



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Zavedení a optimalizace metody ELISA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Tereza Kopačková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph. D.

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Zavedení a optimalizace metody ELISA*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 30.4.2021

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph. D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích v rámci mé bakalářské práce.

Zavedení a optimalizace metody ELISA

Abstrakt

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay neboli ELISA je metoda mající široké uplatnění zejména v imunologii. Metodou lze prokazovat antigeny i protilátky. Základním principem metody je reakce antigenu a protilátky a následné vytvoření imunokomplexu. Imunokomplex je detekován konjugátem, který způsobí barevnou změnu substrátu v případě přítomnosti antigenu nebo protilátky ve vyšetřovaném vzorku. ELISA test představuje jednoduchou metodu významnou pro diagnostiku různých onemocnění nebo laboratorní výzkum. Tato metoda je speciálním typem enzymové imunoanalýzy.

Bakalářská práce je zaměřena na obecné zavedení a optimalizaci ELISA metody. Cílem teoretické části práce je obecné seznámení s imunologickými metodami. Podrobně je vypracováno rozdělení jednotlivých druhů ELISA testů včetně principů a využití v praxi. V praktické části je zavedena a optimalizována metoda ELISA s využitím fotometru DYNAREAD pro odečítání 96jamkových mikrotitračních destiček a softwaru AlaDYN. Tímto způsobem je vyšetřeno celkem 8 zkušebních vzorků sér a následně zpracována získaná data.

Zkušební měření bylo provedeno pomocí testovací sady QuantiVac ELISA a stanovovány byly lidské protilátky třídy IgG proti SARS-CoV-2 v séru. Jako antigeny byly použity domény spikových proteinů SARS-CoV-2 exprimované rekombinantně v lidské buněčné linii HEK 293. Měření proběhlo pomocí přístroje DYNAREAD a zpracování dat pomocí softwarové aplikace AlaDYN.

Měřeno bylo 6 kalibrátorů, pozitivní kontrola, negativní kontrola a poté jednotlivé vzorky sér. Výsledkem měření je 5 vzorků sér, ve kterých byly detekovány protilátky anti-SARS-CoV-2 třídy IgG a 3 vzorky, u nichž se protilátky neprokázaly.

Klíčová slova

ELISA; antigen; protilátka; imunoanalýza; DYNAREAD; AlaDYN; QuantiVac; SARS-CoV-2

Implementation and optimization of ELISA method

Abstract

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay or ELISA is a method that has a wide application, especially in immunology. Antigens and antibodies can be detected by the method. The basic principle of the method is the reaction of antigen and antibody and the subsequent formation of an immunocomplex. The immunocomplex is detected by a conjugate that causes a color change of the substrate in the presence of antigen or antibody in the test sample. The ELISA test is a simple method important for the diagnosis of various diseases or laboratory research. This method is a special type of enzyme immunoassay.

The bachelor thesis is focused on the general implementation and optimization of the ELISA method. The aim of the theoretical part of the work is a general introduction to immunological methods. The division of individual types of ELISA tests, including the principles and use in practice, is elaborated in detail. In the practical part, the ELISA method is introduced and optimized using a DYNAREAD photometer for reading 96well microtiter plates and AlaDYN software. In this way, a total of 8 test samples of sera are examined and subsequently the obtained data are processed.

The test measurement was performed using the QuantiVac ELISA test kit and human IgG antibodies against SARS-CoV-2 in serum were determined. The peaks of SARS-CoV-2 spike proteins expressed recombinantly in the human cell line HEK 293 were used as antigens. The measurement was performed using a DYNAREAD instrument and data processing was performed using AlaDYN software.

6 calibrators, a positive control, a negative control and then individual serum samples were measured. The measurement results are 5 serum samples in which IgG class anti-SARS-CoV-2 antibodies were detected and 3 samples in which no antibodies were detected.

Key words

ELISA; antigen; antibody; immunoassay; DYNAREAD; AlaDYN; QuantiVac; SARS-CoV-2

Obsah

Úvod.....	8
1. Základní pojmy v laboratorní imunologické diagnostice.....	9
1.1 Imunitní systém.....	9
1.2 Antigen.....	10
1.3 Protilátka.....	11
1.3.1 Imunoglobulin G.....	12
1.3.2 Imunoglobulin M.....	13
1.3.3 Imunoglobulin A.....	13
1.3.4 Imunoglobulin E.....	14
1.3.5 Imunoglobulin D.....	14
1.3.6 Monoklonální protilátky.....	14
1.3.7 Polyklonální protilátky.....	15
2. Enzymová imunoanalýza.....	16
2.1 Homogenní enzymová imunoanalýza.....	17
2.2 Heterogenní enzymová imunoanalýza.....	17
3. ELISA.....	18
3.1 Přímá ELISA.....	18
3.2 Nepřímá ELISA.....	19
3.3 Kompetitivní ELISA.....	20
3.4 Nekompetitivní ELISA.....	21
3.5 Přístrojové vybavení.....	21
3.6 Uplatnění metody.....	22
3.7 Diagnostika pomocí ELISA metody.....	22
3.7.1 Stanovení autoprotilátek.....	22
3.7.2 Stanovení potravinových alergií.....	23
3.8 Capture ELISA.....	24
3.9 CAP systém.....	24
4. Radioimunoanalýza.....	25
5. SARS-CoV-2.....	26
5.1 Diagnostika SARS-CoV-2.....	26
6. Cíl práce.....	28
7. Metodika a materiály metody.....	29
7.1 Stanovení anti-SARS-CoV-2 pomocí QuantiVac ELISA (IgG).....	29
7.2 Princip testu.....	29

7.3	Obsah testovací sady	30
7.4	Přístrojové vybavení a pomůcky	31
7.5	Příprava vzorků	31
7.6	Příprava promývacího pufru	32
7.7	Pipetovací protokol	32
7.8	Metodika stanovení	34
7.9	Přístroj DYNAREAD.....	35
7.9.1	Popis přístroje	35
7.9.2	Ovládání přístroje	36
7.10	Software AlaDYN.....	36
7.10.1	Tvorba a editace testu	36
7.10.2	Zpracování dat	39
7.10.3	Spuštění testu	41
8.	Výsledky.....	43
9.	Diskuse	48
10.	Závěr	50
11.	Literatura.....	51
12.	Seznam zkratk	54
13.	Přílohy.....	55

Úvod

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay neboli ELISA je jednou z nejpoužívanějších metod v imunologii. Metoda ELISA slouží k diagnostice mnoha onemocnění. Lze pomocí ní prokazovat jak protilátky, tak i antigeny. Jde tedy buď o protilátku proti konkrétnímu původci onemocnění, nebo přímo antigen. Základním imunologickým principem je vazba antigenu na svou specifickou protilátku a vytvoření imunokomplexu. Imunokomplex je detekován konjugátem, ten následně způsobí barevnou změnu substrátu v případě přítomnosti antigenu nebo protilátky ve vyšetřovaném vzorku. Metoda ELISA je speciálním typem enzymové imunoanalýzy prováděné v mikrotitrační destičce. Bakalářská práce je zaměřena na obecné zavedení a optimalizaci této metody. Pro zkušební měření bylo zvoleno stanovení protilátek anti-SARS-CoV-2 pomocí testovací sady QuantiVac ELISA.

V teoretické části práce jsou zmíněny některé základní pojmy důležité pro laboratorní imunologickou diagnostiku. Dále je vypracované podrobné rozdělení jednotlivých druhů ELISA testů, a to včetně jejich principů a následného využití v praxi. Uvedené jsou i speciální modifikace ELISA testů a Radioimunoanalýza, která patří mezi nejstarší imunochemické metody, ze kterých principy ELISA metod vycházejí. Jelikož jako zkušební stanovení bylo zvoleno měření protilátek anti-SARS-CoV-2, je také popsán SARS-CoV-2 (koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem) a onemocnění COVID-19 (koronavirové onemocnění), které v současné době představuje hlavní zdravotní problém řešený v lidské populaci.

Součástí praktické části je metodika stanovení anti-SARS-CoV-2 pomocí QuantiVac ELISA (IgG) ze vzorků sér. Zmíněné je přístrojové vybavení i pomůcky nutné k provedení stanovení. Praktická část zahrnuje přípravu jednotlivých vzorků, promývacího pufru a stanovení protilátek anti-SARS-CoV-2 za pomoci testovacího kitu QuantiVac. Podrobně popsáno je také samotné měření, tj. práce s fotometrem DYNAREAD pro odečítání 96jamkové mikrotitrační destičky a softwarem AlaDYN. Následuje zhodnocení získaných výsledků měření.

1. Základní pojmy v laboratorní imunologické diagnostice

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je adaptační a zároveň regulační soustava, která se společně s endokrinním a nervovým systémem podílí na zabezpečení integrity mnohobuněčných živočišných organismů. S tím souvisí i udržení funkcí organismu ve vitálních mezích, tj. udržení homeostázy (Toman a kol., 2009).

Imunitní systém je tedy jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu, proto je cílem jeho fungování udržení homeostázy neboli stálosti vnitřního prostředí. Tento systém představuje složitou soustavu specializovaných buněk, tkání, molekul a jejich vzájemných interakcí, které vznikly během fylogenetického vývoje organismů (Ferenčík, 2005). Díky tomu může organismus rozpoznávat nežádoucí změny ve vnitřním a vnějším prostředí a reagovat na ně ve spolupráci s dalšími tělními systémy, zvláště neuroendokrinním systémem. Funkcí imunitního systému je tedy udržování celistvosti organismu tím, že identifikuje škodlivé látky od neškodlivých, a zajišťuje tak ochranu organismu před škodlivými látkami vnitřního i vnějšího původu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Konkrétně se tato funkce projevuje jako obranyschopnost neboli obrana před různými druhy infekce, kdy imunitní systém dokáže identifikovat škodlivé látky z vnějšího prostředí a následně chránit organismus před mikroorganismy, které jsou schopné vyvolávat onemocnění, a před jejich toxiny (Hořejší a Bartůňková, 2009). Důležitá je také autotolerance, což je schopnost imunitního systému rozpoznávat organismu vlastní tkáň a nepoškozovat je. Imunitní dohled pak zajišťuje identifikaci škodlivých látek z vnitřního prostředí a průběžně odstraňuje staré nebo nějakým způsobem změněné buňky (Hořejší a Bartůňková, 2009). Mezi takovéto nefunkční složky organismu patří i buňky mrtvé tzn. poškozené, které hynou nekrózou nebo nadbytečné buňky odstraněné fyziologickým procesem – apoptózou. Mohou to být také nádorové, nějakým způsobem nemocné nebo tělu cizí buňky (Toman a kol., 2009).

1.2 Antigen

Díky základní schopnosti imunitního systému rozeznávat „škodlivé“ od „neškodlivého“ můžeme definovat látku zvanou antigen (Ag). Antigeny představují látky, které imunitní systém rozpoznává a následně na ně reaguje, jsou tedy schopné vyvolat imunitní reakci (Hořejší a Bartůňková, 2009). Kompletní Ag se nazývá imunogen (Ferenčík, 2005). Hapteny jsou nekompletní antigeny, které sice mohou vyvolat imunitní reakci, tvorbu protilátek však nejsou schopny vyvolat (Kramář, 2007).

Prakticky jakékoli chemické struktury mohou působit jako antigeny. Zpravidla je také potřeba, aby antigeny byly rozeznávány ve formě makromolekul. Tato forma zajistí, že na ně imunitní systém může reagovat. Makromolekuly antigenů mohou být rozpustné nebo vázané na buněčném povrchu. Mezi nejvýznamnější antigeny patří proteiny, různé komplexní polysacharidy, lipidy a také lipoproteiny. Nejsilnějším Ag je protein, a naopak nejslabší jsou lipoproteiny (Hořejší a Bartůňková, 2009). Všeobecně si pod pojmem antigen představujeme různé mikroorganismy, které představují ohrožení integrity jedince (Buc, 2009).

Velice důležitou součástí Ag je tzv. epitop. Jde o malou oblast molekuly Ag, která je rozpoznávána imunitními receptory. Při navázání protilátky na specifický epitop Ag vznikne komplex antigenu a protilátky. Zásadní je i přítomnost komplementových fragmentů. Takový komplex nazýváme imunokomplex (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Podle původu můžeme antigeny rozdělit na exoantigeny a autoantigeny. Exoantigeny jsou nejčastějšími antigeny, které představují cizorodé látky z vnějšího prostředí. Obvykle jde o infekční mikroorganismy a jejich produkty. Mezi exoantigeny patří superantigen a alergen. Superantigen je často produkt infekčních mikroorganismů. Tento Ag dokáže vyvolat silnou nespecifickou reakci s následnou aktivací velkého množství lymfocytů bez ohledu na jejich antigenní specifitu. Alergen je pak schopen u lidí trpících alergiemi a zvláště vnímavých jedinců vyvolat alergickou imunitní reakci, která je patologická. Autoantigeny naopak nejsou cizorodé látky. Tento typ antigenů je organismu vlastní, pocházejí tudíž ze samotného organismu (Hořejší a Bartůňková, 2009).

1.3 Protilátka

Protilátka (Ab) neboli imunoglobulin (Ig) představuje látku bílkovinného charakteru, která je základním nositelem humorální imunity. Protilátky jsou produkovány plazmocyty, které vznikají z B-lymfocytů v průběhu specifické imunitní odpovědi. V průběhu separační metody zvané elektroforéza dochází k dělení krevního séra, přičemž imunoglobuliny se nacházejí v gama frakci bílkovinného spektra. Odtud pochází zastaralý termín gamaglobuliny. Pro imunoglobuliny jsou zásadní dvě základní vlastnosti. Jsou to specifita pro danou antigenní strukturu a rozmanitost umožňující jejich reakci s množstvím antigenních struktur z vnějšího prostředí. Imunoglobuliny se vážou k jednomu z mála úzce příbuzných Ag a vazba protilátek k Ag je pak jejich primární funkcí vedoucí k ochraně hostitele (Lochmanová, 2014).

Z chemického hlediska patří imunoglobuliny mezi glykoproteiny, které jsou tvořené z 82–96 % polypeptidy a ze 4–18 % sacharidy. Každá molekula Ig obsahuje minimálně jednu základní jednotku, tzv. monomer, ta se skládá ze dvou identických lehkých řetězců a dvou těžkých řetězců. Molekula těchto imunoglobulinů svým tvarem připomíná písmeno „Y“ (Kramář, 2007). Tato struktura se pak pokládá za základní subjednotku imunoglobulinů (Lochmanová, 2014). Vždy dva těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Ke každému těžkému řetězci (H) je poté disulfidickým můstkem připojen jeden lehký řetězec (L) (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Těžké řetězce jsou složeny celkem ze čtyř strukturně podobných tzv. domén, kdy každá z domén je tvořena sekvencí 110–120 aminokyselin. Prostorová struktura těchto imunoglobulinových domén tvarem připomíná „soudek“, který je tvořený smyčkami polypeptidového řetězce a je také upevněný cystinovým můstkem. Jednotlivé domény jsou spojeny krátkými úseky polypeptidového řetězce (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Lehké řetězce vytvářejí 2 domény, variabilní a konstantní. Těžké řetězce tvoří jednu doménu variabilní a 3–4 domény konstantní (Lochmanová, 2014). Domény na N-konci H i L řetězce se označují jako variabilní (V_H a V_L). Ostatní domény jsou konstantní, tudíž shodné u řetězců téhož typu. Konstantní domény lehkých řetězců se označují C_L a konstantní domény těžkých řetězců C_H . Variabilní domény H a L řetězců spolu vytváří vazebné místo pro Ag (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Molekula Ig se může za vhodných podmínek proteolyticky štěpit na fragmenty. Použitím enzymu papainu lze tak získat dva identické fragmenty označované Fab (fragment antibody binding) a fragment Fc (fragment crystallizable) (Hořejší a Bartůňková, 2009). Kratší „raménka“ se označují jako fragment Fab a dolní část jako fragment Fc. Fragmenty Fab jsou schopny vázat antigeny a fragment Fc je schopný vytvořit vazbu na Fc receptory leukocytů. Oblast, ve které jsou těžké řetězce spojeny disulfidickými můstky, se nazývá pantová oblast (hinge) (Hořejší a Bartůňková, 2009). Ta vykazuje značnou prostorovou flexibilitu (Lochmanová, 2014). Díky tomu imunoglobuliny nejsou ustálenou strukturou, ale naopak se mohou prostorově přizpůsobit různým tvarům či poloze antigenů v prostředí (Kramář, 2007). Tato oblast je také velice citlivá k působení enzymů nebo chemických činidel (Lochmanová, 2014).

Molekuly imunoglobulinů se vzájemně liší ve stavbě konstantních domén těžkých řetězců. Jednotlivé imunoglobuliny tak můžeme rozdělit celkem do pěti tříd, resp. izotypů – IgG, IgM, IgA, IgE a IgD (Lochmanová, 2014).

1.3.1 Imunoglobulin G

Imunoglobulin G (IgG) je složen z jednoho monomeru, tudíž tvoří poměrně malou molekulu. Díky tomu má schopnost snadno pronikat do různých tkání nebo překonávat bariéry, může tak procházet např. placentou. Vazba molekul antigenu následně z monomeru vytváří větší celky, které jsou pak snadněji fagocytovány. IgG má tedy schopnost fixace komplementu a podporuje fagocytózu opsonizací. Tyto imunoglobuliny mohou být také jako jediné přeneseny transplacentárně, jsou proto důležitým základem imunity novorozence v prvních měsících života. Při odpovědi na antigenní podnět se tvoří v pořadí až jako druhé, ale paměť pro jejich tvorbu přetrvává celý život. IgG jsou také poměrně odolné (Kramář, 2007). U zdravých dospělých jedinců tvoří zhruba 75 % celkových imunoglobulinů séra, přičemž jejich koncentrace je 8–18 g/l. Tvoří tedy největší podíl ze všech imunoglobulinů. IgG se vyskytují celkem ve čtyřech podtřídách, které označujeme IgG1–IgG4 (Lochmanová, 2014).

1.3.2 *Imunoglobulin M*

Molekula imunoglobulinu M (IgM) je tvořena pěti monomery, nachází se tedy ve formě pentameru, což je podstatně větší celek vzniklý vazbou pěti molekul s J řetězcem. Při imunitní odpovědi, tedy po antigenním podnětu tento typ protilátek reaguje jako první a poté většinou mizí. Je také nejvíce účinnou třídou imunoglobulinů v průběhu fixace a aktivace komplementu. Uplatňuje se také v reakci vazby komplementu. IgM nemohou na rozdíl od IgG procházet placentární bariérou. Při výskytu specifického IgM můžeme odhalit nedávno proběhlou nebo právě probíhající infekci. V případě, že se tyto protilátky objeví u novorozeného dítěte, není možné, aby pocházely od matky (Kramář, 2007). IgM tvoří zhruba 10 % celkových imunoglobulinů séra a jejich koncentrace je 0,9–2,5 g/l (Lochmanová, 2014).

1.3.3 *Imunoglobulin A*

Imunoglobulin A (IgA) existuje ve dvou formách, jsou to slizniční a sérové imunoglobuliny. Molekuly IgA jsou ve velkých množstvích sekretované na povrchu sliznic, zde tvoří podstatnou část obrany před různými mikroorganismy (Hořejší a Bartůňková, 2009) Slizniční IgA se skládá ze dvou monomerů, které jsou spojené J řetězcem v dimer a součástí je ještě navíc sekreční složka (Lochmanová, 2014). Tyto dimery tedy slouží jako obrana před infekcí a jsou tak hlavním faktorem při ochraně před infekčními agens, které pronikají dýchacím, trávicím a urogenitálním traktem (Kramář, 2007).

Sérový IgA představuje monomer, dimer nebo trimer. Spojení mezi jednotlivými monomery pak zajišťuje opět J řetězec. IgA neaktivuje komplement, funguje jako opsonin. Rozlišujeme dvě podtřídy, IgA1 a IgA2. Izotyp IgA1 pochází zejména ze slizničních plazmatických buněk. IgA2 je produkován více v kostní dřeni (Hořejší a Bartůňková, 2009). Z celkového množství imunoglobulinů krevního séra asi 15 % tvoří IgA. V séru je jejich koncentrace 0,9–3,5 g/l (Lochmanová, 2014).

1.3.4 *Imunoglobulin E*

U třídy imunoglobulinů E (IgE) se někdy používá starší název reaginy. IgE nese zodpovědnost za alergické reakce a vytváří se také při různých parazitárních infekcích. Pokud dojde k navázání těchto imunoglobulinů na buňky, začne se uvolňovat histamin, a tím se rozvine časná alergická reakce (Kramář, 2007). U zdravých lidí je IgE v krvi přítomen jen ve velmi malém množství, zatímco u osob trpících atopií jeho koncentrace stoupá. Díky Fc fragmentu se IgE váže s vysokou afinitou na mastocyty a po interakci se specifickými antigeny (alergeny) uvolňují mediátory alergické reakce u vnímavých jedinců (Lochmanová, 2014).

1.3.5 *Imunoglobulin D*

Imunoglobuliny D (IgD) se nacházejí na povrchu B-lymfocytů (Kramář, 2007). Jejich přítomnost pak popisuje určitou fázi jejich vývoje a také se předpokládá, že se podílejí na diferenciaci těchto buněk. Jejich funkce není zatím zcela objasněna, ale v poslední době se naznačuje, že tento typ imunoglobulinů se zřejmě podílí na rozpoznávání gramnegativních bakterií, které způsobují onemocnění dýchacího traktu a jejich produktů. Obsah IgD v séru zdravých osob je pouze ve stopové množství (Lochmanová, 2014).

1.3.6 *Monoklonální protilátky*

Monoklonální protilátky představují chemická individua, tedy jednotné chemické látky (Ferenčík, 2005). Jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk. V organismu se vyskytují pouze nepatrná množství jednotlivých monoklonálních protilátek, ale za patologických okolností mohou naopak i převládat. K takovému stavu dochází v případě nádoru z plazmocyty. Vzniklý nádor označujeme jako plazmocytom (myelom), při kterém se nádorově změněná plazmatická buňka vymkne regulaci, ale schopnost produkovat protilátky je zachována (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Původním zdrojem monoklonálních protilátek je tzv. hybridom. Ten představuje speciální uměle vytvořenou buňku, která vznikla fúzí diferencovaného B-lymfocytu a myelomové buňky v laboratorních podmínkách (Krejsek et al., 2016). Výsledkem fúze mezi specifickým lymfocytem typu B a myelomem je tedy hybridní buňka, která roste ve tkáňové kultuře a produkuje stejné protilátky jako původní B-lymfocyt (Hořejší a Bartůňková, 2009). Hybridní buňky získají vlastnosti od obou rodičovských buněk. Díky

B-lymfocytům jim zůstane schopnost tvořit a vylučovat protilátky proti určitému Ag. Myelomové buňky pak zajišťují schopnost neustálého dělení a také jejich „nesmrtelnost“ (Ferenčík, 2005).

Monoklonální protilátky jsou základními složkami pro mnoho molekulárních imunologických výzkumů (Nelson et al., 2000). V současnosti je lze považovat i za velmi zásadní skupinu biologických léčiv, které mají nejrozšířenější využití v klinické praxi. Hlavní vlastností tohoto typu protilátek je jejich specifita, která se využívá právě při léčbě. Monoklonální protilátky mohou specificky rozpoznávat vždy pouze odpovídající Ag (Krejsek et al., 2016). Vážou se tedy pouze na jeden typ epitopu (Lochmanová, 2014). Tímto způsobem lze selektivně eliminovat solubilní makromolekuly, které mají velký význam pro patofyziologii některých chorob. Specifita lze využít také při obraně před některými infekčními původci (Krejsek et al., 2016).

1.3.7 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky vykazují multiepitopové vazebné vlastnosti, jsou tedy namířeny proti více epitopům Ag. Tato rozmanitost umožňuje větší citlivost a užitečnost jejich následného využití (Ascoli a Aggeler, 2018). Polyklonální je většinou protilátková odpověď i proti těm nejjednodušším antigenům. Výsledkem je směs tisíců odlišných molekul imunoglobulinů, produktů velkého množství různých klonů plazmatických buněk (Hořejší a Bartůňková, 2009). Polyklonální Ab lze získávat mnohem rychleji, s menšími náklady, a i s menšími technickými dovednostmi, než jaké jsou potřebné k výrobě monoklonální Ab (Lipman et al., 2005).

Polyklonální protilátky jsou připravovány ze séra zvířat, nejčastěji králíků, které jsou imunizovány lidskými imunoblasty (Lochmanová, 2014). Výsledkem záměrné imunizace experimentálního zvířete je pak polyklonální antisérum, které reaguje s celou řadou epitopů na určitém Ag (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2. Enzymová imunoanalýza

Enzymová imunoanalýza (EIA – z angl. Enzyme Immunoassay) je vysoce citlivá analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovit v neznámém vzorku koncentraci Ag nebo Ab (analytu). Velmi důležité je, že indikátorem metody je enzymový konjugát (Bartůňková a kol., 2011). Principem metody je tedy skutečnost, že komplex Ag a Ab (imunokomplex) je detekován sekundární Ab označenou enzymem (konjugát). Konjugát pak způsobí barevnou změnu substrátu v případě, že je vzorku přítomný Ag nebo Ab (Lochmanová, 2014). Dle povahy substrátu je možné imunochemickou reakci detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky (Bartůňková a kol., 2011).

Se zavedením tzv. EIA testů započalo období, kdy docházelo k značnému rozvoji různých imunochemických metod. Začalo se využívat vázání protilátek a antigenů na řadu nosičů a některé metody probíhaly i v tekutém prostředí. Byly také použity různorodé systémy enzymů a substrátů (Bartůňková a kol., 2011).

Příkladem používaného enzymu ke značení Ag nebo Ab je křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza (Lochmanová, 2014). Mezi faktory, které hrají zásadní roli, patří velikost molekuly enzymu a možnost pevné vazby se specifickým místem na protilátkové molekule. Křenová peroxidáza představovala velice snadno dostupný enzym. Ten měl ovšem poněkud velkou molekulu v porovnání s Ab typu IgG, proto se začala používat menší molekula alkalické fosfatázy. V současnosti se ale díky novým technologickým postupům podařilo vytvořit tak pevné vazby mezi specifickou Ab a enzymem, že křenová peroxidáza se používá prakticky ve většině běžných firemních souprav (Bartůňková a kol., 2011).

Metodu EIA můžeme dále rozdělit na homogenní a heterogenní enzymovou imunoanalýzu (Bartůňková a kol., 2011).

2.1 Homogenní enzymová imunoanalýza

Homogenní enzymová imunoanalýza nevyžaduje separaci volné a vázané frakce analytu, tedy Ag nebo Ab (Bartůňková a kol., 2011). Tato metoda je sice velice jednoduchá z hlediska provedení, ale méně citlivá. Využívá se hlavně ke stanovení různých nízkomolekulárních látek. Příkladem mohou být léky, drogy nebo hormony, které se v tělních tekutinách vyskytují v relativně vysokých koncentracích (Lochmanová, 2014).

2.2 Heterogenní enzymová imunoanalýza

Heterogenní enzymová imunoanalýza oproti homogenní enzymové imunoanalýze vyžaduje separaci volné a vázané frakce analytu. Tento typ EIA může být kompetitivní nebo nekompetitivní. Kompetitivní je metoda buď se značenou Ab, nebo se značeným Ag. V případě nekompetitivní metody může být značená pouze Ab (Bartůňková a kol., 2011).

Jednou z metod heterogenní EIA je metoda označovaná jako ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Lochmanová, 2014). Tato metoda je tedy speciálním druhem EIA. ELISA pak představuje buď heterogenní nekompetitivní EIA neboli sandwich nebo heterogenní kompetitivní EIA. V současnosti je většina metod založena právě na principu heterogenní kompetitivní EIA se značenou Ab (Bartůňková a kol., 2011).

3. ELISA

Metoda zvaná ELISA slouží ke stanovení antigenů nebo protilátek, kdy jedna ze složek imunochemické reakce, Ag nebo Ab je pevně adsorbována na povrchu pevné fáze (Lochmanová, 2014). Tato metoda tedy využívá základního imunologického konceptu vazby Ag na svou specifickou Ab. To pak umožňuje detekci velmi malého množství Ag, jako jsou proteiny, peptidy, hormony nebo Ab ve vzorku. ELISA využívá ke stanovení biologických molekul antigeny a protilátky značené enzymy, přičemž nejčastěji používanými enzymy jsou alkalická fosfatáza a glukózooxidáza. Antigeny v tekuté fázi jsou imobilizovány, a to obvykle v 96jamkové mikrotitrační destičce, kde přilnou ke stěnám jamek. Na antigeny se pak specificky vážou primární protilátky. Přidá se sekundární Ab spojená s enzymem, která reaguje s chromogenním substrátem a poskytuje tak viditelnou barevnou změnu pro následnou kvantitativní nebo kvalitativní detekci Ag (Gan a Patel, 2013).

Využívají se různé typy ELISA testů s modifikací základních postupů. Dle uspořádání reakce se dělí na kompetitivní a nekompetitivní metody. Kromě toho se dělí ještě na přímou a nepřímou ELISU (Gan a Patel, 2013).

3.1 Přímá ELISA

Přímou ELISU lze považovat za nejjednodušší formu této metody. Samotná metoda pak probíhá tak, že Ag se přidá k pevné fázi a při následné inkubaci se pasivně adsorbuje. Po inkubaci se při procesu promytí veškerý nevázaný Ag odmyje a poté opouští potaženou pevnou fázi. Přidají se protilátky specifické pro Ag a značené enzymem (konjugát) a opět se inkubují. Konjugát se váže s Ag na pevnou fázi a veškerý nevázaný (volný) konjugát je odplaven. Přidá se roztok substrátu/chromogenu a enzym katalyzuje reakci, čímž je získán barevný produkt. Reakce se po určité době zastaví a barva se kvantifikuje (odečte) pomocí spektrofotometru při vhodné vlnové délce pro produkovanou barvu (Crowther, 2000).

Tento druh systému má jistá omezení. Pokud je ale použit v této formě, má velký význam jako cílový systém v testech kompetice a inhibice, zvláště když jsou použity konjugované monoklonální protilátky (Crowther, © 2009).

3.2 Nepřímá ELISA

V případě nepřímé ELISA metody jsou první dva kroky podobné jako u přímé metody. Ag je tedy pasivně adsorbován na pevnou fázi během inkubace. Přidají se protilátky a inkubují se s Ag připojeným na pevnou fázi. Ty, které jsou specifické, se pak vážou na Ag. Přebytečné protilátky nebo nenavázané složky jsou po inkubační fázi odplaveny. Protilátky značené enzymem (konjugát) jsou namířené proti konkrétním druhům, ve kterých byly původní protilátky produkovány (anti-druhy protilátek). Ty se vážou na jakékoli protilátky, které jsou připojeny k Ag. Přebytek konjugátu se po určité době inkubace odmyje. Přidá se substrát/chromogen a barva se vyvíjí v důsledku přítomného enzymu. Po inkubační době se vývoj barev zastaví a odečte se spektrofotometrem (Crowther, 2000). Koncentrace primární Ab přítomné v séru přímo koreluje s intenzitou výsledného zbarvení (Gan a Patel, 2013).

Nepřímý systém je podobný přímému v tom, že Ag je připojen k pevné fázi a je „zaměřen“ přidanými protilátkami (detekující protilátky). Tyto přidané protilátky však nejsou značeny enzymem, ale samy o sobě jsou „terčem“ protilátek spojených s enzymem. Takové protilátky se produkují proti imunoglobulinům druhů, ve kterých se produkují detekující protilátky, a označují se jako anti-druhovému konjugátu. To umožňuje velkou flexibilitu při použití protidruhovému konjugátů v tom, že lze použít různé specifity konjugátu k detekci vazby konkrétního Ig v testu (Crowther, © 2009).

Nepřímá ELISA je výhodnou metodou, protože je možné vyšetřit libovolný počet antisér z hlediska vazby na daný Ag pomocí jediného protidruhovému konjugátu. Toho se využívalo v diagnostických aplikacích, zejména při zkoumání velkého počtu vzorků (Crowther, 2000). Nevýhodou je, že způsob imobilizace Ag nebo Ab je nespecifický (Gan a Patel, 2013). Jedním z problémů tohoto systému je tedy to, že má různý stupeň nespecifické vazby v jednotlivých sérech. Z toho pak vyplývá tendence rozšiřovat výsledky variability ve zkoušce, a proto se i zvyšuje potřeba zpracovávat mnoho sér pro posouzení spolehlivosti (Crowther, © 2009).

3.3 Kompetitivní ELISA

Principem kompetitivního („soutěživého“) ELISA testu je skutečnost, že známé množství značeného Ag soutěží s neznačeným stanovovaným Ag o limitované množství protilátky, která je vázaná na pevném nosiči (Lochmanová, 2014). Základem je tudíž kompetitivní vazba mezi Ag a imobilizovanou Ab (Gan a Patel, 2013). Stejný koncept funguje, pokud je imobilizovanou molekulou Ag a o vazbu pak soutěží značená Ab s neznačenou Ab (Kohl a Ascoli, 2017).

V současnosti je většina imunologických metod založena právě na principu kompetitivní ELISY se značenou Ab. Reakce probíhá tím způsobem, že Ab je navázána na pevnou fázi a po uskutečnění kompetitivní reakce a Ag v neznámém vzorku nastane rovnováha. Nenavázaný konjugát je pak odstraněn z reakční směsi promytím, zatímco konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a následně změřen (Bartůňková a kol., 2011).

Z praktického hlediska je na stěny jamek polystyrenové mikrotitrační destičky, která má standardně 96 jamek, vázána Ab proti Ag, který vyšetřujeme (Elvington et al., 2019). Ta může být navázána pouhou adsorpcí. Většina protilátek je však navázána chemicky, tedy pomocí různých vazeb (např. kovalentních). Místa, která na polystyrenu nejsou obsazena, se blokují inertní bílkovinou (např. albuminem). Do jamky se přidá naředitelný vzorek s obsahem Ag a inkubuje se po určitou dobu. Poté se složky, které nejsou navázány odmyjí a přidá se tzv. druhá Ab s navázaným enzymem (konjugát). Po skončení opětovné inkubace a promytí se reakce zviditelní díky přidání substrátu. Substrát je štěpen enzymem, který je navázán na druhou Ab a vzniklá barevná reakce se fotometricky změří (Bartůňková a kol., 2011).

Výhodou této metody je vysoká citlivost na rozdíly ve složení komplexních směsí antigenů, i když je specifická detekční Ab přítomna v relativně malém množství (Gan a Patel, 2013).

3.4 Nekompetitivní ELISA

Vícevrstevná nekompetitivní ELISA tzv. sendvičová metoda (sandwich ELISA) se využívá opět ke stanovení antigenů nebo protilátek. Metoda využívá pevnou fázi s navázanou Ab nebo Ag, které musí být vzhledem k analyzovanému analytu v nadbytku (Lochmanová, 2014).

Detekce protilátek sendvičovou metodou patří mezi nejpoužívanější ELISA techniky. V případě této metody je nejprve na pevnou fázi navázán Ag, na který se váže Ab. Po promytí se na navázanou Ab váže antiglobulin značený enzymem (antiglobulin musí být vždy druhově odlišný od stanovované Ab). Tímto způsobem vznikne „sendvič“. Po dalším promytí se provádí detekce enzymové aktivity komplexu, který je vázaný na pevnou fázi (Gan a Patel, 2013).

Tato modifikace se využívá např. pro průkaz HBsAg (Hepatitis B surface antigen), HBeAg (Hepatitis envelope antigen), AFP (alfa fetoprotein), protilátek proti cytomegaloviru, EB (Epstein-Barrové) viru nebo viru zarděnek (Lochmanová, 2014).

3.5 Přístrojové vybavení

Mezi základní vybavení ELISA metody patří především tzv. ELISA-reader. V podstatě jde o speciálně upravený spektrofotometr, který umožňuje měření barevné reakce, a to při různých vlnových délkách. Je také upravený na možnost odečítání přímo z mikrotitračních destiček (Bartůňková a kol., 2011).

V současnosti laboratoře využívají spíše tzv. ELISA procesory obsahující pipetovací blok na ředění vzorků, jejich aplikaci do mikrotitračních destiček a přidávání vlastních reagensů. Součástí je i blok pro promývání, inkubaci a odečítání včetně vyhodnocení. Takovéto systémy mohou být reagenčně otevřené, je tedy možné v nich zpracovávat soupravy od řady výrobců. Druhým typem jsou reagenčně uzavřené systémy. Ty umožňují zpracování souprav jen od jednoho výrobce. Uzavřené systémy představují spíše výjimku a používají se hlavně u speciálních reagensů. Mají ale výhodu v tom, že je díky nim možné zpracovávat jednotlivé parametry u jednotlivých pacientů (Bartůňková a kol., 2011).

3.6 Uplatnění metody

ELISA je rychlá a zároveň citlivá metoda (Lin, 2015). Používá se zejména jako běžný rutinní imunologický test pro stanovení mnoho specifických antigenů a pro monitorování protilátkových odpovědí (Plested et al., 2003). Kromě rutinního laboratorního použití se ELISA využívá v lékařském a potravinářském průmyslu jako diagnostický nástroj pro kontrolu kvality (Lin, 2015).

V imunologické laboratoři se ELISA metody používají hlavně ke stanovení proteinů (protilátek) vyskytujících se v nízkých koncentracích, tj. jsou pod detekční mez metod nefelometrických. Slouží také ke stanovení autoproti látek o známé specifitě. Mohou to být specifické protilátky proti očkovacím antigenům a infekčním mikrobiálním činitelům, virovým i parazitárním, nebo ke stanovení cytokinů a celé řady dalších látek (Bartůňková a kol., 2011).

Lze tedy říct, že tato metoda má uplatnění zejména jako analytický nástroj v biomedicínském výzkumu pro detekci a kvantifikaci specifických antigenů nebo protilátek v daném vzorku (Gan a Patel, 2013).

3.7 Diagnostika pomocí ELISA metody

ELISA metoda je velmi zásadní zejména při diagnostice biomarkerů (měřitelných indikátorů) širokého spektra onemocnění (Plested et al., 2003). Příkladem diagnostiky s pomocí ELISA metody může být stanovení různých autoproti látek nebo stanovení řady potravinových alergenů.

3.7.1 Stanovení autoproti látek

Stanovení antigenní specifity autoproti látek se provádí metodami, které jsou založené na průkazu specifické vazby mezi vyšetřovanou autoproti látkou a purifikovaným Ag fixovaným na pevné fázi vhodného detekčního systému. U metod ELISA slouží jako pevná fáze nejčastěji dno jamky mikrotitrační destičky vyrobené z povrchově modifikovaného polystyrenu. Vazba autoproti látky na Ag je detekována sekundární Ab. Ta pak specificky reaguje s vyšetřovanou autoproti látkou. Sekundární Ab je značená enzymem (křenuvátá peroxidáza, alkalická fosfatáza), který mění vhodný chromogenní substrát na produkt o určité barvě. Následně je barevná reakce kvantitativně vyhodnocena pomocí spektrofotometru nebo kolorimetru (Raška, 2013).

ELISA test se využívá např. při stanovení protilátek proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA protilátky) (Signoriny et al., 2007). Tyto autoprottilátky jsou asociovány s různými autoimunitními onemocněními. Metoda se používá jako pomocná metoda ke screeningu a diferenciaci zánětlivých autoimunitních onemocnění. (Raška, 2013) Příkladem takovýchto onemocnění může být systémový lupus erythematoses, smíšená onemocnění pojivových tkání, Sjögrenův syndrom, sklerodermie, polymyositida či dermatomyositida (Bartůňková et al., 2007).

3.7.2 Stanovení potravinových alergií

Potravinová alergie je jedním z nejčastějších problémů veřejného zdraví, kdy u alergických osob dochází k reakcím způsobeným bílkovinami, které označujeme jako alergeny. Bylo vyvinuto mnoho technik pro detekci i malých stop potravinových alergenů pro klinické nebo laboratorní účely. ELISA je jedním z nejlépe validovaných a nejběžněji používaných imunotestů ve výzkumu alergií, jejich diagnostice a při kontrole kvality související s alergiemi v různých průmyslových odvětvích (Konstantinou, 2017).

ELISA testy se považují za testy s vysokou citlivostí a specifitou. Většina imunochemických testů používá polyklonální nebo monoklonální IgG vyvinutý proti specifickému alergenu nebo vnitřním alergenním proteinům (např. v arašidech – Ara h1, Ara h2). Ty pak slouží právě k detekci a kvantifikaci alergenu. Výběr Ab může ovlivnit citlivost a specifitu daného stanovení (Do et al., 2018).

ELISA metody se tedy mohou zásadně lišit v kvantifikaci alergenu v konkrétní potravině. Kromě analytické variability metody, může být kvantifikace alergenu také ovlivněna povahou alergenu v potravině (Do et al., 2018)

Příkladem asi nejčastěji stanovovaných alergenů jsou alergeny nacházející se v mléce. ELISA souprava pro toto stanovení pak může cílit na β -laktoglobulin nebo jiný mléčný protein (např. kasein) (Do et al., 2018). Další velmi častou potravinou obsahující alergeny mohou být arašidy, u kterých bylo identifikováno celkem dvanáct alergenů (Becker a Jappe, 2014). Alergie může způsobit i ovoce. Může jít o běžné druhy ovoce např. jablko, broskev, jahodu nebo exotické ovoce např. kiwi, mango, granátové jablko (Hassan a Venkatesh, 2015).

3.8 Capture ELISA

Tzv. Capture ELISA je modifikovaná metoda sloužící k průkazu protilátek třídy IgM. Jde o poměrně komplikovanou, ale mnohdy jedinou metodu pro průkaz IgM protilátek v přítomnosti protilátek IgG stejné specifity (Lochmanová, 2014).

Samotný test probíhá tak, že na pevnou fázi jsou vázány protilátky anti-IgM, které na sebe vážou IgM z vyšetřovaného vzorku. Součástí postupu je promývání. Po prvním promytí se přidá příslušný Ag a po dalším promytí značená Ab proti vyšetřovanému Ag. Technika lze využít také ke specifickému průkazu protilátek ze třídy IgG, IgA nebo IgE bez interference ostatních tříd protilátek (Lochmanová, 2014).

3.9 CAP systém

CAP systém představuje speciální modifikaci EIA vyvinutou firmou Pharmacia. Využívá se především ke stanovení specifického IgE, ale i dalších analytů. Tento systém je považován za „zlatý standard“ pro vyšetření IgE, a to díky své specifitě a citlivosti (Bartůňková a kol., 2011).

Vysoké citlivosti systému bylo dosaženo použitím speciální hmoty k navázání Ag (alergenu) na pevnou fázi. Tato hmota posléze vytváří trámčinou strukturu, a tím i výrazně zvyšuje povrch, na který pak může být Ag navázán. Naopak nevýhodou systému je relativně nákladné a jednoúčelové zařízení na promývání nosičů antigenů a nákladný systém detekce (Bartůňková a kol., 2011).

4. Radioimunoanalýza

Historicky nejstaršími imunochemickými metodami jsou radioizotopové metody. Ke stanovení Ag se vždy použila Ab, která byla značená radioaktivním prvkem. Po následném vzniku precipitátu se díky promytí odstranily nadbytečné volné protilátky a v sedimentu zůstaly jen komplexy antigen-protilátka-izotop, které se pak detekovaly měřiči příslušného záření (gama nebo beta) (Bartůňková a kol., 2011).

Radioizotopové metody mají sice velkou citlivost a reprodukovatelnost, ale přesto začaly být nahrazovány. Důvodem byl fakt, že metody vyžadují Ab značenou radioizotopem, izotopové pracoviště a speciální měřicí techniku. Hlavní nevýhodou byla produkce izotopového odpadu (Bartůňková a kol., 2011).

Obecným principem radioimunoanalýzy (RIA) je kompetitivní imunochemická reakce (Berson a Yalow, 2006). K provedení RIA je nutná přítomnost Ag, komplementární Ab a radioaktivně značené verze Ag. Ag a Ab se inkubují společně, což umožňuje Ag vzorku vázat se na Ab. Poté se přidá radioaktivně značený Ag. Takto značený Ag následně „soutěží“ s Ag vzorku a vytěsňuje ho. Čím více je přítomného Ag vzorku, tím hůře je radioaktivně značený Ag schopen vázat se na Ab (Grange et al., 2014).

Tímto způsobem vzniknou celkem dva imunokomplexy (Berson a Yalow, 2006). Jde o komplex značeného Ag a Ab a neznačeného Ag a Ab. Čím je pak větší množství stanovovaného Ag ve vzorku, tím vznikne menší množství imunokomplexu, který je radioaktivně značený. Z toho vyplývá, že značené antigeny se nenavážou na protilátky díky nedostatku vazebných míst (Grange et al., 2014).

5. SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (z angl. severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) neboli koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem je nově identifikovaný koronavirus. SARS-CoV-2 patří do čeledi *Coronaviridae*, což jsou obalené jednovláknové RNA viry. Tento virus je zodpovědný za COVID-19 (z angl. coronavirus disease 2019), tedy tzv. koronavirové onemocnění (Asselah et al., 2020).

Koronaviry mohou infikovat širokou škálu obratlovců, včetně lidí. Vzhledem k podobnosti sekvencí s netopýry se v současné době předpokládá, že SARS-CoV-2 má zoonotický původ a sekundárně získal schopnost šíření mezi lidmi (Asselah et al., 2020).

Virus se šíří dýchací cestou, především kapénkami a kontaktem s kontaminovanými povrchy a předměty. Virus se může vyskytovat ve slinách, moči i ve stolici. Inkubační doba od propuknutí infekce po první příznak je obvykle 5-7 dní, s rozsahem až 14 dnů. Diagnóza aktuální infekce závisí na testech k detekci viru v různých tělesných tekutinách. K potvrzení prodělané infekce se používají protilátkové testy v krvi (Beeching et al., 2020).

Klinický obraz onemocnění COVID-19 zahrnuje řadu nespecifikovaných příznaků, jako je horečka, suchý kašel, dušnost, bolest hlavy, bolest svalů, únava, nevolnost, zvracení, průjem, bolesti břicha a ztráta čichu a chuti. Pacienti s COVID-19 mohou být klasifikováni jako asymptomatictí nebo symptomatictí. Příznaky se mohou lišit od mírných až po závažné a kritické. Těžký akutní respirační syndrom je častější u lidí s rizikovými faktory, jako je např. pokročilý věk či kouření. Vyšší riziko je také u lidí s přidruženými onemocněními. Mezi příklady takových onemocnění patří cukrovka, hypertenze, kardiovaskulární onemocnění, obezita, chronické onemocnění plic, onemocnění ledvin (Oliveira et al., 2020).

5.1 Diagnostika SARS-CoV-2

V diagnostice SARS-CoV-2 se využívá řada sérologických metod (Beeching et al., 2020). Jednou z takových metod je i ELISA, která představuje jednoduchý, rychlý a bezpečný test, kdy se testují vzorky séra nebo plazmy od infikovaných pacientů. Diagnóza pomocí testu ELISA je založena na detekci protilátek IgM a IgG proti SARS-CoV-2 nukleoproteinu Rp3 během počátečního stádia onemocnění COVID-19. Koronavirové neutralizační protilátky se zaměřují na S (Spike) protein, který zprostředkovává vstup viru do hostitelské buňky (Oliveira et al., 2020).

Bylo zjištěno, že reakce IgM na proteiny SARS-CoV-2 vrcholí čtyři týdny po nástupu příznaků a tři měsíce po nástupu příznaků již nejsou detekovatelné. Zatímco IgG byly detekovány kolem čtrnáctého dne po nástupu příznaků a zůstávají detekovatelné až 36 měsíců (Oliveira et al., 2020).

Sérologické testy jsou sice méně složité než molekulární testy a v porovnání např. s polymerázovou řetězovou reakcí spojenou s reverzní transkripcí (RT-PCR), která je zásadní pro diagnostiku SARS-CoV-2 také levnější, ale přesto je jejich užitečnost pro diagnostiku omezená (Asselah et al., 2020). Proto i navzdory výhodám použití techniky ELISA by neměly být sérologické testy používány k diagnostice akutní fáze onemocnění. Sérologická metoda by měla být použita v případě detekce možné předchozí infekce v rekonvalescentní fázi, pro retrospektivní hodnocení ohnisek, epidemiologické studie a diagnostiku asymptomatických pacientů (Oliveira et al., 2020).

Bylo však prokázáno, že pokud se sérologické testování provádí ve spojení s testováním pomocí RT-PCR, významně to zvyšuje citlivost detekce pacientů infikovaných SARS-CoV-2. Dále bylo také zjištěno, že použití všech hlavních antigenů SARS-CoV-2 má určitou diagnostickou hodnotu. Testy měřící celkovou reaktivitu protilátek mají nejvyšší citlivost. Kromě toho metody jako např. EIA nebo chemiluminiscenční imunoanalýza poskytují možnost charakterizovat humorální imunitní odpovědi izotypem. Kombinované využití detekce IgM a IgG pak vede k vyšší citlivosti, než která byla pozorována při detekci samotného izotypu (Espejo et al., 2020).

Ačkoliv byl IgA studován jen zřídka, bylo také prokázáno, že je citlivým markerem této infekce, a hladiny korelují se závažností onemocnění a neutralizační aktivitou protilátek. Toto zjištění ale vyžaduje ještě další důkladnější studie (Ma et al., 2020).

6. Cíl práce

Hlavní cíle práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- 1) Obecné seznámení s imunologickými metodami.
- 2) Zavedení a optimalizace metody ELISA s využitím fotometru DYNAREAD pro odečítání 96jamkových mikrotitračních destiček a softwaru AlaDYN.
- 3) Vyšetření celkem 8 zkušebních vzorků pomocí ELISA metody a následné zpracování získaných dat.

7. Metodika a materiály metody

Pro obecné zavedení a optimalizaci ELISA metody bylo zvoleno stanovení anti-SARS-CoV-2 pomocí kitu QuantiVac ELISA. Stanovovány byly protilátky třídy IgG a jako Ag byla použita doména S1 proteinu SARS-CoV-2 lidské buněčné linie HEK 293.

7.1 Stanovení anti-SARS-CoV-2 pomocí QuantiVac ELISA (IgG)

Enzymatický imunotest (ELISA) poskytuje kvantitativní in vitro stanovení lidských protilátek třídy IgG proti SARS-CoV-2 v séru, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), heparinizované nebo citrátové plazmě či ve vysušených krevních kapkách (DBS) na podporu diagnózy SARS-CoV-2 infekce a rovněž představuje doplněk přímé detekce patogenů. Kromě toho, sérologii lze použít ke sběru epidemiologických údajů a ke stanovení protilátek po očkování vakcínami na bázi S1/RBD (doména spikového proteinu/receptorová vazebná doména). Produkt je navržen k použití jako in vitro diagnostika a lze jej volitelně zpracovat na plně automatizovaném zařízení (Euroimmun, 2021).

7.2 Princip testu

Testovací souprava obsahuje proužky mikrotitrační destičky tzv. stripy po 8 odlomitelných jamkách, které jsou potažené rekombinantní S1 doménou spikového proteinu SARS-CoV-2. V prvním reakčním kroku se zředěné vzorky pacientů inkubují v jamkách. V případě pozitivních vzorků se na antigeny budou vázat specifické protilátky třídy IgG (IgA a IgM). K detekci vázaných protilátek se provede druhá inkubace za použití enzymem značeného anti-lidského IgG (enzymový konjugát), který katalyzuje barevnou reakci (Euroimmun, 2021).

Co se týká antigenu, tak reagenční jamky ELISA testu jsou potaženy doménou S1 proteinu SARS-CoV-2 exprimovaného rekombinantně v lidské buněčné linii HEK 293 (z angl. Human Embryonic Kidney cells – lidské embryonální ledvinové buňky) (Euroimmun, 2021).

7.3 Obsah testovací sady

- Mikrotitrační destička obsahující 96 mikrotitračních jamek, které jsou potažené antigeny (tj. 12 mikrotitračních stripů po 8 jednotlivě odlomitelných jamkách v rámečku).
- Kalibrátor 1: 120 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Kalibrátor 2: 80 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Kalibrátor 3: 40 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Kalibrátor 4: 20 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Kalibrátor 5: 10 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Kalibrátor 6: 1 RU/ml – IgG, lidský (červená barva s klesající intenzitou).
- Pozitivní kontrola: IgG, lidský (modrá barva).
- Negativní kontrola: IgG, lidský (zelená barva).
- Enzymový konjugát s obsahem anti-lidských IgG značených peroxidázou (zelená barva).
- Vzorkový pufr (světle modrá barva).
- Promývací pufr: 10x koncentrovaný (bezbarvý).
- Roztok chromogen/substrát: TBM/H₂O₂ (bezbarvý).
- Stop (zastavovací) roztok: 0,5 M kyselina sírová.
- Ochranná fólie

Veškerý obsah kitu byl již přímo připraven k použití. Bylo nutné připravit pouze promývací pufr, pro jehož zředění byla použita ještě destilovaná voda.

Testovací souprava musí být skladována při teplotě mezi +2 až +8 °C, chráněná před kontaminací a veškeré komponenty jsou po prvním otevření stabilní do uvedeného data expirace.

Testovací sada Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) a její obsah je součástí přílohy 1 (obr. 1,2).

7.4 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Čtečka (reader) mikrotitrační destičky – vlnová délka 450 nm, rozsah referenčních vlnových délek od 620 nm do 650 nm.
- Automatické pipety
- Vícekanálová pipeta – pipetování enzymového konjugátu, substrátu a zastavovacího roztoku.
- Pipetovací špičky
- Korýtko pro vícekanálovou pipetu
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin
- Eppendorfy
- Odměrný válec
- Termostat – inkubace mikrotitrační destičky při + 37 °C.
- Laminární box
- Stopky
- Ochranné pomůcky (rukavice, respirátor)

7.5 Příprava vzorků

Bylo použito 8 testovacích vzorků lidského séra. Mezi těmito vzorky séra byly jak vzorky, u nichž již před tímto stanovením byla detekována pozitivita, tak i takové, u kterých byla zjištěna negativita na prodělané onemocnění COVID-19.

Před samotným provedením testu bylo potřeba nejprve naředit jednotlivé vzorky séra se vzorkovým pufrům, a to v poměru 1:101. Vždy se tedy naředilo 10 µl séra s 1000 µl vzorkového pufru. Nařaděné vzorky přenesené do eppendorfek se pak důkladně promíchaly pomocí centrifugy Eppendorf MiniSpin. Takto nařaděné a promíchané vzorky séra byly připraveny k následnému stanovení.

Vzorkový pufr, kterým se jednotlivá séra ředila, je součástí přílohy 1 (obr. 3). Vzorky použitých sér před naředěním jsou zobrazeny v příloze 1 (obr. 4).

Dodání sér pacientů bylo zajištěno dodavatelem testovací sady, přičemž jednotlivé vzorky byly anonymizovány. O následnou bezpečnou likvidaci se rovněž postaral dodavatel.

7.6 Příprava promývacího pufru

Promývací pufr, který byl součástí sady, byl 10x koncentrovaný a musel se pro účel stanovení naředit. Nejprve bylo nutné pufr zahřát na 37 °C v termostatu. Před zředěním ho bylo potřeba dobře promíchat.

Požadovaný poměr pro ředění byl 1:10 s destilovanou vodou, tedy 1 díl promývacího pufru spolu s 9 díly destilované vody. Na jeden mikrotitrační strip je potřeba 5 ml koncentrátu + 45 ml destilované vody. Bylo proto připraveno 15 ml promývacího pufru + 135 ml destilované vody.

Promývací pufr je součástí přílohy 1 (obr. 3).

7.7 Pipetovací protokol

Pipetovací protokol mikrotitrační destičky byl použit pro mikrotitrační stripy s označením 1 až 2. Takto proběhla kvantitativní analýza 8 vzorků pacientů P₁ až P₈. Kalibrátory C₁ až C₆, pozitivní a negativní kontroly, jakož i vzorky, byly inkubovány každý v jedné jamce.

Pipetovací protokol slouží vlastně jako postup pro správné pipetování reagensů, v tomto případě jde o pipetování do jednotlivých mikrotitračních jamek. Musí tedy být vždy v souladu s metodikou stanovení.

Jak pozitivní, tak i negativní kontrola slouží jako vnitřní kontrola spolehlivosti daného testovací postupu. Kontroly by se měly vždy přezkoušet při každém testování.

Pipetovací protokol pro stanovení anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) je zhotoven v níže uvedené tabulce (tab. 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₁	P ₁										
B	C ₂	P ₂										
C	C ₃	P ₃										
D	C ₄	P ₄										
E	C ₅	P ₅										
F	C ₆	P ₆										
G	pos.	P ₇										
H	neg.	P ₈										

C₁ – kalibrátor 1

C₂ – kalibrátor 2

C₃ – kalibrátor 3

C₄ – kalibrátor 4

C₅ – kalibrátor 5

C₆ – kalibrátor 6

pos. – pozitivní kontrola

neg. – negativní kontrola

P₁ – vzorek pacienta 1

P₂ – vzorek pacienta 2

P₃ – vzorek pacienta 3

P₄ – vzorek pacienta 4

P₅ – vzorek pacienta 5

P₆ – vzorek pacienta 6

P₇ – vzorek pacienta 7

P₈ – vzorek pacienta 8

Tab. 1: Pipetovací protokol

7.8 Metodika stanovení

Prvním krokem pro manuální zpracování ELISA testu byla inkubace vzorků.

Podle pipetovacího protokolu (viz tabulka 1) bylo přeneseno 100 μl kalibrátorů, pozitivní a negativní kontroly a zředěných vzorků séra pacientů do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Takto připravenou testovací destičku bylo nutné přikrýt ochrannou fólií. Následovala inkubace destičky v termostatu při 37 °C, která trvala 60 minut.

Dalším krokem bylo promytí mikrotitrační destičky.

Nejprve byla odstraněna ochranná fólie, a jelikož se jednalo o manuální provedení, vyprázdnily se jamky a následně třikrát promyly 300 μl promývacího pufru. Zmíněných 300 μl bylo vždy pro každé jedno promytí. Promývání probíhalo tak, že promývací pufr byl ponechán v každé jamce po dobu cca 30 až 60 sekund. Po dokončení promývání byly jamky vyprázdněny. Důkladného odstranění veškeré kapaliny z jamek bylo docíleno poklepem destičky dnem vzhůru na absorpční papír. Tímto způsobem byl odstraněn veškerý zbytkový promývací pufr.

Druhým krokem byla inkubace konjugátu.

Do každé z jamek destičky bylo napipetováno 100 μl enzymového konjugátu (peroxidázou značený anti-lidský IgG). Destička byla opět zakryta ochrannou fólií a následovala inkubace v termostatu při 37 °C tentokrát po dobu 30 minut.

Následným krokem byl opět promývací cyklus.

Nejprve byla odstraněna ochranná fólie z mikrotitrační destičky. Vyprázdnily se jednotlivé jamky a promývání probíhalo stejným způsobem, jak je uvedeno výše.

Třetím krokem byla inkubace substrátu.

Do všech jamek destičky bylo napipetováno 100 μl chromogen/substrátového roztoku. Mikrotitrační destička chráněná před přímým slunečním světlem se pak nechala inkubovat 30 minut při pokojové teplotě (18 až 25 °C).

Čtvrtým krokem bylo zastavení reakce.

Napipetovalo se 100 µl stop roztoku do každé z jamek destičky, a to ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako byl pipetován chromogen/substrát roztoku. V tomto okamžiku dochází ke změně zbarvení obsahu mikrotitračních jamek.

Posledním krokem bylo měření.

Fotometrické měření intenzity zbarvení bylo provedeno při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 630 nm do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku. Před samotným měřením byla mikrotitrační destička mírně protřepána, aby bylo zajištěno homogenní rozložení roztoku.

Výsledná mikrotitrační destička se nachází v příloze 1 (obr. 8), kdy koncentrace přítomnosti Ab přímo koreluje s intenzitou výsledného zbarvení.

Jednotlivé úkony byly prováděny v laminárním boxu a též za použití dalších ochranných pomůcek.

7.9 Přístroj DYNAREAD

DYNAREAD představuje přístroj pro odečítání 96jamkových mikrotitračních destiček pro zpracování ELISA metod. Základem je odečítání optických absorbancí 96jamkových mikrotitračních destiček. Přístroj je vhodný pro in vitro diagnostiku (Dynex Technologies, © 2015).

Fotografie přístroje je v příloze 1 (obr. 6).

7.9.1 Popis přístroje

Co se týká parametrů přístroje, má rozsah vlnových délek 405–790 nm a je schopný měřit v rozsahu 0,000–4,000 OD (optická denzita). Optické parametry jsou charakterizovány 12 kanály a referenčním kanálem. Rychlost čtení pro jeden filtr je 10 sekund. Zdrojem světla je LED (elektroluminiscenční dioda) a ovládání přístroje je zajištěno externím PC (Dynex Technologies, © 2015).

DYNAREAD je vlastně automatický 12 kanálový fotometr. Jeho konstrukce umožňuje použití standardní 96jamkové mikrotitrační destičky. Měření je zprostředkováno díky řídicího počítače a ovládajícího softwaru (Dynex Technologies, © 2015) viz příloha 1 (obr. 5).

Na zadní straně přístroje je umístěn konektor sloužící k napájení, síťový vypínač a USB konektor k propojení s počítačem. Měřená mikrotitrační destička se vkládá do rámečku, který se vysouvá z přední strany přístroje. Destička se vkládá do rámečku při pohledu shora pro pozici jamky A₁ vlevo nahoře (Dynex Technologies, © 2015) viz příloha 1 (obr. 7).

7.9.2 Ovládání přístroje

Zapnutí přístroje se provede vypínačem, který se nachází v zadní části přístroje. Rozsvítí se zelená LED, ta indikuje zapnutí – symbol I (zapnuto), symbol 0 (vypnuto) (Dynex Technologies, © 2015).

Samotné měření optických denzit je řízeno příslušným softwarem, v tomto případě jde o software „AlaDYN“ (Dynex Technologies, © 2015).

7.10 Software AlaDYN

Software AlaDYN se využívá pro měření pomocí automatického přístroje DYNAREAND. V principu jde o softwarovou aplikaci, která slouží k ovládání přístroje, k provedení čtecí sekvence s vybraným nastavením a také k zobrazení výsledků čtení (Dynex Technologies, 2015).

7.10.1 Tvorba a editace testu

Základem je test neboli esej, což je kompletní soubor pokynů pro provoz čtečky mikrotitrační destičky. Tento soubor obsahuje informace o různých procesech sběru, výpočtu a hlášení dat, které mají být na mikrotitrační destičce provedeny (Dynex Technologies, 2015).

Při tvorbě nového testu se editor *Průvodce tvorby testu* spouští tlačítkem umístěným v nabídce *Panel nástrojů*. Po spuštění editoru se zobrazí pole *Nadpis testu*. Okno *Nadpis testu* zahrnuje pole, které je nutné vyplnit (Dynex Technologies, 2015).

Vyplňují se následující informace:

- *Zadejte nadpis testu* – zadává se zvolený název testu, tj. libovolný název s alfanumerickými znaky.
- *Napsal* – jméno tvůrce testu.
- *Heslo* – jde opět o alfanumerickou řadu znaků. Heslo je požadováno, pokud chce uživatel test upravit. Při spuštění programu však není heslo nutné.
- *Kód testu* – zahrnuje *Předponu* a *Příponu*. Používá se k označení kódu mikrotitrační destičky, která má být využita v testu.

V případě, že je zadána předpona, program zkontroluje začátek ID destičky s předponou v době běhu testu. Pokud je zadána přípona, program zkontroluje naopak konec ID destičky s příponou v době běhu.

- *Dokončit* – stisknutím tohoto tlačítka je veškerá editace testů sice dokončena, ale v danou chvíli testy nejsou uloženy.

Pro uložení testu je proto nutné vybrat *Uložit test jako*, ikonu umístěnou na *Menu panelu* a zadat název testu (Dynex Technologies, 2015).

Co se týká ovládání fotometru, nastavování testů a jejich parametrů se provádí v okně *Ovládání fotometru*. Toto okno se spouští ikonou v *Panelu nástrojů* (Dynex Technologies, 2015).

Přístroj DYNAREAD se používá k měření v režimu vlnových délek single/dual. Tohle je jediná možnost nastavení módu, kterou si lze vybrat v poli *Režim čtení*. Single mód představuje provedení pouze jedno čtení destičky a je zde použit testovací filtr. Dual mód pak znamená, že je použit testovací filtr a referenční filtr kvůli větší přesnosti a ke snížení příspěvku na pozadí mikrotitrační destičky (Dynex Technologies, 2015).

Single/Dual mód vlnové délky lze najít i v poli *Vlnové délky*, kde je důležité zvolit primární hlavní filtr a primární referenční filtr. Primární referenční filtr se volí v případě, že chce uživatel omezit chyby. Takové chyby mohou být způsobeny např. různými nečistotami nebo škrábanci na dně destičky v jamkách (Dynex Technologies, 2015).

Další pole sloužící k upřesnění nastavení parametrů je *Třepání*. Pro volbu této funkce je potřeba zaškrtnout pole *Povolit třepání*. V další fázi lze zvolit i délku třepání, a to v rozsahu 0–59 sekund a také režim třepání. Režim třepání se označuje módem (Dynex Technologies, 2015).

Mód třepání může být následující:

- Mód 1 o frekvenci 14 Hz a amplitudě 1,7 mm.
- Mód 2 o frekvenci 9 Hz a amplitudě 3 mm.
- Mód 3 o frekvenci 8 Hz a amplitudě 3 mm (Dynex Technologies, 2015).

Další možností pro nastavení třepání destičky je manuální nastavení, které lze nalézt v poli *Uživatelský režim třepání*. Uživatel si tak může nastavit vlastní amplitudu v rozsahu 1–10 mm a vlastní frekvenci v rozsahu 5–20 Hz. Tento režim je určen především pro experimentální účely (Dynex Technologies, 2015).

Šablona umožňuje označit polohu a typ vzorků, které budou na destičce měřeny. Okno se šablonou se spouští pomocí ikony v *Panelu nástrojů*. Šablona se využívá pro označení typu vzorku, který bude umístěn do různých jamek. Pro definování typu vzorku, který bude umístěn do každé konkrétní jamky, musí uživatel kliknout na přepínač pro požadovaný typ jamky a následně dvakrát kliknout na danou pozici jamky. V případě, že daná pozice nebude použita, musí uživatel zvolit *Odstranit* a poté kliknout na jamku (Dynex Technologies, 2015).

Šablona obsahuje celkem čtyři pole, u nichž lze nastavit požadované parametry.

Mezi tyto pole patří:

- *Typ jamky* – pakliže je definován typ jamky, jamka je označena tak, aby označovala typ a nejnižší nepoužité číslo pro tento typ. Ve většině případů se používá relativně strukturované pořadí, ale šablona umožňuje definovat jamky i na úplně náhodném základu.

Typ vzorku tedy závisí na kruhovém tlačítku vybraném v poli *Typ jamky*.

- *Opakování* – tato funkce slouží k označení, kdy vzorek má být umístěn do dvou či více jamek. Počet jamek, do nichž má být daný vzorek vložen, je číselně uveden v poli.
- *Orientace* – využívá se k označení požadované orientace replikátů, pokud je vzorek uspořádán do skupiny více než jednoho replikátu. Jde o řádky, sloupce či libovolnou orientaci.

- *Umístování v* – směr umístování se používá s příkazem *Vyplnit* k určení směru, ve kterém program vyplní šablonu. Lze vybrat umístování v řádcích nebo v sloupcích (Dynex Technologies, 2015).

Tlačítko *Vyplnit* umístí vzorek do každé pozice se začátkem v levém horním rohu označeném A_1 a končícím v pravém dolním rohu označeném H_{12} (Dynex Technologies, 2015).

Nachází se zde také tlačítko *Smazat vše*, díky kterému se vymažou všechna existující přiřazení jamek. Tím může dojít k předefinování šablony od začátku (Dynex Technologies, 2015).

Režim blanku se spouští pomocí ikony umístěné opět na *Panelu nástrojů*. Užitečný je pro vyloučení absorpance roztoku činidla z výsledku. Program je schopný uložit hodnotu OD tohoto roztoku činidla v paměti jako Blank hodnotu a odečte ji poté od ostatních hodnot jamek na destičce (Dynex Technologies, 2015).

Možné jsou dva režimy blanku. Je to buď režim bez blanku, nebo průměr. Režim *Bez blanku* indikuje, že útlum vzduchu by měl být použit jako referenční úroveň pro 100% přenos. Jde o výchozí režim blanku a prázdné vzorky nemusí být v šabloně definovány. *Průměr* vyžaduje jeden nebo více prázdných vzorků na šabloně. Všechny prázdné hodnoty OD jsou zprůměrovány a průměrná hodnota je odečtena od všech ostatních odečtů na mikrotitrační destičce (Dynex Technologies, 2015).

7.10.2 Zpracování dat

Zpracování dat zahrnuje kontrolu kvality primárních dat a editaci rovnic. Rovnice kvalitativních kontrol se používají k zadání kritérií pro správnost provedení testu. Takto jsou hodnoty OD buď přijaty, nebo odmítnuty pomocí kritérií jako je porovnání s kontrolní jamkou nebo s číselnou hodnotou (Dynex Technologies, 2015).

Optická denzita je v podstatě absorpance optického elementu při určité vlnové délce. Jedná se o bezrozměrný parametr, díky kterému můžeme zjistit množství pohlceného světla vzorkem.

Okno *Kontrola kvality primárních dat* obsahuje několik polí:

- *Rovnice* – toto pole se používá k zadání požadované rovnice pomocí operátorů uvedených v poli *Funkce*.
- *Popis chyby* – označuje chybovou zprávu, která by se měla zobrazit v případě, že neprošel test kontrol kvality dat.
- *Rovnice kontrol kvality* – představuje seznam generovaných rovnic, které jsou zpracovány v pořadí, v jakém jsou v seznamu uvedeny.
- *Funkce* – operátoři sloužící ke generování rovnice (Dynex Technologies, 2015).

Kvalitativní zpracování dat se používá k označení rozmezí pro vzorky, u nichž bude kvalitativní stanovení pozitivní nebo negativní podle parametrů testu. Pole *Kvalitativní zpracování* se spouští opět pomocí ikony na *Panelu nástrojů*. Kvalitativní zpracování dat se obvykle používá ke generování různých rovnic pro definování prahových podmínek určujících, zda je vzorek pozitivní či negativní (Dynex Technologies, 2015).

Záporný limit je stanoven pomocí: - *rovnice*.

Kladný limit je stanoven pomocí: + *rovnice*.

Významné je zpracování dat pomocí kalibrační křivky. Kalibrační křivka se používá, když program měří hodnoty OD pro řadu standardních vzorků o známých koncentracích. Pomocí odečtů se vytvoří graf, který je zásadní pro výpočet koncentrací testovaných vzorků (experimentální neznámé hodnoty). K vytvoření osy x grafu se používají čísla zadaná pro známé standardy. Osa y je vykreslena z hodnot OD ze známých standardů. Pro zpracování dat pomocí kalibrační křivky se volí pole *Kalibrační křivka*. (Dynex Technologies, 2015).

Záložka *Fity* se poté používá k vložení nebo výběru křivky v daném testu. Všechny existující fity jsou označeny v oblasti seznamu v poli *Fity*. Standardní křivky jsou běžně pojmenovány Fit_1 , Fit_2 atd. (Dynex Technologies, 2015).

Záložka *Standardy* se používá k definování různých standardů, které se používají právě k vytvoření fitů. Aby bylo možné používat funkci Kalibrační křivka, musí být nejprve vytvořen *Kontrolní seznam* obsahující jednotlivé standardy. Ty slouží k vytvoření standardní křivky (Dynex Technologies, 2015).

Záložka *Typ fitu* slouží k výběru toho, jak mají být data přizpůsobena. Typ fitu může být lineární, polygon nebo sigmoid. V poli *Volby výpočtu* může být zvoleno *Extrapolace povolena*. Extrapolace rozšiřuje graf za OD pro nejvyšší nebo naopak nejnižší známé datové body. Je obvykle vědecky platná z lineární regresní kalibrační křivky, ale ne ze sigmoidální kalibrační křivky (Dynex Technologies, 2015).

V poli zvaném *Osy* lze vybrat požadované osy ze čtyř možností:

- *Lin/Lin* – osy x a y jsou v lineární stupnici.
- *Log/Lin* – osy používají logaritmickou stupnici.
- *Log/Log* – osa x je graficky znázorněna v logaritmickém měřítku, zatímco osa y s hodnotami OD je graficky znázorněna v lineární stupnici.
- *Auto* – přístroj DYNAREAD automaticky vybere osy fitů (Dynex Technologies, 2015).

Záložka *Graf* se používá k zahrnutí grafu koncentrací do výsledků a definování způsobu jeho výstupu. Graf je zahrnut do výsledné zprávy zaškrtnutím tlačítka *Vytvořit graf*.

Záložka *Výběr* slouží k označení vzorků, které budou zahrnuty do následného výpočtu kalibrační křivky. Všechny vzorky (T₁–T₉₆) jsou zobrazeny v poli *Vzorky*. Vzorky obsažené v této křivce jsou uvedeny v poli *Kontrolní seznam*. Zaškrtnutím funkce *V grafu zobrazit body* bude každý bod zobrazen na grafu, a to dle vybraného formátu křivky (Dynex Technologies, 2015).

7.10.3 *Spuštění testu*

Posledním krokem je spuštění testu vedoucí ke shromáždění požadovaných dat pro další zpracování a analýzu (Dynex Technologies, 2015).

Před použitím systému je třeba provést ještě několik úkonů:

- Nejprve se musí zapnout hlavní vypínač umístěný na zadní straně přístroje DYNAREAD.
- Poté se spustí software AlaDYN pomocí ikony na ploše počítače. Následně přístroj provede automatický self-test neboli autotest.

Self-test představuje naprogramovanou sérii měření pro přípravu vlastního měření.

- Po provedení těchto úkonů je systém připraven k použití (Dynex Technologies, 2015).

Před měřením mikrotitrační destičky se musí ještě vybrat některé další podmínky testu. Podmínky jsou nastaveny v okně *Přečíst destičku*. (Dynex Technologies, 2015).

Mezi podmínky, které se určují, patří:

- *ID destičky* – je používáno jako dočasný název datového souboru mikrotitrační destičky, který je vytvořen na konci testu.
- *Operátor* – jméno osoby, která měření provádí.
- *Volby* – je zde možnost vybrat jen *Načíst soubor s ID*.
- *Testy* – slouží pro výběr testu, který má být v dané chvíli spuštěn.
- *Pozice první jamky* – označení jamky, od které má testování začínat.
- *Počet jamek* – hodnota vyjadřující, kolik jamek bude vyhodnoceno (Dynex Technologies, 2015).

Samotné spuštění testu se provádí pomocí tlačítka *Přečíst destičku* na pracovní ploše a následným stisknutím tlačítka *Start*. Výsledky pak mají požadovaný formát společně s výpočty zahrnutými v naprogramovaném testu. Co se týká zpracování výsledků, tak výsledky měření se zobrazí na pracovní ploše a jsou dále zpracovány jako protokol (Dynex Technologies, 2015).

8. Výsledky

Veškeré měření bylo zajištěno pomocí již zmíněného fotometru DYNAREAD a naměřené výsledky byly zpracovány softwarem AlaDYN.

Režim filtrů byl nastaven takovým způsobem, aby hlavní filtr měřil při vlnové délce 450 nm a referenční filtr při vlnové délce 630 nm. Pro režim třepání byl zvolen mód 1 o frekvenci 14 Hz a amplitudě 1,7 mm.

Rovnice kontrol kvality je ve formě $PC > NC$, tedy $1,501 > 0,185$. Pozitivní kontrola s hodnotou 1,501 představuje větší hodnotu než negativní kontrola s hodnotou 0,185. Jde o hodnoty OD. Pokud by rovnice nebyla v této formě, proběhl by test neúspěšně.

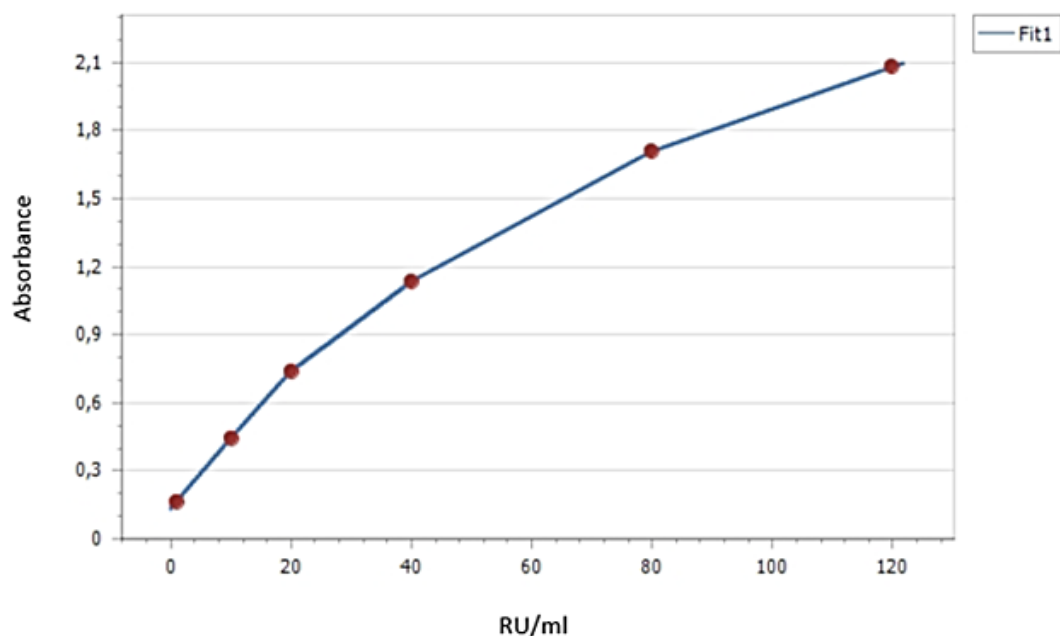
V níže uvedené tabulce (tab. 2) jsou uvedeny hodnoty všech naměřených OD zahrnující kalibrátory (A_1 – F_1), pozitivní a negativní kontrolu (G_1 a H_1) a vzorky séra pacientů (A_2 – H_2).

	1	2
A	2,079	1,030
B	1,707	0,053
C	1,133	1,448
D	0,738	0,059
E	0,441	0,048
F	0,164	0,201
G	1,501	1,269
H	0,185	0,978

Tab. 2: Hodnoty optických denzit

Jelikož šlo o kvantitativní vyhodnocení ELISA metody, proběhlo zpracování dat pomocí kalibrační křivky. Ta má využití právě v případě, že jsou měřeny hodnoty OD pro řadu kalibračních vzorků o známých koncentracích. Vytvořením takového grafu lze pak vypočítat koncentrace vzorků, které jsou testovány.

Níže přiložený graf (graf 1) znázorňuje kalibrační křivku, kdy osa x představuje známé hodnoty koncentrací kalibrátorů s relativními jednotkami na mililitr (1, 10, 20, 40, 80, 120 RU/ml). Osa y je vytvořena z hodnot OD (absorbancí) známých kalibrátorů a jak již bylo zmíněno, jedná se o bezrozměrnou veličinu, tudíž je bez jednotek (0,164; 0,441; 0,738; 1,133; 1,707; 2,079). Osy byly vybrány s označením Lin/Lin, tedy osa x a y jsou v lineární stupnici. Tato standardní křivka je pojmenována Fit₁ a typ fitu byl zvolen lineární s extrapolací dat.



Graf 1: Kalibrační křivka

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Koncentrace (RU/ml)
S ₁	A ₁	2,079	120,000
S ₂	B ₁	1,707	80,000
S ₃	C ₁	1,133	40,000
S ₄	D ₁	0,738	20,000
S ₅	E ₁	0,441	10,000
S ₆	F ₁	0,164	1,000

Tab. 3: Hodnoty kalibrátorů

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Koncentrace (RU/ml)
PC ₁	G ₁	1,501	65,603
NC ₁	H ₁	0,185	1,683

Tab. 4: Hodnoty pozitivní a negativní kontroly

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Koncentrace (RU/ml)
T ₁	A ₂	1,030	34,771
T ₂	B ₂	0,053	-2,595#
T ₃	C ₂	1,448	61,931
T ₄	D ₂	0,059	-2,394#
T ₅	E ₂	0,048	-2,747#
T ₆	F ₂	0,201	2,222
T ₇	G ₂	1,269	49,479
T ₈	H ₂	0,978	32,149

Tab. 5: Hodnoty vzorků séra

Tabulka 3 znázorňuje naměřené hodnoty týkající se použitých kalibrátorů. Je zde uvedeno ID vzorku, tj. dočasný název souborů mikrotitrační destičky. V tomto případě jde o značení S₁–S₆. Dále je uvedeno umístění vzorků kalibrátorů na mikrotitrační destičce A₁–F₁.

Důležitými hodnotami jsou pak OD a koncentrace s jednotkami RU/ml. Je zřejmé, že měření probíhalo od kalibrátoru s nejvyšší koncentrací (120 RU/ml) po nejnižší koncentrací (1 RU/ml). Tomu odpovídají i sestupující hodnoty OD, kdy první vzorek kalibrátoru S₁ má hodnotu OD 2,079 a u posledního vzorku S₆ byla naměřena OD 0,164. To lze porovnat i s postupně snižující se intenzitou žlutého zbarvení výsledné mikrotitrační destičky viz příloha 1 (obr. 8).

Hodnoty v tabulce 4 nesou opět stejné označení jako je v tabulce 3 s rozdílem, že se jedná o naměřené hodnoty pozitivní a negativní kontroly. ID vzorku pozitivní kontroly má označení PC₁, zatímco vzorek negativní kontroly je označen zkratkou NC₁. Umístění v mikrotitrační destičce má označení G₁ a H₁.

U pozitivní kontroly o koncentraci 65,603 RU/ml byla naměřena OD 1,501. Negativní kontrole o koncentraci 1,683 RU/ml odpovídá hodnota OD 0,185. Toto je zřejmé také z výsledné mikrotitrační destičky v příloze 1 – obr. 8, kdy jamka pozitivní kontroly má žluté zbarvení na rozdíl od negativní kontroly. Měření uvedených hodnot probíhá vždy, a to pro posouzení spolehlivosti daného postupu.

Tabulka 5 je v principu stejná jako dvě předchozí tabulky, jen se jedná již o samotné vzorky testovaných sér. ID vzorků je značeno T₁–T₈ s umístěním na mikrotitrační destičce A₂–H₂. Nejzásadnější jsou ovšem hodnoty jejich naměřených OD a koncentrací, díky nimž poté můžeme detekovat vzorky pacientů, u nichž byly prokázány protilátky třídy IgG proti SARS-CoV-2 a ty, které protilátky vytvořené nemají, tudíž onemocnění COVID-19 v nejbližších zhruba 3 měsících neprodělali.

Z tabulky je patrné, že první vzorek (T₁) s hodnotou OD 1,030 má hodnotu koncentrace 34,771 RU/ml, tzn. jde o pozitivní vzorek séra na přítomnost protilátek IgG anti-SARS-CoV-2. Vzorek T₂ s OD 0,053 a koncentrací -2,595 RU/ml je negativní. T₃ s OD 1,448 má koncentraci 61,931 RU/ml, je proto pozitivní. Čtvrtý a pátý vzorek jsou negativní, kdy T₄ s OD 0,059 má koncentraci -2,394 RU/ml a T₅ s OD 0,048 má koncentraci -2,747 RU/ml. Vzorek označený T₆ vyšel jako pozitivní, a to s OD 0,201 a koncentrací 2,222. Poslední dva vzorky fotometr vyhodnotil také jako pozitivní.

U vzorku T₇ byla naměřena hodnota OD 1,269 a koncentrace 49,479 RU/ml a u T₈ to je OD 0,978 s koncentrací 32,149 RU/ml.

V praxi by tři zmíněné záporně naměřené hodnoty koncentrací validní nebyly a měření by muselo proběhnout opakovaně. Přístroj vyhodnotil výsledky v záporných hodnotách zřejmě z důvodu, že sérum nebylo čerstvé. Došlo proto ke zkreslení výsledku.

Testované vzorky poskytnuté dodavatelem kitu byly již analyzovány jinou metodou v diagnostické laboratoři (firma neuvedla o jakou metodu šlo). Deklarované výsledky jsou uvedeny níže (tab. 6), kde jsou porovnány s výsledky vlastního měření. Jednotlivé vzorky pacientů nesou označení P₁–P₂ a výsledek byl poskytnut pouze ve formě kvalitativního hodnocení, tj. pozitivní/negativní. Vzorek T₆ představuje pozitivní výsledek vlastního měření, zatímco deklarovaný výsledek má být negativní na přítomnost protilátek anti-SARS-CoV-2.

Výsledky můžeme také opět porovnat s výslednou mikrotitrační destičkou viz příloha 1 (obr. 8). Pozitivní vzorky T₁, T₃, T₇ a T₈ jsou zbarveny žlutě, zatímco negativní vzorky T₂, T₄, T₅ jsou bezbarvé. Vzorek T₆ má lehce nažloutlou barvu.

Z takovýchto výsledků pak lze usoudit, že z celkem 8 testovaných sér pacientů se u 5 vzorků přítomnost protilátek potvrdila.

Vzorek pacienta	Deklarované výsledky	Výsledky vlastního měření
P ₁	Pozitivní	Pozitivní
P ₂	Negativní	Negativní
P ₃	Pozitivní	Pozitivní
P ₄	Negativní	Negativní
P ₅	Negativní	Negativní
P ₆	Negativní	Pozitivní
P ₇	Pozitivní	Pozitivní
P ₈	Pozitivní	Pozitivní

Tab. 6: Porovnání výsledků

Všechny výsledky ve formě protokolu jsou kompletně shrnuty také v příloze 2 (protokol 1, protokol 2). Jsou zde také objasněny použité znaky u hodnot jednotlivých koncentrací, které jsou součástí tabulky 5.

9. Diskuse

Pomocí testovací sady QuantiVac ELISA se podařilo stanovit protilátky třídy IgG proti SARS-CoV-2 v lidském séru. Antigeny, které byly součástí mikrotitračních jamek představovaly doménu S1 proteinu SARS-Cov-2 exprimovaného rekombinantně v lidské buněčné linii HEK 293.

Veškerá laboratorní práce byla prováděna v laboratoři ZSF za použití přístroje DYNAREAD, díky němuž proběhl odečet intenzity zbarvení jednotlivých vzorků včetně kalibrátorů, pozitivní a negativní kontroly a vzorků lidských sér. Export dat a jejich detailní zpracování pak proběhlo pomocí speciálního softwaru AlaDYN.

Měření vzorků kalibrátorů, podle kterých byla sestrojena kalibrační křivka a vzorky pozitivní a negativní kontroly slouží ke kontrole spolehlivosti stanovení. Z naměřených hodnot vyplývá, že měření proběhlo v pořádku.

Jelikož vzorky sér od dodavatele již prošly jedním stanovením, byla zde kontrola pro případ, že by měření přístroje neproběhlo správně. Z celkem osmi testovaných sér bylo pět vzorků pozitivních na přítomnost protilátek anti-SARS-CoV-2 třídy IgG a tři vzorky negativní. Tři hodnoty koncentrací negativních vzorků však vyhodnotil fotometr v záporných hodnotách. Tato skutečnost je s největší pravděpodobností způsobena tím, že sérum nebylo čerstvě odebrané, ale delší dobu skladované. To zřejmě způsobilo zkreslení daných výsledků. Po konzultaci s pracovníky oddělení lékařské mikrobiologie (sérologický úsek) v Nemocnici Tábor, a.s. bylo zjištěno, že v takovém případě by bylo nutné měření zopakovat. V této situaci však opakování nemělo význam vzhledem k překročení doporučené délky skladování sér.

Z tabulky 6 je také zřejmé, že výsledky u vzorku P₆ se neshodují. Deklarovaný výsledek byl negativní na přítomnost protilátek, ale výsledek vlastního měření metodou ELISA vyšel jako pozitivní. Je patrné, že výsledek nelze považovat za validní, protože ve srovnání se skutečně pozitivními výsledky je i naměřená hodnota OD mnohem nižší, ovšem lehce nad hodnotou OD negativní kontroly. Tato nesrovnalost může být opět připsána poměrně dlouhému skladování séra.

Podle Dua et al. (2020) v případě porovnání protilátek třídy IgG a IgM lze říct, že pacienti, u nichž byla detekována přítomnost protilátek IgG, jsou chráněni proti opakované infekci, a to po určitou dobu. Podle řady studií jde o dobu zhruba 3 měsíců. Protilátky IgM poukazují na právě probíhající infekci. Můžeme tak také zjistit riziko schopnosti přenosu nákazy.

I přes zmíněné nesrovnalosti se metoda ELISA osvědčila, hlavně z důvodu jejího snadného a nenáročného provedení. V principu jde o jednoduchou metodu, a to jak z hlediska praktického provedení, tak i následného měření mikrotitrační destičky, tj. ovládání fotometru a softwaru.

Všechna činidla nutná ke stanovení byla již připravena v testovací soupravě, bylo potřeba připravit pouze promývací pufr a naředit vzorky sér. Praktické provedení mělo jasně daný postup včetně pipetovacího protokolu. Nevýhodou byla pouze časová náročnost, a to z důvodu inkubace a promývání mikrotitrační destičky. Inkubace mikrotitrační destičky probíhala celkem třikrát, 60 minut v termostatu, 30 minut v termostatu a poté ještě jednou 30 minut při pokojové teplotě. Promývání se provádělo manuálně, ale pro urychlení zpracování se v praxi využívá spíše automatické promývání pomocí automatické promývačky mikrotitračních destiček. Celkový čas analýzy byl zhruba 4,5 hodiny, a to od přípravy roztoků a vzorků sér až po výsledné měření mikrotitrační destičky.

Zacházení s přístrojem DYNAREAD také nebylo složité. Náročnější je pouze práce se softwarovou aplikací AlaDYN, konkrétně vytvoření kompletního souboru pokynů pro provoz čtečky mikrotitrační destičky. Následné spuštění a měření proběhlo téměř okamžitě. Dle mého názoru by se metodě dal vytknout jen výstup, který je ve formě protokolu. Jeho součástí by mohlo být ještě porovnání jednotlivých výsledků a názorné vyznačení hodnot pozitivních či negativních na přítomnosti protilátek.

Dle Oliveira et al. (2020) se metoda ELISA využívá spíše u asymptomatických pacientů, v případě potvrzení předchozí infekce či v různých epidemiologických studiích. Pro hodnocení akutní fáze onemocnění vhodná tedy není. Pro takové stanovení je významnější RT-PCR, kdy dochází k detekci virové RNA. Je ale možné, že citlivost detekce se významně zvýší kombinací sérologického stanovení a RT-PCR.

Co se týká diagnostiky protilátek anti-SARS-CoV-2, je tedy sérologický test ELISA sice méně složitý i levnější než různé molekulární testy, avšak má oproti nim řadu omezení.

Cena použité sady anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) včetně 96jamkové destičky byla 11 510 Kč (bez DPH). To je cca 130 Kč za jeden vzorek (počítáno bez kalibrátorů, pozitivní a negativní kontroly). Z finančního hlediska i časové náročnosti je tedy samozřejmě vždy výhodnější stanovit více vzorků najednou na jedné mikrotitrační destičce.

10. Závěr

V rámci teoretické části bakalářské práce proběhlo bližší seznámení s imunologickými metodami, především s metodou ELISA. V praktické části byla metoda ELISA zavedena a optimalizována s využitím přístroje DYNAREAD pro odečítání 96jamkových mikrotitračních destiček a softwarové aplikace AlaDYN. Zkušební měření proběhlo pomocí testovací sady QuantiVac ELISA. Byly tak stanoveny protilátky anti-SARS-CoV-2 třídy IgG. Měření probíhalo na celkem 8 zkušebních vzorcích a následně proběhlo zpracování získaných dat.

Obecně ELISA test tedy představuje poměrně rychlou, citlivou a zároveň jednoduchou metodu, která má široké spektrum využití, až už jde o diagnostiku nejrůznějších onemocnění či laboratorní výzkum. Pro každé stanovení se pak hodí jiný typ nebo speciální modifikace této metody, přičemž v praxi má každá své výhody i nevýhody.

Závěrem lze říct, že výsledky ELISA testu s použitím fotometru DYNAREAD a softwaru AlaDYN jsou validní jen do jisté míry. Výjimku představují čtyři hodnoty, u nichž se projevilo zkreslení výsledku z důvodu delšího skladování séra. I přes tyto nesrovnalosti se hlavní cíl práce, tedy zavést a optimalizovat metodu ELISA podařilo splnit. Podle mého názoru zavedená metoda je tedy použitelná a vhodná pro odbornou výuku, klinickou praxi i výzkum.

11. Literatura

- ASCOLI, C. A., AGGELER, B., 2018. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*. 65(3), 127-136, doi: 10.2144/btn-2018-0065.
- ASSELAH, T., DURANTEL, D., PASMANT, E., LAU, G., SCHINAZI, R. F., 2020. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol*. Jan;74(1):168-184. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.031.
- BARTŮŇKOVÁ, J. a kol., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3533-7.
- BARTŮŇKOVÁ, J. et al., 2007. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-2044-9.
- BECKER, W. M., JAPPE, U., 2014. Peanut allergens. *Chem Immunol Allergy*. 100:256-67. doi: 10.1159/000359916.
- BEECHING, N. J., FLETCHER, T. E., BEADSWORTH, M. B. J., 2020. Covid-19: testing times. *British medical journal*. Apr 8;369:m1403. doi: 10.1136/bmj.m1403.
- BERSON, S. A., YALOW, R. S., 2006. General principles of radioimmunoassay. 1968. *Clinica chimica acta*. 23;369(2):125-43. doi: 10.1016/j.cca. 2006.05.002.
- BUC, M., 2009. *Základná a klinická imunológia*. Bratislava: Univerzita Komenského Bratislava. ISBN 978-80-223-2579-0.
- CROWTHER, J. R., 2000. The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology*. 149: III-IV, 1-413, doi: 10.1385/1592590497.
- CROWTHER, J. R., © 2009. The ELISA guidebook. Second edition. [online]. Vienna: International Atomic Energy Agency, Animal Production & Health Section. Vol 516. [cit. 2020-12-11] doi: 10.1007/978-1-60327-254-4_2 Dostupné z: https://www.academia.edu/28214346/John_R_Crowther_The_ELISA_Guidebook_2E_pdf
- DO, A. B., KHUDA, S. E., SHARMA, G. M., 2018. Undeclared Food Allergens and Gluten in Commercial Food Products Analyzed by ELISA. *J AOAC Int*. Jan 1;101(1):23-35. doi: 10.5740/jaoacint.17-0384.
- DU, Z., ZHU, F., GUO, F., YANG, B., WANG, T., 2020. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J Med Virol*. Oct;92(10):1735-1738. doi: 10.1002/jmv.25820.
- DYNEX, TECHNOLOGIES, 2015. *Přístroj pro odečítání 96 jamkových mikrotitračních destiček pro zpracování ELISA metod – Uživatelský manuál pro software*. Praha: DYNEX TECHNOLOGIES. 37 s.

- ELVINGTON, M., LISZEWSKI, M. K., LISZEWSKI, A. R., KULKARNI, H. S., HACHEM, R. R., MOHANAKUMAR, T., KIM A. H. J., ATKINSON, J. P., 2019. Development and Optimization of an ELISA to Quantitate C3 (H₂O) as a Marker of Human Disease. *Frontiers in Immunology*. 4; 10:703. doi: 10.3389/fimmu.2019.00703.
- ESPEJO, A.P., AKGUN, Y., AL MANA, A.F., TJENDRA, Y., MILLAN, N. C., GOMEZ-FERNANDEZ, C., CRAY, C., 2020. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol*. Aug 5;154(3):293-304. doi: 10.1093/ajcp/aqaa112.
- EUROIMMUN, 2021. *El_2606-10G_A_UK_C02*, Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG).
- FERENČÍK, M., 2005. *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha: Grada. ISBN 8024711966.
- GAN, S. D., PATEL, K. R., 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*. 133 (9), e12, doi: 10.1038/jid.2013.287.
- GRANGE, R. D., THOMPSON, J. P., LAMBERT, D. G., 2014. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth*. Feb;112(2): 213-6, doi: 10.1093/bja/aet293.
- HASSAN, A. K., VENKATESH, Y. P., 2015. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. Nov;47(6):180-7. PMID: 26549334.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ J., 2009. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- KOHL, T. O., ASCOLI, C. A., 2017. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*. Jul 5;2017(7):pdb.prot093740. doi: 10.1101/pdb.prot093740.
- KONSTANTINOOU, G. N., 2017. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods in molecular biology*. 1592:79-94. doi: 10.1007/978-1-4939-6925-8_7.
- KRAMÁŘ, R., 2007. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. ISBN 9788073940218.
- KREJSEK, J. et al., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon, ISBN 978-80-86472-74-4.
- LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J., WEIS-GARCIA, F., 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*. 46(3):258-68. doi: 10.1093/ilar.46.3.258.

- LIN, A. V., 2015. Direct ELISA. *Methods in molecular biology*. 1318: 61-7. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_6.
- LOCHMANOVÁ, A., 2014. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě. ISBN 978-80-7464-570-9.
- MA, H., ZENG, W., HE, H., ZHAO, D., JIANG, D., ZHOU, P., CHENG, L., LI, Y., MA X., JIN, T., 2020. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol*. Jul;17(7):773-775. doi: 10.1038/s41423-020-0474-z.
- NELSON, P. N., REYNOLDS, G. M., WALDRON, E.E., WARD, E., GIANOPOULOS, K., MURRAY, P. G., 2000. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*. Jun;53(3):111-7. doi: 10.1136/mp.53.3.111.
- OLIVEIRA, B. A., OLIVEIRA, L. C., SABINO, E. C., OKAY, T. S., 2020. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Jun 29;62: e44. doi: 10.1590/S1678-9946202062044.
- PLESTED, J. S., COULL P. A., GIDNEY M. A. J., 2003. ELISA. *Methods in molecular medicine*. 71: 243-61. doi: 10.1385/1-59259-321-6:243.
- Přístroj pro odečítání 96 jamkových mikrotitračních destiček pro zpracování ELISA metod – Příručka pro obsluhu a údržbu přístroje*, 2015. [online] © Revidováno 2015 DYNEX TECHNOLOGIES, spol. s r. o. [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: https://www.dynex.cz/data/machines/dynaread_user_manual_1.04_cz.pdf
- RAŠKA, M. a kol., 2013. *Imunologické vyšetřovací metody pro studenty LF UP v Olomouci*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3430-8.
- SIGNORINI, S., KUTSCHERA, I., CAPUANO, F., LATTUADA, L., 2007. ENA screen chemiluminescence immunoassay: a random access method in autoimmunology. *Ann N Y Acad Sci*. 1109:240-4. doi: 10.1196/annals.1398.029.
- TOMAN, M. a kol., 2009. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2464-5.

12. Seznam zkratek

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
COVID-19	Koronavirové onemocnění 2019 (z angl. Coronavirus disease)
EIA	Enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme Immunoassay)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fab	Fragment antibody binding
Fc	Fragment crystallizable
H	Těžký řetězec (z angl. heavy)
Ig	Imunoglobulin
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
L	Lehký řetězec (z angl. light)
OD	Optická denzita
RIA	Radioimunoanalýza (z angl. Radioimmunoassay)
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
S	Spikový protein
SARS-CoV-2	Koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus)

13. Přílohy

Příloha 1

Obrázek 1: Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG)

Obrázek 2: Obsah testovací sady

Obrázek 3: Vzorkový pufr, promývací pufr

Obrázek 4: Vzorky sér

Obrázek 5: Přístroj DYNAREAD, řídicí počítač

Obrázek 6: Přístroj DYNAREAD

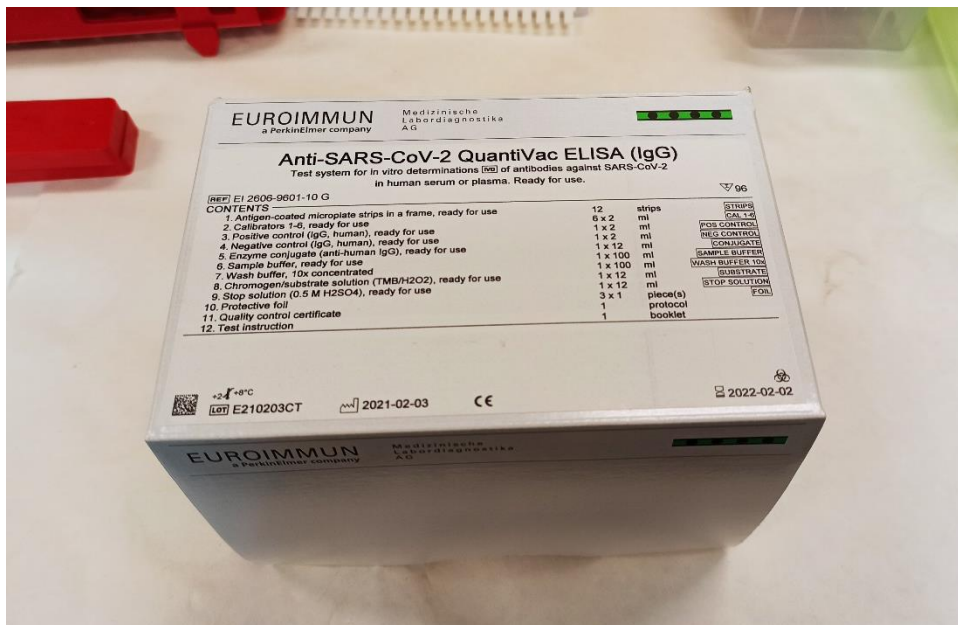
Obrázek 7: Přístroj DYNAREAD, rámeček pro vložení mikrotitrační destičky

Obrázek 8: Výsledná mikrotitrační destička

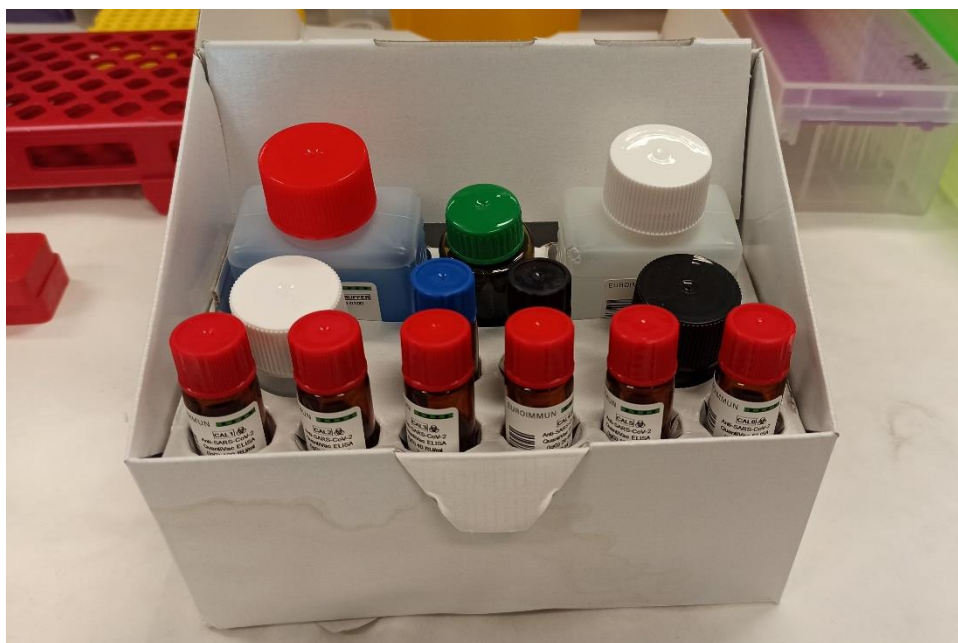
Příloha 2

Protokol 1: Dynex AlaDYN – výsledky měření

Protokol 2: Dynex AlaDYN – výsledky měření



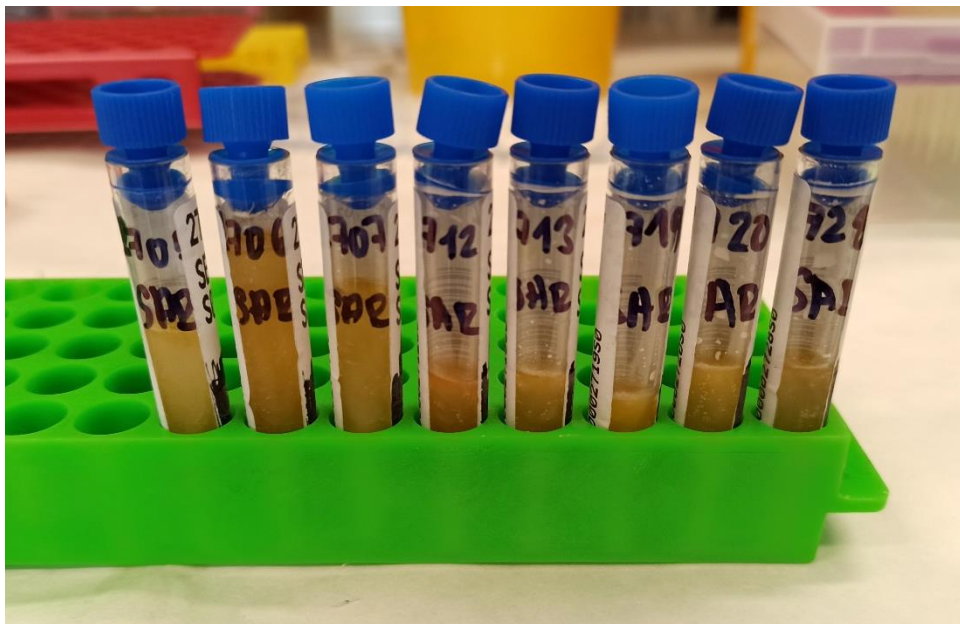
Obr. 1: Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG)



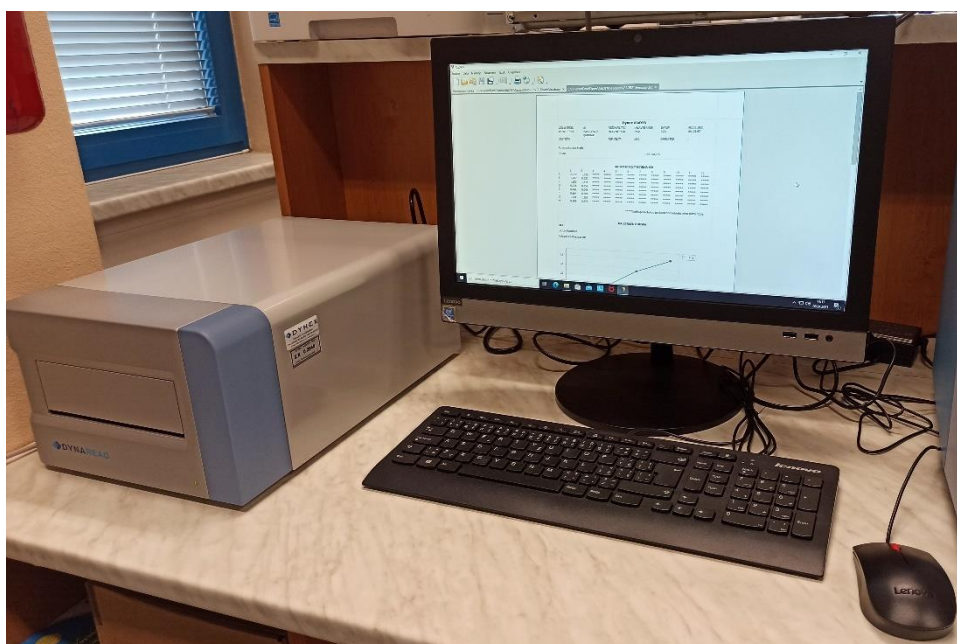
Obr. 2: Obsah testovací sady



Obr. 3: Vzorkový pufr, promývací pufr



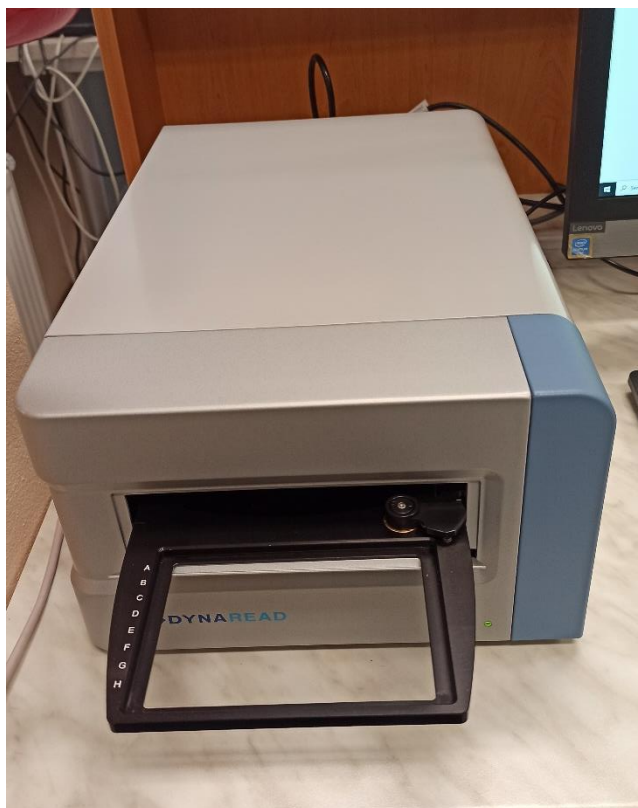
Obr. 4: Vzorky sér



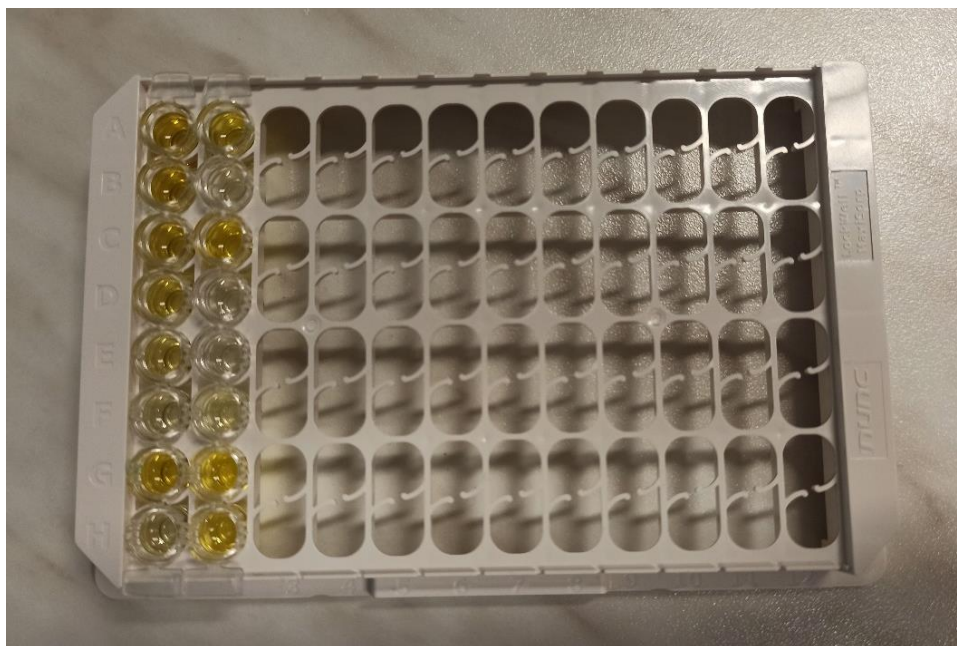
Obr. 5: Přístroj DYNAREAD, řídicí počítač



Obr. 6: Přístroj DYNAREAD



Obr. 7: Přístroj DYNAREAD, rámeček pro vložení mikrotitrační destičky



Obr. 8: Výsledná mikrotitrační destička

Dynex AlaDYN

ČÍSLO TESTU :0 REŽIM FILTRŮ :HLAVNÍ A REF. DATUM :02.03.2021
 JMÉNO TESTU :SARS-CoV-2, HLAVNÍ FILTR :450 ČAS :01.23.47
 QuantVac
 DESTIČKA : REF. FILTR :630 OPERÁTOR :

Rovnice kontrol kvality

PC>NC 1,501>0,185

DATA MATICE/TABULKA: OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,079	1,030	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B	1,707	0,053	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
C	1,133	1,448	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
D	0,738	0,059	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
E	0,441	0,048	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
F	0,164	0,201	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
G	1,501	1,269	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H	0,185	0,978	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

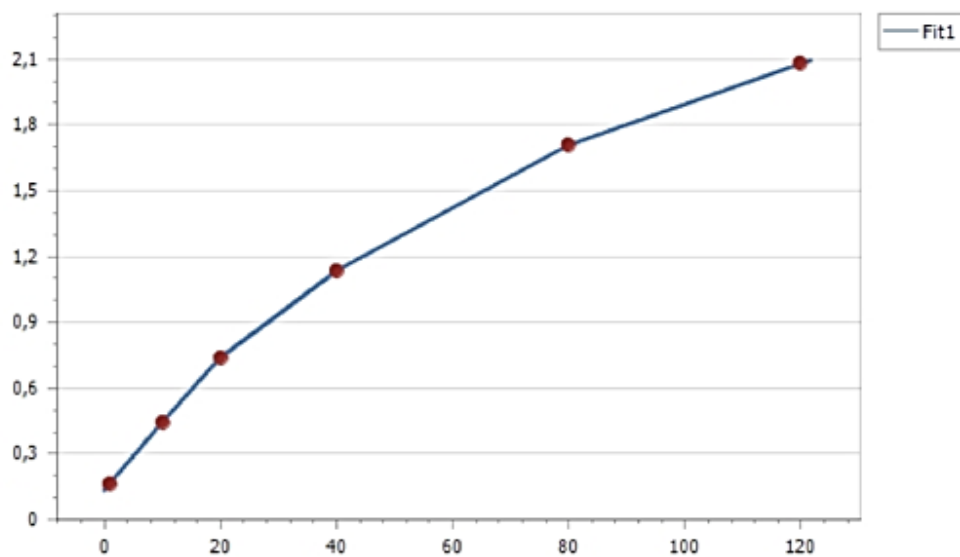
*****Indikuje nečtenou jamku nebo hodnotu mimo platný rozsah

KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Fit1

Lin/Lin Rozsah os

Extrapolace dat



1/2

Rovnice kontrol kvality

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
T1	A2	1,030	1,030	*****	*****	1	34,771
T2	B2	0,053	0,053	*****	*****	1	-2,595#
T3	C2	1,448	1,448	*****	*****	1	61,931
T4	D2	0,059	0,059	*****	*****	1	-2,394#
T5	E2	0,048	0,048	*****	*****	1	-2,747#
T6	F2	0,201	0,201	*****	*****	1	2,222
T7	G2	1,269	1,269	*****	*****	1	49,479
T8	H2	0,978	0,978	*****	*****	1	32,149

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
S1	A1	2,079	2,079	*****	*****	1	120,000
S2	B1	1,707	1,707	*****	*****	1	80,000
S3	C1	1,133	1,133	*****	*****	1	40,000
S4	D1	0,738	0,738	*****	*****	1	20,000
S5	E1	0,441	0,441	*****	*****	1	10,000
S6	F1	0,164	0,164	*****	*****	1	1,000

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
NC1	H1	0,185	0,185	*****	*****	1	1,683

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
PC1	G1	1,501	1,501	*****	*****	1	65,603

*****Indikuje nečtenou jamku nebo hodnotu mimo platný rozsah
 +++++Indikuje výsledek nad limitem
 ----Indikuje výsledek pod limitem
 #Indikuje extrapolovaná data

Dynex