

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Molekulárně-biologické vlastnosti nového koronaviru SARS-CoV-2
Bakalářská práce

2024

Veronika Št'ástková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Štástková**
Osobní číslo: **C18289**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Molekulárně-biologické vlastnosti nového koronaviru SARS-CoV-2**
Téma práce anglicky: **Molecular-biological Properties of the New Coronavirus SARS-CoV-2**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se novým typem koronaviru SARS-CoV-2. V úvodní části se zaměřte obecně na koronaviry, zmiňte jejich základní charakteristiky, taxonomické členění a onemocnění, které způsobují.
2. Dále popište nový koronavirus SARS-CoV-2, především jeho molekulárně-biologické vlastnosti (informace o genomu a strukturních proteinech) a mechanismus nakažení. Diskutujte také na základě dostupných informací problematiku jeho původu.
3. Nakonec uveďte přehled popsanych mutací nového koronaviru SARS-CoV-2 a jejich význam.
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: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Lucie Michalcová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Molekulárně-biologické vlastnosti nového koronaviru SARS-CoV-2 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 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

Veronika Šťátková v.r.

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych tímto poděkovala Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D. a RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivost během psaní mé bakalářské práce.

ANOTACE

Práce je zaměřena na molekulární vlastnosti viru SARS-CoV-2, který se v lidské populaci objevil na konci roku 2019. Jedná se o virus, u něhož proběhlo mnoho mutací, některé z klinicky významných jsou zde zmíněny. Bližší popis je věnován genomu, strukturním a nestrukturním proteinům, včetně jejich funkce při infikování hostitelské buňky. Dále jsou v práci diskutovány možnosti původu viru. Poslední část je věnována onemocnění covid-19, jeho klinickému obrazu, možnostem diagnostiky a terapie.

KLÍČOVÁ SLOVA

koronavirus, virový genom, strukturní proteiny, SARS-CoV-2, covid-19

TITLE

Molecular-biological properties of the new coronavirus SARS-CoV-2

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on the molecular properties of the SARS-CoV-2 virus, which appeared in the human population in the end of 2019. It is a virus that has undergone many mutations, some of which are clinically significant are mentioned here. A closer description is devoted to the genome, structural and non-structural proteins, including their functions in infecting host cells. The work also describes the possible origins of the virus. The last part is dedicated to the disease covid-19, its clinical picture, diagnosis and therapy options.

KEYWORDS

coronavirus, virus genome, structural proteins, SARS-CoV-2, covid-19

OBSAH

ÚVOD.....	12
1 RNA VIRY	13
2 KORONAVIRY	16
3 NOVÝ KORONAVIRUS SARS-COV-2.....	18
3.1 STRUKTURA – GENOM, STRUKTURNÍ PROTEINY.....	18
3.2 MUTACE	22
3.3 PŮVOD VIRU.....	25
3.3.1 Přirozený původ.....	25
3.3.2 Umělý původ	27
3.4 NAPADENÍ BUŇKY.....	28
3.5 ONEMOCNĚNÍ COVID-19.....	31
3.5.1 Diagnostika	33
3.5.2 Terapie	36
3.5.3 Prevence.....	39
4 ZÁVĚR.....	42
5 POUŽITÁ LITERATURA	43

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Schéma obaleného a neobaleného viru	13
Obrázek 2: Koronavirus SARS-CoV-2 – schéma a základní části genomu	18
Obrázek 3: Uzavřená a otevřená forma S proteinu	19
Obrázek 4: Membránová fúze	29
Obrázek 5: Schéma rychlých diagnostických testů (RTD)	35
Obrázek 6: Schéma neutralizačního testu	36
Tabulka 1: Klinicky významné mutace SARS-CoV-2	24

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE2	angiotensin konvertující enzym 2
CD147	glykovaný transmembránový protein
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CNGBdb	Čínská národní genová databáze
Covid-19	koronavirové onemocnění 2019
CPE	cytopatický efekt
CT	cytoplazmatický konec
CTD1/CTD2	C-terminální domény 1 a 2
ddPCR	digitální kapková polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymová imunosorpční analýza
ERGIC	intermediární kompartment endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu
FP	fúzní peptid
FPPR	proximální oblast fúzního peptidu
GISAID	Globální iniciativa pro sdílení všech údajů o chřipce
GRP78	protein regulující glukózu 78
HE	hemaglutinin-esteráza
HS	heparin sulfát
HSPA5	protein tepelného šoku A5
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LFA	laterálně průtokový test
mGluR2	metabotropní glutamátový receptor subtypu 2
MIS-C	multisystémový zánětlivý syndrom u dětí a mladistvých
MERS	blízkovýchodní respirační syndrom
NRP1	neuropilin-1
nsp	gen kódující nestrukturní protein
NTD	N-terminální doména
RAAS	system renin-angiotensin-aldosteron

RBD	receptor vazebná doména
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RDT	rychlé diagnostické testy
RNA	ribonukleová kyselina
RNP	helikální ribonukleoproteinový komplex
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SARS	akutní respirační syndrom
SARS-CoV-2	koronavirus související s akutním respiračním syndromem
TLR4	Toll-like receptor 4
TM	transmembránový segment
TMD	transmembránová hydrofobní doména
TMPRSS2	serinová proteáza typu 2
UNICEF	Dětský fond organizace spojených národů
VOC	varianty způsobující obavy
VOI	varianty způsobující zájem
WHO	Světová zdravotnická organizace
WIV	Virologický institut ve Wuchanu

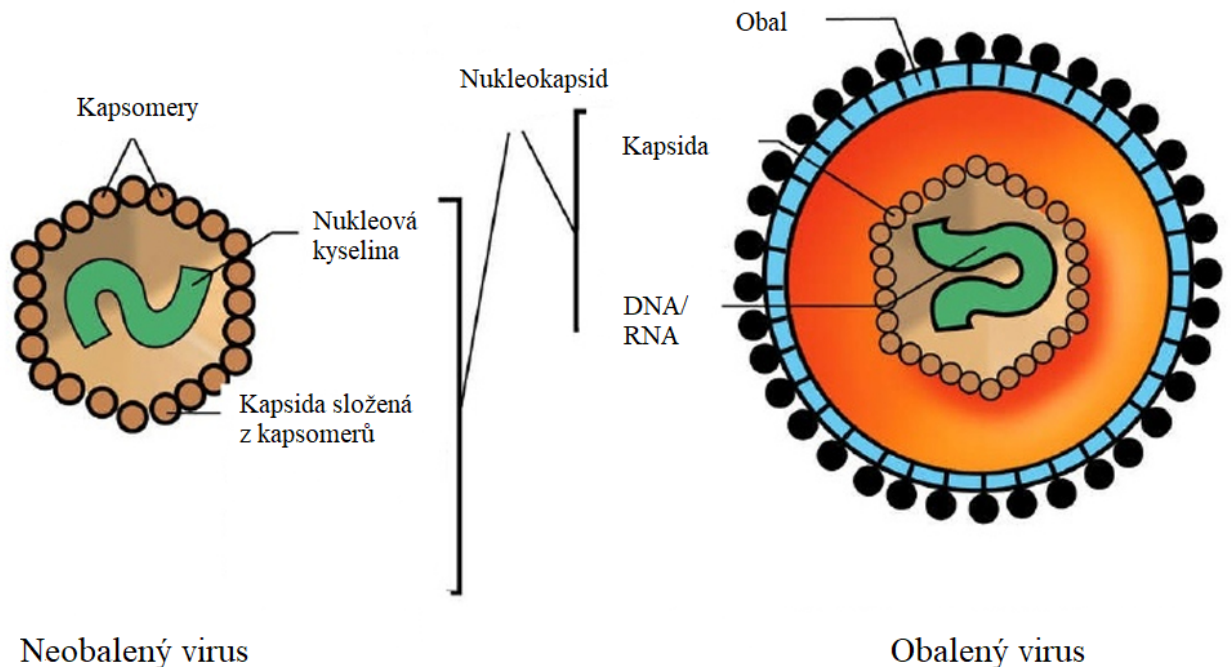
Úvod

SARS-CoV-2, z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, je novým virem ze skupiny koronavirů. Jedná se o RNA virus, který způsobuje onemocnění covid-19. Koronaviry představují skupinu obalených RNA virů s typem RNA ss (+), u člověka způsobujících několik typů převážně respiračních onemocnění – SARS, MERS, ale i běžné záněty horních cest dýchacích. První závažné onemocnění koronavirového původu se objevilo v roce 2002 v Číně a jednalo se o SARS (akutní respirační syndrom, z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome). O deset let později se v Saúdské Arábii objevilo onemocnění MERS (blízkovýchodní respirační syndrom, z angl. Middle East Respiratory Syndrome). Na přelomu roku 2019 a 2020 se pak objevil nový typ koronaviru SARS-CoV-2. K jeho šíření došlo v průběhu roku 2020, prvním ohniskem bylo město Wu-Chan v Číně, odkud se virus během několika týdnů rozšířil do více než 70 zemí světa. Na základě toho bylo jeho rozšíření k 11. březnu 2020 označeno Světovou zdravotnickou organizací (WHO) za pandemii [1].

Hlavním cílem této bakalářské práce je popsat molekulárně-biologické vlastnosti viru SARS-CoV-2. Práce je zaměřena jednak na strukturu (genom a strukturní proteiny) viru, jednak na onemocnění covid-19, jehož je virus původcem a také na problematiku jeho původu. Rovněž jsou zde uvedeny mutace nového koronaviru SAR-CoV-2 a jejich klinický význam.

1 RNA viry

Viry představují skupinu nebuněčných obligátních intracelulárních parazitů. Společným znakem virů je jejich malá velikost, přičemž ty největší dosahují velikosti kolem 300 nm. Jejich genetická informace se skládá z DNA nebo RNA a genom může být jednovláknový nebo dvouvláknový. Podle struktury je možné viry rozdělit na obalené a neobalené (Obr. 1). Neobalené viry, někdy též nazývány jako nahé, jsou tvořeny pouze danou nukleovou kyselinou a kapsidou. Kapsida (z lat. capsula = krabice) je silná a mírně pružná proteinová vrstva, která chrání virový genom před vnějšími vlivy. Její tvar je buď ikosaedrální (dvacetistěn), nebo helikální (šroubovice). Obalené viry mají navíc na svém povrchu lipidový obal. Tento obal je odvozen z některé z buněčných membrán, nejčastěji z plazmatické membrány, případně z endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu nebo jaderné membrány. Obal je s kapsidou spojen tzv. matricovými proteiny. K vytvoření nových virových částic je nutné vnitřní prostředí hostitelské buňky, po uvolnění těchto částic do okolí může virus infikovat další buňky. RNA viry se dále dělí na viry s pozitivním vláknem a viry s negativním vláknem [2].



Obrázek 1: Schéma obaleného a neobaleného viru, upraveno dle [3]

RNA viry jsou pravděpodobně schopné infikovat všechny buněčné organismy a jsou všudypřítomné. Souvislostí mezi viry a chorobami se vědci začali zabývat na přelomu 19. a 20. století. Mezi prvními zkoumanými viry byl například virus tabákové mozaiky, virus vezikulární stomatitidy, virus slintavky a virus kulhavky. RNA viry mají velice široké spektrum hostitelů. U ptáků a savců je možné pozorovat infekční choroby podobné jako u lidské populace. Zvířata jsou pro viry přirozenými rezervoáry a mezidruhovým křížením dochází k přenosu na člověka. U lidí způsobuje tato skupina parazitů širokou škálu onemocnění, od mírných respiračních infekcí až po život ohrožující hemoragické horečky [4, 5].

V současné době je zaznamenáno 180 druhů RNA virů, které infikují lidi. Těchto 180 druhů zahrnuje 50 rodů a 17 čeledí, 160 z nich je považováno za zoonické. Nové druhy jsou však neustále objevovány. Patogeny lze kategorizovat do pyramidy se čtyřmi úrovněmi. První úroveň je vystavení se patogenu. Lidská populace je vystavována stovkám až tisícům druhů, ne všechny jsou ale schopny člověka infikovat. Virus se do těla může dostat například prostřednictvím požití, vdechnutí nebo kousnutí vektorem. Hlavní faktory míry vystavení se novým patogenům jsou ekologie, lidské chování a rezervoáry viru. Druhou úrovní pyramidy je schopnost viru vstoupit a replikovat se v lidských buňkách *in vivo*, tedy způsobit infekci. Ne všechny infekce způsobují klinické symptomy. Klíčovými determinanty jsou cesta vstupu a molekulární biologie interakce mezi člověkem a virem. Ze 180 RNA virů, které mohou infikovat člověka je téměř 60 % omezeno na druhou úroveň. Viry na této úrovni jsou například Australský netopýří lyssavirus, virus Bornovy choroby, virus encefalomyokarditidy, duvenhage virus a virus vezikulární stomatitidy (Indiana vesiculovirus). Třetí úroveň představuje schopnost patogenu infikovat člověka a následně se přenášet v populaci. Jen méně, než polovina RNA virů je schopna přenosu z člověka na člověka (26 druhů je omezeno na třetí úroveň). Reprodukční číslo R_0 zde nedosahuje hodnoty 1. R_0 je definováno jako počet sekundárních případů generovaných jedním primárním případem zavlečeným do velké populace, je funkcí chování a demografie lidské populace. Příkladem třetí úrovně je virus Crimean-Congo hemoragické horečky, virus vztekliny, Zairský virus eboly, virus Zika a virus horečky Lasa. Čtvrté úrovně dosahují viry, které jsou schopné způsobit epidemii nebo se stát endemickým lidským patogenem. Reprodukční číslo R_0 je vyšší než 1. Tyto podmínky splňují například viry hepatitidy A, C a E, virus HKU1, NL63, HIV1 a HIV2, virus chřipky A až C, virus spalniček, příušnic a žluté zimnice [6].

Většina známých savčích RNA virů je schopna infikovat i další druhy. Druhá bariéra bývá často spíše kvantitativní než kvalitativní. Například 50% smrtelná dávka viru vztekliny od lišek byla u lišek až milionkrát nižší než u koček a psů. Dalším příkladem jsou lidské viry

chřipky A, které se sice mohou replikovat u šimpanzů, ale replikace probíhá mnohem nižší rychlostí. Klíčovou roli při cestě přenosu mají tkáňové tropismy, přičemž změna tkáňového tropismu je pro virus těžší než změna hostitelského druhu. Důležitá je také přenosová cesta viru [6].

2 Koronaviry

Koronaviry představují bohatou skupinu virů napadajících zvířecí i lidský organismus. Byly zařazeny do řádu *Nidovirales*, tvoří vlastní čeleď *Coronaviridae* a ta obsahuje několik podčeledí. Velký význam má podčeleď *Orthocoronavirinae*, do níž spadají čtyři rody: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* a *Deltacoronavirus* (dřívější označení: rody I, II a III). Rody alfa a beta ohrožují primárně savce, včetně lidí. Onemocnění způsobená rody gama a delta se objevují u ptactva. Do těchto rodů jsou koronaviry řazeny podle svých genomů a proteinových sekvencí [7].

Koronaviry byly poprvé izolovány z embryonálních vajec v první polovině 20. století, poté, co v USA onemocnělo velké množství kuřat infekční bronchitidou. O několik let později byly tyto viry objeveny i v lidské populaci, k jejich identifikaci došlo ve Spojeném království a USA. V Anglii roku 1960 byl chlapec, kterého lékaři léčili s běžným nachlazením, odebrán vzorek B814. Ten byl třikrát sériově pasážován v kultuře lidských tracheálních orgánů a stále byl schopen způsobit nachlazení při jeho naočkování dobrovolníkům. V Chicagu roku 1962 byly odebrány vzorky pěti studentům medicíny s běžným nachlazením. Po adaptaci na kultury WI-38 bylo možné pozorovat, že se u viru projevil cytopatický efekt (CPE). Odebraná séra studentů vykazovala až čtyřnásobný nárůst titru neutralizačních protilátek proti kmenu 229E. Kmen HCoV-229E se sérologicky lišil od jakýchkoli dosud známých ortho- a paramyxovirů, obsahoval RNA, byl etherově labilní a jeho průměr dosahoval 89 nm. Později bylo vědci nalezeno několik dalších virů, které nerostly na buněčných kulturách ale pouze na orgánových, a byly též etherově labilní. V elektronovém mikroskopu se ukázalo, že kmeny B814 a 229E mají podobnou strukturu a v infikovaných buňkách dochází k jejich pučení do cytoplazmatických váčků. McIntosh a kol. popsali úspěšnou adaptaci izolátů OC38 a OC43 do mozku laboratorní myši. Infikované mozkové preparáty přímo specificky aglutinují erythrocyty získané z kuřat, krys a myši [8].

Koronaviry mohou napadat několik orgánových soustav – dýchací, trávicí, nervovou. Většina způsobuje onemocnění zvířat, například infekční bronchitidu drůbeže, enteritidu krůt, peritonitidu koček nebo encefalomyelitidu selat. Obecně lze říct, že koronaviry mají úzké hostitelské spektrum. U člověka může způsobovat onemocnění sedm typů koronavirů. Všechny koronaviry, které napadají člověka mají zoonický původ a k přenosu na člověka je zpravidla nutný mezipřenositel, jedná se o tyto typy [7]:

- HCoV-229E (alpha),
- HCoV-NL63 (alpha),

- HCoV-OC43 (beta),
- HCoV-HKU1 (beta),
- MERS-CoV (beta),
- SARS-CoV (beta),
- SARS-CoV-2 (beta).

Alfakoronaviry HCoV-229E, HCoV-NL63 a betakoronaviry HCoV-OC43, HCoV-HKU1 způsobují běžná nachlazení a záněty nosohltanu, případně dolních cest dýchacích. Onemocnění mají ve většině případů mírný průběh, k závažnému průběhu může dojít u malých dětí a starých osob [7].

Ostatní tři představují větší riziko. Jedná se o zvířecí koronaviry přenesené na člověka, které v minulosti způsobily několik závažných epidemií. První významné onemocnění bylo pojmenováno jako SARS, s epidemií se svět potýkal v období roků 2002 až 2003, původcem byl koronavirus SARS-CoV (rod: *Betacoronavirus*, podrod: *Sarbecovirus*). Jako místo počátku epidemie byla označena čínská provincie Kuang-tung. Mezi nejvíce postižené státy se zařadily Čína, Singapur a Kanada. Virus SARS-CoV se vyznačoval 9% úmrtností. Epidemie trvala osm měsíců, ojedinělé případy se však objevovaly v různých zemích až do roku 2004 [9].

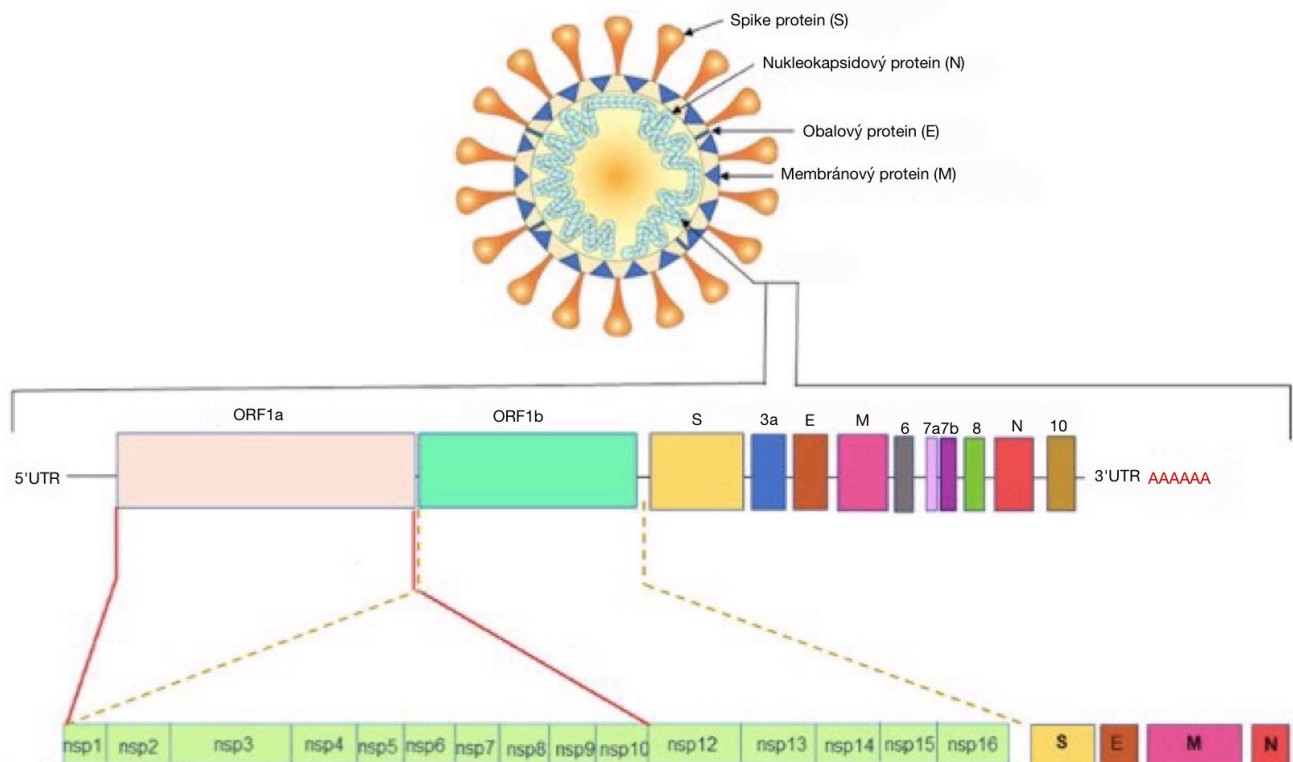
V roce 2012 epidemií způsobilo onemocnění MERS, jehož původcem byl koronavirus MERS-CoV (rod: *Betacoronavirus*, podrod: *Merbecovirus*). Zde byla úmrtnost stanovena 34 %. Ohniskem onemocnění byla Saúdská Arábie, kde došlo ke kontaktu mezi člověkem a infikovaným velbloudem. V dalších několika letech se jedinci postižení virem MERS-CoV objevili v Koreji a na Středním východě. Nejaktuálnějším onemocněním je covid-19 způsobený virem SARS-CoV-2, který je geneticky podobný tomu, který se objevil již v roce 2002 [9].

Skupina koronavirů dostala název podle svého vzhledu v elektronovém mikroskopu. Jedná se o obalené viry kulovitěho tvaru, jejichž obal obsahuje proteiny, které tvoří výběžky o velikosti přibližně 20 nm a připomínají vzhled slunečné koróny. Betakoronaviry linie A mají navíc na svém povrchu homodimerní glykoprotein hemagglutinin-esterázy (HE) o velikosti 5 až 7 nm. Obal zde chrání kapsidu, jež má spirální symetrii. Pod vrstvou kapsomer se nachází viriony o velikosti 80–220 nm. Koronaviry jsou čeledí s největším genomem ze všech RNA virů. Ten tvoří jedna molekula lineární jednovláknové RNA s pozitivní polaritou a dosahuje velikosti 27–32 kb, genom není segmentovaný. Mezi příbuznými koronaviry můžeme často pozorovat genetické rekombinace v jejich genomech. Viriony jsou citlivé na teplo, lipidová rozpouštědla, neiontové detergenty, formaldehyd, oxidační činidla a UV záření [8, 10].

3 Nový koronavirus SARS-CoV-2

3.1 Struktura – genom, strukturní proteiny

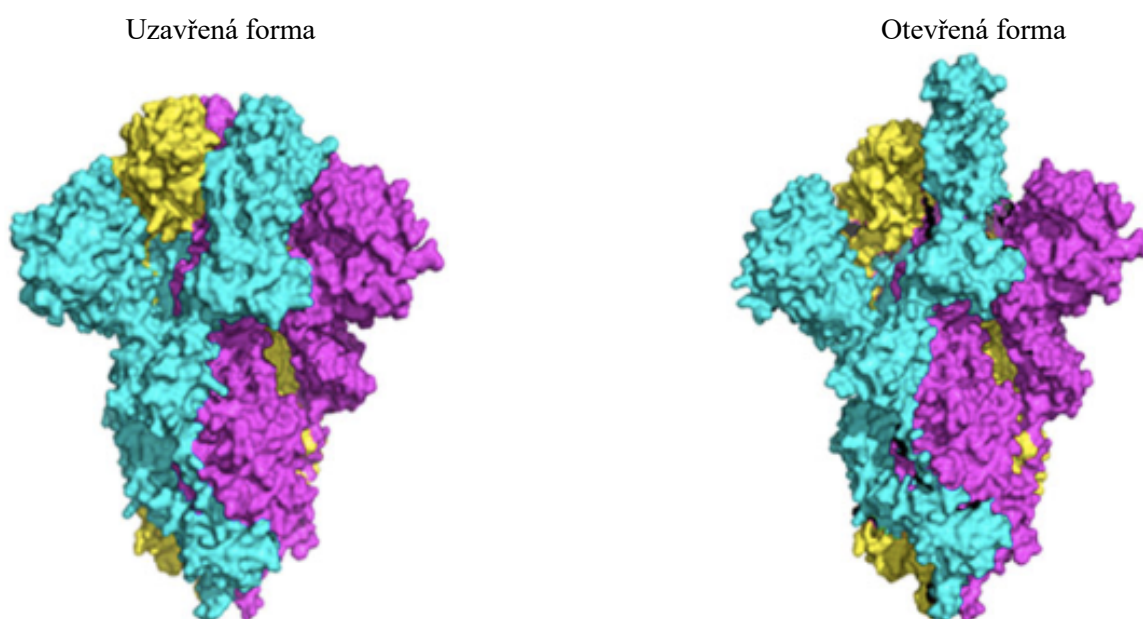
Koronavirus SARS-CoV-2 je nesegmentovaný obalený kulovitý virus, který má průměr 50–200 nm. Na povrchu viru je dvouvrstvý lipidový obal. Genom je tvořen jedním pozitivním vláknem RNA, které obsahuje přibližně 29 903 nukleotidů. Základní části genomu jsou: 5'oblast (UTR), replikační komplex (ORF1a a ORF1b), spike glykoprotein (S), obalový protein (E), membránový protein (M), nukleokapsidový protein (N), 3'UTR, několik neidentifikovaných strukturních ORF a poly (A) konec (Obr. 2). Proteiny S, E, M a N představují tzv. strukturní proteiny, nachází se v obalové části a jsou kódovány čtyřmi ORF, které jsou umístěny za ORF1b. ORF1b je jeden z otevřených čtecích rámců, genom jich obsahuje 14 a jejich úkolem je kódování celkem 27 různých proteinů. V 5'UTR oblasti se nachází nejen gen ORF1b, ale i gen ORF1a, který kóduje polyprotein pp1ab, jenž obsahuje 16 nsp. Polyprotein pp1ab podléhá autoproteolytickému štěpení za vzniku virového replikačního komplexu. V oblasti 3'UTR se nachází čtyři strukturální geny a osm genů doplňkových. Doplňkové geny se liší u různých kmenů koronavirů [11].



Obrázek 2: Koronavirus SARS-CoV-2 – schéma a základní části genomu, upraveno dle [7]

Každý ze strukturních proteinů má svou specifickou stavbu a funkci. Glykoprotein S (spike protein) má za úkol připojení viru ke specifickým buněčným receptorům, fúzi mezi obalem viru a plazmatickou membránou hostitelské buňky a je hlavním induktorem protilátek neutralizujících virus. Membránová fúze je podpořena rozsáhlými strukturálními přestavbami spike proteinu. Strukturně se jedná o trimer, jehož části jsou N-koncový signální peptid, receptor vázající fragment S1 a fúzní fragment S2. Jednotku S1 je možné dále rozčlenit na N-terminální doménu (NTD), receptor vazebnou doménu (RBD) a dvě C-terminální domény (CTD1 a CTD2). Hlavní funkcí jednotky S1 je vazba na receptor v hostitelské buňce. Fúzní fragment S2 představuje fúzní peptid (FP), proximální oblast fúzního peptidu (FPPR), repetici sedmičlenu 1 (HR1), centrální šroubovici (CH), konektorovou doménu (CD), repetici sedmičlenu 2 (HR2), transmembránový segment (TM) a cytoplazmatický konec (CT). Jednotka S2 má za úkol fúzi virové a hostitelské membrány. Před oblastí zapojenou do fúze mají koronaviry ještě oblast zvanou S2-prime, která je štěpena hostitelskou proteázou. Toto štěpení vede k aktivaci S2 jednotky a následné membránové fúzi. Spike protein obsahuje více než 1 200 aminokyselin [12].

U spike proteinu byly pozorovány dvě strukturní formy – otevřená a uzavřená (Obr. 3). U uzavřené formy nevyčnívají rozpoznávací domény z rozhraní, které je tvořeno třemi protomery S proteinu. Naopak u otevřené formy se nachází receptor vazebná doména v konformaci nahoře, tato forma má nezbytný význam pro fúzi viru s membránou hostitelské buňky [13].



Obrázek 3: Uzavřená a otevřená forma S proteinu, upraveno dle [13]

Obalový protein E je nejmenší ze všech jmenovaných strukturních proteinů. V infikovaných buňkách se většina E proteinů nachází v místech intracelulárního transportu proteinů – oblasti endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a ERGIC. Struktura E proteinu je tvořena 75 aminokyselinami a je možné ji rozčlenit na tři domény – krátká hydrofilní N-terminální doména, hydrofobní transmembránová doména (TMD) a dlouhá hydrofilní C-terminální doména. E protein se vyskytuje v pentamerní nebo monomerní formě. U SARS-CoV byla provedena jeho delece, což vedlo k výraznému snížení množství virionů. To potvrzuje jeho významnou roli v produkci zralých a kompletních virionů. E protein je viroporinem (viroporiny = proteiny schopné tvořit póry), protože může vytvářet iontové kanály, které jsou propustné pro draslík, sodík, vápník a hořčík. Jejich vytvořením dochází ke změnám v iontové homeostáze a elektrochemickém gradientu. Tyto změny poté vedou ke spuštění cytokinové bouře a ovlivňují životaschopnost hostitelské buňky [14].

Membránový protein M je převládající strukturální složkou, jedná se o glykoprotein typu III. Skládá se ze tří domén: krátká amino– koncová ektodoména (N hydrofilní), trojitá transmembránová doména, dlouhá karboxy– koncová vnitřní doména (cytoplazmatická). Struktura je tvořena 222 aminokyselinami, které jsou kódovány 669 nukleotidy. U SARS-CoV je membránový protein z více než 90 % identický (221 shodných aminokyselin). Téměř 60 % zbytků v molekule je neutrálních a nepolárních, takže je protein vysoce hydrofobní. Během infekce podporuje membránovou fúzi, váže se na spike protein a hostitelský povrchový receptor. U membránového proteinu byla zaznamenána nízká míra mutací [15, 16].

Nukleokapsidový protein N je vysoce bazický fosfoprotein. Kódující sekvence se skládá z 1260 nukleotidů, které kódují 418 aminokyselin. SARS-CoV obsahuje v N proteinu o tři aminokyseliny více. Jeho hlavní funkcí je ochrana virových ribonukleotidů a udržování stabilní RNA uvnitř viru. Kombinací s genomickou RNA vytváří kapsidu. Při replikaci a transkripci virového genomu se N protein váže na vedoucí RNA a je nepostradatelný pro udržení konformace. Dále může regulovat genové produkty, jako cyklin E a cyklin dependentní kinázu, které se exprimují během S fáze buněčného cyklu. Svou roli má při tvorbě helikálního ribonukleoproteinového komplexu (RNP). Nukleokapsidový protein je druhým nejvíce mutovaným proteinem u SARS-CoV-2 [16].

Dalším strukturním proteinem je hemaglutinin-esteráza (HE), která má souvislost s hemaglutinin-esterázovým fúzním proteinem chřipky typu C. Kromě strukturních proteinů se ve viru nachází dalších 16 proteinů nestrukturních. Prvních deset (nsp1 – nsp10) je kódováno v ORF1a, ORF1b kóduje všech 16 (nsp1 – nsp16). Jedná se většinou o enzymy nebo funkční proteiny, které mají svou úlohu při replikaci v hostitelské buňce [15].

Protein nsp1 je produkovaný N-terminální oblastí viru, skládá se z přibližně 180 aminokyselin a svou roli má v imunitním úniku a inhibici translace. Hlavním mechanismem je interakce s malou ribozomální jednotkou (40S) a NXF1 (nukleární exportní faktor hostitelské mRNA). Podjednotka 40S se váže na iniciační faktory, které skenují mRNA před syntézou proteinu, C-konec nsp1 se přímo váže na 40S během iniciační fáze translace. Reakcí mezi nsp1 a 40S dojde k blokadě cesty mRNA. NXF1 usnadňuje prostřednictvím jaderných pórů translokaci mRNA do cytoplazmy. Nsp3 je největší koronavirový více doménový protein. Jednotlivé domény jsou: hypervariabilní oblast, makrodoména, doména podobná ubikvitinu 1, doména podobná ubikvitinu 2, doména proteázy podobná papainu (pLpro), ektodoména a dvě transmembránové oblasti. Nsp3 se vyznačuje štěpící aktivitou a mechanismy pro usnadnění replikace viru. Nsp5 je tří doménová cysteinová proteáza. Dvě domény (I a II) na N-konci tvoří chymotrypsinový záhyb sestávající se z antiparalelních beta-barelů, alfa-helikální doména (III) se spojuje s II přes oblast dlouhé smyčky. Uplatnění má tento protein v imunitním úniku. Ve srovnání se SARS-CoV vykazuje nsp5 u SARS-CoV-2 vyšší inhibiční aktivitu na indukci IFN. Nsp6 se skládá z 290 aminokyselin, šesti transmembránových domén a dvou malých lumenálních domén. Protein se váže na nsp3 a nsp4, tím se podpoří tvorba dvoumembránových vezikul v hostitelských buňkách, což vede ke vzniku replikačně-transkripčních komplexů. Monomerní protein nsp7 obsahuje asi 80 aminokyselin. S nsp8 tvoří komplexy, které jsou buď v dimerní, nebo lineární/kubické tetramerní konformaci. Spolu s nsp8 se může vázat na nsp12, výsledný komplex stabilizuje polymerázovou doménu, což usnadňuje rozpoznání templátu a polymeraci nukleotidů. Nsp8 je také monomerní protein a obsahuje 198 aminokyselin. Nsp9 se vyskytuje jako dimer, tvoří jediné vazebné místo pro nukleovou kyselinu při virové replikaci. Úlohu má při syntéze virové RNA, jeho delecí může dojít ke snížení infekčnosti viru. Nsp10 se účastní virové replikace, jeho funkcí je zvyšovat aktivitu exoribonukleázy nsp14. Katalytickou aktivitou nezbytnou pro replikaci se vyznačuje nsp12, též známý jako virový RdRp. Nsp12 se skládá z 932 aminokyselin a ke své aktivitě vyžaduje kofaktory nsp7 a nsp8. Enzym nsp13 zprostředkovává hydrolýzu 5`gama-fosfátu nascentního transkriptu mRNA. Nsp16 je enzym zodpovědný za proces uzavírání mRNA při replikaci a bránění detekci imunitních senzorů během infekce [17].

3.2 Mutace

Genom viru SARS-CoV-2 má poměrně nízkou stabilitu, což zapříčiňuje jeho vysokou náchylnost k mutacím. Virus se tak může rychle vyvíjet, měnit svůj antigenní profil a tkáňový tropismus (zaměření k určité struktuře orgánu), ale i rozsah hostitelů. K těmto změnám dochází pomocí dvou polymerázových mechanismů – antigenního driftu a rekombinace. K antigennímu driftu dochází na základě špatné kontrolní aktivity u RNA-dependentní polymerázy, kdy v každém replikačním cyklu dochází k začleňování nesprávných nukleotidů, což způsobí akumulaci mutací ve virovém genomu. Tento mechanismus je příčinou progresivní adaptace povrchových proteinů na buněčné receptory nových živočišných druhů a často se vyskytuje u chřipkových virů. K rekombinaci dochází v případě, že se v hostiteli vyskytuje ještě další infekční agens. RNA polymeráza může přeskočit z RNA jednoho kmene na RNA kmene druhého, což vyvolá syntézu hybridní RNA, která bude obsahovat sekvence z obou virů. Rekombinace může být homologní nebo heterologní. K homologní rekombinaci dochází v případě infekce dvěma variantami stejného viru, k heterologní v případě koinfekce s jiným virem. Kmeny, které bývaly nepatogenní nebo byla jejich patogenita nízká mohou tímto způsobem svou patogenitu výrazně zvýšit u stejného druhu nebo se adaptovat na různé druhy šířící se v dalším novém hostiteli výjimečně rychle [15].

V průběhu epidemie SARS-CoV-2 se objevily různé mutace. Na začátku května 2021 bylo hlášeno více než 1,4 milionu sekvencí, z nichž 3 913 bylo hlavních reprezentativních variant, které byly zaznamenány do globální databáze GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data). Mutace se mohou vyskytovat v různých částech genomu, základní rozdělení u SARS-CoV-2 je na mutace v oblasti spike proteinu a NSP mutace. Ne všechny mutace mají význam, některé jsou však kritické. Varianty viru, které měly velký globální dopad jsou alfa, beta, gama a delta. Tyto varianty spadají do skupiny VOC (Variants of Concern), tzv. variant způsobujících obavy [18].

Kromě již zmíněné skupiny VOC, je nutné se zmínit i o skupině VOI (Variants of Interest). Do této skupiny je varianta zařazena, pokud její genetické změny ovlivní vlastnosti jako přenosnost, závažnost onemocnění, imunitní / diagnostický / terapeutický únik a způsobuje významný přenos v komunitě nebo mnohočetné seskupení ve více zemích s rostoucí relevantní prevalencí společně s rostoucím počtem případů v průběhu času. Skupina VOI zahrnuje varianty epsilon, zéta, éta, théta, ióta, kappa, lambda a mí. Pokud varianta spadá do VOI a splňuje ještě navíc změny, jako je zvýšení přenositelnosti, škodlivé změny v epidemiologii, zvýšení virulence, změna klinické prezentace onemocnění, snížení účinnosti veřejných

zdravotních a sociálních opatření nebo dostupné diagnostiky, vakcín a terapeutik, je poté zařazena do skupiny VOC [19].

Ke změnám v podobě mutací může dojít v různých částech proteinu. Pochopení jejich významu je možné prostřednictvím experimentálních studií, které odhalí souvislost mezi dotyčnou mutací a změnou ve virové biologii. Z konkrétních mutací v oblasti S proteinu je možné zmínit například D614G, jinak známou jako Asp614Gly. Poprvé byla detekována koncem ledna 2020 v Německu a Číně, později však došlo k jejímu rozšíření do zbytku světa. Touto změnou dochází u viru ke zvýšení transdukce v různých typech buněk zahrnující buňky plic, jater nebo tlustého střeva. Zároveň je virus odolnější vůči proteolytickému štěpení a je 4 – 9x nakažlivější. V Severní Americe byla objevena mutace V483A vzniklá nahrazením hydrofobního valinu hydrofobním alaninem. Kmen obsahující tuto mutaci vykazuje silnou rezistenci vůči používaným lékům. Ve variantách viru B.1.351 a B.1.1.28 vědci identifikovali mutaci E484K, s níž je spojena možná odolnost vůči vakcínám. Nahrazením asparaginu tyrosinem v RBD v pozici 501 vznikla N501Y ovlivňující asociaci neutralizačních protilátek vázajících receptor, poprvé byla objevena v Ohio ve městě Columbus. Na jaře roku 2020 se v téměř polovině vzorků v Los Angeles vyskytovala změna L452R. S ní vzrostla schopnost infikovat hostitele, zároveň způsobila oslabení neutralizace protilátek. Poprvé se objevila v Dánsku. Usnadnění vstupu viru do lidských buněk způsobila záměna glutaminu za prolin (Q677P), identifikována v Novém Mexiku a Louisianě. Ztrátou aminokyseliny prolinu a současným přírůstkem imidazolu obsahujícího histidin vznikla P681H. Zde se neuvádí spojitost se zvýšenou infekčností, potenciálně však způsobuje rozpad disulfidových můstků v RBD a její blízkosti. U kmenů P.1 a B.1.351 došlo k záměně lyzinu v oblasti 417. U P.1 byl lyzin nahrazen threoninem, u B.1.351 asparaginem. Tyto a některé další významné mutace popisuje tabulka č. 1 níže [8].

Mutagenézí vznikají nové varianty viru. Varianta se vztahuje k druhu podtřídy organismu, jenž prošel genetickou modifikací od hlavního kmene, ale neliší se natolik, aby mohl být označován jako odlišný kmen. Odlišný kmen se od mateřského viru různí strukturou a chováním. Nově vzniklé varianty mohou infikovat i očkované jedince. V září 2020 se ve Velké Británii mezi vzorky pacientů s covid-19 poprvé objevila varianta alfa (jinak označována jako Kmen Spojeného království, linie B.1.1.7), pro níž je charakteristická vyšší přenositelnost a úmrtnost. V jejím vývoji došlo například k mutaci N501Y. Beta varianta (jinak označována jako Jihoafrický kmen, linie B.1.351) byla odhalena v květnu 2020 a koncem prosince 2020 se stala v Zambii převládající variantou. V jejím genomu je možné najít tyto změny: A701V, D215G, D614G, LAL 242–244 del, K417N, E484K, R246I, D80A, L18F

a N501Y. Některé z těchto mutací ovlivňují odpověď na různé strategie imunizace a neutralizace polyklonálními a monoklonálními protilátkami. V prosinci téhož roku byly výše zmíněné varianty zařazeny organizací WHO mezi VOC. Během listopadu 2020 byla identifikována varianta gama (jinak označována jako Brazílský kmen, linie P.1). U této varianty byly pozorovány mutace N501Y, E484K a K417T. Při přenosu zde dochází k ovlivnění vzoru a profilu antigenu, což způsobuje nevhodnou tvorbu protilátek prostřednictvím předchozí infekce nebo očkování. Ohniska se nacházela kromě Brazílie ještě v Japonsku, později došlo k rozšíření zejména v Jižní Americe. Do VOC byla gama zařazena v lednu 2021. Zejména oblast Asie zasáhla v říjnu 2020 varianta delta (jinak označována jako Indický kmen, linie B.1.617). V genomu je možné nalézt změny D111D, G142D, P681R, E484Q a L452R. Do skupiny VOC byla zařazena v dubnu následujícího roku. V březnu 2020 se objevila varianta epsilon (jinak označována jako Kalifornský kmen, linie B.1.429), jež vykazovala známky rychlejšího přenosu. Ve viru se nachází pět charakteristických změn, tři v S proteinu – W152C, S13I, L452R, a dvě v genu ORF1ab – D1183Y, I4205V. Další významnou variantou se stala varianta omikron (linie B.1.1.529) pocházející z Jižní Afriky. Na rozdíl od ostatních VOC má omikron vyšší riziko reinfekce a zároveň nižší odpověď na léčbu. V genomu viru bylo nalezeno až 50 genetických abnormalit. V USA se varianta omikron na začátku prosince 2021 rozšířila během jednoho týdne do více než 22 států [18, 19, 20].

Tabulka 1: Klinicky významné mutace SARS-CoV-2, zpracováno dle [14]

Mutace	Varianta výskytu	Původní aminokyselina	Nová aminokyselina
N501Y	Alfa, Beta, Gama	Asparagin N	Tyrosin Y
E484K	Alfa, Beta, Gama	Kyselina glutamová E	Lyzin K
K417N	Beta	Lyzin K	Asparagin N
D614G	Alfa, Beta, Delta, Kappa	Kyselina asparagová D	Glycin G
P681H	Alfa	Prolin P	Histidin H
K417T	Gama	Lyzin K	Threonin T
E484Q	Delta, Kappa	Kyselina glutamová E	Glutamin Q
L452R	Delta, Kappa	Leucin L	Arginin R
P681R	Delta, Kappa	Prolin P	Arginin R
T478K	Delta	Threonin T	Lyzin K

Virus se během infekce připojuje k receptoru ACE2 (angiotensin konvertující enzym 2) na povrchu hostitelské buňky, tento děj umožňuje spike protein. S protein má dvě podjednotky, S1 a S2. Jednotka S1 má doménu vázající receptor (receptor binding domain – RBD), ta má možnost se přímo vázat na ACE2. Mutace v této oblasti mají velký klinický význam v souvislosti s virulencí a přenositelností [18].

Téměř všechny z vyjmenovaných S1 mutací zvyšují vazebnou afinitu viru k ACE2 a snižují afinitu k neutralizačním protilátkám, čímž zajišťují vyšší přenosnost a virulenci. Nejrozšířenější mutace D614G, která byla nalezena u všech zmíněných variant (99 % prevalenčních variant od začátku roku 2020) se nachází mimo doménu RBD. Nemění vazebnou afinitu k ACE2 ani neutralizačním protilátkám. Jejím účinkem je zvyšování hustoty špiček (zachovává integritu špičky a zabraňuje vylučování S1), což způsobuje vyšší infekčnost, vyšší afinitu k čichovému epitelu a vyšší stabilitu virionů, které jsou poté odolnější vůči proteolytickému štěpení [18].

Zjištěné NSP mutace mají většinou menší význam než mutace na spike proteinu. Existují dvě mutační místa, která souvisí s přenositelností a virulencí, jedná se o NSP1 ORF1a/ORF1ab a ORF8. Na konci roku 2020 převládaly v Africe varianty koronaviru, u kterých došlo k deleci NSP1 a ORF8. Díky zkrácení zmíněných oblastí byly infekce mírnější. Místem prvního objevu těchto mutací byl Sichuan, Čína (varianta NSP1: A500-532) a Singapur (varianta ORF8: A382). Přestože v Africe představovaly hlavní varianty, tak v přepočtu na světovou populaci se jednalo pouze o méně než 5 % infekcí [18].

3.3 Původ viru

Původ viru SARS-CoV-2 vyvolal značné diskuse nejen mezi vědci. Od počátku pandemie byl publikován nespočet studií zabývajících se otázkou, odkud se virus mezi lidmi vzal. Dvě základní teorie jsou – přirozený původ a laboratorní původ. V obou případech se mluví o spojitosti s netopýřími koronaviry, které si buď svými přirozenými mutacemi nebo genetickými úpravami v laboratoři našli cestu k infikování lidské populace.

3.3.1 Přirozený původ

První, kdo dokázal identifikovat a charakterizovat vlastnosti nového viru SARS-CoV-2, byli vědci z Wuchanského virologického institutu (WIV). Genomové sekvenování prvních případů odhalilo, že nový virus se ze 79 % shoduje s virem SARS-CoV, který způsobil epidemii

v letech 2002 až 2003, a z 96,2 % je identický s virem RaTG13. RaTG13 je koronavirová sekvence vyskytující se u netopýrů *Rhinolophus affinis*. Kmen RaTG13 je možné ve vědeckých člancích z doby kolem roku 2013 najít i pod názvem BtCoV/4991. Sekvence BtCoV/4991 byla objevena v provincii Yunnan v roce 2013, kdy šest horníků, kteří měli odklízet netopýří trus, onemocnělo těžkým zápallem plic. V jejich testovaných vzorcích se našly protilátky typu IgG proti SARS, přičemž byla malá šance, že by protilátky pocházely z epidemie v letech 2002 až 2003. Protilátky SARS s největší pravděpodobností reagovaly zkříženě s novým netopýřím virem, který byl podobný SARS. Později byl BtCoV/4991 prohlášen pouze za jiný název pro RaTG13. Dalším virem s velmi blízkou sekvencí, k již zmíněným, je koronavirus MP789. Ten byl izolován v čínské provincii Guangdong v roce 2019 z luskouna ostrovního a jeho aminokyseliny tvořící obalový protein se s RaTG13 shodují ve 100 %. To staví luskouny na místo možných mezihostitelů v případě SARS-CoV-2 [21].

Trasování viru výzkumníky dovedlo na tzv. mokré trhy v čínském Wuchanu. Zde dochází k prodeji divokých zvířat bez jakéhokoli dokladu o původu či karanténě. Zvířata jsou prodávána buď jako mazlíčci nebo ke konzumaci. Tyto trhy jsou známé svou nepříliš dobrou hygienou, riziko infekce je tedy značné. K nákaze může dojít například respiračními kapátkami a aerosoly od infikovaných zvířat, požitím syrového nebo špatně tepelně upraveného masa. Některé skutečnosti naznačují, že první infikovaný navštívil právě tyto trhy. Tým odborníků z WHO provedl šetření trhu, které trvalo od 14. ledna do 10. února 2021. Vyšetřování však poskytlo pouze neprůkazné výsledky týkající se původu SARS-CoV-2, nikdo nebyl schopen virus najít u divokých zvířat. Studie provedená v období od května 2017 až do listopadu 2019 navíc tvrdí, že na trhu ve Wuchanu neprobíhal žádný obchod s netopýry či luskouny, což může být jedním z argumentů pro to, že trh není místem, odkud se virus rozšířil [23].

Existují některé specifické vlastnosti genomu, které výrazně podporují teorii o přirozeném původu – týkají se zejména mutace na RBD doméně a polybazického furinového štěpného místa. Ze strukturálních studií a biochemických experimentů vyplývá, že SARS-CoV-2 má receptor vazebnou doménu, jež se s vysokou afinitou váže na ACE2 u lidí, frettek, koček a dalších druhů s vysokou homologií receptorů. Vědci se domnívají, že tato vysokoafinitní vazba je výsledkem přirozeného výběru na lidském nebo lidskému podobném ACE2, což popírá SARS-CoV-2 jako laboratorní produkt. RBD ve spike proteinu je nejproměnlivějším místem v genomu, šest jejích aminokyselin je kritických právě pro vazbu na ACE2. Experimenty ukázaly, že přítomnost polybazického místa štěpení furinu má roli při určování virové infekčnosti a rozsahu hostitelů. Zvyšuje fúzi mezi buňkami bez ovlivnění

vstupu viru. Štěpné místo se nachází mezi podjednotkou S1 a S2. U příbuzných betakoronavirů linie B nebyla tato místa štěpení pozorována [24].

Andersen ve své práci zmiňuje tři možné původy viru. První byl již zmíněn výše a souvisí s přirozeným výběrem u zvířecího hostitele před zoonotickým přenosem. Dosud nebyl identifikován žádný zvířecí koronavirus, který by byl SARS-CoV-2 dostatečně podobný na to, aby sloužil jako jeho přímý předek (progenitor). Zvířecí hostitel by musel mít vysokou populační hustotu k tomu, aby mohla proběhnout efektivní přirozená selekce a zároveň ACE2 kódující gen, který by byl podobný tomu lidskému. To by umožnilo původnímu viru získat jak polybazické místo štěpení, tak mutaci, která umožní vazbu na lidský ACE2. Druhou možností původu je přirozený výběr u člověka po zoonotickém přenosu. Tato teorie předpokládá infikování člověka progenitorem SARS-CoV-2 s následnou adaptací viru při přenosu z člověka na člověka. Vzorky odebrané z luskounů obsahují velmi podobnou RBD, což naznačuje, že tuto RBD měl i původní virus. Během přenosu mezi lidmi pak došlo k mutaci týkající se polybazického místa štěpení. K tomu mohl mít virus příležitost, pokud by došlo k velkému množství předchozích zoonotických událostí, jež produkovaly krátké řetězce přenosu mezi lidmi po delší dobu. Tento proces v minulosti nastal například u onemocnění MERS-CoV. Retrospektivní sérologické studie dokázaly, že v některých oblastech Číny došlo v malém množství k expozici koronaviřům podobných SARS-CoV-2. Posledním možným původem je selekce během pasážování, tedy únik z laboratoře, tuto teorii však Andersen považuje za nepravděpodobnou [24].

3.3.2 Umělý původ

Zejména netopýři jsou přirozenými rezervoáry pro širokou škálu koronaviřů. Některé mohou infikovat lidskou populaci přímo a některé potřebují, aby nejprve proběhla mutace na spike proteinu. Vědci již vytvořili řadu chimérických koronaviřů za účelem studování potenciálu vzniku nových koronaviřů a vyhodnocení jejich případné hrozby pro lidskou populaci. Základní páteří pro tyto chimérické kmeny jsou netopýří koronaviry, které nejsou za normálních okolností schopné napadat lidské buňky. Simulací rekombinantních událostí, jež by mohly nastat v přírodě, jsou spike proteiny upraveny pro vazbu na lidské ACE2. Přestože je účelem studií především potřeba být připraveni na možnou příští pandemii s dostatkem léků a vakcín, vyvolávají studie jisté obavy. Hlavním protiargumentem je, že by příští pandemie mohla být způsobena právě těmito chimérickými viry po případném úniku z laboratoře, ať už náhodným nebo cíleným. Možný syntetický původ v rámci laboratorního inženýrství

nelze vyloučit ani u SARS-CoV-2. K úniku z laboratoře může dojít několika způsoby – poškrábáním či pokousáním pracovníka infikovaným zvířetem, únikem infikovaného zvířete, nedodržením pokynů k likvidaci odpadů a dekontaminaci, selháním zařízení (únik aerosolu). V minulosti již k několika takovýmto únikům došlo. Příkladem je únik viru H1N1 v roce 1977 z čínské laboratoře, který následně způsobil celosvětovou pandemii. V listopadu 2019 v Lanzhou došlo k nákaze více než sta studentů a zaměstnanců brucelózou. V roce 2003 byly hlášeny úniky viru SARS z laboratoří v Singapuru a na Tchaj-wanu. Obavy o dodržování bezpečnostních předpisů v laboratořích spojených s výše zmíněnými událostmi podporuje i informace o určitých úpravách virové databáze WIV v květnu 2020 [21].

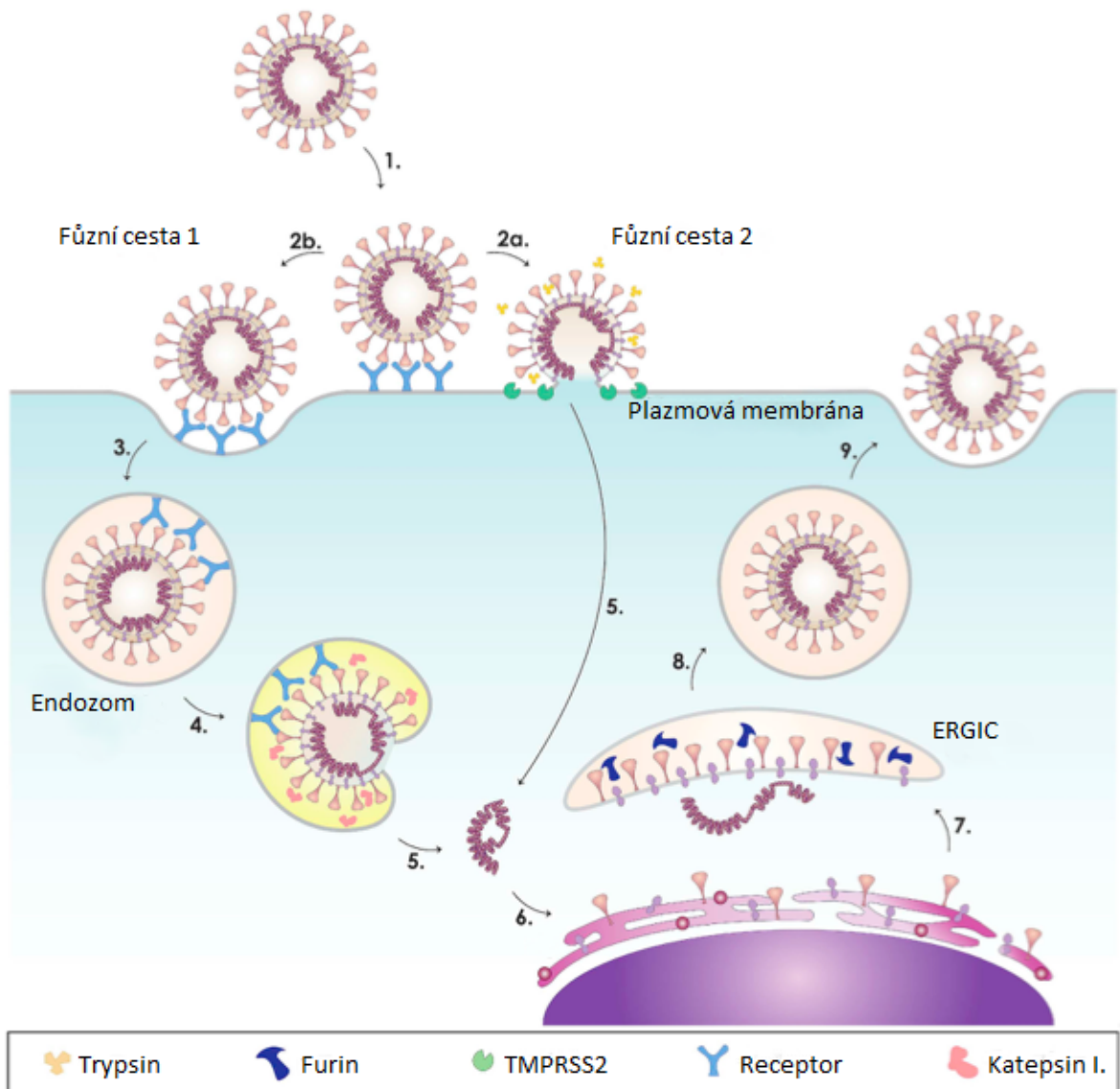
Výzkum netopýřích koronavirů probíhá ve WIV v laboratoři úrovně biologické bezpečnosti 4 (BSL-4), což je nejvyšší možný stupeň biologického omezení umožňující vědcům pracovat s nejnebezpečnějšími látkami. Americká zpravodajská služba informovala 23. května 2021 o třech vědcích, kteří v listopadu 2019 onemocněli nemocí se symptomy, jež připomínaly onemocnění covid-19. Jejich stav vyžadoval hospitalizaci, podrobnosti však nebyly poskytnuty. V únoru 2020 vyšla zpráva o nesprávných laboratorních postupech ve WIV, byla však následně stažena poté, co čínské úřady trvaly na tom, že v souvislosti s pandemií covid-19 nedošlo k žádné laboratorní nehodě. Teorii o umělém původu podporuje informace o vzácném výskytu specifické genetické sekvence kodonů CGG (tandemový argininový dublet CGG-CGG). Tyto kodony se nachází v místě štěpení furinu, přičemž u jiných virů se kodony CGG-CGG nenachází v žádném z furinových štěpných míst. U SARS-CoV-2 kóduje tento kodon téměř 5 % argininů, u SARS-CoV jsou to necelá 3 % [23].

3.4 Napadení buňky

Proces napadení buňky probíhá vždy pomocí strukturního membránového spike proteinu, který pokrývá povrch virové částice. Invaze do hostitelské buňky vyžaduje několik posttranslačních modifikací S proteinu. Uplatňuje se zde zejména podjednotka S1, jenž je zodpovědná za vazbu na receptor na povrchu hostitelské buňky. Každá část S1 má svůj specifický význam. NTD podporuje ve zvířecích koronavirech vazbu na receptor nebo působí jako stabilizační faktor. RBD obsahuje receptor-vazebný motiv, který je zodpovědný za přímou interakci s receptorem, pro spojení je nutná správná konformace RBD. Klíčové jsou jednotky CTD, které stabilizují strukturální změny spike proteinu potřebné pro adekvátní interakci s receptorem a membránovou fúzi. Úkolem podjednotky S2 je spojení S proteinu s povrchem membrány, což je rozhodující pro následnou fúzi membrán [25].

Byly rozpoznány čtyři hlavní vstupní molekuly, které mohou být receptory hostitelských buněk nebo hostitelské proteázy přijaté virem pro vstup do respiračního traktu u lidí – ACE2 (angiotensin konvertující enzym 2), GRP78 (protein regulující glukózu 78), CD147 (vysoce glykovaný transmembránový protein), TMPRSS2 (serinová proteáza typu 2) a furin [26].

Vstup viru do buňky může proběhnout dvěma způsoby – časnou cestou nebo pozdní cestou. Časnou fúzní cestu přes plazmatickou membránu spouští přítomnost exogenních a membránově vázaných proteáz – trypsinu a TMPRSS2 (na Obr. 4 fúzní cesta 2). Druhou možností je cesta přes endozom s následnou aktivací katepsinu I. (na Obr. 4 fúzní cesta 1). Poté se vytvoří kopie genomu v cytoplasmě, složky S proteinu se syntetizují v drsném endoplazmatickém retikulu a strukturální složky se sestaví v ERGIC, následuje uvolnění viru z buňky [27].



Obrázek 4: Membránová fúze, upraveno dle [27]

ACE2 je fyziologicky součástí systému renin-angiotensin-aldosteron (RAAS), jeho funkcí je přeměna angiotensinu II na angiotensin I, který má vasodilatační a protizánětlivý účinek (podílí se na regulaci krevního tlaku a hladin elektrolytů). Vzorce jeho exprese v tkáních lidského těla jsou podobné cílovým buňkám pro SARS-CoV-2. Horní cesty dýchací jsou místem vysoké exprese ACE2 a zároveň místem, kde se virus replikuje v časném stádiu infekce. Vysoké hladiny se nachází také ve střevech, ledvinách a srdeční svalovině, což vysvětluje orgánové komplikace při onemocnění covid-19. Poté, co dojde na membráně buňky ke spojení s ACE2 mohou následovat dvě možnosti cesty invaze. První možností je vstup viru na buněčný povrch, který vyžaduje přítomnost TMPRSS2, což je enzym patřící mezi serinové proteázy typu 2, je přítomný na povrchu sliznice gastrointestinálního, urogenitálního a respiračního traktu, jeho fyziologická úloha v organismu není známa. Nicméně modifikace jeho pomocí je vyžadována v procesu invaze i jinými viry (chřipka, MERS-CoV, SARS-CoV). V bronchiálním epitelu a tlustém střevě dochází k současné expresi TMPRSS2 a ACE2. Druhá možnost invaze je spojena s tvorbou endozomů. Dochází k ní v případě, že na povrchu membrány nedochází k dostatečné expresi TMPRSS2. Jedná se o proces endocytózy zprostředkovaný klatrinem. Tato možnost invaze byla popsána zejména u varianty omicron, kdy umožnila variantě zvýšit přenositelnost tím, že se zaměřila na více buněk dýchacího traktu [25].

GRP78, neboli protein regulující glukózu 78, byl pozorován v endoplazmatickém retikulu při inaktivaci tří enzymů, které jsou zodpovědné za buněčnou smrt nebo diferenciaci (aktivační transkripční faktor 6 – ATF6, enzym vyžadující inositol – IRE1, protein kinase RNA-like ER kinase – PERK). Jeho nadměrná exprese zvyšuje šanci, že se protein přemístí i na buněčnou membránu, kde může rozhodovat o vstupu viru do buňky [26].

CD147 je vysoce glykovaný transmembránový protein z rodiny imunoglobulinů, u lidí je kódován genem BSG. K jeho zvýšené expresi v buňkách dochází při zánětech a rakovině. Prostřednictvím CD147 mohou imunitní buňky šířit virus z infikovaných epitelálních buněk, což vede k lokální a systémové expanzi viru v těle. SARS-CoV-2 může způsobit poškození erytrocytů vyvolané oxidačním stresem, což vede k poškození myokardu a refrakterní hypoxemii. Produkce CD147 je indukována vysokou koncentrací glukózy v krvi, což má spojitost s vyšší úmrtností na covid-19 u pacientů s diabetem 2. typu. Vyšší exprese je také u obézních pacientů a pacientů s CHOPN – běžné komorbidity s covid-19 [25].

Furin je párový bazický enzym štěpící aminokyseliny, několik virů využívá furin k aktivaci svých glykoproteinů včetně S proteinu u SARS-CoV-2. Vlivem jeho účinku dojde

ke štěpení S proteinu, což vede k přeuspořádání ve struktuře RBD, čímž se zvýší afinita viru. Je distribuován v různých orgánech těla [26].

Několik studií navrhlo další alternativní receptory membrán hostitelských buněk pro vstup SARS-CoV-2. Příkladem je neuropilin-1 (NRP1), což je enzym ze skupiny non-tyrosine kináz a je koreceptorem při regulaci řady fyziologických funkcí. Předpokladem je, že furinové štěpení by mohlo vytvořit vazebné místo pro NRP1. Dalším příkladem je metabotropní glutamátový receptor subtypu 2 (mGluR2), při studiích na myších se receptor vázal přímo na S protein. Invaze přes molekulu KIMI1 by vysvětlovala souvislost s urogenitálními příznaky onemocnění covid-19. Mezi další sloučeniny zapojené do vstupu SARS-CoV-2 do buněk je možné zařadit protein tepelného šoku A5 (HSAP5), heparin sulfát (HS), ADAM metalopeptidázovou doménu 17 a Toll-like receptor 4 (TLR4) [25].

3.5 Onemocnění covid-19

Klinický obraz onemocnění covid-19 může být jak symptomatický, tak asymptomatický. Až 40 % případů onemocnění probíhá bez zjevných příznaků, což značně znesnadňuje trasování nákazy. U většiny nakažených lidí probíhá onemocnění mírně za přítomnosti nespecifických symptomů a uzdraví se. Nejčastějšími příznaky jsou: intermitentní nebo přetrvávající horečka (objevuje se u 77 až 98 % případů), kašel (46 až 82 % případů), myalgie a únava (11 až 52 % případů), dušnost (3 až 31 % případů), bolest v krku, bolest hlavy, kašel se sputem. Další často uváděné symptomy jsou ageuzie (ztráta chuti), anosmie (ztráta čichu) a projevy v gastrointestinálním ústrojí zahrnující diareu (průjem) a nauzeu (nevolnost). Přibližně 80 % případů s mírnými příznaky vyžaduje ambulantní léčbu, 15 % hospitalizaci a zbývajících 5 % intenzivní péči v důsledku respiračního selhání [28].

Studie zbývajících se problematikou gastrointestinálních příznaků u pacientů s covid-19, probíhající od března do srpna 2019, uvádí, že se tyto příznaky společně s jaterními mohou objevit už v počátcích onemocnění, a to ještě před typickými respiračními. Studie zahrnovala 413 případů, u nichž byla prevalence gastrointestinálních příznaků 19,8 %. V jiných studiích je možné narazit až na 50% prevalenci. Nejčastěji se jedná o nauzeu, průjem, bolesti břicha, zvracení, anorexii a dysgeuzii. Mechanismus poškození tohoto ústrojí je pravděpodobně opět založen na receptoru ACE2. Virus vstoupí do buňky přes ACE2, replikuje se a způsobí přímé poškození systému ve spojení se zánětlivou reakcí. Infikované a poškozené mohou být i enterocyty. Mechanismus poškození jater ještě není objasněn. Nabízí se možnosti, že virus infikuje hepatocyty nebo cholangiocyty prostřednictvím ACE2 receptorů, na základě

imunodeficienci nebo hepatotoxicitě léků. Podle American College of Gastroenterology se abnormální hladiny jaterních enzymů objevují až u třetiny případů. Z dostupných informací však vyplývá, že poškození jater v důsledku onemocnění covid-19 je pouze mírné a přechodné [29].

Další skupinou příznaků, kterou je nutné zmínit, jsou ORL příznaky. Hlavním útočištěm viru se staly orofaryngeální a nosohltanová sliznice. Kromě již zmíněné ztráty čichových a chuťových vjemů a bolesti v krku, může dojít i k výskytu tinnitu (šelest v uších) nebo ztrátě sluchu. Zatímco ztráta čichových a chuťových vjemů se více vyskytuje u mladší populace, u ztráty sluchu je tomu naopak a postihuje především starší věkovou skupinu. Tyto symptomy se objevují náhle a většina pacientů se z nich úplně uzdraví. Studium vlivu onemocnění covid-19 na sluchový aparát se zabývali Mustafa a kol., kteří ve své studii uvedli, že by infekce mohla mít škodlivé účinky na funkce kochleárních vláskových buněk, i přes to, že proběhla asymptomaticky. U čistého tónu bylo pozorováno snížení vysokofrekvenčních prahů. S postupným šířením viru v organismu může dojít mimo jiné i k neuro-sluchovým problémům [30].

U poměrně velké skupiny lidí se objevují přetrvávající symptomy i po několika měsících od diagnostikované infekce. Ve studii od Yellumahanthi a kol. byl po třech měsících hlášen aspoň jeden symptom u téměř 51 % pacientů. Nejčastěji se jednalo o únavu (56 %), mozkovou mlhu (48 %) a dušnost (41 %). Na tyto příznaky si stěžovaly více ženy a věk nehrál roli. Mezi další přetrvávající příznaky patří ztráta chuti a čichu, porucha pozornosti, vypadávání vlasů, poruchy spánku, kašel, úzkost a deprese. Četnost dlouhodobých symptomů se v různých studiích liší: studie od Cirulli a kol. zahrnující 357 případů covid-19 uvádí přetrvávající symptomy po třech měsících pouze u 14,8 % pacientů, naopak studie od Lemhofer a kol. mluví až o 61,9 % [31].

Přestože se o dětech jako o cílové skupině onemocnění covid-19 příliš nemluvílo v porovnání se starší populací, může u nich způsobit také velmi závažné stavy. Podle údajů UNICEF zveřejněných v lednu 2022 došlo v souvislosti s covid-19 asi k 12 300 úmrtím u dětí a mladistvých do 20 let, z nichž 42 % byly děti ve věku do devíti let. U dětí se nejčastěji vyskytl mírný nebo asymptomatický průběh onemocnění, což z nich dělá významnou skupinu přenašečů. Příznaky se příliš neliší od příznaků u dospělých, navíc se u dětí objevuje cyanóza, interkostální retrakce, dehydratace, rozšíření nosních dírek, snížená saturace kyslíku, ztráta chuti k jídlu, kožní vyrážky a hyperémie spojivek. Inkubační doba je stejná jako u dospělých – 2 až 14 dnů (průměr 6). V dubnu 2020 vydala Britská pediatrická asociace varování o novém klinickém obrazu u dětí, který může být spojen s covid-19. Klinický obraz

byl nazván jako multisystémový zánětlivý syndrom mladistvých a dětí (MIS-C). Jedná se o závažný stav, kdy jsou postiženy aspoň dva systémy, bývá identifikován několik dnů až týdnů po infekci. Jeho důsledkem dochází ke snížení krevního tlaku a hromadění tekutin v plicích a dalších orgánech, léčení vyžaduje intenzivní péči [32].

3.5.1 Diagnostika

K diagnostice onemocnění covid-19 je možné použít několik druhů testů, v této kapitole budou některé z nich představeny. Jako vzorek bývá obvykle použito sérum nebo výtěr ze sliznic pacienta. Jako velmi užitečná metoda testování se stala RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálním čase). Z důvodu nejvyšší virové nálože je pro testování doporučeno odebrat vzorek z dolního dýchacího traktu – sputum, endotracheální nebo bronchoalveolární aspirát. Platí, že pět až šest dnů od propuknutí příznaků dosahuje zjiitelná virová nálož nejvyšších hodnot [33].

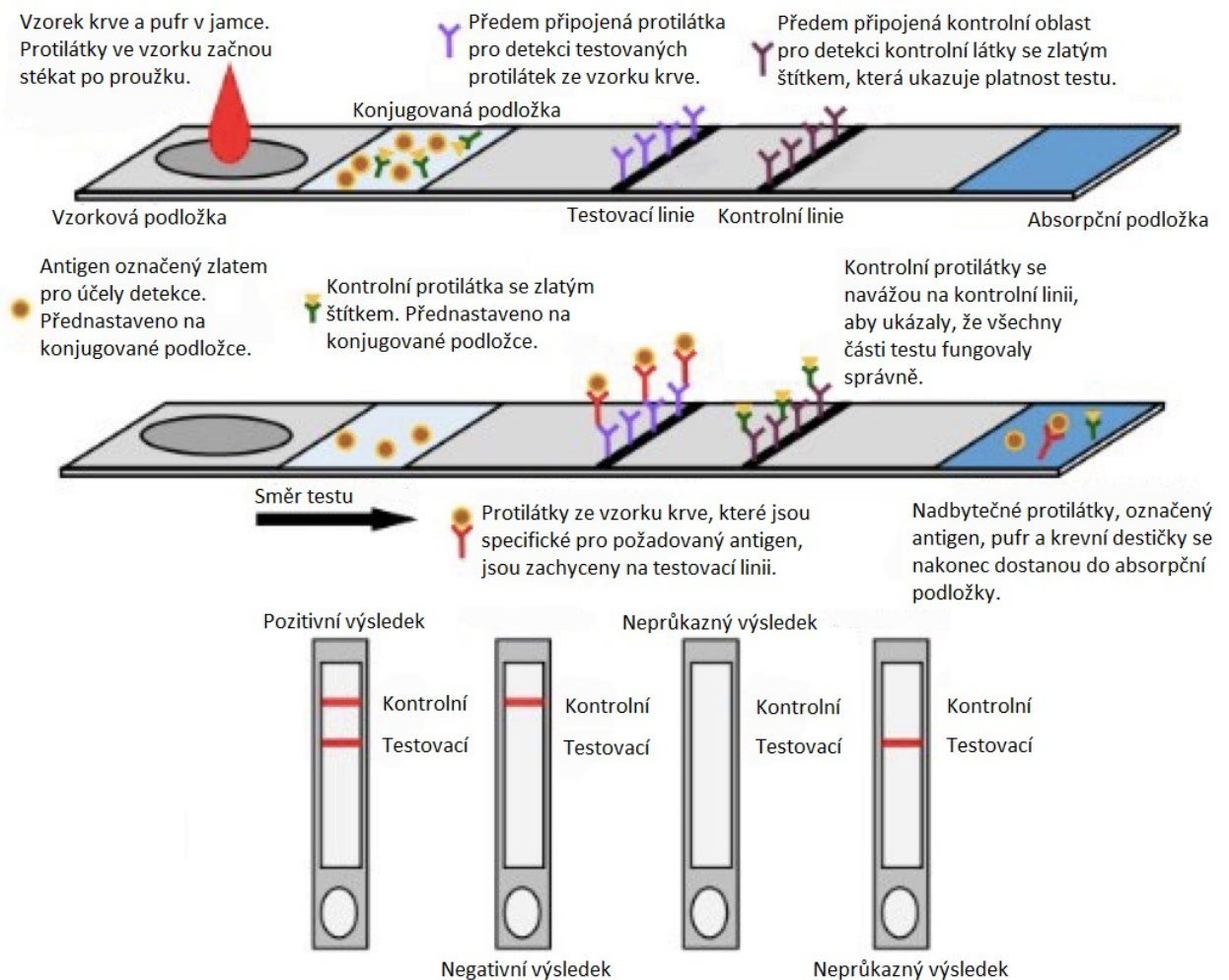
Pokud má pacient asymptomatický průběh onemocnění, je možné test provést i z nosohltanového nebo orofaryngeálního výtěru. Metoda RT-PCR se zaměřuje na konkrétní geny v genomu viru. Testování se v různých zemích liší, bližší informace o protokolech detekce v jednotlivých zemích je možné nalézt na webových stránkách WHO. Například v Číně jsou genovými cíli geny ORF1ab a N, v Německu geny RdRp, E a N, ve Spojených státech tři cíle v genu N. Gen E je specifický pro všechny viry, které souvisejí se SARS-CoV, RdRp umožňuje detekci přímo SARS-CoV-2. Pro gen N se používají tři sady primerů – jedna je univerzální pro betakoronaviry, dvě jsou specifické pro SARS-CoV-2 – pro pozitivní potvrzení infekce musí být pozitivní všechny tři cíle. S rozdílnými protokoly pro testování souvisí mírné nesrovnalosti ve výsledcích [22, 33].

Pro diagnostiku covid-19 je možné použít i další modifikace PCR. V Japonsku na začátku epidemie našla využití vnořená PCR. Nákladnější droplet digital PCR (ddPCR) může podle studie Suo a kol. do značné míry snížit riziko falešně negativních výsledků. Studie analyzovala vzorky ve stejných podmínkách pomocí 8 sad primerů, výsledky ukázaly, že ddPCR je schopná rozlišit pozitivní a negativní vzorky i při nízké virové zátěži [33].

Další skupinou diagnostických metod jsou testy na průkaz specifických protilátek. Nejdůležitější pro odhalení nedávné infekce jsou protilátky IgM. Tyto protilátky jsou produkovány pět až sedm dnů od propuknutí infekce. Následně produkuje infikovaný organismus protilátky IgG, tato fáze trvá přibližně do patnáctého dne infekce a protilátky mohou zůstat zjiitelné v řádech měsíců až let. Detekovatelné bývají i protilátky IgA, jejich

význam u tohoto onemocnění však není ještě příliš objasněn. Platí, že během prvního týdne jsou hodnoty protilátek poměrně nízké, ve druhém týdnu rostou a nejvyšších hodnot dosahují v týdnu třetím. Síla protilátkové odpovědi je ovlivněna věkem, nutričním stavem organismu, závažností onemocnění a užíváním léků (např. imunosupresiva potlačující imunitní reakci). Do skupiny protilátkových diagnostických testů se řadí ELISA, LFA, CLIA, imunofluorescenční test, microarray a mikrofluidní čipy [33].

Laterální průtokový test (lateral flow assay – LFA) patří do skupiny rychlých diagnostických testů (RTD, z angl. rapid diagnostic tests) (Obr. 5), pro jeho malou velikost a přenosnost ho lze použít i v místě péče. Jedná se o kvalitativní test, který prokazuje pacientovy protilátky nebo virový antigen. Vzorkem může být krev (stačí malé množství, například z píchnutí do prstu), sliny nebo tekutiny z nosních výtěrů. Test ukazuje barevné čárky, jež informují o pozitivním nebo negativním výsledku. Celý proces trvá 15 až 40 minut. Dalším diagnostickým testem je enzymová imunosorpční analýza (ELISA, z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay). Tento laboratorní test může být jak kvalitativní, tak kvantitativní. Principem je destička, která je potažena požadovaným virovým proteinem. Pokud má pacient specifické protilátky proti tomuto proteinu, dojde k jejich navázání na protein v destičce a vzniku komplexu protilátka-protein. Ten může být následně detekován (barevný nebo fluorescenční výstup). Pro provedení testu bývají odebírány vzorky plné krve, plazmy nebo séra. Metoda trvá dvě až čtyři hodiny [34].

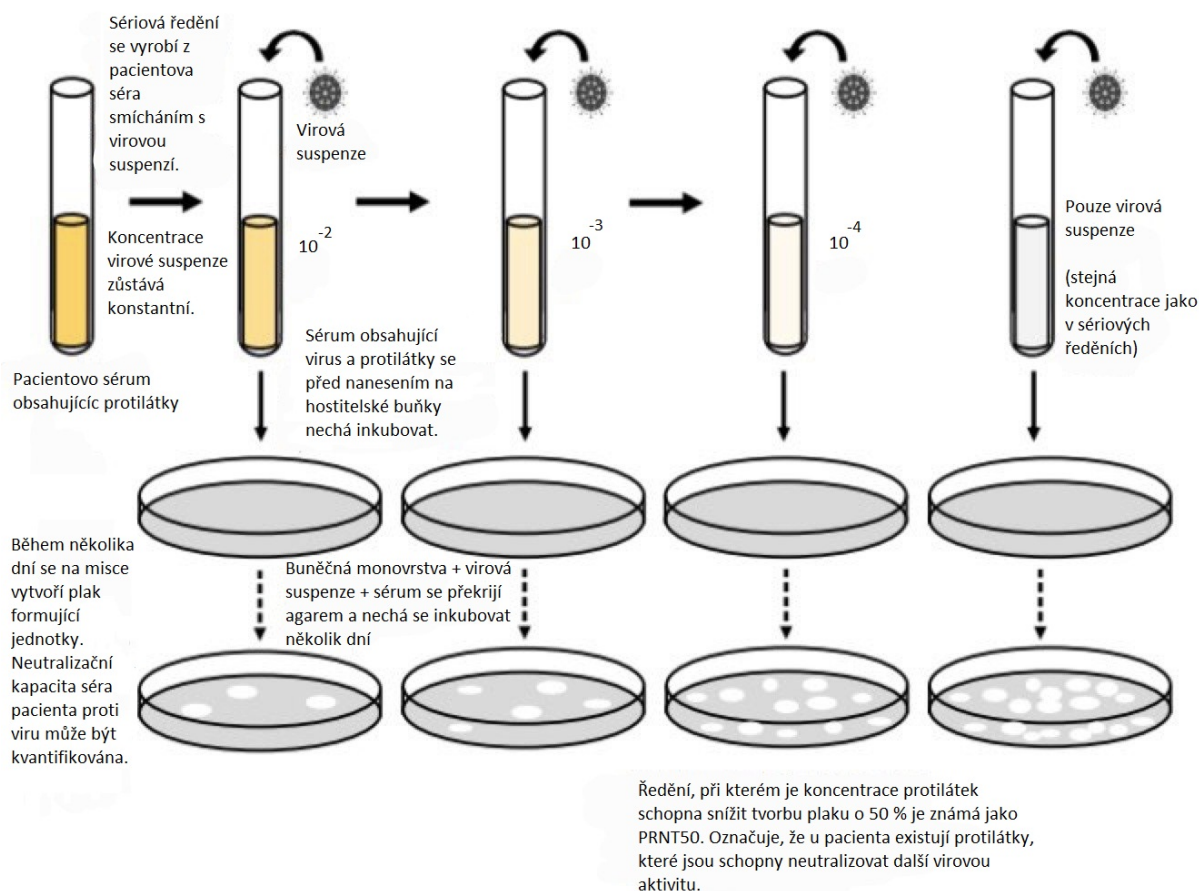


Obrázek 5: Schéma rychlých diagnostických testů (RTD), upraveno dle [35]

Pokud pacient již prodělal infekci, zjišťuje se, zda má stále aktivní a účinné protilátky. K tomu slouží neutralizační test (Obr. 6). Jeho provedení trvá tři až čtyři dny a vyžaduje opět vzorky plné krve, séra nebo plazmy. Viry jsou při něm pěstovány na kultuře s klesajícími koncentracemi protilátek. Na jeho základě je možné kvalitativně i kvantitativně určit specifické protilátky v séru pacienta, které jsou schopné blokovat replikaci viru. Další významnou diagnostickou metodou je CT hrudníku. Na snímku jsou viditelné jasné bílé skvrny, které značí zákal nebo částečné vyplnění vzduchových prostor v plicích [34].

V rámci diagnostiky se provádí i genomické sekvenování. Používanými metodami jsou metatranskriptomické sekvenování, sekvenování založené na hybridním záchytu, amplikonové sekvenování a sekvenování cílené na nanopóry. V březnu 2020 byly ve veřejných databázích (GISAID, NCBI Gen Bank, CNGBdb) zveřejněny stovky genomů SARS-CoV-2. Sekvence

umožňuje popsání primární struktury viru. Slouží k analýze vývoje viru, sledování propuknutí onemocnění, vývoji nových terapií a případně i účinných vakcín [33].



Obrázek 6: Schéma neutralizačního testu, upraveno dle [35]

3.5.2 Terapie

O nalezení vhodné terapie se začala velmi rychle snažit řada lékařů a vědců. Specifické terapii předchází léčba symptomů jako je například horečka a kašel. Při tělesné teplotě nad 38 °C se užívají antipyretika (např. paracetamol, ibuprofen, metamizol, kyselina acetylsalicylová). K léčbě kašle slouží antitusika (např. kodein, dextromethorfan, butamirát, dropropizin), která se často kombinují s mukolytiky (např. acetylcystein, ambroxol). Při bronchiální obstrukci se pacientům podávají bronchodilatancia (např. salbutamol, ipratropium), stav hypoxie se řeší oxygenoterapií nosní kanylou nebo kyslíkovou maskou při SpO₂ nižším než 93 %. V rámci specifické terapie se uplatňují antivirotika (např. remdesivir, nirmatrelvir/ritonavir, molnupiravir), monoklonální protilátky (např. tixagevimab/cilgavimab, sotrovimab), imunomodulátory (dexamethason, baricitinib, anakinra, tocilizumab) a antikoagulancia (nízkomolekulární heparin) [36].

První skupinou léků jsou antivirotika. Jejich úlohou je blokování procesu replikace viru. Největší dopad na léčbu a zabránění vzniku hyperzánětlivého stavu u pacienta má podání antivirotik v časných stádiích onemocnění. Více než 50 % schválených antivirotik se používá u léčby onemocnění způsobené virem HIV. Dále tyto léky našly uplatnění u léčby chřipky A a B, eboly, cytomegaloviru, viru herpes simplex a hepatitidy A a C. U onemocnění covid-19 byl použit například remdesivir, favipiravir, lopinavir, chlorochin a hydroxychlorochin. Prvním lékem, jenž získal souhlas Amerického úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k použití proti viru SARS-CoV-2, byl remdesivir. Schválení se týkalo dospělých a pediatrických pacientů nad 12 let s podmínkou minimální váhy 40 kilogramů. Remdesivir, dříve známý jako GD-5734, je monofosforamidátové proléčivo analogu adenosinu. Původně byl společností Gilead Sciences vyvinut k léčbě onemocnění virem EBOV a Marburg. Později se ukázal jako slibný lék i proti dalším onemocněním způsobeným RNA viry jako je MERS nebo SARS-CoV. Jelikož je remdesivir nukleotidovým analogem, je jeho mechanismus působení založen na schopnosti inhibice RdRp, která je nezbytná pro replikaci a transkripci virového genomu. Jeho molekula podléhá intracelulární metabolické přeměně na analog aktivního metabolitu nukleosid trifosfátu (NTP), jinak označovaný jako remdesivir trifosfát (RTP). Ten poté soutěží s endogenními nukleosidovými zásobami při interakci do procesu replikace virové RNA, tím dochází k předčasnému ukončení syntézy RNA a následnému zrušení procesů transkripce a translace. Antivirotikum favipiravir je proléčivo purinového nukleotidu, které bylo objeveno chemickou modifikací analogu pyrazinu. V roce 2014 byl favipiravir schválen v Japonsku pro léčbu chřipky. Vykazuje však účinek i proti dalším RNA virům. Mechanismus jeho působení je založen na začlenění se do virové RNA, inhibici aktivity enzymu RdRp a blokaci syntézy virové RNA [35].

Molnupiravir je ribonukleosidový prekurzor aktivní proti řadě respiračních RNA virů. Po podání je léčivo hydrolyzováno esterázami na ribonukleosidový analog beta-D-N4-hydroxycytidin (NHC), ten je po vstupu do buněk fosforylován na a mění se na aktivní formu NHC-trifosfát (NHC-TP). Vzniklá aktivní forma se pomocí RNA-dependentní RNA-polymerázy může začlenit do virové RNA, kde způsobí mutagenní změny. S každým dalším replikačním cyklem viru se mutace zvyšují až do bodu prahové hodnoty, kdy se genetický prvek již není schopen udržet v populaci viru. Lék molnupiravir se podává perorálně, kontraindikací je těhotenství, kojení a věk pod 18 let. Výhodou je jeho účinnost v případě varianty omikron [36, 37].

Metoda pasivní imunizace se již dříve osvědčila v globálních nouzových situacích, kdy chybí vakcíny nebo není dostatečně proočkováná ohrožená populace. Pasivní imunizace

se používá u virových a bakteriálních onemocnění a jedná se o podání již hotových protilátek pacientovi. Tyto protilátky jsou většinou purifikovány z lidských sér s vysokými titry IgG proti mikroorganismům. Vysokých titrů je dosaženo buď vakcinací nebo po přirozené infekci. Plazma získaná od rekonvalescentních dárců byla pro terapii použita již při epidemii SARS-CoV v roce 2003, kdy snížila úmrtnost z 17 % na 12,5 %. U onemocnění MERS byla terapie také navržena, ale nebyla vyzkoušena. U SARS-CoV-2 léčba pomocí rekonvalescentní plazmy do značné míry selhala. V populaci neexistuje žádná předchozí imunita proti tomuto patogenu. Specifické protilátky se ve vzorcích začaly objevovat od podzimu 2020 a vzhledem k požadavkům karantény (6 až 12 měsíců), trvalo poměrně dlouho, než byla plazma frakcionována a zpřístupněna pro terapeutické účely. V jednotlivých odběrech se nachází různé titry neutralizačních protilátek a výroba hyperimunního IgG by umožnila standardizaci léčby. Studie provedené u pacientů s covid-19, kterým se protilátková terapie aplikovala však ukázaly, že neexistuje žádný pozitivní účinek rekonvalescentní plazmy. Kromě nedostatečného obsahu a kvality neutralizačních protilátek, mohlo k těmto výsledkům přispět i špatné načasování zahájení léčby [38].

Léky potlačující přehnanou imunitní reakci organismu, tzv. imunomodulátory, v rámci klinických studií zlepšily prognózu pacientů s covid-19 a snížily riziko jejich úmrtí. Jejich podání je možné pouze v případě, že byla vyloučena superinfekce (bakteriální, fungální, virová), nebo byla již залéčena. Příkladem z této skupiny je dexamethason, který je podáván všem hospitalizovaným dospělým a dětem starším 12 let s váhou nad 40 kg, u nichž je nutná oxygenoterapie. Současně s kortikoidy a antikoagulanty je možné podávat baricitinib. Jedná se selektivní a reverzibilní inhibitor Janus kináz JAK1 a JAK2, lék je registrovaný pro léčbu revmatoidní artritidy a atopického ekzému. U onemocnění covid-19 inhibuje zánět a brání vstupu viru do buněk [36].

Další možností léčby je podávání monoklonálních protilátek. Příkladem je sotrovimab, protilátka proti části RBD, která je totožná u SARS-CoV a SARS-CoV-2. Podání je možné u dospělých a dětí nad 12 let a 40 kg. Monoklonální protilátka bamlanivimab je neutralizační protilátka IgG1. Mechanismem účinku je její navázání na spike protein SARS-CoV-2, čímž brání vazbě viru na receptor ACE2 a vstupu do hostitelské buňky. Bamlanivimab byla vyvinuta podle vzoru lidské protilátky, jež pocházela z rekonvalescentní plazmy jednoho z prvních uzdravených pacientů s covid-19. V kombinaci s protilátkou etesevimab vykazuje účinnost proti variantám beta, gama i omikron. Pacientům s variantami alfa a delta se podává infuze s kombinací protilátek casirivimab a imdevimab. Možnou kontraindikací je předchozí

hypersenzitivní reakce po aplikaci monoklonálních protilátek, nebyly pozorovány známky klinicky významné lékové interakce [36].

V rámci výzkumu neúčinnější léčby se zkoumaly i některé alternativní terapie. Jako antibakteriální a protizánětlivá léčba se využívá ozonoterapie. Ozon je přirozeně se vyskytující molekula plynu. V boji proti virům může působit poškozením jejich kapsidy a rozrušením kontaktu mezi virem a buňkou peroxidací. Případně může molekula ozonu difundovat přes proteinový obal a interagovat s virovou RNA. Další možností je laserová terapie, kdy se virus inaktivuje ultrakrátkými pulzy laserového záření. Primární germicidní prostředek používaný k inaktivaci virů s RNA nebo DNA genomy je UV záření. Nevýhodou je zničení přilehlých buněk [39].

Pokud u pacienta dojde k akutnímu těžkému hypoxemickému respiračnímu selhání vyžaduje jeho léčba intenzivní péči. Jejím základem je konvenční oxygenoterapie, v případě její neúčinnosti následuje vysokoprůtoková nosní oxygenoterapie. U pacientů s akutním zhoršením chronických onemocnění jako je například chronická obstrukční plicní nemoc, s akutním kardiogenním plicním edémem, spánkovou obstrukční apnoí nebo syndromem alveolární hypoventilace při obezitě se aplikuje neinvazivní ventilace. V nejtěžších případech je využíváno umělé plicní ventilace [36].

3.5.3 Prevence

Obecně lze prevenci rozdělit na specifickou a nespecifickou. Nespecifická prevence zahrnuje opatření, která mohou zmírnit šíření i jiných kapénkově nebo kontaktem přenášených infekcí, nejen covidu-19. Platí zde pravidlo 3R – respirátory, rozestupy a ruce. Zakrytí nosu a úst respirátorem se ukázalo jako velmi účinné opatření. U infekčních osob brání šíření infekce do okolí a zdravé chrání před nakažením od nemocných. Podmínkou je, aby byl respirátor správně nasazený a pravidelně vyměňovaný. Důležité je také nedotýkat se při používání jeho zevní strany. Ve zdravotnických a některých dalších rizikových zařízeních se pro větší ochranu respirátory kombinují s nošením ochranného štítu. Dodržování rozestupů o minimálně jednom metru a vyhýbání se místům s větší koncentrací lidí může výrazně snížit riziko infekce. Neúčinnější možností je úplná eliminace kontaktu s nemocnými. Třetím bodem je pravidelné mytí rukou mýdlem a vodou po dobu nejméně 20 sekund, případně jejich dezinfekce prostředky na bázi alkoholu. Další doporučení pro nespecifickou prevenci je například užívání vitamínů pro posílení imunity, dodržování bezpečné manipulace se zvířaty, zvlhčování nosní sliznice solnými roztoky a časté větrání prostor [40].

Specifickou prevencí je očkování. Vakcíny proti SARS-CoV-2 spouští imunitní reakci vytvořením protilátek proti S proteinu nebo podjednotkám RBD s následnou aktivací T-lymfocytů. Neutralizační protilátky zabraňují virovým špičkám ve vazbě a vstupu do lidských buněk, čímž dojde k zániku infekce. K 5. lednu 2022 bylo národním regulačním úřadům hlášeno 24 vakcín, z nichž 10 organizace WHO schválila k použití. Vakcíny se dělí do dvou hlavních skupin – klasická platforma a platforma nové generace. Klasická platforma zahrnuje vakcíny inaktivované, živé atenuované a vakcíny na bázi virových proteinových podjednotek. Inaktivovaná vakcína spouští imunitní reakci v návaznosti na existenci celého viru s jeho různými povrchovými antigeny. Její výroba spočívá v několika krocích – proliferace živého viru pomocí buněčné kultivace, zpracování pro zotavení, inaktivace chemickými látkami pro ukončení buněčné infekčnosti a udržení imunogenicity. Nevýhodou tohoto typu vakcín je nízká stabilita a krátká doba působení. K prodloužení trvání imunitní odpovědi se přidávají různá adjuvantia. Na trhu jsou dostupné inaktivované vakcíny Sinopharm, Sinovac a Covaxin. Živé atenuované vakcíny vznikají snížením virulence živého patogenního viru. Vyvolávají vysokou dlouhotrvající imunitní odpověď, která zahrnuje aktivaci toll-like receptoru bez přidání adjuvans kvůli jejich obsahu multivalentních antigenů, jež poskytují silný obranný účinek proti novým variantám. Nevýhodou je obtížná výroba a nevhodnost pro pacienty s oslabeným imunitním systémem. Vakcíny na bázi virových proteinových podjednotek jsou bezpečnější než celé virové vakcíny. Jejich výroba vyžaduje selekci, izolaci a čištění virového proteinu. Často se k podjednotkám S nebo RBD přidávají adjuvans ke spuštění rozšířenější imunitní odpovědi a aktivaci produkce neutralizačních protilátek. Vakcíny Covovax a Nuvaxoid obsahují rekombinantní S proteinové nanočástice SARS-CoV-2 a jsou schopné vyvolat silnou humorální i buněčnou odpověď. Vakcíny nové generace zahrnují vakcíny založené na virovém vektoru, mRNA konstruované vakcíny a DNA konstruované vakcíny. Virový vektor přenáší geny SARS-CoV-2 antigenů do hostitelských buněk, čímž spustí imunitní reakci. Tyto vakcíny se vyvíjí delecí patogenních genů, případně jejich replikací. Geny nejsou začleněny do hostitelského genomu, takže jsou neškodné a odpověď imunitního systému je vyšší než u vakcín na bázi virových proteinů. Konkrétní schválené vakcíny jsou Janssen, Vaxzevria a Covishield. Vakcína Janssen obsahuje lidskou rekombinantní replikačně nekompletní formu adenovirového vektoru sérotypu 26, včetně sekvence genu S viru SARS-CoV-2. Vysokou účinnost vykazují mRNA vakcíny, jejich výhodou je bezpečnost a rychlá výroba. Vakcína obsahuje virovou mRNA, která je uvnitř LNP (lipidové nano-partikule). Po očkování dojde k degradaci lipidové vrstvy, uvolněná mRNA je pak dostupná buněčnému translačnímu aparátu pro produkci odpovídajícího virového proteinu,

který po přenosu do plazmatické membrány vyvolá buněčnou a humorální odpověď organismu. Schválené mRNA vakcíny jsou Comirnaty a Moderna. DNA vakcíny využívají bakteriálních DNA plazmidů, jež obsahují genové sekvence pro kódování SARS-CoV-2 proteinu S nebo podjednotek RBD a promotory exprese savčího typu. Tyto plazmidy pronikají jadernou membránou B-lymfocytů a poté kódují požadovaný protein. Nevýhodou je možnost začlenění genů do genomu hostitelských buněk, což může vést ke vzniku nových mutací. V srpnu 2021 získala nouzové povolení k použití proti covid-19 DNA vakcína ZyCoV-D, kterou vytvořila indická farmaceutická společnost Zydus Cadila [20].

4 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá základní charakteristikou koronavirů. Je zaměřena na molekulární vlastnosti nového koronaviru SARS-CoV-2, jeho genom, strukturní proteiny a mechanismus nakažení hostitelské buňky. Jsou zde popsány možnosti původu viru a vybrané mutagenní změny společně s jejich klinickým významem. Dále je charakterizováno onemocnění covid-19, včetně dostupných diagnostických metod, možností léčby a prevence. SARS-CoV-2 se v současné době stále vyskytuje v lidské populaci a dochází u něj k dalšímu vývoji, proto i nadále zůstává předmětem intenzivního výzkumu mnoha vědeckých týmů po celém světě.

5 Použitá literatura

- [1] WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. *World Health Organization*. 2023. [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>
- [2] LOUITEN, J. Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology*. 2016; 19-29. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>
- [3] AIRTECNICS. OH technology against viruses: Tests. *Airtècnics*. [cit. 2023-07-10]. Dostupné z: <https://www.airtecnics.com/technology/oh-technology-against-viruses-tests>
- [4] ZHANG, Y., W. WU, M. SHI a E. C. HOLMES. The diversity, evolution and origins of vertebrate RNA viruses. *Current Opinion in Virology*. 2018; (31), 9-16. doi:[10.1016/j.coviro.2018.07.017](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.017)
- [5] KOLAKOFSKY, D. A short biased history of RNA viruses. *RNA*. 2015; 21 (4), 667–669. doi:[10.1261/rna.049916.115](https://doi.org/10.1261/rna.049916.115)
- [6] WOOLHOUSE, M. E. J., K. ADAIR a L. BRIERLEY. RNA Viruses: A Case Study of the Biology of Emerging Infectious Diseases. *Microbiology Spectrum*. 2013; (1), 1-11. doi:<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.oh-0001-201>
- [7] EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Cluster of pneumonia cases caused by a novel coronavirus, Wuhan, China. *Rapid Risk Assessment*. 2020; 1-10.
- [8] COSAR, B., Z. Y. KARAGULLEOGLU, S. UNAL, A. T. INCE, D. B. UNCUOGLU, G. TUNCER, B. R. KILINC, Y. E. OZKAN, H. C. OZKOC, I. N. DEMIR, A. EKER, F. KARAGOZ, S. Y. SIMSEK, B. YASAR, M. PALA, A. DEMIR, I. N. ATAK, A. H. MENDI, V. U. BENGI, G. C. SEVAL, E. G. ALTUNTAS, P. KILIC a D. DEMIR-DORA. SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2022; (63), 10-22. doi:[10.1016/j.cytogfr.2021.06.001](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001)

- [9] FENG, D., S. J. DE VLAS, L. FANG, X. HAN, W. ZHAO, S. SHENG, H. YANG, Z. JIA, J. H. RICHARDUS a W. CAO. The SARS epidemic in mainland China: bringing together all epidemiological data. *Tropical Medicine and International Health*. 2009; (14), 4-13. doi:10.1111/j.1365-3156.2008.02145.x
- [10] PRYMULA, R. a M. ŠPLIŇO. *SARS: Syndrom akutního respiračního selhání*. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1550-3.
- [11] RASTOGI, M., N. PANDEY, A. SHUKLA a S. K. SINGH. SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory research*. 2020; (21), 318. doi:https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z
- [12] ZHANG, J., T. XIAO, Y. CAI a B. CHEN. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology*. 2021; (50), 173-182. doi:https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010
- [13] WANG, M., R. ZHAO, L. GAO, X. GAO, D. WANG a J. CAO. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020; (10), 587269. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
- [14] ZHOU, S., P. LV, M. LI, Z. CHEN, H. XIN, S. REILLY a X. ZHANG. SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023; (159), 114242. doi:10.1016/j.biopha.2023.114242
- [15] DECARO, N. a A. LORUSSO. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*. 2020; (244), 108693. doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693
- [16] GORKHALI, R., P. KOIRALA, S. RIJAL, A. MAINALI, A. BARAL a H. K. BHATTARAI. Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2021; (15), 1-32. doi:10.1177/11779322211025876
- [17] LOW, Z. Y., N. Z. ZABIDI, A. J. W. YIP, A. PUNIYAMURTI, V. T. K. CHOW a S. K. LAL. SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins and Their Roles in Host Immune Evasion. *Viruses*. 2022; 14 (9), 1991. doi:10.3390/v14091991

- [18] KHATEEB, J., Y. LI a H. ZHANG. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern and potential intervention approaches. *Critical Care*. 2021; (25), 244. doi:<https://doi.org/10.1186/s13054-021-03662-x>
- [19] WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. *World Health Organization*. 2022. [cit. 2023-07-10]. Dostupné z: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- [20] ABULSOUD, A. I., H. M. EL-HUSSEINY, A. A. EL-HUSSEINY, H. A. EL-MAHDY, A. ISMAIL, S. Y. ELKHAWAGA, E. G. KHIDR, D. FATHI, E. A. MADY, A. NAJDA, M. ALGAHTANI, A. THEYAB, K. F. ALSHARIF, A. ALBRAKATI, R. BAYRAM, M. M. ABDEL-DAIM a A. S. DOGHISH. Mutations in SARS-CoV-2: Insights on structure, variants, vaccines, and biomedical interventions. *Biomed Pharmacother*. 2023; (157), 113977. doi:10.1016/j.biopha.2022.113977
- [21] SEGRETO, R. a Y. DEIGIN. The genetic structure of SARS-CoV-2 does not rule out a laboratory origin. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2020; 43 (3), 202000240. doi:10.1002/bies.202000240
- [22] ZAYED, R. A., D. OMAR a A. A. ZAYED. COVID-19 clinical and laboratory diagnosis overview. *Journal of the Egyptian Public Health Association*. 2021; 96 (1), 25. doi:10.1186/s42506-021-00087-w
- [23] RUIZ-MEDINA, B. E., A. VERELA-RAMIREZ, R. A. KIRKEN a E. ROBLES-ESCAJEDA. The SARS-CoV-2 origin dilemma: Zoonotic transfer or laboratory leak? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2021; 44 (1), 202100189. doi:10.1002/bies.202100189
- [24] ANDERSEN, K. G., A. RAMBAUT, W. LIPKIN, E. C. HOLMES a R. F. GARRY. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. 2020; (26), 450-452. doi:<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- [25] GORACY, A., J. ROSIK, B. SZOSTAK, L. USTIANOWSKI, K. USTIANOWSKA a J. GORACY. Human Cell Organelles in SARS-CoV-2 Infection: An Up-to-Date Overview. *Viruses*. 2022; 14 (5), 1092. doi:10.3390/v14051092

- [26] NITIN, P., R. NANDHAKUMAR, B. VIDHYA, S. RAJESH a A. SAKUNTHALA. COVID-19: Invasion, pathogenesis and possible cure. *Journal of Virological Methods*. 2021; (300), 114434. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114434>
- [27] TANG, T., M. BIDON, J. A. JAIMES, G. R. WHITTAKER a S. DANIEL. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research*. 2020; (178), 104792. doi:<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- [28] SAHIN, E. M., O. OCAK, C. DEMIRAL a B. DONMEZ. COVID-19 Symptoms at First Admission to Hospital. *Konuralp Medical Journal*. 2021; 13 (2), 265-272. doi:[10.18521/ktd.893195](https://doi.org/10.18521/ktd.893195)
- [29] ALAY, H., F. KESMEZ CAN, S. YILMAZ, A. ALBAYRAK, Z. OZKURT, K. OZDEN, E. PARLAK, E. TEKIN a A. O. KOCAK. Gastrointestinal Symptoms and Liver Damage in Patients with COVID-19. *Flora*. 2021; 26 (2), 249-256. doi:[10.5578/flora.20219801](https://doi.org/10.5578/flora.20219801)
- [30] SAVTALE, S., P. HIPPARGEKAR, S. BHISE a S. KOTHULE. Prevalence of Otorhinolaryngological Symptoms in Covid 19 Patient. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*. 2022; 74 (2), 3378-3384. doi:[10.1007/s12070-021-02410-5](https://doi.org/10.1007/s12070-021-02410-5)
- [31] YELLUMAHANTHI, D. K., B. BARNETT, S. BARNETT a S. YELLUMAHANTHI. COVID-19 Infection: Its Lingering Symptoms in Adults. *Cureus*. 2022; 14 (5), 24736. doi:[10.7759/cureus.24736](https://doi.org/10.7759/cureus.24736)
- [32] MELO, M.M., M.M.R. NETA, A.R.S. NETO, A. R. B. CARVALHO, R. L. B. MAGALHAES, A. R. M. C. VALLE, J. H. L. FERREIRA, K. M. J. ALIAGA, M. E. B. MOURA a D. R. J. FREITAS. Symptoms of COVID-19 in children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2022; (55), 12038. doi:[10.1590/1414-431X2022e12038](https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e12038)
- [33] LI, C., C. ZHAO, J. BAO, B. TANG, Y. WANG a B. GU. Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2020; (510), 35-46. doi:[10.1016/j.cca.2020.06.045](https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.045)

- [34] SHEIKHI, K., H. SHIRZADFAR a M. SHEIKHI. A Review on Novel Coronavirus (Covid-19): Symptoms, Transmission and Diagnosis Tests. *Research in Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2020; (2), 1-8. doi:10.33702/ridtm.2020.2.1.1
- [35] JANIK, E., M. NIEMCEWICZ, M. PODOGROCKI, J. SALUK-BIJAK a M. BIJAK. Existing Drugs Considered as Promising in COVID-19 Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (11), 5434. doi:10.3390/ijms22115434
- [36] ŠTEFAN, M., A. CHRDLÉ, P. HUSA, J. BENEŠ a P. DLOUHÝ. Covid-19: diagnostika a léčba: Doporučený postup Společnosti infekčního lékařství ČLS JEP. *Společnost infekčního lékařství*. 2022; 1-64.
- [37] AGOSTINI, M. L., A. J. PRUIJSSERS, J. D. CHAPPELL, J. GRIBBLE, X. LU, E. L. ANDRES, G. R. BLUEMLING, M. A. LOCKWOOD, T. P. SHEAHAN, A. C. SIMS, M. G. NATCHUS, M. SAINDANE, A. A. KOLYKHALOV, G. R. PAINTER, R. S. BARIC a M. R. DENISON. Small-Molecule Antiviral β -d-N4-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *Journal of virology*. 2019; 93 (24), 01348-19. doi:10.1128/JVI.01348-19
- [38] HAMMARSTRÖM, L., H. MARCOTTE, A. PIRALLA, F. BALDANTI a Q. PAN-HAMMARSTRÖM. Antibody therapy for COVID-19. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2021; 21 (6), 553-558. doi:10.1097/ACI.0000000000000787
- [39] SUNDARARAJAN, G., P. J. ISAAC, V. ANDAL a R. LAKSHMIPATHY. Alternative therapies for Covid-19. *Materials today. Proceedings*. 2021; (55), 327-329. doi:10.1016/j.matpr.2021.07.501
- [40] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV. COVID-19: možnosti prevence|NZIP. *NZIP - Národní zdravotnický informační portál*. 2021. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1069-covid-19-moznosti-prevence>