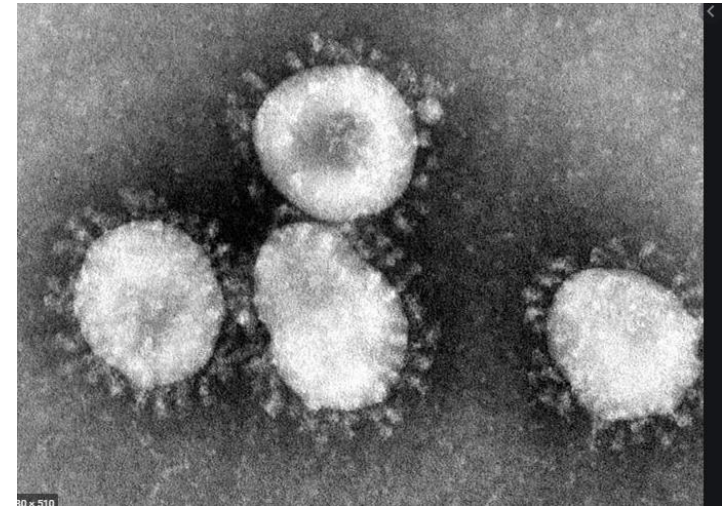
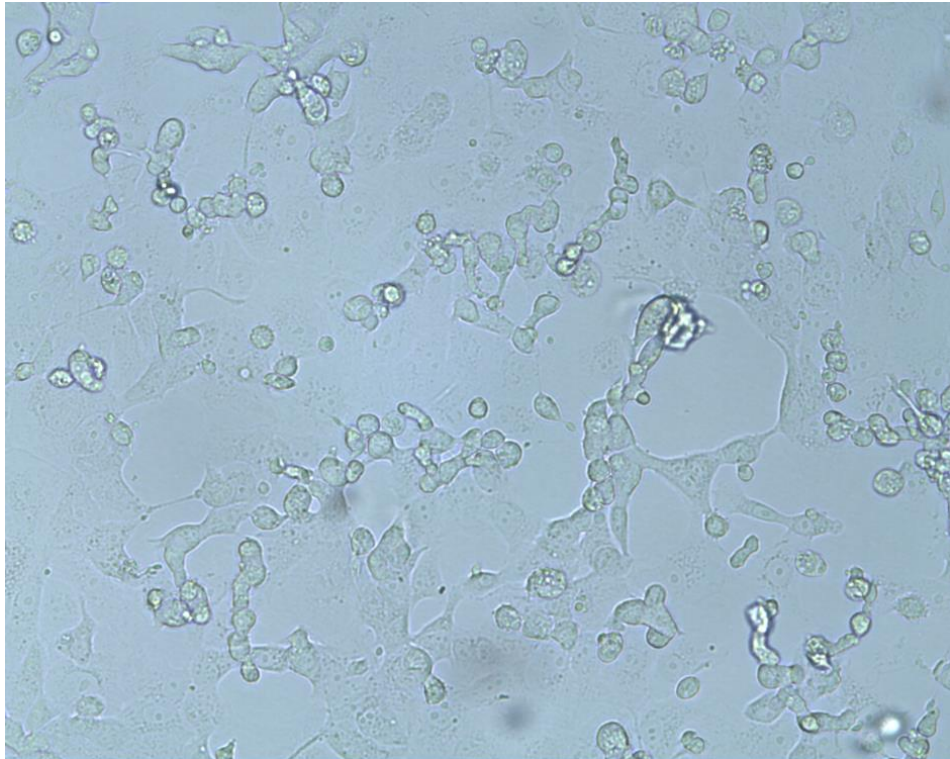
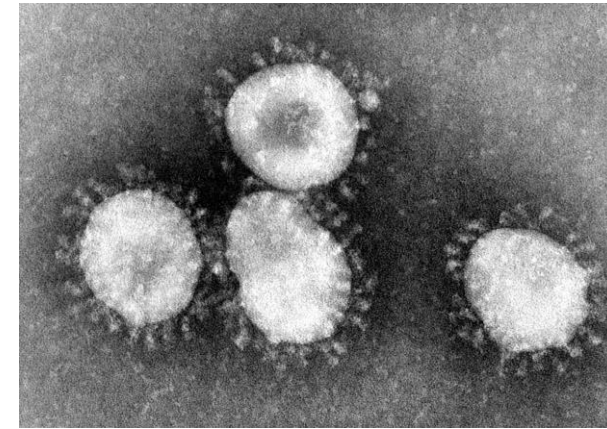
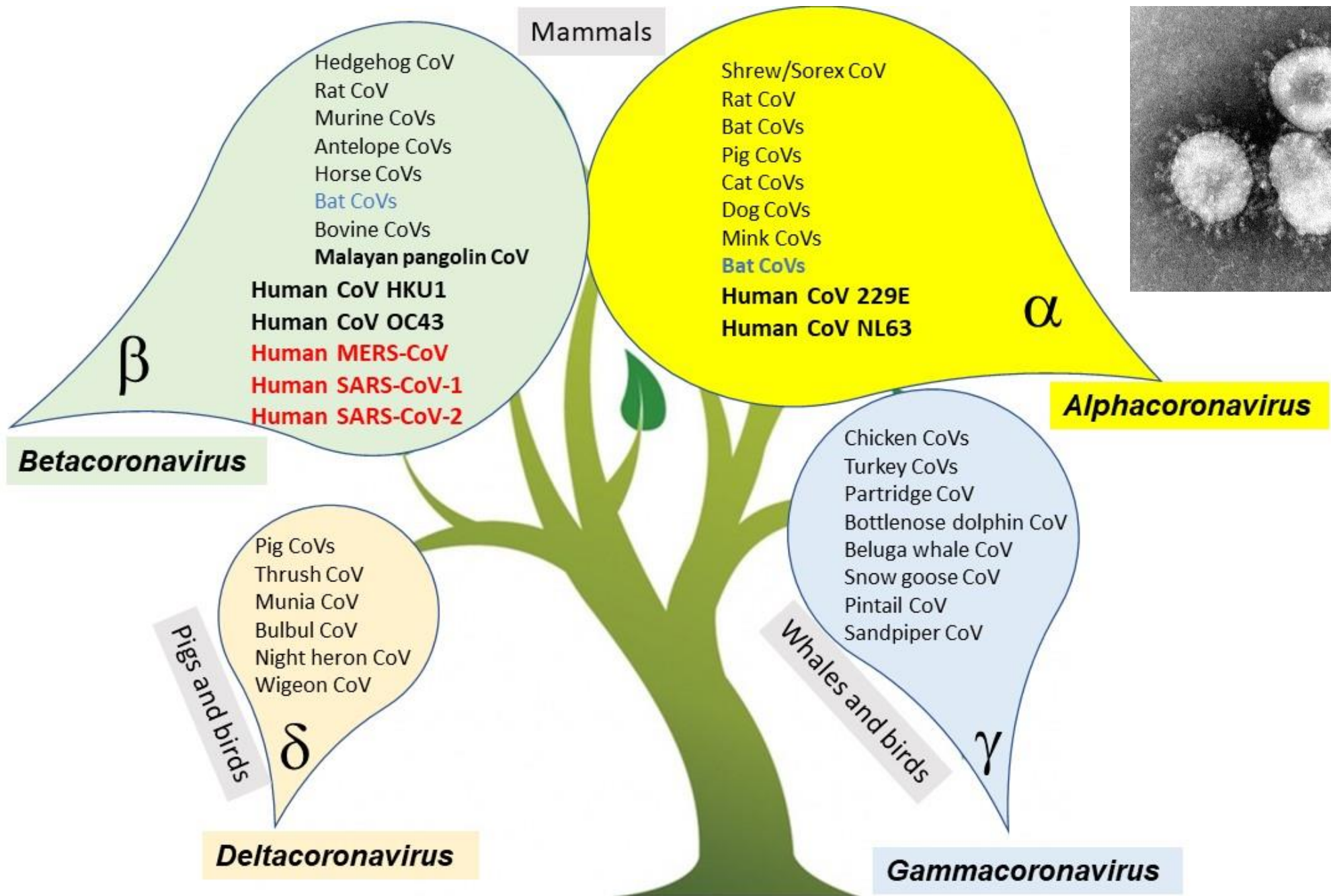


Problematika v rozhodování o pozitivním či negativním PCR testu na Covid 19 v závislosti na použité metodě. Interpretace PCR positivity v kontextu dalších souvislostí. Úvod do evoluce SARS Cov 2.

NRL pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění

Helena Jiřincová, SZÚ

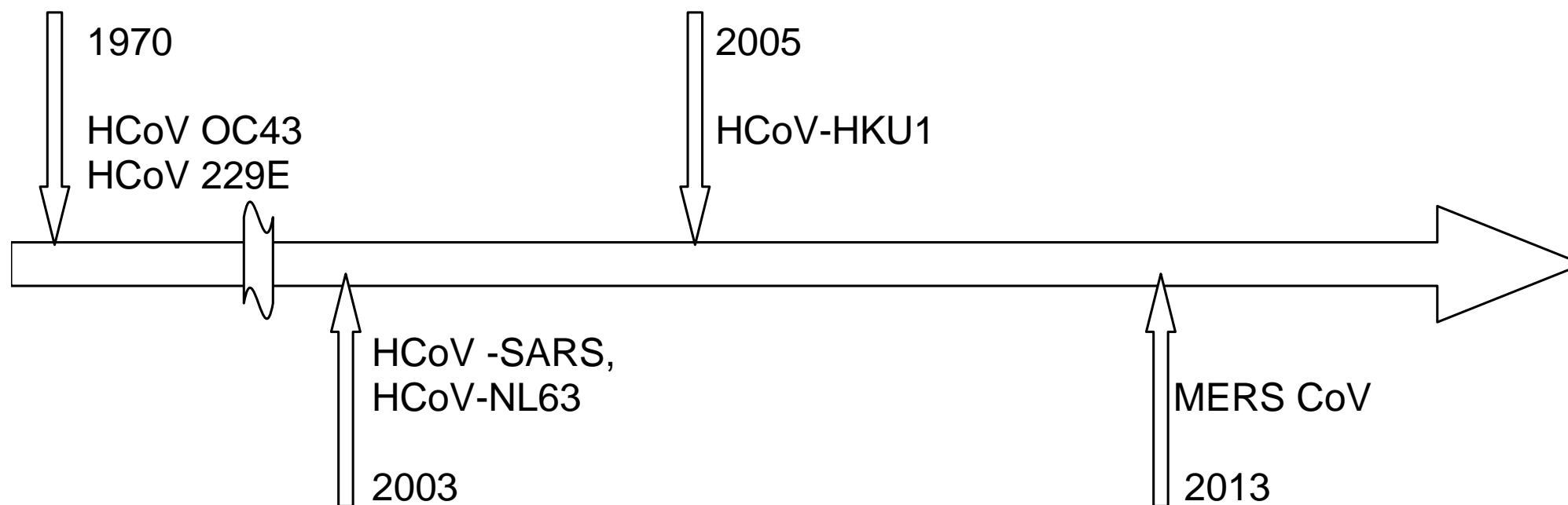




# Human CoV

Zastoupení CoV 5 -18% v sezónách 2013 – 2019,  
celosvětově až 30 % ARI.

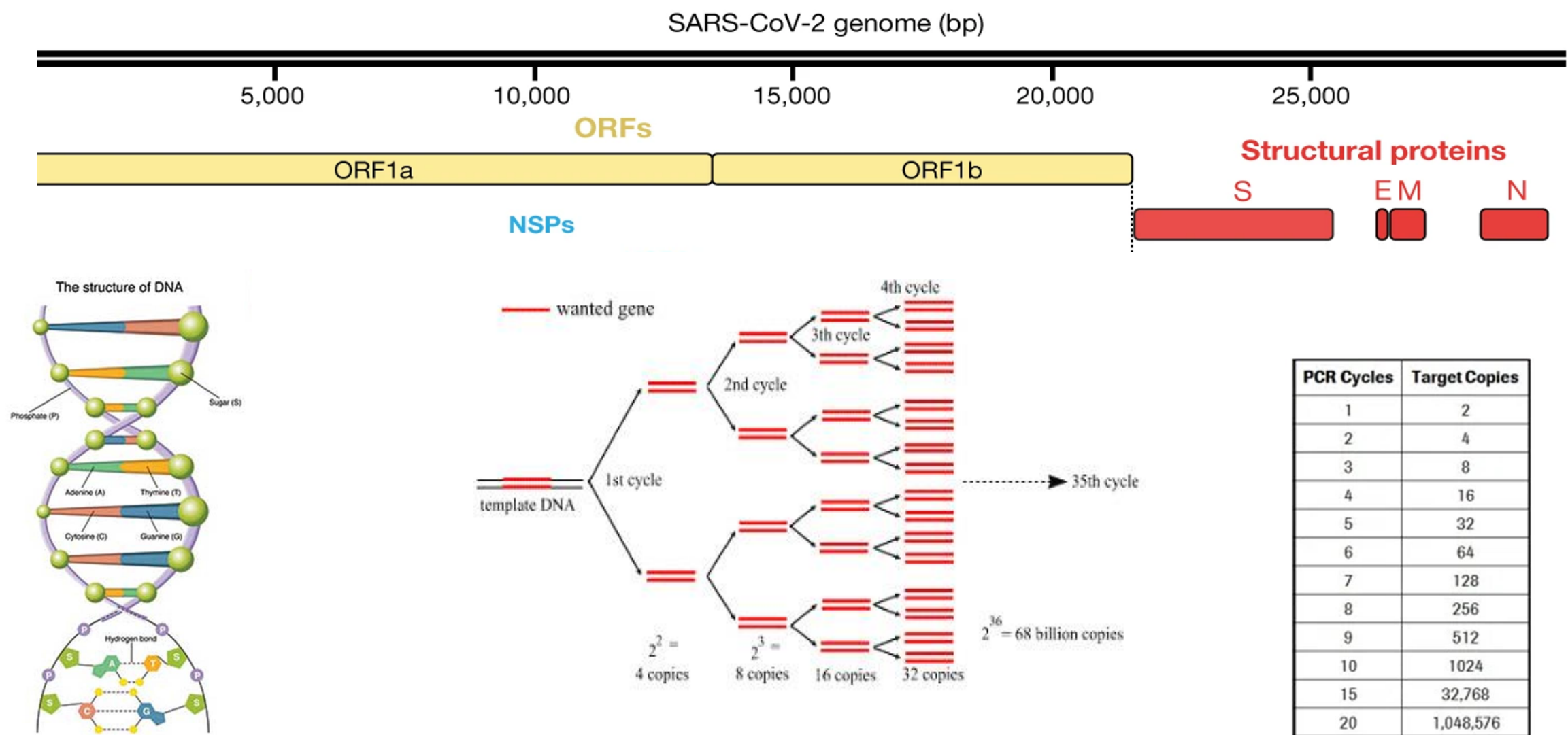
V lidské populaci je doposud známo 6 koronavirů, z nichž 4 byly objeveny  
v posledních 10 letech.



Obr 2 Schematický časový diagram (18)



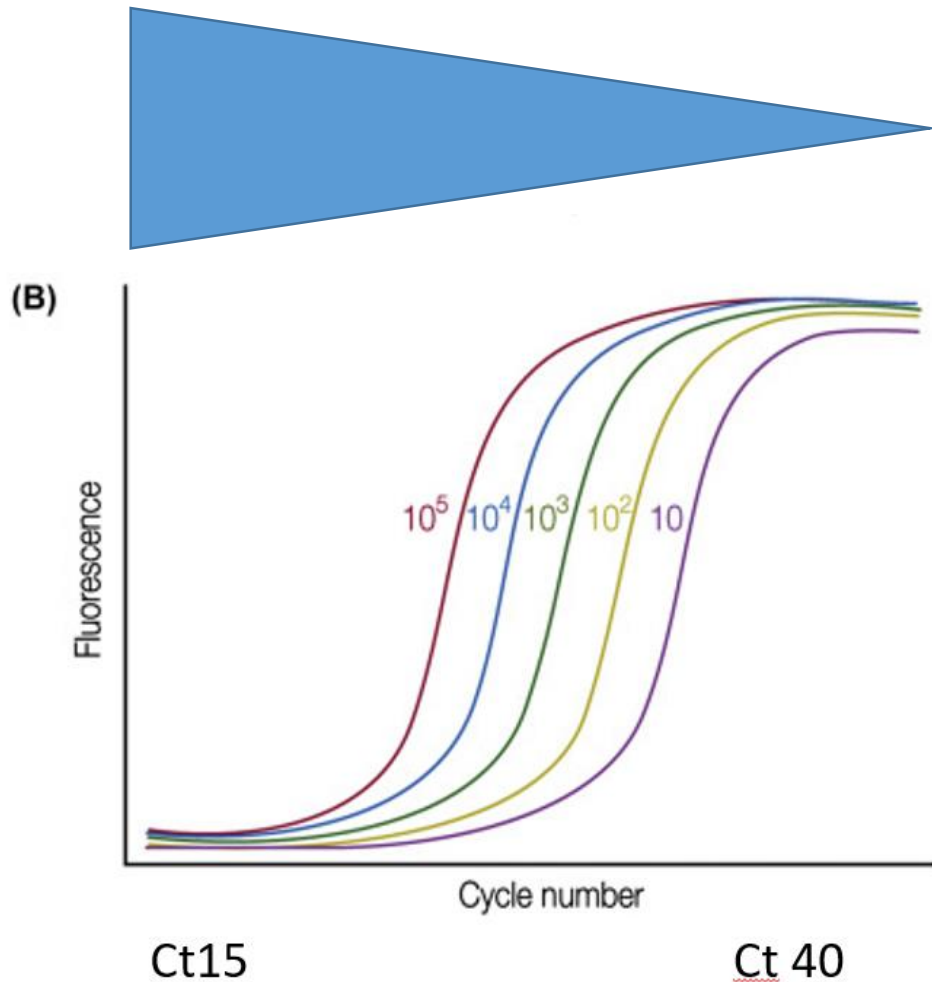
# Princip PCR



Rodriguez-Lazaro, David. (2022). DEVELOPMENT OF MOLECULAR-BASED TECHNIQUES FOR THE DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF FOOD-BORNE PATHOGENS.

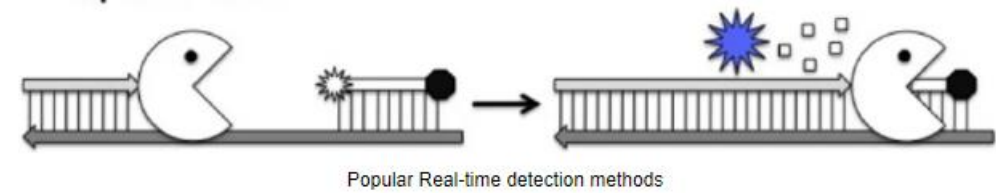
# Princip real time PCR

Množství viru



- Vysoké hodnoty Ct – nízký počet kopií vRNA
- Počet kopií RNA není totožný s počtem virových částic
- Počet kopií RNA může být přímo úměrný počtu virových částic, jednotlivé cíle
- Počet kopií v RNA pro detekované úseky genů je proměnlivý dle životního cyklu viru, v. populace (E, RdRp Orf1a/b, S, EndoRnase, N/N2), nejvyšší citlivost gen E, N2 nevyšší počet kopií, ale obvykle nižší citlivost

B. TaqMan Probe



<https://microbeonline.com/real-time-pcr-principles-and-applications/>

# Ct - fakta

- Vysoké hodnoty Ct – nízký počet kopií vRNA
- Počet kopií RNA není totožný s počtem virových částic
- Počet kopií RNA může být přímo úměrný počtu virových částic, jednotlivé cíle
- Počet kopií v RNA pro detekované úseky genů je proměnlivý dle životního cyklu viru, v. populace (E, RdRp, Orf1a/b, S, EndoRnase, N/N2), nejvyšší citlivost gen E, N2 nevyšší počet kopií, ale obvykle nižší citlivost
- Není pravda, že PCR detekujeme jen zbytky viru
- Metoda izolace RNA nebo extrakce bez izolace ovlivňuje PCR výsledek
- Není pravda, že PCR proti SARS-CoV.2 detekuje jiné respirační patogeny a naopak
- CE-IVD certifikace

# Ct - interpretace

- Vysoké hodnoty Ct – počátek infekce/nemoci, konec – přetrvávající pozitivita
- Nízká citlivost – posun hodnot Ct, infekční vzorky se jeví jako negativní nebo hraničně pozitivní/suspektní
- Pro testování s předstihem, nutná negativita 24 – 48 hod po testu, nutná vysoká citlivost PCR testu
- Pro vyloučení počátku nemoci, špatný odběr – nutno opakovat s 1 – 2 denním zpožděním, rozhodnutí dle dynamiky PCR nálezu
- V současnosti již není možné s jistotou ověřit serologickým nálezem s
- Ověření je možné testem viability



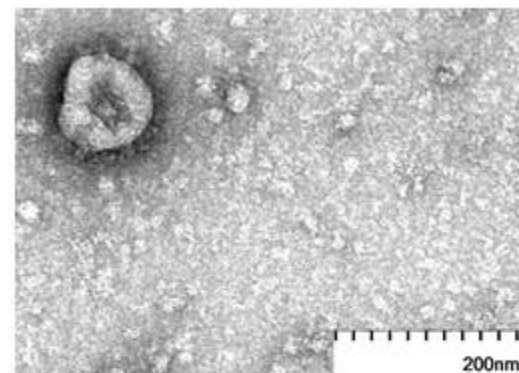
# Postupné poškození buněčné kultury v důsledku množení SARS-CoV-2

Buněčná linie: Vero E6 –TMPRSS2 (optický mikroskop, zvětšení 200x)

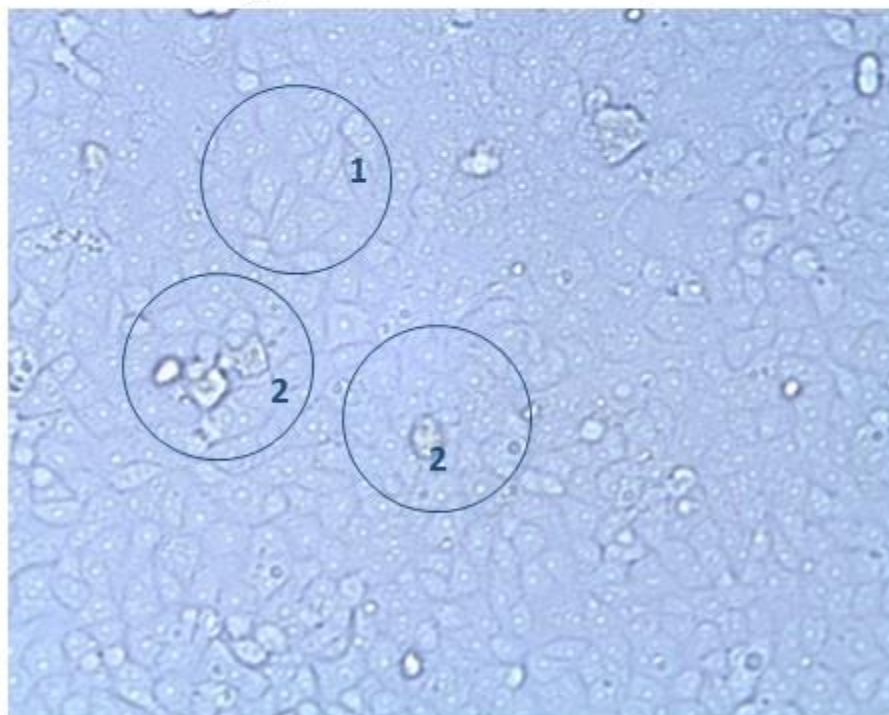
Virus: hCoV-19/Czech Republic/KNL\_2021-110119140/2021 **GISAID Accession ID** EPI\_ISL\_6862005

Taxonomické zařazení: 21K (omicron) – B.1.1.529

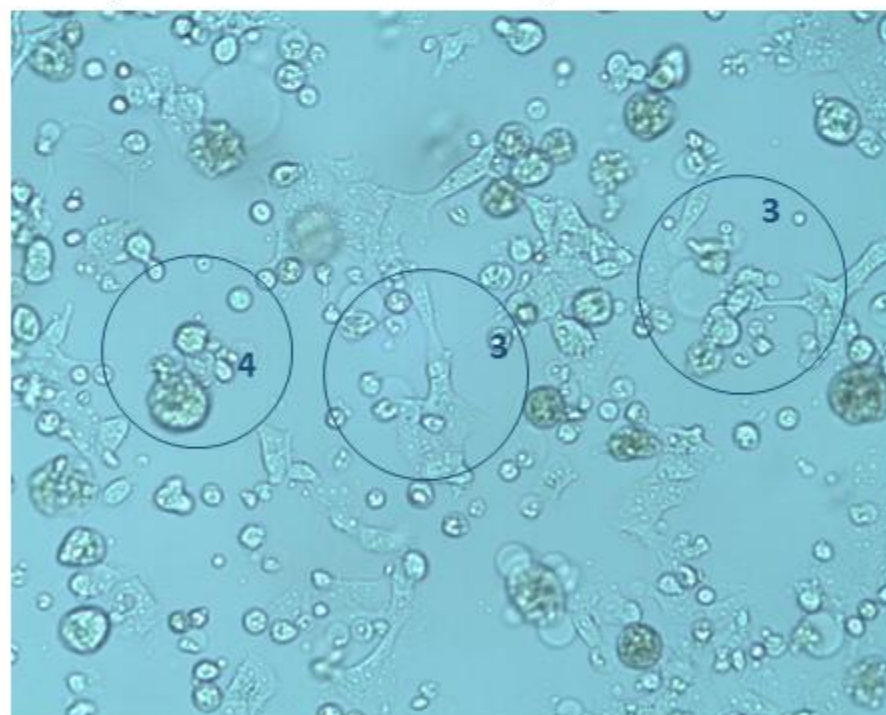
1. Intaktní buňky rostoucí přisedle (adherované) na dně kultivační nádoby
2. Počínající cytopatický efekt
3. Pokročilý cytopatický efekt tvorba syncytií (velkých vzájemně pospojovaných buněk – viditelné propojovací „můstky“) s nižší mírou adherence
4. Mrtvé buňky ještě celistvé s neschopností adherence na povrch kultivační nádoby



Stejný virus pod elektronovým mikroskopem



12 hodin kultivace



84 hodin kultivace



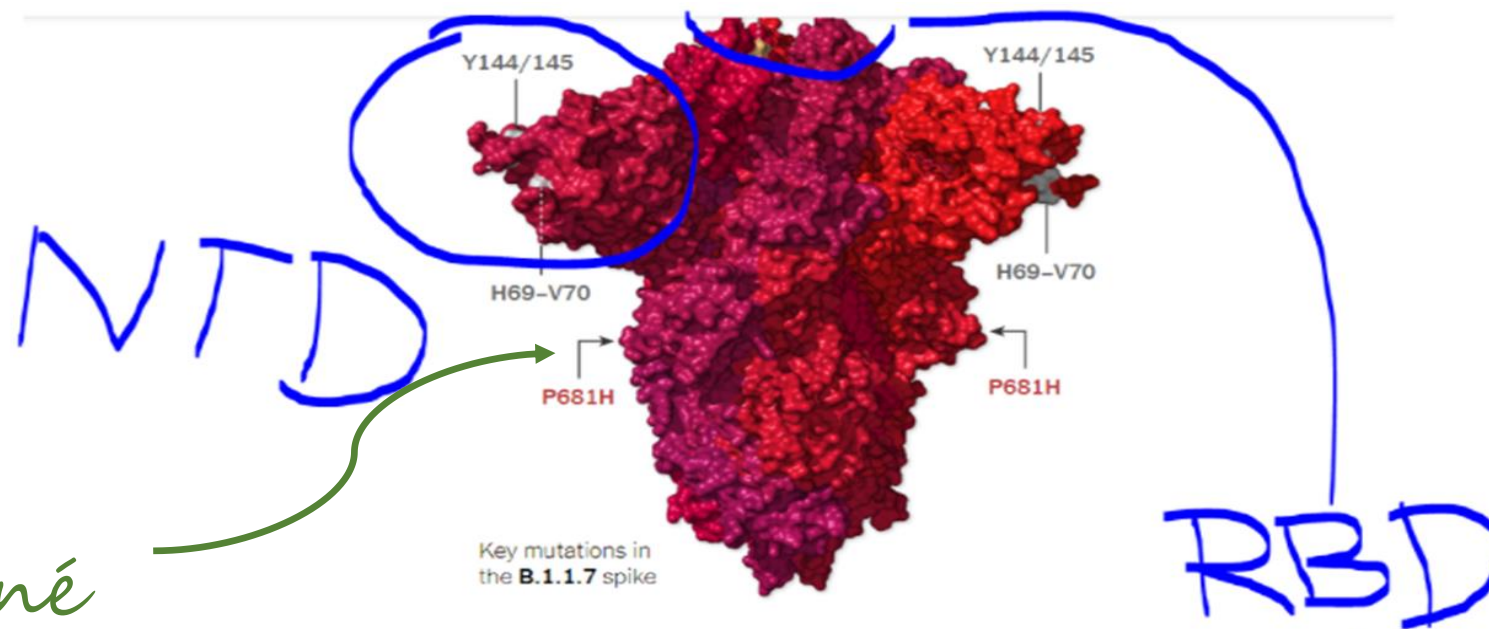
Kultivační nádoba: speciálně upravený plast umožňuje adhezenci buněk (přilepení buněk k povrchu, a tím i jejich množení). Ve víčku, které zajišťuje nemožnost úniku viru, je filtr propustný pouze pro CO<sub>2</sub>, který pomáhá udržovat optimální pH kultivačního média a současně slouží jako zdroj uhlíku pro rostoucí buněčnou kulturu.



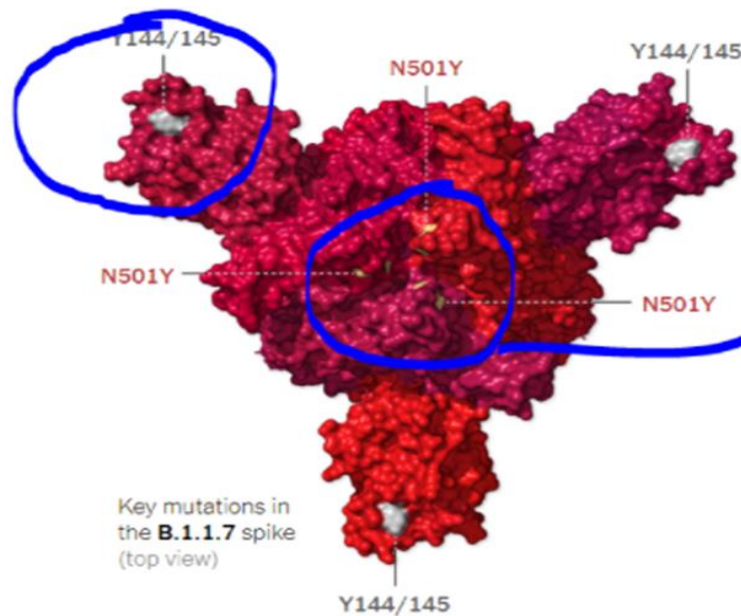
# Stanovení protilátek

- Pohled do minulosti, např rozlišení post vakcinační a post infekční imunitní odpovědi
- Predikce odolnosti
- IgaA, IgM, IgG/IgG VNT
  - Nukleokapis
  - RBD – původ????
  - Pseudovry imitující aktuálně cirkulující varianty

*Furinové štěpné  
místo*



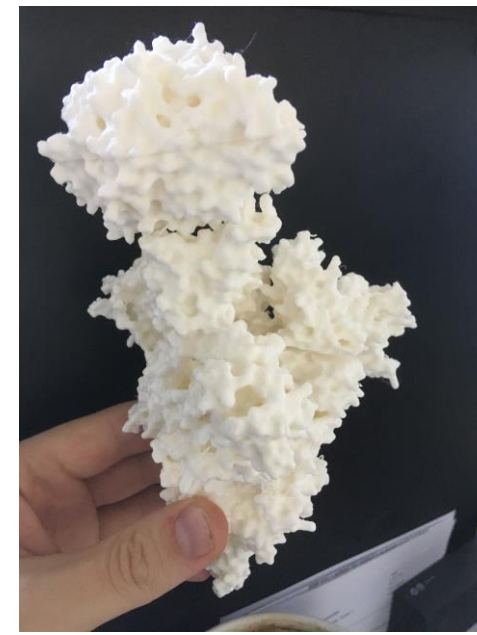
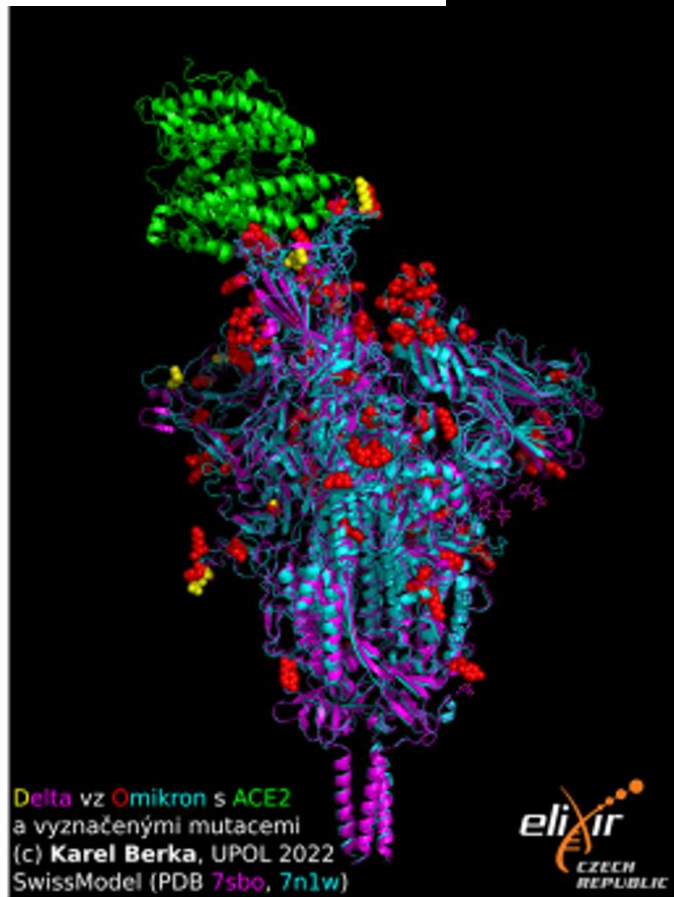
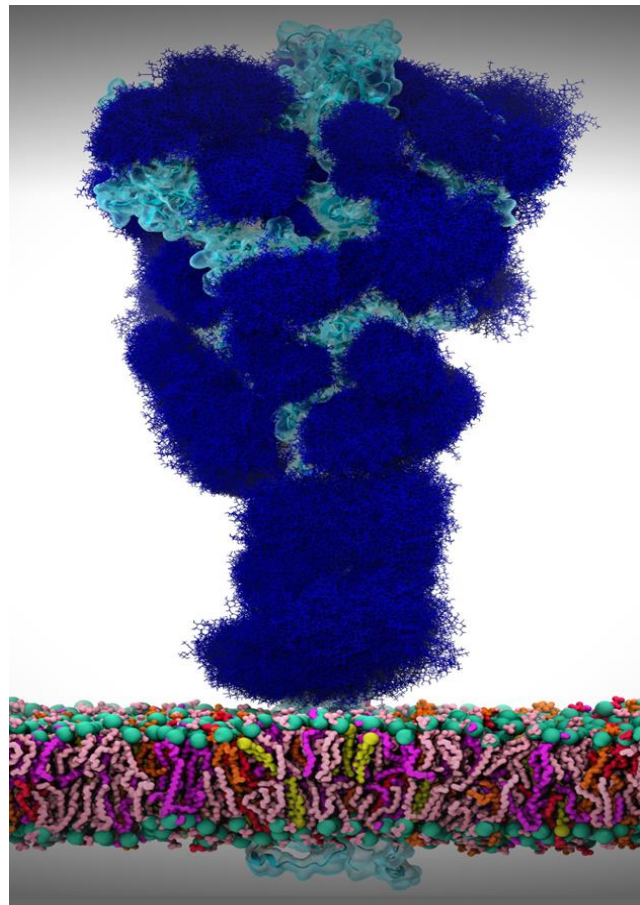
It takes three spike proteins to form one spike, so each mutation appears in three places:



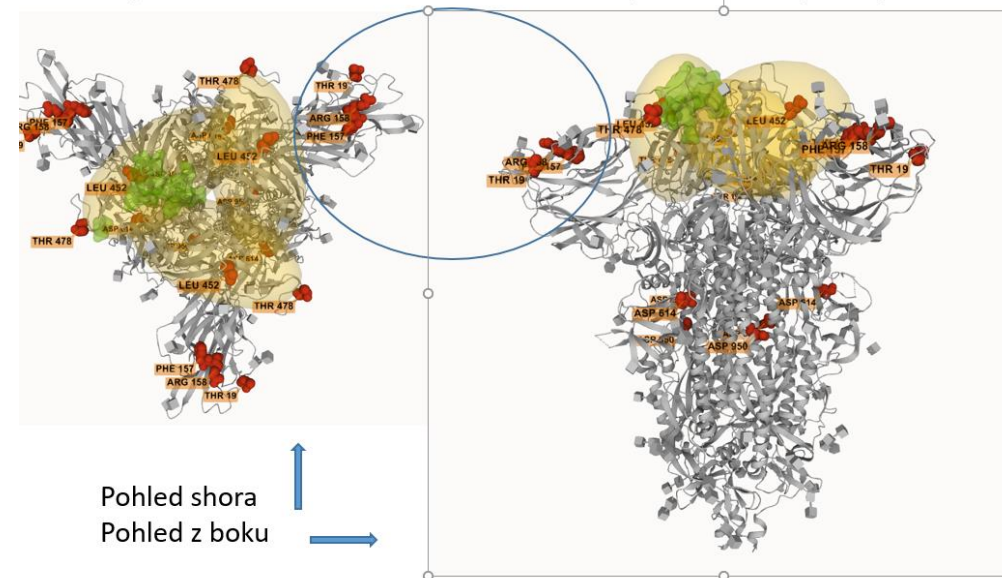
For more on the B.1.1.7 mutations, see: [Inside the B.1.1.7](#)

# V hlavní roli spike

omikron



Aminokyselinové substituce charakteristické pro B.17.2 (delta)



Pohled shora  
Pohled z boku

Modře označena N terminální doména  
Žlutě vazebné místo

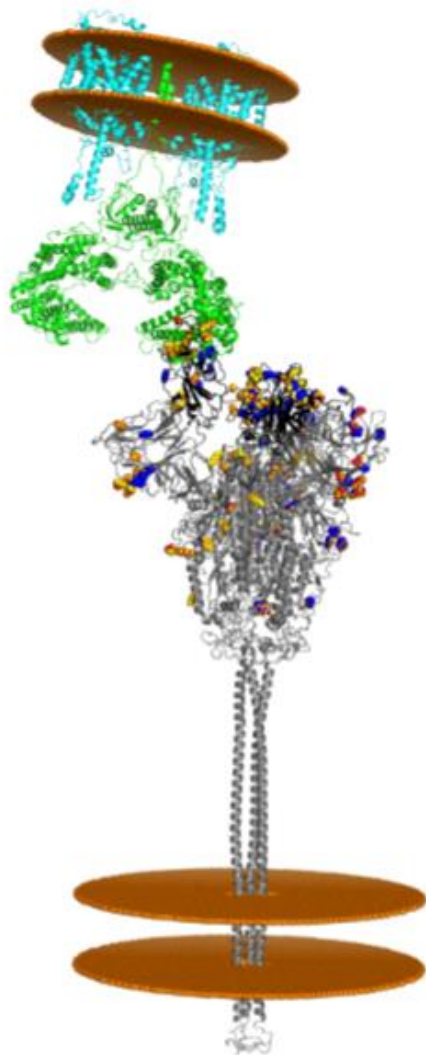
<https://molstar.org/>

Strukturní modely glykosylace spike a spike omikronu  
autor Karel Berka



Celkový pohled na komplex Spike proteinu navázaného na membránový komplex proteinů

ACE2 a BOAT1

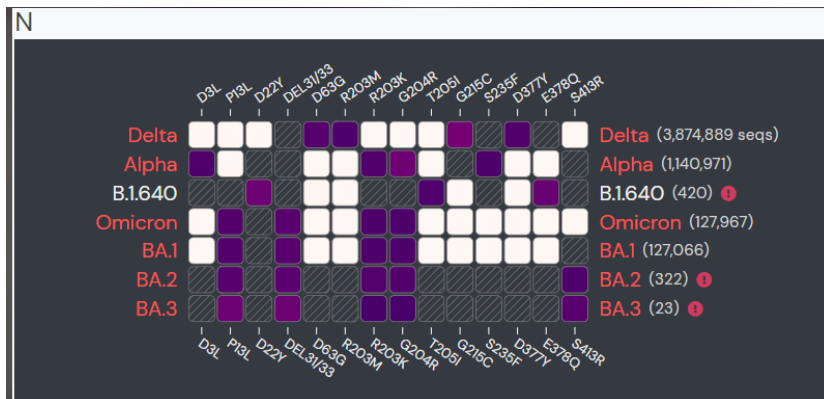


Spike protein je šedý, jeho doména určující vazbu na receptor (RBD doména) černá, dimery ACE2 jsou zelené a BOAT1 transportéry bleděmodré. Mutace jsou zobrazeny pomocí následujících barev - BA.1 žlutě, BA.1.1 oranžově, BA.2 modře, BA.3 červeně. Hranice membrán (Spike protein je držen ve virové, ACE2 a BOAT1 v buněčné) je naznačena oranžovými kruhy. Napojení Spike proteinu na membránu pomocí trojice helixů je flexibilní a umožňuje vyhledávat interakci s ACE2 v širokém úhlovém rozpětí. Celkový pohled na komplex Spike proteinu navázaného na membránový komplex proteinů ACE2 a BOAT1

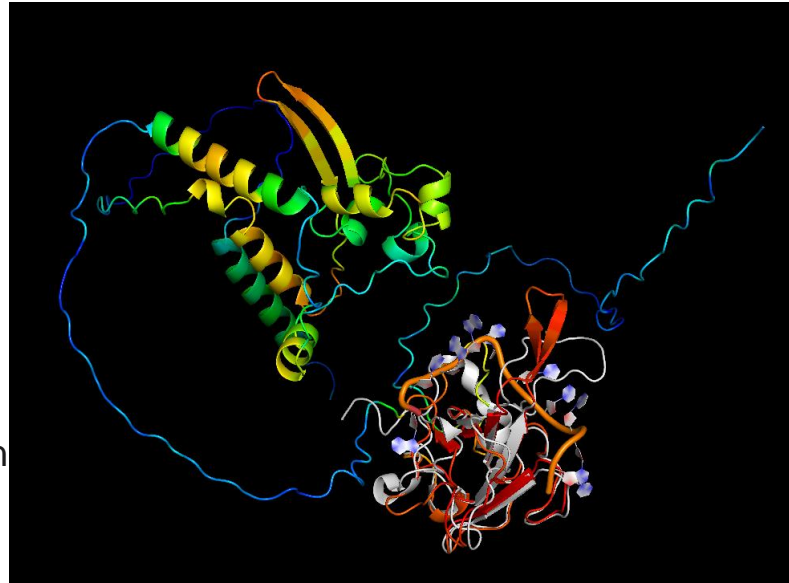


# Ve vedlejší roli nukleokapsidový protein Jsou Ag testy funkční?

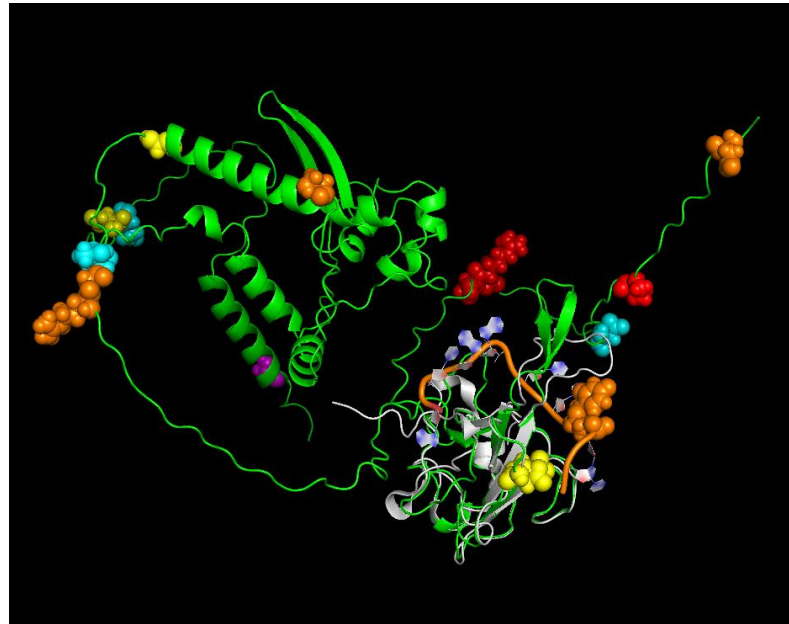
N-term domain binds RNA  
C-term domain binds other N proteins  
monoclonal IG-light lambda binds to N-term domain  
IG-heavy bind to both domains  
MHC binds to both and to unstructured linker  
HLA binds to N-term domain



Strukturní modely a popis  
autor Karel Berka



Bílá  
struktura z s navázaným RNA  
barvy označující lokální kvalitu modelu  
(AlphaFold)



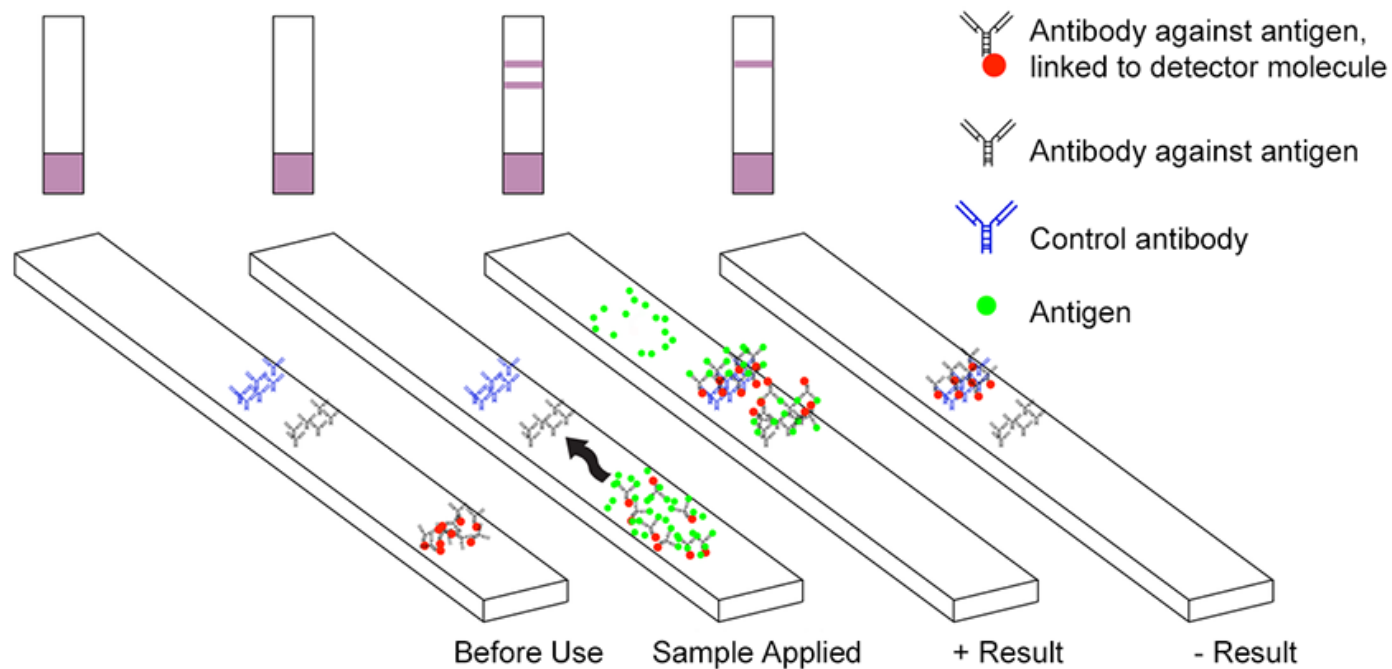
N - 2 domény propojené flexibilními  
linkery.  
Na jednu doménu je navázána ssRNA  
(Václav Veverka – UOCHB)

Delta - žlutá  
B.1.640 - bledě modrá  
Alpha - oranžová  
Omikron - červená  
(+ dost těch oranžových z Alfy)  
BA.2 - fialová (+červená Omikronu)

# Princip Ag testu – rapid

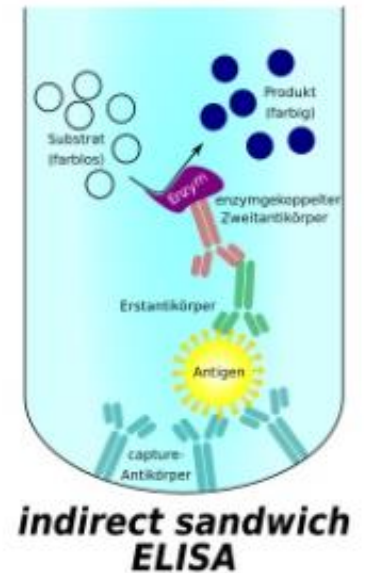
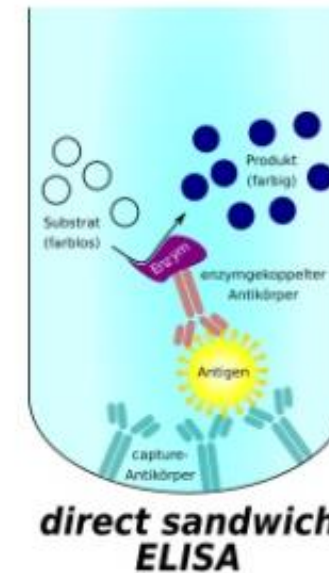
## ELISA/CLIA

### Ag test i měření protilátek

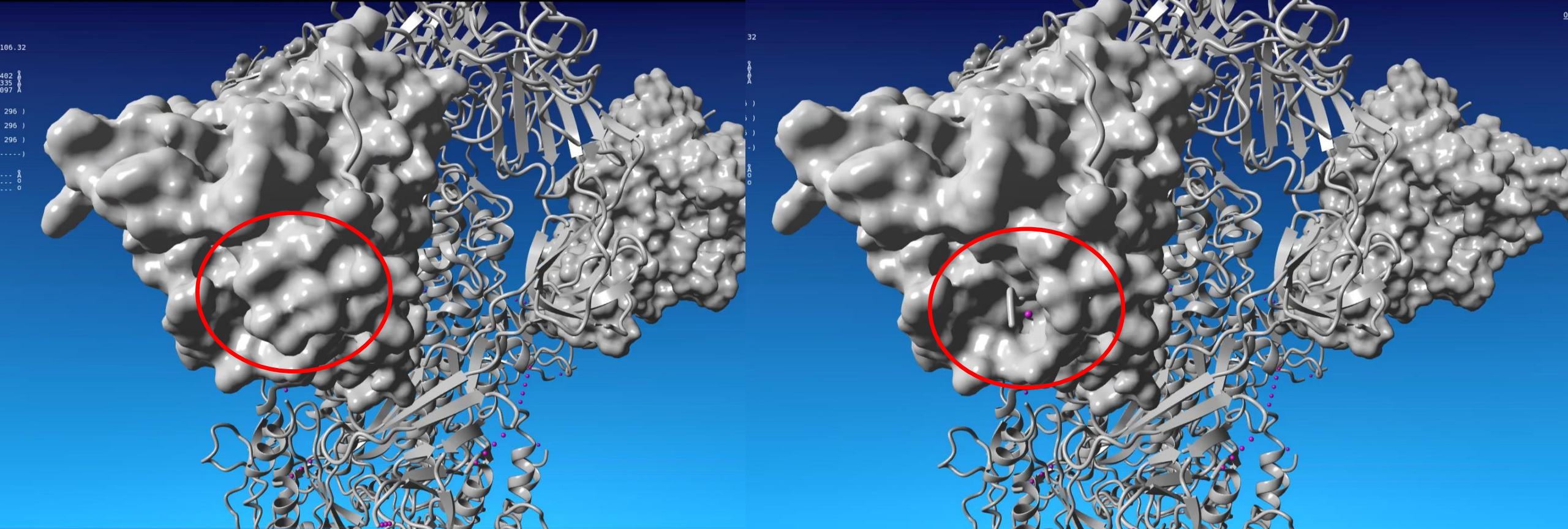


Adapted from: Ian M. Campell, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagnostic\\_Medical\\_Dipstick.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagnostic_Medical_Dipstick.png)

FIGURE 2



<https://cs.weblogographic.com/what-is-difference-between-elisa>



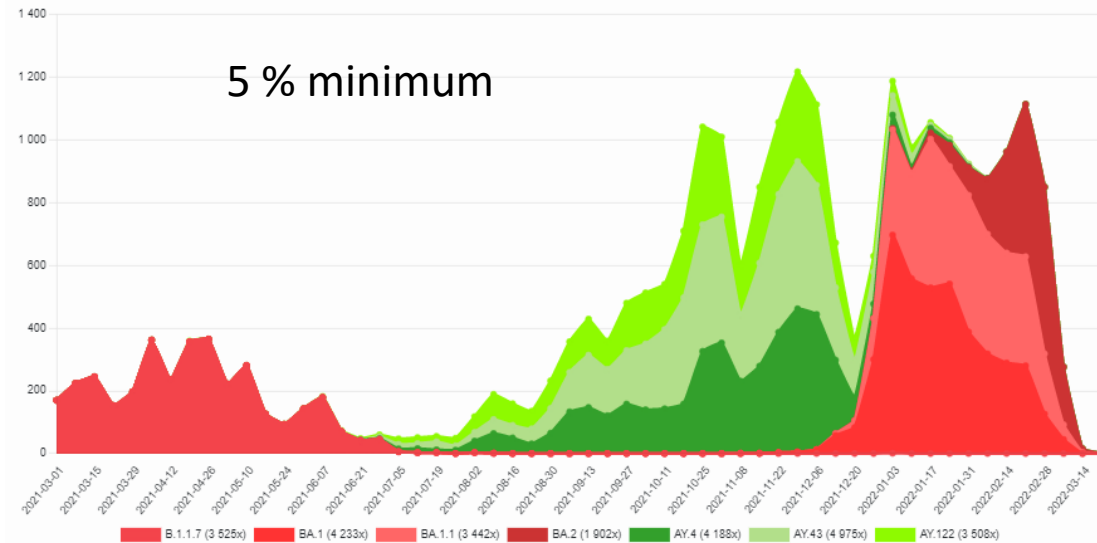
Delece 6 nukleotidů, tedy 2 aminokyselin (69 histidin, 70 valin) v N-terminální doméně spike proteinu - boční pohled (model dle rentgenostrukturní analýzy – SVU+SZU)



# Evoluce SARS – CoV-2 v ČR

COG CZ: <https://virus.img.cas.cz/>

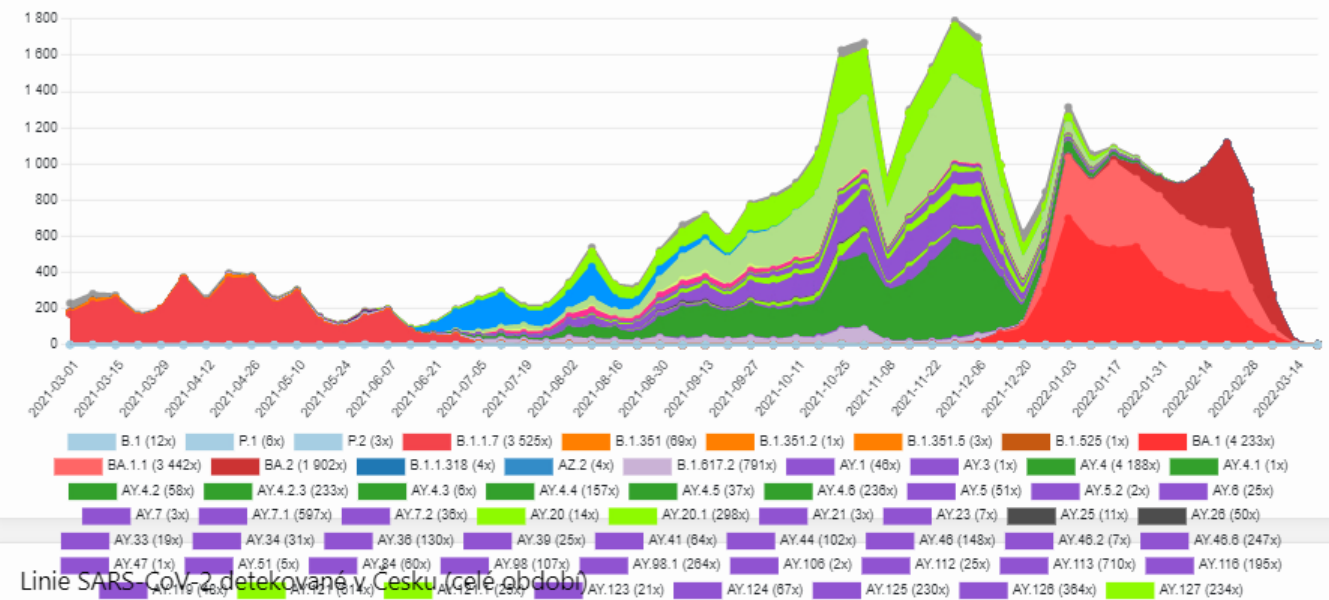
Linie SARS-CoV-2 detekované v Česku (1. 3. 2021 - 30. 3. 2022)



Linie SARS-CoV-2 detekované v Česku (celé období)



Linie SARS-CoV-2 detekované v Česku (1. 3. 2021 - 30. 3. 2022)

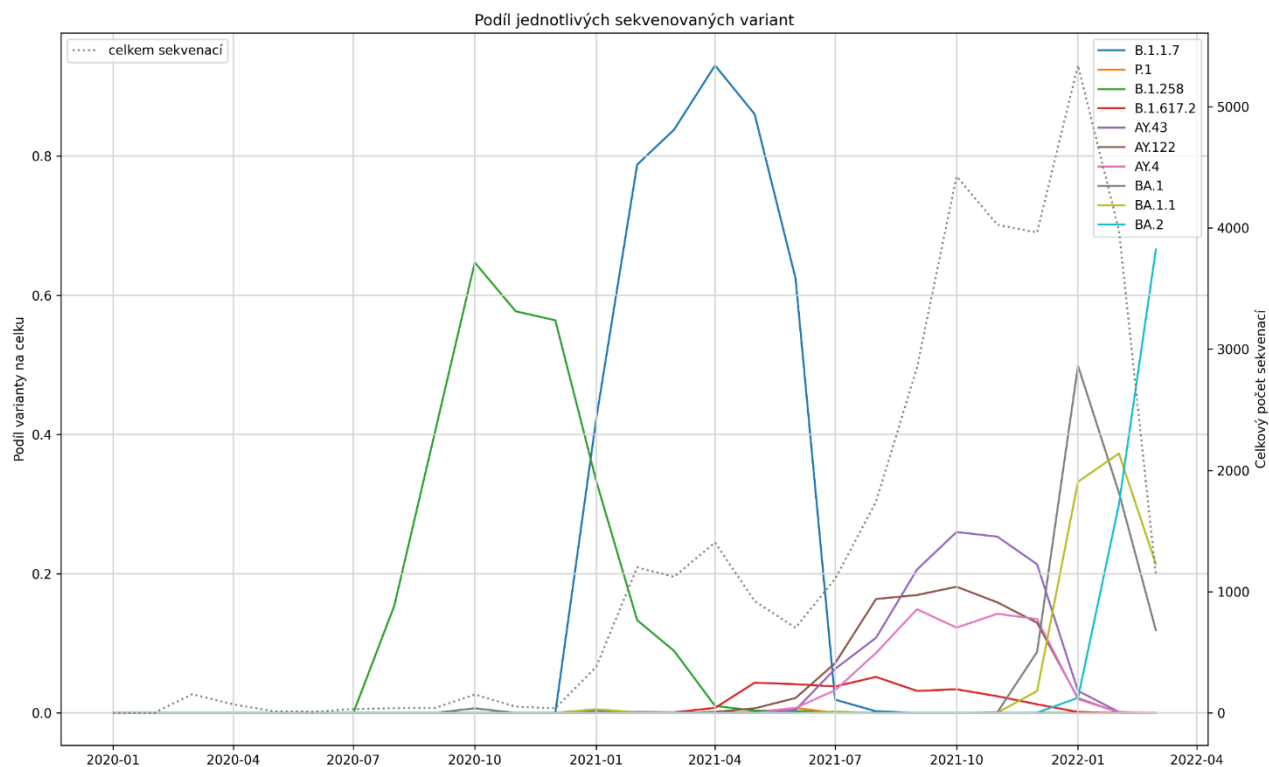


Linie SARS-CoV-2 detekované v Česku (celé období)





# Evoluce SARS – CoV-2 v ČR



Graf zobrazuje střídání variant SARS-CoV-2 v ČR. Variantu B.1.258 (zelená) vystřídala na přelomu let 20/21 varianta alfa (modrá), dále v červenci nastupuje varianta delta a její subvarianty. Na přelomu let 21/22 se objevuje varianta omikron a její subvarianty (BA.2 je tyrkysová). Přerušovaná čára zobrazuje celkový počet sekvenací v ČR.

# Znázornění variant SARS-CoV-2 v haplotypové síti

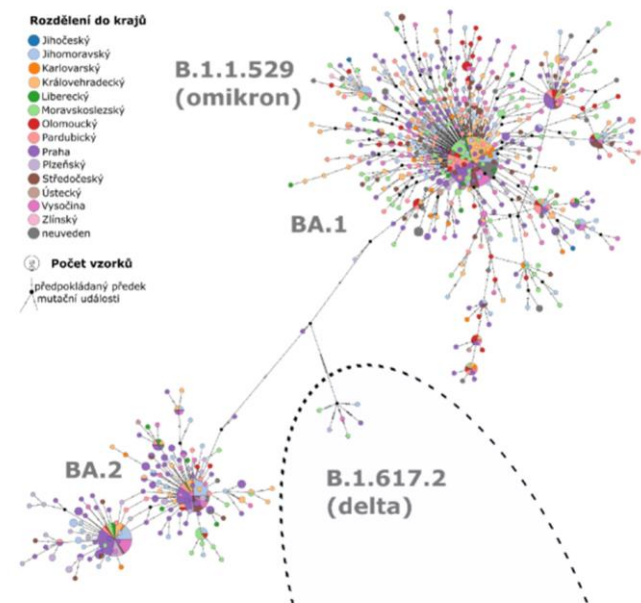
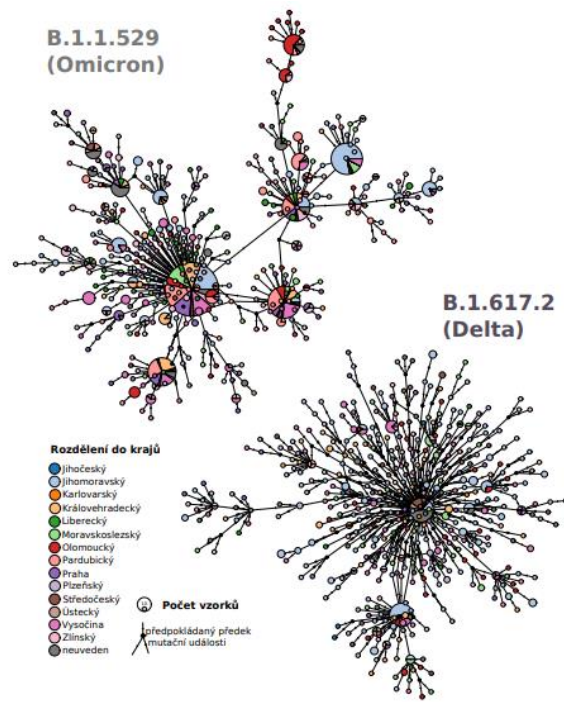
Výběr sekvencí 1588 vzorků

24. 12. – 10. 2. 2022

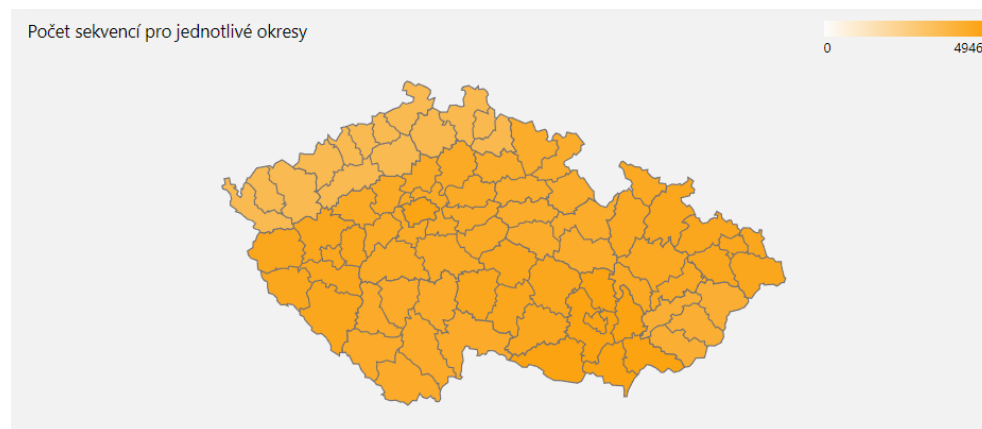
Velikost uzlů – dle počtu vzorků  
s identickou sekvencí.

Spojnice naznačují pravděpodobné  
příbuzenské vztahy,  
počet krátkých kolmých úseček  
odpovídá počtu mutačních

1000 vzorků z České republiky shromážděných od 4. 2. 2022

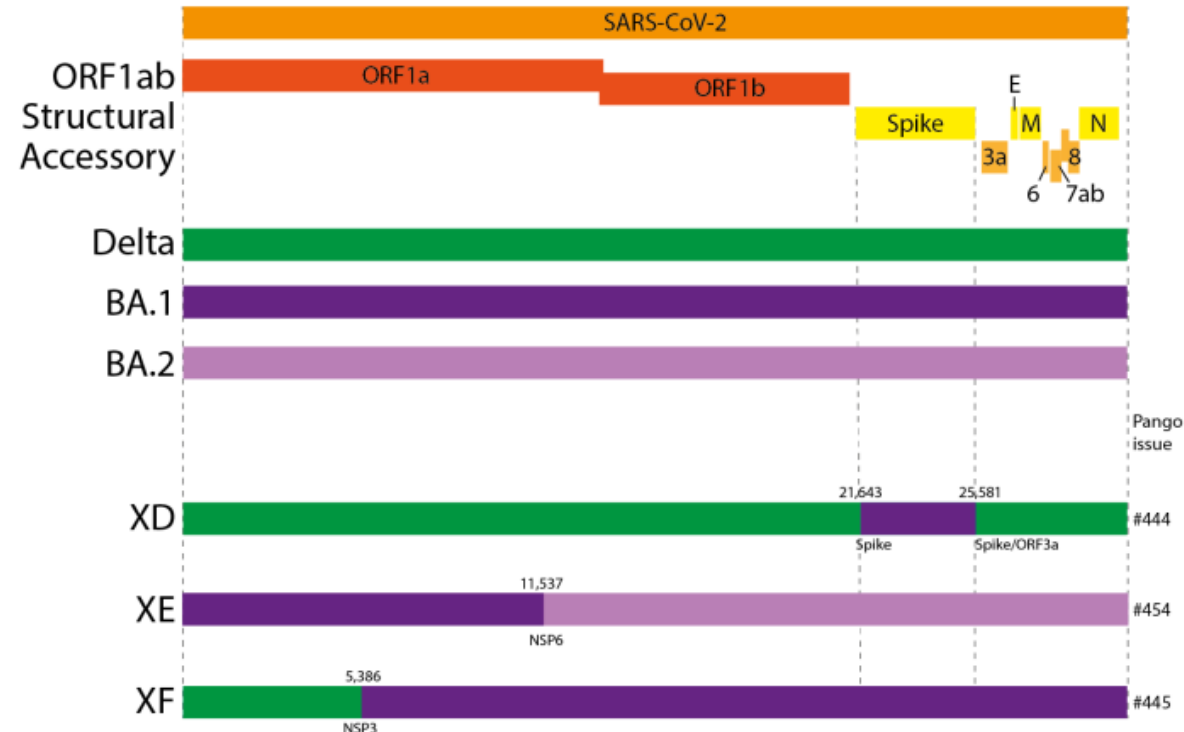


COG CZ: <https://virus.img.cas.cz/>



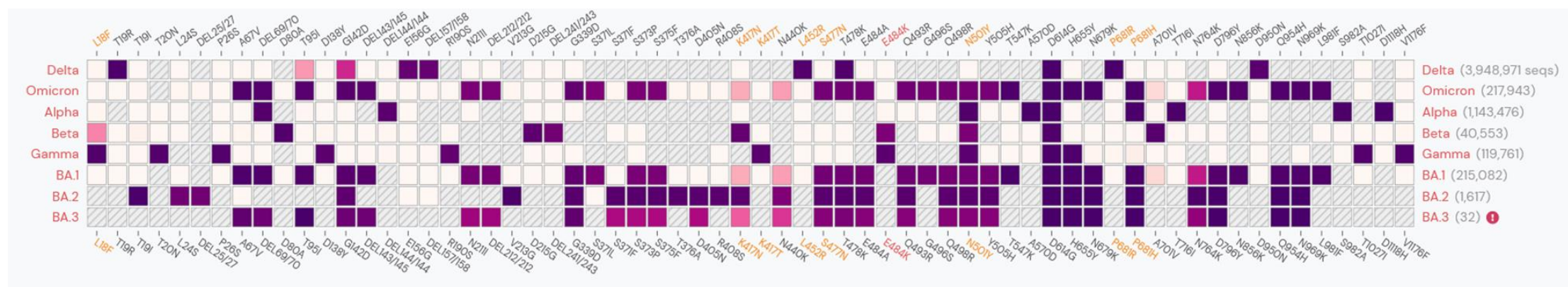
Převzato z PHE : [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/1063424/Tech-Briefing-39-25March2022\\_FINAL.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1063424/Tech-Briefing-39-25March2022_FINAL.pdf)

- V současnosti jsou potvrzeny 3 rekombinantní linie: XD, XE, and XF
- XD and XF jsou rekombinantami mezi variantou delta a BA.1
- XE je důsledkem rekombinace BA.1 a BA.2 subvariant omikronu a má 3 jedinečné mutace:
  - NSP3 C3241T aV1069I,
  - NSP12 C14599T
- XF a XE byly detekovány ve Spojeném království
- XD byla poprvé detekována ve Francii a je dále prokázána ve 4 evropských zemích (Dánsko, Nizozemí, Německo, Belgie)
- XD obsahuje jedinečnou mutaci NSP2: E172D.



Matice mutací: jsou zahrnuty i varianty BA.1, BA.2, BA.3

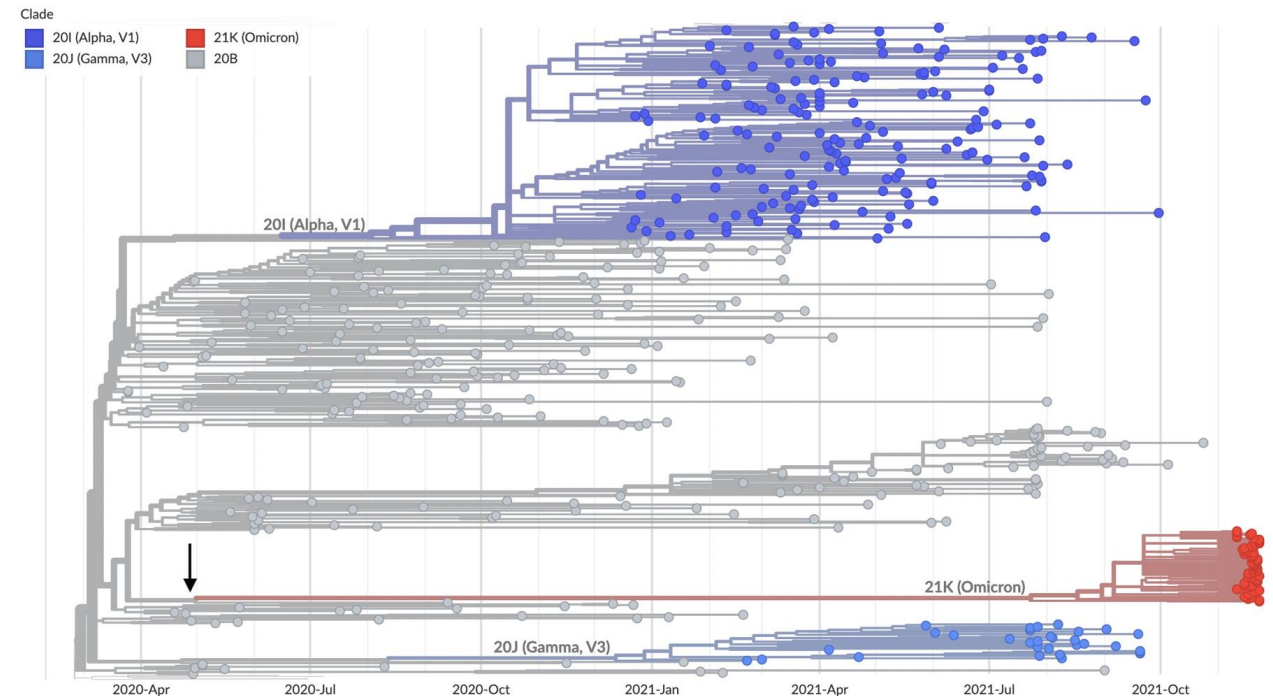
Zdroj: outbreak.info





# Umíme předpovídat budoucnost?

- Můžeme predikovat další vlnu/y?
- Omikron – původ- reintrodukce?
- Zoonotické rozšíření?
- Jsou ohroženy další druhy?



# Děkuji za pozornost



Smích je z hlediska možné náhazy nebezpečnější než lašál.  
My už se postaráme o to, aby vás brzy přešel.

NY TIMES

<https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html>

GISAID

Enabled by hCoV-19 data shared via GISAID

ECDC/CDC/WHO

PROMEDMAIL

PANGO-LINEAGES

NEXSTSTRAIN

NEXTCLADE

OUTBREAK.INFO

COVPSECTRUM

COVARIANTS

ZPRÁVY Z NRL – JEN ČÁST: <http://www.szu.cz/tema/prevence/laboratore>

Info k SARS/chřipka : Alena Janypková – [alena.janypkova@szu.cz](mailto:alena.janypkova@szu.cz)  
Helena Jiřincová – [helena.jirincova@szu.cz](mailto:helena.jirincova@szu.cz)

Tel. Kontakt NRL – 724 362 602