

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Porovnání detekce SARS-CoV-2
v nasopharyngeálních stěrech a kloktacích
samoodběrových vzorcích.**

Diplomová práce

Kateřina Kubáňová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph. D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina KUBÁŇOVÁ
Osobní číslo: R190062
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Porovnání detekce SARS-CoV-2 v nasofaryngeálních stěrech a kloktacích samoodběrových vzorcích.
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Literární rešerše, provedení experimentů včetně zápisu a vyhodnocení, zhodnocení výsledků experimentů, příprava prezentace výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Chilamakuri, R., & Agarwal, S. (2021). COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells*, 10(2), 206. <https://doi.org/10.3390/cells10020206>
- Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics*, 23–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2021). SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 413(1), 49–71. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>
- Mittal, A., Gupta, A., Kumar, S., Surjit, M., Singh, B., Soneja, M., Soni, K. D., Khan, A. R., Singh, K., Naik, S., Kumar, A., Aggarwal, R., Nischal, N., Sinha, S., Trikha, A., & Wig, N. (2020). Gargle lavage as a viable alternative to swab for detection of SARS-CoV-2. *The Indian journal of medical research*, 152(1 & 2), 77–81. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2987_20
- See, A., & Toh, S. T. (2020). Respiratory sampling for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: An Overview. *Head & neck*, 42(7), 1652–1656. <https://doi.org/10.1002/hed.26232>

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termin odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FUNKČNÍ BIOLOGIE A GENETIKY
Slechtelova 47, 783 71 Olomouc - Holiče
tel. +420 585 634 301

10-05-2021

V Olomouci dne 19. května 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Bc. Kateřina Kubáňová
Název práce:	Porovnání detekce SARS-CoV-2 v nasopharyngeálních stěrech a kloktacích samoodběrových vzorcích.
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Koudeláková, Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2021
Klíčová slova:	SARS-CoV-2, COVID-19, koronavirus, samoodběr, nasopharyngeální stěr, GARGTEST, kloktání, RT-PCR.
Počet stran:	79
Počet příloh:	2
Jazyk:	český

Souhrn

Včasná a spolehlivá diagnostika SARS-CoV-2 je nezbytná pro kontrolu přetrvávající pandemie COVID-19. Současným standardem pro testování přítomnosti infekce SARS-CoV-2 je detekce pomocí real-time RT-PCR ze vzorků nasopharyngeálních stěrů. V důsledku globálního nedostatku ochranných pomůcek, diskomfortu spojeným s odběrem nasopharyngeálního stěru, potřebou odborného zdravotního personálu a vystavení personálu riziku nákazy z přítomného aerosolu, je ve všeobecném zájmu zavedení vhodné odběrové alternativy.

Cílem této práce byla validace komerční samoodběrové kloktací soupravy GARGTEST, nového systému, který přináší příjemnější odběr, snadnější transport a skladování vzorků určených k detekci přítomnosti viru SARS-CoV-2. Validace proběhla na základě srovnání výsledků detekce SARS-CoV-2 ve 724 párových vzorcích nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním pomocí multiplex real-time RT-PCR. Ve studii byla prokázána vysoká senzitivita (0,885) a specificita (0,958) nového systému a také silná shoda ($[\kappa] = 0,848$) mezi detekcí SARS-CoV-2 v nasopharyngeálních stěrech a samoodběrech kloktáním. Svou jednoduchostí a dostupností může odběr pomocí sady GARGTEST, spolu s detekcí RT-PCR, napomoci včasnému záchytu nakažených pacientů a tím zabránit dalšímu šíření viru v populaci.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	BSc Katerina Kubanova
Title:	Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs and self-collected gargle samples.
Type of thesis:	Master
Department:	Department of cellular biology and genetics, Faculty of science, UP in Olomouc
Supervisor:	MSc Vladimira Koudelakova, Ph. D.
The year of presentation:	2021
Keywords:	SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, self-collected, nasopharyngeal swab, GARGTEST, gargling, RT-PCR
Number of pages:	79
Number of appendices:	2
Language:	Czech

Summary

Early and reliable detection of SARS-CoV-2 is one of the most important measures to control the COVID-19 pandemic. The current standards for SARS-CoV-2 diagnostics recommend RT-PCR testing using nasopharyngeal swabs. Due to a global shortage of personal protective equipment, discomfort associated with nasopharyngeal swab collection, the need for trained healthcare professionals and the risks associated with their exposure to the virus-containing aerosols, there is a great interest in alternatives to nasopharyngeal specimen.

The aim of this study was to validate commercially available self-sampling gargle collection kit GARGTEST as a new system, that provides a less invasive sampling experience, enables easier transportation and storage of samples for SARS-CoV-2 detection. Validation was based on comparison of SARS-CoV-2 detection in 724 paired nasopharyngeal swabs and self-collected gargle samples, using multiplex real-time RT-PCR. Results showed high sensitivity (0,885) and specificity (0,958) of the new self-sampling method and also presented a strong agreement ($[\kappa] = 0,848$) between SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs and gargling samples. Because of its simplicity and availability,

GARGTEST self-sampling, together with RT-PCR testing, could facilitate an early detection of infected individuals, preventing the spread of the virus within population.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Vladimíry Koudelákové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 30. 07. 2021

.....
Bc. Kateřina Kubáňová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Vladimíře Koudelákové, Ph.D. za její odborné vedení, čas, trpělivost, ochotu a přátelský přístup po celou dobu práce v laboratoři i při následném písemném zpracování mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za statistické zpracování výsledků a Jamesi Grantu Weygintovi za korekce anglického textu. Ráda bych poděkovala i svému partnerovi, za podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	2
3. Lidské koronaviry	3
3.1. Původ a evoluce HCoV	6
3.2. Organizace genomu SARS-CoV-2.....	7
3.3. Replikace SARS-CoV-2	9
4. Klinické vzorky vhodné pro detekci SARS-CoV-2	11
5. <i>In-vitro</i> diagnostika.....	13
6. Experimentální část.....	16
6.1. Materiál a laboratorní vybavení	20
6.1.1. Biologický materiál	20
6.1.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
6.1.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	20
6.1.4. Seznam použitých laboratorních pomůcek.....	21
6.1.5. Použitý software a webové databáze.....	22
6.2. Manipulace se vzorky a reagensy.....	22
6.3. Vzorky nasopharyngeálních stěrů a odběry kloktáním pomocí sady GARGTEST	23
6.4. Zpracování vzorků v laboratoři BSL3	23
6.5. Izolace nukleových kyselin pomocí MagNA Pure 96 Systému.....	24
6.6. Detekce SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR	25
6.7. Vyhodnocení	26
7. Výsledky	29
8. Diskuze.....	32
9. Závěr	35
10. Seznam literatury	36
11. Přílohy.....	48

Seznam zkratek

3CLpro	3C-podobná proteáza
40S	malá podjednotka eukaryotického ribozómu
-1PRF	-1 programovaný ribozomální posun
+ssRNA	jednovláknová RNA pozitivní polarity
-ssRNA	jednovláknová RNA negativní polarity
α CoV	<i>Alphacoronavirus</i>
β CoV	<i>Betacoronavirus</i>
γ CoV	<i>Gammacoronavirus</i>
δ CoV	<i>Deltacoronavirus</i>
ACE2	angiotenzin-konvertující enzym 2
ARDS	Syndrom akutní dechové tísně
B.1.1.7	Britská mutace SARS-CoV-2 (α)
B.1.351	Jihoafrická mutace SARS-CoV-2 (β)
BAL	bronchoaveolární laváž
BatCov RaTG13	netopýří koronavirový kmen RaTG13
BSL3	laboratoř biologického rizika třetího stupně
cDNA	komplementární DNA
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
Ct	práh detekce
DEPC	diethylpyrokarbonát
<i>E</i>	gen kódující obalový protein
ELB	externí lyzační pufr
ER	endoplazmatické retikulum
gRNA	genomická RNA
HCoVs	lidské koronaviry
HRF	hrubá míra fatality
IC	interní kontrola
ICTV	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů
LTR	vzorky odebrané z dolních cest dýchacích
MERS	Blízkovýchodní respirační syndrom
MERS-CoV	koronavirus způsobující Blízkovýchodní respirační syndrom

MGP	magnetické skleněné částice
Mpro	proteáza M
mRNA	mediátorová RNA
N	gen kódující protein nukleokapsidu
NAAT	testy založené na amplifikaci nukleové kyseliny
NendoU	Nidovirální RNA uridylát-specifická endoribonukleáza
NK	nukleová kyselina
NTPs	nukleosid trifosfát
Npns 1-16	nestrukturní proteiny 1 – 16
NPS	nasopharyngeální stěr
OPS	oropharyngeální stěr
ORF	otevřený čtecí rámeček
ORF1a	otevřený čtecí rámeček 1a
ORF1b	otevřený čtecí rámeček 1b
P65	transkripční faktor p65
PHEIC	ohrožení veřejného zdraví mezinárodního významu
PL2pro	papainu podobná proteináza
Pp1a	polyprotein 1a
Pp1ab	polyprotein 1ab
RBD	receptor-vazebná doména
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
S	gen kódující glykoproteinové výběžky
S1	podjednotkou glykoproteinového výběžku S
S2	podjednotkou glykoproteinového výběžku S
SARS	Syndrom akutního respiračního selhání
SARS-CoV	koronavirus způsobující Syndrom akutního respiračního selhání
SARS-CoV-2	koronavirus způsobující Syndrom akutního respiračního selhání 2
sgRNA	sub-genomická RNA
UTR	nepřekládaná oblast genomu
VOC	znepokojivé varianty viru SARS-CoV-2
WHO	Světová zdravotnická organizace

Seznam obrázků

- Obr. 1:** Taxonomické zařazení lidských koronavirů.
- Obr. 2:** Časová osa zachycující počátky vývoje pandemie způsobené novým koronavirem SARS-CoV-2.
- Obr. 3:** Organizace genomu SARS-CoV-2 a struktura SARS-CoV-2 virionu
- Obr. 4:** Životní cyklus SARS-CoV-2 v hostitelské buňce.
- Obr. 5:** Princip izolace nukleových kyselin za použití technologie magnetických skleněných částic.
- Obr. 6:** Obecný princip polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (real-time RT-PCR).
- Obr. 7:** Schéma pracovního postupu při vyšetřování párových vzorků na přítomnost SARS- CoV-2.
- Obr. 8:** Porovnání Ct hodnot u SARS-CoV-2 pozitivních vzorků nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním.

Seznam tabulek

- Tab. 1:** Nestrukturní proteiny CoV a jejich funkce.
- Tab. 2:** Reagencie pro přípravu reakční směsi k detekci přítomnosti SAR-CoV-2 pomocí reakční soupravy Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes).
- Tab. 3:** Nastavení programu Real Time Multiplex RT-PCR.
- Tab. 4:** Fluorescenční kanály snímané při detekci SARS-CoV-2 pomocí reakční soupravy Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes).
- Tab. 5:** Kritéria pro vyhodnocení výsledků detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR.
- Tab. 6:** Porovnání detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR u nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST.

1. Úvod

Virus SARS-CoV-2, je po virech SARS-CoV a MERS-CoV, třetím lidským koronavirem sužujícím lidstvo v tomto století. Lidské koronaviry představují významné původce akutních respiračních infekcí, šířících se převážně kapénkovou nákazou. Infekce virem SARS-CoV-2 má širokou škálu příznaků, může ale také probíhat asymptomaticky. Lehký průběh infekce je většinou doprovázen symptomy připomínající chřipkové onemocnění. U závažných případů může dojít k propuknutí těžkého zápalu plic, syndromu akutní dechové tísně, septickému šoku nebo multiorgánovému selhání.

Základní snahou o boj s infekcí bylo zavedení přísných protiepidemických a karanténích opatření zahrnujících např. nošení ochranných prostředků dýchacích cest, dodržování rozestupů nebo úplné omezování kontaktů, omezení maloobchodu a služeb, opatření související s výjezdem do zahraničí a při vstupu do země, plošné testování a trasování kontaktů infikovaných osob.

I přes veškerá protiepidemická opatření bylo k 26. 7. 2021 Světovou zdravotnickou organizací zaznamenáno více než 194 milionů případů infekce virem SARS-CoV-2 a z toho přes 4 miliony úmrtí. V České republice bylo ke stejnému datu nahlášeno 1,67 milionu případů, z toho 30 357 osob nemoci podlehl.

V současné době není k dispozici žádná cílená léčba. Dostupná je pouze symptomatická léčba dle závažnosti příznaků a podpůrná terapie. Neustálé zlepšování diagnostických testů a zavádění nových vhodných odběrových metod, je proto nezbytné pro zastavení šíření viru v populaci.

2. Cíle práce

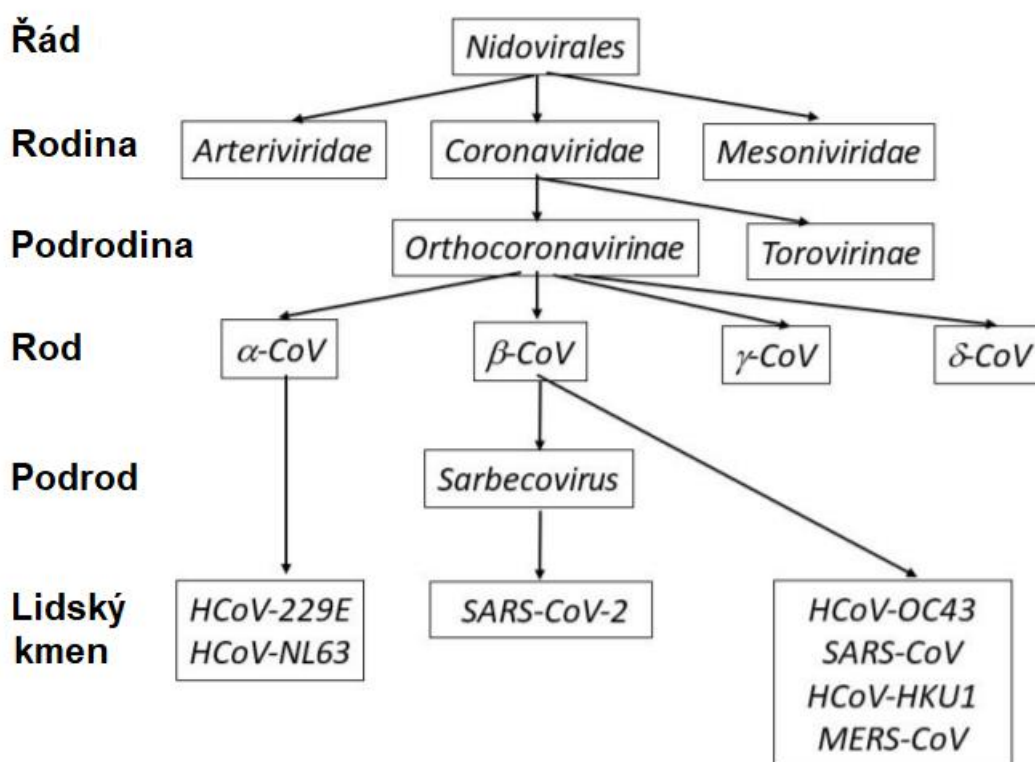
Cílem teoretické části této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na téma onemocnění novým koronavirem SARS-CoV-2, zaměřené především na jeho původ, organizaci genomu, reprodukci, detekci a možnosti využití různého typu biologického materiálu ke stanovení přítomnosti SARS-CoV-2.

Cílem experimentální části byla validace samoodběrové kloktací soupravy GARGTEST. Validace proběhla na základě srovnání s paralelně odebranými vzorky nasopharyngeálních stěrů, které se pro detekci SARS-CoV-2 používají standardně. Cílem validace bylo prověření vhodnosti, funkční a statistické spolehlivosti nového systému, který přináší příjemnější odběr, snadnější transport a skladování vzorků určených k detekci přítomnosti viru SARS-CoV-2.

Mezi dílčí cíle této práce patřila izolace nukleových kyselin z patientských vzorků, detekce SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR a vyhodnocení výsledků.

3. Lidské koronaviry

Koronaviry jsou velké, obalené RNA viry (60–140 nm), které infikují širokou škálu savců a ptačích druhů (Li, 2016; Yang *et al.*, 2020). Z taxonomického hlediska jsou koronaviry řazeny do řádu *Nidovirales*, čeledi *Coronaviridae*, podčeledi *Orthocoronavirinae*, která je rozdělena do čtyř rodů: *Alphacoronavirus* (α CoV), *Betacoronavirus* (β CoV), *Gammacoronavirus* (γ CoV), a *Deltacoronavirus* (δ CoV) (Cui *et al.* 2019; Pal *et al.*, 2020).



Obr. 1: Taxonomické zařazení lidských koronavirů (převzato: Malik, 2020, upraveno).

Lidské koronaviry (Human coronaviruses, HCoVs) byly izolovány a popsány v šedesátých letech dvacátého století (Hamre *et al.*, 1966; Bradbourne *et al.*, 1967). Prvními dvěma objevenými kmeny byly HCoV-229 (α CoV) a HCoV-OC43 (β CoV). Oba tyto kmene byly získány od pacientů s běžným nachlazením (Vassilara *et al.*, 2018). HCoV-229 byl vyizolován z nosního sekretu studenta medicíny. HCoV-OC43, která byla od kmene HCoV-229E sérologicky odlišná, byla později získána z tracheální orgánové kultury č. 43 (Kahn *et al.*, 2005). V roce 2004 byl objeven kmen HCoV-NL63 (α CoV), který byl izolován ze vzorků kojenců, trpících pneumonií a bronchiolitidou (Fouchier *et al.*, 2004; van der Hoek *et al.*, 2004). Následně byl v roce 2005 objeven další

lidský kmen HCoV-HKU1 (β CoV), u 71letého pacienta s pneumonií (Woo *et al.*, 2005). Tyto čtyři kmeny bývají častými původci asymptomatických a mírných infekcí horních cest dýchacích. Předpokládá se, že způsobují přibližně 30 % všech nachlazení (Lau *et al.*, 2006; Mesel-Lemoine *et al.*, 2012).

Propuknutí epidemií, způsobených novými lidskými koronaviry SARS-CoV (β CoV) a MERS-CoV (β CoV), vyvolávající Syndrom akutního respiračního selhání (Severe acute respiratory syndrome, SARS) a Blízkovýchodní respirační syndrom (Middle East respiratory syndrome, MERS), změnily pohled na závažnost koronavirových onemocnění (Zhong *et al.*, 2003; Zaki *et al.*, 2012).

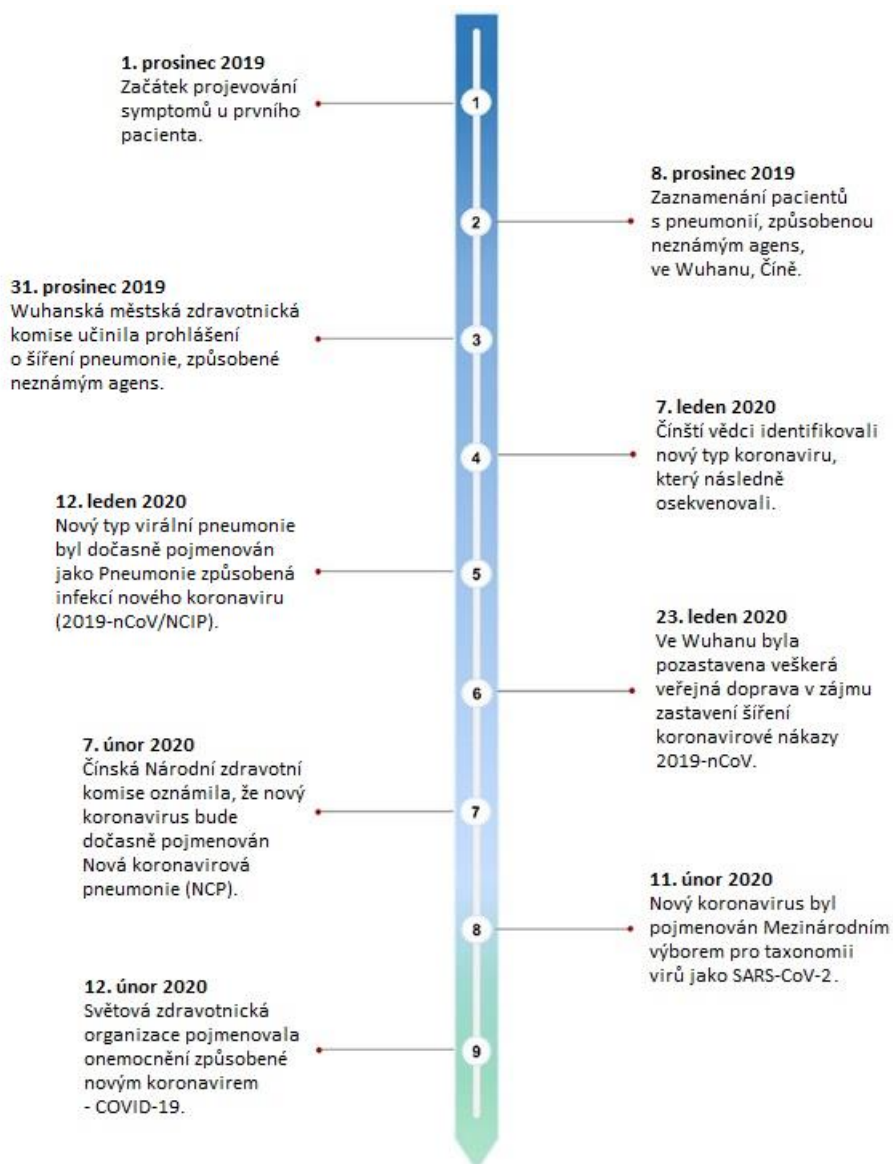
První případy infekce SARS se objevily v listopadu roku 2002 v provincii Guang-dong v Číně (Ksiazek *et al.*, 2003). Epidemie SARS se z Číny rozšířila celkem do 29 zemí včetně Kambodži, Hong Kongu, Singapur, Hanoi, Kanady a mnoha dalších. Průměrná inkubační doba infekce byla 6,4 dnů (v rozmezí 2 až 10 dní) (Park, 2020). Celkem bylo nahlášeno 8096 případů a 774 případů úmrtí spojených s infekcí (hrubá míra fatality, HRF: 9,6 %) (Lam *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2020).

Druhým případem epidemie lidským koronavirem byla infekce MERS, vyskytující se převážně v Saudské Arábii a v dalších zemích Blízkého východu v roce 2012. Na rozdíl od epidemie SARS, která byla díky úspěšným protiepidemickým opatřením eliminována v roce 2004, se infekce MERS stále objevuje. Podle údajů WHO, bylo od roku 2012 do konce ledna 2020 zatím nahlášeno celkem 2519 případů z 27 zemí, z toho 858 případů úmrtí (HRF: 34,4 %) (WHO, 2020). Průměrná inkubační doba infekce byla 7 dnů (v rozmezí 2 až 17 dní) a časový interval od propuknutí prvních příznaků po hospitalizaci činil méně než 14 dnů (Cho *et al.*, 2016).

V prosinci roku 2019 byla Světová zdravotnická organizace (World health organisation, WHO) informovaná o šířící se závažné pneumonii neznámého původu, která se objevila ve Wuhanu, provincii Hubei v Číně (Wang *et al.*, 2020). Později bylo prokázáno, že původcem pneumonie je nově identifikovaný β -koronavirus, který byl na základě fylogenetické a taxonomické analýzy Mezinárodním výborem pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) pojmenován SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome 2) (Hu *et al.*, 2020; Chilamakuri *et al.*, 2021). Onemocnění vyvolané tímto virem, bylo v únoru roku 2020 pojmenováno Světovou zdravotnickou organizací jako COVID-19 (Coronavirus disease 2019) (Sun *et al.*, 2020).

Na konci ledna WHO vyhlásila globální stav nouze a označilo epidemii COVID-19, způsobenou koronavirem SARS-CoV-2, jako ohrožení veřejného zdraví mezinárodního

významu (Public Health Emergency of International Concern, PHEIC) (Rastogi et al., 2020; Wang et al., 2020).



Obr. 2: Časová osa zachycující počátky vývoje pandemie způsobené novým koronavirem SARS-CoV-2 (převzato: Yan et al., 2020, upraveno).

Virus SARS-CoV-2 primárně postihuje dýchací systém a způsobuje symptomy připomínající chřipkové onemocnění. Nákaza se přenáší především kapénkami a inkubační doba může být až 14 dní od expozice (průměrná doba je v rozmezí 4 - 5 dnů) (Guan et al., 2020; Lauer et al., 2020; Li et al., 2020). Mezi nejčastější symptomy patří suchý kašel, horečka a únava. Dalšími symptomy mohou být také zimnice, bolesti v krku, bolest hlavy, ztráta chuti a čichu, průjem nebo zvracení (Dixon et al., 2020). U závažných případů může

dojít k propuknutí těžkého zápalu plic, syndromu akutní dechové tísně (acute respiratory distress syndrome, ARDS) a sepsi (Premaj *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020; Batah *et al.*, 2021). K březnu 2021 bylo celosvětově potvrzených 125 milionů případů infekce virem SARS-CoV-2 ve 224 zemích a 2,7 milionů potvrzených úmrtí spojených s nákazou (HRF: 2,19 %) (Sheehan *et al.*, 2021; Chilamakuri *et al.*, 2021). Po epidemii SARS-CoV a MERS-CoV, je tedy SARS-CoV-2 třetí epidemií koronaviru v tomto století (Gralinski *et al.*, 2020).

3.1. Původ a evoluce HCoV

Lidské koronaviry jsou viry zootického původu a mohou být přímým kontaktem přeneseny na člověka. Předpokládá se, že viry SARS-CoV, MERS-CoV a SARS-CoV-2 pochází z netopýrů. Netopýři jsou hostiteli mnoha koronavirů, nicméně ve většině případů dochází k přenosu viru na člověka přes zvířecího mezipřenositele (Ye *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

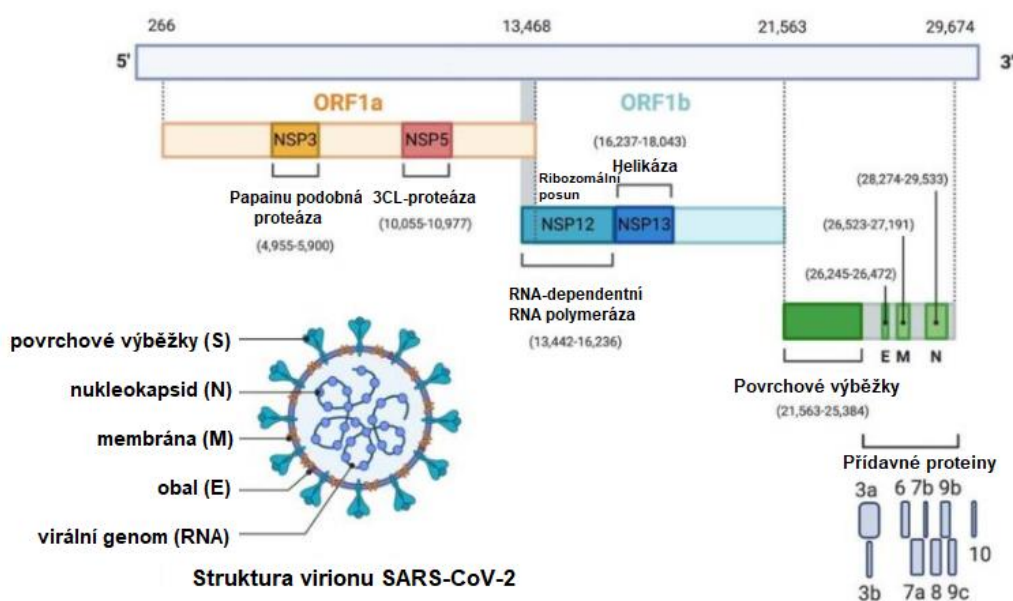
Přírodním rezervoárem pro SARS-CoV je netopýr Vrápenec malý (horseshoe bat) (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). K přenosu viru na člověka došlo z mezipřenositele, kterým byly cibetky a psíci mývalovití, kteří jsou často prodáváni na čínských mokřých trzích (Guan *et al.*, 2003). MERS-CoV byl přenesen na člověka z infikovaného dromedára (Mulabbi *et al.*, 2021).

První případy onemocnění virem SARS-CoV-2 měly spojitost s mokřým trhem v čínském městě Wuhan. Genomová sekvence SARS-CoV-2 byla na počátku epidemie získána z pěti čínských pacientů nakažených SARS-CoV-2. Sekvence viru u těchto pěti pacientů vykazovaly 79,5% sekvenční identitu s SARS-CoV (Zhou *et al.*, 2020). Na základě tohoto porovnání byl SARS-CoV-2 zařazen jako nový lidský β CoV (Lai *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Při porovnání celogenomové sekvence SARS-CoV-2 s dalšími dostupnými sekvencemi β CoVs, SARS-CoV-2 vykazoval největší sekvenční identitu (96 %) se SARS-podobným koronavirovým kmenem BatCov RaTG13, infikující netopýry. Tyto výsledky naznačují, že SARS-CoV-2 se mohl vyvinout z RaTG13 (Zhou *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Stále však není potvrzené, které zvíře přenáší SARS-CoV-2 jako mezipřenositel (Dhama *et al.*, 2020).

3.2. Organizace genomu SARS-CoV-2

Genom SARS-CoV-2 je tvořen nesegmentovanou, jednovláknovou RNA pozitivní polarity (+ssRNA) o velikosti ~ 29,9 kb (Lu *et al.*, 2020). Genom se skládá ze 14 otevřených čtecích rámců (open reading frames, ORFs), které kódují 27 proteinů (Wu *et al.*, 2020).

Na 5' konci genomu, v nepřekládané oblasti (5' untranslated region, UTR), se nachází geny replikačního komplexu (*ORF1a* a *ORF1b*) kódujících 15 nestrukturních proteinů viru (non-structural proteins, npns). Mezi tyto proteiny patří např. papainu podobná proteáza (PL2pro), 3CL-protáza (3CLpro), RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp), helikáza a endoribonukleáza (Obr. 3, Tab. 1) (Kumar *et al.*, 2020; Raj, 2020).



Obr. 3: Organizace genomu SARS-CoV-2 a struktura SARS-CoV-2 virionu (převzato: Alanagreh *et al.*, 2020, upraveno). Legenda: Genom SARS-CoV-2 kóduje dva velké čtecí rámce *ORF1a* (oranžově), *ORF1b* (modře), které kódují pro 15 nestrukturních proteinů. Genom také kóduje pro čtyři strukturální proteiny (zeleně) S (výběžky), E (obal), M (membrána) a N (nukleokapsid) a přidavné proteiny (šedě).

Gen *ORF1a* kóduje 10 nsp (nsp1 - nsp10) a gen *ORF1b* kóduje 15 nsp (nsp1 - nsp16). *ORF1a* a *ORF1b* mají překrývající se čtecí rámce a vlivem ribozomálního posunu tvoří dva polyproteiny - pp1a a pp1ab (Wu *et al.*, 2020).

PL2pro (nsp3) a 3CLpro (nsp5) štěpí polyproteiny pp1ab a pp1a na 15 samostatných nsps. RdRp (nsp12) v komplexu s nsp7, nsp8, helikázou (nsp 13) a exonukleázou (nsp14) jsou nezbytnými proteiny pro virální transkripci a replikaci (Chan *et al.*, 2020).

Na 3' konci genomu SARS-CoV-2 se nachází geny pro čtyři strukturální proteiny, které tvoří povrchové glykoproteinové výběžky (spike, S), obal (envelope, E), membránový glykoprotein (membrane, M) a protein nukleokapsidy (nucleocapsid, N). Strukturální proteiny jsou zodpovědné za vazbu viru na receptor hostitelské buňky, skládání virionu, morfogenezi a uvolnění virových částic z buňky. Mezi strukturálními geny se nachází osm přídavných proteinů (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b a orf14), jejichž funkce je většinou neznámá. Sekvence je zakončena 3' polyadenylovým koncem (Huang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

Tab. 1: Nestrukturní proteiny CoV a jejich funkce (převzato: Rastogi *et al.*, 2020, upraveno).

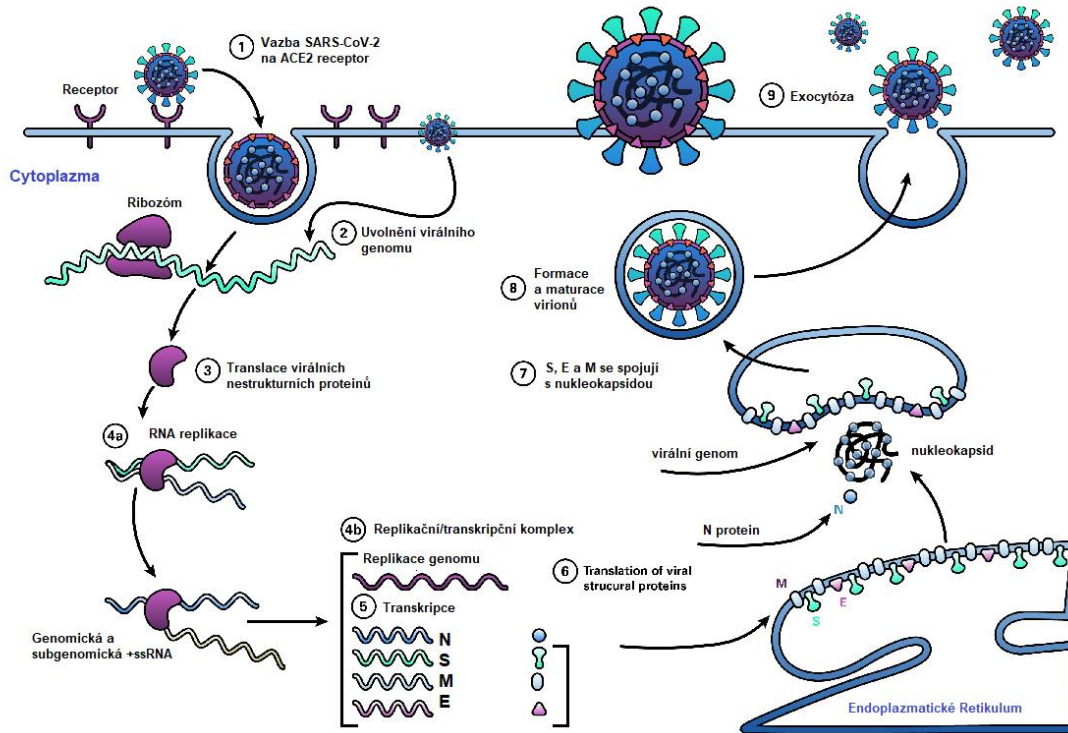
Nestrukturní protein	Funkce proteinu
Nsp1	Interferuje s vazbou mRNA a potlačuje hostitelské imunitní funkce Ukotvuje replikační komplex k buněčné membráně Degraduje hostitelskou mRNA prostřednictvím interakce s lidskou 40S ribozomální podjednotkou
Nsp2	Podléhá mutacím, které dělají virus infekčnějším Ovlivňuje přežití hostitelské buňky, známy také jako homolog p65
Nsp3	Papainu podobná proteáza (PL2pro), účastní se proteolytického štěpení
Nsp4	Zodpovídá za tvorbu dvojité membrány vakuoly během replikace. Ukotvuje virální replikační-transkripční komplex k membráně endoplazmatického retikula
Nsp5	Proteázy 3CLpro a Mpro, účastní se polypeptidového štěpení
Nsp6	Zabraňuje expanzi autofagozomu Pomáhá při tvorbě dvojité membrány vezikulu, potlačuje IFN-I signalizaci
Nsp7	Utváří hexadekamer s nsp8 a je využíván jako primáza při virální replikaci
Nsp8	Spolu s nsp7 působí jako primáza
Nsp9	Působí jako ssRNA vazebný protein
Nsp10	Účastní se metylace čepičky virální mRNA, stimuluje nsp14 3'-5' exoribonukleázovou aktivitu a 2'O-methyltransferázovou (nsp16) aktivitu
Nsp12	Katalytická podjednotka RNA-dependentní RNA polymerázy Katalyzuje syntézu virální RNA za pomoci nsp7 a nsp8 jako kofaktorů

Nestrukturní protein	Funkce proteinu
Nsp13	Helikázová a nukleázová aktivita, hydrlyzuje NTPs a rozvíjí RNA/DNA duplex
Nsp14	Guanin-N7-methyltransferáza, multienzymový komplex Působí na obou stranách ssRNA i dsRNA v 3' – 5' směru Účastní se replikace genomu, syntézy sub-genomické RNA a rekombinace
Nsp15	Nidovirální RNA uridylyát-specifická endoribonukleáza (NendoU) Účastní se replikace a transkripce
Nsp16	Působí jako 2'-O-methyltransferáza, která zprostředkovává 2'-O-ribometylacii mRNA čepičky na 5' virální mRNA

3.3. Replikace SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 napadá převážně ciliární bronchiální epiteliální buňky a pneumocyty II. typu. Pro vstup do buňky využívá buněčný receptor angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2) (Hoffmann *et al.*, 2020). Na ACE2 se virus váže přes receptor-vazebnou doménu (receptor-binding domain, RBD) S1 podjednotkou glykoproteinového výběžku S (spike protein). Následně S2 podjednotka fúzuje s buněčnou membránou hostitelské buňky (Tang *et al.*, 2020). Genom viru (+ssRNA) uvolní do cytoplazmy, kde slouží jako templát pro replikaci a syntézu proteinů (Astuti *et Ysrafil*, 2020).

RNA se váže na ribozómy hostitelské buňky a dochází k translaci nestrukturních proteinů, které slouží k replikaci viru pomocí -1 programovaného ribozomálního posunu (programmed ribosomal frameshift -1PRF). Syntéza virální RNA je katalyzována RdRp za pomoci kofaktorů nsp7 a nsp8 (Gao *et al.*, 2020). Výsledkem replikace jsou kopie RNA genomu s negativní polaritou (-ssRNA), které slouží jako templát pro syntézu pozitivně polarizované genomické RNA (gRNA) a sub-genomické RNA (sgRNA). gRNA, sgRNA a strukturní proteiny jsou transportovány do ER-Golgi komplexu, kde dochází ke kompletaci a maturaci virových částic. Maturované viriony jsou obaleny vezikulou, fúzují s buněčnou membránou a jsou uvolněny z buňky exocytózou (Alanagreh *et al.*, 2020; Boson *et al.*, 2021).



Obr. 4: Životní cyklus SARS-CoV-2 v hostitelské buňce (převzato: LifeSpan BioSciences, 2021, upraveno). Legenda: (1) SARS-CoV-2 se pomocí výběžků (S) váže na ACE2 receptor a vstupuje do buňky, kde dochází k uvolnění virální RNA (2). Na buněčných ribozómech dochází k translaci virálních nestrukturních proteinů (3), které jsou pak využity k replikaci virální RNA (4). Kopie virální RNA poté slouží k transkripci (5) a translaci strukturních proteinů (6). Virální genom spolu se strukturní proteiny S, E a M se spojují s nukleokapsidou tvořenou proteinem (N) (7) a tvoří viriony (8). Zralé viriony jsou uvolněny z buňky exocytózou (9).

4. Klinické vzorky vhodné pro detekci SARS-CoV-2

Správné odebrání vzorku ve správný čas je nejdůležitějším krokem při detekci infekčních chorob (Premraj *et al.*, 2020). Pokud nedojde ke správnému odběru, můžeme získat nejasný nebo falešně negativní výsledek testu. Přítomnost SARS-CoV-2 bývá nejčastěji detekována ve vzorcích odebraných z horních cest dýchacích. Doporučenými odběrovými metodami jsou především odběry nasopharyngeálního stěru (nasopharyngeal swab, NPS), oropharyngeální stěry (oropharyngeal swab, OPS) nebo kombinovaný odběr NPS i OPS pro zvýšení senzitivity detekce (Martinez, 2020).

Stěry jsou odebrány odborným zdravotním pracovníkem, vybaveným vhodnými ochrannými pomůckami. Odběry se provádějí pomocí syntetického tampónu na hliníkové nebo plastové násadě či drátku, které usnadňují získání biologického materiálu. Odběrové sady obsahující násadu z kalcium alginátu nebo dřeva mohou obsahovat inhibitory PCR reakce, proto jsou k odběrům nevhodné (Daley *et al.*, 2006; Premraj *et al.*, 2020; See et Toh, 2020). Po odběru je stěr za chladu uchován ve virologickém transportním médiu. Méně invazivní alternativou odběru z horních cest dýchacích jsou např. výtěry pouze z nosní dutiny, které jsou sice méně invazivní, ale také méně diagnosticky přesné (Péré *et al.*, 2020).

Vzhledem k nedostatku odběrového materiálu v průběhu pandemie, diskomfortu spojeným se samotným odběrem, potřeby odborného zdravotního personálu a vystavení personálu rizika nákazy z přítomného aerosolu, bylo třeba hledat vhodné odběrové alternativy, které by mohly nahradit nejčastěji používané nasopharyngeální stěry. Mezi možné neinvazivní alternativy patří např. odběr slin nebo výplach ústní dutiny kloktáním (Mittal *et al.*, 2020; Vaz *et al.*, 2020; Goldfarb *et al.*, 2021). Výhodami těchto odběrových alternativ je možnost samoodběru a také získání většího objemu vzorku. Nevýhodou detekce SARS-CoV-2 ze slin oproti nasopharyngeálními a oropharyngeálními stěrům, může být nižší senzitivita a specificita (To *et al.*, 2020; Pasomsub *et al.*, 2021).

Vhodnými vzorky pro detekci SARS-CoV-2 mohou být i vzorky získané z dolních cest dýchacích (lower respiratory track samples, LTR), mezi které patří např. tracheální aspirát, sputum, bronchoaveolární laváž (BAL) nebo vzorek získaný z fibrobronchoskopie. Vzorky z dolních cest dýchacích často vykazují vyšší pozitivitu SARS-CoV-2 v pozdním období průběhu nemoci (Martinez, 2020). Ve studii Huang *et al.*, vykazovaly vzorky endotracheálních vzorků a vzorků sputa výrazně vyšší obsah virální RNA než u vzorků NPS a OPS.

Pro detekci SARS-CoV-2 byly využity i vzorky krve, stolice, moči, spermatu, ale jejich senzitivita a specificita není zcela prozkoumána. Vzorky OPS, stolice, rektálních a análních stěrů jsou používány např. v pediatrické praxi, kde je obtížné získat nasofaryngeální stěr a neoptimálním odběrem může dojít k získání falešně negativního výsledku testu (Piras *et al.*, 2020). Ve studii týmu Zhang *et al.*, byla zjištěna přítomnost SARS-CoV-2 ve vzorcích stolice ještě několik týdnů poté, co OPS vzorky byly negativní.

5. *In-vitro* diagnostika

Odpovědí na rychlé šíření pandemie COVID-19 byl vznik široké škály testovacích prostředků. Nově uvedené testy, určené pro detekci SARS-CoV-2 v patientských vzorcích, musí v Evropské unii splňovat kritéria směrnice 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro* (Official Journal of the European Communities, L331, 1998). Plošné testování v kombinaci s trasováním kontaktů nakažených a dalších protiepidemických opatření se ukázalo efektivním pro omezení šíření infekce (Carter *et al.*, 2020).

V současné době jsou dostupné detekční metody rozděleny do dvou hlavních kategorií. První kategorie testů je založena na molekulárních metodách, tzv. NAAT (Nucleic acid amplification tests), které detekují specifické části virálního genomu pomocí amplifikace nukleové kyseliny. NAAT většinou detekují jeden nebo více virálních genů, jejichž přítomnost svědčí o právě probíhající nebo nedávno prodělané infekci. Jedná se o vysoce senzitivní a specifické testy, které podávají kvalitativní výsledek. Pro detekci SARS-CoV-2 pomocí NAAT se využívají vzorky odebrané z horních cest dýchacích, především nasopharyngeální stěry, oropharyngeální stěry, výtěry z nosní dutiny nebo vzorky slin. Nejčastěji využívaným NAAT je RT-PCR (Jayamohan *et al.*, 2021; Mardian *et al.*, 2021).

RT-PCR je v současné době zlatým standardem pro detekci SARS-CoV-2 v patientských vzorcích. Pro detekci se preferenčně používají vzorky stěrů nasopharyngeálních nebo oropharyngeálních stěrů. RT-PCR je založena na amplifikaci cílových sekvencí virálního genomu (Carter *et al.*, 2020). RT-PCR se provádí z RNA z patientského vzorku. Patientská RNA je převedena reverzní transkripcí do komplementární cDNA pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy (Eftekhari *et al.*, 2021). Cílové úseky SARS-CoV-2 cDNA jsou poté amplifikované použitím sekvencně specifických primerů, navržených do oblastí virálních genů *N*, *E*, *S*, *M*, *RdRp* a/nebo *ORF1ab* (Chan *et al.*, 2020; Premaj *et al.*, 2020; Weisseder *et al.*, 2020). Americký národní institut pro veřejné zdraví, Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC), doporučuje detekci genu nukleokapsidového proteinu *N*, mezitím co Světová zdravotnická organizace (WHO) preferuje detekci genu obalového proteinu *E* a konformačním genem *RdRp* (Tang *et al.*, 2020). Přítomnost virální RNA je vyjádřena hodnotou Ct (práh detekce), která odpovídá počtu amplifikačních cyklů potřebných k produkci detekovatelného fluorescenčního signálu. Čím nižší je hodnota Ct, tím vyšší je RNA virální nálož v daném vzorku. Intenzita fluorescenčního signálu odpovídá množství DNA ampliconů v daném

čase. Pozitivní PCR výsledek odráží přítomnost virální RNA ve vzorku, nemusí indikovat přítomnost infekčních virionů ve vzorku (Tom *et Mina*, 2020). Délka PCR positivity také závisí na typu vyšetřovaného vzorku. Například u standardně využívaného nasopharyngeálního stěru dochází k rychlejšímu poklesu PCR positivity než u vzorku sputa (Wölfel *et al.*, 2020).

I přes to, že RT-PCR je v současné době zlatým standardem pro detekci SARS-CoV-2, který se vyznačuje vysokou specificitou (~ 100 %), senzitivitou a přesností, celá procedura je časově i pracovně náročná a vyžaduje speciální přístrojovou techniku a vyškolené laboratorní pracovníky (Younes *et al.*, 2020).

Druhá kategorie detekčních metod zahrnuje sérologické a imunodiagnostické testy, detekující virální proteiny nebo protilátky vytvořené infikovanou osobou (Premaj *et al.*, 2020; Weisseder *et al.*, 2020). Mezi nejčastěji používané imunometody patří antigenní testy. Antigenní testování místo virální nukleové kyseliny detekuje proteinové fragmenty viru, které vypovídají o právě prodělané infekci. Většina antigenních testů je založená na sandwichové imunodetekci. Antigenní testy se většinou skládají z plastové kazety s jamkou pro vzorek a pufr, proužku nitrocelulóзовé matrice s testovací a kontrolní linií. Testovací linie obsahuje navázané protilátky specifické pro komplexy konjugovaných cílových antigenních protilátek a kontrolní linie obsahuje protilátky specifické pro konjugovanou protilátku. Pro detekci přítomnosti SARS-CoV-2 ve vzorku se nejčastěji využívá detekce virálního nukleokapsidového proteinu N, který se během infekce nachází v buňkách ve velkém množství (WHO, 2020).

Antigenní testy mají podobnou specificitu (> 97 %) jako NAAT, ale jsou většinou méně senzitivní (0-94 %). Současná vyžadovaná senzitivita by měla být minimálně 80 % (WHO, 2020). Antigenní testy vykazují větší úspěšnost detekce SARS-CoV-2 u vzorků s vysokou virální náloží (viral load) (Ct hodnoty ≤ 25 nebo > 106 genomických kopií viru/ml), která se u pacientů objevuje během prvních třech dnů, kdy infekce probíhá většinou asymptomaticky a u brzké symptomatické fáze (během 5 až 7 dne infekce) (Weiss *et al.*, 2020; Arons *et al.*, 2020; Dinnes *et al.*, 2020). Většina antigenních testů využívá pro detekci nasopharyngeální stěry nebo výtěry z nosní dutin. V současné době se studuje využití alternativních typů vzorků jako např. slin nebo výplachu z úst (WHO, 2020).

Výhodou antigenních testů je finanční nenáročnost a možnost provedení v místě odběru. Tyto testy tedy spadají do kategorie testů POCT (point of care testing), učených k analýze *in vitro* v místě péče o pacienta. Výsledky testů jsou dostupné v rámci minut, což

umožňuje využít antigenní testy při screenování populace a identifikace právě nakažených jedinců přenášející infekci. Vzhledem k jejich snížené senzitivitě, je vhodně využít konformačního NAAT u symptomatických pacientů s negativním výsledkem antigenního testu a asymptomatických pacientů s pozitivním výsledkem antigenního testu (Jalandra *et al.*, 2020; CDC, 2021).

Důležitou součástí SARS-CoV-2 diagnostiky je detekce SARS-CoV-2 variant. Světová zdravotnická organizace sleduje vývoj tzv. znepokojivých mutací (Variant of Concern, VOC), které se vyznačují zvýšeným přenosem, virulencí a sníženou odpovědí na současné diagnostické postupy, vakcinaci a terapeutika. V současné době pozorujeme čtyři hlavní VOC (Konings *et al.*, 2021).

První objevenou variantou byla varianta α - B.1.1.7 (známá také jako 20I/501Y.V1, Variant of Concern - VOC202012/01), která se objevila v září roku 2020 ve Velké Británii. Tato varianta vznikla bodovou mutací, která vyvolala záměnu asparaginu (N) za tyrozin (Y) v pozici 501 (N501Y), nacházející se v receptor-vazebné doméně (RBD) na povrchovém glykoproteinovém výběžku S. Tato mutace umožnila viru silnější vazbu na receptor ACE2. Varianta B.1.1.7 byla detekována ve více než 40 zemích mimo Velkou Británii. Druhou významnou variantou je varianta β - B.1.351 (20H/501.V2), objevená v květnu roku 2020 v Jižní Africe. Varianta je opět charakterizována mutací povrchového glykoproteinového výběžku S. Mutace se nachází na reziduích K417N, E484K a N501Y. Třetí VOC, je varianta γ - P.1, objevená v Brazílii v listopadu 2020. Tato varianta má 17 mutací z toho tři se nacházejí opět na stejných reziduích jako u B.1.351 - K417N, E484K a N501Y. Čtvrtou variantou je δ - B.1.617.2, objevená v Indii v říjnu 2020. B.1.617.2, má 13 mutací z toho nejvýznamnějšími jsou mutace na glykoproteinovém výběžku - E484Q a L452R (WHO, 2021; CDC, 2021).

Varianty SARS-CoV-2 mohou být detekovány pomocí diskriminační PCR za použití specifických primerů a prób pro jednotlivé nebo pomocí sekvenace (Wang *et al.*, 2021).

6. Experimentální část

Cílem experimentální části této diplomové práce byla validace samoodběrové soupravy GARGTEST. Cílem validace bylo prověření vhodnosti, funkční a statistické spolehlivosti nového systému pro příjemnější odběr, snadnější transport a skladování vzorků, určených k detekci přítomnosti viru SARS-CoV-2.

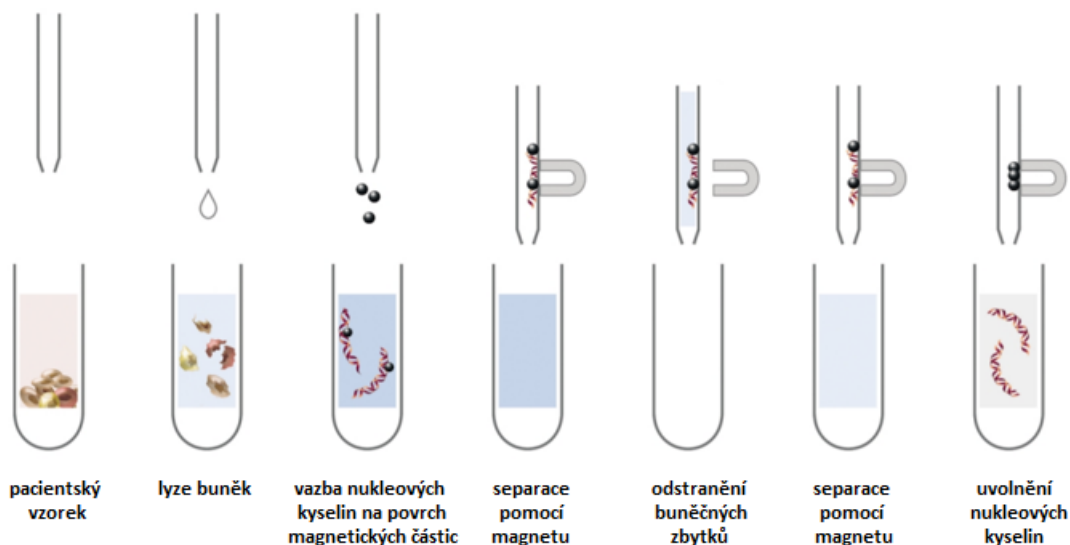
GARGTEST je samoodběrová kloktací souprava, založená na principu kloktání dutiny ústní a hltanu. Sada je určena k odběru vzorků, které jsou ve zdravotnických laboratořích testovány na přítomnost virů infikujících dutinu ústní a horní cesty dýchací. Samoodběrová souprava obsahuje lyofilizované transportní médium, které po rozpuštění ve vzorku kloktání uchovává virus vitální. Vzorek je následně možné použít pro kultivační vyšetření a po izolaci nukleových kyselin (NK) je také vhodný pro metody na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR). GARGTEST byl vyvinut výzkumníky z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, spolu se společnostmi IntellMed, s.r.o. a AUMED, a.s. (GARGTEST, 2021).

Validace odběrové metody proběhla na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, na základě srovnání výsledků vyšetření přítomnosti viru SARS-CoV-2 u 724 párových vzorků nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním. Nasopharyngeální stěry byly odebrány odborným personálem na odběrovém místě Fakultní nemocnice Olomouc do virologického transportního média od společnosti COPAN nebo jeho analogického produktu. Následně byli účastníci studie požádáni o provedení samoodběru pomocí kloktací sady GARGTEST dle návodu poskytnutého výrobcem (Příloha č. 1, kroky 1-5).

Izolace NK ze vzorků proběhla pomocí automatizovaného systému MagNA Pure 96 (Roche). Pro izolaci byla použita reagenční souprava MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche), která k extrakci genomické DNA a virálních NK využívá technologie magnetických skleněných částic (Magnetic Glass Particles, MGPs). Výhodou systému MagNA Pure 96 je možnost současně izolovat až 96 vzorků s minimální časovou náročností na obsluhu přístroje.

Při izolaci jsou buňky obsažené ve vzorku nejprve lyzovány a zbaveny přítomných nukleáz. Poté jsou NK, díky přítomnosti chaotropních solí a vysoké iontové síly lyzačního/vazebného pufru, vychytány na křemičitý povrch přidaných magnetických částic a následně magneticky separovány od zbytku lyzovaného vzorku. Zbytky buněk a další látky, které by mohly inhibovat PCR reakci jsou odstraněny několika promývacími kroky.

Nakonec je přečištěná NK z magnetických částic uvolněna do elučního pufru (Obr. 5) (MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit, 2021).



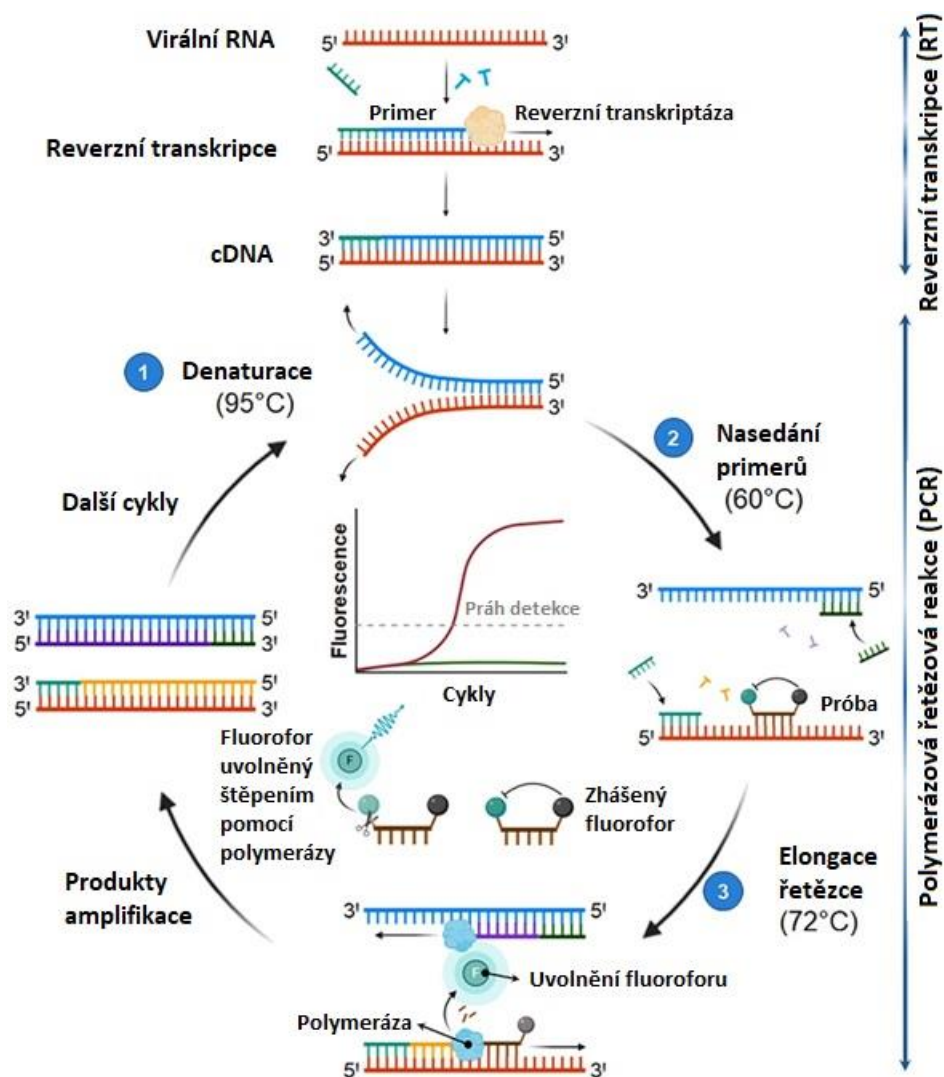
Obr. 5: Princip izolace nukleových kyselin za použití technologie magnetických skleněných částic (převzato z LifeScience, 2021, upraveno).

Vyizolovaná nukleová kyselina, byla použita k detekci přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí soupravy RT-PCR kit Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection 3 genes) od společnosti Liferiver Bio-Tech (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd., Čína).

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (real-time RT-PCR) se používá, když je výchozím materiálem pro detekci specifických úseků ribonukleová kyselina (RNA). Přítomná RNA je převedena pomocí reverzní transkriptázy (RNA-dependentní DNA polymerázy) na komplementární deoxyribonukleovou kyselinu (cDNA), která slouží jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (real-time PCR) (Liferiver, Instruction for Use, 2020).

Princip detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí real-time PCR je založen na fluorogenní 5' nukleázové eseji. Pokud je ve studovaném vzorku přítomna cílová sekvence, dochází po denuraci templátové DNA k nasednutí komplementárních primerů a fluorescenčně značených prób. Během prodlužování řetězce polymeráza štěpí próbu na 5' konci, dochází k oddělení reportéru (fluoroforu) od zhášeče navázaného na 3' konci próby a tím k vyzáření fluorescenčního signálu, který je zachycen optickou jednotkou real-time PCR detekčního systému. PCR cyklus, ve kterém bylo zaznamenáno zvýšení

fluorescence (Ct), je úměrný množství specifického PCR produktu. Pozorování intenzity fluorescence v reálném čase tak umožňuje detekci přibývajících PCR produktu bez nutnosti další analýzy po amplifikaci (Liferiver, Instruction for Use, 2020).

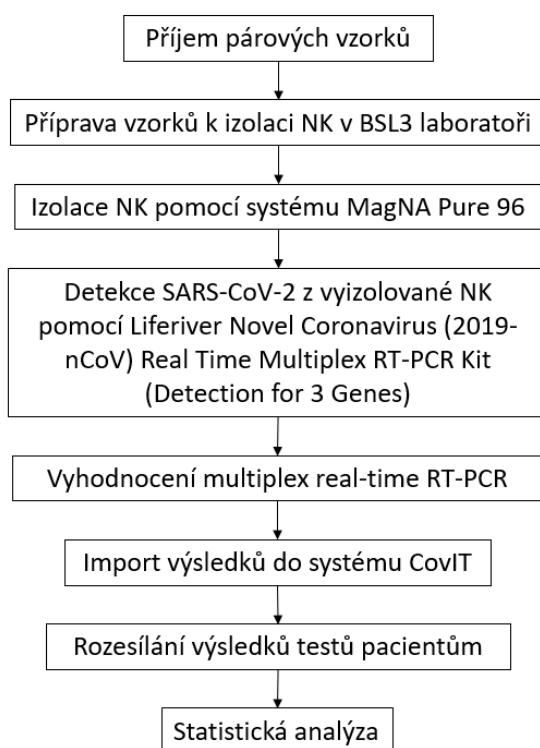


Obr. 6: Obecný princip polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (real-time RT-PCR). Legenda: Templát (virální RNA) je reverzní transkripcí přepsán do cDNA. Získaná cDNA je amplifikovaná pomocí PCR ve třech krocích: (1) denaturace cDNA, (2) nasednutí komplementárních primerů, (3) prodloužení řetězce pomocí enzymu DNA polymerázy. PCR je několikrát opakovaná, aby došlo k získání velkého množství amplikonů. Přítomnost cílových sekvencí je potvrzena fluorescenčním signálem, získaným ze sekvenčně specifických sond (převzato z Afzal , 2020, upraveno).

Primery a próby pro soupravu RT-PCR kit Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection 3 genes) byly navrženy pro nový kmen koronaviru (2019-

nCoV, SARS-CoV-2) (GeneBank přístupový kód: MN908947) a pokrývá sekvence šesti 2019-nCoV kmenů – EPI_ISL_402119, EPI_ISL_402120, EPI_ISL_402121, EPI_ISL_402122, EPI_ISL_402123 a EPI_ISL_402124. Reverzní transkripce a amplifikace přepsané cDNA probíhá v rámci jedné reakce. Specifické primery a próby jsou navrženy do oblastí otevřeného čtecího rámce ORF1a/b a genů pro N a E protein.

Analýza párových vzorků nasopharyngeálního stěru a GARGTEST samoodběru probíhala vždy současně ve stejném izolačním i RT-PCR panelu. Po provedení RT-PCR, byly pro detekované virové a kontrolní geny vyhodnoceny Ct hodnoty dle interní validace uvedené v tabulce č. 5. Vzorky byly zpracovávány a vyhodnoceny vždy do 48 hodin od odběru. Výsledky testů byly zaslány testovaným osobám a indikujícím lékařům a poté statisticky zpracovány pro účely této studie. Schéma pracovního postupu je uvedeno na obrázku č. 7.



Obr. 7: Schéma pracovního postupu při vyšetřování párových vzorků na přítomnost SARS-CoV-2.

6.1. Materiál a laboratorní vybavení

6.1.1. Biologický materiál

Pro validační studii bylo použito 724 párových vzorků nosopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST. Vzorky nosopharyngeálních stěrů byly uskladněny v chladících boxech při teplotě 5°C. Vzorky odebrané pomocí samoodběrové sady GARGTEST byly skladovány při pokojové teplotě. Všechny vzorky byly zpracovány vždy nejpozději 48 hodin od odběru vzorku.

6.1.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Trizma[®] hydrochloride buffer solution (pH 8,0; 1M) (Sigma-Aldrich, kat. č. T2694)
- DEPC ošetřená voda (Invitrogen[™], Thermo Fisher Scientific, kat. č. AM9906)
- Lyzační pufr MagNA Pure 96 External Lysis Buffer (Roche Diagnostics GmbH, kat. č. 06374913001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (Internal Container) (Roche Diagnostics GmbH, kat. č. 06430112001)
- DNA-ExitusPlus[™] (PanReac AppliChem, kat. č. A7089)

Použité soupravy

- Samoodběrová sada GARGTEST (IntellMed, s.r.o.)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics GmbH, kat. č. 06543588001)
- Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes) (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd., kat. č. RR-0479-02)

Použité roztoky a jejich příprava:

10mM Tris (pH 8,0) byl připraven smícháním 10 µl 1M Tris (pH 8,0) s 990 µl DEPC H₂O v 1,5 ml mikrozkušavce. Obsah zkumavky byl pulzně zvortexován. Zbýlý 10mM Tris byl uskladněn při -80 °C.

6.1.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Laminární box Mars Safety Classe 2 (ScanLaf, LaboGene)
- Laminární box HeraSafe KS (Thermo Fisher Scientific)
- Combi-Spin FVL-2400N centrifuga a vortex (BioSan)

- Centrifuga Eppendorf 5430 (Eppendorf)
- PV1 vortex-mixer (Grant Instruments)
- Mini Spin Eppendorf centrifuga (Eppendorf)
- VX-200 Lab Vortexer vortex mixer (Labnet International)
- GmCLab[®] minicentrifuga (Gilson)
- IKA[®] MS 3 vortexer (Sigma-Aldrich)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Automatický izolátor nukleových kyselin MagNA Pure 96 Instrument (Roche Diagnostics GmbH)
- Termocyklér BIO-RAD CFX96 Real-Time System C1000 Touch (BIO-RAD)

6.1.4. Seznam použitých laboratorních pomůcek

- Eppendorf Research Plus pipety a Eppendorf Dualfilter PCR clean/sterile dualfilter špičky (Eppendorf)
- 1,5 ml mikrozkušavky (Scientific Specialties)
- 5,0 ml, screw cap mikrozkušavka (Eppendorf)
- 8 x 0,2 ml tenkostěnné průhledné PCR zkumavky (Axygen)
- EU SFGC 8 x 0,1 ml průhledné PCR stripy (BIOplastic)
- 96 jamková deska Deep well 96 Process Plate (BIOplastics)
- adhezivní fólie Adhesive qPCR Seal (SARSTEDT)
- špičky MagNA Pure Tip 1000 µl (Roche Diagnostics GmbH)
- 96 jamková deska MagNA Pure cartige (Roche Diagnostics GmbH)
- plastová odpadní nádoba pro MagNA Pure System
- eluční deska MagNA Pure 96 Output Plate (Roche Diagnostics GmbH)
- adhezivní fólie MagNA Pure Sealing Foil (Roche Diagnostics GmbH)
- PCR destičky Hard-Shell PCR plates 96-well, thin wall (BIO- RAD)
- adhezivní fólie Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film (BIO-RAD)
- stojan na PCR destičku
- stojan na mikrozkušavky
- 3M[™] PA-1 stěrka pro uhlazení fólie (3M)
- rukavice SemperCare[®] (Sempermed)
- zásobník na reagenty Reagent Reservoir (VWR)
- 96 jamková deska Tissue Culture Test Plate (TPP)

6.1.5. Použitý software a webové databáze

- MagNA Pure 96 Software (verze 3.1)
- BIO-RAD CFX Manager 3.1
- MS Excel
- CovIT

6.2. Manipulace se vzorky a reagensii

Tato diplomová práce byla provedena podle návrhu studie schváleného Etickou Komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, v souladu s Helsinskou deklarácí. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas s využitím jejich biologického materiálu pro výzkumné účely.

Při manipulaci se vzorky a reagensii byla, stejně jako při jejich skladování, dodržována pravidla práce v BSL3, pre-PCR, PCR a post-PCR laboratoři. Příprava reakčních směsí a práce se vzorky probíhaly ve sterilních laminárních boxech určených výhradně pro danou část postupu. Vzorky i veškeré reagensie použité pro přípravu reakčních směsí byly před použitím a po použití uskladněny při odpovídajících teplotách. Vzorky nasopharyngeálních stěrů byly skladovány při 5 °C, pro zachování stability mohly být skladovány při teplotě 20–25 °C až 5 dní, při teplotě 4 °C až 7 dní a při teplotě -20 °C až 6 měsíců. Vzorky odebrané pomocí samoodběrové sady GARGTEST byly stabilní při pokojové teplotě po dobu 14 dní.

Izolační reagensie soupravy MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) byly skladovány při laboratorní teplotě 15–25 °C. Po otevření byly skladovány při 2–8 °C. Otevřené reagensie byly přelepeny MagNA Pure Sealing folií a skladovány při teplotě 2–8 °C až 28 dní od dne otevření. Před použitím skladovaných reagensií, byly reagensie temperovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Při izolaci nukleové kyseliny bylo postupováno podle návodu výrobce a jeho doporučení.

Reagensie sady Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes) (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd.) byly skladovány při teplotě -20 °C. Při real-time RT-PCR bylo postupováno podle návodu k použití testu.

Všechny metody byly validovány výrobcem a verifikovány laboratoří. Laboratoř podléhá jednou ročně externímu hodnocení kvality pořádaného Státním zdravotnickým ústavem a externího porovnání kvality EQA. Výstupní záznamy jsou uloženy u manažera kvality.

6.3. Vzorky nasopharyngeálních stěrů a odběry kloktáním pomocí sady GARGTEST

Do validační studie bylo zařazeno 724 párových vzorků nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST. Nasopharyngeální stěry byly odebrány odborným personálem v rámci rutinní klinické diagnostiky na odběrovém místě Fakultní nemocnice Olomouc. Stěry byly odebrány pomocí syntetického tamponu, který byl poté vložen do virologického transportního média s antibiotiky a antimykotiky (od společnosti COPAN (<https://conapusa.com/covid-19-sample-collection-kits-for-upper-respiratory-tract-specimens/>), nebo jeho analogického produktu. Po odebrání nasopharyngeálního stěru, byly účastníci studie požádáni o provedení samoodběru kloktáním pomocí soupravy GARGTEST, dle návodu poskytnutého výrobcem. Komerčně dostupná samoodběrová sada GARGTEST obsahuje jednorázovou odměrku, transportní plastovou zkumavku, papírovou žádanku na vyšetření, návod k použití a tři hygienické obaly – dva plastové a jednu papírovou obálku. Při rutinním použití, test umožňuje vyplnění papírové žádanky nebo vytvoření elektronické žádanky.

Účastníci studie kloktali 10 ml vody po dobu nejméně 20 sekund a poté vyplivli vykloktanou tekutinu do plastové zkumavky obsahující lyofilizované transportní médium. Zkumavku poté zašroubovali, protřepali obsah zkumavky a odevzdali přítomnému personálu, který předal vzorky ke zpracování v BLS3 laboratoři.

6.4. Zpracování vzorků v laboratoři BSL3

Všechny vzorky byly zpracovávány v laboratoři třetího stupně biologického rizika - BSL3 (biosafety level 3), která je určena k práci s vysoce rizikovými viry a patogeny ohrožujícími lidské zdraví. BSL3 laboratoř má striktně omezený přístup a personál je povinen dodržovat bezpečnostní opatření a při práci se vzorky používat ochranné pomůcky (dvojité rukavice, jednorázový oblek, respirátor FFP3 a ochranné brýle).

Přijaté vzorky byly opatřeny čárovým kódem, který byl po naskenování spárován s elektronickou žádankou ÚZIS v databázi CovIT (<https://covit.imtm.cz>). Informace uvedené v elektronické žádance byly zkontrolovány s informacemi uvedenými na zkumavkách nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním. Každému párovému vzorku bylo v databázi přiděleno identifikační číslo a vzorky byly označeny štítkem s identifikačním číslem a datem přijetí vzorku.

Z odběrových zkumavek vyšetřovaných vzorků bylo odebráno 250 µl transportního média do 96-jamkové plastové destičky. Alikvot byl poté použit k izolaci nukleových kyselin.

6.5. Izolace nukleových kyselin pomocí MagNA Pure 96 Systému

Nukleové kyseliny byly ze vzorků izolovány pomocí systému MagNA Pure 96 (Roche) a předplněných reagenčních souprav MagNA Pure DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche). Pro izolaci NK, byla nejprve připravena 96 jamková MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Do všech jamek MagNA Pure 96 Processing Cartridge bylo napipetováno 111 µl externího lyzačního pufru (MagNA Pure 96 External Lysis Buffer, ELB, Roche).

První dvě pozice na desce byly určeny pro pozitivní izolační kontrolu a negativní izolační kontrolu. Poslední dvě pozice v panelu byly ponechány pro PCR kontroly, které byly přidány až při přípravě multiplex real-time RT-PCR. Do pozice pro pozitivní izolační kontrolu bylo, kromě ELB, přidáno 84,5 µl DEPC vody. Do pozice pro negativní izolační kontrolu a PCR kontroly bylo přidáno 89 µl DEPC vody.

Z 96-jamkové plastové destičky, obsahující 250 µl transportního média bylo pomocí multikanálové pipety přeneseno do pozic, určených pro patientské vzorky, 84,5 µl transportního média se vzorkem. Takto připravený panel se vzorky byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5-10 min. Ke každému vzorku a pozitivní izolační kontrole byla přidána interní kontrola. Interní kontrola byla připravena v 1,5 ml mikrozkuhavce smícháním 350 µl RNase/DNase-free 10 mM Tris pufru o pH 8-8,5 s 100 µl interní kontroly (Novel Coronavirus (2019-nCoV) Internal control, Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd.). Obsah mikrozkuhavky byl promíchán pipetováním a poté rozpipetován do příslušných jamek po 4,5 µl. MagNA Pure 96 Processing Cartridge byla přelepena adhezivní fólií, očištěna dezinfekčním roztokem a předána z BLS3 laboratoře do hygienické smyčky. Mimo BSL3 laboratoř byla MagNA Pure 96 Processing Cartridge centrifugována při 250 g 1 min a poté přenesena do automatického izolátoru MagNA Pure 96 systém.

Při izolaci nukleových kyselin bylo postupováno podle návodu výrobce a jeho doporučení. Po zapnutí přístroje a spuštění softwaru MagNA Pure 96 System, byla provedena denní údržba přístroje. Poté bylo zkontrolováno množství systémové kapaliny a volný objem v odpadním kontejneru. V případě nedostatku systémové kapaliny byla systémová kapalina vyměněna za novou.

Podle instrukcí přístrojového průvodce byly do jednotlivých zásobníků vloženy příslušné reagenty, izolační deska MagNA Pure96 Processing Cartridge s patientskými

vzorky, špičky a eluční deska MagNA Pure 96 Output Plate. V softwaru MagNA Pure 96 System byly nastaveny parametry testu. Před spuštěním testu byla systémem provedena kontrola zásobníků (resource check), po které byl spuštěn příslušný program. Vzorky byly izolovány pomocí programu Kit MP 96 DNA and Viral NA SV, protokolu Pathogen 200. Vstupní množství vzorku bylo 200 µl a eluční objem byl 100 µl.

Po skončení protokolu byla exportována příslušná data o průběhu izolace a vyjmuta eluční deska s eluátem. Deska byla přelepena aluminiovou adhezivní fólií. Vyizolovaná RNA byla poté použita k detekci přítomnosti SARS-CoV-2 v jednotlivých vzorcích pomocí multiplex real-time RT-PCR.

6.6. Detekce SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR

Pro detekci přítomnosti viru SARS-CoV-2 v jednotlivých vzorcích, byla použita detekční souprava Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes). Reakční směs pro real-time multiplex RT-PCR byla připravena podle tabulky č. 2.

Tab. 2: Reagencie pro přípravu reakční směsi k detekci přítomnosti SAR-CoV-2 pomocí reakční soupravy Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes).

PCR reakční směs	Objem [µl/1 reakce]
Novel CoV (2019-nCoV) Super Mix	19
RT-PCR Enzyme mix	1
Vzorek DNA	5
Celkový objem	25

Připravená reakční směs byla pulzně zvortexována, stočena a po 20 µl rozpipetována do 96 jamkové PCR destičky nebo PCR stripu. K reakční směsi bylo do první pozice přidáno 5 µl vyizolované pozitivní izolační kontroly, do druhé pozice bylo přidáno 5 µl vyizolované negativní izolační kontroly a do dalších pozic vždy 5 µl vyizolované nukleové kyseliny příslušného patientského vzorku. Do předposlední pozice bylo napipetováno 5 µl pozitivní PCR kontroly a do poslední pozice bylo napipetováno 5 µl negativní PCR kontroly, dodaných výrobcem jako součást detekční sady. Zbylá vyizolovaná nukleová kyselina z patientských vzorků byla uskladněna při -80 °C.

Poté byla PCR destička zalepena adhezivní fólií, stočena při 1100 g po dobu 30 s a přenesena do termocykléru BioRad CFX96. Vzorky byly testovány pomocí multiplex real-time RT-PCR programu uvedeného v tabulce č. 3.

Tab. 3: Nastavení programu Real Time Multiplex RT-PCR.

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Reverzní transkripce	45 °C	10 min	1
Denaturace	95 °C	3 min	1
Amplifikace	95 °C	15 s	45
	58 °C	30 s	

Po skončení programu byla vyhodnocena přítomnost SARS-CoV-2 v jednotlivých vzorcích.

6.7. Vyhodnocení

Přítomnost infekce virem SARS-CoV-2 v patientských vzorcích byla vyhodnocena na základě přítomnosti fluorescenčních signálů pro sledované virální geny (*ORF1ab*, *E* a *N*). Fluorescenční signály byly zaznamenávány ve fluorescenčních kanálech uvedených v tabulce č. 4.

Tab. 4: Fluorescenční kanály snímané při detekci SARS-CoV-2 pomocí reakční soupravy Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes).

Fluorescenční kanál	Analyzovaný gen
FAM	<i>ORF1ab</i>
HEX/VIC/JOE	<i>N</i>
Cal Red 610/Texas Red	<i>E</i>
Cy5	IC

Legenda: Fluorescenční kanály: FAM – fluorescein; HEX/VIC/JOE – hexachloroflorescein; Cal Red 610/Texas Red – amidit; Cy5 – kyanin. Analyzované geny: gen *ORF1ab* – gen otevřeného čtecího rámce *ORF1ab*; gen *N* – gen kódující protein nukleokapsidy (nucleocapsid); gen *E* – gen kódující protein obalu (envelope); IC – interní kontrola.

Pro každý z detekovaných fluoroforů byl manuálně nastaven práh detekce (baseline threshold), kterým byly odděleny pozitivní fluorescenční signály od negativních. Interpretace výsledků je shrnuta v tabulce č. 5. Výsledky vzorů byly vyhodnoceny jako validní pouze za předpokladu, že:

- v negativní kontrole izolace a negativní kontrole PCR reakce nebyl detekován žádný signál
- v izolační kontrole byl detekován signál pouze v kanálu pro IC ($Ct = 25 - 40$)
- v pozitivní kontrole PCR reakce byl detekován signál ve všech 4 kanálech ($Ct \leq 35$).

Tab. 5: Kritéria pro vyhodnocení výsledků detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR.

Výsledek	Kritéria
SARS-CoV-2 pozitivní	detekovány všechny 3 cílové SARS-CoV-2 geny (Ct hodnota ≤ 41)
SARS-CoV-2 negativní	nedetekován ani jeden z cílových SARS-CoV-2 genů (Ct hodnota > 41), Ct hodnota pro IC > 41 detekován pouze 1 ze SARS-CoV-2 genů (Ct hodnota > 38), Ct hodnota pro IC > 41
Nejasný výsledek	detekovány 2 cílové SARS-CoV-2 geny (Ct hodnota ≤ 41) nebo 1 SARS-CoV-2 gen (Ct hodnota ≤ 38) -vzorek je potřeba zopakovat od izolace RNA, poté provést RT-PCR -pokud byl znova detekován alespoň 1 z cílových SARS-CoV genů (Ct hodnota ≤ 41) vzorek byl vyhodnocen jako SARS-CoV-2 pozitivní <hr/> Ct hodnota pro IC > 41 vzorek je potřeba zopakovat od izolace RNA, poté provést RT-PCR
Špatný odběr	pokud i po opakované analýze je Ct hodnota pro IC > 41 doporučen nový odběr vzorku

Legenda: IC – interní kontrola

Získaná data byla následně zpracována pomocí statistického softwaru R (verze 4.0.3, R Core Team, The R Project for Statistical Computing (<http://swr.r-project.org>) (naposledy navštíveno 5. 1. 2021). Při statistickém zpracování dat byl v této studii využit odběr vzorku nasofaryngeálního stěru jako referenční hodnota (zlatý standard). Podle výsledků

nasopharyngeálních stěrů byla u samoodběrů kloktáním pomocí odběrové sady GARGTEST určena senzitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, přesnost a výpočet Cohenova koeficientu kappa.

7. Výsledky

V průběhu experimentální části byla detekována přítomnost SARS-CoV-2 v 724 párových vzorcích nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním odebraných pomocí sady GARGTEST (Příloha č. 2). Přítomnost infekce SARS-CoV-2 byla testována pomocí multiplex real-time RT-PCR za použití reakční soupravy Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection for 3 Genes).

Přítomnost infekce virem SARS-CoV-2 byla potvrzena u 44,6 % (323/724) nasopharyngeálních stěrů a 39,5 % (286/724) samoodběrů kloktáním (tabulka č. 6). U 55,4 % (401/724) nasopharyngeálních stěrů a 53 % (384/724) samoodběrových vzorků nebyla infekce prokázána. Výsledky párových vzorků se lišily u 54 z 724 vzorků.

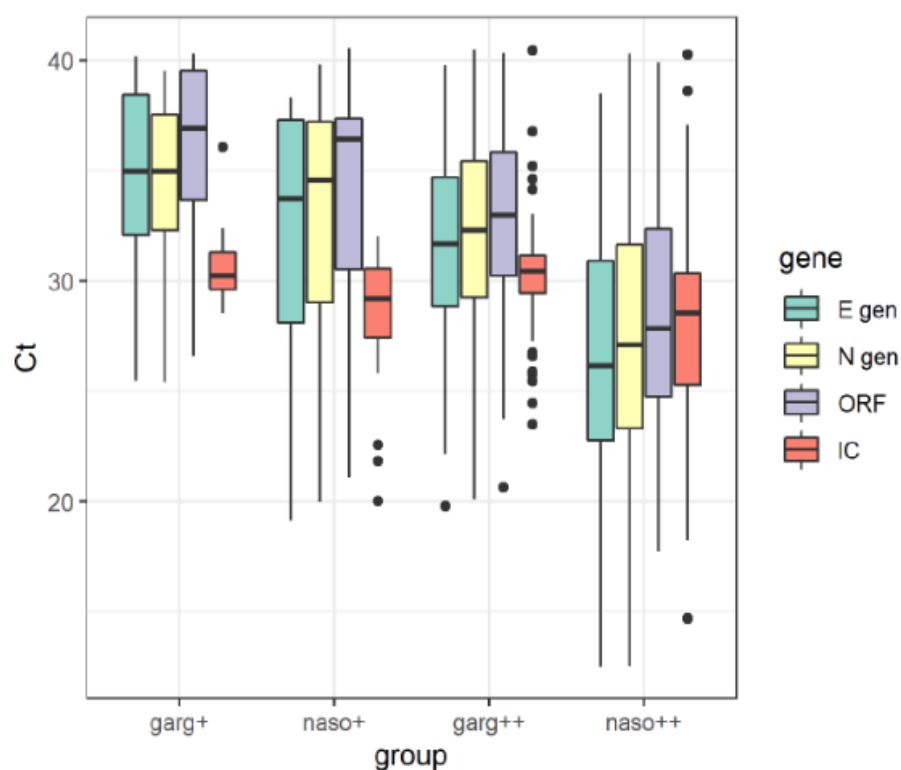
Ve srovnání s referenční metodou odběru (nasopharyngeální stěr) bylo 2,3 % (17/724) samoodběrů kloktáním vyhodnoceno jako falešně pozitivní a 5,1 % (37/724) samoodběrů kloktáním bylo vyhodnoceno jako falešně negativní. Ve srovnání s vyšetřením vzorků nasopharyngeálních stěrů dosahovala detekce SARS-CoV-2 v samoodběrech kloktáním 0,885 sensitivity (95 % CI: 0,846–0,918) a 0,958 specificity (95 % CI: 0,881–0,937). Pozitivní prediktivní hodnota vyšetření vzorků samoodběrů dosahovala 0,944 (95 % CI: 0,912–0,944), negativní prediktivní hodnota dosahovala 0,912 (95 % CI: 0,881–0,937). Celková míra shody (Cohenovo kappa) mezi detekcí SARS-CoV-2 v nasopharyngeálních stěrech a samoodběrech kloktání činila $[\kappa] = 0,848$ (95 %, CI: 0,775-0,921; $P = 0,0097$ [McNemar] s přesností 0,925.

Tab. 6: Porovnání detekce přítomnosti SARS-CoV-2 pomocí multiplex real-time RT-PCR u nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST.

Detekce SARS-CoV-2	Nasopharyngeální stěr*	Samoodběr kloktáním
Pozitivní	323	286
Falešně pozitivní	0	17
Negativní	401	384
Falešně negativní	0	37
Celkem	724	724
Senzitivita		0,885
Specificita		0,958
Přesnost detekce		0,925

* vzorky nasopharyngeálních stěrů byly využity jako referenční hodnota (zlatý standard)

Pouze jeden z párového vzorku byl SARS-CoV-2 pozitivní v 7,46 % případů (54/724). Ve 37 případech byl jako pozitivní vyhodnocen pouze nasopharyngeální stěr a v 17 případech byl pozitivní pouze vzorek samoodběru. U vzorků pozitivních pouze v nasopharyngeálním stěru dosahoval medián Ct hodnot pro gen *E* 32,01 (95 % CI: 28,09–37,29), pro gen *N* 32,80 (95 % CI: 29,01–37,21) a pro *ORF1ab* 33,85 (95 % CI:30,54–37,36) (Obr. X). U vzorků, kde byl pozitivní na přítomnost SARS-CoV-2 pouze samoodběr kloktáním byl medián Ct pro gen *E* 34,56 (95 % CI: 32,08–38,43), 34,37 pro gen *N* (95 % CI: 32,29–37,53) a 35,89 pro gen kódující ORF1ab (95 % CI: 33,67–39,52) (Obr. 8).



Obr. 8: Porovnání Ct hodnot u SARS-CoV-2 pozitivních vzorků nasopharyngeálních stěrů a samoodběrů kloktáním. Legenda: Garg+ představují vzorky pozitivní na SARS-CoV-2 pouze u samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST. Naso+ představují vzorky pozitivní na SARS-CoV-2 pouze u nasopharyngeálních stěrů. Garg++ představují vzorky samoodběrů kloktání, kdy byl SARS-CoV-2 pozitivní vzorek samoodběru i párový vzorek nasofaryngeálního stěru. Naso++ představují vzorky nasofaryngeálního stěru, kdy byl SARS-CoV-2 pozitivní vzorek stěru i párový vzorek samoodběru kloktáním. Gen *E* – gen kódující protein obalu (envelope); gen *N* – gen kódující protein nukleokapsidy (nucleocapsid); *ORF* – gen otevřeného čtecího rámce ORF1ab; IC – interní kontrola.

U 15 z 724 nasopharyngeálních stěrů (2,07 %) a 50 samoodběrů kloktáním (6,91 %) byl výsledek vzorku vyhodnocen jako nejasný. U těchto vzorků byla zopakována izolace NK i detekce SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR. Z 15 nasopharyngeálních stěrů vyhodnocených jako nejasných, byl ve 14 vzorcích stěru detekován pouze jeden (Ct hodnota ≤ 38) nebo dva z cílových genů (Ct hodnota ≤ 41) a u 1 vzorku stěru došlo k selhání interní kontroly. Po zopakování izolace a RT-PCR, bylo 10 vzorků vyhodnoceno jako SARS-CoV-2 pozitivní a 5 jako SARS-CoV-2 negativní. U 50 samoodběrů kloktáním byl výsledek vyhodnocen jako nejasný, protože byl detekován pouze jeden (Ct hodnota ≤ 38) nebo dva z cílových genů (Ct hodnota ≤ 41). U znovu otestovaných samoodběrů byla prokázána pozitivita u 31 z 50 vzorků a 19 z 50 vzorků bylo SARS-CoV-2 negativních.

8. Diskuze

Cílem studie byla validace samoodběru kloktáním pomocí komerčně dostupné odběrové sady GARGTEST, jako vhodného odběrového systému, určeného pro detekci přítomnosti viru SARS-CoV-2. Současným standardem pro odběr vzorků, určených k detekci SARS-CoV-2, je odběr nasopharyngeálního stěru, oropharyngeálního stěru nebo jejich kombinace (Moreira *et al.*, 2021). Odběr stěrů je však spojován se značným diskomfortem, potřebou odborného zdravotního personálu, vystavením personálu riziku nákazy z přítomného aerosolu, nehledně na značnou spotřebu ochranného materiálu a s tím spojeného ekologického dopadu. Zavedení vhodné odběrové alteranativy, která by mohla nahradit nejčastěji používané nasopharyngeální stěry, je klíčové pro zvládnutí pandemie (Huber *et al.*, 2021).

Jednou z možných neinvazivních alternativ je výplach dutiny ústní kloktáním. Odebrání vzorku kloktáním může být provedeno samoodběrem doma bez přítomnosti zdravotního personálu. Tím dojde nejen k omezení přenosu nákazy, ale i ke zmenšení spotřeby ochranného materiálu (Mittal *et al.*, 2020). Výzkumným týmem vedeným Maleckim *et al.*, bylo odhadnuto, že při rutinním otestování 924 zdravotních pracovníků, bylo díky odebrání vzorku kloktáním ušetřeno 225 sad ochranného materiálu a přibližně 1000 stěrových tyčinek (Malecki *et al.*, 2020). Odběr kloktáním je vhodný pro onkologické pacienty nebo osoby, které jsou testovány opakovaně. U těchto osob by pravidelným odběrem mohlo dojít k podráždění nosní sliznice. Odběr je také vhodný pro děti, za předpokladu schopnosti správného provedení kloktání (Morikawa *et al.*, 2015). Vzorek získaný kloktáním je navíc odebrán ze stejného anatomického místa jako oropharyngeální stěr (Bennet *et al.*, 2017). Další výhodou je získání většího objemu vzorku.

Odběr vzorků slin byl použit již u epidemie způsobené virem SARS-CoV (Wang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Genom SARS-CoV-2 je blízce příbuzný genomu viru SARS-CoV (Xu *et al.* 2020). Tak jako SARS-CoV, i SARS-CoV-2 využívá buněčný angiotenzin konvertující enzym 2, jako hlavní receptor pro vstup do hostitelské buňky (Hoffmann *et al.*, 2020). Předchozí experimentální studie poukázali na zvýšenou expresi angiotenzin konvertujícího enzymu 2 ve slinných žlázách. Epiteliální buňky lemující vývody slinné žlázy byly časným cílem SARS-CoV infekce u *Makaka rheus*. Tyto poznatky naznačují, že slinné žlázy mohou být potenciálním cílem pro SARS-CoV-2 infekci a odběr výplachu dutiny ústní, obsahující sliny, tak může představovat vhodný odběrový způsob pro detekci infekce SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2011; Xu J. *et al.* 2020).

V této studii byla prokázána vysoká senzitivita 0,885 (95 % CI: 0,846–0,918) a 0,958 specifická (95 % CI: 0,881–0,937) detekce SARS-CoV-2 pomocí samoodběrů kloktáním. Míra shody (Cohenovo kappa) mezi detekcí SARS-CoV-2 v nasopharyngeálních stěrech a samoodběrech kloktání činila [κ] = 0,848 (95 %, CI: 0,775–0,921; P = 0,0097 [McNemar] s přesností 0,925. Výsledky získané v této studii byly podpořeny výsledky dalších studií.

Ve studii provedené týmem Pasomsub *et al.*, bylo vyšetřeno 200 párových vzorků nasopharyngeálních stěrů a vzorků slin, které byly testovány na přítomnost SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR. Studie rovněž využívala nasofaryngeálního vzorku jako diagnostického standardu. Vzorky byly vyhodnocené jako pozitivní pokud Ct hodnota pro studované virální geny byla < 38. Prevalence infekce v nasofaryngeálních stěrech odpovídala 9,5 % a ve vzorcích slin 9,0 %. Senzitivita detekce infekce ze slin pomocí RT-PCR byla 0,842 (95 % CI: 0,604 – 0,966) a specifická 0,989 (95 % CI: 0,961 – 0,999). Pozitivní prediktivní hodnota byla 0,889 (95 % CI: 0,653 – 0,986) a negativní prediktivní hodnota byla 0,984 (95 % CI: 0,953 – 0,997). Shoda mezi oběma odběrovými metodami vykazovala 0,975 (koeficient κ = 0,851; 95 % CI: 0,723–0,979; P < 0.001). Medián Ct hodnot u obou druhů odběrů byl pro *ORFab* 32,7 (28,5 – 35,0) a pro gen *N* 31,8 (28,4 – 32,3). RT-PCR demonstrovala vysokou senzitivitu a porovnatelnou úspěšnost detekce u vzorků slin, jako u současných standardních odběrů nasopharyngeálních stěrů. Koeficient κ vykazoval silnou shodu detekce mezi nasofaryngeálními stěry a vzorky slin (Pasomsub *et al.*, 2020).

V meta-analýze skupiny Buter-Latorte *et al.* bylo studováno celkem 5922 pacientů. Jednotlivé studie v meta-analýze vykazovali značnou variabilitu v selekci pacientů, návrhů samotné studie a průběhu onemocnění, ve kterém se pacienti nacházeli. V primární analýze vzorků slin byla souhrnná senzitivita detekce 0,832 (95 %, CI: 0,747–0,914) a specifická 0,992 (95 %, CI: 0,982–0,998). U nasofaryngeálních stěrů byla souhrnná senzitivita 0,848 (95 %, CI: 0,768–0,924) a specifická 0,989 (95 %, CI: 0,974–0,998) (Butler-Laporte *et al.*, 2021).

I přes dobré výsledky má odběr vzorků výplachem úst pomocí kloktání určité limitace. V této studii byly Ct hodnoty u vzorků odebraných kloktáním vyšší, než u odběrů nasopharyngeálních stěrů (Obr 8). Ct hodnoty byly také vyšší u vzorků, pozitivních pouze u samoodběrů kloktání – gen *E* 34,56 (95 % CI: 32,08–38,43), 34,37 gen *N* (95 % CI: 32,29–37,53) a 35,89 gen *ORF1ab* (95 % CI: 33,67–39,52), než u vzorků, u kterých vyšel pozitivní pouze nasopharyngeální stěr – gen *E* 32,01 (95 % CI: 28,09–37,29), gen *N* 32,80 (95 % CI: 29,01–37,21) a *ORF1ab* 33,85 (95 % CI: 30,54–37,36). Vyšší Ct hodnoty mohly být

způsobené ředěním vzorku. Samoodběry byly provedené kloktáním 10 ml vody, kdežto nasopharyngeální stěry byly po odebrání vloženy do zkumavky obsahující pouze 3 ml virálního transportního média. Možným řešením tohoto problému by mohlo být snížení objemu použité vody u samoodběrů kloktáním.

Ve studii bylo 2,3 % (17/724) samoodběrů kloktáním vyhodnoceno 5,1 % (37/724) samoodběrů kloktáním bylo vyhodnoceno jako falešně negativních. Falešně negativní výsledky mohly být způsobeny špatným kloktáním, přílišným ředěním nebo vizkozitou vzorku, nebo obsahem potenciálně inhibujících látek – např. zbytku stravy. Všechny tyto možnosti mohly mít negativní vliv na izolaci nukleové kyseliny a následné detekce SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR. Ve srovnání s referenčním metodou odběru (nasopharyngeální stěr) bylo 2,3 % (17/724) samoodběrů kloktáním vyhodnoceno jako falešně pozitivní. Bylo však dokázáno, že virální nálož u nasopharyngeálních stěrů časem slábně, mezitím, co je virus stále detekovatelný v alternativních odběrových vzorcích jako např. v bronchoaveolární laváži nebo sputu (He *et al.*, 2020; Weiss *et al.*, 2020; WHO, 2020). Ve studii Huang *et al.*, vykazovaly vzorky endotracheálních vzorků a vzorků sputa výrazně vyšší obsah virální RNA, než u vzorků NPS a OPS. U vzorků, které v této studii byly vyhodnoceny jako falešně pozitivní, tak není vyloučená možnost vyšší virální nálože v oblasti výplachu dutiny ústní, než v analyzovaných vzorcích nasopharyngeálních stěrů.

Validace jiných izolačních metod a souprav pro RT-PCR, jejich senzitivita a specifita u samoodběrů kloktáním pomocí samoodběrové sady GARGTEST, bude předmětem dalšího zkoumání.

9. Závěr

V diplomové práci byla validovaná komerční samoodběrová sada GARGTEST, jako vhodná odběrová metoda pro získání vzorků k detekci SARS-CoV-2. Validace proběhla na základě porovnání detekce SARS-CoV-2 v 724 párových vzorcích nasopharyngeálních stěrů a vzorků samoodběrů kloktáním pomocí sady GARGTEST. Ze vzorků byla izolována nukleová kyselina, která byla následně amplifikována pomocí multiplex real-time RT-PCR.

Ve srovnání s referenční metodou odběru (nasopharyngeálním stěrem), byla prokázána vysoká senzitivita 0,885 (95 % CI: 0,846–0,918) a specificita 0,958 (95 % CI: 0,881–0,937) u detekce SARS-CoV-2 pomocí samoodběrů kloktáním, a také silná shoda (Cohenovo kappa) mezi detekcí SARS-CoV-2 v nasopharyngeálních stěrech a samoodběrech kloktání $[\kappa] = 0,848$ (95 %, CI: 0,775–0,921; $P = 0,0097$ [McNemar]) s přesností 0,925.

Podle výsledků získaných v této studii, je detekce přítomnosti SARS-CoV-2 ze vzorků slin získaných kloktáním, pomocí komerční samoodběrové sady GARGTEST, vhodnou alternativou k nasopharyngeálním odběrům. Jeho jednoduchost a rychlá dostupnost by mohla mít pozitivní impakt na řešení pandemie a včasným záchytem jedinců nakažených SARS-CoV-2 zabránit dalšímu šíření viru v populaci.

10. Seznam literatury

Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(5), 331. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050331>

Arons, M. M., Hatfield, K. M., Reddy, S. C., Kimball, A., James, A., Jacobs, J. R., ... & Jernigan, J. A. (2020). Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *New England journal of medicine*, 382(22), 2081-2090.

Astuti, I., & Ysrafil (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & metabolic syndrome*, 14(4), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>

Batah, S. S., & Fabro, A. T. (2021). Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respiratory medicine*, 176, 106239. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106239>

Bennett, S., Davidson, R. S., & Gunson, R. N. (2017). Comparison of gargle samples and throat swab samples for the detection of respiratory pathogens. *Journal of virological methods*, 248, 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.06.010>

Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F. L., Lavillette, D., & Denolly, S. (2021). The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100111. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>

Bradburne, A. F., Bynoe, M. L., & Tyrrell, D. A. (1967). Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *British medical journal*, 3(5568), 767–769. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5568.767>

Butler-Laporte, G., Lawandi, A., Schiller, I., Yao, M., Dendukuri, N., McDonald, E. G., & Lee, T. C. (2021). Comparison of Saliva and Nasopharyngeal Swab Nucleic Acid Amplification Testing for Detection of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA internal medicine*, 181(3), 353–360. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.8876>

Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervey, S. R., & Liu, C. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS central science*, 6(5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>

- Carter, S. E., Gobat, N., Pfaffmann Zambruni, J., Bedford, J., van Kleef, E., Jombart, T., Mossoko, M., Bulemfu Nkagirande, D., Navarro Colorado, C., & Ahuka-Mundeke, S.** (2020). What questions we should be asking about COVID-19 in humanitarian settings: perspectives from the Social Sciences Analysis Cell in the Democratic Republic of the Congo. *BMJ global health*, 5(9), e003607. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-003607>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L.** (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Daley, P., Castriciano, S., Chernesky, M., & Smieja, M.** (2006). Comparison of flocced and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. *Journal of clinical microbiology*, 44(6), 2265-2267.
- Dhama, K., Patel, S. K., Sharun, K., Pathak, M., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Malik, Y. S., Sah, R., Rabaan, A. A., Panwar, P. K., Singh, K. P., Michalak, I., Chaicumpa, W., Martinez-Pulgarin, D. F., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J.** (2020). SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus. *Travel medicine and infectious disease*, 37, 101830. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101830>
- Dinnes, J., Deeks, J. J., Adriano, A., Berhane, S., Davenport, C., Dittrich, S., Emperador, D., Takwoingi, Y., Cunningham, J., Beese, S., Dretzke, J., Ferrante di Ruffano, L., Harris, I. M., Price, M. J., Taylor-Phillips, S., Hooft, L., Leeflang, M. M., Spijker, R., Van den Bruel, A., & Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group** (2020). Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *The Cochrane database of systematic reviews*, 8(8), CD013705. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013705>
- Dixon, B. E., Wools-Kaloustian, K., Fadel, W. F., Duszynski, T. J., Yiannoutsos, C., Halverson, P. K., & Menachemi, N.** (2020). Symptoms and symptom clusters associated with SARS-CoV-2 infection in community-based populations: Results from a statewide epidemiological study. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020.10.11.20210922. <https://doi.org/10.1101/2020.10.11.20210922>
- Eftekhari, A., Alipour, M., Chodari, L., Maleki Dizaj, S., Ardalan, M., Samiei, M., Sharifi, S., Zununi Vahed, S., Huseynova, I., Khalilov, R., Ahmadian, E., & Cucchiaroni, M.** (2021). A Comprehensive Review of Detection Methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms*, 9(2), 232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020232>

- Fouchier, R. A., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., de Jong, J. C., Simon, J. H., & Osterhaus, A. D.** (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(16), 6212–6216. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400762101>
- Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., ... Rao, Z.** (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6492), 779–782. <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>
- Goldfarb, D. M., Tilley, P., Al-Rawahi, G. N., Srigley, J. A., Ford, G., Pedersen, H., Pabbi, A., Hannam-Clark, S., Charles, M., Dittrick, M., Gadkar, V. J., Pernica, J. M., & Hoang, L.** (2021). Self-Collected Saline Gargle Samples as an Alternative to Health Care Worker-Collected Nasopharyngeal Swabs for COVID-19 Diagnosis in Outpatients. *Journal of clinical microbiology*, *59*(4), e02427-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02427-20>
- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D.** (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, *12*(2), 135. <https://doi.org/10.3390/v12020135>
- Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., Luo, S. W., Li, P. H., Zhang, L. J., Guan, Y. J., Butt, K. M., Wong, K. L., Chan, K. W., Lim, W., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., & Poon, L. L.** (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5643), 276–278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., ... & Zhong, N. S.** (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, *382*(18), 1708-1720.
- Hamre, D., & Procknow, J. J.** (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *121*(1), 190–193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
- Huang, Y., Chen, S., Yang, Z., Guan, W., Liu, D., Lin, Z., Zhang, Y., Xu, Z., Liu, X., & Li, Y.** (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples from Critically Ill Patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *201*(11), 1435–1438. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0572LE>

- He, X., Lau, E., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., Zhang, F., ... Leung, G. M.** (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature medicine*, *26*(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S.** (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L.** (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews. Microbiology*, *19*(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, Y., Chen, S., Yang, Z., Guan, W., Liu, D., Lin, Z., Zhang, Y., Xu, Z., Liu, X., & Li, Y.** (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples from Critically Ill Patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *201*(11), 1435–1438. <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0572LE>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W.** (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta pharmacologica Sinica*, *41*(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Huber, M., Schreiber, P. W., Scheier, T., Audigé, A., Buonomano, R., Rudiger, A., Braun, D. L., Eich, G., Keller, D. I., Hasse, B., Böni, J., Berger, C., Günthard, H. F., Manrique, A., & Trkola, A.** (2021). High Efficacy of Saliva in Detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR in Adults and Children. *Microorganisms*, *9*(3), 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030642>
- Chan, J. F., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K., Yuan, S., & Yuen, K. Y.** (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chilamakuri, R., & Agarwal, S.** (2021). COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells*, *10*(2), 206. <https://doi.org/10.3390/cells10020206>
- Cho, S. Y., Kang, J. M., Ha, Y. E., Park, G. E., Lee, J. Y., Ko, J. H., Lee, J. Y., Kim, J. M., Kang, C. I., Jo, I. J., Ryu, J. G., Choi, J. R., Kim, S., Huh, H. J., Ki, C. S., Kang, E. S., Peck, K. R., Dhong, H. J., Song, J. H., Chung, D. R., ... Kim, Y. J.** (2016). MERS-CoV outbreak following a single patient exposure in an emergency room in South Korea: an epidemiological outbreak study. *Lancet (London, England)*, *388*(10048), 994–1001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30623-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30623-7)

Jalandra, R., Yadav, A. K., Verma, D., Dalal, N., Sharma, M., Singh, R., Kumar, A., & Solanki, P. R. (2020). Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *129*, 110446. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110446>

Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2021). SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *413*(1), 49–71. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>

Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *The Pediatric infectious disease journal*, *24*(11 Suppl), S223–S226. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60>

Konings, F., Perkins, M. D., Kuhn, J. H., Pallen, M. J., Alm, E. J., Archer, B. N., Barakat, A., Bedford, T., Bhiman, J. N., Caly, L., Carter, L. L., Cullinane, A., de Oliveira, T., Druce, J., El Masry, I., Evans, R., Gao, G. F., Gorbalenya, A. E., Hamblion, E., Herring, B. L., ... Van Kerkhove, M. D. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. *Nature microbiology*, *6*(7), 821–823. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00932-w>

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., ... SARS Working Group (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine*, *348*(20), 1953–1966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>

Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics*, 23–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3

Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J., & Hsueh, P. R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents*, *55*(3), 105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>

- Lam, W. K., Zhong, N. S., & Tan, W. C.** (2003). Overview on SARS in Asia and the world. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *8 Suppl*(Suppl 1), S2–S5. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00516.x>
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H., & Yuen, K. Y.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(39), 14040–14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Lau, S. K., Woo, P. C., Yip, C. C., Tse, H., Tsoi, H. W., Cheng, V. C., Lee, P., Tang, B. S., Cheung, C. H., Lee, R. A., So, L. Y., Lau, Y. L., Chan, K. H., & Yuen, K. Y.** (2006). Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *Journal of clinical microbiology*, *44*(6), 2063–2071. <https://doi.org/10.1128/JCM.02614-05>
- Lauer, S. A., Grantz, K. H., Bi, Q., Jones, F. K., Zheng, Q., Meredith, H. R., Azman, A. S., Reich, N. G., & Lessler, J.** (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of internal medicine*, *172*(9), 577–582. <https://doi.org/10.7326/M20-0504>
- Li F.** (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, *3*(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K., Lau, E., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., ... Feng, Z.** (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *The New England journal of medicine*, *382*(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., & Wang, L. F.** (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science (New York, N.Y.)*, *310*(5748), 676–679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Liu, I. J., Chen, P. J., Yeh, S. H., Chiang, Y. P., Huang, L. M., Chang, M. F., Chen, S. Y., Yang, P. C., Chang, S. C., Wang, W. K., & SARS Research Group of the National Taiwan University College of Medicine-National Taiwan University Hospital** (2005). Immunofluorescence assay for detection of the nucleocapsid antigen of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in cells derived from throat wash samples of patients with SARS. *Journal of clinical microbiology*, *43*(5), 2444–2448. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2444-2448.2005>

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, *395*(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

Malecki, M., Lüsebrink, J., Teves, S., & Wendel, A. F. (2021). Pharynx gargle samples are suitable for SARS-CoV-2 diagnostic use and save personal protective equipment and swabs. *Infection control and hospital epidemiology*, *42*(2), 248–249. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.229>

Malik Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, *42*(1), 3–11.

Mardian, Y., Kosasih, H., Karyana, M., Neal, A., & Lau, C. Y. (2021). Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Frontiers in medicine*, *8*, 615099. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.615099>

Martinez R. M. (2020). Clinical Samples for SARS-CoV-2 Detection: Review of the Early Literature. *Clinical microbiology newsletter*, *42*(15), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2020.07.001>

Mesel-Lemoine, M., Millet, J., Vidalain, P. O., Law, H., Vabret, A., Lorin, V., Escriou, N., Albert, M. L., Nal, B., & Tangy, F. (2012). A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *Journal of virology*, *86*(14), 7577–7587. <https://doi.org/10.1128/JVI.00269-12>

Mittal, A., Gupta, A., Kumar, S., Surjit, M., Singh, B., Soneja, M., Soni, K. D., Khan, A. R., Singh, K., Naik, S., Kumar, A., Aggarwal, R., Nischal, N., Sinha, S., Trikha, A., & Wig, N. (2020). Gargle lavage as a viable alternative to swab for detection of SARS-CoV-2. *The Indian journal of medical research*, *152*(1 & 2), 77–81. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2987_20

Moreira, V. M., Mascarenhas, P., Machado, V., Botelho, J., Mendes, J. J., Taveira, N., & Almeida, M. G. (2021). Diagnosis of SARS-Cov-2 Infection by RT-PCR Using Specimens Other Than Naso- and Oropharyngeal Swabs: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *11*(2), 363. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020363>

Morikawa, S., Hiroi, S., & Kase, T. (2015). Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *64*, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.00>

- Mulabbi, E. N., Tweyongyere, R., & Byarugaba, D. K.** (2021). The history of the emergence and transmission of human coronaviruses. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 88(1), e1–e8. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v88i1.1872>
- Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V.** (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*, 12(3), e7423. <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>
- Park S. E.** (2020). Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and experimental pediatrics*, 63(4), 119–124. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>
- Pasomsub, E., Watcharananan, S. P., Boonyawat, K., Janchompoo, P., Wongtabtim, G., Suksuwan, W., Sungkanuparph, S., & Phuphuakrat, A.** (2021). Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(2), 285.e1–285.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>
- Péré, H., Podglajen, I., Wack, M., Flamarion, E., Mirault, T., Goudot, G., Hauw-Berlemont, C., Le, L., Caudron, E., Carrabin, S., Rodary, J., Ribeyre, T., Bélec, L., & Veyer, D.** (2020). Nasal Swab Sampling for SARS-CoV-2: a Convenient Alternative in Times of Nasopharyngeal Swab Shortage. *Journal of clinical microbiology*, 58(6), e00721-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00721-20>
- Premraj, A., Aleyas, A. G., Nautiyal, B., & Rasool, T. J.** (2020). Nucleic Acid and Immunological Diagnostics for SARS-CoV-2: Processes, Platforms and Pitfalls. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 866. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10110866>
- Raj R.** (2020). Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochemistry and biophysics reports*, 25, 100847. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100847>
- Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A., & Singh, S. K.** (2020). SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respiratory research*, 21(1), 318. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z>
- See, A., & Toh, S. T.** (2020). Respiratory sampling for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: An Overview. *Head & neck*, 42(7), 1652–1656. <https://doi.org/10.1002/hed.26232>

- Sheehan, S. A., Hamilton, K. L., Retzbach, E. P., Balachandran, P., Krishnan, H., Leone, P., Lopez-Gonzalez, M., Suryavanshi, S., Kumar, P., Russo, R., & Goldberg, G. S.** (2021). Evidence that Maackia amurensis seed lectin (MASL) exerts pleiotropic actions on oral squamous cells with potential to inhibit SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease progression. *Experimental cell research*, 403(1), 112594. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112594>
- Sun, P., Lu, X., Xu, C., Sun, W., & Pan, B.** (2020). Understanding of COVID-19 based on current evidence. *Journal of medical virology*, 92(6), 548–551. <https://doi.org/10.1002/jmv.25722>
- Tang, T., Bidon, M., Jaimes, J. A., Whittaker, G. R., & Daniel, S.** (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral research*, 178, 104792. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W.** (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of clinical microbiology*, 58(6), e00512-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
- To, K. K., Tsang, O. T., Yip, C. C., Chan, K. H., Wu, T. C., Chan, J. M., Leung, W. S., Chik, T. S., Choi, C. Y., Kandamby, D. H., Lung, D. C., Tam, A. R., Poon, R. W., Fung, A. Y., Hung, I. F., Cheng, V. C., Chan, J. F., & Yuen, K. Y.** (2020). Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 841–843. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>
- Tom, M. R., & Mina, M. J.** (2020). To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(16), 2252–2254. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa619>
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B.** (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine*, 10(4), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- Vassilara, F., Spyridaki, A., Pothitos, G., Deliveliotou, A., & Papadopoulos, A.** (2018). A Rare Case of Human Coronavirus 229E Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in a Healthy Adult. *Case reports in infectious diseases*, 2018, 6796839. <https://doi.org/10.1155/2018/6796839>
- Vaz, S. N., Santana, D. S., Netto, E. M., Pedroso, C., Wang, W. K., Santos, F., & Brites, C.** (2020). Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 24(5), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>

- Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J.** (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>
- Wang, H., Jean, S., Eltringham, R., Madison, J., Snyder, P., Tu, H., Jones, D. M., & Leber, A. L.** (2021). Mutation-Specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike L452R Mutation. *Journal of clinical microbiology*, 59(8), e0092621. <https://doi.org/10.1128/JCM.00926-21>
- Weiss, A., Jellingsø, M., & Sommer, M.** (2020). Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*, 58, 102916. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102916>
- Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J.** (2020). COVID-19 diagnostics in context. *Science translational medicine*, 12(546), eabc1931. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc1931>
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., & Wendtner, C.** (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., Wong, B. H., Poon, R. W., Cai, J. J., Luk, W. K., Poon, L. L., Wong, S. S., Guan, Y., Peiris, J. S., & Yuen, K. Y.** (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology*, 79(2), 884–895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T.** (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell host & microbe*, 27(3), 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Wu, J., Yuan, X., Wang, B., Gu, R., Li, W., Xiang, X., Tang, L., & Sun, H.** (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: From Gene Structure to Pathogenic Mechanisms and Potential Therapy. *Frontiers in microbiology*, 11, 1576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01576>
- Xiao, J., Fang, M., Chen, Q., & He, B.** (2020). SARS, MERS and COVID-19 among healthcare workers: A narrative review. *Journal of infection and public health*, 13(6), 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.05.019>

Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., Zhong, W., & Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China. Life sciences*, 63(3), 457–460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>

Yan, Y., Shin, W. I., Pang, Y. X., Meng, Y., Lai, J., You, C., Zhao, H., Lester, E., Wu, T., & Pang, C. H. (2020). The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *International journal of environmental research and public health*, 17(7), 2323. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072323>

Yang, P., & Wang, X. (2020). COVID-19: a new challenge for human beings. *Cellular & molecular immunology*, 17(5), 555–557. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0407-x>

Ye, Z. W., Yuan, S., Yuen, K. S., Fung, S. Y., Chan, C. P., & Jin, D. Y. (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *International journal of biological sciences*, 16(10), 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>

Younes, N., Al-Sadeq, D. W., Al-Jighefee, H., Younes, S., Al-Jamal, O., Daas, H. I., Yassine, H. M., & Nasrallah, G. K. (2020). Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 582. <https://doi.org/10.3390/v12060582>

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England journal of medicine*, 367(19), 1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>

Zhang, B., Liu, S., Dong, Y., Zhang, L., Zhong, Q., Zou, Y., & Zhang, S. (2020). Positive rectal swabs in young patients recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19). *The Journal of infection*, 81(2), e49–e52. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.023>

Zhang, S., Qiao, S., Yu, J., Zeng, J., Shan, S., Tian, L., Lan, J., Zhang, L., & Wang, X. (2021). Bat and pangolin coronavirus spike glycoprotein structures provide insights into SARS-CoV-2 evolution. *Nature communications*, 12(1), 1607. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21767-3>

Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, X. H., Chan, K. H., Li, P. H., Tan, S. Y., Chang, Q., Xie, J. P., Liu, X. Q., Xu, J., Li, D. X., Yuen, K. Y., Peiris, J. S. M., & Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet (London, England)*, 362(9393), 1353–1358. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14630-2)

Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H. L., Peiris, M., & Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *The New England journal of medicine*, 382(12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>

CDC. [online] [navštíveno dne 24.7.2021] SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html#Concern>

CDC. [online] [navštíveno dne 24.7.2021] Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html>

CDC. [online] [navštíveno dne 24.7.2021] About Variants of the Virus that Causes COVID-19. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant.html>

CDC. [online] [navštíveno dne 24.7.2021] Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>

COPAN. [online] [navštíveno dne 4.7.2021] Dostupné z <https://www.copanusa.com/covid-19-sample-collection-kits-for-upper-respiratory-tract-specimens/>

GARGTEST. [online] [navštíveno dne 4.7.2021] Dostupné z <https://www.gargtest.com/>

LifeScience. [online] [navštíveno dne 4.7.2021] Dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/articles/magna-pure-lc--instrument-system-technology.html

LifeSpan BioSciences. [online] [navštíveno dne 4.7.2021] Dostupné z: <https://www.lsbio.com/media/whitepapers/sars-cov-2-and-covid-19-pathogenesis-a-revie>

MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit. [online] [navštíveno 4.7.2021] Dostupné z <https://www.n-genetics.com/products/1295/1023/16530.pdf>

WHO. [online] [navštíveno dne 4.7.2021] Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>

11. Přílohy

Příloha 1: Návod výrobce GARGTESTu, postup samoodběru

Příloha 2: Souhrnná tabulka výsledků validace

Příloha 1: Návod výrobce GARGTESTu, postup samoodběru

GARGTEST **POSTUP SAMOODBĚRU**

Odběr si proveďte nejlépe ráno před hygienou dutiny ústní. Při samotném odběru přesně dodržujte uvedené instrukce.



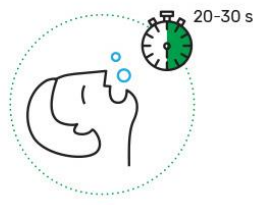
1

Napustěte vodu do přiložené odměrky po rysku 10 ml (zhruba polovina odměrky)



2

Obsah odměrky vlejte do úst - nepolykejte! Pokud omylem polknete, nic se neděje, postup opakujte od bodu číslo 1.



3

Kloktejte po dobu nejméně 20-30 vteřin.



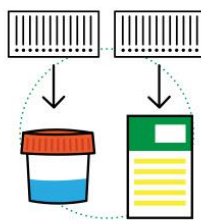
4

Vyplňte obsah Vašich úst do otevřené transportní zkumavky. Ve zkumavce je stabilizační prášek, který nesmíte vyspat. Je důležitý pro uchování vzorku.



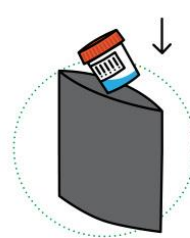
5

Zkumavku velmi pečlivě uzavřete.



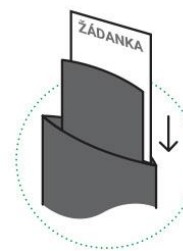
6

Na zkumavku nalepte čárový kód. V případě, že jste nevyplnili elektronickou žádanku nalepte druhý čárový kód na papírovou žádanku.



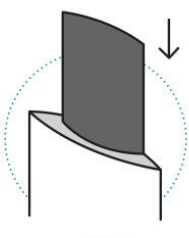
7

Uzavřenou zkumavku vložte do menšího černého sáčku a uzavřete.



8

Uzavřený sáček obsahující zkumavku vložte do druhého černého sáčku a přiložte vyplněnou papírovou žádanku. Pokud jste žádanku vyplnili elektronicky, papírovou žádanku již nepřikládejte. Pak sáček uzavřete.



9

Takto zabalenou zkumavku se vzorkem vložte do přibalené bublinkové obálky a zalepte. Obálku odneste na odběrové místo, sběrné místo, k lékaři nebo do laboratoře podle toho, kdo vyšetření indikoval nebo jej provedl.

Příloha 2: Souhrnná tabulka výsledků validace

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>NPS</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>GARG</i>	souhrnný
CoV36736	37,52	39,80	40,56	29,21	poz.				30,50	neg.	poz.
CoV36780				30,19	neg.	37,32	37,60	37,43	30,88	poz.	poz.
CoV37352	34,71	35,12	35,94	30,50	poz.	32,55	32,79	34,16	30,70	poz.	poz.
CoV37353				29,20	neg.				30,02	neg.	neg.
CoV37357				30,15	neg.				29,87	neg.	neg.
CoV37359				29,59	neg.				30,74	neg.	neg.
CoV37361	33,23	34,52	35,93	30,45	poz.	34,47	37,68	36,76	29,67	poz.	poz.
CoV37363				30,36	neg.				32,43	neg.	neg.
CoV37377	20,37	20,52	25,44	22,37	poz.	31,19	31,91	33,00	29,69	poz.	poz.
CoV37385				31,11	neg.				30,37	neg.	neg.
CoV37388				30,49	neg.				29,45	neg.	neg.
CoV37391				30,77	neg.				30,45	neg.	neg.
CoV37395	22,51	23,35	25,84	23,78	poz.	30,28	30,78	31,84	29,52	poz.	poz.
CoV37396				30,48	neg.				30,51	neg.	neg.
CoV37397				31,10	neg.				29,61	neg.	neg.
CoV37401				32,12	neg.				31,18	neg.	neg.
CoV37403	23,12	23,70	24,54		poz.	33,05	34,33	34,42	31,05	poz.	poz.
CoV37405	19,45	19,94	21,56		poz.	22,46	22,57	23,71		poz.	poz.
CoV37408				30,31	neg.				29,20	neg.	neg.
CoV37411				30,28	neg.				29,72	neg.	neg.
CoV37415				30,39	neg.				30,36	neg.	neg.
CoV37420				29,64	neg.				29,64	neg.	neg.
CoV37422	20,55	21,31	23,85	21,89	poz.	28,70	29,36	32,21	28,76	poz.	poz.
CoV37426				30,48	neg.				30,35	neg.	neg.
CoV37427				29,21	neg.				29,81	neg.	neg.
CoV37428	22,03	22,67	24,59	23,40	poz.	24,48	25,44	27,83	25,48	poz.	poz.
CoV37439				30,98	neg.				31,04	neg.	neg.
CoV37440	30,94	30,73	32,22	31,50	poz.	29,59	29,70	31,52	32,17	poz.	poz.
CoV37441				31,02	neg.				31,05	neg.	neg.
CoV37445	26,23	26,64	27,23	29,49	poz.				31,66	neg.	poz.
CoV37448				31,21	neg.				32,20	neg.	neg.
CoV37456	31,07	31,35	32,07	31,63	poz.	33,58	34,30	34,54	30,75	poz.	poz.
CoV37457				31,17	neg.				31,79	neg.	neg.
CoV37461				29,95	neg.				29,96	neg.	neg.
CoV37466	24,45	25,40	27,62	25,45	poz.	32,29	33,56	35,54	29,47	poz.	poz.
CoV37469	27,63	28,48	30,45	27,87	poz.	27,96	28,88	30,54	27,98	poz.	poz.
CoV37470	25,53	26,41	27,37	26,70	poz.	33,95	35,74	35,23	30,25	poz.	poz.
CoV37472	18,19	18,49	21,55	19,90	poz.	26,57	26,74	30,21	27,88	poz.	poz.
CoV37482	18,74	20,40	22,22	19,76	poz.	28,37	29,92	31,00	28,83	poz.	poz.
CoV37486				28,87	neg.				30,45	neg.	neg.
CoV37488	31,28	32,11	33,25	28,87	poz.	32,51	33,14	34,42	29,77	poz.	poz.
CoV37490	12,47	12,54	17,74	14,69	poz.	32,40	33,16	34,19	30,38	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV37495	26,85	26,72	29,02	34,38	poz.	36,86	40,04	37,44	32,41	poz.	poz.
CoV37496	24,07	24,18	25,35	29,83	poz.	38,07		36,85	29,53	poz.	poz.
CoV37502				29,82	neg.				29,92	neg.	neg.
CoV37503				30,50	neg.				31,46	neg.	neg.
CoV37517	32,41	33,56	33,86	30,54	poz.	30,61	31,44	31,95	29,90	poz.	poz.
CoV37521				31,53	neg.	25,46	25,41	26,60	36,05	poz.	poz.
CoV37522				29,78	neg.				30,43	neg.	neg.
CoV37528				31,05	neg.				31,63	neg.	neg.
CoV37532				30,15	neg.				30,66	neg.	neg.
CoV37534				30,28	neg.				30,46	neg.	neg.
CoV37581	15,42	15,26	18,21		poz.	33,20	35,48	35,11	31,03	poz.	poz.
CoV37590	22,87	23,32	23,94		poz.	31,75	32,58	33,33	31,26	poz.	poz.
CoV37591	21,50	22,09	23,04		poz.	27,15	27,64	28,27	32,20	poz.	poz.
CoV37597				30,08	neg.				30,34	neg.	neg.
CoV37671				30,99	neg.				30,20	neg.	neg.
CoV37673				30,47	neg.				30,30	neg.	neg.
CoV37675				31,00	neg.				33,10	neg.	neg.
CoV37677				31,18	neg.				29,41	neg.	neg.
CoV37678	19,83	19,97	23,53	21,84	poz.				30,40	neg.	poz.
CoV37680				31,83	neg.				29,76	neg.	neg.
CoV37683	29,24	29,63	32,78	29,71	poz.	31,64	32,42	34,77	29,98	poz.	poz.
CoV37684				31,50	neg.				30,17	neg.	neg.
CoV37686				30,65	neg.				29,59	neg.	neg.
CoV37691				29,45	neg.				29,34	neg.	neg.
CoV37792			41,03	31,54	neg.				31,37	neg.	neg.
CoV37796	21,08	21,42	22,08		poz.	26,71	26,73	27,26	34,60	poz.	poz.
CoV37811	21,59	22,11	23,05		poz.	28,28	28,45	29,58	31,19	poz.	poz.
CoV37813	21,88	22,31	23,42		poz.	30,18	30,73	30,84	31,41	poz.	poz.
CoV37823	33,11	33,48	34,33	31,25	poz.	33,31	34,32	33,85	30,51	poz.	poz.
CoV37824	29,75	29,86	30,62	31,23	poz.				30,87	neg.	poz.
CoV37829				33,14	neg.				31,72	neg.	neg.
CoV37839	23,01	23,21	24,42		poz.				31,07	neg.	poz.
CoV37840	29,95	30,99	31,24	32,50	poz.	34,25	35,05	36,09	31,74	poz.	poz.
CoV37842				31,14	neg.				31,19	neg.	neg.
CoV37851				31,21	neg.				31,07	neg.	neg.
CoV37865				31,25	neg.				31,38	neg.	neg.
CoV37866	31,63	31,86	33,23	31,23	poz.	31,78	32,20	32,71	30,91	poz.	poz.
CoV37868				31,89	neg.				30,52	neg.	neg.
CoV37869	20,33	18,93	22,35		poz.	29,77	30,06	30,12	30,75	poz.	poz.
CoV37872				30,54	neg.				30,10	neg.	neg.
CoV37873				30,67	neg.				30,70	neg.	neg.
CoV37874	20,89	20,59	22,30		poz.	25,02	25,11	25,47		poz.	poz.
CoV37889	32,29	32,46	32,65	31,54	poz.	34,78	38,63	34,73	31,30	poz.	poz.
CoV37891	31,45	32,56	33,39	32,86	poz.	35,62	37,47	38,18	32,52	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV38131				31,44	neg.				30,59	neg.	neg.
CoV38137	28,44	29,10	29,35	31,05	poz.	30,85	31,42	31,33	30,59	poz.	poz.
CoV38138				32,04	neg.			39,17	32,17	neg.	neg.
CoV38141	19,27	19,39	19,45		poz.	30,61	31,00	30,80	31,43	poz.	poz.
CoV38143				31,08	neg.				31,30	neg.	neg.
CoV38148	23,19	23,25	23,34		poz.	32,02	32,28	32,26	30,82	poz.	poz.
CoV38155				32,03	neg.				30,23	neg.	neg.
CoV38156	26,22	26,20	27,43	32,25	poz.	30,57	30,71	30,74	30,40	poz.	poz.
CoV38164				32,10	neg.				31,58	neg.	neg.
CoV38167	24,52	22,55	25,40		poz.	26,49	26,52	27,33	35,20	poz.	poz.
CoV38169				31,51	neg.				30,17	neg.	neg.
CoV38178				31,58	neg.				30,64	neg.	neg.
CoV38186			41,11	31,58	neg.				30,37	neg.	neg.
CoV38190				31,39	neg.				31,03	neg.	neg.
CoV38195				32,11	neg.				30,95	neg.	neg.
CoV38208	25,78	27,07	26,54		poz.	33,68	35,95	34,71	30,71	poz.	poz.
CoV38214				31,22	neg.				30,73	neg.	neg.
CoV38228				30,63	neg.				30,52	neg.	neg.
CoV38233	25,48	25,35	26,41		poz.	30,47	31,13	31,37	31,36	poz.	poz.
CoV38241	37,54	37,79	36,88	31,64	poz.				30,42	neg.	poz.
CoV38246	31,42	33,25	32,38	31,85	poz.	33,58	36,65	34,14	31,38	poz.	poz.
CoV38256				30,77	neg.				29,64	neg.	neg.
CoV38262	25,18	25,44	24,98		poz.	29,17	29,73	30,13	30,86	poz.	poz.
CoV38264				31,89	neg.				31,42	neg.	neg.
CoV38268	26,50	26,58	26,46		poz.	27,44	27,60	28,85	31,27	poz.	poz.
CoV38271	33,05	33,42	33,99	32,37	poz.	32,42	33,37	32,80	31,13	poz.	poz.
CoV38272				30,31	neg.				30,07	neg.	neg.
CoV38273				33,01	neg.				31,47	neg.	neg.
CoV38295				32,98	neg.				29,57	neg.	neg.
CoV38298	21,35	21,63	23,64	38,59	poz.	38,84	40,49	38,48	31,08	poz.	poz.
CoV38312	28,00	28,62	28,79	30,38	poz.	30,25	31,45	32,01	29,68	poz.	poz.
CoV38316	20,36	21,26	21,45		poz.	29,80	31,04	31,45	29,17	poz.	poz.
CoV38318				30,21	neg.				29,39	neg.	neg.
CoV38319	25,81	26,50	26,74	33,15	poz.	31,23	32,50	32,31	29,74	poz.	poz.
CoV38322				30,31	neg.				29,04	neg.	neg.
CoV38325	20,08	19,65	23,10		poz.	28,07	28,51	29,07	30,30	poz.	poz.
CoV38335	30,63	31,91	32,28	30,25	poz.	31,16	31,92	32,28	29,09	poz.	poz.
CoV38336				30,72	neg.				30,25	neg.	neg.
CoV38337				31,14	neg.				30,05	neg.	neg.
CoV38338				30,72	neg.				28,74	neg.	neg.
CoV38347		39,44	39,42	32,01	poz.				31,74	neg.	poz.
CoV38357				29,85	neg.	30,70	31,79	32,20	28,74	poz.	poz.
CoV38358	20,01	20,61	22,11		poz.	23,60	24,06	25,27	32,73	poz.	poz.
CoV38362	38,49		38,50	32,56	poz.	33,08	34,13	35,17	31,12	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV38363				33,04	neg.				31,74	neg.	neg.
CoV38366				30,17	neg.				29,48	neg.	neg.
CoV38474				29,83	neg.				29,34	neg.	neg.
CoV38482	21,04	22,00	22,78	40,27	poz.	23,34	24,06	24,18	40,43	poz.	poz.
CoV38489				32,18	neg.				32,34	neg.	neg.
CoV38586	32,62	33,07	32,54	30,56	poz.	30,32	31,20	31,55	30,39	poz.	poz.
CoV38594				30,30	neg.				30,11	neg.	neg.
CoV38604				29,96	neg.				29,26	neg.	neg.
CoV38634				30,02	neg.				29,81	neg.	neg.
CoV38639				29,75	neg.				28,79	neg.	neg.
CoV38666				30,23	neg.				30,00	neg.	neg.
CoV38698				30,07	neg.				29,94	neg.	neg.
CoV38717				30,01	neg.				30,17	neg.	neg.
CoV38724	19,22	19,67	20,75		poz.	28,01	29,08	29,73	30,39	poz.	poz.
CoV38729	32,32	33,54	34,07	30,46	poz.		36,54	37,14	31,60	poz.	poz.
CoV38908	36,18	39,37	36,19	29,62	poz.	34,96	35,13	35,12	29,19	poz.	poz.
CoV38913				30,11	neg.				30,40	neg.	neg.
CoV38929				29,85	neg.				30,16	neg.	neg.
CoV38930	23,62	24,51	25,45	34,35	poz.	27,88	28,48	29,30	29,91	poz.	poz.
CoV38935	28,67	29,73	30,13	32,62	poz.	38,31	36,30		31,45	poz.	poz.
CoV38943	30,16	31,27	31,59	29,66	poz.	30,71	31,29	32,10	30,54	poz.	poz.
CoV38944	31,14	31,67	32,53	30,18	poz.	33,41	33,93	34,38	30,40	poz.	poz.
CoV38946				30,57	neg.				31,21	neg.	neg.
CoV38949				29,93	neg.				29,72	neg.	neg.
CoV38950				30,24	neg.				30,57	neg.	neg.
CoV38956	36,42	38,15	37,46	32,25	poz.	33,25	34,81	34,86	29,30	poz.	poz.
CoV38959	25,86	27,10	27,54	31,67	poz.	29,02	30,18	30,48	30,37	poz.	poz.
CoV38981	34,93	36,63	36,41	30,24	poz.				29,81	neg.	poz.
CoV38987	24,73	25,44	26,38	29,80	poz.	28,40	29,26	29,80	29,19	poz.	poz.
CoV38988				30,38	neg.				29,55	neg.	neg.
CoV39269	35,68	36,16	36,95	31,09	poz.				28,59	neg.	poz.
CoV39278	34,02	33,78	35,27	30,38	poz.	37,40	37,58	36,73	29,49	poz.	poz.
CoV39288				30,48	neg.				30,20	neg.	neg.
CoV39290				30,28	neg.				30,18	neg.	neg.
CoV39291				31,04	neg.				29,61	neg.	neg.
CoV39300				31,19	neg.				29,68	neg.	neg.
CoV39302				30,49	neg.				30,06	neg.	neg.
CoV39314				30,61	neg.				30,08	neg.	neg.
CoV39322				30,79	neg.				29,65	neg.	neg.
CoV39323	26,12	27,02	26,99	30,22	poz.	33,27	34,30	34,58	30,16	poz.	poz.
CoV39326	28,53	28,93	28,80	30,52	poz.	38,14	39,72	38,02	29,88	poz.	poz.
CoV39329				29,78	neg.				29,56	neg.	neg.
CoV39330	29,43	30,23	29,77	30,65	poz.	33,15	34,01	34,65	30,37	poz.	poz.
CoV39332				30,44	neg.				30,20	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV39333				30,73	neg.	38,85	36,72	40,30	29,65	poz.	poz.
CoV39335	35,14	36,01	36,77	30,61	poz.				30,11	neg.	poz.
CoV39341				30,33	neg.				29,73	neg.	neg.
CoV39342	26,05	26,76	27,67	30,67	poz.	36,40	37,24	37,03	29,91	poz.	poz.
CoV39348				30,72	neg.				28,44	neg.	neg.
CoV39365				30,25	neg.				30,32	neg.	neg.
CoV39379				31,66	neg.				30,30	neg.	neg.
CoV39384				31,68	neg.				29,96	neg.	neg.
CoV39388	31,78	32,33	32,31	29,63	poz.	35,16	35,19	35,51	30,01	poz.	poz.
CoV39389				31,73	neg.				30,18	neg.	neg.
CoV39390				30,10	neg.				29,80	neg.	neg.
CoV39392	29,09	28,69	29,28	30,77	poz.	31,43	32,11	32,69	30,01	poz.	poz.
CoV39397				34,06	neg.				29,63	neg.	neg.
CoV39399				31,52	neg.				30,35	neg.	neg.
CoV39401				31,17	neg.				29,58	neg.	neg.
CoV39992				33,39	neg.				30,24	neg.	neg.
CoV39993				32,97	neg.				31,76	neg.	neg.
CoV39994				31,76	neg.				30,72	neg.	neg.
CoV39995				32,40	neg.				31,99	neg.	neg.
CoV39997				32,75	neg.				32,13	neg.	neg.
CoV39999	25,88	25,81	26,27	30,02	poz.	36,75	38,11	39,48	29,45	poz.	poz.
CoV40002				31,86	neg.				31,11	neg.	neg.
CoV40003				32,58	neg.				30,16	neg.	neg.
CoV40007				32,02	neg.				30,89	neg.	neg.
CoV40008				32,95	neg.				31,75	neg.	neg.
CoV40011				33,50	neg.				31,47	neg.	neg.
CoV40012				32,46	neg.				31,59	neg.	neg.
CoV40014	33,08	33,76	34,66	31,79	poz.				30,84	neg.	poz.
CoV40018				29,80	neg.				32,25	neg.	neg.
CoV40020	30,33	31,45	31,89	32,68	poz.	32,04	33,19	33,21	31,49	poz.	poz.
CoV40021				32,08	neg.		37,45	38,54	28,55	poz.	poz.
CoV40024	23,04	23,85	24,46	34,53	poz.	33,78	34,12	35,16	32,11	poz.	poz.
CoV40026				31,40	neg.				31,83	neg.	neg.
CoV40027				32,47	neg.				32,34	neg.	neg.
CoV40028				32,76	neg.				31,67	neg.	neg.
CoV40044	22,13	23,05	23,78	33,12	poz.	31,12	31,77	32,96	31,91	poz.	poz.
CoV40045	29,57	30,43	31,03	30,23	poz.	35,26	36,85	37,33	32,07	poz.	poz.
CoV40048				31,30	neg.				31,10	neg.	neg.
CoV40049				32,31	neg.				29,95	neg.	neg.
CoV40054				31,24	neg.				32,09	neg.	neg.
CoV40064	26,86	27,60	28,30	31,52	poz.	32,19	33,32	34,10	33,03	poz.	poz.
CoV40065	29,36	30,15	30,21	31,40	poz.	28,53	29,45	29,82	31,85	poz.	poz.
CoV40066	31,75	32,42	33,02	32,44	poz.	33,95	34,89	35,82	32,55	poz.	poz.
CoV40073	22,37	22,01	24,60	36,32	poz.	29,20	30,13	30,51	31,74	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV40077				30,08	neg.	38,35	38,76	39,52	32,40	poz.	poz.
CoV40082				29,72	neg.				29,53	neg.	neg.
CoV40083	25,97	25,67	26,46	30,34	poz.	37,07	37,07	36,49	30,11	poz.	poz.
CoV40084	28,15	29,24	30,65	28,74	poz.	35,67	37,02	37,07	29,49	poz.	poz.
CoV40086				30,04	neg.				29,37	neg.	neg.
CoV40092				30,12	neg.				29,67	neg.	neg.
CoV40099				29,53	neg.				29,73	neg.	neg.
CoV40105	38,31	37,03	38,34	30,28	poz.				30,00	neg.	poz.
CoV40134				30,23	neg.				30,38	neg.	neg.
CoV40137				29,69	neg.				29,69	neg.	neg.
CoV40139				30,63	neg.				29,99	neg.	neg.
CoV40147				30,84	neg.				29,32	neg.	neg.
CoV40154	22,39	23,48	25,00	23,83	poz.	27,00	28,37	29,60	27,94	poz.	poz.
CoV40161	22,51	23,51	25,31	23,85	poz.	31,89	33,11	34,59	29,45	poz.	poz.
CoV40168				29,99	neg.				29,64	neg.	neg.
CoV40180				29,71	neg.				29,40	neg.	neg.
CoV40194	28,81	29,75	31,35	29,33	poz.	33,62	34,63	35,69	29,45	poz.	poz.
CoV40223	29,75	30,39	32,21	29,45	poz.	31,00	32,30	33,32	29,23	poz.	poz.
CoV40224	19,68	20,87	21,81	20,90	poz.	29,16	30,23	31,89	28,91	poz.	poz.
CoV40226	26,70	27,49	29,72	27,77	poz.	33,57	34,62	35,83	29,35	poz.	poz.
CoV40229	27,19	28,09	29,24	27,99	poz.	34,89	35,84	36,81	29,00	poz.	poz.
CoV40232	22,02	23,06	24,74	23,48	poz.	33,95	34,98	35,81	29,43	poz.	poz.
Cov40235				29,48	neg.				29,39	neg.	neg.
CoV40244	23,34	24,46	25,88	24,66	poz.	28,79	30,25	31,26	28,70	poz.	poz.
CoV40245				29,64	neg.				29,34	neg.	neg.
CoV40247	23,66	24,55	25,86	25,34	poz.	33,06	33,89	36,12	29,16	poz.	poz.
CoV40248				29,86	neg.				29,64	neg.	neg.
CoV40251	37,27		39,67	29,72	poz.				29,68	neg.	poz.
CoV40257				29,29	neg.				29,68	neg.	neg.
CoV40259				31,42	neg.				29,45	neg.	neg.
CoV40260				29,79	neg.				29,38	neg.	neg.
CoV40262	22,80	23,74	25,61	24,34	poz.	25,87	26,78	28,95	27,30	poz.	poz.
CoV40267	23,56	24,62	26,87	25,41	poz.	36,85	37,69	40,31	29,81	poz.	poz.
CoV40270	21,16	22,00	24,16	22,56	poz.	22,15	23,28	24,65	23,49	poz.	poz.
CoV40271	26,93	27,92	28,93	27,65	poz.	32,94	34,41	35,40	29,29	poz.	poz.
CoV40274				29,61	neg.				28,88	neg.	neg.
CoV40294				30,23	neg.				29,66	neg.	neg.
CoV40295				30,20	neg.				28,96	neg.	neg.
CoV40296				30,15	neg.				29,52	neg.	neg.
CoV40297				29,59	neg.				29,74	neg.	neg.
CoV40299	22,88	23,77	25,74	24,62	poz.	27,19	28,04	30,43	27,91	poz.	poz.
CoV40301	25,69	26,53	28,89	27,31	poz.	27,22	28,25	30,18	27,81	poz.	poz.
CoV40312	21,29	22,35	24,33	22,65	poz.	32,69	33,76	35,66	29,13	poz.	poz.
CoV40314				30,11	neg.				28,83	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV40322				30,26	neg.				29,29	neg.	neg.
CoV40324				30,12	neg.				29,52	neg.	neg.
CoV40330				29,64	neg.				29,51	neg.	neg.
CoV40333				29,79	neg.				30,17	neg.	neg.
CoV40334	25,40	26,29	26,67	29,84	poz.	28,18	29,17	29,48	30,53	poz.	poz.
CoV40339	30,94	32,28	31,81	30,02	poz.	29,92	31,24	31,15	29,56	poz.	poz.
CoV40344	25,14	25,95	26,26	29,84	poz.	35,88	40,08	38,39	30,44	poz.	poz.
CoV40529				30,66	neg.				30,30	neg.	neg.
CoV40532	23,89	25,22	24,43	30,02	poz.	35,10	37,05	36,09	30,31	poz.	poz.
CoV40542	35,78	37,63	36,98	30,34	poz.	36,33	38,03	38,22	30,11	poz.	poz.
CoV40544				30,19	neg.	32,53	33,62	33,67	29,62	poz.	poz.
CoV40558				31,15	neg.				29,81	neg.	neg.
CoV40559				30,35	neg.				29,58	neg.	neg.
CoV40561				30,83	neg.				30,63	neg.	neg.
CoV40563				30,62	neg.	36,78		39,59	29,82	poz.	poz.
CoV40568	27,49	28,89	28,24	30,36	poz.	34,68	36,23	36,14	29,31	poz.	poz.
CoV40569				29,78	neg.				29,74	neg.	neg.
CoV40573	26,06	27,51	27,27	29,51	poz.	35,10	36,55	36,34	29,21	poz.	poz.
CoV40584				30,47	neg.				30,44	neg.	neg.
CoV40585				30,04	neg.				30,03	neg.	neg.
CoV40595	25,09	26,24	25,97	29,83	poz.	28,48	29,20	29,17	30,01	poz.	poz.
CoV40610	25,07	26,13	26,38	29,78	poz.				29,53	neg.	poz.
CoV40616				30,19	neg.				29,65	neg.	neg.
CoV40617				30,28	neg.				30,36	neg.	neg.
CoV40618	26,26	27,64	27,50	29,93	poz.	30,49	31,99	31,74	29,38	poz.	poz.
CoV40619	37,96	36,18	38,80	30,09	poz.	38,04	37,70	37,83	29,33	poz.	poz.
CoV40629				30,28	neg.				31,14	neg.	neg.
CoV40630	31,51	32,87	33,14	30,35	poz.	31,03	32,05	32,18	29,20	poz.	poz.
CoV40632	23,03	23,95	24,30	30,04	poz.	28,21	29,35	29,45	29,60	poz.	poz.
CoV40636	37,63	36,35	37,26	30,52	poz.				29,19	neg.	poz.
CoV40640				29,83	neg.				30,85	neg.	neg.
CoV40643	35,05	37,61	36,32	30,24	poz.	38,35	39,57	37,58	29,38	poz.	poz.
CoV40644				30,39	neg.				30,09	neg.	neg.
CoV40651				30,10	neg.				29,79	neg.	neg.
CoV40669	19,38	20,54	21,00	37,05	poz.	29,40	30,68	30,83	29,17	poz.	poz.
CoV40674	26,16	27,22	27,14	29,91	poz.	34,92	35,59	35,79	30,19	poz.	poz.
CoV40679	32,61	34,02	34,53	30,31	poz.	34,97	35,62	35,52	29,92	poz.	poz.
CoV40681				30,15	neg.				30,86	neg.	neg.
CoV40683				30,16	neg.				31,05	neg.	neg.
CoV40691				30,29	neg.				30,22	neg.	neg.
CoV40692				30,04	neg.				30,37	neg.	neg.
CoV40695				30,25	neg.				29,97	neg.	neg.
CoV40705	21,63	23,05	22,86	31,82	poz.	23,74	24,94	24,82	30,78	poz.	poz.
CoV40707				30,27	neg.				29,98	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>NPS</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>GARG</i>	souhrnný
CoV40708	27,12	28,18	28,27	30,17	poz.	31,90	32,27	31,80	30,48	poz.	poz.
CoV40712				30,12	neg.				29,97	neg.	neg.
CoV40724				30,39	neg.				30,07	neg.	neg.
CoV40735	34,26	35,35	35,42	30,00	poz.	34,57	35,43	35,23	29,64	poz.	poz.
CoV40739	23,98	25,54	25,04	29,69	poz.	28,29	29,83	29,11	30,13	poz.	poz.
CoV40745				29,78	neg.				29,08	neg.	neg.
CoV40747				29,75	neg.				29,68	neg.	neg.
CoV40768	28,66	28,31	30,16	28,60	poz.	35,32	34,27	36,58	28,71	poz.	poz.
CoV40771				29,97	neg.				29,62	neg.	neg.
CoV40772	20,89	20,47	23,10	22,30	poz.	27,71	26,54	28,67	27,85	poz.	poz.
CoV40780	23,38	22,52	25,73	24,64	poz.	29,98	28,46	31,43	29,23	poz.	poz.
CoV40783	29,71	28,72	31,27	28,85	poz.	36,67	38,32	38,51	29,70	poz.	poz.
CoV40784				29,82	neg.				29,61	neg.	neg.
CoV40795				29,73	neg.				29,36	neg.	neg.
CoV40806	24,20	23,75	26,34	25,58	poz.	27,48	26,61	28,86	27,88	poz.	poz.
CoV40810	35,24	34,95	36,56	30,35	poz.	28,41	27,33	29,57	28,84	poz.	poz.
CoV40811				29,58	neg.				28,85	neg.	neg.
CoV40812				29,55	neg.				28,75	neg.	neg.
CoV40820	25,46	24,60	26,37	29,31	poz.	36,54	37,08	37,38	29,54	poz.	poz.
CoV40825	27,07	26,29	29,99	27,54	poz.	25,54	24,33	28,54	26,68	poz.	poz.
CoV40832	22,93	21,97	24,95	24,53	poz.	25,79	24,98	27,58	26,71	poz.	poz.
CoV40836	17,44	16,32	20,86	19,61	poz.	35,84	34,47	38,87	28,58	poz.	poz.
CoV40837	18,23	16,97	21,72	20,21	poz.	30,83	29,65	32,38	29,61	poz.	poz.
CoV40840	16,25	15,25	19,21	18,23	poz.	29,43	28,31	30,75	28,37	poz.	poz.
CoV40845	16,27	15,09	19,54	18,31	poz.	31,53	30,51	33,43	28,61	poz.	poz.
CoV40846	17,05	15,80	19,92	19,28	poz.	26,12	24,75	27,29	26,59	poz.	poz.
CoV40847	16,35	14,94	19,99	18,64	poz.	26,08	24,76	27,71	27,27	poz.	poz.
CoV40858				29,61	neg.	33,62	32,78	34,76	29,20	poz.	poz.
CoV40861				29,38	neg.				28,74	neg.	neg.
CoV40862	34,06	34,10	34,13	29,45	poz.	38,06		39,72	29,32	poz.	poz.
CoV40878	21,88	20,84	23,87	23,62	poz.	34,86	33,34	36,79	28,73	poz.	poz.
CoV40886	18,38	17,61	19,97	19,97	poz.	24,72	23,87	26,76	25,80	poz.	poz.
CoV40896				29,37	neg.				28,84	neg.	neg.
CoV40932	21,32	20,70	23,30	22,72	poz.	22,99	22,24	24,45	24,46	poz.	poz.
CoV40934	23,40	22,79	25,39	24,77	poz.	25,78	23,84	27,29	26,74	poz.	poz.
CoV40935	18,63	17,68	20,40	20,22	poz.	30,51	29,97	31,87	29,00	poz.	poz.
CoV40938				29,77	neg.				29,27	neg.	neg.
CoV40941	23,27	22,61	24,77	24,51	poz.	32,81	31,75	33,71	28,97	poz.	poz.
CoV40951	24,29	23,65	25,85	25,61	poz.	29,89	28,56	31,43	28,39	poz.	poz.
CoV40963	30,22	29,55	31,76	29,00	poz.	28,23	27,63	29,97	27,96	poz.	poz.
CoV40965	24,15	22,46	25,57	25,49	poz.	29,98	29,39	31,40	28,74	poz.	poz.
CoV40972	25,46	24,54	27,78	26,82	poz.	27,59	26,61	29,50	27,93	poz.	poz.
CoV40974	33,52	32,70	35,32	29,28	poz.				29,22	neg.	poz.
CoV40976	35,21	35,08	35,41	30,37	poz.	39,74	37,72	39,17	29,57	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV40987				29,46	neg.				29,12	neg.	neg.
CoV40994				29,44	neg.				29,18	neg.	neg.
CoV40999	35,38	34,68	35,72	29,88	poz.	38,06	36,42		29,32	poz.	poz.
CoV41000	25,24	24,41	26,93	26,43	poz.	31,80	30,57	33,37	28,73	poz.	poz.
CoV41394				31,39	neg.				30,82	neg.	neg.
CoV41395	29,68	30,23	30,94	31,50	poz.	26,25	26,68	27,24	31,05	poz.	poz.
CoV41398				29,50	neg.				30,41	neg.	neg.
CoV41402	33,26	32,81	34,27	31,35	poz.	29,83	30,32	31,19	31,23	poz.	poz.
CoV41408	29,98	30,24	30,54	31,59	poz.				31,30	neg.	poz.
CoV41420	21,34	21,33	22,15	31,58	poz.	39,15	38,05		29,86	poz.	poz.
CoV41423				29,87	neg.				29,56	neg.	neg.
CoV41430				28,95	neg.				28,89	neg.	neg.
CoV41439				31,64	neg.				31,41	neg.	neg.
CoV41446				31,88	neg.				31,10	neg.	neg.
CoV41456				32,48	neg.				31,00	neg.	neg.
CoV41459				31,75	neg.				30,76	neg.	neg.
CoV41461				31,61	neg.				31,04	neg.	neg.
CoV41474				32,17	neg.				31,11	neg.	neg.
CoV41481	25,67	25,97	26,12	30,20	poz.	37,68	37,87	37,33	29,57	poz.	poz.
CoV41487				32,29	neg.				31,07	neg.	neg.
CoV41494	28,61	28,59	29,40	31,59	poz.	32,92	32,98	33,43	31,20	poz.	poz.
CoV41495	31,36	31,72	31,81	30,99	poz.	31,43	31,98	32,11	31,24	poz.	poz.
CoV41499				31,11	neg.				31,04	neg.	neg.
CoV41504				30,76	neg.				31,15	neg.	neg.
CoV41525				31,42	neg.				31,11	neg.	neg.
CoV41528	31,03	31,18	31,57	31,33	poz.				30,56	neg.	poz.
CoV41531				31,54	neg.				31,62	neg.	neg.
CoV41533	35,80	35,50	35,78	31,38	poz.	38,85	38,86	37,11	31,31	poz.	poz.
CoV41534	25,77	25,69	27,21	31,20	poz.	39,13		40,17	31,70	poz.	poz.
CoV41568				31,58	neg.				31,28	neg.	neg.
CoV41833				31,72	neg.				31,10	neg.	neg.
CoV41834				31,16	neg.				30,77	neg.	neg.
CoV41838				31,56	neg.				30,90	neg.	neg.
CoV41840				31,70	neg.				31,01	neg.	neg.
CoV41844	21,62	21,57	22,72	33,52	poz.	28,72	28,79	29,80	31,03	poz.	poz.
CoV41853	24,80	25,24	25,71	31,89	poz.	19,79	20,07	20,63	36,77	poz.	poz.
CoV41858	19,37	19,39	20,28		poz.	28,23	28,48	29,33	31,01	poz.	poz.
CoV41867	26,01	26,44	27,14	31,26	poz.	32,12	32,47	33,41	31,11	poz.	poz.
CoV41875	23,30	23,25	24,51	33,01	poz.	26,63	26,64	27,72	30,64	poz.	poz.
CoV41878				31,02	neg.				30,76	neg.	neg.
CoV41947	19,30	19,61	20,45		poz.	30,20	30,90	31,16	31,10	poz.	poz.
CoV41948				30,96	neg.				30,79	neg.	neg.
CoV41950	23,88	24,08	24,62	33,09	poz.	28,51	28,56	29,27	31,42	poz.	poz.
CoV41971				32,28	neg.				31,36	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV41979				31,63	neg.				30,75	neg.	neg.
CoV41980	31,99	32,19	32,76	31,68	poz.	38,81	38,48	39,50	31,52	poz.	poz.
CoV41983	34,04	35,59	34,76	32,05	poz.	36,15	37,57	36,80	31,13	poz.	poz.
CoV41988				31,60	neg.				31,84	neg.	neg.
CoV41989	27,37	27,15	27,87	31,23	poz.	34,21	34,10	35,15	31,79	poz.	poz.
CoV42005	32,10	32,76	33,28	31,30	poz.	29,04	29,73	30,24	31,03	poz.	poz.
CoV42014	25,80	26,16	26,28	32,21	poz.	29,69	29,50	30,57	31,73	poz.	poz.
CoV42019	23,44	23,74	24,30	32,58	poz.	26,40	26,73	27,46	30,97	poz.	poz.
CoV42020	33,70	34,18	33,72	29,47	poz.	38,07	38,55	39,65	29,10	poz.	poz.
CoV42022	28,10	29,64	30,45	29,17	poz.	29,23	30,84	31,47	29,17	poz.	poz.
CoV43912	23,90	25,55	26,55	26,20	poz.	23,97	25,72	26,85	26,64	poz.	poz.
CoV43913				29,88	neg.				29,25	neg.	neg.
CoV43914	27,12	28,78	29,82	28,56	poz.	32,03	33,90	33,92	29,73	poz.	poz.
CoV43915	21,64	23,36	24,77	24,30	poz.	26,91	28,67	30,13	28,66	poz.	poz.
CoV43916				29,47	neg.				29,49	neg.	neg.
CoV43917	24,94	26,81	26,92	26,84	poz.	30,92	33,01	32,72	29,60	poz.	poz.
CoV43918				30,50	neg.				29,76	neg.	neg.
CoV43920	32,33	34,23	33,69	30,34	poz.	33,86	35,20	35,09	30,17	poz.	poz.
CoV43921				30,46	neg.				29,96	neg.	neg.
CoV43922				30,27	neg.				28,99	neg.	neg.
CoV43923				30,02	neg.				29,34	neg.	neg.
CoV43924				30,30	neg.				29,91	neg.	neg.
CoV43925	31,80	33,78	33,99	29,91	poz.	35,51		37,16	29,71	poz.	poz.
CoV43926				29,28	neg.				29,46	neg.	neg.
CoV43927	18,97	20,75	21,70	21,85	poz.	26,49	28,27	28,98	28,36	poz.	poz.
CoV43975				30,12	neg.				29,48	neg.	neg.
CoV43977				30,62	neg.				29,55	neg.	neg.
CoV43984	18,12	19,75	20,81	20,89	poz.	22,89	24,53	26,17	25,77	poz.	poz.
CoV43987	25,88	27,74	28,70	28,13	poz.	31,41	32,87	33,65	29,21	poz.	poz.
CoV43992	20,69	22,69	23,45	23,78	poz.	30,93	32,97	33,23	29,06	poz.	poz.
CoV44060				29,44	neg.				30,00	neg.	neg.
CoV44080	25,84	27,65	28,65	28,25	poz.	29,41	31,27	31,90	29,16	poz.	poz.
CoV44166	22,69	24,51	25,71	25,67	poz.	29,36	30,98	31,65	29,09	poz.	poz.
CoV44324	18,11	19,80	20,91	20,95	poz.	31,55	33,05	34,70	29,49	poz.	poz.
CoV44325				30,20	neg.				30,54	neg.	neg.
CoV44328	28,75	30,92	30,68	29,36	poz.	29,95	31,33	32,18	29,47	poz.	poz.
CoV44329	25,52	27,43	28,48	27,93	poz.				29,42	neg.	poz.
CoV44330				29,84	neg.				28,87	neg.	neg.
CoV44341				31,18	neg.				29,75	neg.	neg.
CoV44347				30,13	neg.				29,74	neg.	neg.
CoV44352				29,44	neg.				29,78	neg.	neg.
CoV44353				29,92	neg.				29,48	neg.	neg.
CoV44357				29,64	neg.				28,96	neg.	neg.
CoV44359				29,80	neg.				30,70	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV44382				29,96	neg.				29,80	neg.	neg.
CoV44389				29,26	neg.				29,58	neg.	neg.
CoV44396	23,73	25,58	26,19	26,09	poz.	27,43	29,23	29,83	28,70	poz.	poz.
CoV44400				30,32	neg.				28,93	neg.	neg.
CoV44404				29,93	neg.				29,32	neg.	neg.
CoV44665	27,70	29,23	30,81	29,62	poz.	27,81	29,13	30,95	29,21	poz.	poz.
CoV44686	27,89	29,68	30,53	29,47	poz.	29,50	31,09	32,25	28,77	poz.	poz.
CoV44692	32,48	33,90	34,83	30,33	poz.	33,43	35,08	36,51	29,76	poz.	poz.
CoV44696				30,48	neg.				29,66	neg.	neg.
CoV44704	23,04	24,62	25,56	25,64	poz.	30,47	31,98	32,71	29,48	poz.	poz.
CoV49214				29,27	neg.				31,76	neg.	neg.
CoV49215				29,30	neg.				30,08	neg.	neg.
CoV49216	23,92	24,80	25,87	24,21	poz.	36,19	36,60	37,39	30,67	poz.	poz.
CoV49217	34,02	35,58	35,77	29,38	poz.	36,86	36,33		30,46	poz.	poz.
CoV49218	36,89	38,79	37,62	29,66	poz.	33,35	33,76	35,85	30,56	poz.	poz.
CoV49219	35,80	38,94	38,66	28,44	poz.	37,56	37,18		30,58	poz.	poz.
CoV49220				29,00	neg.				30,26	neg.	neg.
CoV49221				29,24	neg.				31,65	neg.	neg.
CoV49222				28,94	neg.				30,12	neg.	neg.
CoV49224				29,72	neg.				30,99	neg.	neg.
CoV49225				30,12	neg.				30,98	neg.	neg.
CoV49226	34,85	36,28	37,14	29,32	poz.	34,60	36,21	38,27	31,03	poz.	poz.
CoV49228	17,90	18,42	19,69	18,74	poz.	29,44	29,71	31,76	30,49	poz.	poz.
CoV49229				29,79	neg.				30,37	neg.	neg.
CoV49230	29,95	31,03	30,87	28,93	poz.	32,30	32,42	34,00	31,04	poz.	poz.
CoV49231	33,70	34,98	34,97	30,39	poz.	37,39	35,65	38,62	31,39	poz.	poz.
CoV49232				29,53	neg.				30,45	neg.	neg.
CoV49233	32,80	34,13	34,37	29,22	poz.	36,97	36,61	39,63	31,55	poz.	poz.
CoV49234	27,10	27,90	28,85	27,02	poz.	33,97	34,67	36,89	30,75	poz.	poz.
CoV49235				29,34	neg.				30,01	neg.	neg.
CoV49236	31,97	32,99	34,00	29,30	poz.	29,32	29,81	31,70	29,52	poz.	poz.
CoV49237	31,97	32,96	33,84	29,27	poz.	34,17	34,77	36,23	30,00	poz.	poz.
CoV49238	16,79	17,50	19,46	18,22	poz.	23,70	23,94	26,24	25,89	poz.	poz.
CoV49240				29,31	neg.				30,74	neg.	neg.
CoV49241	29,31	30,20	31,37	28,45	poz.	30,45	30,75	33,00	30,44	poz.	poz.
CoV49242				29,93	neg.				30,93	neg.	neg.
CoV49243				28,88	neg.				30,60	neg.	neg.
CoV49277				30,25	neg.				30,73	neg.	neg.
CoV49298				30,56	neg.				30,62	neg.	neg.
CoV49302				29,77	neg.				30,76	neg.	neg.
CoV49304	27,12	28,60	28,69	26,92	poz.	37,22	36,68	37,78	29,91	poz.	poz.
CoV49305				29,48	neg.				31,94	neg.	neg.
CoV49306				29,88	neg.				30,87	neg.	neg.
CoV49320	22,55	23,33	24,21	23,14	poz.	28,84	28,92	30,99	29,95	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV49335				28,65	neg.				30,55	neg.	neg.
CoV49343				28,59	neg.				30,29	neg.	neg.
CoV49426	28,53	29,43	29,32	27,89	poz.	32,12	32,72	33,81	31,26	poz.	poz.
CoV49427				28,91	neg.				29,81	neg.	neg.
CoV49428				28,58	neg.				29,99	neg.	neg.
CoV49432				28,99	neg.				31,34	neg.	neg.
CoV49436	35,78	36,45	35,38	28,98	poz.				31,30	neg.	poz.
CoV49437				30,85	neg.				30,67	neg.	neg.
CoV49438				28,54	neg.				31,69	neg.	neg.
CoV49439	30,93	32,24	32,16	28,59	poz.	31,58	32,31	34,36	30,55	poz.	poz.
CoV49440				28,92	neg.				31,27	neg.	neg.
CoV49443	30,61	31,51	31,77	28,42	poz.	29,30	29,68	31,32	29,58	poz.	poz.
CoV49444				28,85	neg.				30,38	neg.	neg.
CoV49836	27,80	28,25	30,14	28,33	poz.	32,61	33,44	34,35	30,94	poz.	poz.
CoV49837	17,27	17,52	20,36	18,64	poz.	27,92	28,58	30,34	29,21	poz.	poz.
CoV49838				29,37	neg.				30,36	neg.	neg.
CoV49839				29,42	neg.				30,34	neg.	neg.
CoV49840				28,61	neg.				30,67	neg.	neg.
CoV49841	30,85	31,45	33,40	28,96	poz.	35,24	35,48	37,52	30,65	poz.	poz.
CoV49849			41,13	29,33	neg.				30,15	neg.	neg.
CoV50659	30,27	34,91	31,19	28,55	poz.	34,17	34,97	36,11	30,77	poz.	poz.
CoV50660				29,08	neg.				30,57	neg.	neg.
CoV50661	26,30	27,29	28,73	26,75	poz.	28,93	29,52	31,51	29,89	poz.	poz.
CoV50662	35,43	36,72	36,63	29,52	poz.	37,60	40,44		30,61	poz.	poz.
CoV50663	26,69	29,30	28,57	26,45	poz.	28,45	28,88	30,66	29,46	poz.	poz.
CoV50664				28,88	neg.				32,07	neg.	neg.
CoV50665				29,69	neg.				30,70	neg.	neg.
CoV50666				29,29	neg.				30,95	neg.	neg.
CoV50667	28,82	31,65	29,71	27,94	poz.	38,58	38,33	38,59	30,00	poz.	poz.
CoV50668				28,94	neg.				30,04	neg.	neg.
CoV50669	36,83	38,28	38,74	29,50	poz.				30,72	neg.	poz.
CoV50673				29,94	neg.				30,51	neg.	neg.
CoV50674				29,65	neg.				29,66	neg.	neg.
CoV50675				29,31	neg.				30,29	neg.	neg.
CoV50676				29,66	neg.				30,37	neg.	neg.
CoV50677	35,08	36,27	36,83	30,92	poz.				30,22	neg.	poz.
CoV50678				29,85	neg.				30,45	neg.	neg.
CoV50679				29,40	neg.				30,52	neg.	neg.
CoV50680				28,99	neg.				31,16	neg.	neg.
CoV50681				30,21	neg.				29,79	neg.	neg.
CoV50682				29,84	neg.				29,95	neg.	neg.
CoV50683	33,24	40,28	33,74	29,41	poz.	35,45	36,71	36,92	30,92	poz.	poz.
CoV50685				30,92	neg.				31,21	neg.	neg.
CoV50686				30,06	neg.				29,98	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV50687				30,61	neg.	33,19	33,47	35,51	29,94	poz.	poz.
CoV50688	29,57	30,97	31,13	28,87	poz.	24,40	24,78	26,73	26,62	poz.	poz.
CoV50689	38,18			32,72	neg.	30,65	30,90	33,40	30,23	poz.	poz.
CoV50690	31,25	32,35	33,18	29,49	poz.	28,86	29,56	31,44	29,65	poz.	poz.
CoV50691	25,13	27,25	27,16	25,37	poz.	28,87	29,43	31,41	29,66	poz.	poz.
CoV50692				30,18	neg.				30,29	neg.	neg.
CoV50693	24,51	25,38	26,55	25,23	poz.	32,54	33,26	34,46	30,60	poz.	poz.
CoV50694				29,58	neg.				29,97	neg.	neg.
CoV50695			41,79	29,25	neg.	27,63	27,80	30,44	28,86	poz.	poz.
CoV50697	37,10	36,79	38,45	28,75	poz.	35,88	35,88	37,43	30,30	poz.	poz.
CoV50698				29,69	neg.				30,44	neg.	neg.
CoV50743				30,39	neg.				30,72	neg.	neg.
CoV50745				31,28	neg.				29,74	neg.	neg.
CoV50746				29,84	neg.				30,13	neg.	neg.
CoV50752	36,52	37,93	39,91	28,94	poz.	34,33	35,06	36,09	30,07	poz.	poz.
CoV50753				29,79	neg.				30,88	neg.	neg.
CoV50764	33,05	33,91	35,33	27,64	poz.	34,26	35,46	35,70	30,72	poz.	poz.
CoV50922				32,33	neg.				30,23	neg.	neg.
CoV50923				27,80	neg.				30,29	neg.	neg.
CoV50924	38,75			27,82	neg.	38,67		39,76	30,77	poz.	poz.
CoV50925				28,28	neg.				30,74	neg.	neg.
CoV50926	26,70	27,85	29,29	26,29	poz.	26,98	27,91	28,39	31,52	poz.	poz.
CoV50927				27,47	neg.				31,08	neg.	neg.
CoV50928				27,68	neg.				30,52	neg.	neg.
CoV50929	32,88	34,40	34,60	27,65	poz.	33,55	34,16	34,54	31,30	poz.	poz.
CoV50930				27,73	neg.				32,03	neg.	neg.
CoV50931				27,69	neg.				31,30	neg.	neg.
CoV50932				27,61	neg.				32,66	neg.	neg.
CoV50934	28,20	28,94	31,43	26,99	poz.	34,44	36,90	36,41	31,42	poz.	poz.
CoV50935				27,59	neg.				30,69	neg.	neg.
CoV50936	24,89	25,27	27,80	25,51	poz.	37,03	36,69	37,56	31,73	poz.	poz.
CoV50937				27,64	neg.				31,34	neg.	neg.
CoV50938				27,51	neg.				31,05	neg.	neg.
CoV50939				29,82	neg.				30,51	neg.	neg.
CoV50940	28,60	29,76	30,94	27,32	poz.	38,38	39,56	38,83	31,69	poz.	poz.
CoV50941				28,24	neg.				32,19	neg.	neg.
CoV50942	38,38	38,40	38,70	27,96	poz.	36,29	39,12	38,21	31,09	poz.	poz.
CoV50943			38,77	27,90	neg.				31,76	neg.	neg.
CoV50944	30,44	31,44	32,75	27,62	poz.				32,11	neg.	poz.
CoV50945				32,36	neg.				31,19	neg.	neg.
CoV50946				27,60	neg.				31,41	neg.	neg.
CoV50961				28,24	neg.				30,55	neg.	neg.
CoV50664	40,90	42,85		28,88	neg.	39,13	38,49	39,65	31,61	poz.	poz.
CoV50970				28,20	neg.				30,41	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV50999				27,94	neg.				30,44	neg.	neg.
CoV51024	28,61	29,59	30,96	26,79	poz.	32,15	32,73	33,43	31,15	poz.	poz.
CoV51032				27,90	neg.				31,18	neg.	neg.
CoV51034				29,29	neg.				30,73	neg.	neg.
CoV51058				28,15	neg.				31,10	neg.	neg.
CoV51070				35,43	neg.				31,02	neg.	neg.
CoV51081				27,56	neg.				31,26	neg.	neg.
CoV51091				27,61	neg.				31,09	neg.	neg.
CoV51092	18,87	19,82	21,55	19,35	poz.	28,09	29,01	29,21	30,59	poz.	poz.
CoV51194				26,92	neg.				31,00	neg.	neg.
CoV51195				28,17	neg.				31,26	neg.	neg.
CoV51196				26,93	neg.				30,78	neg.	neg.
CoV51197	35,85	36,77	37,34	28,25	poz.	33,22	34,49	35,11	30,66	poz.	poz.
CoV51198	31,99	33,02	34,33	26,75	poz.	32,27	33,43	33,62	30,51	poz.	poz.
CoV51199				27,96	neg.				31,14	neg.	neg.
CoV51200	26,66	27,81	29,06	25,55	poz.	29,12	30,15	30,54	30,66	poz.	poz.
CoV51201	34,81	36,16	37,74	27,35	poz.	37,36	37,46		31,00	poz.	poz.
CoV51202	25,59	26,53	27,84	24,61	poz.	31,04	31,69	31,89	31,59	poz.	poz.
CoV51203	30,90	31,89	32,99	26,90	poz.	36,78	38,40	38,38	31,24	poz.	poz.
CoV51204				28,10	neg.				31,14	neg.	neg.
CoV51205	22,76	23,75	24,95	22,34	poz.	30,59	32,05	31,40	31,18	poz.	poz.
CoV51206	22,54	23,25	25,06	22,33	poz.	33,87	34,89	34,59	31,03	poz.	poz.
CoV51207	27,26	28,07	30,43	25,79	poz.				31,24	neg.	poz.
CoV51208	25,12	25,90	27,39	24,45	poz.	34,09	35,94	35,93	30,52	poz.	poz.
CoV51209	29,87	30,97	32,54	26,64	poz.	33,61	35,02	35,77	30,46	poz.	poz.
CoV51223	37,42	38,33	36,83	27,28	poz.				29,98	neg.	poz.
CoV51229				27,10	neg.				30,71	neg.	neg.
CoV51231				27,31	neg.				31,16	neg.	neg.
CoV51234				26,76	neg.				31,26	neg.	neg.
CoV51246				26,67	neg.				31,03	neg.	neg.
CoV51250				26,60	neg.				30,25	neg.	neg.
CoV51253	19,93	20,80	22,57	19,70	poz.	33,65	34,28	34,23	30,77	poz.	poz.
CoV51255	30,36	31,19	32,62	26,52	poz.	33,02	33,98	34,53	30,60	poz.	poz.
CoV51259	27,74	28,77	29,72	25,86	poz.	34,02	34,78	34,53	30,64	poz.	poz.
CoV51266				26,73	neg.				29,99	neg.	neg.
CoV51267				26,65	neg.				31,03	neg.	neg.
CoV51269	32,07	33,52	33,78	26,73	poz.	30,34	31,28	31,08	31,20	poz.	poz.
CoV51594				28,95	neg.				31,63	neg.	neg.
CoV51595				28,63	neg.				31,07	neg.	neg.
CoV51596	18,84	19,21	21,42	19,81	poz.	24,89	25,30	26,47	30,11	poz.	poz.
CoV51597				28,63	neg.				30,25	neg.	neg.
CoV51598				28,05	neg.				30,92	neg.	neg.
CoV51599				28,63	neg.				30,01	neg.	neg.
CoV52055	37,43	37,74	39,44	28,84	poz.				32,21	neg.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV52095	28,01	29,16	30,60	27,36	poz.	23,26	24,06	24,83	31,77	poz.	poz.
CoV52111				27,75	neg.				31,15	neg.	neg.
CoV52115				27,79	neg.				31,13	neg.	neg.
CoV52119	26,30	27,35	28,40	26,53	poz.	27,53	28,59	28,62	30,98	poz.	poz.
CoV52134	33,31	34,49	34,52	28,13	poz.	37,26	39,31		30,78	poz.	poz.
CoV52135				27,81	neg.		41,02		30,65	neg.	neg.
CoV52136	24,17	25,23	26,35	24,91	poz.	31,35	32,45	32,33	30,75	poz.	poz.
CoV52137	18,12	19,07	20,64	19,40	poz.	27,30	28,26	28,65	30,80	poz.	poz.
CoV52138				27,73	neg.				30,67	neg.	neg.
CoV52139	31,85	33,90	33,97	27,80	poz.				31,33	neg.	poz.
CoV52140	18,18	19,11	20,75	19,50	poz.	26,26	26,94	27,61	30,56	poz.	poz.
CoV52141				27,94	neg.				30,40	neg.	neg.
CoV52142	28,92	29,61	31,23	27,69	poz.	32,23	33,44	33,42	30,22	poz.	poz.
CoV52143				28,44	neg.				30,31	neg.	neg.
CoV52144	37,35	37,00	37,46	27,37	poz.				31,23	neg.	poz.
CoV52145	25,73	26,87	28,12	26,24	poz.				30,36	neg.	poz.
CoV52146	38,30	38,94	40,43	29,15	poz.				30,12	neg.	poz.
CoV52147	17,90	18,48	20,70	19,86	poz.	27,62	28,39	29,24	31,00	poz.	poz.
CoV45736				28,37	neg.				32,18	neg.	neg.
CoV45737				26,90	neg.				30,72	neg.	neg.
CoV45738				27,85	neg.				31,44	neg.	neg.
CoV45739	20,81	20,14	19,23	31,61	poz.	28,36	28,35	28,39	31,07	poz.	poz.
CoV45740	23,16	22,91	21,95	28,29	poz.	30,15	30,31	30,09	31,22	poz.	poz.
CoV45741				28,06	neg.				30,92	neg.	neg.
CoV46339				30,84	neg.				31,47	neg.	neg.
CoV46340				29,30	neg.				30,80	neg.	neg.
CoV46341	19,82	20,75	22,37	21,47	poz.	29,58	29,36	29,24	31,99	poz.	poz.
CoV46342				30,13	neg.				31,52	neg.	neg.
CoV46343				29,92	neg.	40,18	39,52	37,69	31,29	poz.	poz.
CoV46345	22,94	24,14	25,27	24,17	poz.	31,67	31,50	32,08	31,24	poz.	poz.
CoV46358				29,63	neg.				31,67	neg.	neg.
CoV46369				29,50	neg.				31,15	neg.	neg.
CoV46370				29,59	neg.				30,75	neg.	neg.
CoV46761	33,90	35,47	35,47	28,83	poz.	39,10	38,75	39,46	31,62	poz.	poz.
CoV46765	19,12	20,22	21,08	20,03	poz.				31,15	neg.	poz.
CoV46766	22,98	23,90	25,03	23,92	poz.	36,81	36,10	36,86	31,63	poz.	poz.
CoV46770				28,35	neg.				31,41	neg.	neg.
CoV46775				29,01	neg.				31,35	neg.	neg.
CoV46776	23,76	23,97	24,71	23,79	poz.	31,09	30,84	31,09	31,87	poz.	poz.
CoV46781				28,82	neg.				31,63	neg.	neg.
CoV46782	28,66	28,99	29,54	27,73	poz.	28,72	28,54	29,23	30,39	poz.	poz.
CoV46796	21,28	22,40	24,53	21,56	poz.	23,72	23,39	24,10	34,13	poz.	poz.
CoV46982	22,16	23,31	25,91	22,52	poz.	28,35	27,82	28,83	31,97	poz.	poz.
CoV46988				27,29	neg.				31,30	neg.	neg.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	E	N	ORF	IC	NPS	E	N	ORF	IC	GARG	souhrnný
CoV46991	35,21	38,05	37,36	26,89	poz.				31,57	neg.	poz.
CoV47006	35,92	36,48	36,28	28,96	poz.	33,22	32,73	34,01	30,74	poz.	poz.
CoV47110	22,07	23,35	24,89	22,26	poz.	29,68	29,21	30,25	30,88	poz.	poz.
CoV47115	37,69	38,90	40,08	27,50	poz.				31,16	neg.	poz.
CoV47116				27,29	neg.				30,21	neg.	neg.
CoV47117				27,21	neg.				30,44	neg.	neg.
CoV47118				26,97	neg.				30,34	neg.	neg.
CoV47119				27,37	neg.				31,72	neg.	neg.
CoV47120	27,96	29,48	30,63	26,47	poz.	33,01	33,02	33,07	31,22	poz.	poz.
CoV47121				27,53	neg.				32,04	neg.	neg.
CoV47122				27,45	neg.				31,16	neg.	neg.
CoV47123				28,37	neg.				31,50	neg.	neg.
CoV47125	34,49	35,39	37,59	30,32	poz.	31,72	31,26	32,36	30,88	poz.	poz.
CoV47126	23,41	24,65	26,69	23,41	poz.	38,84	37,35	36,79	31,65	poz.	poz.
CoV47127				27,15	neg.				31,19	neg.	neg.
CoV47128	34,19	37,03	35,12	29,07	poz.	37,04		38,10	31,34	poz.	poz.
CoV47129	33,93	35,21	36,61	27,44	poz.	39,94			31,41	neg.	poz.
CoV47130				27,85	neg.				32,02	neg.	neg.
CoV47131	28,66	29,99	31,99	26,87	poz.	29,50	29,29	30,04	31,82	poz.	poz.
CoV47132				27,41	neg.				31,46	neg.	neg.
CoV47133				27,28	neg.				31,29	neg.	neg.
CoV47134				27,35	neg.				32,19	neg.	neg.
CoV47135				27,82	neg.				31,95	neg.	neg.
CoV47136				28,15	neg.				31,10	neg.	neg.
CoV47137				28,27	neg.				31,50	neg.	neg.
CoV47138				28,27	neg.				31,25	neg.	neg.
CoV47139	23,44	24,35	25,00	23,24	poz.	35,12	35,98	34,90	31,60	poz.	poz.
CoV47141				28,21	neg.				31,35	neg.	neg.
CoV47142				27,74	neg.				31,52	neg.	neg.
CoV47143			38,66	27,97	neg.	34,80	34,97	34,11	31,76	poz.	poz.
CoV47144				27,82	neg.				32,02	neg.	neg.
CoV47154				28,24	neg.				32,91	neg.	neg.
CoV47212	37,91		39,28	27,38	poz.	37,32	36,78	37,30	31,97	poz.	poz.
CoV47214				27,71	neg.				31,51	neg.	neg.
CoV47216				28,40	neg.				31,91	neg.	neg.
CoV47385	24,83	25,78	26,64	24,43	poz.	35,56	35,58	36,44	31,37	poz.	poz.
CoV47390				27,60	neg.				31,90	neg.	neg.
CoV47391	37,95	38,84	36,99	27,72	poz.	33,41	33,47	33,29	31,62	poz.	poz.
CoV47400				27,29	neg.				31,75	neg.	neg.
CoV47401				27,28	neg.				31,14	neg.	neg.
CoV47411				27,73	neg.				30,80	neg.	neg.
CoV47412				29,21	neg.				31,14	neg.	neg.
CoV47419				27,53	neg.				31,20	neg.	neg.
CoV47420	22,01	22,88	24,01	21,88	poz.	30,30	30,11	31,16	31,68	poz.	poz.

Číslo vzorku	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	Ct hodnoty studovaných virálních genů a IC				RT-PCR	RT-PCR
	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>NPS</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>ORF</i>	<i>IC</i>	<i>GARG</i>	souhrnný
CoV52148	23,20	24,39	25,93	24,17	poz.	35,39	36,26	37,16	30,77	poz.	poz.
CoV52149				27,87	neg.				31,31	neg.	neg.
CoV52150	32,53	33,62	36,46	27,57	poz.				30,82	neg.	poz.
CoV52151	21,10	21,76	24,12	22,58	poz.				31,38	neg.	poz.
CoV52152				27,34	neg.				31,91	neg.	neg.
CoV52153				27,77	neg.				31,64	neg.	neg.
CoV52154	32,68	33,67	33,94	27,60	poz.	39,18		37,42	31,35	poz.	poz.
CoV52155				27,82	neg.	35,11	36,18	36,92	31,10	poz.	poz.
CoV52156	30,15	31,42	32,47	27,63	poz.	35,97	35,54	36,33	30,93	poz.	poz.
CoV52157				28,21	neg.				31,67	neg.	neg.
CoV52158				27,78	neg.				30,95	neg.	neg.
CoV52159				38,39	neg.				31,75	neg.	neg.
CoV52160				27,74	neg.				31,80	neg.	neg.
CoV52161	26,44	27,60	28,68	26,53	poz.	36,81	36,87	38,26	31,49	poz.	poz.
CoV52163	28,37	29,32	31,32	27,22	poz.				31,40	neg.	poz.
CoV52164	27,84	28,98	29,73	26,90	poz.	34,69	34,63	34,77	30,94	poz.	poz.
CoV52165				29,65	neg.				30,47	neg.	neg.
CoV52166				27,75	neg.				32,28	neg.	neg.
CoV52167	34,77	35,89	38,41	27,65	poz.	35,74	36,12	35,12	30,93	poz.	poz.
CoV52168				27,60	neg.				31,35	neg.	neg.
CoV52172	22,53	23,48	25,39	23,58	poz.	29,53	29,04	29,10	31,25	poz.	poz.
CoV52174				27,75	neg.				30,98	neg.	neg.

Legenda: E – gen *E*; N – gen *N*; ORF – gen otevřeného čtecího rámce *ORF*; NPS – vzorek nasopharyngeálního stěru; GARG – vzorek odebraný samoodběrovou sadou GARGTEST; poz. - vzorek vyhodnocen jako SARS-CoV-2 pozitivní; neg. – vzorek vyhodnocen jako SARS-CoV-2 negativní.