



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Laboratorní diagnostika SARS-CoV-2
v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/
ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Eliška Sokolová

Vedoucí práce: RNDr. Jana Fleischmannová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Laboratorní diagnostika SARS-CoV-2 v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29.4. 2022

.....

Eliška Sokolová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své vedoucí, RNDr. Janě Fleischmannové, Ph.D., za její odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Mé poděkování patří rovněž celému týmu oddělení ÚKMAS Nemocnice Strakonice, a.s., pod vedením paní primářky PharmDr. Evy Šimečkové, za poskytnutí příjemného prostředí a cenných rad během praktické části mé práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu po celou dobu mého studia.

Laboratorní diagnostika SARS-CoV-2 v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21

Abstrakt

V prosinci 2019 byl v Číně objevený nový druh β -koronaviru SARS-CoV-2, který způsobuje onemocnění COVID-19. Zlatým standardem laboratorní diagnostiky je RT-PCR v reálném čase. Další alternativu přímého průkazu SARS-CoV-2 představují antigenní testy.

V období leden–únor 2021 byla metodou real-time RT-PCR ověřována spolehlivost antigenních testů od firmy Abbott. U 48 vzorků, které měly pozitivní antigenní test, bylo následně prováděno referenční PCR vyšetření. Pouze 1 osoba vykazovala falešně pozitivní reakci antigenního testu. Současně bylo PCR metodou vyšetřováno i 80 konsekutivních vzorků od symptomatických pacientů Nemocnice Strakonice, a.s., kteří měli negativní antigenní test. Celkem 16 osob vykazovalo falešně negativní reakci.

Dále byl zpracován statistický přehled PCR testů provedených v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. v roce 2020/21. V tomto období bylo vyšetřeno celkem 78 222 vzorků, z toho 17 622 osob s pozitivním výsledkem. Za nejvíce kritické pandemické období je považováno jaro 2021, kdy procento positivity všech vyšetřených osob dosáhlo 45,8 %. Zajímavým zjištěním byla vysoká míra positivity v kategorii 60+. Naopak v podzimní vlně 2021 bylo zaznamenáno vysoké procento positivity u dětí do 15 let, které se do té doby testovaly minimálně.

Real-time RT-PCR je časově i finančně náročná metoda a vyžaduje kvalifikovaný personál pro její provedení. Naopak antigenní testy představují rychlou a jednoduchou variantu možné detekce SARS-CoV-2. V POCT režimu jsou kvalitní antigenní testy spolehlivou alternativou testování, a to převážně u symptomatických jedinců. V důsledku výskytu falešně negativních reakcí, je i přesto doporučováno ověřovat negativní antigenní výsledky pomocí PCR.

Klíčová slova

Koronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; real-time RT-PCR; antigenní testy

Laboratory diagnostics of SARS-CoV-2 at Nemocnice Strakonice, a.s. in 2020/21

Abstract

In December 2019, a new type of β -coronavirus SARS-CoV-2 was discovered in China causing COVID-19. The gold standard of laboratory diagnostics is real-time RT-PCR. Antigen testing is another alternative for the direct detection of SARS-CoV-2.

From January to February 2021, the reliability of antigen tests from Abbott was verified by real-time RT-PCR. Out of the 48 antigen-positive samples, only one patient was tested PCR negative. At the same time, 80 consecutive samples from symptomatic patients at *Nemocnice Strakonice, a.s.* were examined by PCR, which were tested negative by the antigen tests. Among these samples, 16 were tested PCR positive.

The statistics of PCR tests performed in the Central Laboratories of the *Nemocnice Strakonice, a.s.* in 2020/21 was elaborated. During this period, 78,222 samples were examined, of which 17,622 had a positive result. The most critical pandemic period was considered spring 2021, when all samples' positivity amounted to 45,8 %. An interesting fact was the high level of positivity in the category 60+. Contrary to the spring wave in 2021 – in autumn 2021, a high positivity was appeared in the category of children under 15 years old, who had been tested minimally until that time.

Real-time RT-PCR is a time-consuming and costly method, which requires a qualified laboratory staff. On the contrary, antigen tests are a quick and easy alternative to direct detecting SARS-CoV-2. In the POCT mode, high-quality antigen tests are a reliable alternative, primarily for symptomatic individuals. Nevertheless, it is advised to confirm negative antigen results using PCR to prevent a false-negative antigen reaction.

Keywords

Coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; real-time RT-PCR; antigen tests

OBSAH

Úvod	8
1 Viry	9
2 Koronaviry	9
2.1 Stavba	10
2.2 Klasifikace	10
2.3 Lidské koronaviry	10
3 SARS-CoV-2 = onemocnění COVID-19	12
3.1 Charakteristika	13
3.2 Klinické projevy	14
3.3 Průběh onemocnění	14
3.4 Přenos	15
3.5 Nakažlivost, infekčnost	15
3.6 Prevence a vakcinace	16
3.7 Léčba	17
3.8 Varianty	18
3.9 Epidemiologie v ČR za rok 2020/21	18
4 Laboratorní diagnostika SARS-CoV-2.....	20
4.1 Real-time RT-PCR	21
4.1.1 Odběr a transport vzorku	21
4.1.2 Izolace	21
4.1.3 Reverzní transkripce	21
4.1.4 Amplifikace	22
4.1.5 Detekce genů SARS-CoV-2 a interpretace výsledků	23
4.2 Průkaz antigenu SARS-CoV-2.....	23
4.3 Vyšetření protilátek proti SARS-CoV-2	24
5 Cíle práce a hypotézy	25

6	Metodika.....	25
6.1.	Odběr materiálu	25
6.2.	Real-time RT-PCR.....	26
6.2.1.	Liferiver	26
6.2.1.1.	Příprava vzorků k vyšetření	27
6.2.1.2.	Izolace RNA	27
6.2.1.3.	Master Mix.....	30
6.2.1.4.	Detekce	31
6.2.1.5.	Vyhodnocení a interpretace výsledků vyšetření	34
6.2.2.	Xpert Xpress SARS-CoV-2.....	36
6.3.	Antigenní testování.....	38
6.4.	Výběr a zpracování dat.....	40
7	Výsledky	41
7.1.	Statistický přehled PCR vyšetření v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21	41
7.1.1.	Časový vývoj procenta pozitivitu u všech pacientů.....	44
7.1.2.	Časový vývoj procenta pozitivitu dle věku.....	46
7.1.3.	Časový vývoj procenta pozitivitu dle pohlaví.....	50
7.2.	Stanovení procenta falešně pozitivních výsledků antigenních testů.....	52
7.3.	Stanovení procenta falešně negativních výsledků antigenních testů	52
7.4.	Pozitivní antigenní i PCR test.....	54
8	Diskuse.....	57
9	Závěr	61
10	Citovaná literatura	63
11	Seznam příloh	70
12	Seznam zkratk.....	73

Úvod

SARS-CoV-2 je nově objevený druh koronaviru, který způsobuje onemocnění COVID-19. První případ výskytu byl popsán v prosinci 2019 v čínském městě Wu-chan. V tu dobu by asi nikoho z nás nenapadlo, jak rychle se SARS-CoV-2 rozšíří po celém světě, a jaký bude mít dopad na celou naši planetu.

COVID-19 je akutní infekční onemocnění, které postihuje zejména respirační trakt a přenáší se především kapénkovou cestou. Mezi základní symptomy patří kašel, dušnost, zvýšená teplota či bolest svalů a kloubů. Později byly zjištěny i další příznaky spojené s tímto onemocněním: rýma, průjem, únava, malátnost, bolest v krku, ztráta chuti a čichu. Průběh COVID-19 je ve většině případů mírný až asymptomatický a nepřináší žádné komplikace. Ke zhoršení zdravotního stavu dochází především u pacientů starších 60 let a osob s komorbiditami. Nejčastější komplikací je poškození dolních cest dýchacích, které se vyvine v pneumonii nebo ARDS a může vést až ke smrti. Tito pacienti vyžadují hospitalizaci a často jsou odkázáni na oxygenoterapii, v horším případě na umělou plicní ventilaci. I přes intenzivní péči mnozí z nich umírají.

Stěžejním pro zvládnutí pandemie COVID-19 je především (i) očkování, které s vysokou účinností chrání před těžkým průběhem onemocnění, (ii) omezení šíření SARS-CoV-2 pomocí protiepidemických opatření (hygiena rukou, dodržování rozestupů, nošení ochranných pomůcek, izolace nakažených osob a jejich kontaktů), (iii) a v neposlední řadě včasná terapie rizikových pacientů. Pro nastavení protiepidemických opatření i zahájení adekvátní léčby je nezbytná široce dostupná, rychlá a spolehlivá laboratorní diagnostika.

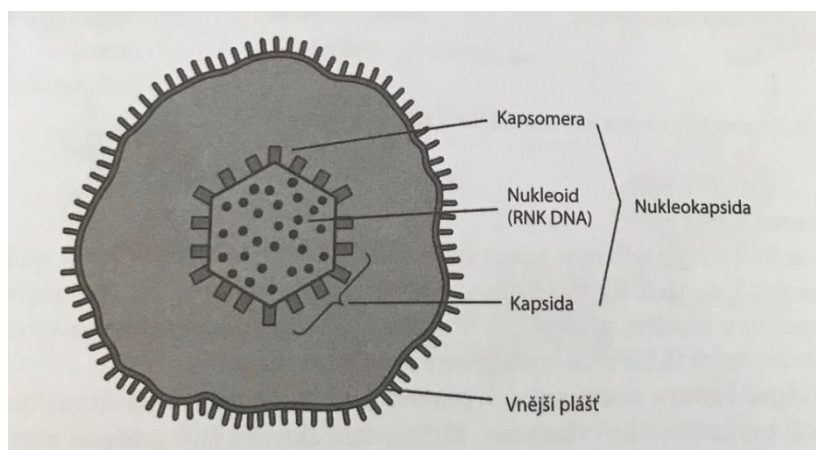
Zlatým standardem laboratorní diagnostiky SARS-CoV-2 je metoda přímého průkazu real-time RT-PCR. Nejčastěji používaným biologickým materiálem pro vyšetření je výtěr ze sliznice nosohltanu a sliny, kde předpokládáme největší koncentrace virových částic. Pozitivní PCR výsledek značí přítomnost genetické informace viru ve vyšetřovaném vzorku, spolu s klinickým stavem pacienta potvrzuje diagnózu COVID-19. Levnější, rychlejší, ale méně přesnou metodu detekce, představují antigenní testy.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na praktické osvojení metod přímého průkazu (real-time RT-PCR a antigenní testy), zpracování statistického přehledu PCR vyšetření a ověření spolehlivosti antigenních testů od firmy Abbott metodou real-time RT-PCR.

1 Viry

Viry můžeme charakterizovat jako malá infekční agens. Jejich velikost je velmi rozmanitá, pohybuje se v rozmezí 20-300 nm (Hamplová et al., 2015). Jedná se o intracelulární organismy. Jejich existence je zcela závislá na hostitelských buňkách, které využívají pro své rozmnožování, jelikož nemají vlastní proteosyntetický aparát. Svou přítomností mohou viry poškozovat hostitelské buňky a vyvolávat různá infekční onemocnění (Kolářová et al., 2020).

Infekční virová částice je známa jako virion. Jeho vnitřní část se označuje jako nukleoid, který je tvořen nukleovou kyselinou. Viry vždy obsahují pouze jeden typ nukleové kyseliny – buď DNA (deoxyribonukleová kyselina), nebo RNA (ribonukleová kyselina). (Votava, 2003). Okolo ní se nachází bílkovinný obal – kapsida, která je tvořena z jednotlivých proteinových podjednotek – kapsomer. Kapsidy dle symetrie můžeme rozdělit na kubické a helikální (Bednář et al., 1996). Nejjednodušší viry se skládají z nukleové kyseliny a kapsidy (nukleokapsida), lze je označit jako neobalené. Některé druhy virů mají navíc membránový obal a na svém povrchu nesou glykoproteiny, pomocí nichž se virion může vázat na specifické receptory a vniknout do hostitelské buňky. Tuto skupinu nazýváme jako viry obalené (Votava, 2003).



Obrázek 1 – Virová částice – virion (Hamplová et al., 2015)

2 Koronaviry

Objev koronavirů se datuje do 60. let minulého století. Název získaly na základě svého vzhledu – pod elektronovým mikroskopem vypadá jejich membránový obal jako sluneční koróna (lat. *corona*) (Hubáček, 2020).

Koronaviry se vyskytují po celém světě a infikují jak člověka, tak různé druhy zvířat, především ptáky a savce. Mezi nejčastěji vyvolaná onemocnění u člověka a zvířat patří choroby respiračního a gastrointestinálního traktu (Státní zdravotní ústav, 2021).

2.1 Stavba

Koronaviry spadají do skupiny obalených virů s jednovláknovou RNA, která má pozitivní polaritu. Jejich kapsida se řadí do skupiny s helikální symetrií (Bednář et al., 1996). Tvar nukleokapsidy je nejčastěji kulatý či eliptický (Trojánek et al., 2020). Velikost virionu se pohybuje v rozmezí 60-140 nm, genom je pak tvořen kolem 27-32 tisíc bází a obsahuje 6-11 otevřených čtecích rámců (Hubáček, 2020).

2.2 Klasifikace

V současné době existují přibližně čtyři desítky známých druhů koronavirů. Taxonomicky jsou řazeny do řádu *Nidovirales*, čeledi *Coronaviridae*, kterou tvoří 2 podčeledi – *Coronavirinae* a *Torovirinae* (Hubáček, 2020). Podčeď *Coronavirinae* rozdělujeme do 4 rodů: α -, β -, γ - a δ -koronaviry. γ - a δ -koronaviry infikují ptáky a savce, nejsou ale charakterizovány jako přenosné na člověka. Lze je též označit jako zvířecí koronaviry. Jsou patogenní pro celou řadu domácích a hospodářských zvířat (skot, prasata, hlodavci, kočky, ptáci). Zapříčiňují nejen respirační infekce, ale i onemocnění trávicího traktu nebo nervové soustavy (Poljak, 2003). α -, β -koronaviry nazýváme jako lidské (Hubáček, 2020).

2.3. Lidské koronaviry

V současné době je známo 7 druhů lidských koronavirů. Do rodu α -koronavirus řadíme HCoV-229E (lidský koronavirus 229E) a HCoVNL63 (lidský koronavirus NL63). Mezi β -koronaviry spadá HCoV-OC43 (lidský koronavirus OC43), HCoVHKU1 (lidský koronavirus HKU-1), MERS-CoV (Middle-East respiratory syndrom virus), SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome-related virus) a nejnověji objevený SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related virus 2) (Alanagreh et al., 2020).

Přehled, taxonomie a vlastnosti jednotlivých druhů jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Za nejvýznamnější zástupce lidských koronavirů považujeme SARS-CoV, MERS-CoV a SARS-CoV-2 (Chan a Chan, 2013).

MERS-CoV byl jako nový β -koronavirus popsán v roce 2012 v Saudské Arábii. Způsobuje akutní respirační onemocnění a postihuje i ledviny. Jedná se o zootonickou infekci – k přenosu viru dochází ze zvířete na člověka, ale přenos mezi lidmi je také možný (Ramadan a Shaib, 2019). Počáteční symptomy působí nenápadně, projevují se jako běžné nachlazení. Ke zhoršení stavu dochází převážně u osob s komorbiditami a projevuje se pneumonií, akutní nefritidou nebo šokem. Smrtnost je poměrně vysoká, uvádí se, že až 1/3 infikovaných zemře. Tento fakt však může být zkreslený nedagnostikovanými asymptomatickými infekcemi. Laboratorní diagnostika se provádí metodou real-time RT-PCR, stejně jako u koronaviru SARS-CoV-2. V současné době není k dispozici žádná specifická léčba ani vakcína proti tomuto onemocnění (Ramadan a Shaib, 2019).

SARS-CoV je lidský druh koronaviru, který způsobuje těžké akutní respirační onemocnění. Na konci roku 2002 došlo v Číně k výskytu atypických pneumonií počátkem roku 2003 byl jako původce označen nový koronavirus SARS-CoV. V polovině 2003 epidemie ustoupila, následně se objevilo jen několik laboratorních případů. Malá epidemie byla zaznamenána ještě v roce 2004 (Chan a Chan, 2013).

Specifickými symptomy bývají vysoké teploty nad 38 °C, dušnost, suchý kašel, bolest svalů a celková slabost pacientů. Onemocnění může být provázeno také průjmem, bolestí v krku, hlavy a dalšími symptomy (Poljak, 2003). U dětské populace bývá průběh mírnější než u dospělých. U části pacientů dochází ke zhoršení stavu, stejně jako u MERS a SARS-CoV-2. To se projevuje dechovými potížemi, které se vyvíjí v zápal plic. Tito pacienti pak vyžadují intenzivní péči. Odhad letality se pohybuje kolem 10 %, u osob nad 60 let se zvyšuje až ke 45 % (Chan a Chan, 2013). Za zlatý standard laboratorní diagnostiky považujeme PCR metodu, podobně jako u ostatních koronavirů. Hlavní prevencí proti tomuto viru je dodržování protiepidemických opatření, terapie probíhá symptomaticky (Poljak, 2003).

Tabulka 1 – Přehled lidských koronavirů

Čeď a podčeď	Rod	Koronavirus	Rok popsání	Klinický obraz	Inkubační doba
<i>Coronaviridae – coronavirinae</i>	α - coronavirus	HCoV-229E	1966	Nachlazení, edém sliznic	2-5 dní
		HCoV-NL63	2004	Nachlazení, edém sliznic	2-4 dny
	β - coronavirus	HCoV-HKU-1	2005	Nachlazení, edém sliznic	2-4 dny
		HCoV-OC43	1967	Nachlazení, edém sliznic	2-5 dní
		SARS-CoV	2003	Respirační onemocnění, může způsobit těžší/život ohrožující průběh	2-11 dní
		MERS-CoV	2012	Respirační onemocnění, těžký/život ohrožující průběh	2-13 dní
		SARS-CoV-2	2019	Respirační onemocnění (asymptomatický, mírný, těžký/život ohrožující průběh)	2-14 dní

Zdroj: (Hubáček, 2020)

3 SARS-CoV-2 = onemocnění COVID-19

V prosinci 2019 se v čínském městě Wu-chan objevily případy virové pneumonie neznámé etiologie. Později byl jako původce onemocnění označen nový β -koronavirus. Nejprve byl pojmenován jako 2019-nCoV (novel coronavirus), poté se přejmenoval na dnes všem známý SARS-CoV-2 (Trojánec et al., 2020). Z genetického hlediska se velmi podobá koronaviřům MERS-CoV a SARS-CoV. Jeho původ není přesně popsán. S největší pravděpodobností se jedná o zoonotickou infekci, podobně jako u ostatních koronaviřů, a za rezervoár jsou považováni netopýři. Spekuluje se však o jiném intermediárním hostiteli, přesný mechanismus přenosu na člověka není doposud znám (Střížová et al., 2020).

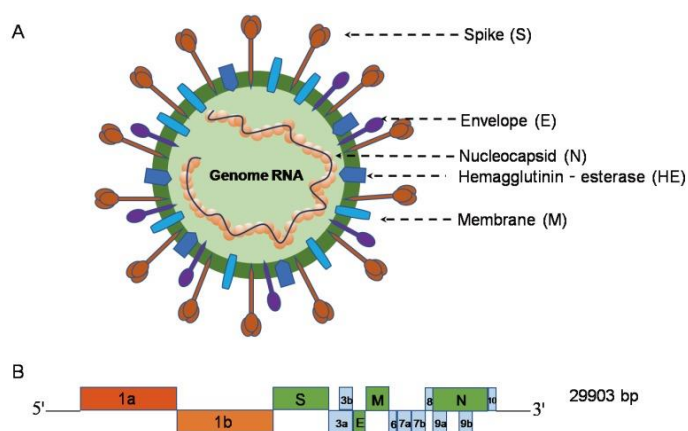
3.1. Charakteristika

Genom SARS-CoV-2 obsahuje přibližně 29 900 nukleotidů, které kóduje 16 nestrukturálních proteinů, označovaných jako nsp11-nsp16, 4 proteiny strukturální a různé další proteiny pomocného charakteru (Krafcikova et al., 2020).

Mezi strukturální proteiny řadíme povrchový (S) protein, obalový (E) protein, transmembránový (M) glykoprotein a vnitřní fosforylovaný nukleokapsidový (N) protein (Lin et al., 2020).

Povrch viru je obklopen lipidovým obalem, ze kterého vyčnívají S proteiny. Ty představují hlavní faktor virulence a zprostředkovávají vstup koronaviru do hostitelských buněk (Hu et al., 2021). M protein je společně s E proteinem umístěn mezi S proteiny v obalu viru (Krafcikova et al., 2020). Klíčová role M proteinů je tvorba a tvarování virionů a jedná se o nejhojněji zastoupený protein. E proteiny jsou nejméně zastoupené a jejich hlavní funkcí je uvolnit viriony z hostitelských buněk. Význam N proteinu spočívá v tvorbě nových virionů, váží se na virovou RNA v genomu a stabilizují její konformaci (Lin et al., 2020). Na povrchu obalu SARS-CoV-2 se nacházejí ještě další výběžky – glykoproteiny hemagglutinin-esteráza, jejichž hlavní funkcí je hemaglutinace a hemabsorpce virů (Krafcikova et al., 2020).

Základním principem vstupu SARS-CoV-2 do hostitelských buněk je interakce S proteinu s ACE2 (angiotenzin konvertující enzym 2) receptorem na povrchu epiračních epitelí. Uvnitř buněk dochází k množení virových částic a vyvolání infekce (Dlouhý et al., 2020).



Obrázek 2 – Stavba (A) a genom (B) SARS-CoV-2 (Jin et al., 2020)

3.2. *Klinické projevy*

Klinické projevy onemocnění COVID-19 jsou velmi různorodé. Mezi nejčastější symptomy patří horečka/zvýšená teplota, suchý dráždivý kašel, dušnost a bolest hlavy. Mezi další časté příznaky se řadí únava, malátnost, bolest svalů a kloubů. Méně časté jsou pak bolest v krku, rýma, průjem, nevolnost či zvracení (Beneš et al., 2021). Specifický, v mnoha případech primární, symptom představuje ztráta čichu (anosmie) a chuti (dysgenuzie). Alespoň jeden z této dvojice se vyskytuje až u 80 % infikovaných, z toho jedna pětina má oba symptomy synchronně (Hubáček, 2020).

Klinické projevy nejsou vždy zcela jednoznačné, působí až nenápadně. Často tomu tak bývá u starších lidí, kdy může dojít k neurčitému zhoršení stavu, doprovázeného zmateností, apatií, závratěmi nebo ataxií (Dlouhý et al., 2020).

3.3. *Průběh onemocnění*

Většina infikovaných má lehký a nekomplikovaný průběh. Za zcela asymptomatickou formu onemocnění COVID-19 považujeme stav, kdy nedojde k rozvinutí žádných výše zmíněných symptomů po celou dobu laboratorní positivity (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021). Podle zatím dostupných dat se bezpříznakový průběh vyskytuje u 10-50 % osob. Tato část jedinců představuje významné riziko v šíření onemocnění, jelikož nevědomě šíří virové partikule (Státní zdravotní ústav, 2021).

Dle závažnosti průběhu, můžeme onemocnění klasifikovat na formu mírnou, střední, závažnou a kritickou (Trojánek et al., 2020). Mírná forma se vyznačuje přítomností jednoho či více klinických projevů a je doprovázena akutní respirační infekcí. Nedochází však k radiologickému nálezu změn na plicích. Středně závažná forma už představuje významné riziko v rozvoji komplikací u respiračních obtíží. U infikovaných se vyvíjí pneumonie, kde již nacházíme přítomnost zánětlivých změn na plicích u zobrazovacích metod (Beneš et al., 2021). Za závažný průběh považujeme akutní selhání plic, kde radiologické známky změn plicního parenchymu překračují 50 %. Pacienti navíc vykazují tyto klinické projevy: značná tachypnoe – vyšší než 30/min, saturace hemoglobinu kyslíkem menší než 93 %, významná dušnost a respirační index pod 300 mmHg (Trojánek et al., 2020). Tato forma často přechází do kritického stavu. Pacienti trpí respiračním selháním a jsou odkázáni na umělou plicní ventilaci. Může nastat septický šok a selhání ostatních životně důležitých orgánů (Beneš et al., 2021).

Letalita (smrtnost) onemocnění COVID-19 se v jednotlivých státech liší, pohybuje se kolem 1-10 %. V České republice zemře přibližně 1,7 % s prokázaným onemocněním (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021). Závažná až smrtelná forma průběhu postihuje nejčastěji osoby starší 60 let, jedince s chronickým onemocněním plic, hypertenzí, kardiovaskulárním onemocněním, onkologické a diabetické pacienty a osoby s obezitou (Státní zdravotní ústav, 2021).

3.4. Přenos

Hlavní zdroj SARS-CoV-2 představuje nakažený člověk. Vstupní bránou koronaviru je nejčastěji sliznice nosu, úst a oční spojivka (Trojánek et al., 2020).

K přenosu infekce dochází různými způsoby. Nejčastější je přímý či nepřímý blízký kontakt s infikovanou osobou. Za úzký kontakt se považuje vzdálenost menší než dva metry (Dlouhý et al., 2020). Nakažený jedinec vylučuje z dýchacích cest infekční sekrety v podobě kapének či aerosolů, a to během kašláním, kýchání, mluvení či zpěvu. Další možnosti nákazy představuje přenos viru SARS-CoV-2 vzdušnou cestou nebo kontaminovanými předměty. Udává se, že virus na površích přežívá po dobu několika hodin až dnů. (Státní zdravotní ústav, 2021).

3.5. Nakažlivost, infekčnost

Nakažlivost tohoto onemocnění není přesně určena. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 2-14 dnů od expozice, s mediánem 5-6 dnů (Beneš et al., 2021). Udává se, že nakažená osoba je pro okolí infekční 48-72 hodin po vstupu viru do organismu, tedy 1-2 dny před propuknutím symptomů. U lehkých a středních forem onemocnění virus přežívá v organismu až 8 dní od prvních příznaků. Je ale nepravděpodobné, aby tyto osoby byly infekční 10 dní od prvních symptomů. U těžších průběhů se virus vyskytuje v organismu i déle, maximálně ale 14 dní po infekci. Tito jedinci mohou být infekční i více než 10 dnů (Státní zdravotní ústav, 2021). Množství virových partikulí, které potřebujeme pro vyvolání onemocnění, se odhaduje na více než 100-1000 částic (Stejskal, 2020). U symptomatické a asymptomatické formy onemocnění nebyly prokázány rozdíly ve virové náloži, proto jsou i bezpříznakoví jedinci stejně nebezpečným zdrojem nákazy (Dlouhý et al., 2020).

3.6. *Prevence a vakcinace*

Preventivní opatření směřují k zabránění dalšímu šíření COVID-19. Mezi populační doporučená opatření řadíme: vyhýbání se úzkému kontaktu s ostatními osobami, dodržování rozestupů minimálně 1 metr, nošení roušek a respirátorů, pravidelné mytí a dezinfekce rukou, omezení cestování a shlukování velkého množství lidí na veřejných místech (World Health Organization, 2022). Dalším základním opatřením je izolace osob s potvrzenou pozitivitou COVID-19 a trasování jejich kontaktů (Dlouhý et al., 2020). Ve zdravotnických zařízeních je na všechna tato výše uvedená opatření obzvlášť kladen důraz. Dochází zde k členění infekčních a suspektně rizikových osob, které jsou umístovány na speciálně vyčleněné COVID oddělení. Personál zařízení přistupuje k těmto pacientům za použití ochranného pláště, štítu, brýlí, jednorázových rukavic a respirátorů typu FFP2 nebo FFP3. Jako individuální prevence je doporučováno dodržování zdravého životního stylu a posilování imunitního systému (Střížová et al., 2020).

Vysoce účinnou a jedinou dlouhodobě udržitelnou formu zvládnutí epidemie COVID-19 představuje vakcinace. Očkování nezabrání přenosu viru do organismu, stále ale výrazně chrání před těžkým průběhem onemocnění, hospitalizací a smrtí. (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021). V současné době máme v České republice k dispozici 5 schválených vakcín proti COVID-19. Jejich přehled a vlastnosti jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 2). Vakcíny od společností Pfizer/BioNTech a Moderna jsou vhodné i pro očkování dětské populace (Pfizer pro osoby starší 5 let, Moderna pro osoby 12+). Očkovací látky od firem AstraZeneca, Johnson & Johnson a Novavax jsou určeny pouze pro dospělé. V současnosti dochází k přeočkování 3. (posilující) dávkou. Hladina protilátek v organismu v čase klesá, proto se posilující (booster) dávka doporučuje převážně ohroženým a vybraným skupinám osob. Její aplikace se doporučuje 5-12 měsíců po poslední dávce základního očkovacího schématu, u vakcíny od společnosti Johnson & Johnson je přeočkování doporučeno již po 2 měsících. Pro přeočkování jsou prozatím schváleny pouze mRNA vakcíny (SÚKL, 2022).

Tabulka 2 – Přehled schválených vakcín v ČR proti onemocnění COVID-19

Název (výrobce)	Druh vakcíny	Počet dávek, optimální odstup mezi nimi
Comirnaty (Pfizer/BioNTech)	mRNA	2 dávky, 21 dní
Spikevax (Moderna)	mRNA	2 dávky, 28 dní
Vaxzevria (Astra Zeneca/University of Oxford)	Vektorová	2 dávky, 12 týdnů
Janssen (Johnson & Johnson)	Vektorová	1 dávka
Nuvaxovid (Novavax)	Proteinová	2 dávky, 21 dní

Zdroj: (SÚKL, 2022)

3.7. Léčba

Jako specifickou terapii používáme řadu experimentálních léčiv, jejichž cílem je zabránit progresi infekce a rozvoji komplikací (Stejskal, 2020). Nejvýznamnější je antivirotikum Remdesivir, které je již v ČR registrováno k léčbě COVID-19. Využívá se u hospitalizovaných pacientů se zápallem plic a nasazuje se v časně fázi infekce (Beneš et al., 2021).

Zpočátku epidemie se hojně využívala imunoterapie rekonvalescentní plazmou. Jedná se o plazmu odebranou od osob s prodělaným onemocněním COVID-19 (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021). V současnosti tuto metodu nahradila léčba za použití monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky (MAB) proti SARS-CoV-2 charakterizujeme jako neutralizační protilátky proti různým epitopům na S proteinu. Principem je zabránění vazby S proteinu na ACE2 receptor na hostitelské buňce. Léčbu se doporučuje započít v co nejvíce časně fázi onemocnění (Býma et al., 2021). Některé druhy MAB lze použít i jako postexpoziční profylaxi (u rizikových osob, které byly vystaveny nákaze), případně i jako preexpoziční profylaxi (u imunosupresivních jedinců s neúčinnou či nedostatečnou postvakcinační ochranou) (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022).

K léčbě symptomů se využívají běžně dostupné léky, jako jsou antipyretika nebo antitusika. Při zhoršení saturace hemoglobinu kyslíkem pod 93 % se využívá kyslíková podpora. U závažných a velmi těžkých stavů jsou pacienti na lůžkách odkázáni na umělou plicní ventilaci (Trojánek et al., 2020). Další terapie fungují na principu

potlačení přehnané imunitní reakce na zánět (např. Dexamethason), jako antikoagulační terapie a další (Beneš et al., 2021).

3.8. Varianty

Všechny viry, včetně SARS-CoV-2, se časem vyvíjejí – mutují. Dochází ke změnám v jejich virovém genomu a vzniku různých variant. Ve své práci zmíním pouze ty nejvýznamnější, které jsou označeny jako tzv. obávané varianty (VOC, z angl. *variant of concern*) (Státní zdravotní ústav, 2021). Jejich význam spočívá ve zvýšené nakažlivosti, způsobení těžšího průběhu nemoci, redukci neutralizační schopnosti protilátek proti původním mutacím nebo snížení účinku očkování (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021).

První objevená VOC byla v září 2020 ve Velké Británii, pojmenována jako varianta Alfa, lidově nazývána „britská“. Později byla Alfa z VOC klasifikace vyřazena (Státní zdravotní ústav, 2021). V téže době byla poprvé detekována i další nová varianta Beta, neboli „jihoafrická“ (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021). V prosinci 2020 se v Brazílii objevila varianta Gama, tzv. „brazilská“. Další obávanou variantu představuje Delta – „indická“. Identifikována byla taktéž v prosinci 2020 a udává se, že má až dvakrát vyšší riziko hospitalizace než Alfa. V létě 2021 se rozšířila i do Evropy, včetně ČR, kde se stala převažující variantou. Na začátku listopadu 2021 se v Africe objevila varianta Omikron, která je dle studií více nakažlivá než Delta a uniká neutralizační schopnosti protilátek, a to především díky velkému počtu mutací v S proteinu. Začátkem roku 2022 výrazně převládla nad Deltou (Státní zdravotní ústav, 2021).

V současné době mezi VOC řadíme 4 zástupce: Beta, Gamma, Delta a Omikron (Státní zdravotní ústav, 2021). Plošný screening cirkulujících variant lze provádět diskriminačním PCR testem. Pro detailní molekulární surveillance se využívá celogenomového sekvenování vybraných vzorků (Beneš et al., 2021).

3.9. Epidemiologie v ČR za rok 2020/21

První tři případy onemocnění COVID-19 byly v České republice zaznamenány 1. března 2020 (ÚZIS ČR, 2022). Z důvodu zabránění šíření nového druhu koronaviru byl vládou ČR 12.3. 2020 vyhlášen nouzový stav. Vrcholem první vlny pandemie byl duben 2020, ke dni 11.4. 2020 bylo zaznamenáno 4 605 aktivně nakažených osob. Koncem

dubna začal počet nově infikovaných klesat. Následně došlo k rozvolnění protiepidemických opatření a 17. května 2020 byl nouzový stav zrušen (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022).

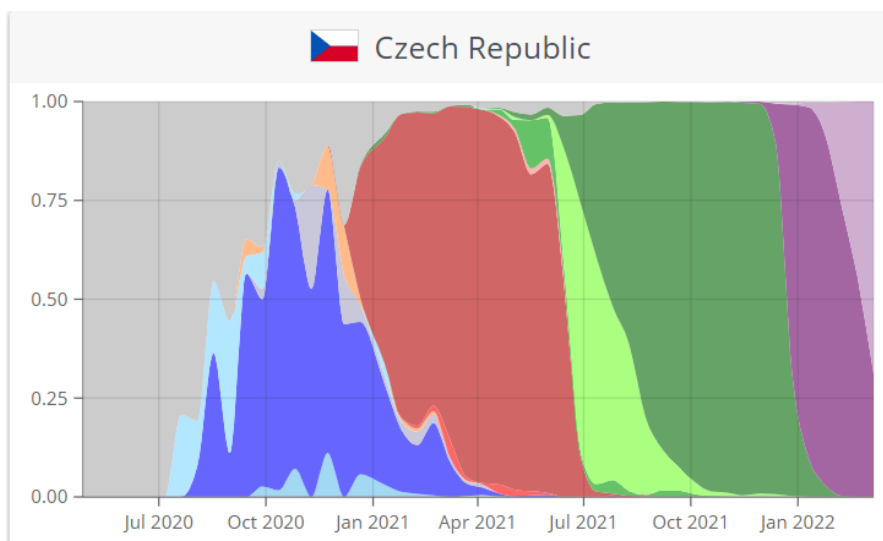
Na začátku září 2020 začala čísla pozitivně testovaných opět strmě stoupat. 30. září 2020 byl vyhlášen druhý nouzový stav, který trval až do 11. dubna 2021. Trend růstu nově nakažených pokračoval až do konce roku 2020. Za vrchol druhé vlny epidemie byl považován začátek ledna 2021, kdy nejvyšší denní přírůstek byl 17 875 nově nakažených osob (ke dni 6.1. 2021) (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022). Na přelomu roku 2020/21 se zde vyskytla nová Alfa mutace, která se postupně stala dominantní (CoVariants, 2022). Počty infikovaných i nadále rostly a 3.2. 2021 překročil počet dosud prokázaných případů onemocnění COVID-19 jeden milion (ÚZIS ČR, 2022). Dne 14.3. 2021 bylo aktuálně nemocných 163 466 osob, což bylo nejvíce od začátku pandemie. Vlivem přísných protiepidemických opatření se situace začala koncem března zlepšovat a během léta 2021 se denní incidence pohybovala řádově v desítkách až stovkách osob (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022).

Koncem září 2021 začal počet nakažených osob opět stoupat a vypukla třetí vlna epidemie. Příčinou byla především nově se vyskytující varianta Delta, která se postupně stala dominantní. Dne 25.11. 2021 byla zjištěna nová nejvyšší denní incidence – 27 937 osob. Během prosince 2021 čísla opět začala klesat (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022). Od ledna 2022 je v České republice dominantní nejnovější varianta Omikron, která způsobila opět prudký nárůst pozitivně testovaných (CoVariants, 2022).

Data od počátku pandemie v ČR (1.3. 2020) ke dni 31.12. 2021:

- celkový počet potvrzených případů onemocnění COVID-19 byl 2 461 584
- celkový počet úmrtí činil 36 302 osob

(Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022)



Obrázek 3 – Přehled výskytu dominantních variant SARS-CoV-2 v ČR

- Odstíny modré/šedé/oranžové – původní mutace (neřadí se mezi VOC)
- Odstíny červené – varianta Alfa (Beta, Gamma minoritně)
- Odstíny zelené – Delta
- Odstíny fialové – Omikron

Zdroj: (CoVariants, 2022)

4 Laboratorní diagnostika SARS-CoV-2

Za zlatý standard považujeme přímý průkaz virové RNA metodou real-time RT-PCR, která se vyznačuje vysokou specificitou a senzitivitou. Její velkou výhodou je detekce onemocnění již ve velmi časně fázi a taktéž u asymptomatických jedinců (Střížová et al., 2020). Další alternativu přímé detekce viru představuje metoda založená na průkazu antigenu SARS-CoV-2, tzv. antigenní testy. Ty mají nižší specificitu a senzitivitu než PCR, zato jsou výrazně rychlejší a levnější variantou. Výsledek testu máme k dispozici do 30 minut a není zde zapotřebí transport vzorku do laboratorního zařízení (Dlouhý et al., 2020). Nepřímý průkaz, tj. sérologické stanovení protilátek proti SARS-COV-2, nelze považovat za výhodný ukazatel akutní infekce (s výjimkou vzácných případů opakovaných negativních testů u osob s vysokým podezřením na nákazu COVID-19). Vyšetření protilátek je naopak indikováno při diagnostice postcovidového syndromu, pro výzkumné či epidemiologické účely. V minulosti se indikace používala i při darování rekonvalescentní plazmy, která se v současné době již k terapii nevyužívá (Beneš et al., 2021).

4.1. Real-time RT-PCR

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (real-time reverse transcription polymerase chain reaction) je molekulárně biologická metoda, která v současnosti spadá mezi nenahraditelné metody i v oblasti mikrobiologie při diagnostice infekčních onemocnění (Gitman et al., 2021).

4.1.1. Odběr a transport vzorku

Preanalytická část je velmi důležitá pro adekvátnost PCR vyšetření. Špatně provedený odběr může způsobovat falešně negativní výsledky. Jako biologický materiál se nejčastěji využívá výtěr ze sliznice nosohltanu, který je hlavním cílem pro množení viru v horních cestách dýchacích a je zde nejvyšší koncentrace respiračních sekretů (Macková et al., 2020). V současnosti se hojně využívá i testování ze slin. U intubovaných jedinců se preferuje odběr tracheálního aspirátu (TAS) (Dlouhý et al., 2020). Virus byl také prokazován ze sputa, stolice, moči, krve nebo plicní tkáně pacienta (Kolářová et al., 2020).

4.1.2. Izolace

Proces izolace zahrnuje získání nukleové kyseliny z odebraného materiálu pomocí kombinace chemických a fyzikálních postupů (Xiao et al., 2021). Způsobů izolace existuje celá řada. V současnosti se hojně využívají automatické izolátory, které jsou nejčastěji založeny na principu magnetické separace, s využitím magnetických kuliček o velikosti nm – μ m. Magnetické částice se smísí se vzorkem obsahujícím nukleovou kyselinu, dojde k jejich navázání a tvorbě komplexu. Pomocí magnetu se komplex oddělí od zbytku vzorku, promyje a následně se uvolní čistý eluát nukleové kyseliny (Klein et al., 2020).

Existují i další možnosti real-time RT-PCR testů, kdy proces samotné izolace odpadá a PCR systém je plně automatizovaný (GeneXpert, 2020).

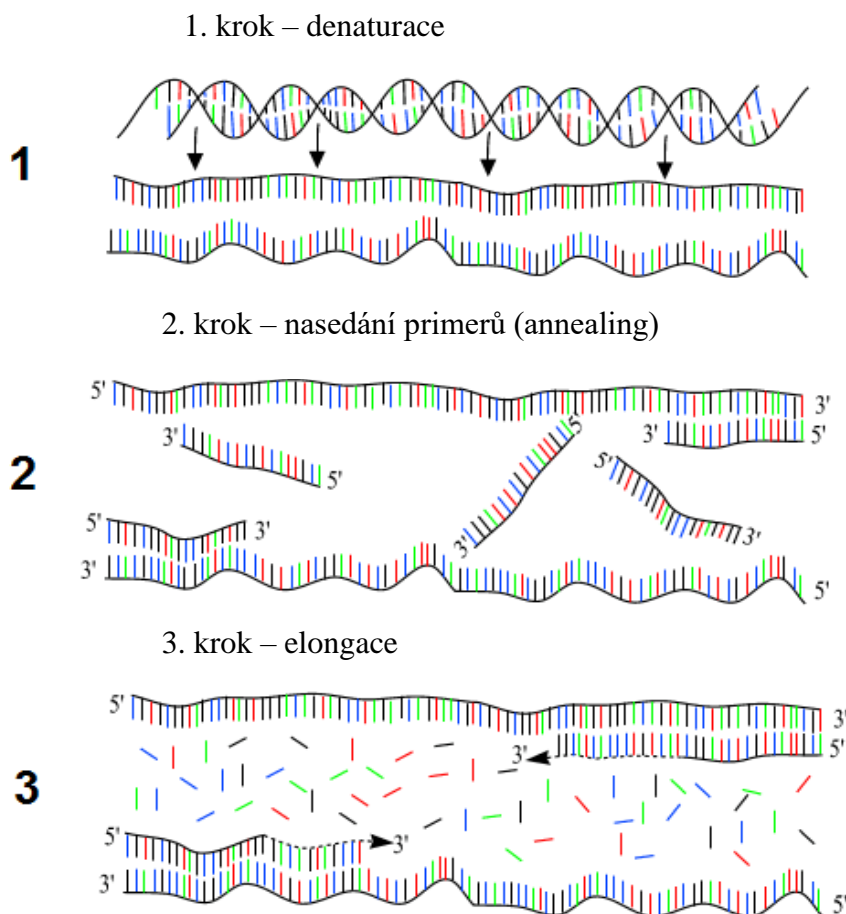
4.1.3. Reverzní transkripce

V dalším kroku testování real-time RT-PCR je nutný přepis genetické informace z molekuly RNA do DNA (cDNA, z angl. *complementary DNA*), jelikož RNA nemůže sloužit jako předloha pro PCR reakci. Tato reakce probíhá pomocí specifického enzymu reverzní transkriptázy (Mathuria et al., 2020).

4.1.4. Amplifikace

Pojem amplifikace lze charakterizovat jako cyklické namnožení vybraných úseků DNA, které probíhá při opakovaných změnách teplot. Tato reakce se odehrává v přístroji zvaném termocycler, který udržuje naprogramovanou teplotu pro jednotlivé kroky po určitý čas (Alberts et al., 2006).

Prvním krokem je denaturace, při které dochází k rozvolnění vodíkových můstků za následného rozestoupení dvoušroubovice DNA. V druhém kroku následuje nasednutí primerů (tzv. annealing) na jednovláknovou DNA za snížení teploty reakční směsi. Posledním krokem je elongace, při které se teplota opět zvyšuje a syntetizuje se nový řetězec DNA pomocí DNA polymerázy. Výsledkem těchto reakcí je zmnožení původní sekvence nukleové kyseliny (Alberts et al., 2006). Grafické schéma PCR reakce je znázorněno na obrázku (Obrázek 4).



Obrázek 4 – Princip PCR reakce (Aghová, 2021)

4.1.5. Detekce genů SARS-CoV-2 a interpretace výsledků

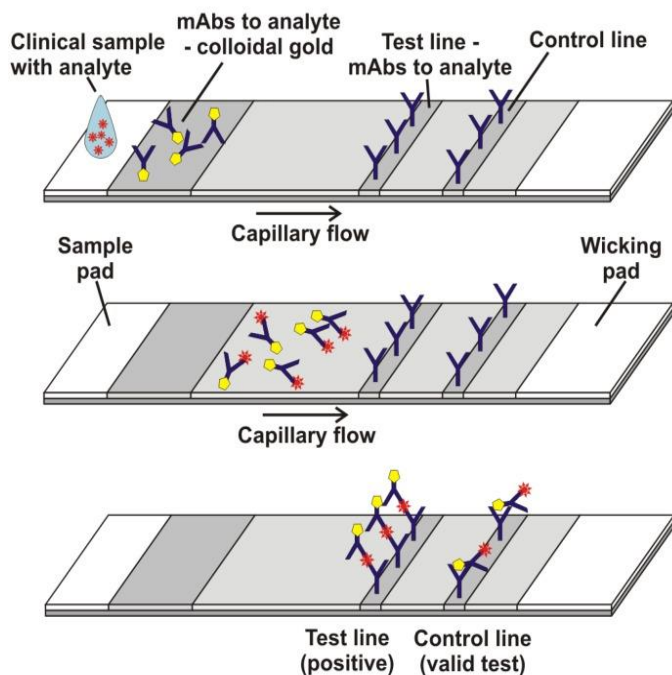
RT-PCR v reálném čase detekuje konkrétní specifické části genomu SARS-CoV-2. Hlavními standardizovanými cíli jsou ORF1 ab (geny pro RNA-dependentní RNA polymerázu = RdRP), geny N, E a S (Macková et al., 2020). Jako detekční markery se používají fluorescenční barviva. Princip je založen na měření fluorescenčního signálu v reálném čase, který je přímo úměrný množství specifického PCR produktu (Mathuria et al., 2020). Při použití komerčně dostupných detekčních kitů probíhá test v jedné zkumavce, ve které jsou obsaženy potřebné reagenty a detekují se stanovené cíle (minimálně dva různé geny) (Xiao et al., 2021). Pozitivní výsledek potvrzuje přítomnost SARS-CoV-2, nemusí však vždy znamenat akutní infekci COVID-19. Správnou interpretaci výsledků je nutné zhodnotit s klinickým stavem pacienta. I přes velmi vysokou senzitivitu PCR metody, negativní výsledek infekci nevylučuje. U osob s podezřením na nákazu se doporučuje vyšetření zopakovat s odstupem 2-5 dnů (Beneš et al., 2021).

4.2. Průkaz antigenu SARS-CoV-2

Antigenní testy fungují na principu imunochromatografie a využívají specifické vazby mezi protilátkami a antigeny viru (Kyosei et al., 2021). Jedná se o přímý průkaz virového proteinu (zejména S a N), který se provádí z biologického materiálu, nejčastěji výtěr z nosohltanu a sliny (Jiřincová et al., 2020).

Antigenní testy nelze chápat jako rovnocennou alternativu PCR. Testovací soupravy musí splňovat předepsanou certifikaci a současně deklarovanou citlivost nejméně 90 % a specifitu minimálně 97 %. Jejich využití je primárně určeno pro orientační diagnostiku osob se symptomy COVID-19. Hojně se využívají například v ambulancích nebo u lůžka v nemocničních zařízeních, jako tzv. point-of-care testing (POCT), kdy potřebujeme znát výsledek co nejrychleji (Jiřincová et al., 2020). Ten bývá zpravidla k dispozici do 15-30 minut, dle druhu výrobce (Chau et al., 2020). Naopak se moc nedoporučují pro vyšetření asymptomatických jedinců a v rámci nízkofrekvenčních celoplošných screeningů (Dřevínek et al., 2021).

Pozitivní i negativní výsledky bývá ve většině případů doporučováno ověřovat přesnější real-time RT-PCR metodou, jelikož antigenní testy mohou způsobovat falešně pozitivní či negativní reakce (Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2021).



Obrázek 5 – Princip antigenního testu (Lee et al., 2013)

4.3. *Vyšetření protilátek proti SARS-CoV-2*

Protilátky proti SARS-CoV-2 můžeme detekovat například metodami ELISA nebo CLIA (Dřevínek et al., 2020). Lze prokazovat protilátky ve třídách IgA, IgG a IgM ze séra pacienta. U respiračních onemocnění není tato metoda vhodná k prokazování akutní infekce, v důsledku opožděného nástupu protilátkové odpovědi (Stejskal, 2020). K nástupu hladiny protilátek dochází po 5-14 dnech od prvních příznaků. Nejprve se tvoří protilátky IgA (přibližně 5 dní po nakažení) a IgM (cca 8 dní od nákazy). Po 2-3 týdnech od primárních symptomů se objevují IgG, které ukazují na již dříve prodělané onemocnění. U imunokompetentních jedinců po prodělané nemoci či očkování, zůstávají protilátky v krvi dlouhodobě, po dobu několika měsíců. U některých osob se ale nemusí vytvořit vůbec (Dřevínek et al., 2020).

5 Cíle práce a hypotézy

Cíle:

1. Osvojit si metody přímého průkazu SARS-CoV-2: real-time RT-PCR a antigenní testy.
2. Statisticky zpracovat přehled vyšetření SARS-CoV-2 provedených v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. metodou real-time RT-PCR.
3. Ověřit spolehlivost antigenních testů při detekci SARS-CoV-2.

Hypotézy:

Předpokládáme, že:

1. Antigenní testy mohou způsobovat falešně pozitivní či falešně negativní reakce
2. Využití antigenních testů urychlí diagnostiku SARS-CoV-2 na příjmových ambulancích Nemocnice Strakonice, a.s.

6 Metodika

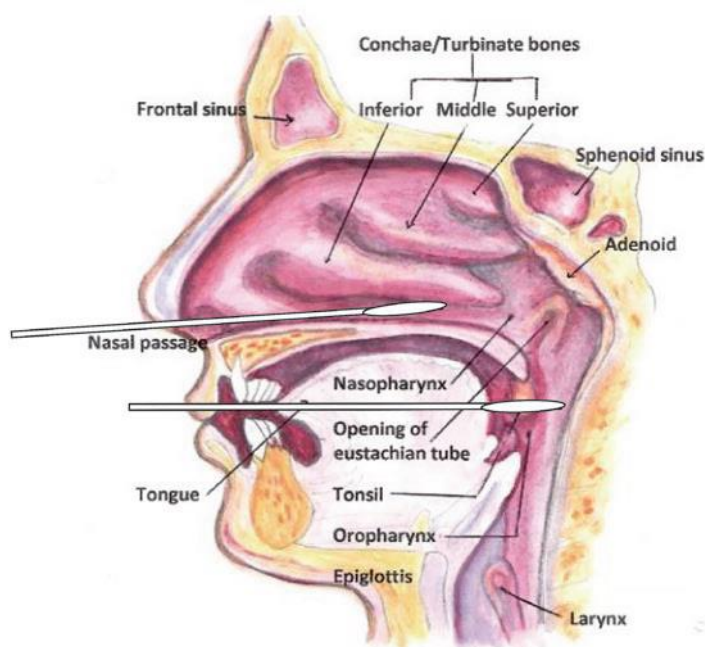
V praktické části své bakalářské práce jsem se zaměřila na osvojení metod přímého průkazu SARS-CoV-2: real-time RT-PCR a antigenní testy. Antigenní testy jsem prováděla v Antigenním odběrovém centru Nemocnice Strakonice, a.s. v prosinci 2020. Laboratorní diagnostiku real-time RT-PCR jsem vykonávala v období 1.1.–28.2. 2021 v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s., oddělení ÚKMAS (Úsek klinické mikrobiologie a antibiotické středisko).

Veškerý materiál pro laboratorní diagnostiku byl odebrán dle Laboratorní příručky a zpracován dle příslušných Standardních operačních postupů (SOP) pro pracoviště ÚKMAS, za současného dodržení všech bezpečnostních a hygienických opatření.

6.1. Odběr materiálu

Odběr z nazofaryngu se provádí jednorázovými výtěrovými štětičkami, jejichž konec je vyroben z umělého vlákna. Pacient zakloní hlavu, štětičku vložíme do nosní dírky a pokračujeme rovnoběžně s patrem dozadu směrem k zevnímu zvukovodu a to tak, aby se dosáhlo zadní strany hrtanu. Poté jemně setřeme a několikrát rotujeme tyčinkou (Hubáček, 2020). Schéma správného odběru je znázorněno na obrázku (Obrázek 5).

Odebraný vzorek se použije buď pro průkaz antigenu dle postupu výrobce, nebo se ščetinka vkládá do zkumavky s tekutým virologickým médiem. Zkumavka se řádně označí (jméno, příjmení, rodné číslo pacienta) a se žádankou se transportuje do laboratoře – dle stanovených postupů na PCR vyšetření.



Obrázek 6 – Správný postup nazofaryngeálního výtěru (Hubáček, 2020)

6.2. *Real-time RT-PCR*

Pro RT-PCR vyšetření v reálném čase byly aplikovány dva systémy. Pro pacienty, jejichž PCR bylo indikováno v režimu STATIM, byl použit test Xpert Xpress® SARS-CoV-2 na přístroji GeneXpert. Pro ostatní pacienty (v rutinním režimu) byla využita souprava Liferiver (Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time multiplex RT-PCR Kit), na přístroji MIC Real Time PCR Cycler (BMS-bio-molecular systems). Jejich principy a rozdíly jsou popsány v následujících kapitolách.

6.2.1. *Liferiver*

Souprava pro rutinní vzorky Liferiver: Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time multiplex RT-PCR (výrobce: Shanghai ZJ Bio-Tech) detekuje tři ze čtyř standardizovaných cílů: geny ORF1 ab, N a E. Obsahuje všechny potřebné produkty pro izolaci RNA, přípravu Master Mix a detekci SARS-CoV-2 (tj. interní, negativní a

pozitivní kontrola, Super Mix a směs enzymů RT-PCR). Skladuje se v mrazáku při teplotě -20 °C (Liferiver, 2020).

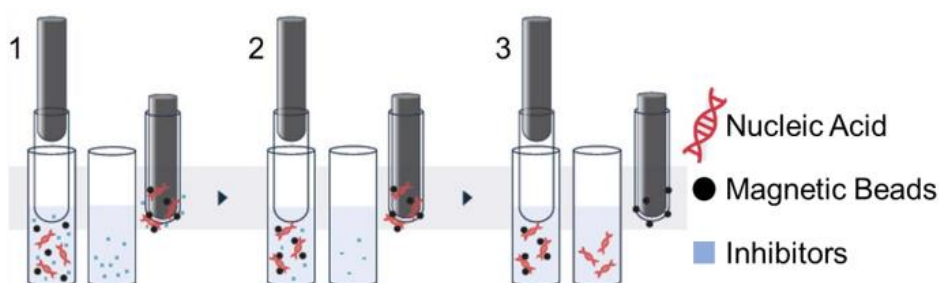
6.2.1.1. Příprava vzorků k vyšetření

Po příjmu vzorků v laboratoři se odebraný materiál zpracovává kontinuálně, tak jak to umožňuje bezpečný chod laboratoře. Před samotným zpracováním materiálu se vzorky s žádankami identifikují pod příslušným laboratorním číslem, které je automaticky vygenerováno laboratorním informačním systémem VaxNT Janiga Labs. Číslování vzorků se žádankami probíhá v biohazardním boxu a během něj se kontrolují identifikační údaje na žádance a zkumavce.

V případě, že se materiál z kapacitních důvodů nemůže zpracovat ihned, uchovává se v chladničce při teplotě 2 až 8 °C, maximálně po dobu 72 hod. Při delším uchování je nutné vzorky zamrazit na teplotu minimálně -70 °C (Macková et al., 2020).

6.2.1.2. Izolace RNA

Izolace byla prováděna na automatickém izolátoru nukleových kyselin Nextractor® NX-48S od společnosti Genolution, za použití soupravy NX-48S Viral NA Kit. Tento extrakční systém se primárně používá pro izolaci vzorků výtěrů z nosu, nosohltanu a sputa a je vhodný pro zpracování 1-48 vzorků naráz. Souprava obsahuje předpřipravené izolační kazety, které jsou variabilní dle počtu vzorků. Pracovala jsem s kazetami pro 1/8/24 vzorků (VN163/VN153/VN143). Samotná automatizovaná extrakce funguje na principu magnetických kuliček (popsáno na Obrázku 7). Celková doba izolace na tomto přístroji trvá přibližně 22 minut.

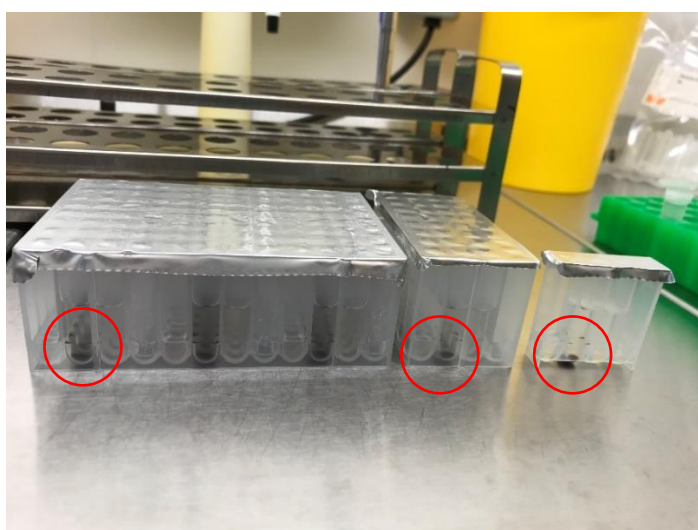


Obrázek 7 – Princip postupu automatického analyzátoru Nextractor® NX-48S (Nextractor® NX-48S User Guide, 2020)

- 1 – Prvním krokem je tzv. lyzační fáze – vzorek je smíchán s lyzačním roztokem a magnetickými částicemi. RNA je extrahována a vázána na kuličky.
- 2 – Následuje dvojitě pročistění RNA a odstraňují se inhibitory PCR reakce pomocí promývacího roztoku.
- 3 – Poslední je tzv. eluční fáze, v tomto kroku je vázána RNA uvolněna z magnetických kuliček pomocí elučního pufru. Zároveň dochází k odstranění magnetických částic pomocí magnetické tyče.



Obrázek 8 – Automatický izolátor Nextactor® NX-48S, pohled zepředu
(Zdroj: vlastní fotografie)



Obrázek 9 – Izolační kazety k přístroji Nextactor

(zleva VN143 – 96 jamková destička, určena pro 24 vzorků, uprostřed VN153 – 32 jamková destička, pro 8 vzorků, vpravo VN163 – 4 jamková destička, pro 1 vzorek). Můžeme zde vidět správnou polohu kazetek, kdy magnetické kuličky jsou vždy na 2. pozici – označeno červeně (Zdroj: vlastní fotografie).

Pomůcky a reagenty:

- Automatické pipety a příslušné jednorázové špičky
- Vortex
- Minicentrifuga
- Automatický izolační systém Nextractor® NX-48S a k němu příslušná extrakční souprava NX-48S Viral NA Kit (izolační kazeta, plastové stripové tyče)
- Mikrokumavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml se zámkem
- Laboratorní stojánky
- Buničina
- Novel CoV (2019-nCoV) Internal Control = interní kontrola (IC)
 - Syntetický necílový fragment RNA (Liferiver, 2020)
- Novel CoV (2019-nCoV) Negative Control = negativní kontrola
 - Sterilně filtrovaná voda s přísadkou DEPC (diethyl pyrokarbonát) (Liferiver, 2020)
- Novel CoV (2019-nCoV) Positive Control = pozitivní kontrola
 - Směs plazmidů, které obsahují část genů ORF1 ab, N a E (Liferiver, 2020)
- PCR voda – Nucelase-Free Water

Pracovní postup:

Zapneme si automatický izolátor Nextractor a necháme si rozmrazit příslušné izolační reagenty: interní a negativní kontrolu, případně pozitivní kontrolu. Pozitivní kontrolu izolujeme vždy pro první detekční běh, případně při jejím nedostatku na další běhy. Před každou extrakcí si připravíme plánek izolace, ve kterém si zaznamenáváme pozice jednotlivých vzorků a kontrol v izolační kazetě.

Na minicentrifuze krátce stočíme všechny potřebné kontroly. Připravíme si výslednou negativní interní kontrolu (Nci) a to tak, že zkumavku s interní kontrolou přepipetujeme do zkumavky s negativní kontrolou a krátce promícháme na vortexu. Po dobu 10 vteřin

promícháme všechny zkumavky se vzorky. Následně jejich obsah postupně přelijeme do označených zkumavek Eppendorf. Po těchto úkonech si vyměníme chirurgické rukavice, aby v následujících krocích nedošlo ke kontaminaci. Do izolační kazety napipetujeme do každé jamky pro vzorek 10 µl smíchané Nci. U izolační destičky pro 24 vzorků pipetujeme do 1., 5. a 9. sloupce, u destičky pro 8 vzorků pipetujeme pouze do 1. sloupce a u jednovzorkové destičky do 1. pozice. Následně do každé jamky pro vzorek pipetujeme ještě 200 µl vzorku, v souladu s izolačním plánkem. Zkumavky s přelítnými vzorky otevíráme vždy pomocí buničiny, abychom předešli kontaminaci. Do poslední pozice pipetujeme místo vzorku 200 µl Nucelase-Free Water (sterilní PCR vody). Pokud potřebujeme izolovat pozitivní kontrolu, do poslední pozice pipetujeme 200 µl pozitivní kontroly, na předposlední pozici pak PCR vodu. Pozitivní kontrola by měla být co nejdále od vzorků, aby nedošlo k případné kontaminaci. V přístroji nasadíme plastové stripy do daných pozic držáku nad destičkou, plně je zatlačíme dozadu a spustíme izolaci.

V průběhu izolace si označíme čisté zkumavky Eppendorf s čísly právě extrahovaných vzorků – pro přepipetování izolátů. Po skončení izolace vyjmeme kazetu a přemístíme izoláty do Eppendorf zkumavek. Pokud s izoláty nepracujeme ihned, uchováváme je v ledničce při 2-8 °C.

6.2.1.3. Master Mix

Master Mix je roztok, který obsahuje všechny potřebné komponenty pro RT-PCR reakci v reálném čase. Obvykle zahrnuje příslušné enzymy, primery, nukleotidy, fluorescenční barviva, pufrы, případně různé stabilizátory či zesilovače. Přesné složení Master Mix podléhá výrobnímu tajemství dané společnosti a není přesně známo.

Pomůcky a reagenty:

- Automatické pipety a příslušné špičky
- Zkumavka typu Eppendorf
- Minicentrifuga a vortex
- Destička s mikrozukumavkami typu MIC Tubes (dle počtu pozic)
- Novel Cov (2019-nCoV) Super Mix
- RT-PCR Enzyme Mix

Pracovní postup:

S dostatečným předstihem si necháme rozmrazit příslušné reagentie. Mezitím si připravíme plánek detekčního běhu, abychom věděli potřebné množství Master Mix. Mícháme vždy o 1-2 reakce navíc (vzhledem k chybě pipetování). Výsledná Master Mix se připravuje smícháním reagentií Super Mix a Enzyme Mix v poměru 19:1. Na jednu reakci potřebujeme 20 µl Master Mix. Detekční přístroj MIC má celkovou kapacitu 48 reakcí (včetně kontrol) – „plný běh“. Pokud bude plně využita jeho kapacita, výsledná Master Mix se bude připravovat následovně:

- 48 pozic celkem + 2 pozice navíc = 50 pozic celkem
- 50 µl Enzym Mix + 950 µl Super Mix

Rozmražené reagentie krátce stočíme na minicentrifuze. Dle detekčního plánu si připravíme množství Master Mix, poté ji ještě řádně promícháme na vortexu. Takto připravenou Master Mix rozpipetujeme po 20 µl do mikrozkušavek MIC, a poté je přikryjeme ochranným víčkem (Obrázek 10).



Obrázek 10 – Speciální MIC Tubes mikrozkušavky (vlevo) s ochranným víčkem (vpravo) (Zdroj: vlastní fotografie)

6.2.1.4. Detekce

Souprava pro detekci nukleové kyseliny SARS-CoV-2 obsahuje specifický systém a reakce se provádí v jedné zkumavce jedнокrokovým testováním real-time RT-PCR. Zde probíhá transkripce RNA do cDNA, zmnožení a samotná detekce cDNA.

Vyšetření bylo prováděno na přístroji MIC Real Time PCR Cyler, za použití již zmíněné detekční soupravy Liferiver. Teplotní profil přístroje byl nastaven dle

příbalového letáku detekční soupravy (Tabulka 3). Jednotlivé kanály pro detekci fluorescenčního signálu byly nastaveny dle příbalového letáku výrobce (Tabulka 4).

Tabulka 3 – Profil detekčního přístroje MIC Real Time PCR Cycler

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1	45	10 minut	1
2	95	90 sekund	1
3	95	3 sekundy	45
	58	20 sekund detekce fluorescenčního signálu	

Zdroj: (Liferiver, 2020)

Tabulka 4 – Nastavení kanálu v přístroji MIC Real Time PCR Cycler

Fluorescenční kanál	Detekční cíl
FAM (green)	ORF1 ab gen
HEX/VIC/JOE (yellow)	N gen
Cal Red 610/ROX/TEXAS RED (orange)	E gen
Cy5 (red)	IC – interní kontrola

Zdroj: (Liferiver, 2020)

Pomůcky a reagentie:

- Automatické pipety a špičky
- Mikrozkušavky MIC Tubes s již napipetovanou Master Mix
- Izoláty
- Kontroly
- Víčka na MIC zkumavky, držák a pinzeta

Pracovní postup:

Do každé MIC zkumavky s Master Mix pipetujeme 5 µl izolátu/ kontroly, v souladu s detekčním plánkem. Před samotným pipetováním izolát vždy alespoň dvakrát pipetou promícháme, jelikož dochází k usazování RNA na dně zkumavky. Každou hotovou čtveřici zkumavek zavřeme bílými víčky pomocí speciálního nástavce a pinzety (Obrázek 10). Víčko musí být vždy řádně uzavřeno. Pak už jen vložíme zkumavky do

detekčního přístroje MIC a spustíme běh. Doba detekce trvá minimálně 1 hodinu a 5 minut (závisí na počtu pozic).



Obrázek 11 – Uzavřené MIC Tubes mikrozkuhavky s izoláty a Master Mix (vpravo), speciální nástavec na uzavírání MIC Tubes (vlevo) (Zdroj: vlastní fotografie)



Obrázek 12 – Přístroj MIC Real Time PCR Cycler (BMS-bio-molecular systems) (Zdroj: vlastní fotografie)



Obrázek 13 – Otevřený detekční přístroj MIC Real Time PCR Cycler (BMS-bio-molecular systems) s uzavřenými MIC Tubes (Zdroj: vlastní fotografie)

6.2.1.5. Vyhodnocení a interpretace výsledků vyšetření

Výsledkem real-time RT-PCR vyšetření je Ct hodnota (z angl. *cycle of treshold*), která nám udává cyklus, při kterém dochází k nárůstu fluorescenčního signálu nad práh pozadí, které se vyskytuje v reakci.

Pro validitu PCR testu musí být splněny následující podmínky:

- a) Pozitivní i negativní kontrola jsou validní za splnění kritérii viz. Tabulka 5. Pokud alespoň jedna z nich kritéria nesplňuje, je nutné celý detekční proces zopakovat.
- b) U negativních vzorků musí dojít ke správné amplifikaci Nci, která k nim byla přidána během přípravy izolace. V případě nevalidního vzorku je nutné opakovat test, případně i odběr vzorku (Tabulka 6).

Za správné vyhodnocení a interpretaci výsledků odpovídá VŠ pracovník na oddělení ÚKMAS.

Tabulka 5 – Výsledky kontrol detekce na přístroji MIC pro validaci PCR vyšetření

Kontrola	ORF1 ab gen	N gen	E gen	Interní kontrola (IC)
	Ct hodnota			
Negativní	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno	25-40
Pozitivní	≤35	≤35	≤35	≤35

Zdroj: (Liferiver, 2020)

Od výrobce je daný algoritmus, jak interpretovat naměřené Ct hodnoty (Tabulka 6). Dle odborného stanoviska Laboratorní skupiny COVID (LS COVID) při Ministerstvu zdravotnictví ČR značí hodnoty Ct > 35 nízkou kvantitu RNA SARS-CoV-2 ve vyšetřovaném materiálu (Dřevínek et al., 2021). V souladu s tímto doporučením je hodnocení výsledků na pracovišti ÚKMAS následující: Pozitivní výsledek je dán hodnotou Ct ≤ 35 v minimálně dvou standardizovaných cílech. Vzorky s Ct > 35 v minimálně dvou genech jsou hodnoceny jako hraniční a jejich interpretaci je nutno provádět v souladu s anamnézou a klinickým stavem pacienta. Na oddělení ÚKMAS se většinou doporučuje provést nové vyšetření s odstupem 1-2 dnů (Tabulka 7).

Tabulka 6 – Algoritmus interpretace výsledků z přístroje MIC za použití soupravy Liferiver (dle výrobce)

Výsledek analýzy	Ct hodnota			
	ORF1 ab gen	N gen	E gen	IC
Negativní	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno	25-40
Pozitivní	≤40	nedetekováno	≤40	-
	≤40	≤42	nedetekováno	-
	≤40	≤42	≤40	-
	nedetekováno	≤42	≤40	-
Opakovat vyšetření	≤40	nedetekováno	nedetekováno	-
	nedetekováno	≤42	nedetekováno	-
	nedetekováno	nedetekováno	≤40	-
Invalidní	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno

Zdroj: (Liferiver, 2020)

Tabulka 7 – Vyhodnocení PCR vyšetření na základě Ct hodnot na pracovišti ÚKMAS

Detekční cíle	Výsledek			
	Negativní	Pozitivní	Invalidní	Individuální hodnocení
Geny ORF1 ab/N/E	nedetekováno/ pozitivita v jednom genu	$Ct \leq 35$ (minimálně ve dvou genech)	nedetekováno	$Ct > 35$ (ve dvou nebo třech genech)
IC	pozitivní	-	nedetekováno	-

(Zdroj: vlastní)

6.2.2. Xpert Xpress SARS-CoV-2

Xpert Xpress SARS-CoV-2 je určený pro real-time RT-PCR testování nukleové kyseliny SARS-CoV-2. Lze takto vyšetřovat výtěry z nosohltanu nebo nosního výplachu/aspirátu, které jsou umístěny do zkumavky s virovým transportním médiem. Je využíván v tzv. POCT režimu a ve strakonické nemocnici je používán pro testování pacientů s požadavkem STATIM.

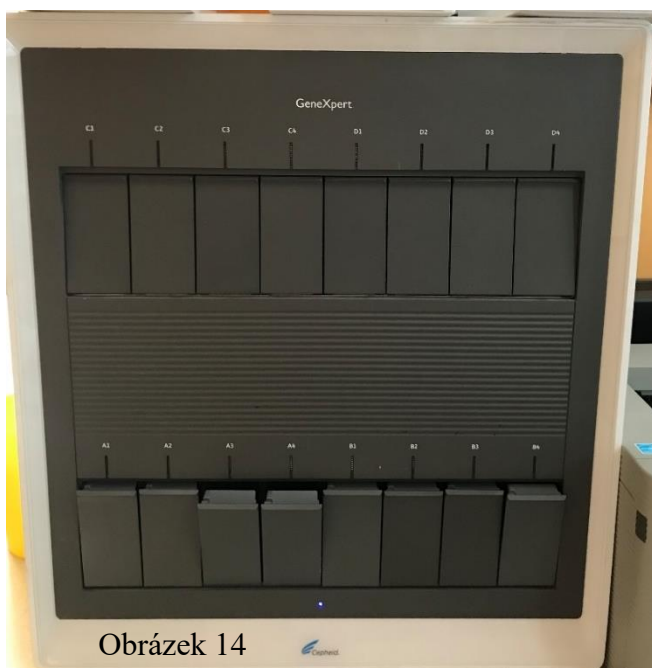
Jedná se o automatizovaný *in vitro* test, který je prováděn na přístroji GeneXpert. Přístroj si sám zajišťuje přípravu vzorků, izolaci, amplifikaci a detekci SARS-CoV-2. Detekují se dva standardizované cíle: geny N2 a E. K systému jsou k dispozici jednorázové kazety, které obsahují všechny příslušné reagentie pro real-time RT-PCR reakci, včetně kontroly pro zpracování vzorků (SPC) a kontroly sond (PCC) (GeneXpert, 2020).

Pomůcky:

- Xpert Xpress SARS-CoV-2 kazeta
- 300 µl přenosová pipeta (je součástí soupravy)

Pracovní postup:

Nejprve si promícháme vzorek – 5x rychle převrátíme zkumavku. Kazetu si vyjmeme z obalu, otevřeme víko (v místě komory pro vzorek) a pomocí 300 µl pipety přeneseme 600 µl vzorku, tzn. na dvakrát, pomocí stejné pipety. Poté načteme kazetu na platformu přístroje GeneXpert a spustíme testování.



Obrázek 14



Obrázek 15

Obrázek 14 – přístroj GeneXpert (Zdroj: vlastní fotografie)

Obrázek 15 – Kazeta Xpert Xpress SARS-CoV-2, pohled zředu (Zdroj: vlastní fotografie)

Výsledky Xpert Xpress SARS-CoV-2 testování se generují systémem přístroje GeneXpert, dle algoritmů výrobce (Tabulka 8) a následně jsou kontrolovány, případně individuálně posuzovány, VŠ pracovníkem na oddělení ÚKMAS. Interpretace Ct > 35 se řídí opět odborným stanoviskem (Dřevínek et al., 2021) a tyto výsledky jsou hodnoceny podobně jako u soupravy Liferiver – viz. kapitola 6.2.1.5. *Vyhodnocení a interpretace výsledků vyšetření* a Tabulka 7.

Tabulka 8 – Algoritmus automatického hodnocení výsledků Xpert Xpress SARS-CoV-2 testování na přístroji GeneXpert (nastaveno dle výrobce)

Výsledek	N2 gen	E gen	Kontrola (SPC)
Pozitivní	+	+	+/-
	+	-	
Hraniční	-	+	+/-
Negativní	-	-	+
Invalidní	-	-	-

Zdroj: (GeneXpert, 2020)

6.3. *Antigenní testování*

K testování byly použity testy Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott, validované pro výtěr z nosohltanu. Senzitivita Abbott testů se uvádí 91,4 % (u vzorků s hodnotami Ct ≤ 33 pak 94,1 %), specificita pak činí 99,8 % (Global point of care, 2022).

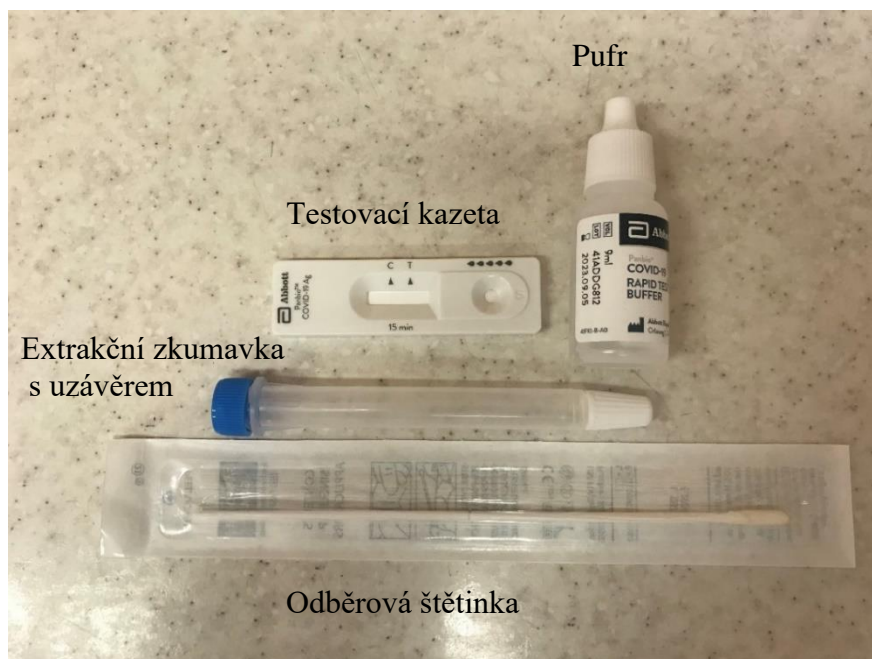
Antigenní test obsahuje testovací a kontrolní zónu. V oblasti kontrolní zóny musí vždy dojít k tvorbě imunokomplexu a zobrazení barevné linie. Pokud se tak nestane, test nelze považovat za validní. Na detekční zóně jsou navázány specifické monoklonální protilátky proti SARS-CoV-2. Pokud je v odebraném vzorku přítomen N virový protein, dojde k tvorbě imunokomplexu a objeví se barevná linie – značí pozitivní výsledek. Pokud vzorek N protein neobsahuje, protilátky se nenaváží – negativní výsledek. Pozitivní antigenní test je doporučováno ověřovat metodou PCR.

Pomůcky:

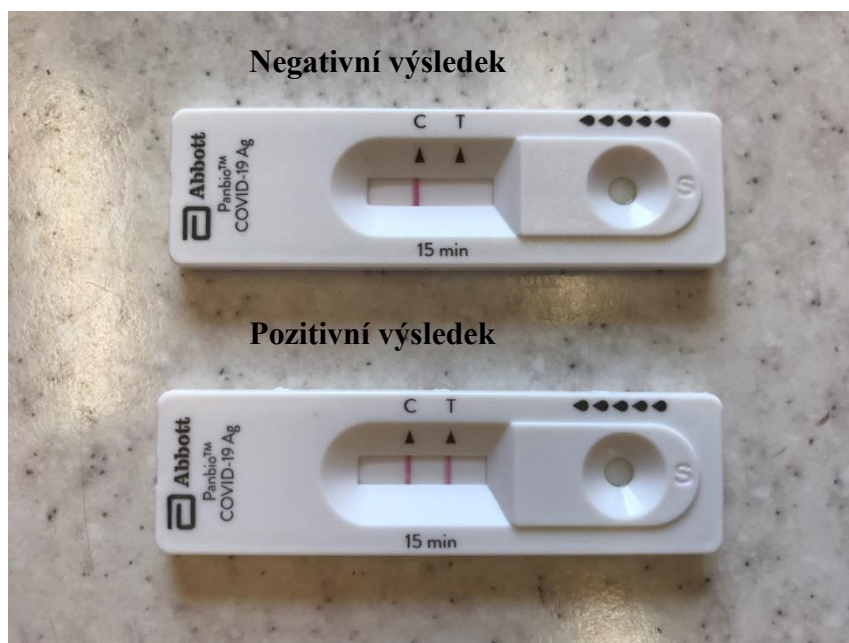
- Testovací kazeta
- Pufr
- Extrakční zkumavka s uzávěrem
- Sterilní tampón pro odběr nazofarygeálních vzorků

Pracovní postup:

Ihned po provedení odběru vkládáme výtěr do extrakční zkumavky, kam jsme si předem nakapali 300 µl pufru, přesně po rysku. Ve zkumavce se štětinka minimálně 5x otočí, poté se zlomí a zkumavka se uzavře. Dále nanese 5 kapek roztoku do jamky pro vzorek na testovací kazetě. Po 15 minutách odečítáme výsledek. Pozitivní výsledek ukazuje přítomnost dvou barevných linií, a to v místě C („Control“) a T („Test“). Pokud je pacient negativní, objeví se pouze jedna linie v místě C. Pokud se neobjeví žádná barevná linie, nebo se objeví pouze v místě T, test nelze považovat za validní a je nutné ho zopakovat.



Obrázek 16 – Souprava pro provedení antigenního testu od firmy Abbott (Zdroj: vlastní fotografie)



Obrázek 17 – Ukázka negativního (nahore) a pozitivního (dole) výsledku antigenního testu Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott (Zdroj: vlastní fotografie)

6.4. Výběr a zpracování dat

Dále jsem zpracovala statistický přehled vyšetření SARS-CoV-2 provedených v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. metodou real-time RT-PCR v roce 2020-2021. Cílem bylo stanovit časový vývoj procenta pozitivity u (i) všech pacientů, (ii) v závislosti na věku (iii) a pohlaví vyšetřovaných osob.

Posledním cílem mé bakalářské práce bylo ověření spolehlivosti antigenních testů Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott. Hodnocení jsem prováděla na základě falešně negativních, či pozitivních výsledků antigenního testování:

- Procento falešně pozitivních výsledků antigenních testů bylo stanoveno na základě real-time RT-PCR vyšetření osob, které byly pozitivně testovány v Antigenním odběrovém centru Nemocnice Strakonice a.s.
- Procento falešně negativních výsledků antigenních testů bylo stanoveno na základě výsledků real-time RT-PCR vyšetření pacientů Nemocnice Strakonice, a.s., kteří vykazovali symptomy COVID-19 a byl jim proveden antigenní test s negativním výsledkem.

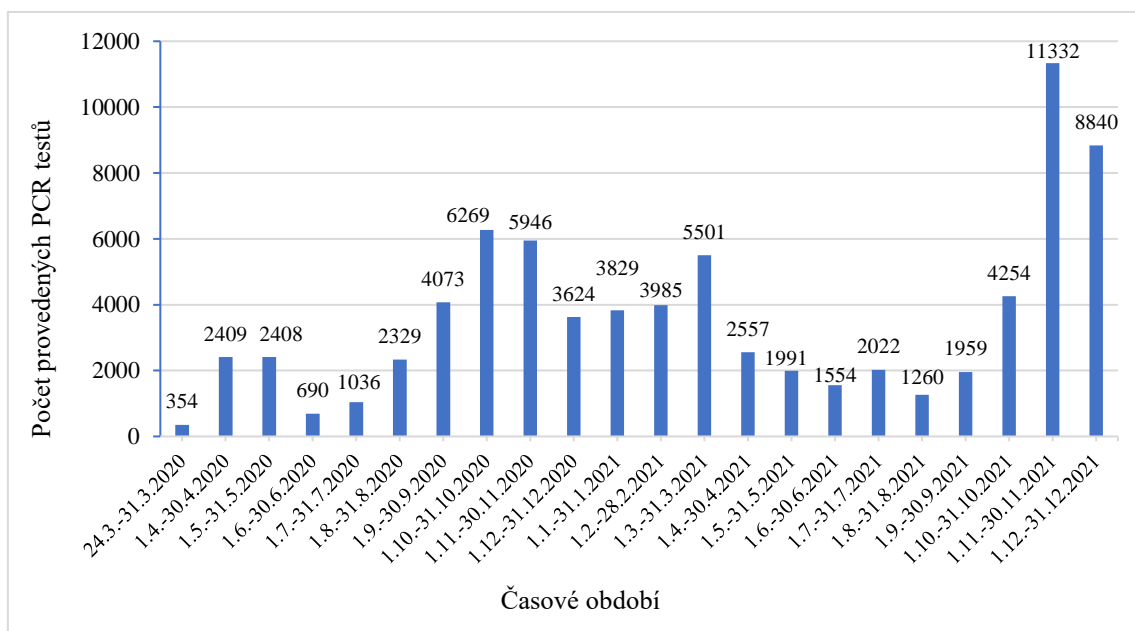
Pro hodnocení byly použity pouze vzorky se stejným datem odběru Ag i PCR testu. Data jsem získala z laboratorního informačního systému VaxNT Janiga Labs a následně vytvořila grafy a tabulky v programu MS Excel.

7 Výsledky

7.1. Statistický přehled PCR vyšetření v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21

V Nemocnici Strakonice a.s. byly první PCR vyšetření na průkaz SARS-CoV-2 provedeny 24.3. 2020. Ke dni 31.12. 2021 bylo celkem vyšetřeno metodou real-time RT-PCR 78 222 vzorků.

V roce 2020 bylo nejvíce vyšetřených vzorků v říjnu, jejich počet činil 6 269. Tato hranice byla překonána v listopadu 2021, kdy se otestovalo 11 332 vzorků během jednoho měsíce. Druhý největší počet vyšetření byl zaznamenán v prosinci 2021, tj. 8 840 vzorků. Naopak během letních měsíců bylo testováno výrazně méně vzorků (Graf 1).



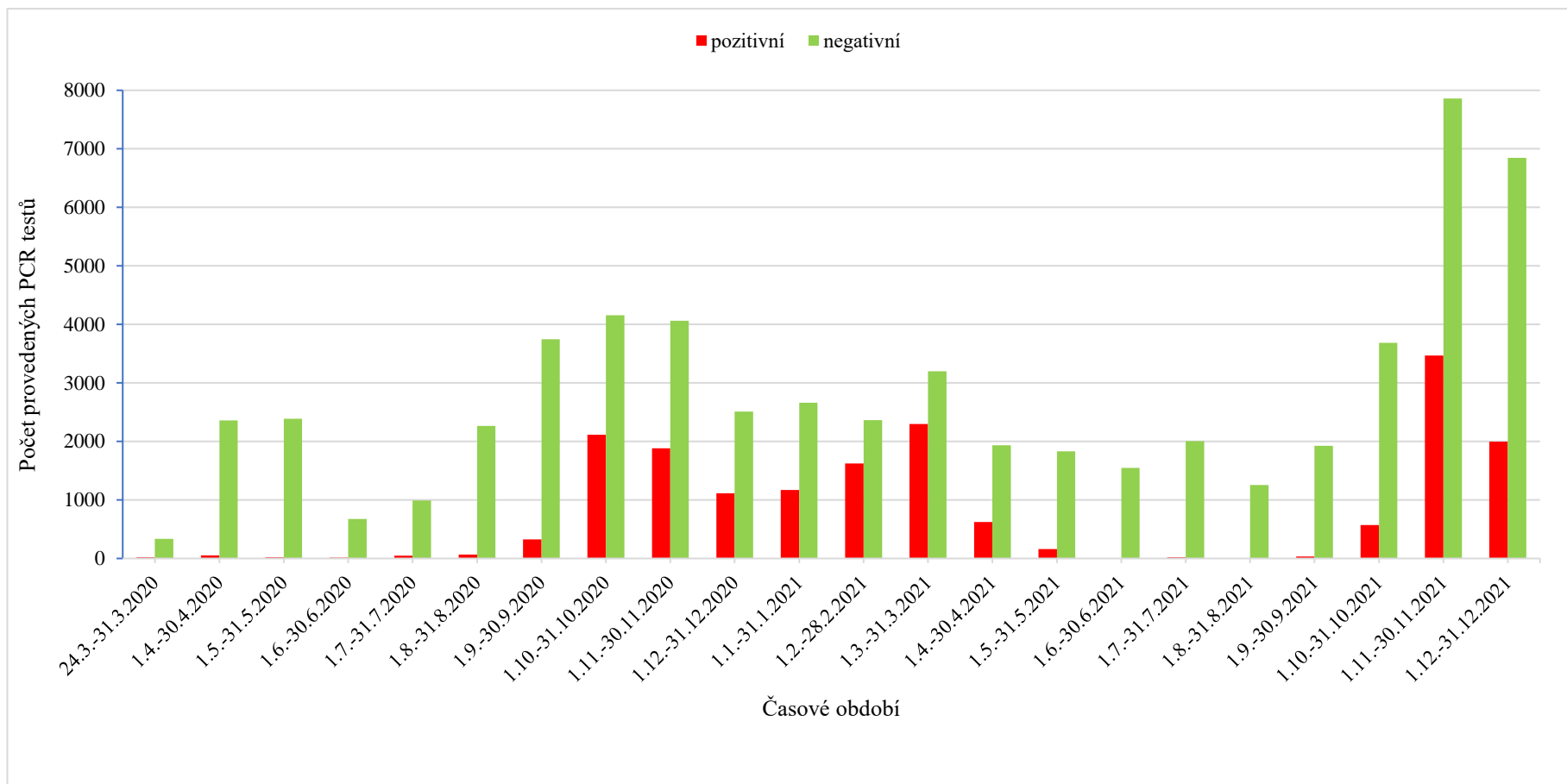
Graf 1 – Počet provedených PCR testů v Nemocnici Strakonice a.s.

Z 78 222 vyšetřených vzorků vykazovalo 17 622 pozitivní výsledek a 60 600 negativní výsledek. Vzorky, které byly vyhodnoceny jako hraniční, zde vyobrazeny nejsou. Zaznamenán je až jejich finální výsledek (pozitivní nebo negativní) – po posudku anamnézy, kliniky či po opakovaném odběru.

Na počátku pandemie (březen–květen 2020) se počet pozitivních záchytů pohyboval v řádů desítek. Nejméně pozitivně testovaných bylo zaznamenáno v červnu 2020. V září 2020 počty nakažených opět navyšovat. Nejvíce pozitivních případů bylo zachyceno

v říjnu 2020, a to 2 112 vzorků, dále pak 1 883 pozitivních v listopadu 2020 a 1 112 pozitivních v prosinci 2020 (Graf 2).

Od ledna do března roku 2021 začal počet pozitivních vzorků opět stoupat. V březnu pak dosáhl svého dosavadního maxima – 2 300 pozitivních vzorků během jednoho měsíce. Od dubna 2021 počet pozitivních klesal. Během léta nepřesáhl hodnotu 20 pozitivních, nejnižší měsíční incidence byla pouhých 5 osob. V říjnu 2021 začal počet pozitivních opět strmě stoupat a svého vrcholu dosáhl v listopadu – 3 470 vzorků za měsíc (Graf 2).



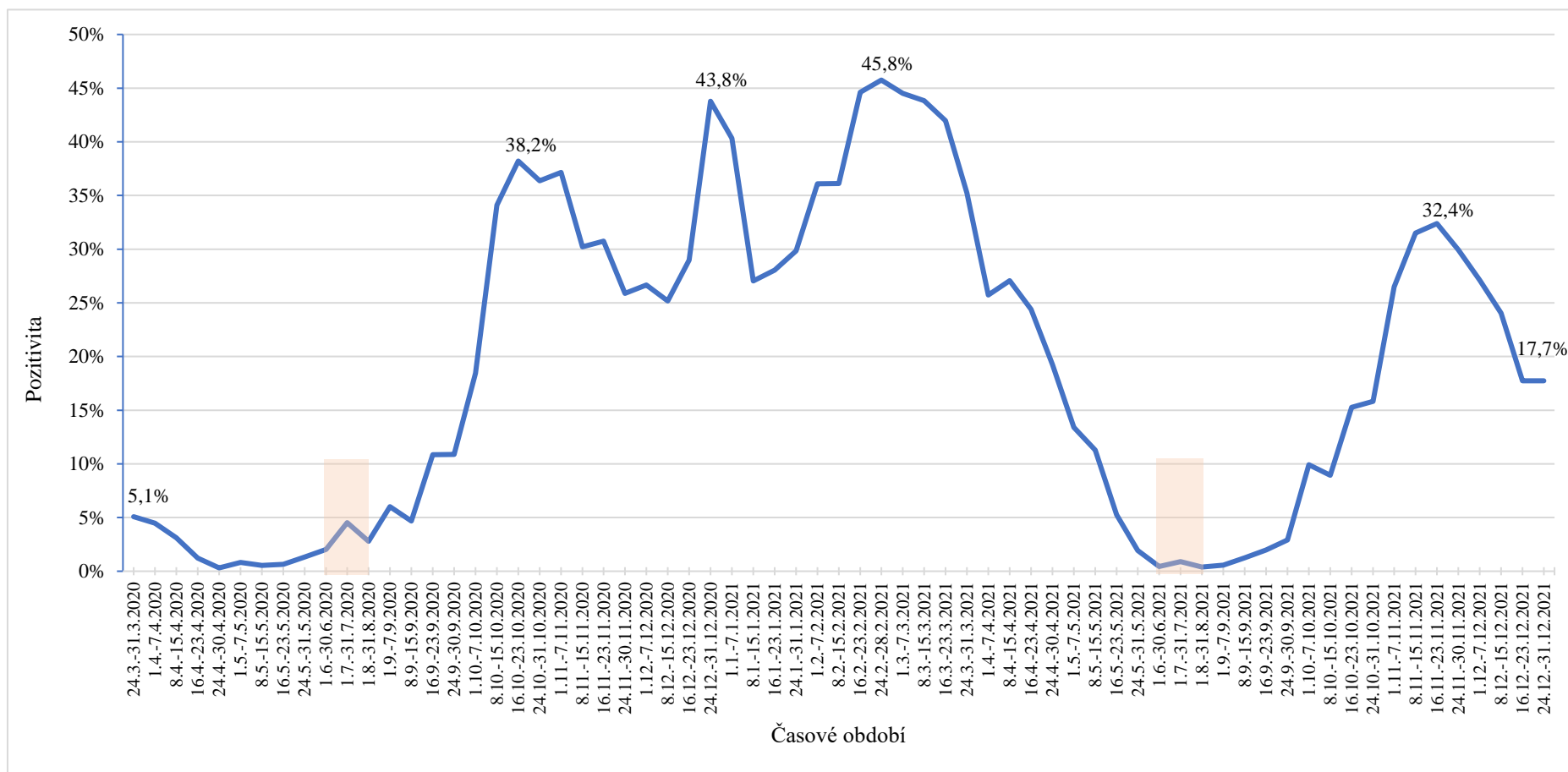
Graf 2 – Počet pozitivních a negativních výsledků PCR testů

7.1.1. Časový vývoj procenta pozitivity u všech pacientů

Pro podrobnější záchyt procenta pozitivity jsem si zvolila období po týdnu, kromě letních měsíců, kde jsem ponechala měsíční trend (v Grafu 4 vyznačeno oranžově).

V březnu 2020 (během první vlny pandemie) procento pozitivity nepřesáhlo hranici 5,2 %. V září 2020 začala pozitivita strmě stoupat, v říjnu (16.10.–23.10.2020) bylo zachyceno doposud nejvyšší procento pozitivity 38,2 %. Během listopadu 2020 pozitivita mírně klesala. K nárůstu došlo opět na konci roku 2020, v týdnu 24.-31.12. bylo zaznamenáno 43,8 % pozitivně testovaných z celkového počtu PCR testů. To bylo nejvíce od začátku pandemie (Graf 3).

V lednu 2021 pozitivita opět klesala. Kulminace se znovu objevila v únoru, v týdnu 24.-28.2. 2021 se vyšplhala na 45,8 %, tzn. že téměř polovina vyšetřených vzorků vykazovala pozitivní výsledek. Trend růstu se v březnu 2021 zastavil a do léta 2021 pozitivita téměř konstantně klesala. V září 2021 začala čísla opět stoupat. V listopadu (16.-23.11. 2021) činila hodnota pozitivity 32,4 %, od té doby opět klesala. Na konci roku byla zaznamenána 17,7 % pozitivita. Hodnota z konce února 2021 nebyla během celého zkoumaného období překonána (Graf 3).



Graf 3 – Časový vývoj procenta pozitivitu u všech pacientů vyšetřených v Nemocnici Strakonice, a.s.

7.1.2. Časový vývoj procenta pozitivita dle věku

Vývoj procenta pozitivita dle věku vyšetřovaných osob jsem rozdělila do 4 věkových kategorií:

- 0-15 let – děti
- 15-26 let – mladiství, studentský věk
- 27-59 let – dospělí, pracující populace
- 60+ let – senioři, důchodci

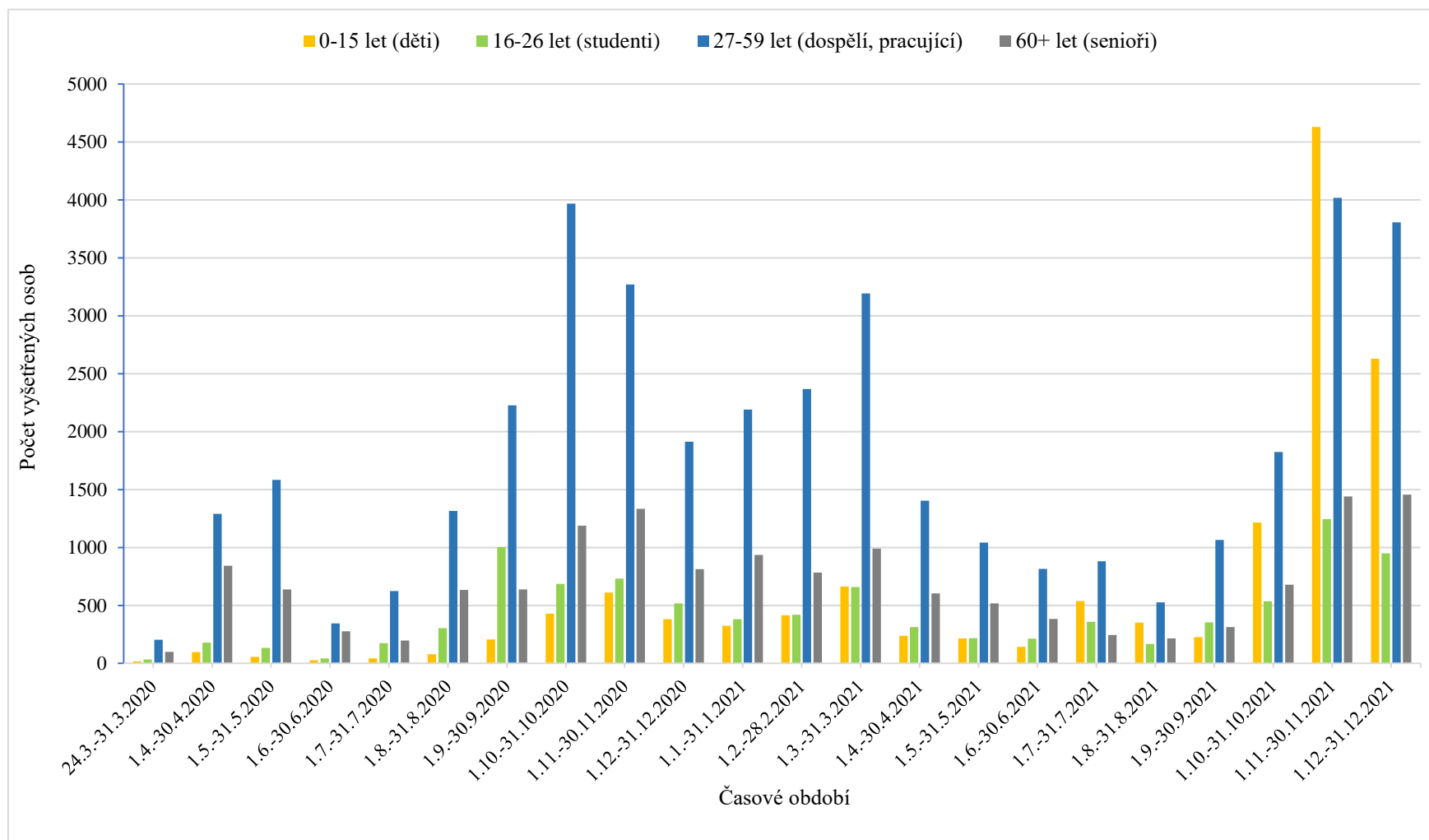
Pozitivní záchyty **kategorie 0-15 let (dětí)** jsou na počátku pandemie nulové (Graf 5), lze ale vidět i minimální testování této věkové skupiny (Graf 4). Výsledky z předchozí doby kopírují časový vývoj % pozitivita v ostatních věkových skupinách, ale konkrétní hodnoty mohou být vzhledem k malému počtu vzorků značně zkreslené (Graf 4, Graf 5). Pozitivita svého maxima dosahuje v březnu 2021 – 42,1 %. V dubnu a květnu 2021 výrazně převládá nad ostatními kategoriemi (Graf 5). Tento fakt může být také zkreslený nižší frekvencí testování v této věkové skupině. K nárůstu počtu vyšetření v kategorii 0-15 let dochází v září 2021. V listopadu 2021 jsou dokonce nejčetněji testovanou skupinou. Celkem bylo v tomto měsíci vyšetřeno více než 4 630 osob 0-15 let, což je dosavadní maximum ze všech skupin (Graf 4). Vysokému počtu testů připadá i vysoké procento pozitivita, v říjnu 2021 činí 15,5 % (1. příčka), listopad 2021 pak 25,9 % (Graf 5).

Kategorie 16-26 let (mladiství, studenti) je od počátku pandemie do srpna 2020 v ČR minoritně testovanou skupinou, spolu s kategorií dětí (Graf 4). Tomuto tvrzení odpovídá i zkreslená procenta pozitivita. V září 2020 byl zaznamenán nárůst vyšetřených 16-26 let a zároveň i zjištěna 9,6 % pozitivita (1. příčka). Vysoká míra pozitivita přetrvávala až do března 2021. Nejvyšší dosažené procento pozitivita bylo zjištěno v únoru a březnu 2021, a to 36,2 %. Od dubna 2021 pozitivita postupně klesala, stejně jako u ostatních věkových skupin. Další nárůst procenta pozitivita byl zaznamenán od října 2021 (Graf 5).

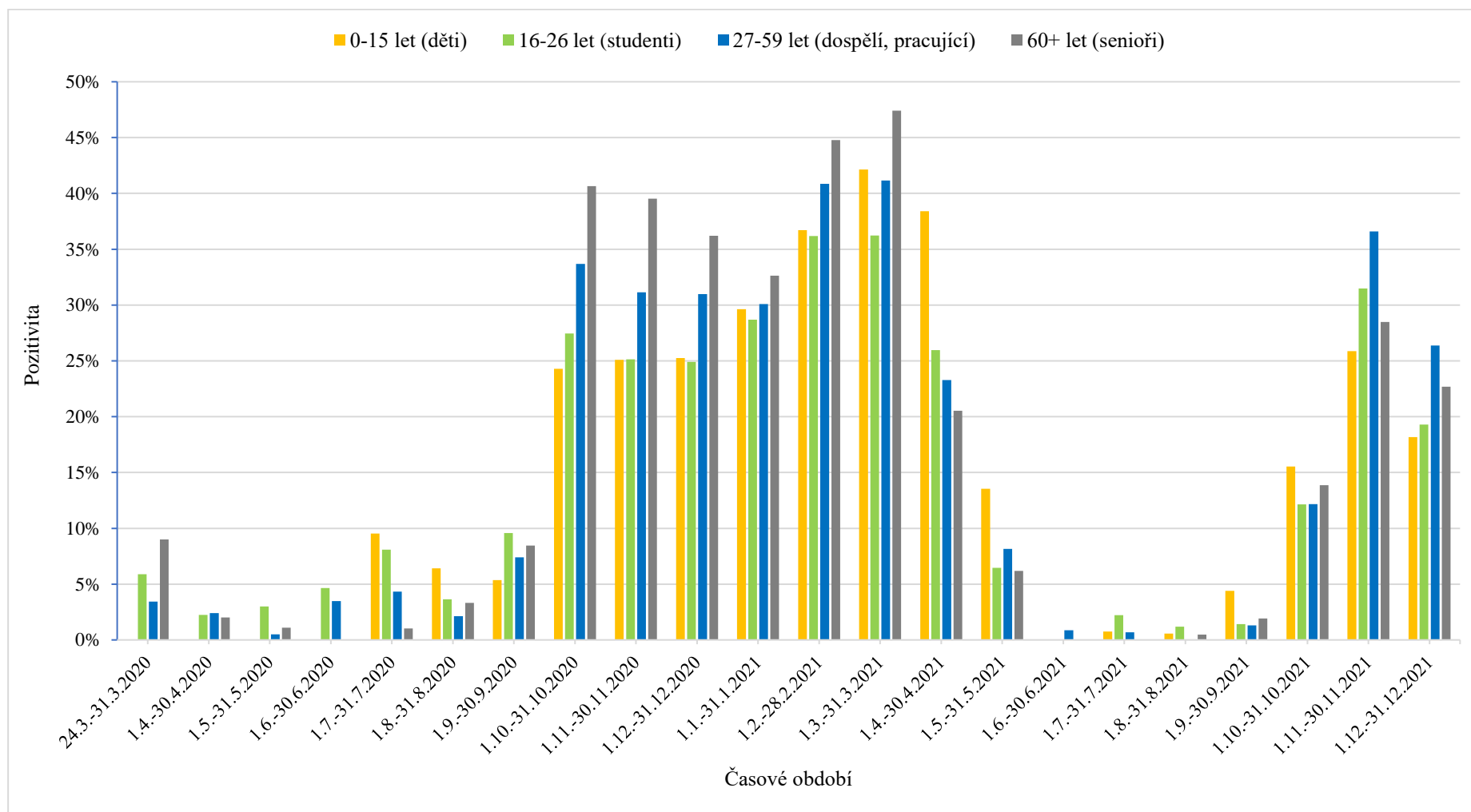
Kategorie 27-59 let (dospělí, pracující) zaujímá největší podíl z celkové populace. Proto jistě dominuje v počtu vyšetřených osob ve všech obdobích, kromě listopadu 2021, kde zaujímá 2. místo (Graf 4). Největší nárůst pozitivita byl pozorován mezi zářím a říjnem 2020. Od října do ledna 2021 se pozitivita držela mezi 30 a 35 %. Její maximum bylo zaznamenáno v březnu 2021, kdy hodnota činila 41,2 %. V lehkém

závěsu následuje únor 2021 s 40,9 %. Poté následoval pokles procenta pozitivitu, jako u ostatních skupin. Nárůst nastal opět od října 2021 a v listopadu 2021 vykazovala tato kategorie pozitivitu 36,6 % (Graf 5).

Nejrizikovější **kategorie 60+ let (senioři, důchodci)** se v březnu 2020, na počátku pandemie, pohybuje na 1. příčce s pozitivitou 9,0 %. Ke značnému nárůstu dochází v říjnu 2020, kdy pozitivita překračuje hranici 40 %. První místo v % pozitivitu si udržuje až do března 2021. Svého maxima dosahuje právě v březnu 2021, kdy její hodnota činí 47,4 %, což je nejvíce za celé zkoumané období ze všech věkových skupin. Následuje únor 2021 s 44,8 %. Od dubna 2021 pozitivita konstantě klesá a během léta 2021 se nevyskytují prakticky žádné pozitivní záchyty. K nárůstu dochází opět od října 2021 a v listopadu 2021 dosahuje pozitivita hranice 28,5 % (Graf 5). Nejvíce testovaných 60+ bylo v prosinci 2021, jejich počet činil 1 455 osob (Graf 4).



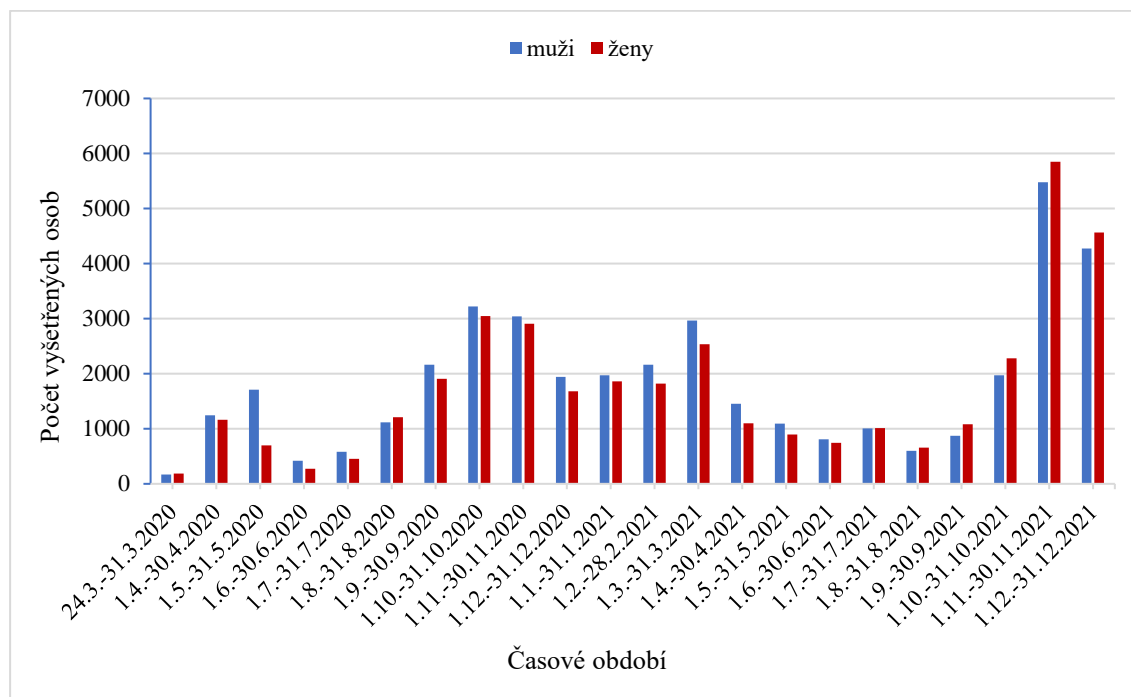
Graf 4 – Počet vyšetřených osob v jednotlivých věkových kategoriích



Graf 5 – Časový vývoj procenta pozitivita dle věku vyšetřovaných osob

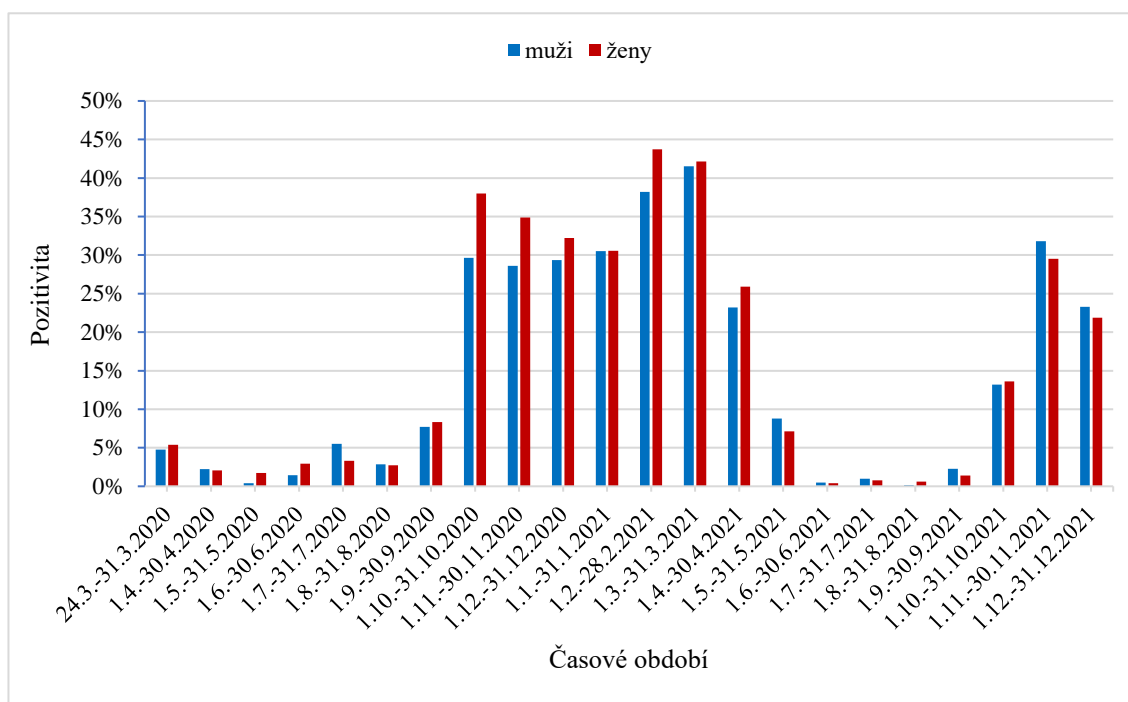
7.1.3. Časový vývoj procenta pozitivy dle pohlaví

Zastoupení mužů a žen v celkové populaci lze považovat za rovnoměrné. Celkem bylo metodou PCR v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21 vyšetřeno 40 283 mužů a 37 939 žen, z toho pozitivní výsledek vykazovalo 8 802 mužů a 8 820 žen. Mezi vyšetřenými výrazně nepřevažuje ani jedno z pohlaví, s výjimkou května 2021, kdy bylo otestováno 1 710 mužů a jen 698 žen, tj. méně než polovina (Graf 6).



Graf 6 – Počet vyšetřených osob dle pohlaví

Procento pozitivity je u obou pohlaví po většinu sledovaného období podobné. Významnější rozdíly byly zaznamenány v říjnu 2020, v listopadu 2020, v prosinci 2020 (minimálně) a v únoru 2021. V těchto měsících převažují ženy nad muži. Nejvýraznější rozdíl můžeme pozorovat v říjnu 2020, kdy muži činí 29,6 % pozitivitu a ženy 38,0 % (Graf 7).



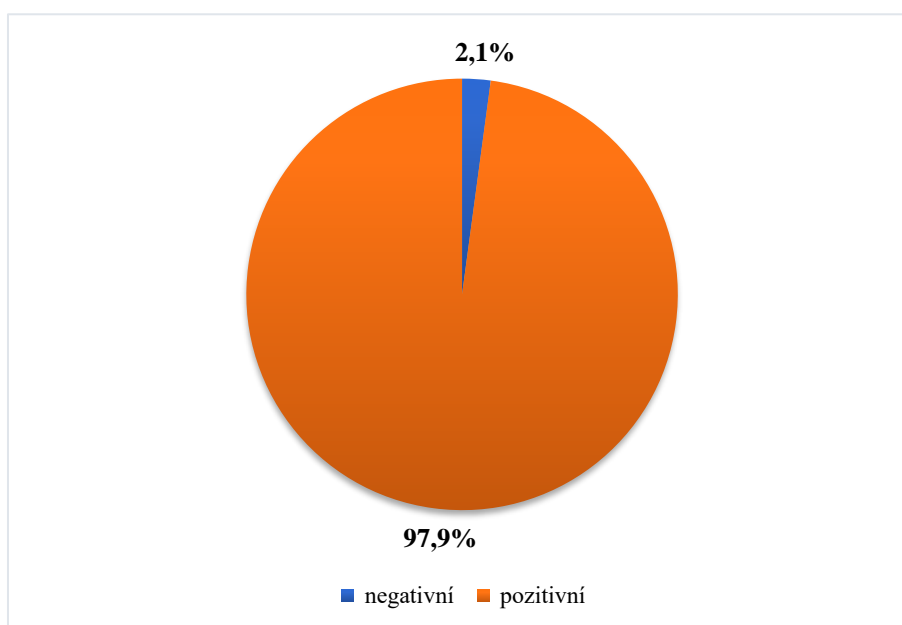
Graf 7 – Časový vývoj procenta pozitivita dle pohlaví vyšetřovaných osob

7.2. Stanovení procenta falešně pozitivních výsledků antigenních testů

V období leden–únor 2021 bylo v Antigenním odběrovém centru Nemocnice Strakonice, a.s. pozitivně testováno 48 lidí a u všech bylo posléze provedeno PCR vyšetření soupravou Liferiver. Ze 48 osob pozitivních na antigen mělo 47 osob pozitivní i PCR test, pouze jeden byl PCR negativní. Procento falešně pozitivních výsledků antigenních testů činí 2,1 % (Tabulka 9, Graf 8).

Tabulka 9 – Přehled výsledků PCR vyšetření u antigeně pozitivních osob

Antigenní test		PCR test (Liferiver)		
Pozitivní	48	Negativní	1	2,1 %
		Pozitivní	47	97,9 %



Graf 8 – Procentuální zastoupení výsledků PCR u antigeně pozitivních osob

7.3. Stanovení procenta falešně negativních výsledků antigenních testů

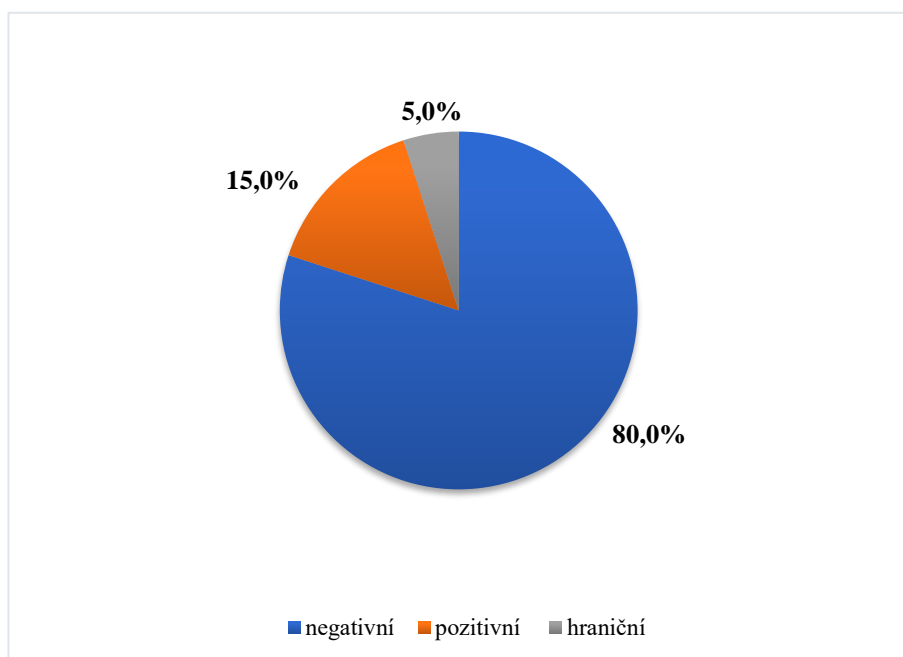
Celkem bylo v období leden–únor 2021 metodou real-time RT-PCR vyšetřeno 80 konsektivních vzorků od pacientů Nemocnice Strakonice, a.s. s negativních antigenním testem. Všechny tyto osoby současně vykazovaly symptomy COVID-19.

64 osob (80 %) mělo PCR test negativní, 12 pacientů (15 %) bylo PCR pozitivních a 4 osoby (4 %) byly interpretovány jako hraniční (Tabulka 10, Graf 9).

3 ze 4 hraničních výsledků byly podrobeny opakovanému odběru, který byl následně vyhodnocen jako pozitivní. Poslední hraniční výsledek byl po jasné klinické stránce označen ihned jako pozitivní. Z tohoto důvodu je zařazují do kategorie společně s pozitivními. Procento falešně negativních výsledků antigenních testů činí 20 % (hraniční + pozitivní) (Tabulka 10, Graf 9)

Tabulka 10 – Vyhodnocení negativních antigenních testů a symptomatických osob PCR metodou

Antigenní test		PCR test (Liferiver/Xpress Xpert)		
Negativní	80	Negativní	64	80 %
		Pozitivní	12	15 %
		Hraniční	4	5 %



Graf 9 – Procentuální zastoupení výsledků PCR vyšetření u antigenně negativních osob

Dále jsem vypočítala mediány Ct hodnot u pozitivních vzorků. Ct hodnota sice nemůže nahradit kvantitativní stanovení, ale lze jí použít pro orientační odhad hladiny RNA ve vzorku. Vzhledem k tomu, že se Ct hodnoty mezi jednotlivými metodami mohou lišit, vypočítala jsem mediány Ct hodnot pro obě použité detekční soupravy samostatně.

Četnost jejich použití u pozitivních/hraničních výsledků činí 8x Liferiver a 8x Xpress Xpert (Tabulka 11). Všechny mediány Ct hodnot jsou >30, u soupravy Liferiver jsou přibližně o 2 cykly vyšší než u Xpress Xpert (Tabulka 12).

Tabulka 11 – Počet PCR pozitivních/hraničních vzorků vyšetřených jednotlivými PCR testy

PCR výsledek		PCR souprava	
Pozitivní/hraniční	16	Liferiver	8
		Xpress Xpert	8

Tabulka 12 – Mediány Ct hodnot standardizovaných cílů u použitých PCR souprav

Gen	PCR pozitivní/hraniční	
	Liferiver	Xpress Xpert
	Ct hodnota (medián)	
ORF1 ab	31,3	-
N/N2	33,4	31,1
E	32,4	30,3

7.4. Pozitivní antigenní i PCR test

V období leden–únor 2021 se antigenním testem pozitivně vyšetřilo 146 pacientů Nemocnice Strakonice, a.s. Pro srovnání jsem zaznamenala vzorky s pozitivním antigenním testem, které byly zároveň ověřeny pomocí PCR ostatními pracovníky ÚMKAS. Celkem se jedná o 76 vzorků (stejný datum odběru antigenního i PCR testu). Z toho 37 jich bylo vyšetřeno soupravou Liferiver a 39 soupravou Xpress Xpert (Tabulka 13).

Tabulka 13 – Četnost použití PCR souprav u antigen i PCR pozitivních vzorků

Antigenní test	PCR test	PCR souprava	
Pozitivní	Pozitivní	Liferiver	Xpress Xpert
76	76	37	39

Pro srovnání jsem opět vypočítala mediány Ct hodnot u detekčních cílů těchto dvou testů. Všechny mediány Ct hodnot jsou ≤ 23 , u soupravy Liferiver jsou opět lehce vyšší (přibližně o 2 cykly) než mediány Ct hodnot u Xpress Xpert (Tabulka 14).

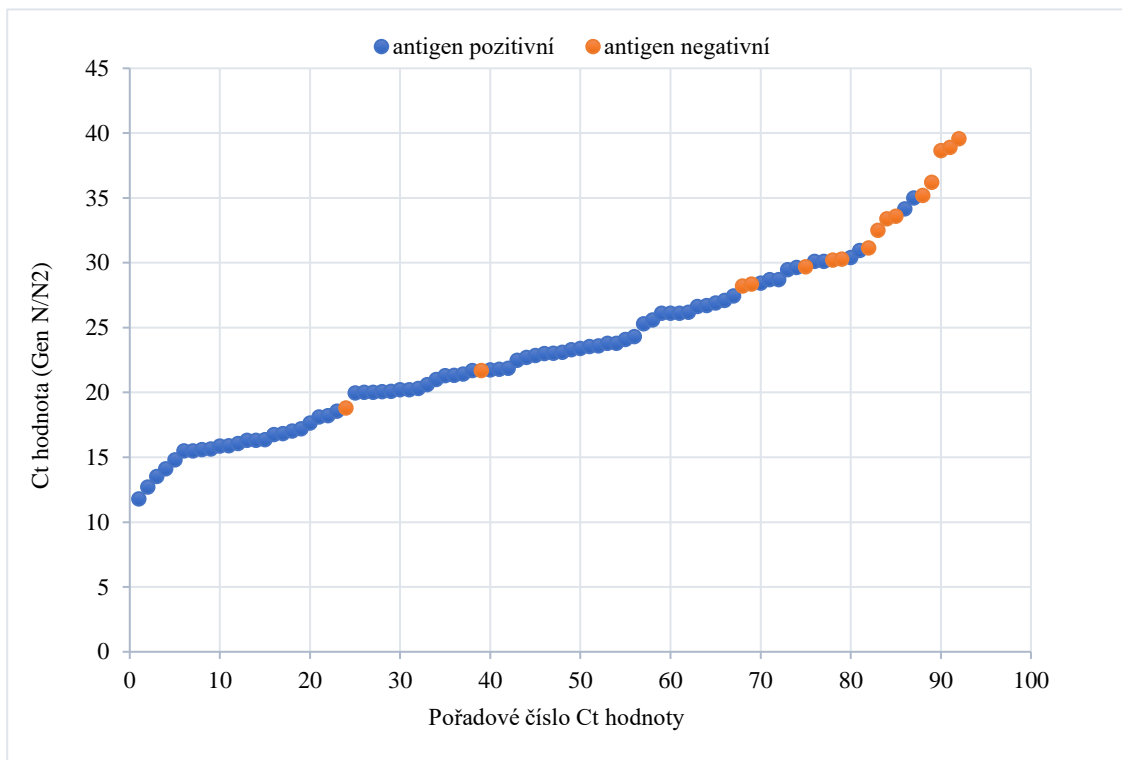
Tabulka 14 – Mediány Ct hodnot PCR systémů u standardizovaných cílů u antigen i PCR pozitivních pacientů

Gen	PCR i Ag pozitivní	
	Liferiver	Xpress Xpert
	Ct hodnota (medián)	
ORF 1 ab	22,4	-
N/N2	23,0	21,3
E	22,3	20,0

V Tabulce 15 jsou porovnány mediány Ct hodnot u standardizovaných cílů u osob Ag i PCR pozitivní vs. Ag negativní a PCR pozitivní. Graf 10 ukazuje, že osoby s negativním Ag testem vykazují vyšší Ct hodnoty než osoby Ag pozitivní, s výjimkou dvou Ag negativních s Ct 18,8 a 21,7. Většina osob Ag negativní měla Ct hodnoty PCR testu > 30 . Naopak u osob Ag pozitivní jsme takto vysoké hodnoty nikde nezaznamenali (Graf 10).

Tabulka 15 – Srovnání mediánů Ct hodnot u osob Ag i PCR pozitivní vs. Ag negativní a PCR pozitivní

Gen	Pozitivní Ag + pozitivní PCR		Negativní Ag + pozitivní PCR	
	Liferiver	Xpress Xpert	Liferiver	Xpress Xpert
	Ct hodnota (medián)			
N/N2	23,0	21,3	33,4	31,1
E	22,3	20,0	32,4	30,3
ORF1 ab	22,4	-	31,3	-



Graf 10 – Srovnání Ct hodnot v genu N/N2 u antigen pozitivních a antigen negativních vzorků

8 Diskuse

Prvním cílem mé bakalářské práce bylo praktické osvojení metod přímého průkazu: antigenní testy a real-time RT-PCR. Antigenní testy byly prováděny v Antigenním odběrovém centru Nemocnice Strakonice, a.s. Testování real-time RT-PCR metodou bylo vykonáváno v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. (oddělení ÚKMAS).

Centrální laboratoře Nemocnice Strakonice, a.s. měly již před koronavirovou pandemií, jako jediná okresní nemocnice Jihočeského kraje, akreditovanou PCR laboratoř. Ta ale nebyla uzpůsobena pro vyšetření velkého množství vzorků (testovalo se cca 10 vzorků týdně). Nouzový stav výrazně změnil požadavky. Po bleskurychlém dovybavení laboratoře a zaškolení personálu proběhlo první PCR testování na COVID-19 už 24. března 2020. PCR laboratoř se podařilo velmi rychle a kvalitně zprovoznit. Doba odezvy výsledku byla ve většině případů pouhých 24 hodin (nejrychlejší v Jihočeském kraji). Vyšetřovalo se především pro okresy Strakonice, Prachatice a část Písku (Jihočeské zdraví, 2020). V první vlně byla maximální kapacita laboratoře 500-700 vzorků týdně. Se silící pandemií byly čím dál tím větší nároky na navýšení testovací kapacity laboratoře, proto se neustále usilovně pracovalo na její modernizaci. Od prvního PCR testování (24. března 2020) do 31. prosince 2021 bylo vyšetřeno celkem 78 222 vzorků. Z toho 17 622 osob bylo vyhodnoceno jako pozitivní a 60 600 osob mělo výsledek negativní. Nejvíce vzorků, tj. 11 332, bylo během jednoho měsíce vyšetřeno v listopadu 2021. V závěru roku 2021 se vyšetřovalo kolem 2 700-3 600 vzorků týdně.

První případ COVID-19 byl v ČR potvrzen 1. března 2020. Od té doby se onemocnění postupně rozšířilo po celé republice. První vlna pandemie, ve srovnání s ostatními státy, proběhla velmi mírně, a to především vlivem rychlého zavedení přísných protiepidemických opatření. Do doby ukončení 1.nouzového stavu (17. května 2020), byl nejvyšší počet případů COVID-19 na 100 000 obyvatel zachycen v Praze. Jihočeský kraj se řadil mezi nejméně zasažené kraje. V dalších vlnách už to tak optimistické nebylo. Na podzim 2020 začal počet pozitivních strmě stoupat a ČR se zařadila mezi nejvíce zasažené státy Evropy (v přepočtu nově nakažených na 1 milion obyvatel). Na počátku roku 2021 se začalo v ČR očkovat proti COVID-19. Trend nárůstu infikovaných ale neustále pokračoval a ČR se zařadila dokonce mezi nejpostiženější

státy světa. V březnu 2021 bylo zaznamenáno nejvíce potvrzených denních úmrtí na COVID-19, což bylo hlavní příčinou kolapsu českých nemocnic. Od dubna 2021 začala pandemie postupně slábnout. Další vlna vypukla opět na podzim 2021, už ale nebyla tak silná jako ta jarní 2021 (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022).

Druhým cílem mé práce bylo zpracovat statistický přehled PCR testů provedených v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. v období 2020/21. Časový vývoj procenta pozitivity zachycuje jednotlivé pandemické vlny a koreluje s celorepublikovou křivkou.

První vlna (březen–květen 2020) ukazuje nízký záchyt pozitivity, do května 2020 bylo celkem pozitivně testováno 63 osob. Většina pozitivních byla zaznamenána u pracujících a seniorské populace. V kategorii dětí do 15 let nebyl zachycen žádný pozitivní případ. Zajímavý fakt v této vlně můžeme pozorovat v květnu 2020, kdy výrazně převažuje testování populace mužů nad ženami, i přes rovnoměrnost pohlaví v populaci. Za vysvětlení toho výkyvu považuji zavedení povinného testování při překročení hranic (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022). Vysoký počet mužů v Jihočeském kraji pracuje v zahraničí.

Na podzim 2020 vypuká další vlna pandemie, která s menšími výkyvy pokračuje až do března 2021. Vrcholí koncem února 2021, kdy byla zjištěna nejvyšší dosavadní pozitivita 45,8 %. V tomto období můžeme pozorovat nejvyšší počty % pozitivity u věkové kategorie 60+ (nejvíce riziková skupina). Tento fakt lze považovat za vysvětlení nejvyšší zaznamenané úmrtnosti a zatížení českých nemocnic v únoru–březnu 2021 (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022). Z Grafů můžeme vidět, že pozitivita v kategorii 60+ kulminuje, a právě v březnu 2021 dosahuje svého vrcholu 47,4 %. Podíl na vysokém počtu pozitivních má i nová, více nakažlivá, varianta Alfa. Od dubna 2021 procento pozitivních výrazně klesá. Během léta 2021 se počty pozitivních vzorků vyskytují velmi minoritně. Celkově se ale během léta 2021 méně testuje.

K nárůstu infikovaných dochází opět na podzim 2021, kdy se objevuje i nová Delta mutace. V tomto období můžeme pozorovat zvýšený počet provedených testů věkové kategorie 0-15 let, převážně v důsledku zavedení celoplošného povinného testování ve školách. Během listopadu 2021 bylo metodou PCR vyšetřeno 4 630 vzorků od dětí, což bylo dosavadní maximum provedených testů během jednoho měsíce ze všech věkových

kategorií. V souvislosti s vysokým množstvím testů, strmě stoupá % positivity u dětské skupiny. Během září a října 2021 zaujímá tato populace dokonce první příčku. V listopadu 2021 můžeme pozorovat trend vzestupu kategorie 16-26 let a 27-59 let, kde lze předpokládat přenesení infekce COVID-19 od mladší populace dětí. V závěru roku 2021 dominují skupiny dospělých a seniorů. V této podzimní vlně 2021 už nezaznamenáváme tak vysoká čísla positivity (maximum 32,4 %) ani úmrtí, jako během jarní vlny pandemie. Důvodem je pravděpodobně vysoká proočkovanost seniorské populace. Od září 2021 se přeočkovává 3. (posilující) dávkou (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022).

Posledním cílem mé bakalářské práce bylo ověření spolehlivosti antigenních testů Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott. Z hlediska managementu pacientů, přijímaných v době největšího zatížení nemocnice, byla velmi důležitá jejich rychlá triage. Od konce léta 2020 (Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2022) se staly široce dostupnými antigenní testy, které umožňovaly výrazné zrychlení diagnózy u velké části symptomatických pacientů. Vzhledem k jejich deklarované nižší senzitivitě a specificitě, v porovnání s PCR, bylo velmi důležité ověřit jejich fungování v podmínkách Nemocnice Strakonice, a.s.

Celoplošné testování asymptomatických osob pomocí antigenních testů není odborníky konsenzuálně doporučováno (Dřevínek et al., 2021). Při nízké prevalenci onemocnění v populaci je pozitivní prediktivní hodnota vyšetření nízká. Nezanedbatelné procento testů se při následném ověření PCR může ukázat jako falešně pozitivní. Na souboru 48 vzorků, s pozitivním antigenním testem z Antigenního odběrového centra Nemocnici Strakonice, a.s., jsem metodou PCR zjistila pouze jednu falešně pozitivní reakci (2,1 %). Tento fakt lze vysvětlit danou 99,8 % specificitou, což je řádově vyšší, než limit požadovaný pro schválení antigenních testů (Global point of care, 2022). Dalším možným vysvětlením může být i provádění testů zkušeným zdravotnickým personálem. Z mého souboru nebylo možné senzitivitu a specificitu vypočítat, jelikož se negativní antigenní výsledky neověřovaly pomocí PCR.

Antigenní testy jsou naopak doporučovány pro testování symptomatických jedinců (Dřevínek et al., 2021). V tomto případě je pozitivní prediktivní hodnota testu vysoká. Problém představuje jejich nižší citlivost, a tak se mohou objevovat falešně negativní výsledky. Ty se vyskytují převážně u testovaných osob, které jsou na počátku

onemocnění a mají tak nižší virovou nálož. Abych ověřila spolehlivost antigenních testů od firmy Abbott na příjmových ambulancích Nemocnice Strakonice, a.s., metodou PCR jsem dále testovala 80 konsektivních vzorků. Všichni tito pacienti byli symptomatictí, ale měli negativní antigenní test. Celkem bylo zjištěno 16 (20 %) falešně negativních reakcí. Naměřené Ct hodnoty byly poměrně vysoké. Žádná nebyla menší než 28, s výjimkou dvou antigenně negativní vzorků (na PCR vyhodnoceny s Ct 18,8 a 21,7 – vysoká virová nálož). Vyšší Ct hodnoty znamenají nižší koncentraci RNA SARS-CoV-2 v odebraném vzorku, což mohla být první pravděpodobná příčina falešně negativní reakce. Další možnou falešnou reakci si vysvětluji špatným odběrem vzorku během antigenního testování, či chybným provedením nebo vyhodnocením testu. Za pozitivní výsledek je nutné považovat i velmi slabé linie. Právě tyto možnosti považuji za relevantní vysvětlení dvou nízkých Ct hodnot u Ag negativních vzorků v Grafu 10.

Pro srovnání jsem ve stejném časovém období (leden-únor 2021) zaznamenala 76 pacientů Nemocnice Strakonice, a.s. s pozitivním Ag i PCR testem (žádná falešně pozitivní reakce). Jejich Ct hodnoty jsem porovnávala s Ct hodnotami u Ag negativních, ale PCR pozitivních osob. U skupiny Ag i PCR pozitivních byly zjištěny podstatně nižší Ct hodnoty, které značí vyšší virovou nálož SARS-CoV-2. Na Grafu 10 můžeme vidět, kdy nám antigenní test s jistotou zachytí infekci COVID-19, tj. hodnota $Ct \leq 28$ (kromě dvou Ct hodnot – nejspíše došlo ke špatnému odběru, provedení či vyhodnocení během antigenního testování). U $Ct > 28$ spolehlivost tohoto druhu antigenního testu značně klesá a začínají se objevovat falešně negativní reakce. Senzitivitu a specificitu u této vyšetřované skupiny nelze taktéž vypočítat, jelikož v tomto období se ne všechny antigen pozitivní pacienti ověřovali referenční PCR, nebo byli na PCR test poslány až se zpožděním.

V zahraničí i ČR byla provedena řada studií hodnotící spolehlivost antigenních testů. Testy od firmy Abbott hodnotila i studie prováděná ve FN Motol. Podobně jako v mé práci bylo zjištěno minimální procento falešně pozitivních výsledků a 55,9 % falešně negativních výsledků. U vzorků s $Ct > 30$ antigenní testy nezachytily dokonce žádný pozitivní případ (Antigenní testy pro plošné testování? Jen pokud se často opakují, 2021).

Závěrem lze usoudit, že antigenní testy od výrobce Abbott jsou velmi spolehlivé pro osoby s vysokou koncentrací RNA ve vzorku (nízká Ct hodnota), ve většině případů se

jedná právě o symptomatické jedince. Jejich spolehlivost naopak klesá s nižší virovou koncentrací (vyšší Ct hodnota). Tomuto tvrzení odpovídají i hodnoty specificity – 99,8 % a senzitivity – 91,4 %. (s $Ct \leq 33$ až 94,1 %) (Global point of care, 2022). Studie Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR taktéž ukazuje, že antigenní testy od výrobce Abbott se řadí mezi kvalitnější (Aktualizované výsledky analýzy antigenních testů a hra Mistr antigenu, 2021). Výsledky antigenních testů jsou samozřejmě závislé i na správném odběru vzorku, provedení a vyhodnocení testu.

Všechny cíle mé bakalářské práce byly naplněny: praktické osvojení metod přímého průkazu, statistické zpracování přehledu PCR vyšetření a ověření spolehlivosti antigenních testů. Ve své práci jsem zaznamenala výskyt falešně pozitivních i negativních reakcí antigenních testů, čímž jsem potvrdila svou první hypotézu. Falešně pozitivní reakce byly prokázány minimálně. Ve větší míře jsem zaznamenala falešně negativní reakce, tento fakt potvrzuje nutnost použití PCR u symptomatických pacientů s negativním antigenním testem. Pro objektivnější zhodnocení Abbott antigenních testů by bylo určitě zapotřebí testovat větší skupinu vzorků. I tak si myslím, že jsem jejich kvalitu prokázala dostatečně. Použití těchto antigenních testů je jednoznačným přínosem pro POCT diagnostiku SARS-CoV-2 u suspektních jedinců na příjmových ambulancích Nemocnice Strakonice, a.s. Díky tomu lze pacienty včas izolovat na vyhrazená infekční COVID oddělení, čímž se naplnila i druhá hypotéza mé práce.

9 Závěr

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se seznámila s obecnou charakteristikou virů a koronavirů. Většinová část teorie se věnuje popisu koronaviru SARS-CoV-2, včetně onemocnění COVID-19 a jeho laboratorní diagnostiky (real-time RT-PCR, antigenní testy a sérologické stanovení protilátek proti SARS-CoV-2).

V praktické části jsem si osvojila metody přímého průkazu SARS-CoV-2: antigenní testy a RT-PCR v reálném čase. Dále jsem vytvořila statistický přehled PCR vyšetření provedených v Nemocnici Strakonice, a.s. v roce 2020/21 a závěrem jsem ověřila spolehlivost antigenních testů Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott.

Analýza dat provedených PCR testů ve strakonické nemocnici v roce 2020/21 ukázala jednotlivé pandemické vlny a hlavní příčinu kolapsu českých nemocnic v období jarní vlny 2021, v důsledku vysoké positivity v rizikové skupině 60+. Zároveň se potvrdil význam dodržování protiepidemických a karanténních opatření.

Po osvojení metod antigenního i PCR testování mohou objektivně porovnat jejich pozitiva a negativa. Antigenní testy považují za velmi snadné jak na provedení, tak i jejich vyhodnocení (bez asistence VŠ pracovníka). Pokud vyšetřovaná osoba vykazuje symptomy onemocnění COVID-19 (předpokládáme u ní vysokou virovou nálož), je tato forma testování v POCT režimu spolehlivou alternativou PCR. Rychlým zjištěním pozitivního výsledku antigenního testu můžeme daného jedince individuálně izolovat. V případě jednoznačné kliniky můžeme dokonce potvrdit infekci COVID-19, i bez ověření pomocí PCR, jelikož falešně pozitivní reakce antigenního testu Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott byly minimální.

I přes časovou náročnost a potřebnou kvalifikaci, musím PCR metodu považovat za zlatý standard laboratorní diagnostiky SARS-CoV-2. Zjednodušení PCR jde neustále kupředu, postupně dochází k automatizaci celého procesu a k velké časové úspoře.

10 Citovaná literatura

1. AGHOVÁ, T., 2021. *Polymerázová řetězová reakce*. [online]. Doba genová. Praha: Asociace genové terapie, z.s. [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://doba-genova.cz/polymerazova-retezova-reakce/>
2. Aktualizované výsledky analýzy antigenních testů a hra Mistr antigenu, 2021. In: *ÚOCHAB AV ČR* [online]. Praha: Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <https://www.uochb.cz/cs/novinky/284/aktualizovane-vysledky-analyzy-antigennich-testu-a-hra-mistr-antigenu>
3. ALANAGREH, L., ALZOUGHLOOL, F., ATOUM, M., 2020. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens* [online]. 9(5), 1-11 [cit. 2021-10-20]. DOI: 10.3390/pathogens9050331. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/5/331>
4. ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., 2006. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902906-2-0.
5. *Antigenní testy pro plošné testování? Jen pokud se často opakují*, 2021. [online]. FN Motol: Odbor komunikace. Praha [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <https://www.fnmotol.cz/odbor-komunikace/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/archiv-2021/10032021-tz-antigenni-testy-pro-plosne-testovani-j/>
6. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., VÁVRA, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
7. BENEŠ, J., PAVEL, D., HUSA, P., CHRDLA, A., ŠTEFAN, M., 2021. *Covid-19: diagnostika a léčba: Doporučený postup SIL ČLS JEP*. [online]. Infekce.cz. [cit. 2021-10-13]. Dostupné z: https://www.infekce.cz/Covid2019/DPcovid-19_SIL_0421.pdf
8. BÝMA, S., BALÍK, M., ČERNÝ, V., DLOUHÝ, P., 2021. *MEZIOBOROVÉ STANOVISKO: k použití monoklonálních protilátek v léčbě a postexpoziční*

- profylaxi COVIDu-19*. [online]. Infekce.cz. Praha [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <https://www.infekce.cz/Covid2019/MezioboroveMAB0821.pdf>
9. *CoVariants* [online], 2022. [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://covariants.org/>
 10. DLOUHÝ, P. et al., 2020. *Farmakologická léčba: Covid-19: od diagnózy k terapii*. [online]. Acta Medicinae: Farmakologická léčba. [cit. 2021-10-12]. Dostupné z: <http://www.actamedicinae.cz/literatura.htm>
 11. DŘEVÍNEK, P., BENEŠ, J., BOHONĚK, M., KRÁTKÁ, Z., ZELENÁ, H., 2021. *Teze o SARS-CoV-2 a COVID-19 a doporučená opatření*. [online]. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/teze-o-sars-cov-2-a-covid-19-a-doporucena-opatreni>
 12. DŘEVÍNEK, P., JEŽO, E., ZÁKOUCKÁ, H., MACEK, M., MACKOVÁ, B., 2021. *Komentář k interpretaci slabě pozitivních nálezů metodou PCR s vysokými hodnotami Ct: Odborné stanovisko Laboratorní skupiny COVID (LS COVID) při Ministerstvu zdravotnictví ČR*. [online]. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/komentar-k-interpretaci-slabe-pozitivnich-nalezu-metodou-pcr-s-vysokymi-hodnotami-ct>
 13. DŘEVÍNEK, P. et al., 2020. *Sérologický průkaz protilátek proti SARS-CoV-2*. [online]. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. [cit. 2021-12-17]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/serologicky-prukaz-protilatek-proti-sars-cov-2>
 14. GENEXPERT, 2020. *Xpert® Xpress SARS-CoV-2: Návod k použití* [online]. A. USA: Cepheid [cit. 2022-03-15]. 302-3562. Dostupné z: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual/eul_0511_070_00_xpert_xpress_sars_cov2_ifu.pdf?ua=1
 15. GITMAN, M., SHABAN, M., PANIZ-MONDOLFI, A., SORDILLO, E., 2021. *Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 Pneumonia. Diagnostics (Basel, Switzerland)*. MDPI, 11(7), 1270. DOI: 10.3390/diagnostics11071270. ISSN 2075-4418. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34359353>
 16. *Global point of care: Abbott* [online], 2022. California: Abbott [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <https://www.globalpointofcare.abbott/cs/index.html>

17. HAMPLOVÁ, L., GÖPFERTOVÁ, D., PAZDIORA, P., DOHNAL, K., JANOVSÁ, D., 2015. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1. Praha: Stanislav Juhuňák- TRITON. ISBN 978-80-7387-934-1.
18. HUBÁČEK, P., 2020. Nově popsáný koronavirus SARS-CoV-2 a jeho biologické souvislosti. *FARMAKOTERAPEUTICKÁ REVUE: Nový koronavirus SARS-CoV-2 a onemocnění covid-19* [online]. Praha: Current Media, 5(1), 15-22 [cit. 2021-10-12]. ISSN 2533-6878. Dostupné z: https://farmakoterapeutickarevue.cz/Resources/Upload/farmakoterapie/casopisy/supplementum01-2020//fr_2020_suppl1_covid-19.pdf
19. HU, B., GUO, H., ZHOU, P., SHI, Z., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 19(3), 141-154 [cit. 2021-11-15]. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
20. CHAN, P., CHAN, M., 2013. Tracing the SARS-coronavirus. *Journal of Thoracic Disease*. 5(2), 118-121. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747522/>
21. CHAU, C., STROPE, J., FIGG, W., 2020. COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy*. John Wiley and Sons Inc, 40(8), 857-868. DOI: 10.1002/phar.2439. ISSN 1875-9114. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32643218>
22. *Jihočeské zdraví: Jihočeské nemocnice v době COVID-19*, 2020. České Budějovice: Jihočeské nemocnice, a.s., 2020(1). Dostupné také z: http://www.nemcb.cz/upload/files/jihoceske-zdravi/jihoceske-zdravi-11.pdf?fbclid=IwAR0Z0bTNDY96D8JSkcsot1iLLByKXersApa_B6_qKzIbelCy4IjYWcuZEXU
23. JIN, Y. et al., 2020. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses* [online]. 12(4), 1-17 [cit. 2021-10-20]. DOI: 10.3390/v12040372. ISSN 1999-4915. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/372>

24. JIŘINCOVÁ, H., MACKOVÁ, B., DŘEVÍNEK, P., HAJDÚCH, M., 2020. *Přímá detekce SARS-CoV-2: detekce antigenu*. [online]. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. [cit. 2021-10-12]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/prima-detekce-sars-cov-2-detekce-antigenu>
25. KLEIN, S. et al., 2020. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses*. MDPI, 12(8), 863. DOI: 10.3390/v12080863. ISSN 1999-4915. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32784757>
26. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství: Klinika – Výzkum – Informace Původní práce – Přehledy – Kazuistiky*, 2021. Praha: Trios, 27(2). ISSN 1211-264X.
27. KOLÁŘOVÁ, L. et al., 2020. *Obecná a klinická mikrobiologie*. 1. Praha: Galén. ISBN 978-807-4924-774.
28. KRAFCIKOVA, P., SILHAN, J., NENCKA, R., BOURA, E., 2020. Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nature Communications* [online]. 11(1), 1-7 [cit. 2021-10-20]. DOI: 10.1038/s41467-020-17495-9. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-17495-9>
29. KYOSEI, Y. et al., 2021. Antigen tests for COVID-19. *Biophysics and physcobiology*. The Biophysical Society of Japan, 18, 28-39. DOI: 10.2142/biophysico.bppb-v18.004. ISSN 2189-4779. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33954080>
30. LEE, L., NORDMAN, E., JOHNSON, M., OLDHAM, M., 2013. A low-cost, high-performance system for fluorescence lateral flow assays. *Biosensors*. MDPI, 3(4), 360-373. DOI: 10.3390/bios3040360. ISSN 2079-6374. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586412>
31. LIFERIVER, 2020. *Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time multiplex RT-PCR (detekce pro 3 geny): Návod k použití* [online]. China: Shanghai ZJ Bio-Tech Co.,Ltd. [cit. 2022-03-15]. RR-0479-02. Dostupné z:

https://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual/eul_0486_139_00_novel_coronavirus_sars_cov_2_real_time_multiplex_rt_pcr_kit_ifu.pdf

32. LIN, P., WANG, M., WEI, Y., KIM, T., WEI, X., 2020. Coronavirus in human diseases: Mechanisms and advances in clinical treatment. *MedComm* [online]. 1(3), 270-301 [cit. 2021-10-20]. DOI: 10.1002/mco2.26. ISSN 2688-2663. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.26>
33. MACKOVÁ, B., JIŘINCOVÁ, H., DŘEVÍNEK, P., HUBÁČEK, P., 2020. *Principy přímého průkazu SARS-CoV-2 metodou RT-PCR*. [online]. Společnost pro lékařskou mikrobiologii. s. 1 [cit. 2021-10-12]. Dostupné z: <https://www.splm.cz/article/principy-primeho-prukazu-sars-cov-2-metodou-rt-pcr>
34. MATHURIA, J., YADAV, R., RAJKUMAR, ., 2020. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of infection and public health*. Published by Elsevier Ltd on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences, 13(7), 901-905. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.06.005. ISSN 1876-035X. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32534946>
35. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky* [online], 2022. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19>
36. *Nextractor® NX-48S User Guide* [online], 2020. Republic of Korea: Genolution [cit. 2022-03-07]. Dostupné z: https://dmech.moh.gov.vn/documents/10182/22203828/upload_00009943_1631869394843.pdf?version=1.0&fileId=22226000
37. POLJAK, V., 2003. SARS. *Internal Medicine for Practice*. 5(7), 330-331. ISSN 12127299. Dostupné také z: <https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200307-0002.php>
38. RAMADAN, N., SHAIB, H., 2019. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. *Germs* [online]. 9(1), 35-42 [cit. 2021-10-26]. DOI: 10.18683/germs.2019.1155. ISSN 22482997. Dostupné z:

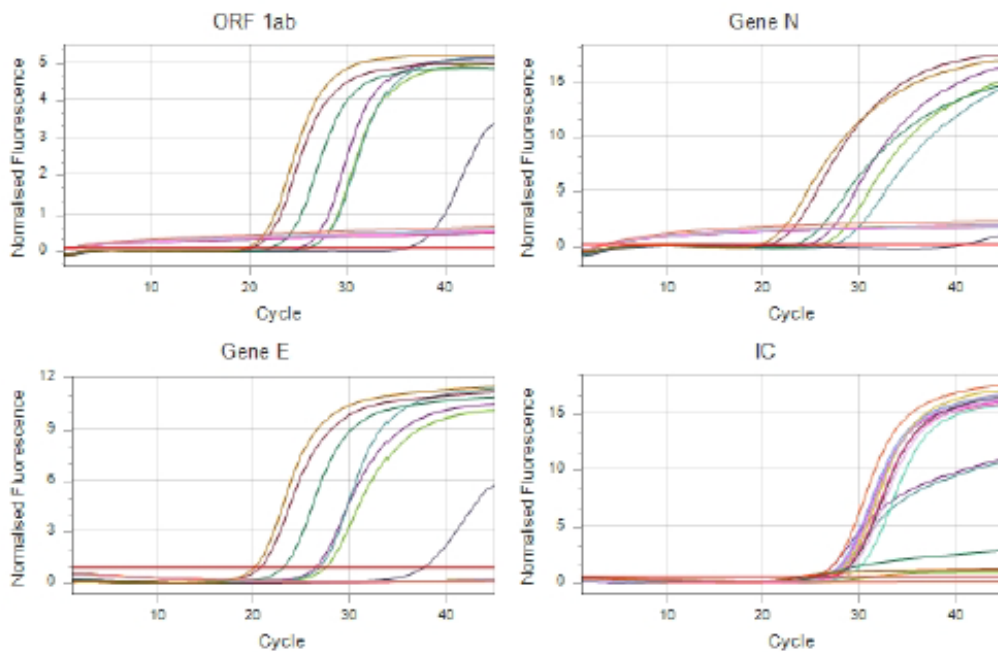
<http://www.germs.ro/en/Articles/Middle-East-respiratory-syndrome-coronavirus-MERS-CoV-A-review-886>

39. *Státní zdravotní ústav: Základní informace o onemocnění novým koronavirem – covid-19 (coronavirus disease 2019)* [online], 2021. Centrum epidemiologie a mikrobiologie: SZÚ [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/Zakladni_info/2020_08_07_Covid_19_zakladni_informace.pdf
40. STEJSKAL, F., 2020. Covid-19 – devět měsíců zkušeností. Jsou přístupy ke kontrole této infekce racionální?. *FARMAKOTERAPEUTICKÁ REVUE: Nový koronavirus SARS-CoV-2 a onemocnění covid-19* [online]. Praha: Current Media, 5(1), 8-14 [cit. 2021-10-28]. ISSN 2533-6878. Dostupné z: https://farmakoterapeutickarevue.cz/Resources/Upload/farmakoterapie/casopisy/supplementum01-2020//fr_2020_suppl1_covid-19.pdf
41. STRÍŽOVÁ, Z., MILOTA, T., BARTŮŇKOVÁ, J., 2020. Aktuální problematika COVID-19 z pohledu imunologa. *Časopis lékařů českých* [online]. 159(2), 54-96 [cit. 2021-10-12]. ISSN 1805-4420. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2020-2-6/download?hl=cs>
42. SÚKL: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online], 2022. Praha [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/covid-19>
43. TROJÁNEK, M. et al., 2020. Nový koronavirus (SARS-CoV-2) a onemocnění COVID-19. *Časopis lékařů českých* [online]. 2020. 159(2), 54-96 [cit. 2021-10-12]. ISSN 1805-4420. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2020-2-6/download?hl=cs>
44. ÚZIS ČR: *Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic* [online], 2022. Praha [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php>
45. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.

46. *World Health Organization: Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update* [online], 2022. Geneva: WHO [cit. 2022-02-23]. Dostupné z: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
47. XIAO, Y. et al., 2021. Comparison of three TaqMan real-time reverse transcription-PCR assays in detecting SARS-CoV-2. *Journal of virological methods*. Elsevier B.V, 288, 114030-114030. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.114030. ISSN 1879-0984. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33275927>

11 Seznam příloh

Identifier: Liferiver Covid 19



Výsledky			
Well	Colour	Sample Name	Decision
1	■	pc iz	Positive Control
2	■	pc	Positive Control
3	■	nci 1	Negative Control
4	■	c88150	Pozitivní
5	■	c88151	Negativní
6	■	c88152	Negativní
7	■	c88153	Negativní
8	■	c88154	Negativní
9	■	c88155	Pozitivní
10	■	c88156	Negativní
11	■	c88157	Pozitivní
12	■	c88158	Negativní
13	■	c88159	Negativní
14	■	c88160	Negativní
15	■	c88161	Pozitivní
16	■	c88162	Negativní
17	■	c88163	Pozitivní
18	■	nc	NTC

Příloha 1 – Ukázka vyhodnocení real-time RT-PCR na detekčním přístroji MIC PCR Cycler (zdroj: vlastní – report z přístroje)

Obrázek 1: Virová částice – virion.....	9
Obrázek 2: Stavba a genom SARS-CoV-2	13
Obrázek 3: Přehled výskytu dominantních variant SARS-CoV-2 v ČR.....	20
Obrázek 4: Princip PCR reakce.....	22
Obrázek 5: Princip antigenního testu	23
Obrázek 6: Správný postup nazofaryngeálního výtěru	26
Obrázek 7: Princip postupu automatického analyzátoru Nextractor® NX-48S	27
Obrázek 8: Automatický izolátor Nextractor® NX-48S.....	28
Obrázek 9: Izolační kazety k přístroji Nextractor	28
Obrázek 10: Speciální MIC Tubes mikroskopické s ochranným víčkem	31
Obrázek 11: Uzavřené MIC Tubes mikroskopické s izoláty a Master Mix, speciální nástavec na uzavírání MIC Tubes	33
Obrázek 12: Přístroj MIC Real Time PCR Cyclers.....	33
Obrázek 13: Otevřený detekční přístroj MIC Real Time PCR Cyclers (BMS-bio-molecular systems) s uzavřenými MIC Tubes	34
Obrázek 14: Přístroj GeneXpert.....	37
Obrázek 15: Kazeta Xpert Xpress SARS-CoV-2.....	37
Obrázek 16: Souprava pro provedení antigenního testu od firmy Abbott	39
Obrázek 17: Ukázka negativního a pozitivního výsledku antigenního testu Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device od firmy Abbott	39
Tabulka 1: Přehled lidských koronaviřů	12
Tabulka 2: Přehled schválených vakcín v ČR proti onemocnění COVID-19.....	16
Tabulka 3: Profil detekčního přístroje MIC Real Time PCR Cyclers	32
Tabulka 4: Nastavení kanálu v přístroji MIC Real Time PCR Cyclers.....	32
Tabulka 5: Výsledky kontrol detekce na přístroji MIC pro validaci PCR vyšetření	35
Tabulka 6: Algoritmus interpretace výsledků z přístroje MIC za použití soupravy Liferiver (dle výrobce)	35

Tabulka 7: Vyhodnocení PCR na základě Ct hodnot na pracovišti ÚKMAS.....	36
Tabulka 8: Algoritmus automatického hodnocení výsledků Xpert Xpress SARS-CoV-2 testování na přístroji GeneXpert (nastaveno dle výrobce).....	37
Tabulka 9: Přehled výsledků PCR vyšetření u antigenně pozitivních osob.....	52
Tabulka 10: Vyhodnocení negativních antigenních testů u symptomatických osob PCR metodou.....	53
Tabulka 11: Počet PCR pozitivních/hraničních vzorků vyšetřených jednotlivými PCR testy	54
Tabulka 12: Mediány Ct hodnot standardizovaných cílů u použitých PCR souprav.....	54
Tabulka 13: Četnost použití PCR souprav u antigen i PCR pozitivních vzorků.....	54
Tabulka 14: Mediány Ct hodnot PCR souprav u standardizovaných cílů u pacientů antigen a PCR pozitivních.....	55
Tabulka 15: Srovnání mediánů Ct hodnot u osob Ag i PCR pozitivní vs. Ag negativní a PCR pozitivní	55
Graf 1: Počet provedených PCR testů v Nemocnici Strakonice a.s.	41
Graf 2: Počet pozitivních a negativních výsledků PCR testů.....	43
Graf 3: Časový vývoj procenta positivity u všech pacientů vyšetřených v Nemocnici Strakonice, a.s.	45
Graf 4: Počet vyšetřených osob v jednotlivých věkových kategoriích	48
Graf 5: Časový vývoj procenta positivity dle věku vyšetřovaných osob.....	49
Graf 6: Počet vyšetřených osob dle pohlaví.....	50
Graf 7: Časový vývoj procenta positivity dle pohlaví vyšetřovaných osob	51
Graf 8: Procentuální zastoupení výsledků PCR u Ag pozitivních osob	52
Graf 9: Procentuální zastoupení výsledků PCR vyšetření u Ag negativních osob	53
Graf 10: Srovnání Ct hodnot v genu N/N2 u Ag pozitivních a Ag negativních	56

12 Seznam zkratek

ACE2	Angiotenzin konvertující enzym 2
Ag	Antigen
ARDS	Syndrom akutní respirační tísně
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza
COVID-19	Coronavirus disease 2019
Ct	Cycle of treshold, cyklus prahu
ČR	Česká republika
DEPC	Diethyl pyrokarbonát
DNA	Deoxyribonukleové kyselina
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FFP2/FFP3	Filtering Face Piece 2/3
HCoV-229E	Human coronavirus 229E
HCoVHKU1	Human coronavirus HKU1
HCoV-OC43	Human coronavirus OC43
HCoVNL63	Human coronavirus NL63
IC	Interní kontrola
IgG/IgM/IgA	Imunoglobulin třídy G/M/A
MAB	Monoklonální protilátky
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
mmHg	Torr, milimetr rtuťového sloupce
mRNA	Mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina

Nci	Negativní interní kontrola
ORF	Otevřený čtecí rámeček
POCT	Point of care testing
RdRP	RNA-dependentní RNA polymeráza
Real-time RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálné čase
RNA	Ribonukleová kyselina
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome – related virus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome – related virus 2
SOP	Standardní operační postup
TAS	Tracheální aspirát
ÚKMAS	Úsek klinické mikrobiologie a antibiotické středisko
VOC	Variant of Concern, obávaná varianta
VŠ	Vysokoškolský