

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Testování infekce virem SARS-CoV-2 v populaci a správná interpretace
výsledků v kontextu protivirové imunity
Bakalářská práce

2022

Aleš Syrový

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Testing for SAR-CoV-2 virus infection in the population and correct
interpretation of results in the context of antiviral immunity
Bachelor Thesis

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Aleš Syrový
Osobní číslo:	C18284
Studijní program:	B3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Téma práce:	Testování infekce virem SARS-Cov 2 v populaci a správná interpretace výsledků v kontextu protivirové imunity
Téma práce anglicky:	Testing for SARS-Cov 2 Virus Infection in the Population and Proper Interpretation of Results in the Context of Antiviral Immunity
Zadávací katedra:	Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování

- 1) Nastudujte pomocí odborné literatury problematiku týkající se onemocnění COVID-19, etiopatogeneze onemocnění, klinické příznaky, metody diagnostiky (laboratorní metody, zobrazovací techniky, atd.), možnosti terapie – aktuální stav. Tyto informace stručně shrňte v úvodní kapitole teoretické části.
- 2) Další část věnujte popisu viru SARS-CoV2, jak do organismu vstupuje, jak se množí a způsoby přenosu infekce v rámci populace.
- 3) Detailněji popište, jak imunitní systém proti původci onemocnění COVID-19 bojuje, jaké složky imunitního systému se do boje proti tomuto viru zapojují a jak tento virus ovlivňuje imunitní systém (cytokinová bouře, autoimunitní reakce vůči vlastním tkáním). Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 10 – 15 letech.
- 4) Vypracujte literární rešerši o diagnostických metodách v současné době používaných v praxi, popište, na jakém principu jsou tyto metody založeny, jaký biologický materiál se testuje, jak se interpretují výsledky a to i v kontextu fáze onemocnění. Popište, jaké testy jsou vhodné pro průkaz infekce a jaké pro monitorování průběhu onemocnění, sledování účinnosti terapie nebo vakcinace.
- 5) Jako zdroje informací používejte odborné články z hodnotných odborných časopisů českých i zahraničních (anglický jazyk). Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy.

Interpretace výsledků testů v kontextu průběhu virové infekce a aktivity imunitního systému.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

Prohlašuji:

Práci s názvem Testování infekce virem SARS-CoV-2 v populaci a správná interpretace výsledků v kontextu protivirové imunity jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 o 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

Aleš Srový

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych moc rád poděkoval prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, vedoucí mé práce, za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost a ochotu při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat celé mé rodině, kamarádům a kompletně všem, kteří mě podporovali během mého studia na univerzitě.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá rutinními metodami na detekci viru SARS-CoV-2, který způsobuje pandemii onemocnění COVID-19 projevující se těžkým respiračním syndromem, prováděné nejen v laboratořích. Práce popisuje rozdělení a princip diagnostických testů se zaměřením především na správnou interpretaci jejich výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

SARS-CoV-2, covid-19, PCR, antigen, protilátky

TITLE

Testing for SAR-CoV-2 virus infection in the population and correct interpretation of results in the context of antiviral immunity

ANNOTATION

This Bachelor thesis deals with routine methods for detection SARS-CoV-2 virus, which causes a pandemic of COVID-19 disease manifesting itself as a severe respiratory syndrome, carried out not only in laboratories. The thesis describes the distribution and principle of diagnostic tests, focusing primarily on correct interpretation of their results.

KEYWORDS

SARS-CoV-2, covid-19, PCR, antigen, antibodies

OBSAH

1. SARS-CoV-2	14
1.1. Původ a taxonomie SARS-CoV-2	14
1.2. Klinické příznaky	15
1.2.1. Postcovidový syndrom.....	16
1.3. Diagnostika.....	18
2. ŽIVOTNÍ CYKLUS SARS-CoV-2.....	19
2.1. Struktura viru.....	19
2.2. Mechanismus vstupu viru do buňky.....	20
2.3. Replikace virové RNA	21
3. Diagnostické metody pro detekci SARS-CoV-2	23
3.1. Screeningové testy	23
3.1.1. Imunochromatografické testy	23
3.2. Preanalytická fáze.....	24
3.2.1. Odběr vzorku z nosohltanu	24
3.2.2. Odběr vzorku krve na průkaz protilátek	25
3.2.3. Fekální vzorek.....	25
3.2.4. Manipulace se vzorkem, jeho správné uskladnění a transport.....	25
3.3. Stripovací testy	26
3.3.1. Testy na průkaz specifických protilátek (nepřímý test).....	26
3.3.2. Testy na průkaz antigenu (přímý test)	28
4. Průkaz specifických RNA.....	31
4.1. Detekce nukleových kyselin.....	31
4.1.1. Odběr vzorku	31
4.1.2. Izolace virové RNA ze vzorku.....	32
4.1.2.1. Organická extrakce pomocí fenol-chloroformu	32
4.1.2.2. Izolace pomocí rotačních sloupců.....	33
4.1.2.3. Magnetické částice	33
4.1.2.4. Chelex	33
4.2. Princip PCR metody	33
4.2.1. Reverzní transkripce	34
4.2.2. Denaturace molekuly DNA	34
4.2.3. Hybridizace	34
4.2.4. Elongace.....	35
4.2.5. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase	36

5. Zhodnocení testů v klinickém kontextu.....	38
5.1.1. CT vyšetření v diagnostice COVID-19	41
5.1.2. Výběr typ vzorku a odběr	41
5.1.3. Testy na protilátky COVID-19	41
ZÁVĚR	43
POUŽITÁ LITERATURA	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Popis struktury SARS-CoV-2 [15].....	19
Obrázek 2: Popis mechanismu vstupu viru do buňky [18].....	21
Obrázek 3: Popis testovací destičky a schéma LFIA k vyšetření protilátek [31].....	28
Obrázek 4: Popis testovací destičky pro detekci virového antigenu [37].....	29
Obrázek 5: Schéma průběhu RT-PCR [58]	37
Obrázek 6: Vzorec výpočtu senzitivity [63]	39
Obrázek 7: Vzorec pro výpočet specifity [63].....	39
Obrázek 8: Vzorec pro výpočet PPV [63]	40
Obrázek 9: Vzorec pro výpočet NPV [63].....	40
Tabulka 1 Průběh infekce SARS-CoV-2 [7] (převzato a upraveno)	16
Tabulka 2: Příznaky post-covidového syndromu a klasifikace podle systémů [10].....	17

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE2	Angiotenzin-konvertující enzym 2
AlphaCoV	Alfa koronavirus
BetaCoV	Beta koronavirus
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza (z angl. Chemiluminescence immunoassay)
Cov	Koronavirus
Covid-19	Koronavirové onemocnění 2019 (z angl. Coronavirus disease 2019)
CT	Výpočetní tomografie (z angl. Computed Tomography)
DeltaCov	Delta koronavirus
DNA	Deoxyribonukleonová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic acid)
DNázy	Deoxyribonukleázy
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
DPP4	Dipeptidylpeptidáza 4
ECL	Elektrochemiluminiscence
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzymová imunisorbentní analýza (z angl. Enzyme-Linked In Sorbent Assay)
ERGIC	Endoplazmatické retikulum Golgiho interního kompartmentu
FAM	Karboxyfluorescein
TAMRA	Tetra-metylkarboxyrhodamin (zhášecí barvivo)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)
FIA	Fluorescenční imunotest (z angl. Fluorescent Immunoassay)
GammaCoV	Gamma koronavirus
HCoV	Lidský koronavirus (z angl. Human Coronavirus)
IFA	Imunofluorescenční test
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M

ICTV	Mezinárodní výbor pro taxonomii (z angl. International Committee on Taxonomy of Viruses)
JIP	Jednotka intenzivní péče
LFIA	Laterální průtoková imunoanalýza (z angl. Lateral-Low Immunoassay)
MEM	Minimální esenciální médium
MERS-CoV	Blízkovýchodní respirační syndrom (z angl. Middle East Respiratory Syndrom)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
nAChR	Nikotinový acetylcholinový receptor
NPV	Negativní prediktivní hodnoty
PBS	Fosfát pufovaný fyziologickým roztokem
pH	Vodíkový exponent (z lat. Pondus hydrogenii)
POC	„Point of care“
PPV	Pozitivní prediktivní hodnoty
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic Acid)
RNázy	Ribonukleázy
RT-PCR	Reverzní transkriptáza polymerázové řetězové reakce (z angl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)
RTC	Replikačně-transkripční komplex
SARS-CoV-2	Těžký akutní respirační syndrom koronavirus 2(z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome-Related)
SARS-CoV	Těžký akutní respirační syndrom (z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome)
ssRNA	Jednovláknová ribonukleová kyselina
SDS	Typ slabého neiontového detergentu (Safety Data
Taq	Bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
VTM	Virové transportní médium
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

ÚVOD

Původcem pandemie onemocnění COVID-19 je nový lidský koronavirus (SARS-CoV-2) projevující se těžkým akutním respiračním syndromem. Poprvé byl objeven ke konci roku 2019 v Číně ve Wu-chanu a následně byl rychle rozšířen po celém světě, kdy 11. března 2020 byla Světovou zdravotnickou organizací (WHO) vyhlášena celosvětová pandemie tohoto viru. Lidské koronaviry (HCoV) byly poprvé identifikovány v roce 1962 s příčinou akutní infekce horních cest dýchacích. Během let byly identifikovány dva vysoce patogenní lidské koronaviry, těžký akutní respirační syndrom koronavirus (SARS-CoV) a respirační syndrom na Středním východě (MERS-CoV). SARS-CoV-2 je výsledkem mezidruhového přenosu ze zvířete na člověka a dalšího jeho šíření z člověka na člověka. Přenáší se především respiračními kapénkami a aerosoly, nebo přímým či dokonce nepřímým kontaktem, například dotykem na povrch předmětu, na kterém ulpěl virus, s následným dotykem úst, nosu nebo očí. Pandemie COVID-19 po celém světě ovlivnila životy miliardy lidí a velice oslabil globální ekonomiku v důsledku vyhlášených protipandemických opatření, jako omezený pohyb nebo karantény. COVID-19 vykazuje řadu klinických příznaků od lehčích až po smrt ohrožující stavy. V počáteční fázi onemocnění se vyskytuje nevolnost, kašel a horečka. Mezi další, menší příznaky patří bolest hlavy, bolest v krku, zimnice, průjem. Do těžkých a až život ohrožujících klinických příznaků patří dušnost, respirační selhání, septický šok a multiorgánová dysfunkce.

Důležitým krokem pro vyhodnocení stavu pandemie a jejího zvládnutí je zjištění počtu infikovaných lidí v regionu. Nástrojem pro tento úkol jsou diagnostické testy schválené Světovou zdravotnickou organizací, které se využívají přímo či nepřímo k detekci viru SARS-CoV-2. K přímému průkazu viru lze využít jeho povrchových antigenů nebo RNA molekuly, ze které se vir skládá.

Nejcitlivější a nejefektivnější metodou je polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí (RT-PCR), která detekuje virové RNA. Diagnostický rychlý antigenní test využívá k průkazu viru jeho povrchových proteinů (antigenů) pomocí metod LFIA, CIA, FIA.

Každý nově vyvinutý a zavedený diagnostický test musí být validován a porovnán s jiným diagnostickým testem, a to konkrétněji metodou RT-PCR, která je „zlatým standardem“ průkazu nukleových kyselin.

1. SARS-CoV-2

V prosinci 2019 v asijském městě Wu-chan v Číně se objevil nový lidský koronavirus, který dostal, potom, co rozpoutal celosvětovou pandemii, název SARS-CoV 2, neboli virus covid-19. Toto pojmenování (Coronavirus Disease-2019) dostal 11. února od Světové zdravotnické organizace (WHO) a Mezinárodního výboru pro taxonomii (ICTV) SARS-CoV-2, z anglického Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (těžký akutní respirační syndrom koronavirus 2). SARS-CoV 2 je třetím zoonotickým lidským koronavirem hned po objevení SARS-CoV a MERS-CoV. Covidová pandemie si vysloužila prozatím více než 2,6 milionů obětí po celé Zemi, z toho asi 34 000 lidí z České republiky [1]. Koronaviry se vyskytují po celém světě a na různých místech vyvolávají velké smrtící epidemie, nejčastěji důsledkem vyvolání těžké pneumonie. První takovou epidemií byla epidemie v listopadu 2002 ve Foshanu v Číně způsobená koronavirem těžkého akutního syndromu (SARS-CoV), která se později rozšířila téměř po celém světě s 10 % úmrtností [2]. Další nový lidský koronavirus respiračního syndromu nazývaný MERS-CoV vyvolal epidemii na Středním východě, jehož centrum vypuknutí bylo v Jeddahhu v Saúdské Arábii v červnu 2012 s celosvětovou úmrtností 35 %. A v poslední řadě tu máme celosvětovou vážnou pandemii způsobnou novým kmenem SARS-CoV, označovaným jako SARS-CoV-2. Důvodem vzniku takovýchto globálních epidemií je přetrvávající a nepředvídatelný výskyt viru, rychlé a lehké šíření a i snadné vyvolání zdravotních potíží, což z HCoV (Human CoronaVirus) činí přetrvávající potenciální ohrožení lidí [3].

1.1. Původ a taxonomie SARS-CoV-2

Koronaviry jsou řazeny do 39 druhů, které jsou dále členěny do 27 podrodů, 5 rodů a 2 podčeledí. Tyto podčeledi patří do čeledi *Coronaviridae*, podřádu *Cornidovirineae*, řádu *Nidovirales* a říše *Riboviria*. HCoV, neboli lidské koronaviry, se dělí na alpha, beta, gama a delta CoV. Skupiny AlphaCov a BetaCoV infikují převážně savce, zatímco GammaCoV a DeltaCoV se vyskytují převážně u ptáků [4].

Lidský koronavirus byl objeven v 60. letech minulého století, přičemž obecně koronaviry jsou studovány už od 40. let 20. století. Mezi první objevené a studované HCoV zapříčínující respirační potíže patří HCoV-229E a HCoV-OC43 [5]. Po roce 2002, kdy vypukla epidemie SARS-CoV, jejímž epicentrem byl čínský Foshan v provincii Kuang-tung, vědci objevili další nové CoV jako MERS-CoV, SARS-CoV a SARS-CoV-2, o kterém jsme

poslední dva roky slyšeli nejvíce. Mezi AlphaHCoV jsou řazeny HCoV-229E a HCoV-NL63. HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV a MERS-CoV jsou klasifikovány jako BetaCoV [6]. Virus vstupuje nejčastěji do buněk dýchacího traktu a to prostřednictvím vazby na receptory enzymu konvertujícího angiotenzin 2 (ACE2). Strukturální proteiny viru slouží k následnému pučení a uvolňování nových virových částic z různých hostitelských buněk. Bohužel v současnosti nejsou žádná možná léčba mimo schválených vakcín, nově vyráběných typů vakcín, tzv. mRNA vakcín. Vakcíny ovšem vždy neochrání jedince před napadením nově zmutovaného viru, neboli nové variantě viru.

1.2. Klinické příznaky

Většina koronavirů způsobuje běžně probíhající nachlazení, v závažných případech ovšem mohou zapříčinit větší potíže, a to hlavně u imunokompromitovaných lidí. U těchto jedinců neboli jedinců se sníženou reaktivitou imunitního systému s infekcí, mohou CoV vyvolat bronchiolitidu, pneumonii nebo i smrtící zápal plic [7]. Při studování koronavirů byly také zjištěny jejich tzv. rezervoáry neboli hostitelé, přes které se mohou šířit. Právě při první detekci SARS-CoV v už zmíněném čínském Foshanu byl zjištěn zdroj virového kmene, a to u palmových cibetek a psíků mývalovitých. Později byly HCoV nalezeny hlavně u netopýrů. I přesto, že je SARS-CoV-2 fylogeneticky velmi podobný s viry netopýrů projevující se závažným akutním syndromem, není znám mechanismus druhového skoku a přenosu na člověka.

Infekce covid-19, způsobená těžkým respiračním koronavirem nazývaným SARS-CoV-2, může vyvolat několik klinických příznaků, a to od inaparentních (asymptomatických) příznaků, přes lehké, střední a závažné příznaky [8]. V kritických případech, kdy pacient musí být hospitalizován na JIP, může dojít k multiorgánové dysfunkci a následně až ke smrti pacienta. U covid-19 bylo zjištěno 5 základních klinických forem infekce (tabulka 1). Podle patogeneze lze klinické příznaky rozdělit na skupiny infekcí sliznic a infekcí vnitřních orgánů. Přičemž slizniční infekce se projevuje jako infekce dýchacích cest nebo jako gastroenteritida, infekce vnitřních orgánů jako pneumonie.

Tabulka 1 Průběh infekce SARS-CoV-2 [8] (převzato a upraveno)

Průběh	Charakteristika
Inaparentní (asymptomatický)	Bez klinických projevů nemoci
Lehký (mild)	Projevy respirační infekce, ale bez průkazu pneumonie mohou být přítomny gastrointestinální příznaky
Středně těžký (moderate)	Respirační infekce provázená pneumonií (obraz intersticiální pneumonie na rtg snímku plic)
Závažný (severe)	Intersticiální pneumonie provázená aspoň jedním tři příznaků. Dechová frekvence > 30/min; saturace krve kyslíkem < 93 %; respirační index (PaO ₂ , FiO ₂) ≤ 300 mmHg
Kritický (critical)	Nutnost hospitalizace na JIP, přítomnost aspoň jedné z následujících diagnóz: projevy ARDS s nutností umělé plicní ventilace; oběhový šok; multiorgánové selhání

U každého konkrétního jedince se tedy může koronavirus projevit jiným způsobem, na němž je závislých několik faktorů jak organismu, tak viru. Mezi takové faktory patří celková zdatnost organismu pacienta, velikost infekční dávky, aktuální stav imunitního systému a také genetická a antigenní výbava organismu.

Jak už bylo zmíněné, u zhruba 20 % nakažených lidí může infekce probíhat bez klinických příznaků, ale i přesto tito asymptomatictí nakažení můžou nákazu šířit na ostatní. Symptomatictí pacienti můžou trpět kašlem, únavou, teplotami, obtížemi s dýcháním, bolestmi v krku, bolestmi hlavy, zad, svalů nebo kloubů, průjemem, nevolností nebo zvracením. Jedním z nejčastějších a zvláštním příznakem covidu-19 je ztráta čichu a chuti, která se může dostavit i u lidí netrpících ani jedním příznakem onemocnění. Mezi závažnější příznaky patří vysoká dušnost, zmatenost, přetrvávající bolest a tlak na hrudi a vysoká teplota (nad 38 °C) [9].

1.2.1. Postcovidový syndrom

V některých případech ani po vyléčení není s příznaky z covidu-19 konec. U asi 10 % lidí, kteří protrpěli onemocnění covid-19, se vyskytly po několika měsících nové závažné potíže. Tyto postcovidové příznaky se mohou rozvinout jak u člověka, který prodělal těžkou formu infekce, tak i u jedince s mírným průběhem nemoci. Postcovidový syndrom jsou tedy nevysvětlené přetrvávající symptomy, které se vyskytnou po 12 týdnech od diagnostiky. Lékaři od počátku pandemie zaznamenali nespočet příznaků. Mezi ně nejčastěji patří vysoká únava, kdy jedinec nezvládá základní práce, dušnost i při minimálním zatížení, porucha

paměti, bolesti na hrudi, bolesti břicha a hlavy, zhoršený spánek až nespavost. Podle získaných studií a statistik tyto příznaky odezní nejméně u 90 % nakažených do 12 měsíců [10].

Tabulka 2: Příznaky post-covidového syndromu a klasifikace podle systémů [11]

1. Respirační příznaky	Kašel
	Dušnost
2. Kardiovaskulární příznaky	Bolest na hrudi
	Útlak
	Bušení srdce
3. Neurologické příznaky	Bolest hlavy
	Závratě
	Tinnitus
	Ztráta chuti nebo čichu
	Poruchy spánku
	Parestézie
	Svalové bolesti
	Kognitivní příznaky <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mozková mlha ▪ Problémy s pamětí ▪ Problémy s koncentrací
	Psychiatrické příznaky <ul style="list-style-type: none"> ▪ Úzkost ▪ Deprese
4. Gastrointestinální příznaky	Bolest břicha
	Nevolnost
	Průjem
	Anorexie
5. Systémové příznaky	Únava
	Horečka
	Bolest
	Artralgie
	Bolest ucha a krku

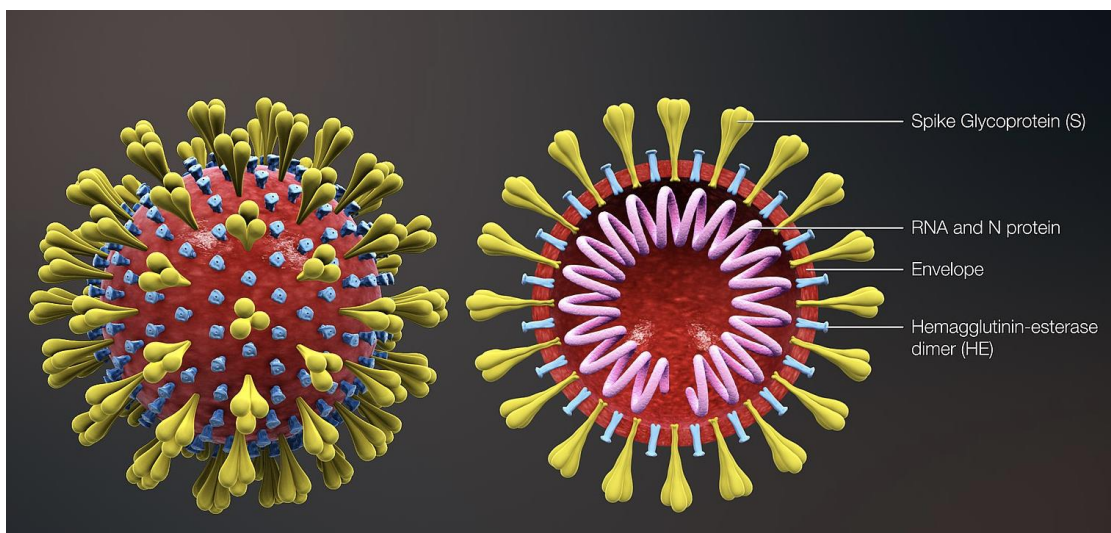
1.3. Diagnostika

V současné době se SARS-CoV-2 může prokázat třemi speciálními testy využívanými buď v laboratořích prováděných odborným personálem za přísných podmínek, nebo v domácnostech pro rychlou diagnostiku. Mezi tyto testy se řadí identifikace nukleových kyselin, v případě viru SARS-CoV-2 se jedná o ribonukleovou kyselinu (RNA), identifikace pomocí techniky amplifikace nukleových kyselin (RT-PCR), dále testování antigenu za pomoci laterální průtokové imunoanalýzy a poslední test využívaný na průkaz viru je vyšetření protilátek produkovaných imunitním systémem jako reakce na virovou infekci. Tyto diagnostické testy se dělí na přímou detekci viru a na nepřímou detekci viru [12]. Průkaz nukleových kyselin prostřednictvím RT-PCR se provádí pro přímý průkaz viru v organismu při okamžitém stavu pacienta během odběru vzorku. Rychlý antigenní test k průkazu antigenu viru je druhým přímým testem. Využívá se především pro opakované testování populace a prokázání infekce u bezpříznakových jedinců. Mezi nepřímé testy se řadí vyšetření protilátek po dvou až třech týdnech od prvních příznaků infekce. Vyšetřují se protilátky typu IgG a IgM ve vzorku krve.

2. ŽIVOTNÍ CYKLUS SARS-CoV-2

2.1. Struktura viru

Koronaviry jsou obalené jednovláknové RNA viry (+ssRNA) s pozitivním smyslem a s lipidovou membránou získanou z hostitelské membrány, na které jsou zabudovány jisté proteiny. Konkrétně se HCoV skládá z genomové RNA, která chrání fosforylovaný nukleokapsidový (N) protein. Toto jádro je kromě toho ještě obalené fosfolipidovou dvojvrstvou, na které jsou zasazeny proteiny spike (S), membránové (M) a obalové (E) proteiny [13]. Každý protein má určitou a důležitou roli v šíření, pronikání do hostitelských buněk a množení v hostitelských buňkách. Sekreci nových zralých virionů ven z hostitelské buňky zajišťuje protein E. Nejdůležitější povrchový protein a hlavní faktor virulence je spike (S) glykoprotein, který se pomocí svých dvou podjednotek (S1 a S2), ze kterých je složen, podílí na vstupu viru do hostitelské buňky. Podjednotka S1 zprostředkovává vazbu mezi virionem a buněčným receptorem ACE2 a podjednotka S2 je zodpovědná za fúzi viru s buněčnou membránou [14]. A právě tímto povrchovým hrotovým proteinem dodává viru svou specifickou charakteristiku tzv. korunky, kdy je virus v elektronovém mikroskopu zjeven jako korunka, odtud také nese název koronavirus.

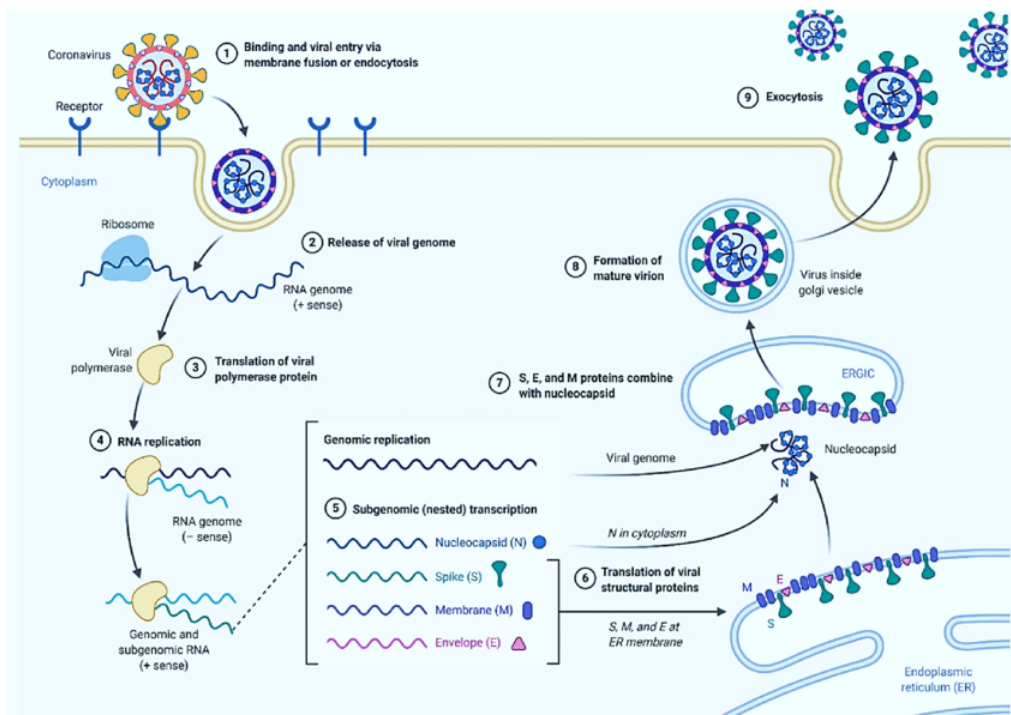


Obrázek 1: Popis struktury SARS-CoV-2 [15]

2.2. Mechanismus vstupu viru do buňky

Virus SARS-CoV-2 se do plic dostává přes sliznici nosu, hrtan a dýchací cesty, kde může zapříčinit akutní dýchací potíže. Z plic se dále může dostat do periferní krve a tím se rozšířit po celém těle do buněk tkání exprimujících angiotensin-konvertující enzym (ACE2) jako jsou plíce, srdce, ledviny a gastrointestinální trakt. Jak už zaznělo, koronavirus je obalená jednovláknová RNA, jinými slovy se jedná o tzv. RNA viry s pozitivním smyslem replikující se v cytoplazmě. Aby se mohl množit (replikovat) a dále šířit, potřebuje k tomu zdravou hostitelskou buňku, kterou napadne a ve které se bude dělit. K tomu, aby se do této cizí buňky vůbec dostal, potřebuje speciální náčiní. Takové náčiní jako jeho povrchové strukturální proteiny. Proteiny Spike (S), Membrane (M), Envelope (E) a Nukleokapsid (N), které tvoří povrch koronavirového virionu, přičemž hlavní protein zprostředkovávající vnik viru do buňky je Spike (S) protein.

Systém spike proteinu se skládá ze tří monomerních polypeptidů S a každý onen polypeptid se dělí na podjednotky S1 a S2, přičemž doména S1 zprostředkovává vazbu na receptor buňky a S2 doména je zodpovědná za fúzi do hostitelské buňky. Doména S1 se tedy naváže na receptor hostitelské buňky nacházející se na povrchu této buňky. Jako receptory pro betakoronaviry se uplatňují ACE2 pro SARS-CoV a například dipeptidylpeptidáza-4 (DPP4) pro MERS-CoV. Bylo také zjištěno, že se spike protein SARS-CoV-2 neváže jenom na ACE2 receptor, ale dále i na nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR), což ukazuje na receptor vazebného potenciálu koronavirového viru a to může vyústit až k mnohočetné patogenezi orgánů [16]. Po navázání povrchového proteinu viru na receptor hostitelské buňky je působením proximální hostitelské proteázy štěpen spike protein, z něhož se uvolní spike fúzní peptid, který se uvolňuje dovnitř buňky. Aktivace receptoru vyvolá konformační změny v subjednotkách spojující jak virovou, tak buněčnou membránu dohromady. To má za následek vytvoření fúzního póru, přes nějž se virový nukleokapsid dostane do buněčné cytoplazmy (cytosolu). Mechanismus vstupu viru do buňky je tedy víceřadový proces počínající přichycením na buněčný povrch, následovaný zapojením receptoru, proteolytickým štěpením a končící membránovou fúzí. [17]



Obrázek 2: Popis mechanismu vstupu viru do buňky [18]

2.3. Replikace virové RNA

Replikace je složitý biologický proces vytváření nové, ale stejné molekuly DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Tím se přenáší dál genetická informace zapsaná v této molekule. Molekula DNA vstupující jako výchozí molekula do procesu replikace se nazývá templát nebo matrice a molekula (vždy dvě molekuly) z procesu vycházející nese název replika. Tato replika se skládá vždy ze dvou vláken, jednou z původní molekuly DNA a jednou syntetizovanou, a proto je tento proces replikace tzv. semikonzervativní proces.

Pro virus je replikace v jeho životním cyklu velmi důležitá, neboť se jedná o jeho množení. Produkce mnoha kopií jeho genomu a následné balení do virionů umožňuje viru množit se, šířit se a dále infikovat nové buňky a tím umožnit přežití svého druhu. Proto musí virus po vstupu do cytoplasmy hostitelské buňky exprimovat své buňky jako funkční mRNA, aby mohlo dojít k syntéze virových proteinů. U některých RNA virů a převážně u DNA virů musí být syntetizována virová mRNA hned po vstupu do hostitelské buňky. Ovšem u RNA virů s jednovláknovou RNA s tzv. pozitivním smyslem tato syntéza není potřeba, protože jejich infekční genom ssRNA(+) působí jako mRNA [19] a je tedy buňkou rozpoznán a dále prezentován ribozomům k translaci a překlada do proteinů spolu s enzymy pro reprodukci viru. Touto výhodou právě vyniká virus SARS-CoV-2.

Pro správný průběh transkripce je důležitý replikačně-transkripční komplex (RTC), který vznikne ze dvou proteinů, které jsou kódovány oběma částmi virového genu ORF 1a a ORF 1b [20].

Zatímco povrchové strukturní proteiny viru (S, M a E) vznikají v ribozomech vázanými na endoplazmatickém retikulu, N protein je syntetizován volnými cytosolickými ribozomy hostitelské buňky. Replikovaný RNA genom je obalen tímto nasyntetizovaným N proteinem za vzniku šroubovitého nukleokapsidu. Následně tato virová částice putuje do endoplazmatického retikula – Golgiho intermediárního kompartmentu (ERGIC) [19], kde se uvolní jako sekreční váček a fúzí s plazmatickou membránou je z hostitelské buňky vyloučen exocytózou.

Hlavní příčinou šíření infekce v infikovaných jedincích je virová odolnost vůči vrozené a adaptivní imunitní reakci hostitele, a proto se může dále šířit z buňky na buňku přes různé tkáně a orgány. [13]

3. Diagnostické metody pro detekci SARS-CoV-2

Pro včasnou diagnostiku onemocnění covidu-19 jsou nejvhodnějšími klinickými metodami dva typy testů. Mezi první typy testů patří metody prováděné v laboratořích, do nichž se řadí molekulární testy jako nejvhodnější a nej přesnější metody detekující právě přítomnost virové RNA ve vzorku odebraného z nosohltanu daného pacienta. Nejznámější takovou metodou je reverzní transkriptáza polymerázové řetězové reakce v reálném čase [21]. Vzhledem k probíhající pandemii, a tím vysoce rostoucím počtům nakažených pacientů covidem-19, se muselo přiklonit k rychlejší a méně nákladné alternativní detekci tohoto viru v populaci. V nemocnicích, laboratořích, testovacích centrech a domácnostech se začaly používat tzv. stripovací testy, hlavně jako screening nebo také jako diagnostické testy na detekci SARS-CoV-2 pro širší společnost. [22] Tento, jiným odbornějším názvem, laterální průtokový imunoassay test (LFIA, Lateral Flow ImmunoAssay) pracuje na principu schopnosti zachycení přítomného specifického virového antigenu, např. Spike (S) proteinu, ale i nukleokapsidového (N) proteinu.

3.1. Screeningové testy

Screeningové testy mají velký význam v prevenci onemocnění. Jsou to rutinní testy prováděné převážně v době před propuknutím dané nemoci. Umožňují včasné zachycení problému, což zajišťuje odhalení dané nemoci ještě před jejím propuknutím, a tím možné nastavení snadnější a účinnější léčby [23]. Nejčastěji se screeningové testy používají k detekci zhoubného nádoru nebo jeho prekurzorových lézí v časném stádiu rakoviny, kdy je její léčba nejefektivnější. Výhoda těchto testů je buď prevalence onemocněním, nebo včasné podchycení choroby [16].

3.1.1. Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy, které byly vynalezeny ve dvacátých letech minulého století, jsou metody využívající se v současnosti především k detekci mnoha různorodých látek od nízkomolekulárních částic až po vysokomolekulární částic (bakterie, viry apod.). I přesto, jako každá metoda, má své nevýhody – např. nutnost kapalného vzorku, semikvantitativní vyhodnocení a v určitých případech je potřeba i úprava vzorku [24]. Nicméně jsou imunochromatografické metody velmi oblíbené a využívány v mnoha oborech a laboratořích

kvůli jednoduchosti, rychlosti a nízké ceně testu. Jejich princip je založen na nekovalentních interakcích protilátek se stanovovaným vzorkem (analytu, antigenu).

Imunochromatografické metody můžeme rozdělit do tří skupin. Tou první skupinou, využívanou převážně v laboratořích, jsou testy tzv. „stripovací“, kdy se jedná pouze o samostatný proužek, na který se na určitý bod nanese kapátkem upravený kapalný vzorek. Do druhé skupiny patří „kasetové“ testy, které jsou upraveny pro použití mimo laboratoř. Proužek je vložen nejčastěji do plastové obalu (výztuže), na kterém je uděláno okénko určené pro nanesení určitého množství vzorku (analytu). „Midstream“ testy patří do poslední skupiny imunochromatografických metod [25], kdy je test upraven tak, aby proužek částečně vyčníval z plastové výztuže pro dobrý kontakt s proudem moči.

3.2. Preanalytická fáze

V preanalytické fázi se připravuje pacient k odběru vzorku, odebírá vzorek a transportuje ho do laboratoře, kde už začíná analytická fáze, kde jde hlavně o analýzu vzorku a správnou interpretaci výsledku. Pro správnou laboratorní diagnostiku COVID-19 je důležitý výběr místa, odkud bude vzorek odebrán. To záleží na stádiu onemocnění. Pro standardní virovou detekci je vzorek nejčastěji odebírán z horních a dolních cest dýchacích [26].

3.2.1. Odběr vzorku z nosohltanu

Aby byl nasofaryngeální výtěr správně proveden, musí ho provést zdravotní sestry nebo proškolený personál. Postup odběru není nijak složitý, avšak zdravotní sestra (či vyškolený personál) musí dávat pozor, aby správně a s jistotou odebrala potřebný vzorek a aby neublížila pacientovi. K odběru vzorku z nosohltanu se používá plastová tyčinka dlouhá asi 20 cm, na jejímž konci je zakotven kousek vatičky, na kterou se bude vzorek sbírat. Tato tyčinka s vatičkou by měla být před použitím sterilní a zabalená ve sterilním obalu. Tyčinka s vatičkou po vyjmutí ze sterilního obalu je opatrně a vatičkou předem zavedena do nosu pacienta, který má hlavu nakloněnou zhruba o 70 stupňů [27]. Tyčinka s vatičkou se musí po naražení na stěnu nosohltanu třikrát či pětkrát otočit ve směru a poté protisměru hodinových ručiček, aby se docílilo správného a dostatečného odebrání vzorku. Aby byla vatička dostatečně nasycena vzorkem, musí být vytažena krouživými pohyby. Takto provedený nasofaryngeální výtěr by měl být proveden z obou nosních dírek pacienta. Tyčinka

s odebraným vzorkem je pak opatrně vložena do sterilní zkumavky, ve které je připravené virové transportní médium.

3.2.2. Odběr vzorku krve na průkaz protilátek

Virus SARS-CoV-2 lze detekovat v také v plazmě jako marker těžkého nebo až kritického onemocnění. Neprokazuje se samotný virus, nýbrž produkty reakce imunitního systému na něj. Těmito produkty jsou myšleny protilátky, které se tvoří po 2–4 týdnech po vstupu viru do organismu. Nicméně vyšetření protilátek nenapomáhá klinické diagnóze COVID-19 [27]. Vzorek krve pro průkaz protilátek se získává z pichu prstu sterilní jehlou. Pár čerstvých kapek krve se hned analyzují.

3.2.3. Fekální vzorek

Bylo zjištěno, že virus SARS-CoV-2 lze detekovat z análního výtěru při vážnějších stavech onemocnění nebo od druhého týdnu infekce. Přítomnost viru ve stolici může indikovat vážný stav onemocnění. Při negativních výsledcích testů ze vzorku z horních cest dýchacích, kdy ale pacient trpí vážnými klinickými příznaky onemocnění, se pro průkaz viru použije vzorek ze stolice [26].

3.2.4. Manipulace se vzorkem, jeho správné uskladnění a transport

Při nesprávné manipulaci se vzorkem může dojít k jeho kontaminaci. Proto je manipulace se vzorkem velmi zásadní pro správné vyhodnocení tohoto vzorku. Je-li to možné, vzorek se ihned po odběru začne testovat. Pokud to možné není, vzorek se vloží do transportního média, které je už připravené ve skleněné nebo plastové zkumavce. Zkumavka se vzorkem musí být co nejdříve doručena do laboratoře a ihned testována.

K manipulaci se vzorkem patří i manipulace s potenciálně infikovaným materiálem použitým při odběru vzorku od potenciálně infikovaném pacienta. S těmito materiály se musí nakládat podle stejných pravidel jako s jiným biologicky nebezpečným materiálem v laboratoři [28].

Jak už bylo zmíněné, vzorky se přepravují ve speciálních zkumavkách naplněných cca 2-3 ml tekutého transportního média, tak aby vatička nasycená odebraným vzorkem a kousek plastové tyčinky, na níž vatička je, byli ponořené. Jako transportní médium se nejčastěji využívá virové transportní médium (VTM), které obsahuje důležité složky pro vytvoření izotonického roztoku pro virus. Mezi takové složky patří proteiny chránící virovou strukturu, antibiotika pro kontrolu mikrobiální kontaminace a pufrů pro kontrolu pH. Tyto látky mají

zajistit prostředí pro životnost viru, vhodnou teplotu, nutriční podmínky, ochranu před vyschnutím během skladování a transportu vzorku. Dalším transportním médiem může být fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS), minimální esenciální médium (MEM) [27] nebo sterilní fyziologický roztok. Vzorky by měly být během přepravy umístěny do chladných obalů, které udržují jejich teplotu na 2–8 °C. Vzorky uchované při takové teplotě by měly být zpracované během 72 hodin.

3.3. Stripovací testy

Včasné odhalení SARS-CoV-2 bylo v probíhající vážné a rozšířené pandemii značně důležité. Přes potřebu testovat velkou část populace levnější a rychlejší cestou byly uplatněny okamžité komerčně dostupné stripovací testy, kterými nejčastěji byly laterální průtokové imunoanalýzy zprostředkovávající okamžitý výsledek testu. Laterální průtoková imunoanalýza (LFIA) využívá spojení tenkovrstvé chromatografie s nepřímou imunochemickou sendvičovou metodou [21] a umožňuje tak detekci antigenu SARS-CoV-2 ve vzorku z nasofarngiálního výtěru.

3.3.1. Testy na průkaz specifických protilátek (nepřímý test)

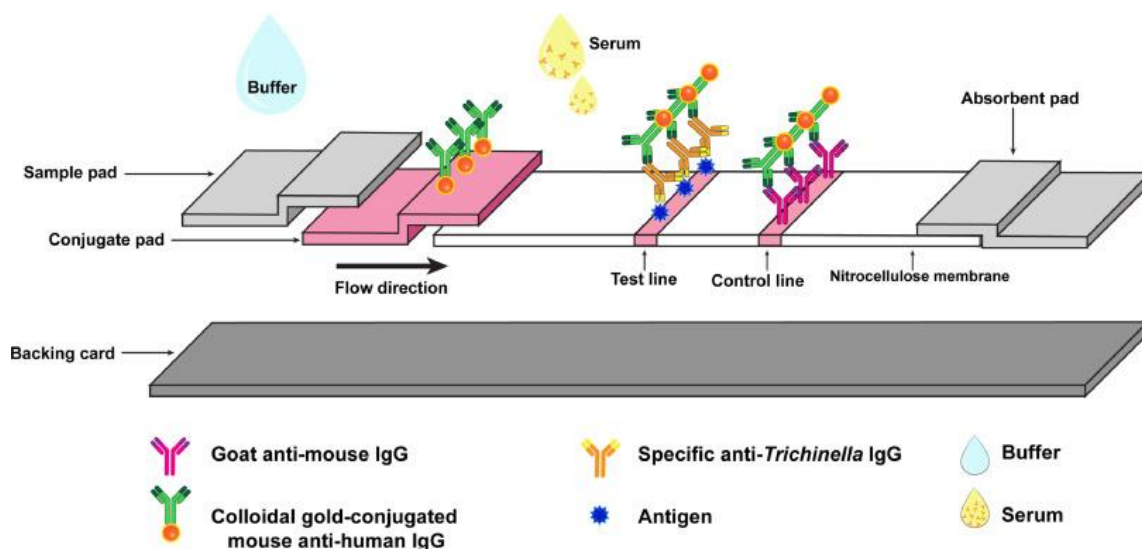
Jednou z možností průkazu infekce virem SARS-CoV-2 je detekce přítomných specifických protilátek proti tomuto viru ze vzorku krve. Protože protilátky typu IgG imunitní systém vytváří v pozdější stádiu infekce než protilátky IgM vznikající už na počátku vstupu antigenu do organismu, jsou protilátky IgG pro antigen specifičtější. Protilátka IgM poskytuje první obranou linii imunitního systému člověka. Pokud se protilátky IgG objeví ve vzorku, může to značit prodělanou infekci, hlavně když množství protilátek IgM klesá. Testy na průkaz protilátek jsou buď pouze pro IgG, nebo pro IgG a IgM, anebo pro celkové protilátky.

Mezi metody imunoanalýzy používané pro detekci protilátek COVID-19 se zahrnují enzymatické imunosorbentní testy (ELISA), chemiluminiscenční imunotesty (CLIA), fluorescenční imunotesty (FIA) a point of -care (POC) lateral flow immunoassay (LFIA).

Laterální průtoková imunoanalýza (LFIA) je kvalitativní imunochromatografický test na bázi koloidního zlata, který využívá kombinaci principů tenkovrstvé chromatografie a nepřímé imunochemické sendvičové metody s vazebnými a detekčními protilátkami [29]. Ve srovnání s jedním testem IgM nebo IgG je použitelnost a citlivost při použití kombinovaného testu, při kterém se zároveň detekují IgM a IgG protilátky, lepší.

Testovací souprava testu na protilátky IgG-IgM SARS-CoV-2 obsahuje testovací kazetu, pufr na ředění vzorku, kapátko a příbalový leták. V testovací kazetě se nachází testovací proužek, který se skládá z pěti částí, včetně tedy plastové podložky, podložky na vzorky, podložky s konjugátem, absorpční podložky a membrány z nitrocelulózy. Testovací proužek má na dvou oddělených testovacích liniích stripované dvě myší anti-lidské monoklonální protilátky (anti-IgG a anti-IgM). To znamená, že na testovací linii M jsou imobilizovány anti-lidské IgM protilátky, na linii G zase anti-lidské IgG a poslední linie kontrolní (C linie) obsahuje anti-králičí IgG protilátky, jak je znázorněno na obrázku 3. Na konjugační podložce je nastříkán jak povrchový antigen ze SARS-CoV-2 vázající se na přítomné protilátky, který je konjugován s nanočásticemi koloidního zlata, tak i králičí IgG protilátky konjugované s koloidním zlatem pro navázání na anti-králičí IgG protilátky, které jsou zakotveny na kontrolní linii [30].

Na vložku pro vzorek se napipetuje 15 až 20 μ l vzorku plné krve a poté se hned přidají 3 kapky pufru pro ředění vzorku. Po aplikaci vzorku se pufr se vzorkem pohybuje pomocí kapilárních sil horizontálně podél membrány (chromatografického papíru). Po dojití analytu na první testovací linii M se může vytvořit první barevný proužek. Ten vzniká právě pokud vzorek krve obsahuje protilátky IgM proti SARS-CoV2, na kterých je navázaný antigen ze SARS-CoV-2 a které se váží na myší anti-lidské protilátky IgM. To samé se stane v linii G, ve které jsou zakotveny myší anti-lidské IgG protilátky, na něž se navážou protilátky ze vzorku, pokud ovšem ve vzorku jsou přítomny. Ovšem pokud vzorek neobsahuje žádné protilátky, nevznikají žádné proužky v M a G linii, ale musí vzniknout jeden barevný proužek, a to na kontrolní linii, ať už je vzorek pozitivní nebo negativní. Tento proužek, který funguje jako kontrola správného provedení testu, vznikne při vychytávání přebytečného konjugátu (králičí protilátka IgG značená koloidním zlatem) králičí anti-protilátkou IgG.



Obrázek 3: Popis testovací destičky a schéma LFIA k vyšetření protilátek [31]

U ELISA testu jsou mikrotitrační jamky potaženy antigeny SARS-CoV-2, na které se naváží antigen-specifické protilátky. K vizualizaci komplexu antigen-protilátka se po promytí přidá konjugát, který po reakci se substrátem změní barvu. Podle míry změny barvy se kvantitativně určí počet protilátek ve analyzovaném vzorku.

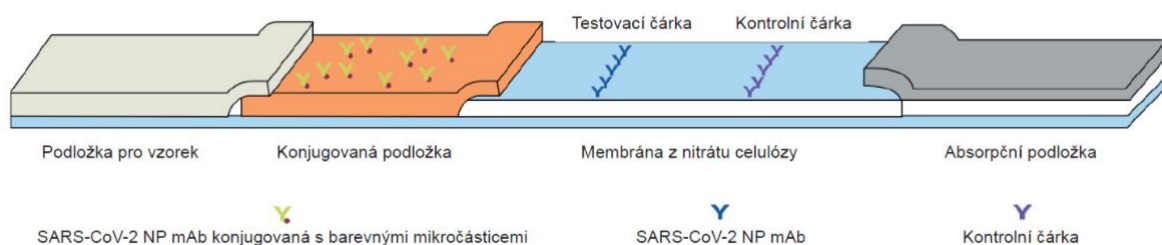
U metody CLIA se využívá chemiluminiscence ke kvantifikaci množství protilátek ve vzorku, kdy antigen SARS-CoV-2 je konjugován s fluoresceinem isothiokyanátem a oba jsou vázány na magnetické částice. Po navázání protilátky na tento konjugovaný antigen je pomocí chemiluminiscence detekována hladina protilátek přítomných ve vzorku. Metody ELISA a CLIA na rozdíl od metody LFIA poskytují i kvantitativní výsledky [32].

3.3.2. Testy na průkaz antigenu (přímý test)

Antigen je částice nebo fragment umožňující navodit imunitní systém a produkci specifických protilátek, které bojí proti infekci zabíjením patogenů. Antigenní testy jsou rychlé diagnostické testy detekující povrchové proteiny (antigeny) viru a odhalují pouze aktivní virovou infekci nikoli fázi uzdravování, které odhalují sérologické testy, kdy detekují vznikající protilátky [33]. Tyto testy jsou velmi levné a lze je použít pro screeningové testování v domácnosti, testovacích centrech nebo třeba v pečovatelských domech [34]. Rychlý antigenní test (Rapid test) je kvalitativní imunochromatografický test na bázi koloidního zlata, který využívá kombinaci principů tenkovrstvé chromatografie a nepřímé imunochemické sendvičové metody s vazebnými a detekčními protilátkami [35]. Jedná se opět o laterální průtokovou imunoanalýzu jako u předchozí kapitoly, ovšem tentokrát se využívá k detekci antigenu SARS-CoV-2. Vazebná protilátka je navázána na

chromatografický papír ve specifické matrici a detekční protilátka značená koloidním zlatem je zabudována do vzorkové podložky. Stacionární fáze může být tedy chromatografický papír nebo určitý polymer. Mobilní fáze se naopak skládá z pufru a ze vzorku. Po aplikaci mobilní fáze na podložku se pufr se vzorkem pohybuje pomocí kapilárních sil horizontálně podél stacionární fáze. Po spojení analytu s detekční protilátkou vznikne imunokomplex, který dále při putování chromatografickým papírem tvoří tzv. sendvič s vazebnou protilátkou [36]. V místě ekvivalence se vytvoří barevný proužek, který indikuje přítomnost viru ve vzorku.

Testovací nitrocelulóзовый proužek obsahuje protilátku COVID-19 v testovací zóně T a protilátku IgG v kontrolní zóně C. V konjugované podložce je obsažena protilátka COVID-19 konjugovaná s koloidním zlatem a myšimi IgG protilátkami konjugovanými také s koloidním roztokem. Pracovní pufr s roztokem se vloží do jamky pro vzorek a tento analyt se spojí s konjugátem protilátky COVID-19 a tím vznikne komplex antigenu [33]. Ten pomocí kapilárního děje putuje po nitrocelulózové membráně a po dosažení testovací linie T obsahující protilátku COVID-19 se na ni naváže a vznikne vínově zbarvený proužek, který nám udává informaci o pozitivitě testu a tím tedy i o přítomnosti viru. Pokud žádný barevný proužek v této linii nevznikne, test je negativní a svědčí o nepřítomnosti viru. Pro kontrolu, zda byl test správně proveden, slouží kontrolní zóna C, ve které by se měl pokaždé objevit barevný proužek. Pokud žádný barevný proužek nevznikne, test nebyl proveden správně, není platný a měl by být proveden znovu.



Obrázek 4: Popis testovací destičky pro detekci virového antigenu [37]

Membrána je velmi často vyráběna z nitrocelulózy nebo také z polyethylenu nebo nylonu. Důležité vlastnosti materiálu, z něhož se bude membrána skládat, jsou dobrá vaznost reagensů a velikost pórů, jimiž je protkána. Velikost pórů je důležitá především pro vysokou citlivost a tím i správnost imunochromatografického testu, protože čím menší póry membrána obsahuje, tím vyšší citlivost tento test vykazuje. Optimální velikost pórů se udává 0,05 – 12 μm . Abychom neměli jenom holou membránu a abychom ji nijak nepoškodili při manipulaci a dobře se nám s ní pracovalo, je tato membrána vložena do plastové výztuhy [38]. Membrána obsahuje tři zóny: zóna pro vzorek, zóna pro konjugát a absorpční podložka.

Zóna pro aplikaci vzorku má za práci pomalu a homogenně přenášet vzorek do zóny pro konjugát, a proto je nejčastěji vyráběna z celulózy nebo skleněného vlákna. Pro získání dokonale pomalého a homogenního vztlínání vzorku po membráně, je tato zóna napuštěna buď různými pufry, solemi, surfaktanty nebo proteiny.

Zóna pro konjugát je zase nasorbována určitou specifickou, a indikátorem značenou, protilátkou – koloidním zlatem. Konjugát musí být stabilní a také se lehce uvolnitelný z místa po setkání se vzorkem. Tato zóna je běžně tvořena ze skleněného vlákna, polyesteru nebo celulózy.

Poslední zónou na membráně je absorpční podložka, jejíž funkcí je přefiltrování, nasátí a nanesení kapalného vzorku na membránu. Touto podložkou může být buď celulózový filtr nebo adsorpční papír [39].

V imunochromatografických metodách se jako reagentie využívají specifické protilátky, a to nejčastěji monoklonální protilátky připravované hybridomovou technologií imunizací myší či potkanů. Využívají se také uměle syntetizované nukleové kyseliny nazývané aptamery, které se nejen díky své silnější vazbě a vysoké selektivnosti s analyty, ale také díky jednoduché a levnější výrobě, reprodukovatelnosti a širšímu použití, využívají v dnešní době čím dál tím více a zastiňují používání specifických protilátek, jejichž výroba je pracná, náročná a finančně náročnější.

4. Průkaz specifických RNA

K diagnostice onemocnění covid-19 nám může sloužit i virová RNA (ribonukleová kyselina – Ribonucleic Acid), ze které se tento vir skládá. K této detekci nám slouží testy nukleových kyselin, do kterých se řadí především široce rozšířená, velmi preferovaná a zaručená metoda PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerázová řetězová reakce). Princip metody PCR je využití DNA-polymerázy v laboratorních podmínkách (in-vitro), k snadnému a rychlému pomnožení neboli replikaci dané sekvence DNA. Je to tedy technika molekulárního klonování nebo purifikace. Tato metoda byla objevena v roce 1983 americkým vědcem Kary Mullisem, za kterou byl obměněn Nobelovou cenou za chemii v roce 1993. Od té doby si tato metoda našla využití v mnoha oborech. Je zcela nezbytná v buněčné a molekulární biologii, kriminalistice k identifikaci osoby, mikrobiologii pro zjištění kvality potravin. Před tímto objevem byla DNA namnožena vložením do bakteriálního plazmidu. [40]

4.1. Detekce nukleových kyselin

4.1.1. Odběr vzorku

Pro molekulární metody mohou být vzorky odebrány z horních a dolních cest dýchacích, z plné krve, séra nebo plazmy. Při odběru z horních cest dýchacích se vkládá tyčinka s tamponem nosními dírkami nebo ústy na konkrétní místo, kde se krouživými pohyby odebere vzorek viru SARS-CoV-2 a infikované buňky. Nasátá tyčinka s tamponem se vloží do transportního virového média připraveného ve zkumavce, která je poté poslána do laboratoře na analýzu. Podle místa výtěru se pak vzorek dělí na výtěry nosohltanové, orofaryngeální (krční) a přední výtěr z nosu, kde se stírá jen ze stěny nosní dírkou. Z dolních cest dýchacích se odebírá vykašlaný sputum, tracheální aspirát odebraný z průdušnic a bronchoalveolární laváž pocházející z plic. Sérum a plazma se získává z plné krve odebrané ze žíly. Sérum lze dosáhnout vysrážením a následným odstraněním krevní sraženiny. Přidáním antikoagulant do vzorku plné krve se vyváží vápenaté ionty, čímž se zabrání hemokoagulaci. Zabráněním hemokoagulace vyvázáním vápenatých iontů pomocí antikoagulant a následnou centrifugací se získá plazma. Ve zkumavce po centrifugaci vzniknou tři fáze: plazma, buffy coat, obsahující převážně leukocyty a trombocyty, a erytrocyty [41].

K tomu, aby se mohly odebrané vzorky použít k detekci nukleových kyselin, musí z nich být předtím získány vzorky těchto nukleových kyselin pro následnou amplifikaci a detekci.

4.1.2. Izolace virové RNA ze vzorku

Izolace virové RNA SARS-CoV-2 z odebraného vzorku je zásadní pro molekulární diagnostiku. Izolace RNA nebo DNA je proces získávání těchto makromolekul z určitého vzorku za použití různých separačních metod a chemikálií. Pro polymerázovou řetězovou reakci stačí použít jen velmi malé množství RNA, které lze získat přímo z tkání nebo buněk. Izolace RNA z virové částice se provádí proto, aby případné nečistoty neovlivňovaly průběh PCR. Tyto nečistoty fungují jako inhibitory polymerázy a tím reakci zpomalují, nebo se váží na samotnou templátovou DNA a nedovolí jí se zúčastnit polymerázové reakce. Prvním krokem při získání RNA z viru je lýza virové částice (rozrušení buňky), kterou lze provést působením různých hydroxidů, tenzidů nebo zmrazováním a následným rozmrazováním. Buněčná a jaderná membrána se rozruší nebo až rozpustí [42].

Pro rozrušení živočišné buňky stačí použít slabý neiontový detergent (např. 0,5% SDS), který způsobí snížení osmolarity a následně popraskání buňky. Dále lyzační roztok obsahuje proteázy (Proteináza K), které hydrolyzují bílkoviny a histony, a látky denaturující RNázy, které by odstraňovaly přítomné RNA [43].

Proto, aby se odstranili kontaminující látky, následuje extrakce a purifikace RNA z lyzátu. Typy extrakcí, které lze použít, je mnoho.

4.1.2.1. Organická extrakce pomocí fenol-chloroformu

Při tomto typu extrakce se kontaminující bílkoviny denaturují a precipitují fenolem, následně se vysrážené bílkoviny vytřepají do chloroformu a nechají se zcentrifugovat [43]. Po centrifugaci vznikají dvě fáze (vodná a organická fáze). Horní vodní roztok obsahuje odizolovanou RNA a spodní organická fáze obsahuje zase fenol a chloroform. Kvůli polaritě vodné fáze a nepolaritě organické fáze se bílkoviny, které mají jednu část molekuly polární a druhou část nepolární, nerozpouští ani v jedné fázi a kumulují se na rozhraní mezi horní a dolní fází. RNA se díky své polaritě velmi ochotně rozpouští ve vodném roztoku. RNA se pročišťuje postupným odebíráním vrchní fáze a přidáváním fenol/chloroformu. Následně se provede precipitace RNA (vysrážení) přidávkem ethanolu a octanu sodného. Vysrážená RNA se omyje a rozpustí ve vodě nebo v roztoku pufru [44].

Tato metoda je stále i přes svou časovou náročnost, pracnost, manipulaci s nebezpečnými chemikáliemi a správné odstranění fenolu a chloroformu z extrakční metody, „zlatým standardem“ purifikace RNA.

4.1.2.2. Izolace pomocí rotačních sloupců

Klasické metody k čištění nukleových kyselin používají organickou extrakci, při které vyžadují použití toxických rozpouštědel, jako je chloroform a fenol. Navíc je tato metoda extrakce časově náročná [45]. Extrakce RNA za pomoci rotačních sloupců je metoda využívající membrány z oxidu křemičitého, jimiž jsou naplněny tyto sloupce [46]. Dále mohou sloupce membrány vyrobené z nabitých polymerů zachycující RNA. Pro mytí se využívá buď odstředivá síla nebo vakuum [41].

4.1.2.3. Magnetické částice

Ačkoli v současné době se často z virových částic extrahují nukleové kyseliny odděleně, nově vynalezená metoda extrakce pomocí magnetických částic umožňuje koextrahovat ze vzorku sputa jak RNA, tak DNA, které se dále amplifikují a detekují multiplexní metodou RT-qPCR. Tato populární nová metoda nabízí získání nukleových kyselin ve vysoké kvalitě a vysokém množství, ušetření času a financí. Právě pro své výhody si našla velké uplatnění v diagnostických laboratořích [47].

4.1.2.4. Chelex

Extrakce DNA pomocí chelexu se využívá pro získání DNA z velmi malého množství vzorku (krevní skvrny, vlasy, stopy slin, stopy spermatu), a proto je tato metoda nejvíce využívána ve forenzní genetice jako hlavní a důležitý nástroj pro identifikaci pachatele [43]. Její také častou výhodou je rychlost provedení a dobrá komerční dostupnost. Dále její zásadní výhodou je získání potřebného množství z nepatrného množství vzorku pro vyhodnocení PCR reakcí.

Chelex je chelatační iontoměničová pryskyřice složená z kopolymeru styrenu a divinylbenzenu s párovými iminodiacetátovými ionty, které se váží s polyvalentními kovovými ionty [48]. Tato chelatační vlastnost se využívá k vyvázání ze vzorku hořčnatých kationtů, které aktivují nukleázy, jak už bylo zmíněno výše.

4.2. Princip PCR metody

PCR metoda je technika získávání velkého množství specifické sekvence DNA ze vzorku. Jako matrix DNA se může použít jak genomická DNA, DNA obsažená v jádře buňky, tak i komplementární DNA nebo dokonce mitochondriální DNA [40]. Začátek a konec úseku

vybrané DNA, které se budou replikovat, se musí označit jako tzv. primery, krátké oligonukleotidy DNA. Touto metodou lze získat in vitro nespočet kopií fragmentu DNA z extraktu. Lze replikovat DNA o délce až 10 000 nukleotidů (v některých případech i mnohem více, až 40 000 nukleotidů). Mluvíme tedy o tzv. amplifikaci, která se dělí do tří základních kroků: denaturace, hybridizace a elongace. Reakční směs obsahuje vzorek (extrakt DNA), Taq polymerázu, primery a 4 deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP) v přebytku v roztoku pufru. Je vystavena několikasupňovému cyklu ohřevu v tepelném cyklovači. Zařízení umožňuje skokové tepelné změny po určité době (tzv. Peltierovým jevem), potřebné pro dané kroky replikace [49].

4.2.1. Reverzní transkripce

Před samotnou metodou PCR se musí ještě provést jeden malý krok, a to přeměna extrahované virové mRNA na templátovou komplementární DNA (cDNA), s níž se už může dále pracovat. Proces, při kterém je přepisována RNA na cDNA se nazývá reverzní transkripce a celý tento děj je katalyzován enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza). cDNA je syntetizována pomocí náhodných primerů, oligo-dT primerů, primerů specifických pro cílový gen, anebo kombinace oligodT a náhodných primerů [50].

4.2.2. Denaturace molekuly DNA

U tohoto kroku dochází k rozdělení dvoušroubovicové DNA na dva řetězce působením tzv. denaturační teploty dosahující kolem 94 °C. Vodíkové můstky, držící dva řetězce DNA do jedné dvoušroubovice, se při teplotách vyšších než 80 °C rozpadají, a tím vzniká jednovláknová DNA [51].

4.2.3. Hybridizace

Hybridizační krok se provádí při teplotách od 40 °C do 70 °C, které jsou nazývané teploty hybridizace primeru. Po ochlazení reakční směsi mají jednořetězcové DNA nutkání se znovu spojovat do dvoušroubovicové DNA, tzv. se renaturovat [51]. Tohoto efektu se zamezí dostatečnou teplotou a nadbytkem specifických oligonukleotidů, které se v reakční směsi již vyskytují. Tyto krátké řetězce oligonukleotidů se budou vázat (hybridizovat) se svou komplementární sekvencí rychleji než právě dlouhé jednořetězcové molekuly vyskytující se v reakční směsi v menší koncentraci než zmíněné nukleotidy. Teplota je při této fázi z mnoha

důvodu velmi důležitá pro celkový výsledek PCR. Nižší teplota může vyvolat chybné nasedání primerů na nekomplementární sekvence, a tím může vznikat nesprávný a nespecifický produkt. Naopak při velmi vysoké teplotě nebudou primery dostatečně hybridizovat [52], což povede k malému množství produktů. Obecně ale platí, že čím vyšší teplota je, tím selektivnější a specifičtější hybridizace se dostaví.

4.2.4. Elongace

Při elongační teplotě (72 °C) se syntetizují komplementární vlákna k primery označeným úsekům jednovlakovým DNA, kam se Tag polymeráza váže a tím katalyzuje replikaci. Tyto oligonukleotidy nasedlé na jednořetězcovou DNA (templát) slouží jako primery pro DNA polymerasu. Ta od jejich 3'-konce začíná syntetizovat nové komplementární řetězce s templátem. Od jednoho primeru začíná syntéza a u druhého primeru syntéza končí. Tímto končí celý jeden cyklus replikace [51].

Po prvním cyklu PCR vznikají dva řetězce dvoušroubovicových řetězců DNA. Jako templát pro polymerázu v dalším cyklu mohou sloužit i nově vytvořené řetězce. To znamená, že se nám počet řetězců opět zdvojnásobí, a tím bude množství produktů v dalších cyklech exponenciálně růst až do té doby, dokud koncentrace produktů nedosáhne fáze plató, kde se už dále nezvyšuje [53].

Po těchto zhruba 30 cyklech, které trvají cca 3 hodiny, a kdy je PCR už ukončeno, jsou v reakční směsi nově nasyntetizované krátké specifické úseky DNA, ale i dlouhé řetězce DNA. To je dáno právě dlouhou molekulou původní DNA, která sloužila jako primární templát, ze které sice vznikne řetězec kratší než původní templát, ale který je z obou konců delší o primer. Z těchto nových a o něco delších templátů už v dalších cyklech vznikají přesně dlouhé úseky řetězců DNA, jež primery označovaly. Tím vznikají dále přesně definované úseky DNA, ale dále vznikají i dlouhé řetězce DNA z původního templátu. V závěru je poměr specifických produktů a delších řetězců v konečné směsi prakticky zanedbatelný právě tím, jak už bylo zmíněno, že množství specifických produktů roste exponenciálně, zatímco dlouhé řetězce jenom lineárně.

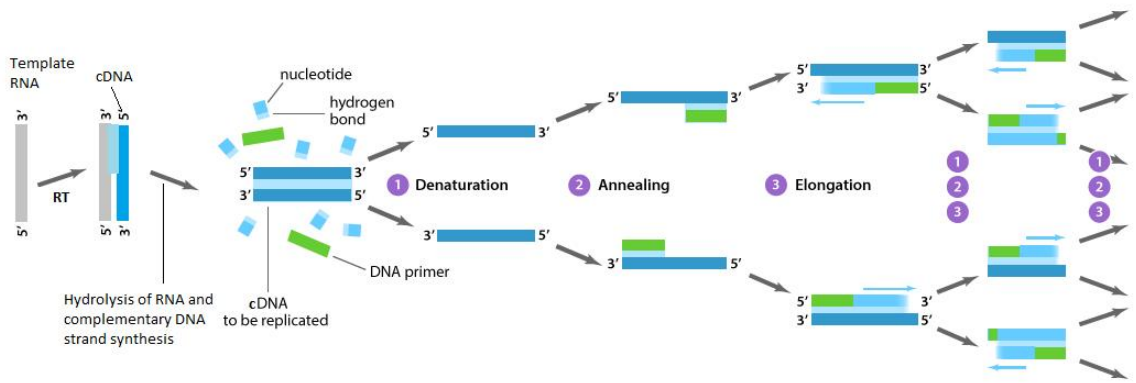
Na konci polymerázové řetězové reakce je v celkovém výtěžku cca 10^9 kopií na jednu molekulu DNA po 30 cyklech [51].

4.2.5. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase je spolehlivá detekce a měření produktů PCR za každého cyklu procesu, které jsou přímo úměrné množství templátu na začátku procesu PCR [54]. Zatímco kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase stanovuje množství vzorku už při průběhu cyklů, při klasické PCR metodě se tak neděje a kvantifikace vzorku se musí provést až na úplném závěru metody za použití elektroforézy na agarózovém gelu, potom mluvíme o end-point metodě [55]. Metoda tedy měří akumulaci produktů PCR prostřednictvím fluorescenčních látek.

V dřívější době, lze se ale s touto detekcí setkat i nyní, se využívala vizualizace produktů PCR pomocí interkalace ethidium bromidem nebo jiné nespecifické interkalační barvivo. Tyto produkty byly pak analyzovány na standardních agarózových gelech a kvantifikovány radiozobrazováním. Ethidium bromid se totiž váže na dvouvláknové DNA interpolací mezi páry bází a při ozáření UV světlem fluoreskuje. Zásadní nevýhodou použití tohoto barviva je jeho vysoká karcinogenita a slabé fluorescenční záření.

Dnes je ethidium bromid nahrazen interkalačním barvivem SYBR Green, nebo také využitím 5' nukleázových testů s použitím sond, mezi ně patří nejznámější TagMan sonda [54]. Při použití SYBR green se opět měří nárůst fluorescence způsobený navázáním barviva na stále rostoucím množství DNA. SYBR Green se osvědčil především tím, že se specifičtěji a s větší afinitou váže na dvouvláknovou DNA a jeho fluoreskování je mnohem jasnější než u jeho předchůdce, ethidium bromidu [56]. Při použití fluorescenčně značených sond, které představují oligonukleotidy označené na 5' konci reportérským barvivem (FAM) a na 3' konci hasícím barvivem (TAMRA). Při neporušení sondy dochází k absorpci fluorescenční energie hasícím barvivem. Avšak při dalších fázích cyklu PCR dochází k narušení nebo spíše její štěpení 5'-3' nukleolytickou aktivitou DNA polymerázy a záření z barviva reportéru se nevyčytává hasícím barvivem, což má za následek zvýšení fluorescenčního záření z reportérského barviva, které je snadno měřeno v každém cyklu PCR [57].



REVERSE TRANSCRIPTION PCR

Obrázek 5: Schéma průběhu RT-PCR [58]

5. Zhodnocení testů v klinickém kontextu

Včasná diagnóza a izolace podezřelých pacientů je zásadní pro kontrolu probíhající pandemie. Už od počátku pandemie viru SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19 se začala věnovat veškerá pozornost na průkazu tohoto viru. Diagnostické testy těžkého akutního respiračního syndromu koronaviru 2 (SARS-CoV2) hrají ústřední roli v diagnostice. O diagnostické testy nastala velmi velká poptávka jak v laboratořích, nemocnicích a testovacích centrech, tak i v domácnostech. Kvůli tomuto stoupajícímu se zájmu o testy muselo být zavedeno více diagnostických testů využívaných v laboratořích nebo v nemocnicích pod odborným dohledem, ale také i pro širokou veřejnost pod neodborným dohledem. Jak už bylo v této práci zmíněno, pro průkaz SARS-CoV-2 se využívají 2 typy diagnostických testů. První typ testů detekuje fragmenty viru, a to buď genom virové RNA nebo virové proteiny a řadí se mezi přímou detekci viru. Virová RNA je nejčastěji detekována pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkriptázou v reálném čase (RT-PCR). Naproti tomu průkaz viru pomocí jeho povrchových proteinů (antigenů) je sice méně citlivý než detekce virové RNA, ale naopak je rychlejší, ekonomicky dostupnější a snadněji se s ním manipuluje [59]. Sérologické testy řazené do nepřímých testů prokazují vzniklé imunoglobuliny (protilátky) vytvořené imunitním systémem při probíhající infekci nebo po prodělané nemoci. Vzhledem k pozdějšímu vývoji protilátek jako reakce na infekci jsou tyto testy méně užitečné pro diagnostiku akutní aktivní infekce. Využívají se ovšem pro zpětné zjištění o proběhlém onemocnění a zajištění informace, zda jsou v organismu přítomné protilátky proti viru SARS-CoV-2 po prodělané nemoci nebo po vakcinaci.

Ačkoliv všechny typy popsaných diagnostických testů jsou založeny na průkazu viru v organismu, ne vždy mohou vyjít správně s ohledem na to, jestli byl test proveden správně nebo také v jaké fázi se onemocnění byl proveden. Je důležité brát v potaz, v jaké fázi infekce se právě virus nachází a podle toho vybrat správný test. Zásadní je také správný typ vzorku, popřípadě trefné místo výtěru. A také diagnostické testy nejsou zcela dokonalé a mohou vykazovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky, a proto nelze z určitostí nikdy definitivně potvrdit přítomnost viru. Aby se docílilo celkového vyhodnocení testu, je brána v úvahu charakteristika provedení testu, informace o pacientovi a prevalence onemocnění. Podle těchto dalších informací lze odhadnout „pozitivní prediktivní hodnotu“, neboli pravděpodobnost správného výsledku [60]. Diagnostické testy SARS-CoV-2 se řídí pevně stanovených směrnic technické výkonnosti, například citlivost a specifita, přičemž klinická

citlivost dále závisí na infekčním stavu pacienta. Interpretace se stává problematickou v důsledku vymizení viru a následné produkci protilátek imunitním systémem, kdy klinická citlivost postupně klesá [61].

Od propuknutí pandemie COVID-19 Světová zdravotnická organizace (WHO) a Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválili několik diagnostických testů pro diagnostiku COVID-19, přičemž každý nový test je srovnáván vedle metody RT-PCR, který se využívá jako referenční metoda k detekci patogenu [62]. Pro kontrolu, zda daný test vykazuje vysokou míru správných výsledků a může být tedy využit ve zdravotnictví, musí se provést tzv. validita testu. Tuto validitu diagnostických testů lze určit podle dvou specifit, podle senzitivity a specifity. Přičemž senzitivita udává poměr počtu lidí s onemocněním, u kterých test poskytl pozitivní výsledek, a celkového počtu testovaných lidí s onemocněním. To znamená, pokud u sta infikovaných lidí test indikoval pozitivní výsledky u 80 z nich, potom senzitivita daného testu se rovna 80, neboli 80 %. U zbylých 20 % lidí test prokázal falešně negativní výsledky [63].

$$\text{Senzitivita} = \frac{\text{počet pozitivně testovaných infikovaných lidí}}{\text{celkový počet testovaných infikovaných lidí}} \times 100 \%$$

Obrázek 6: Vzorec výpočtu senzitivity [63]

Naopak u specifčnosti se udává poměr počtu lidí bez onemocnění ku celkovému počtu testovaných lidí bez infekce. V tomto případě, pokud se u sta testovaných lidí bez infekce test prokáže negativní výsledky u 90 z nich, potom specifčnost diagnostické testu vykazuje 90 %. Falešně pozitivní výsledek test ukázal tedy u 10 lidí z celkových testovaných [63].

$$\text{Specifita} = \frac{\text{počet negativně testovaných lidí bez infekce}}{\text{celkový počet testovaných lidí bez infekce}} \times 100 \%$$

Obrázek 7: Vzorec pro výpočet specifity [63]

Světová zdravotnická organizace (WHO) schvaluje diagnostické testy, pokud vykazují senzitivitu vyšší než 80 % a specifitu vyšší než 90 %.

Bohužel nelze předpokládat, že testy dosahují vždy stejných výsledků, a proto takový verdikt není dostatečný. Proto byly zavedeny pozitivní prediktivní hodnoty (PPV) a negativní prediktivní hodnoty (NPV), kdy PPV lze získat výpočtem poměru počtu lidí s pozitivními výsledky se správnou diagnostikou a počtu celkově pozitivně testovaných lidí, zatímco NPV se vypočítá poměrem počtem lidí s negativními výsledky, kteří skutečně nejsou infikováni, a celkovým počtem negativně testovaných lidí [63].

$$PPV = \frac{\text{počet infikovaných lidí s pozitivním výsledkem}}{\text{celkový počet pozitivně testovaných lidí}} \times 100 \%$$

Obrázek 8: Vzorec pro výpočet PPV [63]

$$NPV = \frac{\text{počet zdravých lidí s negativním výsledkem}}{\text{celkový počet negativně testovaných lidí}} \times 100 \%$$

Obrázek 9: Vzorec pro výpočet NPV [63]

Při testování 300 lidí testem vykazující 0,7 senzitivitu a 0,9 specifickost, přičemž 100 lidí z celkových 300 jsou správně pozitivně testovány. Kvůli senzitivitě činící 0,7 počet pozitivní výsledků pacientů s nemocí je 70 ($100 \times 0,7 = 70$). Dále bylo po testování potvrzeno zbylých 200 zdravých lidí. Protože hodnota specifickosti činí 0,9, počet s falešně pozitivním výsledkem je 20 z výpočtu $200 \times 0,1 = 20$. Hodnota PPV se poté vypočítá jako $\frac{70}{70+20} \cdot 100 = 70 \%$ a NPV je vypočítána jako $\frac{80}{180+20} \cdot 100 = 90 \%$.

Udávaná citlivost aktuálně dostupných RT-PCR kitů je v rozmezí 70 % až 98 % a senzitivita od 95 % do 99,7 % [63].

Citlivost, senzitivita a specifickost diagnostických testů se různě mění podle typu vzorku a jeho místa odběru. Citlivost rychlých antigenních testů se pohybuje okolo 64 % až 69 %, přičemž specifickost se může vyšplhat až ke 100 %. I přesto je ovšem doporučována metoda RT-PCR při negativních výsledcích pro snížení falešně negativních výsledků.

Senzitivita PCR na nukleovou kyselinu SARS-CoV-2 klesá v průběhu infekce, což dále ovlivňuje klinickou citlivost testování PCR. Po prvních pěti dnech po nástupu příznaků onemocnění se klinická senzitivita pohybuje nad 90 %. Mezi šestým a osmým dnem je klinická citlivost v intervalu od 84 % do 76 % a v dalších dnech se citlivost klesne až pod 50 % [63]. Citlivost u této metody může být variabilní na základě virové zátěže, techniky extrakce RNA, zdroje odběru vzorků a stádia onemocnění během dobrého odběru vzorku. Citlivost techniky RT-PCR byla výrazně zlepšena použitím specifických sond pro další virově specifické geny. [64]. Je důležité si uvědomit, že při technice RT-PCR je velký problém v tom, že mnoho jedinců mohou být infikováni fragmenty virové RNA, které mohou přetrvávat týdny nebo měsíce bez jakéhokoli důkazu aktivní replikace viru a výsledek testu vykazuje pozitivní výsledek [65].

V důsledku zvyšující se sérokonverze v průběhu infekce se senzitivita sérologického testu zvyšuje po nástupu prvních klinických příznaků. Sérokonverze byla detekována po sedmi dnech při nástupu příznaků u 50 % pacientů a v dalších dnech se dále zvyšovala, přičemž po 12 dnech se séropozitivita činili až 80 % a vyšší. Po vyhodnocení těchto poznatků o citlivosti testů v různých dobách probíhající infekce se ukazuje, že sérologické testy jsou spolehlivější

diagnostickou pomůckou po sedmi dnech nástupu klinických příznaků než vyšetření pomocí metody RT-PCR [61].

5.1.1. CT vyšetření v diagnostice COVID-19

Počítačová tomografie (CT) hrudníku je diagnostické zobrazování a využívá se jako rutinní test k diagnostice pneumonie, kterou virus SARS-CoV-2 může způsobit, a proto může mít užitečné při diagnostice COVID-19. CT hrudníku může být použito k odhalení infekce v rané fázi, sledování progresu onemocnění a vyhodnocování léčebných postupů. Nedávné studie odhalily, že vyšetření CT hrudníku má vyšší senzitivitu (98 %) než RT-PCR (71 %). Nižší citlivost rentgenového záření vykazuje během raných fází infekce. Ovšem naopak vysokou citlivost vykazuje pro detekci časného nebo mírného onemocnění [66].

5.1.2. Výběr typ vzorku a odběr

Na základě jednoho negativního výsledku testu se nevylučuje přítomnost infekce a je proto nutné zopakovat test se stejným typem odběru vzorku nebo se doporučuje použít jiný typ vzorku. Například pokud test vzorku z horních cest dýchacích vykazuje negativní výsledek, doporučuje se testovat vzorek odebraného z dolních cest dýchacích, zvláště v případě těžkého nebo progresivního onemocnění. Na výběru vzorku závisí pacientův stav a fáze infekce, ve které se právě vyskytuje [67]. U asymptomatických pacientů a pacientů s mírnými příznaky se doporučuje odběr jak výtěru z nosohltanu, tak z orofaryngu, které musí být skladovány ve virovém transportním médiu (VTM), které je předem připravené ve zkumavce a které slouží k ochraně vzorku během transportu do laboratoří, kde se vzorek vyšetřuje. Nejen u pacientů, jejichž vzorek odebraného z horních cest dýchacích vykazuje negativní výsledek, tak i u pacientů se závažnými příznaky nebo s produktivním kašlem se doporučuje výtěr z dolních cest dýchacích, jako je sputum, bronchoalveolární laváž a tracheální aspiráty. Aby měl test vyšší pravděpodobnost vykazování správného výsledku, je tedy důležité dbát i na správném výběru typu odebraného vzorku.

5.1.3. Testy na protilátky COVID-19

Diagnostické testy na vyšetření protilátek proti viru SARS-CoV-2 se využívají k nepřímému průkazu tohoto viru neboli k průkazu protilátek produkované imunitním systémem, což udává probíhající nebo už proběhlou virovou infekci. Naproti testům NAT a antigenním testům mají testy protilátek řadu výhod, mezi ně patří delší detekční okno, snadnost a bezpečnost operátora při odběru krve, stabilita lidských protilátek ve srovnání s virovou RNA během odběru vzorků, přípravy, skladování a rovnoměrnější distribuce protilátek v krvi než u viru v krvi. A poslední radě lze protilátky detekovat i ze slin a tyto testy nevyžadují laboratoře

BSL-2. Testy na protilátky se používají pro různé příčiny a hrají důležitou roli v diagnostice onemocnění COVID-19 v případech s negativním testem PCR nebo prodělanou infekcí COVID-19, monitorování imunitních reakcí za účelem posouzení průběhu, stupně a trvání imunity, identifikace potenciálních dárců plazmy v rekonvalescenci, vývoj a hodnocení terapeutických protilátek a vývoj a hodnocení vakcín [68]. Pro detekci se využívají neutralizační protilátky, jejichž úkolem v organismu při infekci je blokáda vstupu patogenu do buňky, a vazebné protilátky, které se specificky vážou na v organismu přítomný patogen.

Vyšetření protilátek lze různými sobě podobnými technikami. Pro detekci imunoglobulinů v krvi se využívají metody ELISA, LFIA, CLIA s enzymovým nebo neenzymovým značením, elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA), fluorescenční imunoanalýza (FIA) a imunofluorescenční testy (IFA). Rychlý test s technikou LFIA, která pracuje s nanočásticemi koloidního zlata, vykazuje senzitivitu okolo 97,5 % a specificitu 95,2 %, citlivost má ovšem nízkou, pohybující okolo 50 %. Další imunochromatografická metoda ELISA využívá místo nanočástic koloidního zlata fluorescenční mikrokuličky. Její princip je založen na sendvičového imunotestu s dvojitým antigenem. Tento test na protilátky má mnohem vyšší citlivost (98 %) se specificitou 100 %, ale se senzitivitou pouze 62 %. ECL imunotest využívající princip sendvičového testu s dvojitým antigenem na analyzátorech a vyvolání chemiluminiscenční emise po vyvolání napětí na elektrodu, na jejíž povrch je magneticky zachycený komplex SARS-CoV-2-specifický rekombinantní N antigen, značený SARS-CoV-2-specifický rekombinantní N antigen a přítomné protilátky v krvi. Tento ECL imunotest byl validován s citlivostí 99,5 % a specificitou 99,8 %. Principem fluorescenční imunotestu je měření intenzity fluorescenčního záření, které vyvolává R-fykoerythrin značený antilidskými protilátkami IgG, IgM nebo IgA, který vytvoří sendvičový komplex s antigenem SARS-CoV-2 zachycený s magnetickými mikročásticemi v jamkách destičky a s protilátkami přítomné ve vzorku slin nebo séru. Tato metoda vykazuje nejvyšší citlivost a specificitu (100 %). Sérové protilátky lze také analyzovat imunofluorescenčními testy (IFA), jejichž principem je vizualizace protilátek pomocí fluoresceinem konjugovanými antihumánními imunoglobuliny pod fluorescenčním mikroskopem. Metoda IFA byla validována se 100 % specificitou a senzitivitou [68].

ZÁVĚR

Virus SARS-CoV-2, který byl objeven v Číně a který se rozšířil po celém světě, způsobil celosvětovou pandemii způsobující onemocnění COVID-19 a z toho důvodu byly zavedeny různá opatření po celém světě k zamezení šíření tohoto onemocnění a k zvládnutí probíhající pandemii. Kvůli rostoucí počet nakažených lidí se stal rychlý a přesný samotestovací test důležitým nástrojem pro diagnostiku COVID-19. V této práci jsou rozepsány principy dosud dostupné diagnostické testy založené na detekci virového genů, detekci lidských protilátek a detekci virových antigenů, přičemž detekce virových genů pomocí metody polymerázové řetězové reakci v reálném čase s reverzní transkripcí (RT-PCR) se stala nejspolehlivější technikou. Tento „zlatý standard“ kvůli své spolehlivosti používá jako srovnávací metoda k nově vznikajícím diagnostickým testům. Onemocnění COVID-19 se testuje v nemocnicích, v testovacích centrech a v laboratořích. Rapid antigenní testy a sérologické testy lze zakoupit v lékárnách a provést je v soukromě domě, ovšem bez odborné asistence může dojít mnoho chybám při provádění testu, jako například špatně odebraný vzorek nebo špatná manipulace s testem. Kromě srovnání nově uvedených diagnostických testů s metodou RT-PCR se bere v úvahu i specifita a senzitivita daného testu k porovnání, zda je diagnostický test dostatečně úspěšný. Mezi dalším důležitým faktorem pro správný výběr diagnostického testu je prevalence onemocnění, neboť ta se v různých populacích a čase mění. Proto to jsou definovány dvě hodnoty (PPV a NPV), kdy PPV je definována jako pravděpodobnost, že pozitivně testovaná osoba skutečně danou infekci má a naopak NPV je zase definovaná jako pravděpodobnost, že negativně testovaná osoba danou nemocí netrpí.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] YADAV, Rohitash, Jitendra Kumar CHAUDHARY, Neeraj JAIN, et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells* [online]. 2021, **10**(4) [cit. 2022-06-10]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10040821/
- [2] LU, Roujian, Xiang ZHAO, Juan LI, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* [online]. 2020, **395**(10224), 565-574 [cit. 2022-07-06]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- [3] UMAKANTHAN, Srikanth, Pradeep SAHU, Anu V RANADE, Maryann M BUKILO, Joseph Sushil RAO, Lucas Faria ABRAHAO-MACHADO, Samarika DAHAL, Hari KUMAR, Dhananjaya KV. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J.* [online]. 2020, 96(1142), 753-758 [cit. 2022-06-25]. Dostupné z: DOI: [10.1136/postgradmedj-2020-138234](https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138234)
- [4] RAI, Praveen, Ballamoole Krishna KUMAR, Vijaya Kumar DEEKSHIT, Indrani KARUNASAGAR a Iddyia KARUNASAGAR. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2021, **105**(2), 441-455 [cit. 2022-07-06]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-11061-5
- [5] KIRTIPAL, Nikhil, Shiv BHARADWAJ a Sang Gu KANG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2020, **85** [cit. 2022-05-29]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2020.104502
- [6] YÜCE, Meral, Elif FILIZTEKIN a Korin Gasia ÖZKAYA. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **172** [cit. 2022-07-06]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112752
- [7] VAŠUT, PharmDr. Karel, Ph.D., PharmDr. MVDr. Vilma VRANOVÁ, Ph.D. Koronavirus COVID-19 [online]. 2020, [cit. 2022-05-30]. Dostupné z: https://www.psychiatriepropraxi.cz/incpdfs/inf-990000-8900_10_076.pdf
- [8] BENEŠ, Jiří. NOVÁKOVÁ, Dana. Intervenční a akutní kardiologie 2021. Patogeneze covid-19: principy virové infekce a imunitní odpovědi [online]. 2021, 20(2), 73-77 [cit. 2022-07-04]. Dostupné z: <https://www.iakardiologie.cz/pdfs/kar/2021/02/03.pdf>
- [9] KONEČNÝ, Jan. Covid-19: Nejčastější příznaky a jak poznat, jestli ho máte [online]. 2021, [cit. 2022-05-22]. Dostupné z: <https://www.nanospace.cz/blog/covid-priznaky/>
- [10] JIMENO-ALMAZÁN, Amaya, Jesús G. PALLARÉS, Ángel BUENDÍA-ROMERO, Alejandro MARTÍNEZ-CAVA, Francisco FRANCO-LÓPEZ, Bernardino J. SÁNCHEZ-ALCARAZ MARTÍNEZ, Enrique BERNAL-MOREL a Javier COUREL-IBÁÑEZ. Post-COVID-19 Syndrome and the Potential Benefits of Exercise. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2021, **18**(10) [cit. 2022-06-21]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18105329
- [11] CAROD ARTAL, Francisco Javier. Síndrome post-COVID-19: epidemiología, criterios diagnósticos y mecanismos patogénicos implicados. *Revista de Neurología* [online]. 2021, **72**(11) [cit. 2022-06-21]. ISSN 0210-0010. Dostupné z: doi:10.33588/rn.7211.2021230

- [12] YÜCE, Meral, Elif FILIZTEKIN a Korin Gasia ÖZKAYA. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **172** [cit. 2022-06-22]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112752
- [13] LOW, Jenny a Sumana SANYAL. How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts — what we know so far. *Emerging Topics in Life Sciences* [online]. 2020, **4**(4), 383-390 [cit. 2022-06-22]. ISSN 2397-8554. Dostupné z: doi:10.1042/ETLS20200165
- [14] YANG, Haitao a Zihao RAO. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(11), 685-700 [cit. 2022-06-22]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-021-00630-8
- [15] KAŠÍK, Petr. Povrchové proteiny SARS-CoV-2 představují možné terapeutické cíle. Vědci postupně odhalují jejich strukturu [online]. 2020, [cit. 2022-06-02]. Dostupné z: <https://www.czechsight.cz/povrchove-proteiny-sars-cov-2-predstavuji/>
- [16] LOUD, Jennifer T. a Jeanne MURPHY. Cancer Screening and Early Detection in the 21st Century. *Seminars in Oncology Nursing* [online]. 2017, **33**(2), 121-128 [cit. 2022-06-22]. ISSN 07492081. Dostupné z: doi:10.1016/j.soncn.2017.02.002
- [17] BAKHIET, Moiz a Sebastien TAURIN. SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2021, **58**, 16-29 [cit. 2022-06-22]. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2020.11.001
- [18] https://www.researchgate.net/figure/SARS-CoV-2-genome-replication-pathway-and-life-cycle-in-the-host-cell-created-with_fig4_354436480
- [19] RAMPERSAD, Sephra a Paula TENNANT. Replication and Expression Strategies of Viruses. *Viruses* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 55-82 [cit. 2022-06-22]. ISBN 9780128112571. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6
- [20] FEHR, Anthony R. a Stanley PERLMAN. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: MAIER, Helena Jane, Erica BICKERTON a Paul BRITTON, ed. *Coronaviruses* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015-2-12, s. 1-23 [cit. 2022-07-06]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-2437-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- [21] RAVI, Neeraja, Dana L. CORTADE, Elaine NG a Shan X. WANG. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, **165** [cit. 2022-06-22]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112454
- [22] SOMBORAC BAČURA, Anita, Marija DROTIĆ, Leonarda GROŠIĆ, Monika DŽIMBEG a Slavica DODIG. Current status of the lateral flow immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. *Biochimica medica* [online]. 2021, **31**(2), 230-239 [cit. 2022-06-22]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2021.020601
- [23] DrSc. RACEK, Prof. MUDr. Jaroslav. Co to je screening [online]. 2016, [cit. 2022-05-27]. Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/screening-pojem-a-jeho-vyznam.html>
- [24] JIANG, Wei, Yingchun LIU, Yongjun CHEN, et al. A novel dynamic flow immunochromatographic test (DFICT) using gold nanoparticles for the serological detection of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2015, **72**, 133-139 [cit. 2022-06-23]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.04.035

- [25] SAJID, Muhammad, Abdel-Nasser KAWDE a Muhammad DAUD. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* [online]. 2015, **19**(6), 689-705 [cit. 2022-06-23]. ISSN 13196103. Dostupné z: doi:10.1016/j.jscs.2014.09.001
- [26] LAI, Christopher K C a Wilson LAM. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2021, **538**, 226-230 [cit. 2022-06-24]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.069
- [27] SOMBORAC BAČURA, Anita, Marija DOROTIĆ, Leonarda GROŠIĆ, Monika DŽIMBEG a Slavica DODIG. Current status of the lateral flow immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. *Biochemia medica* [online]. 2021, **31**(2), 230-239 [cit. 2022-06-23]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2021.020601
- [28] YAN, Ying, Le CHANG a Lunan WANG. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* [online]. 2020, **30**(3) [cit. 2022-06-24]. ISSN 1052-9276. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.2106
- [29] KONTOU, Panagiota I., Georgia G. BRALIOU, Niki L. DIMOU, Georgios NIKOLOPOULOS a Pantelis G. BAGOS. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. *Diagnostics* [online]. 2020, **10**(5) [cit. 2022-06-25]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10050319
- [30] LI, Zhengtu, Yongxiang YI, Xiaomei LUO, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology* [online]. 2020, **92**(9), 1518-1524 [cit. 2022-06-25]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.25727
- [31] THANCHOMNANG, Tongjit, Lakkhana SADAOW, Oranuch SANPOOL, et al. Development of an immunochromatographic point-of-care test for detection of IgG antibody in serodiagnosis of human trichinellosis. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2021, **111**, 148-153 [cit. 2022-06-25]. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2021.08.056
- [32] ONG, David S.Y., Paraskevi C. FRAGKOU, Valentijn A. SCHWEITZER, Roy F. CHEMALY, Charalampos D. MOSCHOPOULOS a Chrysanthi SKEVAKI. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2021, **27**(7), 981-986 [cit. 2022-06-25]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2021.05.001
- [33] YÜCE, Meral, Elif FILIZTEKIN a Korin Gasia ÖZKAYA. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **172** [cit. 2022-07-01]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112752
- [34] MBOUMBA BOUASSA, Ralph-Sydney, David VEYER, Hélène PÉRÉ a Laurent BÉLEC. Analytical performances of the point-of-care SIENNA™ COVID-19 Antigen Rapid Test for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in nasopharyngeal swabs: A prospective evaluation during the COVID-19 second wave in France. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2021, **106**, 8-12 [cit. 2022-07-01]. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2021.03.051
- [35] SCOHY, Anaïs, Ahalieyah ANANTHARAJAH, Monique BODÉUS, Benoît KABAMBA-MUKADI, Alexia VERROKEN a Hector RODRIGUEZ-VILLALOBOS. Low

- performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2020, **129** [cit. 2022-07-06]. ISSN 13866532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2020.104455
- [36] CHO, Il-Hoon, Arun BHUNIA a Joseph IRUDAYARAJ. Rapid pathogen detection by lateral-flow immunochromatographic assay with gold nanoparticle-assisted enzyme signal amplification. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **206**, 60-66 [cit. 2022-07-06]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.032
- [37] Online Lékárna U Sv. Mikuláše Brankovice, DIAGNOSTICKÉ TESTY [online]. 2022, [cit. 2022-06-11]. Dostupné z: <https://www.lekarna-brankovice.cz/Nove-produkty/test-COVID-19-Antigen-Rapid-Test-Cassette-Saliva-20-ks.html>
- [38] PAULINI, Inarei, Joselma SIQUEIRA-SILVA, Luciana THOMAZ, Leticia ROCHA, Charlotte HARSI, Nancy BELLEI a Celso GRANATO. Development of a prototype immunochromatographic test for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2017, **21**(5), 500-506 [cit. 2022-07-01]. ISSN 14138670. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjid.2017.03.023
- [39] SAKAMOTO, Seiichi, Nao KIKKAWA, Toshitaka KOHNO, Kuniyoshi SHIMIZU, Hiroyuki TANAKA a Satoshi MORIMOTO. Immunochromatographic strip assay for detection of bioactive Ganoderma triterpenoid, ganoderic acid A in Ganoderma lingzhi. *Fitoterapia* [online]. 2016, **114**, 51-55 [cit. 2022-07-01]. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2016.08.016
- [40] LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (63) [cit. 2022-07-03]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/3998
- [41] RAVI, Neeraja, Dana L. CORTADE, Elaine NG a Shan X. WANG. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, **165** [cit. 2022-07-03]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112454
- [42] GUPTA, Nalini. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology* [online]. 2019, **36**(2) [cit. 2022-07-03]. ISSN 0970-9371. Dostupné z: doi:10.4103/JOC.JOC_110_18
- [43] LabGuide, Izolace genomové DNA [online], 2014, [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-a-purifikace-nukleovych-kyselin/izolace-genomove-dna/>
- [44] VOMELOVÁ, I, Z VANÍCKOVÁ, A SEDO. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biol (Praha)* [online]. 2009, **55**(6), 243-51 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20163774/>
- [45] SHI, Rui, Ramsey S. LEWIS, Dilip R. PANTHEE a Maxim ANTOPOLSKY. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(12) [cit. 2022-07-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0203011
- [46] YANG, Fan, Guoping WANG, Wenxing XU a Ni HONG. A rapid silica spin column-based method of RNA extraction from fruit trees for RT-PCR detection of viruses. *Journal of Virological Methods* [online]. 2017, **247**, 61-67 [cit. 2022-07-06]. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2017.05.020

- [47] HE, Hui, Rongqun LI, Yi CHEN, Ping PAN, Wenjuan TONG, Xueyan DONG, Yueming CHEN a Daojun YU. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2022-06-22]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep45199
- [48] BIO-RAD, Chelex 100 Pryskyřice pro přípravu virové RNA pro detekci COVID-19 [online], 2022, [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/feature/Chelex-100-Resin-for-Viral-RNA-Preparation-for-COVID-19-Detection.html>
- [49] Polymerase Chain Reaction (PCR). National Center for Biotechnology Information [Online]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- [50] BUSTIN, S A, V BENES, T NOLAN a M W PFAFFL. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* [online]. 2005, **34**(3), 597-601 [cit. 2022-06-22]. ISSN 0952-5041. Dostupné z: doi:10.1677/jme.1.01755
- [51] KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. L. NAGPAL, Madan, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALŤĂ a Shymaa ENANY, ed. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-2-12 [cit. 2022-07-03]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
- [52] DIAGNOSTICS ROCHE, Co je PCR [online], 2021, [cit. 2022-06-07]. Dostupné z: <https://diagnostics.roche.com/cz/cs/article-listing/what-is-pcr.html>
- [53] PCR Optimization: Reaction Conditions and Components. Applied Biosystems. 2017. Available from: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042520.pdf
- [54] GINZINGER, David G. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology* [online]. 2002, **30**(6), 503-512 [cit. 2022-07-03]. ISSN 0301472X. Dostupné z: doi:10.1016/S0301-472X(02)00806-8
- [55] file:///C:/Users/aless/Downloads/[14796813%20-%20Journal%20of%20Molecular%20Endocrinology]%20Quantification%20of%20mRNA%20using%20real-time%20reverse%20transcription%20PCR%20(RT-PCR)_%20trends%20and%20problems.pdf
- [56] 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>
- [57] HEID, C A, J STEVENS, K J LIVAK a P M WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome Research* [online]. 1996, **6**(10), 986-994 [cit. 2022-07-06]. ISSN 1088-9051. Dostupné z: doi:10.1101/gr.6.10.986
- [58] LABORATORY TEST, COVID-19-RT-PCR [online], 2022, [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://laboratorytests.org/covid-19-rt-pcr/covid-19-rt-pcr-2/>
- [59] STITES, Edward C. a Craig B. WILEN. The Interpretation of SARS-CoV-2 Diagnostic Tests. *Med* [online]. 2020, **1**(1), 78-89 [cit. 2022-07-04]. ISSN 26666340. Dostupné z: doi:10.1016/j.medj.2020.08.001

- [60] TANG, Yi-Wei, Jonathan E. SCHMITZ, David H. PERSING, Charles W. STRATTON a Alexander J. MCADAM. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2020, **58**(6), e00512-20 [cit. 2022-07-06]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00512-20
- [61] MILLER, Tyler E., Wilfredo F. GARCIA BELTRAN, Adam Z. BARD, et al. Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. *The FASEB Journal* [online]. 2020, **34**(10), 13877-13884 [cit. 2022-07-04]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.202001700RR
- [62] SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da a Lindomar J. PENA. A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostics tests. *Journal of Medical Virology* [online]. 2021, **93**(2), 717-718 [cit. 2022-07-04]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.26531
- [63] ASAI, Takashi. COVID-19: accurate interpretation of diagnostic tests—a statistical point of view. *Journal of Anesthesia* [online]. 2021, **35**(3), 328-332 [cit. 2022-07-04]. ISSN 0913-8668. Dostupné z: doi:10.1007/s00540-020-02875-8
- [64] TEO, Shyh Poh. Interpretation of Antigen-detection Rapid Diagnostic Tests (Ag-RDTs) Should Take into Account the Pre-test Probability of COVID-19 Infection. *Oman Medical Journal* [online]. 2022, **37**(3), e390-e390 [cit. 2022-07-04]. ISSN 1999768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2022.58
- [65] BENEŠ, Jiří. NOVÁKOVÁ, Dana. Intervenční a akutní kardiologie 2021. Patogeneze covid-19: principy virové infekce a imunitní odpovědi [online]. 2021, 20(2), 73-77 [cit. 2022-07-04]. Dostupné z: <https://www.iakardiologie.cz/pdfs/kar/2021/02/03.pdf>
- [66] ALSHARIF, W. a A. QURASHI. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography* [online]. 2021, **27**(2), 682-687 [cit. 2022-07-11]. ISSN 10788174. Dostupné z: doi:10.1016/j.radi.2020.09.010
- [67] HONG, Ki Ho, Sang Won LEE, Taek Soo KIM, et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 2020, **40**(5), 351-360 [cit. 2022-07-12]. ISSN 2234-3806. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2020.40.5.351
- [68] LIU, Guoqiang a James F. RUSLING. COVID-19 Antibody Tests and Their Limitations. *ACS Sensors* [online]. 2021, **6**(3), 593-612 [cit. 2022-07-12]. ISSN 2379-3694. Dostupné z: doi:10.1021/acssensors.0c02621