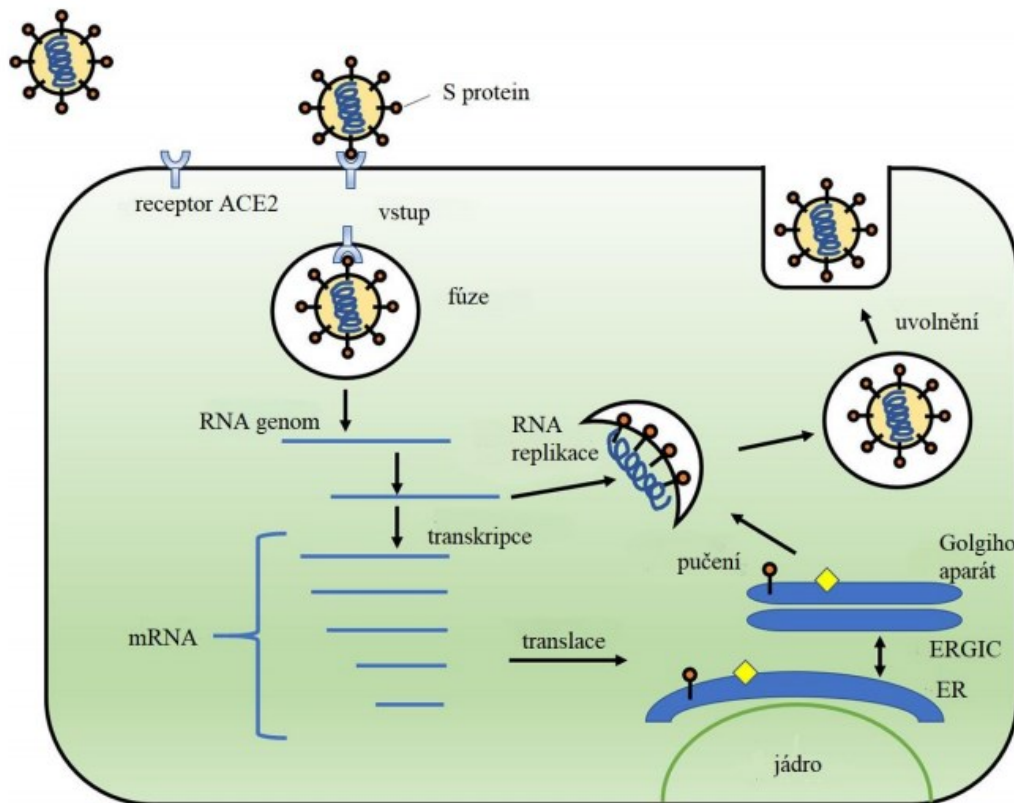


**Obrázek 1** - Popis struktury koronaviru [7].

### 2.3 Vstup koronaviru do hostitelské buňky

Hlavní úlohu, při vstupu koronaviru do hostitelské buňky, zprostředkovává glykoprotein S, který je složen ze dvou podjednotek. Podjednotka S1 umožňuje rozpoznání a absorpci na hostitelský receptor angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2) a podjednotka S2 zprostředkovává fúzi virové buněčné membrány. ACE2 se vyskytuje na buňkách v plicích, srdci, tepnách, ledvinách a střevech. Po vniknutí viru do buňky se uvolní virové RNA a přepíše se oba čtecí rámce genu ORF 1a a ORF 1b, tím vzniknou polyproteiny. Dochází k replikaci a transkripci genomové RNA pomocí štěpení polyproteinů a sestavení komplexu replikáza-transkriptáza. V konečné fázi se strukturní proteiny syntetizují, sestavují a balí

v Golgiho aparátu. Následně putují k buněčné membráně, kde dochází k uvolňování nových virových částic (viz Obr. 2) [8].



**Obrázek 2** - Schéma vstupu koronaviru do hostitelské buňky [9].

## 2.4 Klinické příznaky onemocnění COVID-19

Klinické projevy onemocnění se mohou u jednotlivých osob postihnutých koronavirem lišit. Jsou známy i osoby, které byly zcela asymptomatické. Nejčastější příznaky jsou horečka, únava a suchý kašel. Bolesti v krku, průjem, zánět spojivek, bolesti hlavy, vyrážka na těle či ztráta chuti a čichu se řadí mezi méně obvyklé příznaky. K nejzávažnějším příznakům však patří bolest, tlak na hrudi, dýchací obtíže nebo dušnost, a dokonce i ztráta řeči nebo schopnost pohybu. Každý takový příznak by neměl být ignorován a osoba by měla kontaktovat svého obvodního lékaře a být vyšetřena, aby se zamezilo šíření viru. Příznaky se objevují nejčastěji 5. – 6. den po nakažení, mohou se ale objevit i za 14 dní od nakažení [10].

## 2.5 Možnosti detekce infekce SARS-CoV-2 virem

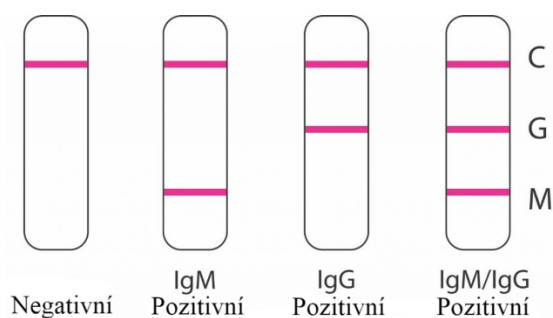
### 2.5.1 Testy na průkaz specifických protilátek

Jedním z možných způsobů jsou testy detekující přítomnost protilátek, které se tvoří jako imunitní reakce člověka na infekci SARS-CoV-2 v krvi. Přítomnost protilátek akutní fáze třídy IgM indikuje aktivní nebo nedávnou infekci, zatímco dlouhodobé paměťové protilátky třídy IgG se projeví později a často znamenají již proběhlou nemoc. Tento způsob testování slouží jako screeningový nástroj. Pozitivní test na protilátky zpravidla svědčí již o proběhnuté nemoci, kdy si jedinec vytvořil imunitu vůči viru, a tudíž už není náchylný k infekci. Předpokládá se, že osoby s pozitivní hladinou protilátek IgG již nejsou infekční [11].

Na začátku infekce se jako první v krvi objeví protilátky třídy IgM, které jsou většinou pozitivní po 3-15 dnech od počátku klinických příznaků. Následně, asi se sedmidenním zpožděním, se začnou tvořit protilátky třídy IgG. Hladina IgM protilátek se začne postupně snižovat, zatímco protilátky IgG v krvi rostou. Ve fázi uzdravování se titr IgG protilátek může zvýšit až několikanásobně oproti počáteční akutní fázi. Lze také testovat protilátky třídy IgA, které se vytváří na sliznici i při nízké virové náloži, často bez klinických příznaků. Právě tyto imunoglobuliny se tvoří jako první a vykazují nejvyšší citlivost asi 4.-25. den po nástupu nemoci. Protilátky IgA dosáhnou vrcholu asi 16.-20. den od nástupu nemoci, následně dojde k jejich poklesu, i přesto při uzdravovací fázi zůstávají na relativně vysoké hodnotě [12].

Existují rychlé (Rapid) testy, které se provádí z kapky kapilární krve a podávají informaci o přítomnosti protilátek. Nevýhodou těchto testů je, že nedokážou stanovit hladinu protilátek. Provedení testu je jednoduché a nevyžaduje přítomnost odborného pracovníka. Jedinec si odebere kapilární krev z prstu a pomocí kapátka kápne 20  $\mu$ l krve do jamky Rapid testu s proužky s barevnými konjugáty a reaktivními činidly rozptýlenými na odpovídající oblasti. Poté se do jamky přidají 2 až 3 kapky ředícího pufru a vyčká se 15 minut na odečtení výsledku. V případě positivity protilátek se objeví barevný proužek v oblasti s odpovídající protilátkou. V negativním případě zůstane barevný proužek pouze u kontroly testu (viz Obr. 3). Princip testu je založen na migraci vzorku membránou chromatografickým působením a reakci s anti-lidskými IgM nebo IgG protilátkami v dané oblasti [13].





**Obrázek 3 - Hodnocení Rapid testu [14].**

Pro detekci hladiny protilátek je nutné provést kvantitativní nebo semikvantitativní test protilátek v laboratoři metodou ELISA nebo CLIA.

Průkaz protilátek metodou ELISA se provádí ze vzorku séra nebo plazmy od pacienta s použitím rekombinantní domény S1 glykoproteinu SARS-CoV-2 jako antigenu. Stanovení se provádí v mikrotitračních destičkách, jejichž jamky jsou potažené právě rekombinantním strukturálním proteinem S1. V prvním kroku detekce se v jamkách inkubují zředěné vzorky od pacientů. Pokud je ve vzorku přítomná protilátka, naváže se v tomto kroku na antigen. Následuje promytí reakční směsi a odstranění nadbytečné protilátky. Poté se provede druhá inkubace pomocí enzymem značeného antihumánního IgA, IgM nebo IgG katalyzujícího barevnou reakci. Výsledky jsou následně hodnoceny semikvantitativně, výpočtem poměru kontrolního nebo patientského vzorku a kalibrátoru. Hodnoty menší než 0,8 jsou považovány za negativní, 0,8-1,0 za hraniční a hodnoty nad 1,1 za pozitivní [15].

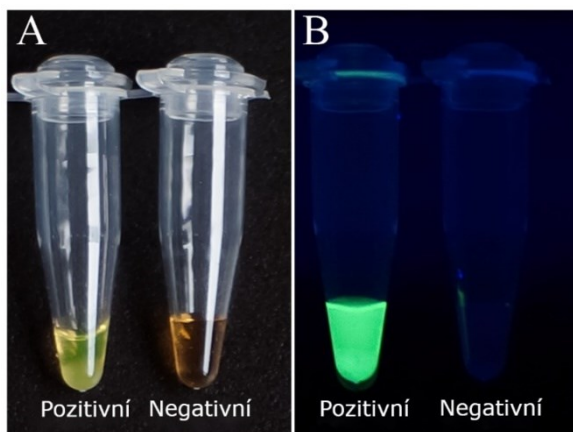
Metoda CLIA neboli chemiluminiscenční imunoanalýza používá magnetické kuličky potažené rekombinantním antigenem, zejména se jedná o strukturální proteiny S nebo N, a substrát značený chemiluminiscenční látkou na automatizovaných platformách. Jako detekční protilátka se používá protilátka proti lidskému IgG nebo IgM. Pokud je ve vzorku séra přítomná protilátka, naváže se na rekombinantní antigen a vytvoří komplex. V dalším kroku se na komplex naváže substrát značený chemiluminiscenční látkou. K detekci naměřených hodnot chemiluminiscence je potřeba použít automatizovaný magnetický chemiluminiscenční analyzátor. Výsledky jsou uváděny jako arteficiální jednotky/ml. Hodnoty menší než 12 AU/ml jsou považovány za negativní, 12-15 AU/ml za hraniční a hodnoty nad 15 AU/ml za pozitivní [16, 17].

## 2.5.2 Testy na průkaz antigenu

Další z možných způsobů testování je rychlý test antigenu (RAT). Tento test kombinuje imunochromatografii s enzymovým testem k detekci virového nukleokapsidového (N) proteinu. Výhodou RAT je, že nevyžaduje speciální vybavení, není časově náročný a není potřeba vysoce kvalifikovaných laboratorních pracovníků. Podobně jako u Rapid testu na protilátky se pacientův vzorek nanese kapátkem do určené jamky a po určitém čase se odečtou výsledky barevných proužků. Vzorek na antigenní test se kromě standardního výtěru z nosohltanu vyšetřuje i ze slin, popř. výtěru z kraje nosu, což představuje pro pacienta menší zátěž. Tato metoda je oproti polymerázové řetězové reakci rychlá, avšak není tak citlivá. Test bývá pozitivní hlavně v době, kdy pacient produkuje velké množství viru a je nejvíce infekční [18, 19, 20].

## 2.5.3 LAMP testy

LAMP (z angl. Loop-mediated isothermal amplification) neboli smyčkově zprostředkovaná izotermická amplifikace se řadí mezi další metody k diagnostice nákazy SARS-CoV-2 virem. Metodou získáme informaci o přítomnosti virové RNA ze slin pacienta za poměrně krátký časový úsek. Oproti referenční PCR metodě je technika LAMP rychlá a poměrně nenáročná na přístrojové vybavení. Vzorky slin se nejprve tepelně inaktivují a následně se smíchají s reagensy LAMP. Poté následuje inkubace při teplotě 60-65 °C po dobu asi 30 minut k dokončení amplifikace. V konečné fázi se ke vzorku přidá barvivo (např. SYBR Green), které následně změní barvu v závislosti na výsledku testu (viz Obr. 4) [21].



**Obrázek 4** - Vizuální detekce pozitivního a negativního vzorku pomocí metody LAMP:(A) analýza výsledků po použití barviva SYBR Green za přirozeného světla; (B) analýza výsledků po použití barviva SYBR Green v UV světle [22].

Nejcitlivější metodou pro diagnostiku SARS-CoV-2 je polymerázové řetězová reakce (PCR) v reálném čase s reverzní transkripcí (RT), která je založena na průkazu virové nukleové kyseliny. Tato metoda bude podrobně popsána v následující kapitole.

### **3 Detekce SARS-CoV-2 viru pomocí kvantitativní RT-PCR**

Nejspolehlivější metodou stanovení SARS-CoV-2 viru je polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí (RT-qPCR). Proces zahrnuje dva hlavní kroky. Nejprve převedeme virovou RNA na komplementární cDNA pomocí reverzní transkripce a poté následuje amplifikace specifických oblastí cDNA metodou PCR. Pro úspěšné testování je důležitý především návrh vhodných primerů a optimalizace testu.

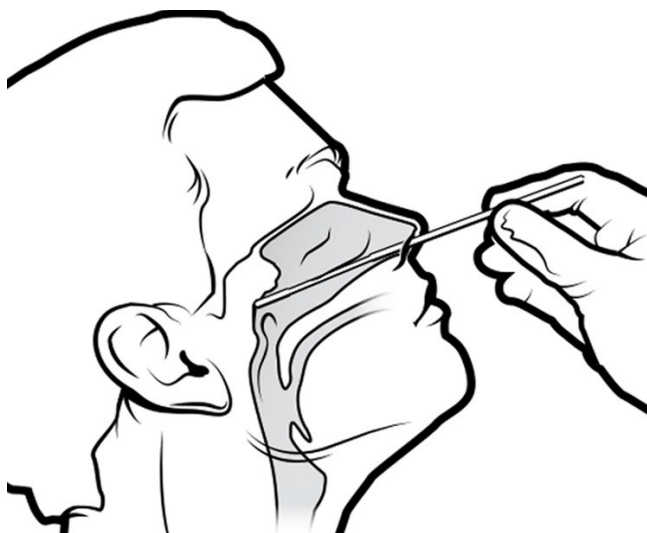
Před vlastním provedením testu je potřeba zajistit správný odběr vzorku a izolovat virovou RNA. Jednotlivé kroky budou popsány níže.

#### **3.1 Odběr vzorku**

Správnost a kvalita odběru materiálu na vyšetření je pro úspěšnost testu naprosto zásadní. Vzorek se odebírá především z horních cest dýchacích, stěrem z nosohltanu, popřípadě z orofaryngu. Odběr z nosohltanu se provádí proto, že se zde virus primárně množí. Z orofaryngu je odběr důležitý, protože virus se zde usazuje v souvislosti s klinickými příznaky, zejména kašláním. Tyto místa lze setřít jedním odběrovým tampónem nebo dvěma tampóny a následně je vložit do jedné zkumavky obsahující tekuté virologické transportní médium. Samotný odběr pacienta probíhá tak, že si pacient pohodlně sedne a opře hlavu o opěrku, aby ji měl lehce zakloněnou. Tampón se zavede do nosní dírkou a dbá se na to, aby byl rovnoběžně s patrem. Měl by dosáhnout hloubky stejné, jako je vzdálenost mezi nosní dírkou a uchem (viz Obr. 5). Tampón se nechá na místě několik sekund a poté se otáčivým pohybem opatrně vytáhne ven. Následně se vloží do zkumavky s transportním médiem. Součástí transportního média je pufr o osmolalitě fyziologického roztoku, protektivní bílkovina, antibiotika, popřípadě antimykotika. Takto odebraný materiál je možné okamžitě zpracovávat nebo uchovávat při chladničkové teplotě 2-8 °C po dobu až 72 hodin. Pro případné delší uchovávání vzorku je nutné jej zamrazit na teplotu -70 °C a nižší [23, 24].

Při odběru pacienta nebo manipulaci se vzorkem je nutné mít na paměti, že se může jednat o infekční osobu nebo materiál a je nezbytné dodržovat příslušná preventivní opatření.

Zdravotník nebo osoba pověřená odběrem nebo zpracováním vzorku musí vždy používat ochranné pomůcky, jako jsou ochranné masky (respirátory, roušky), rukavice, plášť a ochranný štít nebo brýle, aby se zamezilo přenosu nákazy. Zpracování vzorku probíhá v samostatné místnosti a v laminárním boxu, aby nedocházelo ke kontaminaci ostatních přístrojů a také k nákaze pracovníků. Dále je nutné vždy po skončení práce řádně vydezinfikovat pracovní místo a vyklidit odpad do speciálně označeného infekčního odpadu. Pracovníci si také pravidelně musí měnit ochranné pomůcky a dezinfikovat ruce [23, 24].



**Obrázek 5** - Schéma správného odběru z nosohltanu [25].

## 3.2 Izolace RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) je nedílnou součástí laboratorních analýz. Důležitá je zejména v diagnostice virových, bakteriálních a parazitárních onemocnění a také pomáhá určit diagnózu některých poruch a nádorů. Před vlastní analýzou je potřeba získat čistou molekulu RNA. Toho docílíme různými způsoby čištění [26].

### 3.2.1 Fenol-chloroformová extrakce

Principem metody je oddělení RNA od DNA pomocí extrakce kyselým roztokem, jež obsahuje guanidin thiokyanát, octan sodný, fenol a chloroform. Následuje centrifugace, po které se celková RNA nachází v horní vodné fázi, zatímco DNA, proteiny a ostatní nečistoty v mezifázi nebo v organické fázi. Poté se provádí precipitace RNA s izopropylalkoholem, po centrifugaci získáváme bílou peletu obsahující izolovanou celkovou RNA. Bílé zbarvení je způsobeno přítomností zbytkových solí srážejících se společně s RNA.

Promytím pelety ethanolem (75-90 %) se soli odstraní a vznikne čistá RNA. Nejvýznamnější izolační směs je monofázický roztok fenolu a guanidin isothiokyanátu, který slouží jako komplexní činidlo pro extrakci RNA, DNA a proteinů z tkání nebo buněk. Je dostupná komerčně pod různými názvy např. TRIzol (Invitrogen), TRI Reagent (Sigma-Aldrich), TRIR (Abgene), RNA blue (Top Bio), aj. [26, 27, 28].

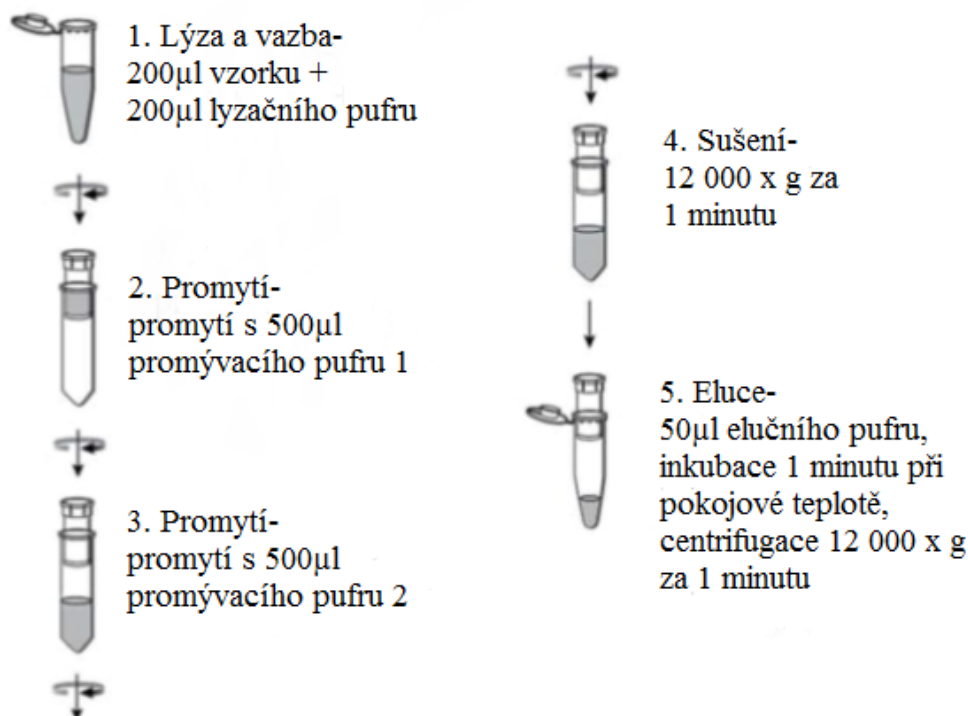
Nevýhodou fenol-chloroformové extrakce je její zdlouhavost a také práce s nebezpečnými sloučeninami, proto se v praxi nahrazuje rychlejšími a bezpečnějšími metodami [26, 27, 28].

### **3.2.2 Manuální izolace pomocí spin-kolonek**

Manuální izolace pomocí spin-kolonek se oproti fenol-chloroformové metodě liší tím, že je rychlejší a nepracuje se s nebezpečnými sloučeninami. Jedná se o vysoce specifickou metodu, při níž získáváme vysokou výtěžnost virové RNA nebo DNA. Izolace je založena na lýze virových molekul za přítomnosti chaotropních solí, které pomáhají vazbě RNA, a následném navázání nukleových kyselin na pevnou fázi (spin-kolonku). Poté následuje odstranění kontaminující DNA pomocí rekombinantní DNázy a centrifugace k odstranění nenavázaných látek. Nukleové kyseliny, jež jsou navázané na vazebném materiálu, se v dalším kroku promyjí pomocí vhodných pufrů. V konečné fázi dochází k eluci purifikovaných nukleových kyselin z vazebného materiálu, a to pomocí roztoků s nízkým obsahem soli např. ultra čisté vody bez RNáz. V mezikrocích vždy probíhá potřebná inkubace a centrifugace (viz Obr. 6). Takto izolovaná nukleová kyselina má vysokou kvalitu a je vhodná k přímému použití pro RT-qPCR a jiné metody [26, 27, 29].

V poslední době, kdy počet vzorků pro izolaci RNA stoupá a je potřeba ji izolovat rychle a ve vysoké kvalitě, se upřednostňuje používání komerčně dostupných souprav zahrnujících centrifugační (spin) kolonky nebo vícejamkové destičky obsahující materiál vázající nukleovou kyselinu. RNA je izolována na různě modifikovaných sorbentech, které umožňují vyšší výtěžnost čisté RNA a snižují kontaminaci preparátu genomovou DNA. Jako vazebný materiál se nejčastěji používají povrchy z oxidu křemičitého (silika) ve formě matrice (filtry ze skleněných vláken nebo membrány z oxidu křemičitého). Tyto materiály vážou nukleové kyseliny v prostředí pufrů na bázi guanidinu, jež jsou běžně používány pro zajištění chaotropních podmínek pro vazbu nukleových kyselin.

Existují také spin-kolony na bázi rostlinného celulózového materiálu pro čištění nukleových kyselin. Filtrační papír na bázi celulózy je oproti materiálu na bázi oxidu křemičitého levný a snadno dostupný v laboratořích [29, 30].

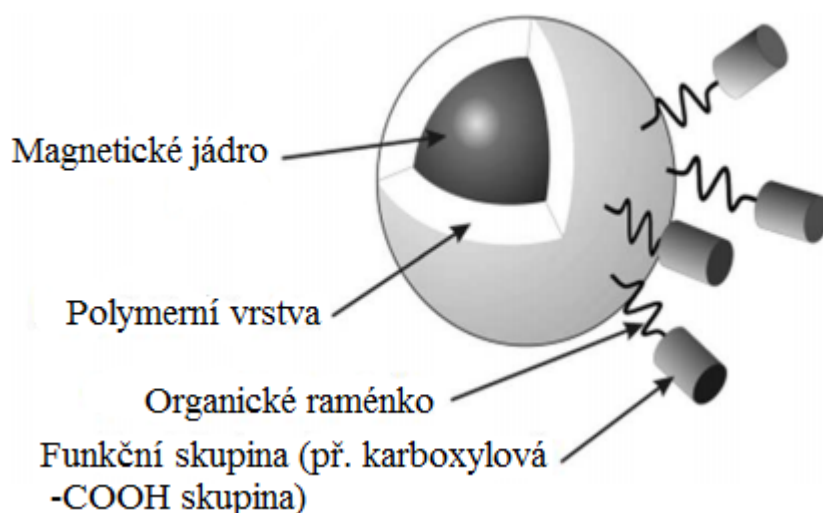


**Obrázek 6** - Schéma izolace nukleových kyselin pomocí spin-kolonek [31].

### 3.2.3 Automatizovaná izolace pomocí magnetických částic

Izolace nukleových kyselin pomocí magnetických částic je velmi oblíbená metoda zejména ve velkých provozech (nemocnicích), kde se může najednou pracovat s velkým množstvím vzorků. Některé přístroje jsou schopny izolovat až 96 vzorků za hodinu. Pracuje se s magnetickými částicemi, které jsou kulovitého tvaru a jejichž velikost se pohybuje od nm až po µm, v závislosti na izolovaném druhu vzorku. Pro izolaci nukleových kyselin a virů se velikost částic pohybuje okolo 20–450 nm. Jádro těchto částic je tvořeno magnetickými oxidy železa, nejčastěji  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetit),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemit), ale i zlatem. Aby se mohla částice navázat na nukleovou kyselinu, je potřeba obalit jádro specifickým povrchem, který ji bude vázat (viz Obr. 7). Používají se organické polymerní materiály obsahující velké množství navázaných karboxylových skupin, které mají hydrofilní charakter a usnadňují tak vazbu nukleové kyseliny [30].

Postup izolace probíhá tak, že nejprve dojde k lýze virových partikulí pomocí lyzačního pufru a poté se přidá vazebný pufr a také magnetické částice. Nukleové kyseliny se navážou na magnetické částice a při následném působení magnetického pole se přitáhnou ke stěně zkumavky a zbylý supernatant, obsahující nenasázené složky, se odstraní. Poté následuje promývání vzorků pomocí pufrů a v konečné fázi se přidá eluční pufr k vyvázání nukleových kyselin z vazby na magnetických částicích. Působením magnetického pole se odpipetuje čistá nukleová kyselina, která se nachází v supernatantu. Takto připravená nukleová kyselina je vhodná k přímému použití pro další zpracování [30].



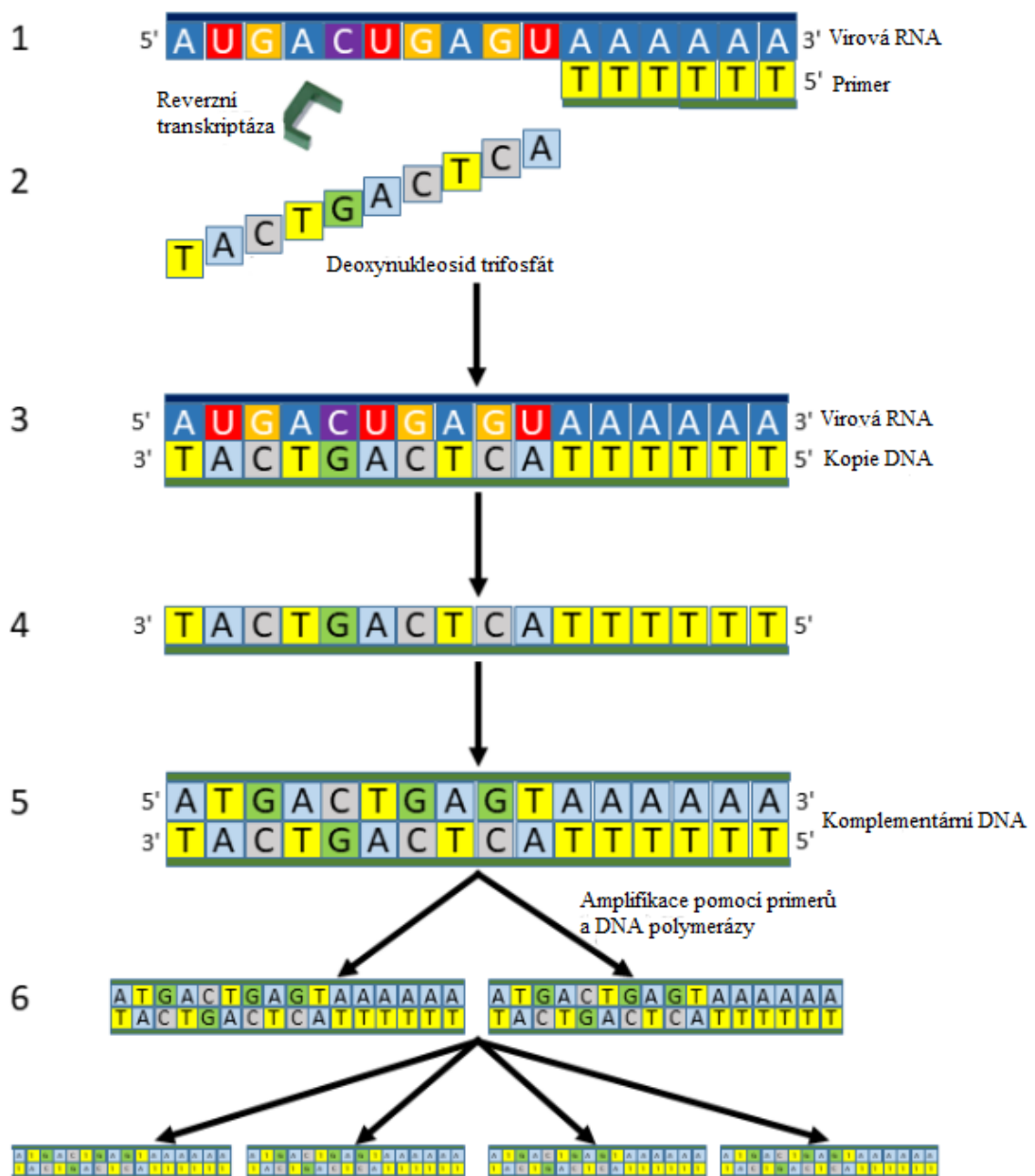
**Obrázek 7** - Schéma magnetické částice používané pro izolaci nukleových kyselin [32].

### 3.3 Reverzní transkripce

Principem reverzní transkripce je přepis genetické informace v mRNA do komplementární DNA (cDNA), která slouží jako templát pro metodu PCR v reálném čase (viz obr. 8). Z produktů cDNA jsme schopni zkoumat genetické složení nádorů, využívat metodu PCR obecně nebo kvantitativně, exprimovat jedinečné proteiny a mnoho dalšího. Přepis se uskutečňuje pomocí enzymu tzv. reverzní transkriptázy (RNA-dependentní DNA polymeráza) [33].

Pro stanovení SARS-CoV-2 viru se používají komerčně dostupné kity, jež obsahují veškeré reagenty potřebné pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci s reverzní transkripcí. Jsou v nich zahrnuty i složky potřebné právě k reverzní transkripci. Jedná se

zejména o Taq DNA polymerázu s reverzní transkriptázou. Taq DNA polymeráza je termostabilní enzym, který pochází z bakterie zvané *Thermus aquaticus* a je zodpovědný za katalýzu syntézy komplementární DNA ve směru 5'→3' konci. K zahájení zpětné transkripce a syntézy komplementárního řetězce DNA je dále potřeba mít vysokou kvalitu čisté vyizolované RNA a vhodné primery. Používají se oligo-dT primery, směs náhodných hexaoligonukleotidů nebo sekvenčně specifické primery. Celý proces reverzní transkripce probíhá v termocykleru nejčastěji při 55 °C 15 minut, kde se sestaví komplementární DNA řetězec a na něj poté navazuje metoda qPCR [33, 34].



**Obrázek 8** - Schéma reverzní transkripce [35].

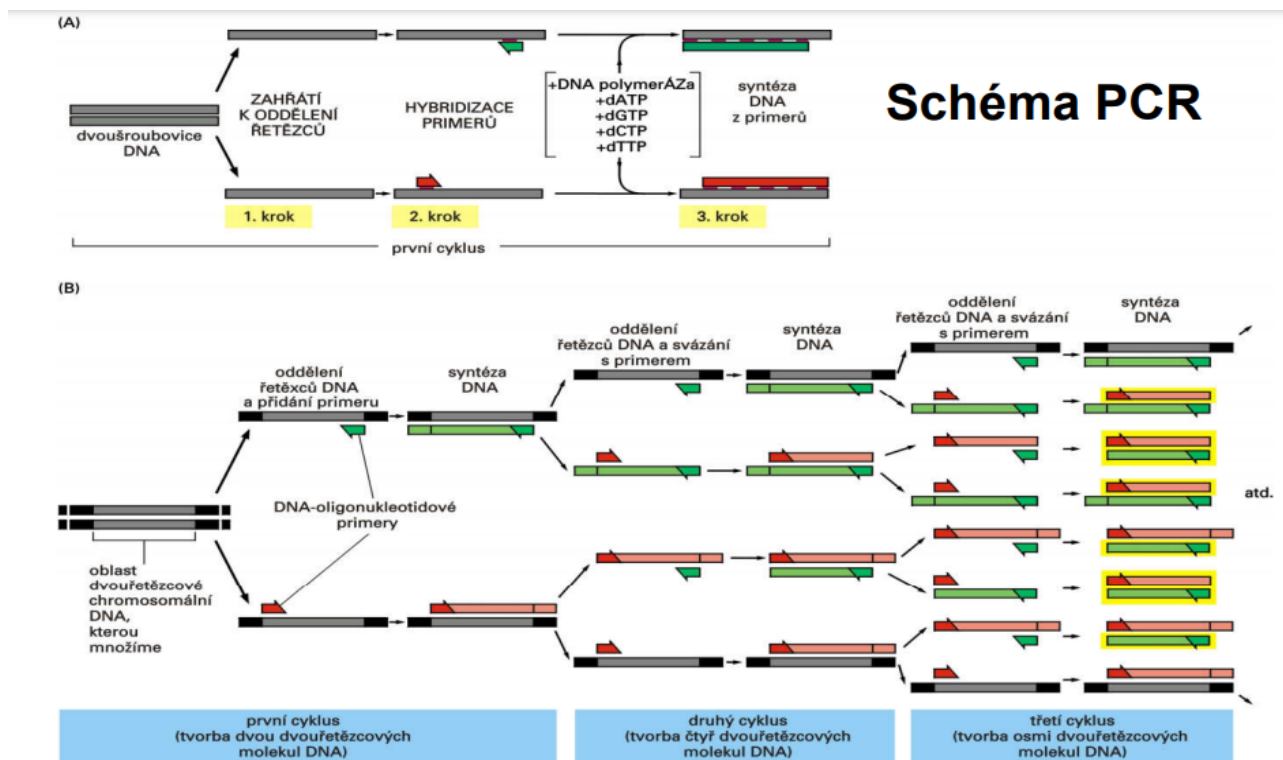


### 3.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Tato metoda vychází z konvenční metody polymerázové řetězové reakce (PCR), která byla vyvinuta americkým chemikem Kary Banks Mullisem a jeho spolupracovníky v roce 1985. Principem metody je selektivní amplifikace (namnožení) relativně krátkých úseků specifické DNA nebo RNA přítomné v reakční směsi působením cyklického střídání teplot. Takto namnoženou sekvenci je možné detekovat nebo dále analyzovat. Metoda PCR se stala velmi významným objevem, který našel využití v oblasti biologie a umožnil vývoj řady nových oborů. Za tento objev obdržel v roce 1993 K. Mullis Nobelovu cenu za chemii [36].

Metoda se provádí v termocyklerech a její průběh je založen na 3 krocích: denuraci, navázání primerů (tzv. annealing) a elongaci. První krok denurace zahrnuje zahřátí reakční směsi DNA na teplotu 95 °C. Při této teplotě dochází k oddělení dvouřetězcových vláken DNA a vzniká templátová (matricová) DNA. Po rozdělení řetězců následuje druhý krok PCR metody, tzv. annealing. V této fázi dojde ke snížení teploty reakční směsi na 50–60 °C, dochází k přisednutí krátkých oligonukleotidů (primerů) na templátovou DNA. Posledním krokem je elongace. Opět se zvýší teplota na 72 °C, a probíhá prodlužování primerů o nukleotidy komplementární k templátové DNA. Výsledkem PCR je namnožení původní sekvence DNA. Obvykle se provádí 30 cyklů, kde konečná hodnota je až  $10^9$  kopií (viz Obr. 8) [36].

Pro zahájení PCR metody je nutné připravit vhodnou reakční směs, která musí obsahovat určité komponenty. Mezi hlavní komponenty patří oligonukleotidové primery (koncentrace každého primeru v reakci 0,1 – 1  $\mu\text{M}$ ), termostabilní DNA polymeráza (obvyklé množství 0,25  $\mu\text{l}$ ), templátová DNA (nepatrné množství 1 až 1000 ng), reakční pufr (10 mM Tris-HCl a 50 mM KCl) zajišťující vhodné prostředí pro činnost DNA polymerázy (optimální pH 8,3 – 9,0), deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP, koncentrace v reakci obvykle 200  $\mu\text{M}$ ), sterilní destilovanou vodu a hořečnatou sůl ( $\text{MgCl}_2$  v koncentraci většinou 1,5 mM) sloužící jako kofaktor, který tvoří nerozpustný komplex s dNTP rozpoznávaný DNA polymerázou. Reakční směs se připravuje v různých objemech v závislosti na množství vzorků. Objem na jeden vzorek bývá kolem 25  $\mu\text{l}$  [37].



**Obrázek 9** - Schéma PCR: (A) přehled základních kroků PCR metody, (B) zobrazení amplifikačního postupu [38].

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR, PCR-real time) se od původní PCR metody liší tím, že je schopna určit výchozí množství DNA po proběhnutí celého cyklického procesu. Jedná se tedy o metodu kvantitativní. U původní PCR metody se analyzuje až konečný produkt pomocí elektroforézy v agarózovém gelu, jde tedy o tzv. end-point metodu. Tento nedostatek vyřešil v roce 1992 Russell Huguchi se svými spolupracovníky. Zjistili, že metodu PCR lze provádět v přítomnosti barevných sond, které po navázání na molekulu DNA vykazují fluorescenci, a tu je možné průběžně zaznamenávat. Dle záznamu lze poté zjistit jak výchozí množství molekuly DNA, tak i jednotlivá množství po každém proběhnutém cyklu. Tato metoda lze použít i v kombinaci s reverzní transkripcí, kdy dochází nejprve k přepisu mRNA do cDNA. Poté je možné zjistit původně přítomné mRNA jako měřítko aktivace genového přepisu [39, 40].

### 3.5 Možnosti detekce

Detekce množství DNA při kvantitativní PCR je možná díky různým detekčním značkám interagujícím s DNA. Mezi nejčastěji používané patří např. nespecifické

fluorescenční interkalační barviva či sekvenčně specifické fluorescenčně značené sondy či primery.

Interkalační barvivo zvyšuje fluorescenci v přítomnosti dvouvláknové (ds) DNA. Jako barvivo se využívá například ethidium bromid, který se váže na dvouvláknovou DNA a po ozáření fluoreskuje v UV části spektra, ale jeho fluorescence bývá většinou slabá. Proto bývá většinou nahrazováno jinými barvivy. Osvědčeným barvivem je zejména SYBR Green, což je fluorescenční kyaninové barvivo, které má zhruba stokrát větší afinitu k DNA než ethidium bromid a poskytuje mnohem silnější fluorescenci. Signál fluorescence se zvyšuje s rostoucím počtem amplikonů. V dnešní době je metoda pomocí interkalačních barviv nahrazována komerčně dostupnými kity, kde je detekce DNA založena na jiném způsobu značení pomocí sond nebo primerů [41].

Mezi používané fluorescenčně značené sondy se řadí např. TaqMan sondy (hydrolyzační sondy), což jsou oligonukleotidy delší než primery nasedající na vnitřní část amplifikované oblasti. Na svém 5' konci jsou opatřeny kovalentně navázaným fluoroforem (tzv. reportér) a na 3' konci obsahují zhášec (tzv. quencher), což jsou molekuly schopné absorbovat energii z excitovaného fluoroforu. Princip testu je založen na exonukleázové aktivitě Taq polymerázy ve směru 5'→3'. Aby sonda emitovala fluorescenci musí ji nejdříve Taq polymeráza rozštěpit a zabránit tak zhášení fluorescence. Fluorescence je zaznamenávána a měřena každý cyklus v závislosti na množství uvolněných reportérů, a tedy i na množství amplifikovaného produktu [42].

Fluorescenčně značené primery používané při kvantitativní PCR jsou např. LUX primery (z angl. Light-Upon extension), jedná se o oligonukleotidy, které mají fluorescenční barvivo připojeno poblíž 3' konce. Tato metoda nevyžaduje zhášec, protože oligonukleotidy jsou konstruovány tak, aby vytvořily vlásenkové smyčky, které jsou schopny samy zhášet fluorescenci. K emisi fluorescence dsDNA produktu dochází po prodloužení primerů. Výhodou vlásenkových oligonukleotidů je také to, že zabraňují tvorbě dimerů primerů a nesprávnému primování, čímž poskytují vyšší specifitu a citlivost PCR [43].

V současné době lze amplifikovat a detekovat více různých genů současně za použití tzv. multiplexní analýzy. Toho je dosaženo tak, že se do reakce přidá více párů primerů, které jsou označeny sondami, z nichž každá sonda je značena jedinečným fluorescenčním barvivem. Primery se vážou k různým úsekům DNA a jsou zaznamenávány odlišné barvy každého úseku. Následný signál každého barviva se používá ke kvantifikaci množství

určitého cíle nebo genu. Výhodou používání multiplexní analýzy je, že umožňuje rychle měřit úroveň exprese několika sledovaných cílů nebo genů [44].

### 3.6 Přístrojové vybavení

PCR metoda probíhá v přístroji zvaném termocykler, což je programovatelný termostat, který umožňuje změnu teploty ve velmi krátkém intervalu. Klasický termocykler je vybaven tepelným blokem s otvory pro zkumavky a umožňuje programovatelnou regulaci teploty v jednotlivých cyklech. Obsahuje také vyhřívané víko, jež tlačí na víčka reakčních zkumavek a zabraňuje tak kondenzaci vody z reakční směsi na vnitřní straně víček [45].

Ke snímání fluorescenčního signálu u real-time PCR se používají termocyklery, které mají navíc modul pro detekci fluorescence (fluorimetr). Fluorimetr měří změny intenzity fluorescence. Přístroje jsou opatřeny zdrojem excitačního záření, používají se halogenové žárovky, lasery nebo LED diody, jejichž světlo poskytne takovou energii, která je schopna excitovat elektrony fluoroforu. Dále obsahují filtry nebo monochromátor a detektor záření. Záření, vznikající ve zdroji, prochází filtrem nebo monochromátorem, kde dojde k úpravě jeho vlnové délky a následně pokračuje do vzorku. Zde dochází k interakci se vzorkem a vzniku fluorescenčního záření. Poté záření ze vzorku vychází a přes filtr dopadá na detektor [46].

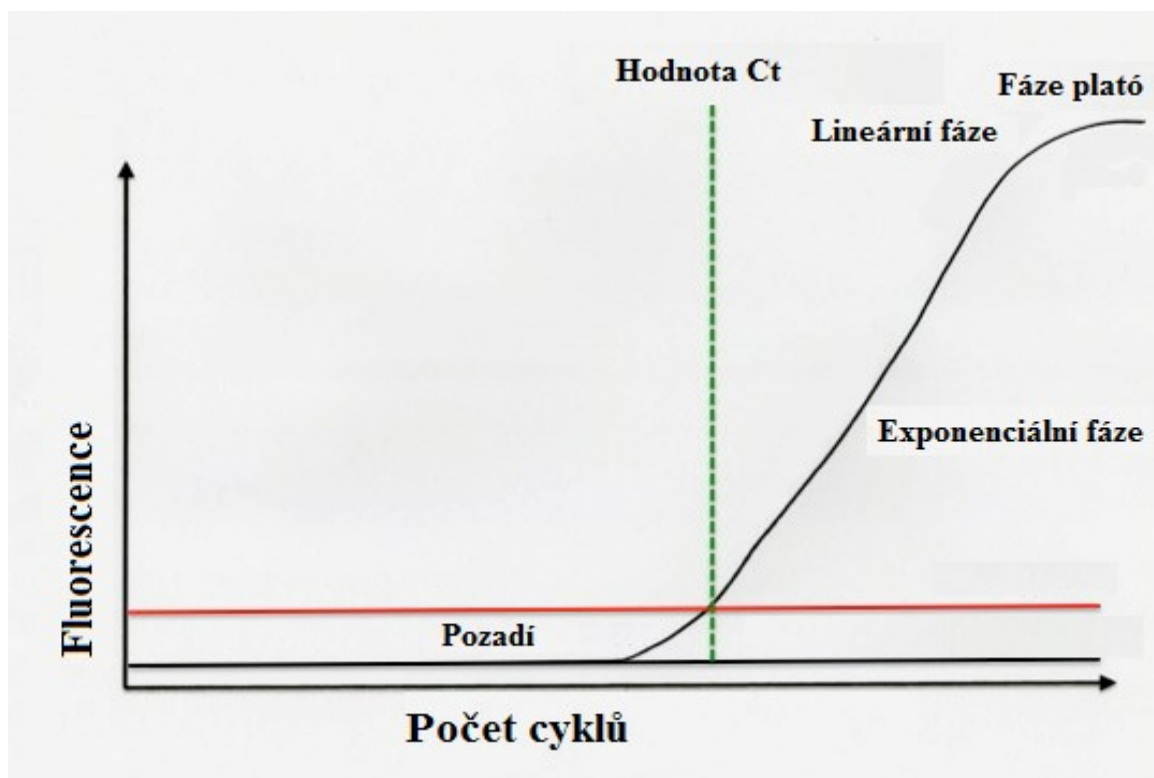
### 3.7 Grafický průběh reakce

Průběh real-time PCR se zaznamenává graficky pomocí amplifikační křivky, která znázorňuje závislost fluorescence (osa y) na počtu cyklů (osa x). Křivku je možné rozdělit do 4 fází (viz Obr. 9): fázi background (pozadí), exponenciální fázi, lineární fázi, a fázi plató.

V background fázi dochází k amplifikaci produktu, ale jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot. V exponenciální fázi dochází ke zdvojnásobení množství amplikonu po každém proběhnutém cyklu a zároveň k nárůstu fluorescence, která ještě nepřesahuje úroveň pozadí. V tomto úseku křivky se určuje tzv. Ct hodnota (z angl. Cycle threshold), jež je zachycena detektorem. Tato hodnota nám udává cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí. Čím menší je hodnota Ct, tím více bylo vstupního materiálu vloženo do reakce a naopak. V lineární fázi se účinnost reakce snižuje, nedochází k exponenciálnímu nárůstu fluorescence, ale pouze k lineárnímu. V poslední fázi plató

množství fluorescence již nenarůstá z důvodů postupného vyčerpání složek reakční směsi [47].

Při detekci SARS-CoV-2 viru pomocí RT-qPCR jsou hodnoty Ct menší jak 40 považovány za pozitivní.



**Obrázek 10** - Amplifikační křivka qPCR [48].

### 3.8 Senzitivita a specificita RT-qPCR testu na průkaz SARS-CoV-2 viru

Metoda RT-qPCR se vyznačuje vysokou senzitivitou i specificitou. S chybnými výsledky testů se setkáváme jen velmi výjimečně. Ke správnému výsledku musí být striktně dodrženy všechny postupy související jak s preanalytickou fází, tak s analytickou fází. Za chybné výsledky jsou považovány falešná negativita (člověk je nemocný, ale výsledek testu je negativní) nebo falešná pozitivita (člověk je zdravý, ale výsledek testu je pozitivní). Nejčastější příčinou falešně negativního testu může být špatné nebo nedostatečné odebrání klinického materiálu, nevhodný materiál k vyšetření, RNA vir se nepodařilo vyizolovat nebo se znehodnotil během manipulace se vzorkem. Dalším důvodem může být, že test byl proveden příliš brzy a virus se ještě nestihl pomnožit, a to zejména v době, kdy pacient ještě nemá klinické příznaky. U falešně pozitivního výsledku může být příčina lidský faktor, záměna vzorku nebo kontaminace vzorku. Mohou také selhat některé reagenty při testování.

Obecně lze ale říct, že PCR metoda je velmi spolehlivá a chybné výsledky jsou spíše vzácnost. Do jisté míry může mít vliv na senzitivitu PCR testu také mutace viru [49, 50].

## 4 Komerční RT-qPCR kity pro detekci SARS-CoV-2

Komerční kity umožňují snadnější a rychlejší detekci virové nukleové kyseliny. U stále se rozvíjejícího onemocnění Covid-19, kdy počet nakažených rapidně roste, je důležité diagnostikovat onemocnění včas, aby se předcházelo dalšímu nakažení. Proto je výhodné používat právě komerční kity. V soupravách jsou obsaženy veškeré potřebné reagenty. Spolu se soupravou jsou také dodávány návody, jak postupovat v jednotlivých krocích, informace o reagentech a jejich přípravě a skladování, nezbytné přístrojové vybavení a také interpretace výsledků [51].

Komerčních kitů pro detekci viru SARS-CoV-2 je celá řada, vyvíjí je mnoho různých společností po celém světě. Existují i kity, které dokážou odhalit různé mutace viru nebo rozlišit, zda se jedná o koronavirus nebo chřipku [51].

### 4.1 Experimentální uspořádání RT-qPCR kitů

Jednotlivé kity umožňují provedení RT-qPCR buď jedнокrokově, nebo dvoukrokově. V případě jedнокrokové (tzv. „one tube“ nebo „one step“) RT-qPCR probíhá reverzní transkripce a PCR v jedné jediné zkumavce. Výhodou této reakce je jednodušší příprava, použití méně pipetovacích kroků a tím i nižší riziko kontaminace. Mezi další výhody lze zařadit rychlost, vysokou reprodukovatelnost a také průběh při vyšší teplotě umožňující vyšší citlivost. Většina kitů je založena právě na jedнокrokové RT-qPCR metodě. Oproti tomu u dvoukrokové (tzv. „two tube“) RT-qPCR jsou od sebe oba procesy, reverzní transkripce a PCR, odděleny pomocí použití dvou zkumavek. Výhodou tohoto provedení je vznik cDNA, kterou lze dále flexibilně používat. Avšak na rozdíl od jedнокrokové metody je zde vyšší riziko kontaminace.

Důležitou součástí kitů bývá pozitivní a negativní kontrola, které se vždy analyzují spolu s vyšetřovanými vzorky. Jako kontroly lze použít např.:

- **Interní pozitivní kontrola (IPC)** – kontrola inhibice PCR a kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA

- **Endogenní kontrola** – prevence falešně negativních výsledků, kontrola odběru vzorků, procesu izolace a odhalení možné inhibice RT-qPCR
- **Pozitivní kontrola** – ověření validity analýzy
- **Exogenní kontrola** – ověření izolačního procesu a one-step RT-qPCR [51, 52]

Komerčních kitů pro detekci viru SARS-CoV-2 je celá řada, vyvíjí je mnoho různých společností po celém světě. Existují i kity, které dokážou odhalit různé mutace viru nebo rozlišit, zda se jedná o koronavirus nebo chřipku [51].

## 4.2 Cílové oblasti využívané při detekci SARS-CoV-2

Virový genom SARS-CoV-2 obsahuje 3 oblasti, které mají konzervované sekvence. Jsou to gen E (gen obalového proteinu), gen RdRP (gen RNA-dependentní RNA polymerázy) nacházející se v oblasti otevřeného čtecího rámce ORF 1ab a gen N (gen nukleokapsidového proteinu). Právě na tyto oblasti je zacílena většina komerčních kitů. Nejvyšší analytickou citlivost mají E a RdRP geny, které poskytují jasné výsledky o přítomnosti SARS-CoV-2 viru [53].

Podle typu přístroje se tyto dva geny stanovují buď postupně ve dvou analýzách, nebo paralelně v jedné analýze (tj. multiplexní analýza). Postupná analýza bývá prováděna v případě dvoukanalových zařízení, kdy v jednom kanále je během analýzy měřena vnitřní kontrola a ve druhém kanále pak cílový gen. Strategie bývá taková, že se vyšetřované vzorky zanalyzují nejprve na přítomnost E genu (tj. primární test) a ty co vyjdou pozitivní, se pak potvrzují testem na stanovení přítomnosti RdRP. Vzorky, které vyjdou pozitivní v obou testech, jsou pak považovány ve výsledku za pozitivní. Nevýhodou této metody postupné detekce ve dvou krocích je především zdlouhavost. Proto se dává přednost multiplexním analýzám, kdy se paralelně detekuje více cílů. Jejich počet závisí na možnostech přístroje, který máme, konkrétně jde o počet měrných kanálů, a dostupném komerčním kitu. Pro detekci SARS-CoV-2 viru jsou používány komerčně dostupné kity, které jsou založeny např. na duplexní nebo kvadruplexní RT-qPCR. Test probíhá v jedné zkumavce a jsou v ní současně testovány dva (např. E gen a RdRP gen, *kit gb SARS-Cov-2 Combi* od GeneriBiotech) nebo čtyři (např. E gen, RdRP gen a N gen, *kit GeneProof SARS-CoV-2 Screening PCR kit* od GeneProof a.s.) cíle. Jeden cíl slouží jako interní amplifikační kontrola na bázi RNA, ta se

přidává do lyzačního kroku při izolaci RNA a kontroluje tak celý proces analýzy. Ostatní cíle slouží k amplifikaci různých sekvencí specifických pro SARS-CoV-2 vir. Tento postup nám poskytuje jednoznačnou interpretaci výsledků a pozitivní výsledky i v případě mutace viru. V soupravách se využívá detekce především pomocí fluorescenčně značených sond (např. TaqMan sondy) [44, 54].

U nás je v tomto směru významná společnost Generi Biotech, která má certifikaci pro výrobu zdravotnických prostředků podle normy EN ISO 13485 a vyvíjí a vyrábí IVD (z angl. *In Vitro* Diagnostic) kity pro real-time PCR. Všechny kity vychází z oficiálně doporučeného protokolu WHO pro detekci SARS-CoV-2 viru. Přehled jejich komerčně dostupných kitů pro detekci SARS-CoV-2 viru je uveden v tabulce 1 [51].

**Tabulka 1** - Přehled kitů pro detekci SARS-CoV-2 od společnosti Generi Biotech [51].

Typ kitu	Metoda RT-qPCR	Primární test	Konfirmační test	Multiplexová analýza
Duplexní kit: LOD 3 kopie spolehlivost 95 % FAM sondy modifikované technologíí GEMINI™	jednokroková	geny N / E (cíleno na konzervativní sekvence skupiny <i>Sarbecovirus</i> )	geny RdRP / N (pro potvrzení pozitivních vzorků z primárního testu)	-
Combi test: LOD 3,45 kopií vlastní technologie sond GEMINI™	jednokroková	-	-	geny E a RdRP (FAM)
Combi EndoC test: LOD 3,28 kopií vlastní technologie sond GEMINI™	jednokroková	-	-	geny E a RdRP (FAM), endogenní kontrola (HEX)
Multiplex test: LOD 2,13 kopií vlastní technologie sond GEMINI™	jednokroková	-	-	geny E (FAM) a RdRP (HEX)
Multiplex EdoC test: LOD 2,90 kopií vlastní technologie sond GEMINI™	jednokroková	-	-	geny E (FAM) a RdRP (HEX), endogenní kontrola (Cy5)



Aby se předcházelo falešně negativním výsledům, lze ověřit kvalitu odběru a extrakce RNA ze vzorku např. kitem na detekci lidské RNA (*gb Human B2M mRNA kit* od Generi Biotech). Využívá se detekce transkriptu genu B2M, což je lidský referenční gen, který je přítomný ve všech lidských vzorcích. Pomocí tohoto kitu se zkontroluje celý preanalytický proces. Pokud dojde k odchylce některého ze vzorků je potřeba provést nový odběr, izolaci RNA a nový test. Falešnou negativitu lze kontrolovat také pomocí lidské endogenní kontroly (*gb SARS-CoV-2 Combi EndoC kit* od Generi Biotech), a to na základě detekce lidského referenčního genu GUSB ( $\beta$ -glukuronidáza). Kromě detekce lidského referenčního genu slouží také ke kontrole odběru vzorku, procesu izolace a k odhalení možné inhibice RT-qPCR. K ověření izolačního procesu a k odhalení možné inhibice RT-qPCR lze použít také exogenní kontrolu (EPC Template RNA od Generi Biotech). Jedná se o uměle vytvořenou RNA, která je přidána ke vzorku před izolací, anebo je přidána do RT-qPCR reakce k jejímu ověření. K ověření validity analýzy slouží pozitivní kontrola (*Positive Control CoV-2 EC* od Generi Biotech) [55, 56].

#### **4.3 Srovnání kitů pro detekci SARS-CoV-2**

V současnosti je dostupných více než 350 komerčních kitů pro detekci SARS-CoV-2 viru pomocí RT-qPCR. Kromě kitů od zmiňované společnosti GeneriBiotech existuje celá řada dalších souprav od jiných společností (Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., DIANA Biotechnologies, s.r.o., GeneProof a.s., AUMED, a.s., Erba Lachema s.r.o., Institute of Applied Biotechnologies a.s., IntellMed, s.r.o.). Principiálně jsou obdobné, některé vybrané jsou uvedeny v tabulce 2 [57].

**Tabulka 2 - Přehled kitů pro detekci SARS-CoV-2 od ostatních společností [58, 59, 60].**

Název společnosti	Název kitu	Popis
Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.	EliGene® COVID19 BASIC A500 RT	Jednokroková, kvadruplexní RT-qPCR, 3 cíle v N genu viru SARS-CoV-2
Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.	EliGene® COVID19 CONFIRM 500RT	Jednokroková RT-qPCR, cíle v genu ORF1ab a v genu E
DIANA Biotechnologies, s.r.o.	COVID-19 Multiplex RT-PCR kit	Jednokroková RT-qPCR, cíle: gen Spike a EndoRNase
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 Screening PCR kit	Jednokroková RT-qPCR, cíle: geny RdRP, E a N
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 RdRp Confirmatory PCR Kit	Jednokroková RT-qPCR, cíl: specifická oblast RdRP genu, zkrácená PCR (méně než 1 hodina), vzorek i ze slin
Institute of Applied Biotechnologies a.s.	DIOS-RT-qPCR	Jednokroková RT-qPCR bez extrakce RNA, cíle: virové nukleokapsidové geny N1, N2

Všechny kity by měly spolehlivě odlišit pozitivní a negativní vzorky a splňovat co nejlepší hodnoty co se specificity a senzitivity týče. Existují studie, které se zabývají vyhodnocováním a porovnáváním účinnosti jednotlivých komerčních souprav. Jedna z nich byla navržena a provedena na katedře mikrobiologie Sanjay Gandhi Post Graduated Institute of Medical Sciences v Lucknow v Indii. Tato studie vyhodnocuje sedm komerčních souprav RT-PCR pro testování Covid-19. Jedná se o soupravy: *TRUPCR SARS-CoV-2 Kit* (Black Bio Biotech), *TaqPath RT-PCR COVID-19 Kit* (Thermo Fischer Scientific), *Allplex 2019-nCoV Assay* (Seegene), *Patho detect COVID-19 qualitative PCR kit* (My Lab), *LabGun COVID-19 RT-PCR Kit* (Lab Genomics), *Fosun COVID-19 RT-PCR detection kit* (Fosun Ltd.) a *Real-time Fluorescent RT-PCR kit for detectig SARS-CoV-2* (BGI Genomics). Těmito komerčními kity se testovalo celkem 40 pozitivních vzorků a 10 negativních vzorků. Výsledky studie jsou uvedeny v tabulce 3 [61].

*Tabulka 3 - Výsledky porovnání jednotlivých RT-PCR kitů [61].*

	<b>Black Bio Biotech</b>	<b>Thermo Fischer Scientific</b>	<b>Seegene</b>	<b>My Lab</b>	<b>Lab Genomisc</b>	<b>Fosun Ltd.</b>	<b>BGI Genomics</b>
<b>Citlivost</b>	100% (91,1-100%)	100% (91,1-100%)	100% (91,1-100%)	88,8% (75,9-96,2%)	93,02% (80,9-85%)	95,2% (83,8-99,4%)	100% (91,1-100%)
<b>Specifičnost</b>	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)	100% (69,1-100%)
<b>Přesnost</b>	100%	100%	100%	90,9%	94,3%	96,15%	100%
<b>Pozitivní prediktivní hodnota</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Negativní prediktivní hodnota</b>	100%	100%	100%	66,6% (46,6-82,0%)	76,9% (52,8-90,8%)	83,3% (56,3-95,0%)	100%

Všechny soupravy dokázaly správně identifikovat 40 pozitivních a 10 negativních vzorků a mohou být tudíž používány pro rutinní diagnostiku Covid-19. Výsledky rovněž ukazují, že vyšší analytickou citlivost, specifitu a přesnost dávají soupravy od společností Black Bio Biotech, Thermo Fischer Scientific, Seegene a BGI Genomics [61].

#### **4.4 Kity pro detekci SARS-CoV-2 bez extrakce**

Na trhu se objevují také tzv. extraction-free RT-PCR kity, kde je vynechán krok extrakce RNA vzorku. Právě tento krok představuje hlavní překážku při provádění diagnostiky viru. Výhodou tohoto testování je menší spotřeba reagensů, zkrácení času analýzy nebo také rozšíření počtu laboratoří schopných provádět diagnostiku Covid-19. Respirační vzorky jsou nejprve tepelně inaktivovány (z angl. heat inactivation) při 99 °C po dobu 5 min, aby byla zajištěna bezpečná práce a lýze viru. Zahřátí musí být takové, aby došlo k efektivní lýzi buněk, ale nedošlo k degradaci RNA. Při provedení PCR testu bez extrakce se využívají enzymy, které jsou tolerantní vůči vysokým hladinám inhibitoru. Vzorky výtěrů jsou přímo uloženy do zkumavek obsahující směs PCR komponent. Společnosti, které vytváří komerční kity bez extrakčního kroku, jsou např: Takara (*PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix*,

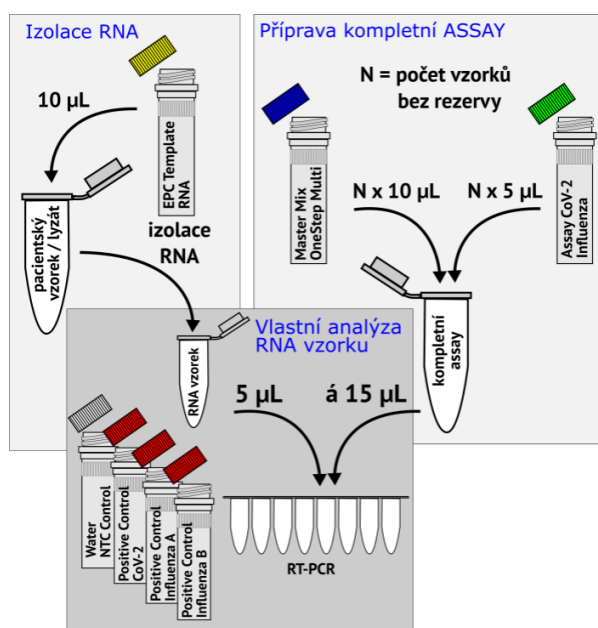
*PrimeScript®RT-PCR*) a Sansure (*SARS-CoV-2 SANSURE®BIOTECH Novel Koronavirus*). Všechny tyto kity mají dobrou citlivost PCR testů, a to zejména u vysokých virových zátěží (Ct <30). Hodnocení těchto souprav ukazuje, že dvě soupravy mají podobnou celkovou citlivost 69,9 % (PrimeScript a Sansure). PrimeDirect vykazoval celkovou citlivost 55,1 %. Výsledek studie ukázal, že testy bez extrakce jsou vhodnou alternativou ke klasickým testům pro detekci SARS-CoV-2 viru ve vzorcích nosohltanu i přes nedostatečnou citlivost na nízkou virovou zátěž [62, 63].

#### 4.5 Odlišení infekce virem SARS-CoV-2 od chřipky

Onemocnění Covid-19 a chřipka se na první pohled jeví velmi podobně. Důležitým rozdílem je zejména rychlost přenosu. Ačkoli se obě onemocnění přenáší kapénkami, kontaktem nebo kontaminovanými předměty, chřipka má kratší průměrnou inkubační dobu i kratší sériový interval. V průměru jsou to cca 3 dny u chřipky a 5-6 dní u Covid-19, což ukazuje, že se chřipka v populaci šíří rychleji. Následné projevy jsou u obou onemocnění prakticky stejné. Mohou se ale lišit podílem onemocnění se závažným průběhem. Dalším rozdílem mezi oběma nemocemi je až čtyřicetkrát vyšší pravděpodobnost úmrtí při nákaze virem SARS-CoV-2, které platí pro všechny věkové kategorie. Proto je důležité tyto dvě nemoci rozlišit [64].

Existují kity umožňující odhalení, zda se jedná o onemocnění Covid-19 nebo chřipku. Např. IVD souprava *gb SARS-CoV-2 Influenza A/B* (Generi Biotech) detekuje viry SARS-CoV-2, Influenza A a Influenza B, a to pomocí multiplexní jednokrokové RT-qPCR metody. U SARS-CoV-2 se jedná konkrétně o virové geny E a RdRP v kanálu FAM, gen M slouží pro detekci Influenzy A v kanálu HEX a Influenzy B v kanálu ROX. Současně se provádí exogenní pozitivní kontrola EPC v kanálu Cy5. Přehled obdobných kitů odlišujících onemocnění Covid-19 od chřipky je uvedeno v tabulce 4 [65].

K ověření validity analýzy slouží pozitivní kontrola CoV-2/Influenza A/Influenza B. Pro kontrolu izolačního procesu a jednokrokové RT-qPCR reakce se používá exogenní pozitivní kontrola EPC Template RNA. Může se také využít *gb Human B2M mRNA kit*, který slouží jako kontrola procesu odběru vzorku. Souprava využívá technologii sond GEMINI™ a multikanálové PCR termocyklery. Příprava reakční směsi probíhá podle schématu (viz Obr. 10). LOD testu pro SARS-CoV-2 je 2,15 kopií virové RNA na reakci, pro Influenza A 14,68 kopií a pro Influenza B 10,67 kopií RNA [65].



**Obrázek 11** - Schéma přípravy analýzy kitem gb SARS-CoV-2 Influenza A/B (Generi Biotech) [66].

**Tabulka 4** - Přehled kitů pro odlišení infekce virem SARS-CoV-2 od chřipky [58, 59, 67].

Název společnosti	Název kitu	Detekované cíle
Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.	EliGene® COVID19 Triple RIC 500 RT	SARS-CoV-2, Influenza A (H1N1, H3N2, H5N1), Influenza B, respirační syncytiální virus A a respirační syncytiální virus B (RSV A a B)
GeneProof a.s.	Covid-19 • Flu • RSV GPack	SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RVS A a B
AusDiagnostics	SARS-CoV-2, Influenza A RSV	SARS-CoV-2, Influenza A a její sérotypizace, Influenza B, RVS A a B

#### 4.6 Detekce mutací viru SARS-CoV-2

Vznik mutací u SARS-CoV-2 viru je spojen především s jeho povrchovým proteinem S, který se váže na ACE2 a umožňuje tak průnik viru do hostitele. Právě z tohoto důvodu se stávají mutace více nakažlivé a způsobují horší průběh nemoci v důsledku vyšší virové nálože. Ačkoli mutací stále přibývá, budou zde popsány 3 nejčastější. Britská, jihoafrická

a brazilská mutace. Všechny tři typy spojuje mutace N501Y, ta se nachází v části genu pro S protein. Odlišnosti jednotlivých mutací jsou definovány v tabulce 5 [68, 69].

**Tabulka 5 - Mutace viru SARS-CoV-2.**

	<b>Britská varianta</b>	<b>Jihoafrická varianta</b>	<b>Brazilská varianta</b>
<b>Označení</b>	B.1.1.7 (20I/501Y.V1)	B.1.351 (501Y.V2)	B.1.1.28 (P.1) B.1.1.33 (P.2) (501Y.V3)
<b>Mutace</b>	N501Y, A570D, D614G	N501Y, E484K, K417N	-N501Y, K417T, E484K (varianta P.1) -N501Y, E484K (varianta P.2)

Komerčně dostupné kity jsou vytvořeny tak, aby detekovaly dva a více úseků genetické informace viru. Mutace způsobí změnu určité sekvence genetické informace viru, a to může mít za následek u některých kitů sníženou senzitivitu testu. Jsou však již navrženy takové komerčně dostupné kity, které spolehlivě dokážou rozeznat mutaci viru [49, 50].

Příkladem může být multiplexní IVD kit *gb SARS-CoV-2 Variant SA/BR, UK* (Generi Biotech), jež slouží pro detekci SARS-CoV-2 viru a umožňuje identifikaci jeho britské, jihoafrické a brazilské mutace. Vše probíhá v jedné reakci založené na jednokrokové RT-qPCR metodě. Využívají se fluorescenčně značené sondy, kanály FAM, HEX, ROX pro detekci viru a Cy5 kanál pro exogenní pozitivní kontrolu. Virové geny S a RdRP se stanovují v kanálu ROX, jihoafrická a brazilská mutace v kanálu FAM a britská varianta v kanálu HEX. Klíčová mutace E484K způsobuje sníženou vazbu neutralizačních protilátek a najdeme ji ve variantě B.1.351 (501Y.V2) označované jako jihoafrická varianta a v P.1 (501Y.V3) jako varianta brazilská. Mutace A570D je britská varianta B.1.1.7 (20I/501Y.V1). Přehled obdobných kitů, které slouží pro detekci mutací viru je uvedeno v tabulce 6 [70].

K ověření validity analýzy slouží pozitivní kontrola CoV-2 SA a jako prevence falešně negativních výsledků se provádí kontrola procesu izolace RNA a PCR, a to pomocí EPC Template RNA, která se přidá do vzorku před izolací a následně je detekována v Cy5 kanálu. Může být také použit *gb Human B2M mRNA kit* pro kontrolu procesu odběru vzorku. LOD testu je 4 kopie virové RNA v reakci [70].

**Tabulka 6 - Přehled kitů pro detekci mutací viru SARS-CoV-2 [58, 59].**

<b>Název společnosti</b>	<b>Název kitu</b>	<b>Detekované cíle</b>
Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.	EliGene® COVID19 UKV 500 RT	SARS-CoV-2 vir, britská mutace
Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.	EliGene® COVID19 UKV/SAV 500 RT	SARS-CoV-2 vir, britská a jihoafrická mutace
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 South African/UK Typing PCR Kit	SARS-CoV-2 vir, britská a jihoafrická mutace
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 Vaccine Escape PCR Kit	SARS-CoV-2 vir, britská, jihoafrická a brazilská mutace
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 South African/UK Diagnostic PCR Kit	SARS-CoV-2 vir, britská a jihoafrická mutace
GeneProof a.s.	GeneProof SARS-CoV-2 South African/UK/BR Typing PCR Kit	SARS-CoV-2 vir, britská, jihoafrická a brazilská mutace

## 5 Závěr

Virus SARS-CoV-2, který se od roku 2019 šíří z čínské provincie Wu-chan do celého světa, způsobuje závažné onemocnění nazývané Covid-19. Toto onemocnění, projevující se zejména respiračními problémy, může skončit až fatálně. Z toho důvodu se zavedla různá opatření k omezení šíření této nemoci. Velmi důležitá pro zastavení viru je také jeho diagnostika. Je mnoho způsobů, jak virus diagnostikovat, nejefektivnějším způsobem je polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí, která namnoží určitý úsek genetické informace viru před jeho detekcí. Z tohoto důvodu je úspěšnost testování téměř 100 %. Tato metoda je již zcela automatizována a umožňuje tak diagnostiku velkého množství vzorků najednou. Pro tento účel jsou hojně využívány komerční kity, které obsahují veškeré reagencie a umožňují tak snadnější a rychlejší detekci. Průběh RT-qPCR může probíhat buď jedнокrokově (v jedné zkumavce, RT a qPCR společně) nebo dvoukrokově (ve dvou zkumavkách, RT a qPCR odděleně). Většina kitů je založena na jedнокrokové metodě, právě z důvodu rychlejší analýzy. Existuje mnoho společností po celém světě, které vyrábí komerční kity, principem jsou si všechny podobné. Jsou založené na RT-qPCR detekci určité sekvence genu (především geny E, N a RdRP). Cílové oblasti mohou být detekovány jednotlivě nebo existují tzv. multiplexní kity, které umožňují detekci více cílových molekul v jedné analýze. Ačkoli virus vytváří mutace, vhodně navržený RT-qPCR test je schopen úspěšně diagnostikovat přítomnost viru i v tomto případě. Stejně tak je možné odlišit nákazu virem SARS-CoV-2 od chřipky.

Onemocnění Covid-19 se v České republice testuje v nemocnicích, v soukromých laboratořích nebo ve speciálně zřízených centrech. Výsledky testování jsou zpravidla známy do 48 hodin od odběru vzorku. Laboratoř je také povinna vystavit potvrzení o výsledku nebo certifikát o negativním výsledku, který lze uplatnit po celé Evropské unii.



## 6 Zdroje

1. Decaro N, Lorusso A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Vet Microbiol.* 2020 May;244:108693. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108693. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32402329; PMCID: PMC7195271.
2. Shokri S, Mahmoudvand S, Taherkhani R, Farshadpour F. Modulation of the immune response by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Cell Physiol.* 2019 Mar;234(3):2143-2151. doi: 10.1002/jcp.27155. Epub 2018 Aug 26. PMID: 30146782; PMCID: PMC7166610.
3. Satija N, Lal SK. The molecular biology of SARS coronavirus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr;1102(1):26-38. doi: 10.1196/annals.1408.002. PMID: 17470909; PMCID: PMC7168024.
4. Hui DSC, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Dec;33(4):869-889. doi: 10.1016/j.idc.2019.07.001. PMID: 31668196; PMCID: PMC7127569
5. Van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 Sep;30(5):760-73. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00032.x. PMID: 16911043; PMCID: PMC7109777.
6. Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 2020 Jul;131(1):93-96. doi: 10.1213/ANE.0000000000004845. PMID: 32243297; PMCID: PMC7173023.
7. Popis struktury koronaviru. In: *thepharmaletter* [online], [cit. 2020-12-07]. Dostupné z <https://www.thepharmaletter.com/article/harbour-biomed-joins-forces-with-mount-sinai-on-cancer-and-covid-19-research>.
8. Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 41, 1141–1149 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
9. Schéma vstupu koronaviru do hostitelské buňky. In: *Onlinelibrary.wiley.com* [online], [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25766>.
10. World Health Organization [online], Coronavirus disease (COVID-19), 12.10.2020 [cit. 9.3.2021]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>.

11. Mathur G, Mathur S. Antibody Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 Jun 8;154(1):1-3. doi: 10.1093/ajcp/aqaa082. PMID: 32412044; PMCID: PMC7239247.
12. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Jiang D, Zhou P, Cheng L, Li Y, Ma X, Jin T. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jul;17(7):773-775. doi: 10.1038/s41423-020-0474-z. Epub 2020 May 28. PMID: 32467617; PMCID: PMC7331804.
13. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, Sun R, Wang Y, Hu B, Chen W, Zhang Y, Wang J, Huang B, Lin Y, Yang J, Cai W, Wang X, Cheng J, Chen Z, Sun K, Pan W, Zhan Z, Chen L, Ye F. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020 Sep;92(9):1518-1524. doi: 10.1002/jmv.25727. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32104917; PMCID: PMC7228300.
14. Hodnocení Rapid testu. In: Test na koronavirus [online], [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <https://www.testcoronavirus.cz/>.
15. Beavis KG, Matushek SM, Abeleda APF, Bethel C, Hunt C, Gillen S, Moran A, Tesic V. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104468. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104468. Epub 2020 May 23. PMID: 32485620; PMCID: PMC7255182.
16. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)*. 2020 May 19;10(5):319. doi: 10.3390/diagnostics10050319. PMID: 32438677; PMCID: PMC7278002.
17. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, Cray C. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 Aug 5;154(3):293-304. doi: 10.1093/ajcp/aqaa112. PMID: 32583852; PMCID: PMC7337672.
18. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, Horiuchi M, Kato K, Imoto Y, Iwata M, Mimura S, Ito T, Tamura K, Kato Y. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test, In: *Journal of Clinical Microbiology* [online], [cit. 2021-07-11]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01438-20>
19. Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Koga M, Akasaka O, Nakachi I, Koh H, Maeda K, Adachi E, Saito M, Nagai H, Ikeuchi K, Ogura T, Baba R, Fujita K, Fukui T, Ito F, Hattori SI, Yamamoto K, Nakamoto T, Furusawa Y, Yasuhara A, Ujie M, Yamada S, Ito M, Mitsuya H,

- Omagari N, Yotsuyanagi H, Iwatsuki-Horimoto K, Imai M, Kawaoka Y. Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19. *Viruses*. 2020 Dec 10;12(12):1420. doi: 10.3390/v12121420. PMID: 33322035; PMCID: PMC7764512.
20. Agulló V, Fernández-González M, Ortiz de la Tabla V, Gonzalo-Jiménez N, García JA, Masiá M, Gutiérrez F. Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study. *J Infect*. 2020 Dec 9:S0163-4453(20)30768-4. doi: 10.1016/j.jinf.2020.12.007. Epub ahead of print. PMID: 33309541; PMCID: PMC7725051.
21. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel)*. 2020 Jul 22;9(8):182. doi: 10.3390/biology9080182. PMID: 32707972; PMCID: PMC7464797.
22. Vizuální detekce pozitivního a negativního vzorku pomocí metody LAMP, In: *Plos One* [online], [cit. 2021-03-15]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052486.g001>.
23. Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. *N Engl J Med*. 2020 May 28;382(22):e76. doi: 10.1056/NEJMc2010260. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32302471.
24. Staněk, Libor. Testování viru SARS-CoV-2 v synlab czech s. r.o. SYNLABIANER, odborný magazín pro lékaře [online], 28.7.2020, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://synlabianer.cz/clanek/testovani-viru-sars-cov-2-v-synlab-czech-s-r-o/>.
25. Schéma správného odběru z nosohltanu. In: *NEWS* [online], [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.abc.net.au/news/2021-02-03/queensland-coronavirus-covid-19-ellume-test-kit-brisbane/13115452>.
26. Chomczynski, P., Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1, 581–585 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
27. Vomelová I, Vanícková Z, Sedo A. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(6):243-51. PMID: 20163774.

28. Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques*. 2007 Apr;42(4):467-70, 472. doi: 10.2144/000112401. PMID: 17489233; PMCID: PMC4721573
29. Shi R, Lewis RS, Panthee DR. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLoS One*. 2018 Dec 7;13(12):e0203011. doi: 10.1371/journal.pone.0203011. PMID: 30532193; PMCID: PMC6286138.
30. Janochová Jana, Izolace DNA: Výtěžnost a kvalita [online], Brno 2009, [cit. 2021-03-24], Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D, dostupné z: [https://is.muni.cz/th/vxxdp/IZOLACE\\_DNA\\_-\\_VYTEZNOST\\_A\\_KVALITA.pdf](https://is.muni.cz/th/vxxdp/IZOLACE_DNA_-_VYTEZNOST_A_KVALITA.pdf)
31. Schéma izolace nukleových kyselin pomocí spin kolonek, In: ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o. [online], [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-viral-dna-rna-isolation-kit.html>.
32. Vlachová Jana, Separace a purifikace nukleových kyselin s využitím magnetických mikročástic [online], Brno 2012, [cit. 2021-06-20], Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, doc. RNDr. Alena Španová, CSc. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=49911](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=49911)
33. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005 Jun;34(3):597-601. doi: 10.1677/jme.1.01755. PMID: 15956331.
34. Top-Bio [online], Taq DNA polymeráza, [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/dna-polymerazy-a-pufry-13.html?taq-dna-polymeraza>
35. Schéma reverzní transkripce, In: The Centre for Evidence-Based Medicine [online], [cit. 2021-07-11]. Dostupné z: <https://www.cebm.net/covid-19/coronaviruses-a-general-introduction/>
36. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. *Natl Med J India*. 1992 May-Jun;5(3):115-9. PMID: 1304285
37. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.

38. Papoušek Ivo, Schéma PCR, Molekulární biologie v hygieně potravin [online], přednáška 2018/19, [cit. 2021-03-28], dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/MBHP\\_2019\\_04.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/MBHP_2019_04.pdf)
39. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992 Apr;10(4):413-7. doi: 10.1038/nbt0492-413. PMID: 1368485.
40. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug;29(1):23-39. doi: 10.1677/jme.0.0290023. PMID: 12200227.
41. Nováčková Hana, Zavedení metody kvantifikace degradované DNA pomocí fluorescenčních PCR barviv [online], Brno 2015 [cit. 2021-03-30], Diplomová práce, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta. Mgr. Kateřina Boberová, Ph.D. dostupné z: [https://is.muni.cz/th/c8vpk/DP\\_Novackova\\_IS.pdf](https://is.muni.cz/th/c8vpk/DP_Novackova_IS.pdf)
42. Hunt Margaret, Real time PCR, In: University of South Carolina School of Medicine. Microbiology and Immunology [online], [cit. 2021-03-30], dostupné z: <https://www.microbiologybook.org/pcr/realtime-home.htm>.
43. Zlatko N. Kalvatchev, Iliya D. Tsekov, Svetoslav N. Slavov, Pavel I. Draganov, Effective Light-Up-on-Extension Real-Time PCR Primer Systems for Rapid Detection of Human Viruses, *Laboratory Medicine*, Volume 41, Issue 3, March 2010, Pages 150–155, <https://doi.org/10.1309/LMLY7BG3D1OJNKHO>.
44. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2017;1546:125-133. doi: 10.1007/978-1-4939-6730-8\_8. PMID: 27896761.
45. Rice G., Polymerase Chain Reaction: (PCR), In: Montana State University [online], [cit. 2021-04-02], dostupné z: [https://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/genomics/pcr.html](https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html).
46. Beránek, Martin. Molekulární genetika pro bioanalytiku. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.
47. BIOpedia, Kvantitativna PCR (real-time PCR) [online], [cit. 2021-04-03], dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/kvantitativna-pcr-real-time-pcr>.
48. Amplifikační křivka qPCR. In: BioSite [online], [cit. 2021-07-12], dostupné z: <https://www.nordicbiosite.com/blog/the-lowdown-on-real-time-pcr-part-1-2>

49. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020 Jun 9;323(22):2249-2251. doi: 10.1001/jama.2020.8259. PMID: 32374370
50. DIANA, Britská varianta COVID-19 se rychle šíří i přes současná opatření. Nejspíš již dominuje v celé ČR [online], 19. února 2021 Praha, [cit. 2021-04-08], dostupné z: [https://www.dianabiotech.com/for-media/britska\\_varianta\\_dominuje/](https://www.dianabiotech.com/for-media/britska_varianta_dominuje/)
51. Generibiotech, IVD [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/kategorie/ivd/>.
52. BIOGEN, Polymerázová řetězová reakce [online], [cit. 2021-06-23], dostupné z: <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>
53. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. ACS Nano. 2020 Apr 28;14(4):3822-3835. doi: 10.1021/acsnano.0c02624. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32223179; PMCID: PMC7144809.
54. *Elisabeth Pharmacon*, EliGene® COVID19 BASIC A RT [online], [cit. 2021-04-01], dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-covid19-basic-a-rt-cz.html>.
55. *Generibiotech*, Duplexní kity pro SARS-CoV-2 [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/kity-pro-detekci-sars-cov-2/>
56. *Generibiotech*, gb SARS-CoV-2 Combi EndoC [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/gb-sars-cov-2-combi-endoc/>.
57. Přehled testů k diagnostice onemocnění COVID-19, In: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online], [cit. 2021-11-07]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/prehled-testu-k-diagnostice-onemocneni-covid-19>
58. *Elisabeth Pharmacon*, DNA DIAGNOSTIKA ELIGENE [online], [cit. 2021-06-28], dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/nabidka-eligene-respiracni-infekce.html>
59. *GeneProof a.s.*, Respiratory Infections [online], [cit. 2021-06-28], dostupné z: <https://www.geneproof.com/cs-cs/respiratory-infections/c1018>
60. *DIANA Biotechnologies s.r.o.*, DIANA COVID-19 diagnostic products [online], [cit. 2021-06-28], dostupné z: <https://www.dianabiotech.com/>
61. Garg A, Ghoshal U, Patel SS, Singh DV, Arya AK, Vasanth S, Pandey A, Srivastava N. Evaluation of seven commercial RT-PCR kits for COVID-19 testing in pooled clinical

- specimens. *J Med Virol.* 2021 Apr;93(4):2281-2286. doi: 10.1002/jmv.26691. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33230819; PMCID: PMC7753435.
62. Visseaux B, Collin G, Houhou-Fidouh N, Le Hingrat Q, Ferré VM, Damond F, Ichou H, Descamps D, Charpentier C. Evaluation of three extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR assays: A feasible alternative approach with low technical requirements. *J Virol Methods.* 2021 May;291:114086. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114086. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33577957; PMCID: PMC7871772.
63. Lübke N, Senff T, Scherger S, Hauka S, Andrée M, Adams O, Timm J, Walker A. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. *J Clin Virol.* 2020 Sep;130:104579. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104579. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32795959; PMCID: PMC7405857.
64. STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, Chřipka versus koronavirus [online], 18.3.2020, [cit. 2021-06-27], dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/chripka-versus-koronavirus-podobnosti-a-zasadni-rozdily-k-18>
65. Generibiotech, gb SARS-CoV-2 Influenza A/B [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/gb-sars-cov-2-influenza-a-b/>.
66. Schéma přípravy analýzy kitu Influenza A/B, In: generibiotech [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/wp-content/uploads/2020/09/scheme-influenza.png>.
67. AusDiagnostic, Respiratory Pathogens [online], [cit. 2021-06-28], dostupné z: <https://www.ausdiagnostics.com/respiratory-pathogens>
68. Socher E, Conrad M, Heger L, Paulsen F, Sticht H, Zunke F, Arnold P. Mutations in the B.1.1.7 SARS-CoV-2 Spike Protein Reduce Receptor-Binding Affinity and Induce a Flexible Link to the Fusion Peptide. *Biomedicines.* 2021 May 8;9(5):525. doi: 10.3390/biomedicines9050525. PMID: 34066729; PMCID: PMC8151884.
69. COVARIANTS, Sdílené mutace [online], 23.6.2021, [cit. 2021-06-27], dostupné z: <https://covariants.org/shared-mutations>
70. Generibiotech, gb SARS-CoV-2 Variant SA/BR, UK [online], [cit. 2021-04-21], dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/gb-sars-cov-2-variant-sa-br-uk/>.