

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

Bc. LADA ŠMÍDOVÁ

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav chemie a biochemie



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Vývoj imunologických testů pro detekci nebezpečných
bakteriálních patogenů**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Lada Šmídová

Brno 2017



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce: Bc. Lada Šmídová
Studijní program: Zootechnika
Obor: Živočišné biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Pavlína Adam, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Zbyněk Heger

Název práce: **Vývoj imunologických testů pro detekci nebezpečných bakteriálních patogenů**
Jazyková varianta: Čeština

Zásady pro vypracování:

1. Bakteriální patogeny. Bakteriální patogeny jsou skupinou mikroorganismů vážně ohrožující zdraví organismu. Mezi nejzávažnější patogenní bakterie současnosti se řadí methicilin-resistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), způsobující těžce léčitelné záněty, které mohou vést až k sepsi a selhání organismu.
2. Včasná diagnostika. Včasná diagnostika a přesná identifikace bakterie, způsobující infekci vede ke specifikaci léčebného protokolu a výrazně tak zvyšuje úspěšnost léčby se současným snížením rizika nežádoucích komplikací.
3. Imunologické metody. Laboratorní imunologické metody fungují na principu reakce antigenu a dané protilátky. Tyto metody vykazují vysokou citlivost a selektivitu a jsou tak hojně využívány v klinické praxi.
4. Praktická část
 1. Seznámení s teoretickými základy imunologických metod
 2. Sumarizace poznatků o aktuálních imunologických metodách
 3. Vývoj imunologického testu pro detekci vybraného bakteriálního patogenu (primárně MRSA)
 4. Vyhodnocení a zpracování výsledků.

Rozsah práce: 40-60

Literatura:

1. Ahmed, A., Rushworth, J. V., Wright, J. D., Millner, P. A., Anal. Chem. 2013, 85, 12118-12125.
2. Carinelli, S., Marti, M., Alegret, S., Pividori, M. I., New Biotech. 2015, 32, 521-532.
3. Hugon, P., Dufour, J. C., Colson, P., Fournier, P. E., et al., Lancet Infect. Dis. 2015, 15, 1211-1219.

Datum zadání: listopad 2015

Datum odevzdání: duben 2017

Bc. Lada Šmídová
Autorka práce

Ing. Pavlína Adam, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Vojtěch Adam,
Ph.D.
Vedoucí ústavu

doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vývoj imunologických testů pro detekci nebezpečných bakteriálních patogenů vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli k vytvoření této diplomové práce, děkuji také za vstřícný přístup a možnost tuto diplomovou práci zpracovat v rámci společnosti TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., dále bych ráda poděkovala konzultantovi mé diplomové práce Mgr. Zbyňkovi Hegerovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval. Také chci poděkovat své rodině za jejich podporu při mém studiu.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo vytvořit imunologický test pro detekci nebezpečného bakteriálního patogenu methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infekce MRSA způsobují celosvětové problémy ve zdravotnických zařízeních poskytujících akutní a následnou péči v lůžkové i ambulantní části, proto je u pacientů velmi důležitá včasná a rychlá diagnostika a cílená terapie.

Z *E. coli* byl pomocí QIAquick PCR Purification Kitu izolován bakteriální konstrukt, který byl následně purifikován a dialyzován. Získaný rekombinantní protein PBP2a byl v různých koncentracích nanesen na nitrocelulózovou membránu v podobě linií. Dále se provedla optimalizovaná blot-line metoda pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a ve třídách imunoglobulinů IgG, IgA a IgM. Pro detekci bylo použito několik různých koncentrací konjugátu Goat Anti-Human IgG-AP, Goat Anti-Human IgA-AP nebo Goat Anti-Human IgM-AP. Intenzita zabarvení linií každého jednotlivého stripu byla hodnocena pomocí Immunoblot softwaru. Z naměřených hodnot byla zjištěna diagnostická citlivost, specifita a celková diagnostická shoda. Dále bylo provedeno testování preciznosti za podmínek opakovatelnosti (intra-assay) a reprodukovatelnosti (inter-assay). Preciznost metody byla vyjádřena variačním koeficientem.

Jako nejvhodnější pro výrobu soupravy IgG byla stanovena koncentrace antigenu PBP2a od 0,30 mg/ml do 0,45 mg/ml a koncentrace konjugátu IgG 1:1500–1:1800. Pro třídu imunoglobulinů IgA byla jako nejvhodnější zjištěna koncentrace antigenu PBP2a od 0,40 mg/ml do 0,52 mg/ml a koncentrace konjugátu IgA 1:500–1:1000. Variační koeficient za podmínek opakovatelnosti pro celý rozsah u třídy IgG je 10,09 % a u třídy IgA je 8,91 %. Variační koeficient za podmínek reprodukovatelnosti pro celý rozsah u třídy IgG je 9,23 % a u třídy IgA je 9,60 %. Preciznost metody za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti pro třídy imunoglobulinů IgG a IgA vyhovuje kritériím pro výrobu diagnostické soupravy.

Výsledky titrací prokázaly, že vyrobené konkrétní šarže karet nitrocelulózové membrány s naneseným antigenem PBP2a musí být vždy ověřeny na panelu referenčních vzorků a podle toho se nastaví hodnoty koncentrací (jak antigenu, tak konjugátu) dle potřeby, odlišně však pro třídu imunoglobulinů IgG a IgA.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, MRSA, blot, PBP2a, IgG, IgA, IgM, nitrocelulózová membrána, citlivost, specifita, opakovatelnost, reprodukovatelnost.

ABSTRACT

The aim of the thesis was to develop an immunoassay for the detection of dangerous bacterial pathogen, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA infections cause global problems in health facilities which provide acute and follow-up care in inpatient and outpatient parts. That is why early and rapid diagnosis and targeted thereapies are very important for the subjects.

E. coli was purified using the QIAquick PCR kit Purificatin isolated bacterial constructs, which were subsequently purified and dialyzed. The recombinant protein PBP2a in different concentrations was applied to a nitrocellulose membrane in the form of lines. Furthermore was performed optimized blot-line method for the detection of specific antibodies against the recombinant antigen PBP2a in the classes IgG, IgA and IgM. Several different concentrations of the conjugate Goat Anti-human IgG–AP, Goat Anti-human IgA–AP or Goat anti-Human IgM–AP were used for the detection. The color intensity of each line of the strip was evaluated with Immunoblot software. The measured values were used to determine diagnostic sensitivity, specificity and overall diagnostic match. Further testing of precision was carried out under repeatability conditions (intra–assay) and reproducibility (inter–assay). Precision of the method was expressed by coefficient of variation.

As the most suitable for the manufacture of a IgG kit was determined the concentration of the antigen PBP2a from 0.30 mg/ml to 0.45 mg/ml and the concentration of IgG conjugate from 1:1500 to 1:1800. For class IgA as the most appropriate antigen was determined concentration PBP2a from 0.40 mg/ml to 0.52 mg/ml and conjugate concentrations of IgA from 1:500 to 1:1000. The coefficient of variation under repeatability conditions for the entire range of the IgG class is 10.09 %, and for IgA is 8.91 %. Variation coefficient reproducibility conditions for the entire range of the IgG class is 9.23 % and for IgA is 9.60 %. Precision of the method under conditions of repeatability and reproducibility for classes IgG and IgA meets the criteria for the manufacture of a diagnostic kit.

Titration results showed that particular batch of cards made of nitrocellulose membrane coated with antigen PBP2a must always be verified on the panel of reference samples and the values of concentrations (for both antigen and conjugate) should be set according to the needs, but differently for the class of immunoglobulins IgG and IgA.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, blots, PBP2a, IgG, IgA, IgM, nitrocellulose membrane, sensitivity, specificity, reproducibility, repeatability.

OBSAH

1 ÚVOD.....	12
2 CÍL PRÁCE.....	13
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
3.1 Charakteristika druhu <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.1.1 Taxonomie	14
3.1.2 Rod <i>Staphylococcus</i>	15
3.1.3 Druh <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2 Infekce a onemocnění způsobené druhem <i>S. aureus</i>	16
3.2.1 Pyogenní infekce	18
3.2.2 Infekce vyvolané působením toxinů.....	18
3.2.3 Alimentární intoxikace	18
3.3 Patogenita	19
3.4 Genom <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.4.1 Genetické faktory rezistence pro <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.5 Citlivost a rezistence <i>Staphylococcus aureus</i> k antimikrobiálním látkám	22
3.6 Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	23
3.6.1 Mechanismus antibiotické rezistence MRSA.....	24
3.6.2 Genetika rezistence MRSA	25
3.6.2.1. Stafylokoková chromozomová kazeta SCC <i>mec</i>	26
3.6.3 Nosičství MRSA.....	28
3.6.4 Epidemiologie MRSA	29
3.6.5 Léčba MRSA	29

3.7	Současné metody detekce MRSA	30
3.7.1	Detekce methicilin rezistentních kmenů pomocí fenotypových metod.....	30
3.7.2	Detekce methicilin rezistentních kmenů pomocí molekulárně genet. metod.....	31
3.8	Imunologické metody	34
3.8.1	Obecné vymezení pojmů pro imunologické metody.....	34
3.8.1.1	Antigen	34
3.8.1.2	Protilátka (imunoglobulin)	34
3.8.1.3	Reakce antigen – protilátka	37
3.8.2	Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA).....	38
3.8.3	Western blotting	40
3.8.3.1	Blotovací membrány.....	42
3.8.3.2	Blokace vazebných míst	43
3.8.3.3	Detekční metody po blottingu	43
3.8.3.4	Imunodetekce.....	44
3.8.4	Imunochromatografie (Lateral Flow)	45
4	MATERIÁL A METODIKA	46
4.1	Materiál.....	46
4.1.1	Původ a ředění vzorků, bakteriální kmen MRSA.....	46
4.1.2	Laboratorní přístroje	46
4.1.3	Materiál a laboratorní pomůcky	47
4.1.4	Roztoky a chemikálie	47
4.1.5	Příprava pracovních roztoků.....	49
4.1.6	Příprava ředící řady konjugátů třídy IgG, IgM, IgA.....	52
4.1.7	Příprava kontrolní linie	53
4.1.8	Příprava kontroly konjugátu třídy IgG, IgM nebo IgA	54
4.1.9	Příprava roztoků pro SDS-PAGE.....	54
4.1.7	Počítačový software.....	55

4.2 Metodika.....	56
4.2.1 Příprava rekombinantního antigenu PBP2a.....	56
4.2.1.1 Klonování, exprese a izolace proteinu PBP2A (mecA MRSA)	56
4.2.1.2 Kritéria hodnocení kvality, analýza vzorků surového produktu, purifikace a dialýza rekombinantního antigenu PBP2a a zjištění koncentrace produktu.....	57
4.2.2 Příprava stripů pro metodu detekce blot-line	61
4.2.3 Provedení optimalizované metody blot-line pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a	64
4.2.4. Hodnocení výsledků optimalizované metody blot-line	66
4.2.4.1 Stanovení diagnostické citlivosti (senzitivity).....	67
4.2.4.2 Stanovení diagnostické specifity	67
4.2.4.3 Stanovení celkové diagnostické shody (efektivity).....	68
4.2.4.4 Stanovení opakovatelnosti (intra-assay)	68
4.2.4.5 Stanovení reprodukovatelnosti (inter-assay).....	69
4.2.5. Návrh podoby blot-line soupravy MRSA.....	70
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	71
5.1. Příprava rekombinantního antigenu PBP2a.....	71
5.2 Úvodní titrace antigenu č. 1, pro třídu imunoglobulinů IgG.....	73
5.3 Titrace antigenu č. 2, pro třídu imunoglobulinů IgG.....	83
5.4 Charakteristika metody pro třídu imunoglobulinů IgG	99
5.4.1 Opakovatelnost	99
5.4.2 Reprodukovatelnost.....	100
5.5 Titrace antigenu č. 3, pro třídu imunoglobulinů IgM	102
5.6 Titrace antigenu č. 4, pro třídu imunoglobulinů IgA.....	104
5.7 Charakteristika metody pro třídu imunoglobulinů IgA	116
5.7.1 Opakovatelnost	116
5.7.2 Reprodukovatelnost.....	118

6 ZÁVĚR.....	120
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	122
8 SEZNAM TABULEK	132
9 SEZNAM OBRÁZKŮ	137
10 PŘÍLOHY	138

1 ÚVOD

Mezi nejvýznamnější multirezistentní patogeny patří zejména methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Je to problematický kmen, jehož výskyt se netýká pouze České republiky, ale jedná se o celosvětový problém většiny zdravotnických zařízení poskytujících akutní a následnou péči v lůžkové i ambulantní části. Jeho výskyt v invazivních infekcích je od roku 2000 sledován celoevropským systémem EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System). S objevem penicilinu roku 1928 A. Flemingem se postupně začala vyvíjet i rezistence bakterií na antibiotika. Stafylokoky si začaly vytvářet enzym β -laktamasu, který rozkládá antibiotika penicilinové řady. Začátkem 60. let 20. století se začaly vyvíjet polysyntetické peniciliny, které vynikaly svojí odolností vůči působení β -laktamasy, první polysyntetický penicilin nesl název methicilin (v našich podmínkách běžnější oxacilin). Situace se ovšem začala opakovat a některé kmeny *S. aureus* se na methicilin staly opět rezistentní a rozšířily se v nemocnicích po celém světě. To vedlo ke zvýšení výskytu případů bakteriémie, pneumonie, infekcí v chirurgických ranách a dalších nozokomiálních infekcí. Nozokomiální infekce způsobené MRSA jsou velmi závažné, protože ohrožují pacienta vysokou morbiditou a mortalitou. Tyto infekce jsou také zátěží pro zdravotní péči, protože pacienti vyžadují delší pobyt v nemocnicích.

U imunokompromitovaných jedinců je velmi důležitá včasná a rychlá diagnostika MRSA a cílená terapie, protože může dojít k rozvoji systémové infekce odpovídající zejména infekci krevního řečiště, pneumonii nebo infekcím kostí a kloubů. Pro cílenou detekci MRSA u pacientů v rutinních klinických laboratořích je potřeba vyvinout metody, které budou splňovat požadavky na jednoduché, rychlé, přesné a citlivé metody. Klasické mikrobiologické metody, které umožňují identifikaci během 24–96 hod., nejsou pro tyto účely příliš vhodné. Opírají se především o selektivní kultivaci na pevných nebo v tekutých médiích. Detekce MRSA v laboratoři je komplikována tím, že populace s nízkým nebo extrémně nízkým počtem bakterií rezistentních k methicilinu (oxacilinu) se mohou jevit jako citlivé k tomuto antibiotiku. Při vyhledávání MRSA, se proto doporučuje užití více metod současně. Další možností pro rychlou identifikaci MRSA jsou latexové aglutinační testy. V posledních letech se využívá PCR detekce genu *mecA*, ale vzhledem k ceně a časové náročnosti se v laboratořích běžně neprovádí, jejich limitací je také nutnost použití čistých kolonií stafylokoků.

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo:

- Potvrdit molekulovou hmotnost (SDS-PAGE) u rekombinantního antigenu PBP2a, následně provést purifikaci, dialýzu a zjistit jeho výslednou koncentraci.
- Připravit finální stripy pro metodu detekce blot-line.
- Provést optimalizovanou metodu blot-line pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a na vybraných referenčních sérech.
- Stanovit diagnostickou citlivost, diagnostickou specifitu a celkovou diagnostickou shodu, následně stanovit opakovatelnost (intra-assay) a reprodukovatelnost (inter-assay) pomocí statistických výpočtů.
- Vyhodnotit výsledky pro třídu imunoglobulinů IgG, IgA, případně IgM.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika druhu *Staphylococcus aureus*

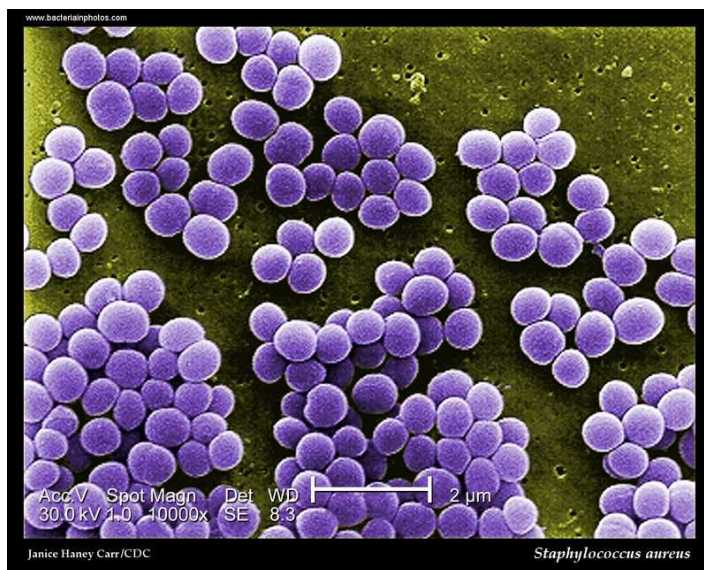
Každý člověk je trvale osídlen různými druhy bakterií. Bakterie se vyskytují zejména v dutině ústní, v tlustém střevě, ale také na kůži, na nosní sliznici apod. Tyto bakterie za normálních okolností nevyvolávají žádné potíže ani onemocnění, člověk je na jejich přítomnost adaptován. Při porušení sliznice nebo při výrazném útlumu imunity však mohou i tyto běžné bakterie způsobit zdravotní komplikace, proto je označujeme za podmíněně patogenní. Mezi takovéto podmíněně patogenní bakterie patří i stafylokoky, které se u zdravých osob mohou vyskytovat zejména na nosní sliznici a na kůži. U oslabených jedinců mohou vyvolat hnisavá ložiska v kůži nebo i v různých hlubokých orgánech a tkáních. Mohou způsobit i sepsi (Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje, 2004).

3.1.1 Taxonomie

Stafylokoky patří mezi nejdéle studované bakterie. Francouzský přírodovědec Luis Pasteur a skotský chirurg Alexander Ogston byli první mikrobiologové, kteří si uvědomili souvislost mezi kokovitými bakteriemi a vznikem hnisu (Petráš, 2004). Pasteur roku 1880 popsal malé sférické bakterie izolované z hnisu odebraného z vředů a vzorků získaných od pacientů trpících osteomyelitidou a označil je za patogenní (Kloos *et al.*, 1991). Ogston o dva roky později v roce 1882 poprvé použil slovo „*Staphylococcus*“ (avšak pouze v popisném smyslu) pro označení skupiny koků, které se sdružují do shluků často v podobě hroznů a způsobují zánět a hnisání (Kloos a Bannerman, 1994). První, kdo použil tento termín v taxonomickém smyslu a identifikoval první druh *Staphylococcus aureus*, byl roku 1884 německý bakteriolog Rosenbach (Petráš, 1998). Taxonomicky patří *S. aureus* do říše *Eubacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae*, rodu *Staphylococcus*. Existují dva poddruhy *S. aureus*: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* (Obr. 1). Druhý jmenovaný se u člověka nevyskytuje. Naproti tomu *S. aureus* subsp. *aureus* patří mezi nejvýznamnější lidské patogeny. V rodu *Staphylococcus* existuje v současnosti 47 různých druhů, přičemž deset z nich má dva poddruhy a jeden má poddruhy čtyři (Euzéby, 2013).

3.1.3 Druh *Staphylococcus aureus*

S. aureus je mnohostranný lidský patogen, který způsobuje infekce v rozsahu od relativně mírných zánětů kůže a měkkých tkání, až po život ohrožující sepse, nekrotizující pneumonie nebo syndrom toxického šoku (Murray *et al.*, 2009). Jedná se o grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky o průměru asi 1 μm . Rostou na běžných kultivačních půdách. Velmi dobře snášejí zvýšený obsah solí, čehož se využívá k přípravě selektivní půdy s obsahem 10% NaCl. *S. aureus* se díky produkci koagulázy řadí do skupiny koaguláza pozitivních stafylokoků (Tiemersma *et al.*, 2004).



Obr. 2 Mikrofotografie kolonií *S. aureus* pořízena pomocí elektronového mikroskopu (Janice Haney Carr, 2011).

3.2 Infekce a onemocnění způsobené druhem *S. aureus*

S. aureus je typický oportunní patogen. To znamená, že dokáže perzistovat na kůži či sliznicích člověka i teplokrevných zvířat a za určitých podmínek, které nejsou doposud zcela objasněné, může naplno projevit svůj patogenní potenciál. Literatura uvádí, že přibližně jedna třetina dospělé zdravé populace je bezpříznakovými nosiči kmenů *S. aureus* (Peacock *et al.*, 2001). Nejfrekventovanější místa na lidském těle, která mohou být kolonizována tímto druhem, jsou znázorněna na obr. 3, kromě uvedených míst na tomto obrázku bývá tento druh ojediněle izolován i z gastrointestinálního traktu. Nejběžnější je přítomnost kmenů *S. aureus*

3.2.1 Pyogenní infekce

S. aureus způsobuje pyogenní (hnisavé) infekce kůže, tzv. pyodermie, z nichž jsou nejčastější impetigo, folikulitida (např. tzv. ječné zrno) a furunkly, také způsobuje mastitidu. *S. aureus* je nejčastějším původcem hnisání ran (běžných povrchových zranění, popálenin, pooperačních ran). Toto hnisání vzniká, pokud v ráně zůstane cizí těleso (např. tříska, nečistota, stehy). Infikovanou ranou se bakterie mohou dostat do krevního oběhu a způsobit abscesy vnitřních orgánů, empyémy, endokarditidy, osteomyelitidy, artritidy, sinusitidy, bronchopneumonie a jiné. Tyto bakteriémie mohou vést až k sepsi, která může být smrtelná. Výskyt benigních kožních infekcí je velmi častý, zatímco postižení vnitřních orgánů a sepse se projevují jen u disponovaných jedinců (Votava, 2003). U zvířat může *S. aureus* způsobit pustulární zanícení kůže a ostatních orgánů, ze kterých je nejvýznamnější mastitida (Asperger *et al.*, 2002).

3.2.2 Infekce vyvolané působením toxinů

S. aureus je schopný vyvolat akutní infekci způsobenou toxiny, dojde k narušení jak homeostáze, tak lokální i celkové imunity. Tyto infekce jsou zprostředkované širokou škálou exotoxinů, které jsou zprostředkované chromozomálně nebo přes plasmid (Asperger *et al.*, 2002). Mezi infekce, které jsou spojované s působením toxinů, patří například exfoliativní dermatitida (SSSS), způsobující syndrom opařené kůže. Dále Ritterův syndrom u novorozenců, pemphigus neonatorum, impetigo bullosa, syndrom toxického šoku (toxin TSST-1), enterotoxikóza a jiné infekce (Votava, 2003).

3.2.3 Alimentární intoxikace

Schopnost tvořit stafylokokové enterotoxiny (SEs) má asi 20 až 50 % plasmakoaguláza pozitivních kmenů *S. aureus* izolovaných z člověka, které mohou zapříčinit otravy potravinami, tzv. enterotoxikózy. Z dvaceti typů SEs je nejčastěji zodpovědných za otravu z potravin pět stafylokokových enterotoxinů (SEA – SEE). Zdrojem nákazy mohou být lidé pracující s potravinami mající bakterii v nosohltanu anebo mají hnisavý zánět měkké tkáně. Stafylokoková enterotoxikóza je akutní onemocnění. Zpravidla se objevuje 1–6 hodin po požití kontaminované potraviny. Charakteristický je její prudký až dramatický průběh. Stafylokokové enterotoxikózy působí na sliznici střeva, což vede k prudkému zvracení

spojeného s průjmem, bez zvýšení tělesné teploty, v těžkých případech až s kolapsovým stavem. Příznaky onemocnění vymizí obvykle za 24 až 48 hodin. Na vyvolání stafylokokové enterotoxikózy postačuje 0,5 až 5 µg enterotoxinu A. Toto množství je schopno naprodukovat množství *S. aureus* větší, než je 10⁵ KTJ/g. Na dosažení tohoto množství je podle ostatních vnitřních a vnějších podmínek potřebný čas 10 až 20 hodin. Při necharakteristickém průběhu onemocnění se využívá mikrobiologického vyšetření inkriminované potraviny a zvratků, anebo vyšetření obsahu toxinu v krvi a stolici pacienta. Stafylokokové enterotoxiny jsou termostabilní, a proto enterotoxikózu může způsobit i potravina, ve které byly stafylokoky po jejich rozmnožení tepelnou úpravou devitalizovány (Gorner a Valík, 2004).

3.3 Patogenita

Proniknutí *S. aurea* do organismu a jeho šíření v prostředí je umožněno četnými faktory virulence, které lze rozdělit na povrchové a extracelulární:

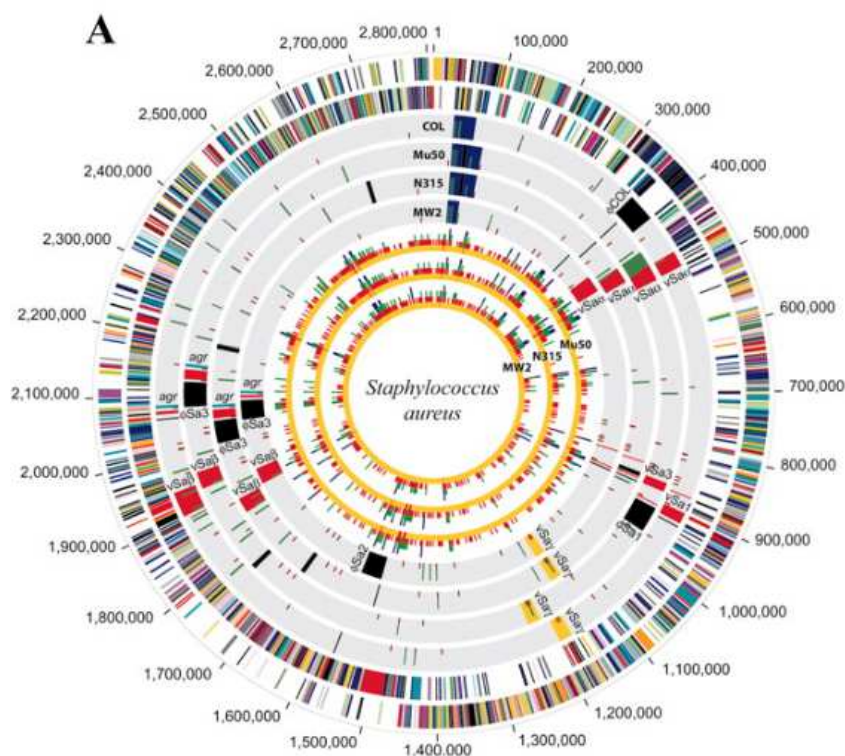
- Povrchové faktory způsobují uvolnění cytokinů, aktivaci komplementového systému, shlukování trombocytů a vazbu s *Fc* fragmenty imunoglobulinů, čímž chrání bakteriální buňku před fagocytózou. Tyto faktory zahrnují stafylokokový peptidoglykan, protein A a vázanou koagulázu, tzv. *clumping factor*. Důležitou funkcí faktorů vázajících se na kolagen, elastin či fibronectin je adheze na tkáňové povrchy.
- Extracelulární faktory virulence zahrnují enzymy a toxiny. K enzymům patří koaguláza, hyaluronidáza, kataláza (volná), lipázy, nukleázy, fibrinolysin a penicilináza. Jejich účinkem je rozrušování buněčných struktur, tím dochází k šíření stafylokoků tkáněmi. Penicilináza inaktivuje β-laktamová antibiotika a volná koaguláza indukuje přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrin (Choi *et al.*, 1989).

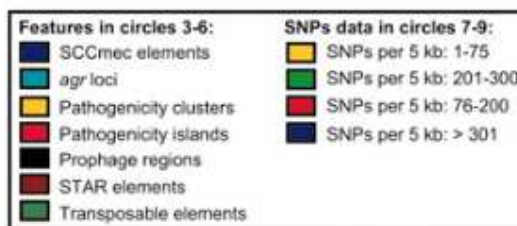
Patogenita většiny kmenů *S. aureus* spočívá ve schopnosti tvořit řadu extracelulárních proteinů, jenž negativně ovlivňuje průběh onemocnění. Mezi tyto proteiny patří např. toxin syndromu toxického šoku (TSST-1), enterotoxiny typu A až U, exfoliativní toxiny typu A až D, Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL), cytolytické toxiny α-hemolysin a β-hemolysin, aj. (McCormick *et al.*, 2001). Enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku (TSST-1) jsou superantigeny, způsobující nadměrnou imunitní reakci. Nespecificky se váží na MHC antigen

II. třídy, na povrchový histokompatibilní komplex bílých krvinek (Choi *et al.*, 1989). Aktivují 5–30 % T-lymfocytů, a tím zapříčiní jejich nespecifickou proliferaci. Výsledkem je nadprodukce cytokinů způsobujících stav šoku. Exfoliativní toxiny působí proteolyticky na desmozomální glykoprotein Desmoglein 1 (Amagai *et al.*, 2000). Důsledkem je odloučení keratinocytů v granulózní vrstvě pokožky. Cytolyziny poškozují buněčné membrány a jsou zodpovědné za tkáňová poškození v průběhu infekce. Ochranu před působením neutrofilů a makrofágů poskytuje stafylokokům Pantonův-Valentinův leukocidin, (Genestier *et al.*, 2005).

3.4 Genom *Staphylococcus aureus*

Genom *S. aureus* tvoří kružnicová dvouřetězcová DNA, jejíž velikost se pohybuje okolo 2800 Mb a obsahuje přibližně 2700 protein-kódujících sekvencí. *S. aureus* obvykle nese navíc jeden nebo více extrachromozomálních plazmidů, tyto mobilní genetické elementy nemusí mít stejné procentuální zastoupení bází jako ostatní úseky DNA. Většina kódujících sekvencí vykazuje vysokou homologii s geny kódujícími známé funkce u jiných bakterií. Funkce, které tyto geny kódují, zahrnují základní procesy v buňce (metabolismus buňky, růst, replikace, interakce s hostitelem a další funkce pro přežití buňky), (Holden a Lindsay, 2008).





Obr 4. Znázornění genomu *S. aureus*. Každý kruh znázorňuje genomická data, která jsou vyčíslena směrem do středu. Vnější kruh vyjadřuje uspořádání párů bazí v genomu. Druhý, třetí a čtvrtý kruh znázorňuje *S. aureus* COL. Další kruhy znázorňují ostatní kmeny *S. aureus*, graficky znázorněny jsou jen části odlišné od genomu *S. aureus* COL. Pátý kruh (kmen Mu50), šestý (kmen N315) a sedmý (kmen MW2), (Gill *et al.*, 2004).

Celkový genom je tvořen konzervativními (jádrovými) geny, přídavnými elementy a pravidelně se vyskytujícími variabilními geny, tzv. „*core variable*“ (CV) geny. Jádrové geny dosahují 98-100% identity napříč kmeny. Jejich funkce je spojena s centrálním metabolismem a základními funkcemi buňky. CV je skupina 723 genů, pomocí kterých lze kmeny dělit do několika vývojových linií (Feil *et al.*, 2003). Přibližně 75 % genomu *S. aureus* tvoří jeho stabilní složku sestávající se z genů, které jsou přítomny ve všech kmenech. Tyto geny jsou nepostradatelné pro růst a přežití buňky. Vyskytují se zde však i geny s funkcemi charakteristickými pro daný druh, které odpovídají za patogenitu jednotlivých kmenů, jako jsou geny virulence, proteiny vážící se na buněčný povrch, toxiny, exoenzymy a geny pro biosyntézu kapsul. Tato přídavná složka zaujímá až 25 % genomu. Tvoří ji mobilní genetické elementy, tj. integrované plazmidy, transpozony, integrované profágy, ostrovy patogenity a stafylokokové chromozomové kazety (Lindsay a Holden, 2004, Gill *et al.*, 2004). Plazmidy o velikosti 1-60 kbp jsou klasifikovány do čtyř tříd a patnácti dosud známých inkompatibilních skupin. Mobilní elementy genomu jsou začleněny v chromozomu nebo v plazmidech (Mlynarczyk *et al.*, 1998).

Genetická diverzita ve stabilní části genomu *S. aureus* může také přispívat k důležitým fenotypovým rozdílům mezi kmeny. Velkou roli zde hraje jednonukleotidový polymorfismus, kdy dochází k nesynonymní mutaci. Výsledkem nesynonymních substitucí je změna v kódované aminokyselině. Genetickou diverzitu v základním genomu mohou také způsobovat větší polymorfní úseky tvořící mozaikovou strukturu, kdy se začlení DNA do

míst, vykazující sekvenční homologii Tato mozaiková struktura vzniká určitou formou výměny genetické informace při homologní rekombinaci (Lindsay a Holden, 2006).

3.4.1 Genetické faktory rezistence pro *Staphylococcus aureus*

Před více než padesáti lety vedl objev antibiotik k revoluci v léčbě bakteriálních infekcí. Vzápětí se díky nadměrnému používání těchto antimikrobiálních látek u mnoha bakterií vyvinuly rezistentní kmeny. Významný problém v dnešní době tvoří kmeny *S. aureus* rezistentní k methicilinu, které mají hlavní podíl na šíření nemocničních infekcí.

Faktory rezistence k antibiotikům a jiným baktericidním látkám se u stafylokoků vyskytují na mobilních genetických elementech jako genomové ostrovy patogenity, integrované plazmidy, transpozóny aj. Reorganizace bakteriálního genomu způsobená těmito elementy umožňuje vznik a šíření nových rezistentních variant (Ito *et al.*, 2003).

3.5 Citlivost a rezistence *Staphylococcus aureus* k antimikrobiálním látkám

Mikroorganismy mají vedle své přirozené odolnosti k určitým antimikrobiálním látkám také získanou (sekundární) rezistenci, která vzniká působením antibiotika na danou bakteriální populaci. Rezistence k antibiotikům je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace daného antibiotika. Vznik a šíření rezistence určuje přítomnost genů rezistence v populaci bakterií a rozsah spotřeby antibiotik. Zejména škodlivé jsou dlouhodobě podávané nízké dávky antibiotik, které vyselektují relativně velkou rezistentní bakteriální populaci a ta může sloužit jako zásobárna genů pro rezistenci. Geny rezistence získávají bakterie předáváním svých genů nebo od jiných bakteriálních buněk v ekosystému, mimo to rezistentní geny vznikají i mutacemi (Urbášková, 2001).

Odolnost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám je velkým celosvětovým problémem, zejména pak u nosokomiálních patogenů, mezi které patří i *S. aureus*. Narůstající výskyt multirezistentních kmenů *S. aurea*, zejména pak methicilin – rezistentní (MRSA) způsobuje závažný problém při léčbě stafylokokových infekcí (Duran *et al.*, 2012). Antibiotická rezistence zvyšuje více než dvojnásobně morbiditu, podstatně prodlužuje hospitalizaci a způsobuje významný vzestup nákladů na zdravotní péči. Náklady na prevenci

multirezistentních infekcí přitom představují až 20 % všech nákladů potřebných k péči o nemocné s klinicky manifestní infekcí (Bergerová *et al.*, 2006).

3.6 Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

S. aureus je významným patogenem, který v dřívější době vyvolával převážně infekce získané v nemocnicích, ale v současné době je izolován i z infekcí získaných ve společenství lidí. Způsobuje invazivní infekce, které byly před vynalezením antibiotik velmi často smrtelné, až s objevením penicilinu roku 1928 A. Flemingem se zlepšila prognóza pacientů s těžkými infekcemi. Po několika letech se zjistilo, že léčba stafylokokových infekcí nereaguje na podání penicilinu. *S. aureus* se stal na penicilin rezistentní, začal produkovat β -laktamasy, které jej hydrolyzují. Proto byl vyvinut methicilin (v našich podmínkách je mnohem běžnější oxacilin), který odolává působení penicilinázy (druh β -laktamasy) a využívá se pro léčbu infekcí vyvolaných stafylokoky produkující tento enzym. Methicilin se poprvé začal používat v roce 1959. Pouhé dva roky poté již byly izolovány kmeny (u hospitalizovaných pacientů ve Velké Británii) rezistentní k tomuto antibiotiku. Situace se začala opakovat a některé kmeny *S. aureus* se na methicilin staly opět rezistentní (tyto kmeny se označují jako MRSA) a rozšířily se v nemocnicích po celém světě. To vedlo ke zvýšení výskytu případů bakteriémie, pneumonie, infekcí v chirurgických ranách a dalších nozokomiálních infekcí. Nozokomiální infekce způsobené MRSA jsou velmi závažné, protože ohrožují pacienta vysokou morbiditou a mortalitou. Tyto infekce jsou také zátěží pro zdravotní péči, protože pacienti vyžadují delší pobyt v nemocnicích. *S. aureus* je druhým nejčastějším původcem infekcí krevního řečiště a v roce 2001 bylo prokázáno, že kmeny MRSA se podílejí na těchto infekcích z 57 % (Jevons, 1961; Urbášková, 2008; Yinduo, 2007).

Původně se předpokládalo, že se kmeny bakterií methicilin rezistentního *S. aureus* vyskytují jen jako nozokomiální infekce v nemocničních zařízeních, ale postupem času se ukázalo, že se vyskytují i v komunitách (Beneš, 2009). První MRSA infekce v komunitách byla popsána v roce 1980 a je označovaná jako CA-MRSA (z anglického názvu Community-Acquired Methicilin Rezistant *Staphylococcus aureus*). Do roku 1980 byli všechny dokumentované případy infekce pouze v nemocničních zařízeních a označují jako HA-MRSA (z anglického názvu Hospital-Acquired Methicilin Rezistant *Staphylococcus aureus*).

V České republice se methicilin nahrazuje oxacilinem, ten se používá i k průkazu rezistence. První případ MRSA infekce byl zaznamenán v roce 1992, ve Fakultní nemocnici Brno (Hodová a Lipový, 2010).

- HA-MRSA jsou kmeny, k jejichž přenosu dochází při pobytu nebo ošetření ve zdravotnickém zařízení. Na jejím vzniku nebo kolonizaci se podílí řada rizikových faktorů, např. věk, závažná chronická onemocnění, invazivní zákroky, opakované hospitalizace. Pro tyto nemocniční kmeny je typická multirezistence.
- CA-MRSA jsou kmeny, u nichž není prokázána souvislost s pobytém nebo ošetřením ve zdravotnickém zařízení. Infekce CA-MRSA jsou vyvolané kmeny jiných vlastností, než mají HA-MRSA. Komunitní kmeny vykazují rezistenci pouze na β -laktamová antibiotika. Rizikové faktory pro vznik CA-MRSA jsou mladší věk, týmové sporty, pobyt ve vězení. Významným místem šíření jsou domovy pro seniory, léčebny dlouhodobě nemocných a ústavy sociální péče (Metodický návrh MZ ČR, 2010; Rampachová, 2010).

Výskyt kmenů *S. aureus* rezistentních k methicilinu je v oblasti humánní medicíny celosvětově sledován prostřednictvím národních monitorovacích pracovišť již řadu let. Monitoring mezi členskými státy EU probíhá prostřednictvím nezávislého projektu EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), dříve EARSS, ke kterému se Česká republika připojila v roce 2000 (Urbášková, 2008). V terapii infekcí vyvolaných stafylokoky rezistentními k methicilinu (oxacilinu) se používají glykopeptidová antibiotika (vankomycin a teikoplanin). Tato praxe vede k narůstajícímu počtu kmenů stafylokoků rezistentních i proti těmto antibiotikům, což má závažné důsledky (Drozenová a Petráš, 2000).

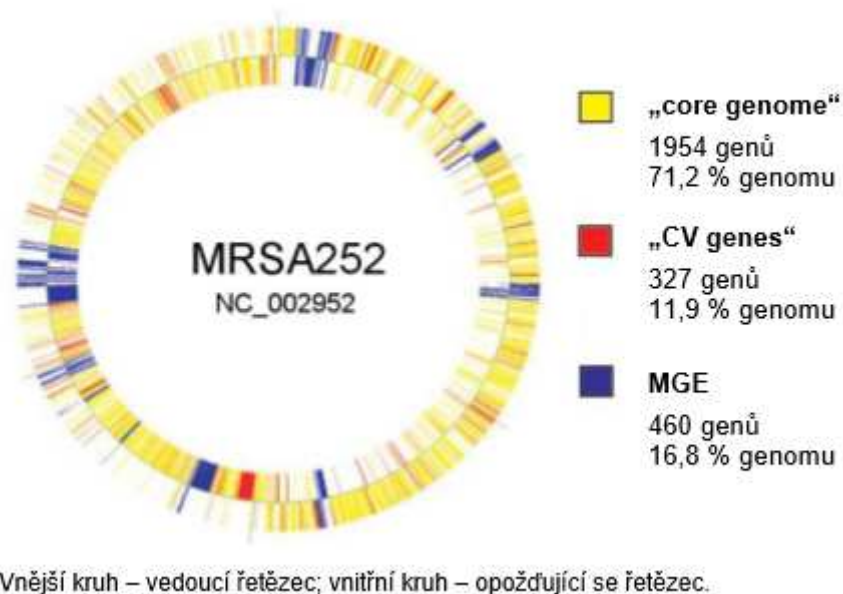
3.6.1 Mechanismus antibiotické rezistence MRSA

Rezistence methicilin rezistentního *S. aureus* je dána produkcí alterovaného enzymu transpeptidázy, který se nazývá penicilin binding protein 2a (PBP2a, taktéž označen jako PB2'). Tento protein má mnohonásobně nižší afinitu k většině antibiotik, hlavně β -laktamových (Mad'ar *et al.*, 2006). Normální penicilin vázající protein (PBP) je schopen

určité modifikace, a tím dochází ke změně na získaný penicilin vázající protein (PBP2a). Na cytoplasmatické membráně *S. aurea* se vyskytují čtyři PBP, které se v buněčné stěně bakterií podílí na zesíťování peptidoglykanu. Tyto PBPs mají vysokou afinitu k β -laktamovým antibiotikům a jejich aktivita je podobná jako u serinových proteáz. Pokud dojde k navázání proteinu na penicilin, tak dochází k inhibici PBPs v buněčné stěně, a to způsobí smrt bakterií. PBP2a je unikátní protein, jehož molekulová hmotnost je přibližně 76 kDa a produkují ho pouze methicilin rezistentní stafylokoky. Na rozdíl od PBP má nízkou afinitu k β -laktamovým antibiotikům, a tím dokáže i za účasti β -laktamů nahradit biosyntetickou funkci PBPs a znemožní tak buňkám lyzovat. Protein PBP2a je klinicky rezistentní ke všem β -laktamům, včetně penicilinů, cefalosporinů, karbapenemů, monobaktamů a kombinacím β -laktamových/ β -laktamasových inhibitorů (Yinduo, 2007).

3.6.2 Genetika rezistence MRSA

Rezistence k methicilinu je determinována řadou faktorů, z nichž nejdůležitější je produkt genu *mecA* (nacházející se na stafylokokové chromozomové kazetě *SCCmec*) a jeho regulační geny. Gen *MecA* kóduje enzym PBP2a (jinak označovaný také PBP2[']), což je analog transpeptidázy PBP, která má pro normální buňku nezastupitelnou úlohu při stavbě buněčné stěny, účastní se tvorby křížových vazeb mezi řetězcí peptidoglykanu, a tím přispívají ke vzniku buněčné stěny (spojuje nascentní peptidoglykanové řetězce). Rozpoznávanou strukturou je D-alanyl-D-alanin, což je zároveň cílové místo působení β -laktamových antibiotik. Pozměněný protein PBP2a má nízkou afinitu k β -laktamům (včetně methicilinu), nepodléhá jejich inhibici, a proto může katalyzovat příslušné enzymatické reakce i v přítomnosti tohoto antibiotika. Mechanismus antibiotické rezistence je takový, že protein PBP2a v přítomnosti inhibiční koncentrace β -laktamů (jejich přítomnost je nezbytná pro aktivaci, resp. inaktivaci příslušných regulačních genů) přejímá funkci normálního penicilin vázající protein (PBP), jehož produkci inaktivuje. Jedná se o jakýsi druh kooperace mezi PBP2a a běžně se vyskytujícího PBPs, kdy se protein PBP2a chová v přítomnosti methicilinu jako slabá transpeptidáza, která je schopná formovat jen muropeptidové dimery, takže inaktivace běžné PBPs má za následek snížení úrovně rezistence. Kromě genu *mecA* jsou součástí genového komplexu *mec* i dva jeho regulátory – *mecI* a *mecRI*. Dále vznik rezistence ovlivňuje gen *femA* nacházející se na chromozomu (Berger-Bächli *et al.*, 1989; Hakenbeck a Coyette, 1998; Katayama *et al.*, 2000; Pinho *et al.*, 1997; Pinho *et al.*, 2001).



Obr. 5 Distribuce složek genomu u kmene MRSA252 (Lindsay *et al.*, 2006).

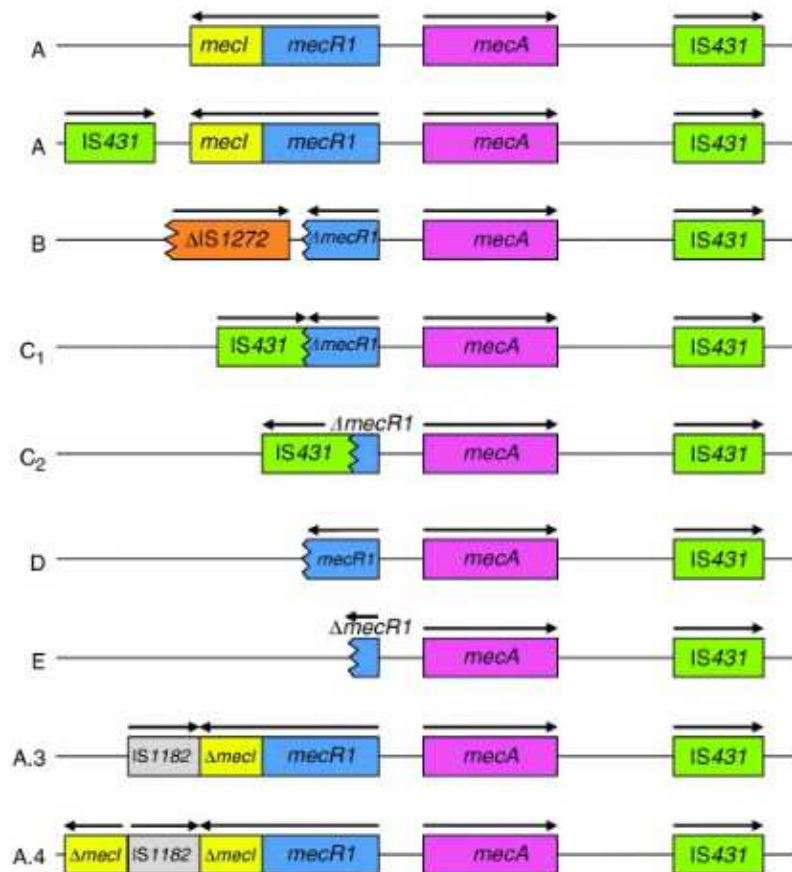
3.6.2.1. Stafylokoková chromozomová kazeta *SCCmec*

SCCmec (z anglického názvu Staphylococcal Chromosome Cassette Methicilin-Resistance Island) je fragment DNA dlouhý 21-67 kb, který je začleněn do bakteriálního chromozomu poblíž místa počátku replikace, ostrovy rezistence jsou vždy vloženy do jednoho místa na chromozomu (*attBSCC*) v otevřeném čtecím rámci *orfX*, zhruba 25 kb od začátku replikace. Pro integraci *SCCmec* do genomu bakterie *S. aureus* je toto místo velmi výhodné, a to z toho důvodu, že se nachází na chromozomu 2-4 krát. Po začlenění *SCCmec* do genomu vzniká methicilin-rezistentní kmen (MRSA) odolný vůči téměř všem β -laktamovým antibiotikům. Tyto kazety jsou charakteristické terminálními invertovanými repetitivními, dále genovými komplexy *mec* a *ccr* a obklopujícími regiony DNA (Hiramatsu, 2001; Ito *et al.*, 1999).

SCCmec se skládá ze dvou základních genových komplexů. První z nich, *mec* komplex, je zodpovědný za rezistenci k methicilinu. Podle jeho struktury je klasifikován do pěti tříd, Obr. 6 (Katayama *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2003).

- Třída A obsahuje inzerční sekvenci IS431, gen *mecA*, *mecR1* a *mecI*.
- Třída B se skládá z IS431, genu *mecA*, části genu *mecR1* a inzerční sekvence IS1272.

- Třída C má obdobnou strukturu jako třída B, ale místo IS1272 obsahuje IS431.
- Třída D je tvořena IS431, genem *mecA* a částí genu *mecR1*.
- Třída E se shoduje s třídou E, ale deletovaná část genu *mecR1* je větší.



Obr. 6 Třídy *mec* genového komplexu vyskytující se u stafylokoků.

Vyznačené šipky ukazují směr transkripce (Hanssen a Ericson Sollid, 2006).

Druhou základní složkou SCC*mec* je *ccr* komplex kódující specifické rekombinázy *CcrA*, *CcrB* a *CcrC*. Tyto polypeptidy udělují stafylokokové kazetě mobilitu. *Ccr* komplex se vyskytuje v pěti různých typech, které byly pojmenovány *ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* a *ccrC* (Ito *et al.*, 2001, 2004; Oliveira *et al.*, 2001). Zbytek SCC*mec* označujeme jako *J* oblasti (*junkyard*). Tyto části kazety nejsou pro bakteriální buňku nijak významné. Jejich součástí však mohou být integrované geny udělující buňce rezistenci k těžkým kovům nebo antibiotikům, které nepatří do β -laktamové skupiny (Ito *et al.*, 2003).

3.6.3 Nosičství MRSA

MRSA je patogen, který je schopen nákazy jak exogenního (infekční agens zaneseno do organismu z vnějšího prostředí – jiný pacient, zdravý nosič, zdravý personál, návštěva), tak i endogenního původu (agens je vlastní kmen nemocného, který je z kolonizovaného místa zavlečen do jiného systému). Cestou přenosu může být přímý nebo nepřímý kontakt s infikovanou osobou či zdravým nosičem MRSA, kontaminovanými rukavicemi, rukama personálu, prostřednictvím vyšetřovacích pomůcek (např. fonendoskopy) či vzduchem v kontaminovaném prostředí. Nejčastějším hostitelem se poté stává pacient s oslabenou imunitou, jehož přirozené obranné mechanismy byly narušeny. U takto imunokompromitovaných jedinců je velmi důležitá včasná a rychlá diagnostika a cílená terapie, protože může dojít k rozvoji systémové infekce odpovídající zejména infekci krevního řečiště, pneumonii nebo infekcím kostí a kloubů.

Jako nosič MRSA je označována osoba bez klinických známek infekce. Nejčastěji je nosič osídlen MRSA na nosní sliznici, kůži perinea, třísel, axil a hýždí, méně často ve faryngu. Pokud jsou současně odebrány vzorky z nosu, krku a perinea, lze prokázat až 98,3 % nosičů. Nosičství představuje základní způsob šíření MRSA, ale u zdravých osob nemusí nutně znamenat příčinu šíření infekce. Riziko přenosu se zvyšuje při akutním respiračním infektu. Nosičství MRSA může trvat týdny, měsíce až roky, může být i intermitentní, a proto obtížně mikrobiologicky prokazatelné. Rizikovými faktory pro vznik nosičství MRSA jsou delší pobyt v nemocnici, zvláště na JIP, invazivní výkony, léčba antibiotiky, diabetes mellitus, hemodialýza a kožní choroby. V komunitním spektru infekcí MRSA výrazně převažují solitární kožní infekce s infekcemi měkkých tkání (Bergerová *et al.*, 2006; Jindrák, 1998; Šrámová *et al.*, 2001; Pourová *et al.*, 2007; Veselý, 2015).

Methicilin rezistentní *S. aureus* se v určitém věku objevuje skoro u všech dětí a přibližně u čtyřiceti procent dospělých. Na některých odděleních se můžeme setkat až s dvaceti pěti procenty pacientů kolonizovaných infekcí způsobenou MRSA (Maďar *et al.*, 2006). U vysoce rizikových pacientů, polymorbidních, imunosuprimovaných apod. považujeme nosičství MRSA po prodělané manifestní infekci za doživotní (Krupková *et al.*, 2008). Vzhledem k široké antibiotické rezistenci kmenů MRSA a spektru pacientů postižovaných MRSA infekcemi je výskyt MRSA ve zdravotnických zařízeních sledován

a podléhá zvláštnímu režimu. Účelem těchto opatření je zabránit dalšímu šíření kmenů MRSA v rámci prostředí zdravotnických zařízení (Veselý, 2015).

3.6.4 Epidemiologie MRSA

Výskyt MRSA celosvětově narůstá v nemocničním i komunitním prostředí, děje se tak především v závislosti na rozdílech regionálně uplatňovaných při protiepidemických opatřeních a antibiotické politice. Jako silné selektory MRSA se uvádějí především cefalosporiny všech generací, chinolony a makrolidy, tedy antibiotika, jejichž užití je v empirické terapii velmi běžné. V Evropě je výskyt MRSA od roku 2000 systematicky sledován celoevropským systémem EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) a mezi jednotlivými zeměmi existují výrazné rozdíly. Nejnížší frekvence MRSA mezi izolovanými kmeny *S. aurea* připadá na Dánsko, Švédsko, Island a Nizozemsko (pod 5 %). V České republice vzrostla prevalence invazivních infekcí způsobených MRSA z 3,8 % v roce 2000 na 14,3 % v roce 2005. Mnohem závažnější je skutečnost, že tyto infekce byly v roce 2005 potvrzeny již v 51 z 88 českých nemocnic, sledovaných systémem EARSS. Situace v České republice odpovídá výskytu MRSA v Rakousku (od 6 do 15 % izolovaných kmenů *S. aurea*). Španělsko, Portugalsko, Itálie a Řecko spolu s Velkou Británií a Irskem pak představují oblasti s vyšší frekvencí výskytu MRSA (16-25%). Celkově lze konstatovat, že se v řadě zemí EU situace během posledních let stabilizovala nebo zlepšila (Bergerová *et al.*, 2006; Veselý, 2015).

3.6.5 Léčba MRSA

U nekomplikované infekce charakteru furunklu či abscesu běžně postačuje incize a drenáž s odstraněním nekrotické tkáně, pokud je přítomna. Celková antibiotická léčba je nutná, když jsou přítomny známky komplikací těchto procesů. Mezi indikátory hospitalizace jako nutného postupu patří zejména horečka, lymfangoitida, resp. flegmona nebo celulitida, rychlá progresse lokálního nálezu, závažné komorbidity, imunosuprese, nemožnost chirurgicky zcela sanovat ložisko, selhání chirurgické léčby ve smyslu recidivy nálezu po zákroku a příslušnost ke krajním věkovým skupinám. V případě komplikací a systémových infekcí nelze použít běžná antibiotika. Nejvhodnějšími antibiotiky k léčbě ambulantně zvladatelných infekcí MRSA jsou sulfonamidy, zastoupené alespoň v ambulantní praxi výhradně kombinací

trimethoprimu se sulfamethoxazolem (cotrimoxazol). Vankomycin, daptomycin, ceftarolin, tigecyklin a linezolid jsou antibiotika, která jsou v léčbě MRSA účinná, ale jejichž užití je v ambulantní praxi silně omezeno z více různých důvodů, od nutnosti parenterálního podávání, přes toxicitu s nutností laboratorního monitoringu léčby, až k farmakoeconomickým dopadům, jako je úhrada pojišťovnou vázaná na hospitalizaci. Dalším přírůstkem do terapeutického arzenálu proti MRSA se staly semisyntetické deriváty vankomycinu: dalbavancin a telavancin, schválené v květnu a červnu 2014 americkým FDA (Food and Drug Administration) k léčbě stafylokokových infekcí včetně MRSA ve specifických indikacích, dalbavancin k léčbě bakteriálních infekcí kůže a podkoží, telavancin k užití při nozokomiálních, zejména ventilátorových pneumoniích způsobených MRSA (Veselý, 2015).

3.7 Současné metody detekce MRSA

Pro cílené kontroly přijatých pacientů, personálu a prostředí byla potřeba vyvinout metody pro rychlou identifikaci MRSA kmenů. Klasické mikrobiologické metody, které umožňují identifikaci během 24-96 hod., nejsou pro tyto účely příliš vhodné. Opírají se především o selektivní kultivaci na pevných nebo v tekutých médiích. V současnosti existuje celá řada vyhledávacích metod, které jsou většinou založené na multiplexu PCR, kdy se detekuje gen *mecA*. Jejich limitací je však nutnost použití čistých kolonií stafylokoků, dále vysoká cena a časová náročnost, proto se v laboratořích běžně neprovádí (Datta *et al.*, 2011; Sakoulas *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2004).

3.7.1 Detekce methicilin rezistentních kmenů pomocí fenotypových metod

Pro detekci MRSA v rutinních klinických laboratořích jsou požadavky na jednoduché, rychlé, přesné a citlivé metody, ale detekce MRSA v laboratoři je komplikována tím, že populace s nízkým nebo extrémně nízkým počtem bakterií rezistentních k oxacilinu se mohou jevit jako citlivé k tomuto antibiotiku. Tyto populace se označují jako heterorezistentní k oxacilinu. Při vyhledávání MRSA se proto doporučuje užití více metod současně. Existuje řada laboratorních metod detekce založené na fenotypových projevech, které se dají použít při identifikaci MRSA, tyto metody jsou uvedeny v Tab. 1. Mezi tradiční metody patří oxacilinový diskový test nebo diskové metody s cefoxitinem, diluční metody s oxacilinem

a testy, které kombinují principy diskové difúzní a diluční metody, tzv. E – testy. Pro tyto testy se používá Müeller-Hintonův agar (MH agar) s přídavkem 2% NaCl pro zlepšení detekce nebo BSAC Columbia agar. Pro screening kolonií izolovaných na rutinních médiích a pro potvrzení suspektní rezistence je doporučována kultivace na MH agaru obsahující 4% NaCl a 6 mg/l oxacilinu. Jako vysoce spolehlivá metoda se ukázala metoda s cefoxitinem, kterou se podařilo detekovat MRSA kmeny, které byly při použití rutinních metod negativní. Tato metoda je doporučována EARSS manuálem a také National Comitee for Clinical Laboratory Standards (dříve NCCLS dnes CLSI), pro zvýšení spolehlivosti interpretace je dobré ji kombinovat s ostatními fenotypovými metodami. Další možností pro rychlou identifikaci MRSA jsou latexové aglutinační testy (Brown *et al.*, 2005; Urbášková *et al.*, 2003; 2004).

Tab. 1 Detekce MRSA pomocí fenotypových metod (Urbášková *et al.*, 2003).

Vyhledávací metoda	s 6 mg/ l oxacilinu
	s 2 mg/ l oxacilinu
Disková – difuzní metoda	pro vyšetření citlivosti k oxacilinu s cefoxitinem pro průkaz MRSA
Diluční mikrometoda	pro vyšetření citlivosti k oxacilinu
E – test (Gradientová difuzní metoda)	pro vyšetření citlivosti k oxacilinu
Průkaz PBP2a	latexovou aglutinací

3.7.2 Detekce methicilin rezistentních kmenů pomocí molekulárně genet. metod

Molekulárně genetické metody jsou stabilnější oproti fenotypovým metodám a mají tu výhodu, že jsou nezávislé na expresi genů. Tyto metody jsou založené na detekci *mecA* genu a umožňují poměrně jednoznačnou identifikaci methicilin – rezistentních kmenů *S. aureus*. První hybridizační metody k detekci používaly radioaktivně značené DNA sondy nebo sondy značené digoxigeninem (Archer a Pennell, 1990). V současnosti jsou používány PCR metody

jako standardní metody referenčními laboratořemi. Izoláty *S. aureus* s hraniční rezistencí mohou podle studií vykazovat diskrepance. V těchto případech, kdy není rezistence zprostředkována *mecA* genem, jsou výsledky molekulárních metod negativní. Stejný problém může představovat kmen vyskytující se pouze v určité lokalitě, který neobsahuje cílovou sekvenci. Naopak mohou být detekovány i citlivé kmeny s nefunkčním genem *mecA* nebo s genem, který není exprimován (Brown *et al.*, 2005; Štěpán *et al.*, 2004). Hlavním problémem klasických PCR metod pro detekci MRSA založených na detekci genu *mecA* a genů specifických pro *S. aureus* (např. *nuc* a *fem*) je nízká citlivost u přímé analýzy klinického materiálu. Přítomné koaguláza negativní stafylokoky, které obsahují gen strukturálně identický nebo velmi podobný s genem *mecA* u MRSA, mohou způsobovat falešně pozitivní výsledky. Tyto metody proto stále vyžadují počáteční kultivační a identifikační kroky, což prodlužuje celkovou dobu vyšetření. Cílem při vývoji nových metod bylo tedy zvýšit citlivost a zároveň co nejvíce zkrátit dobu analýzy. Za účelem zrychlit diagnostiku se používá metoda real-time PCR (pomocí hybridizace s fluorogenní sondou). Tento test je označen jako IDI-MRSA assay (Infectio Diagnostic Inc., Sainte-Foy, Québec, Canada) a představuje komerčně dostupný a spolehlivý test pro přímou detekci MRSA z nosních výtěrů. Senzitivita i specifita testu dosahují více než 90 % ve srovnání s kultivačními metodami využívající selektivní média. Výsledky jsou dostupné do 1,5 hod (Warren *et al.*, 2004, Brown *et al.*, 2005). K dalšímu určení MRSA pomocí molekulárně genetických metod jsou v současnosti využívány tyto další metody detekce:

- Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) = pulsní gelová elektroforéza

PFGE je jedna z nejtypičtějších metod užívaných pro typizaci *S. aureus*. Chromozomální DNA je rozložena restriční enzymem *SmaI* a vzniklé fragmenty DNA jsou separovány agarózovou gelovou elektroforézou v elektrickém poli se střídavým napětím. Získané profily jsou analyzovány pomocí speciálního softwaru, např. GelCompar II. PFGE je levnější než MLST, ale její nevýhoda spočívá ve značné variabilitě výsledků v různých laboratořích.

- Multilocus sequence typing (MLST) = sekvenování

MLST se ukázalo jako výborná metoda pro studium molekulární evoluce *S. aureus* (Deurenberg a Stobberingh, 2008). Tato metoda je založena na sekvenování zhruba 500 kb dlouhých fragmentů sedmi referenčních genů. Každé sekvenci každého referenčního genu odpovídá jiná alela. Tyto alely sedmi genů definují druhovou linii *S. aureus* a tvoří

alelový profil nazývaný sequence type (ST). Kmeny jsou podle podobnosti ST řazeny do tzv. klonálních komplexů (CC).

MLST a PFGE mohou pomoci při určování kmenů, které jsou blízké příbuzné, ale ne všechny kmeny jsou zjistitelné těmito metodami. Například typický LA-MRSA kmen, který náleží k typu 398, odolává rozložení enzymem *SmaI* v tradiční PFGE a výsledky nejsou použitelné.

- *Spa* typing

Je další důležitou metodou pro genotypizaci, která umožňuje identifikovat kmeny nerozlišitelné PFGE nebo MLST (van Loo *et al.*, 2007). Tato metoda detekuje variace v sekvenci polymorfního regionu X na stafylokokovém proteinu A (*spa*). Rozmanitost v genu *spa*, který se skládá převážně z krátkých opakujících se úseků je připisována bodovým mutacím a také delecím a duplikacím opakujících se úseků. Protože se sekvenuje pouze jediný lokus je *spa* typing ve srovnání s MLST levnější, méně pracná a méně časově náročná. Další výhodou je dostupnost softwarového balíku StaphType, který se používá k vyhodnocování výsledků sekvenování v lokálních i referenčních laboratořích po celém světě (Deurenberg a Stobberingh, 2008).

- DNA microarrays

Tato metoda, založená na principu hybridizace, probíhá na membráně nebo skleněné destičce, na které jsou mikrodávkočtem naneseny jednotlivé oligonukleotidy (DNA sondy). Po převrstvení testovaným vzorkem dojde v případě pozitivní reakce k navázání cílové DNA na DNA sondu. Tato cílová DNA je označena fluoroforem, který v případě navázání na DNA emituje světlo, jenž se projeví fluorescencí. Dle množství navázané cílové DNA se projeví i intenzita fluorescenčního signálu. Výhodou této metody je možnost kvantitativního i kvalitativního stanovení a sledování až stovek specifických úseků DNA v jedné reakci (McMeekin, 2003).

3.8 Imunologické metody

3.8.1 Obecné vymezení pojmů pro imunologické metody

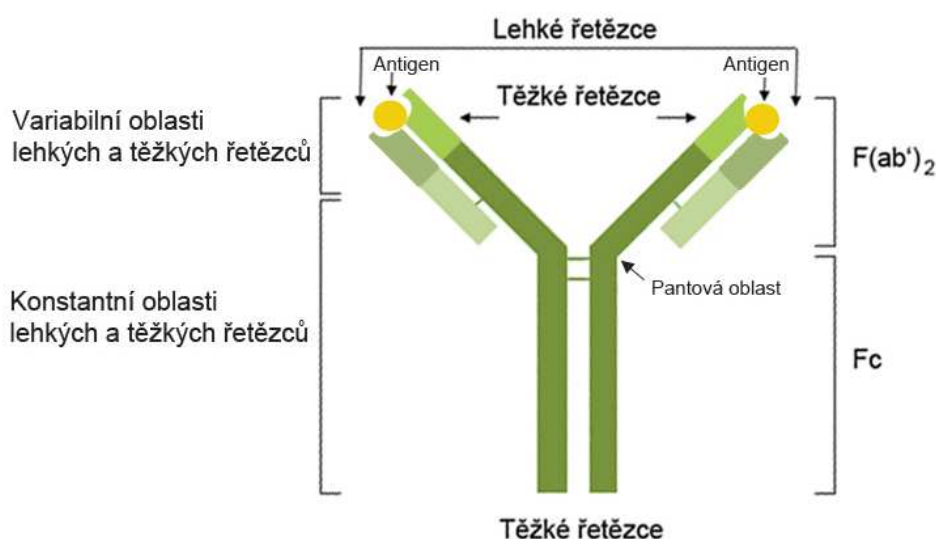
3.8.1.1 Antigen

Antigen je látka, kterou imunitní systém rozpozná a reaguje na ni. Jako antigeny mohou působit prakticky jakékoli chemické struktury. K tomu, aby na ně imunitní systém mohl reagovat je zpravidla potřeba, aby byly rozeznány ve formě makromolekul. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy, lipoproteiny a nukleové kyseliny. Antigenem může být také nízkomolekulární sloučenina, tzv. haptén, která dokáže vyvolat imunitní odpověď pouze po navázání na látku s vyšší molekulovou hmotností (např. na protein). Oblast molekuly antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory, se nazývá epitop (Hořejší a Bartůňková, 2002).

3.8.1.2 Protilátka (imunoglobulin)

Protilátka je glykoprotein, zvaný imunoglobulin, produkován plazmatickou buňkou, která je konečným stádiem vývoje B lymfocytů (Bartůňková a Paulík *et al.*, 2011). Reaguje s antigenem, váže se ke specifickému epitopu na základě vzájemné komplementarity na principu zámku a klíče. Základní funkcí imunoglobulinů je reakce se specifickými antigeny, kromě toho mají schopnost vázat komplement, což vede k lýze buňky nebo se připojují k receptorům jiných buněk a aktivují je k činnosti (Penka a Tesařová *et al.*, 2012). Imunoglobuliny tvoří přibližně 20 % celkových proteinů séra a lze je dobře charakterizovat elektroforeticky. Základní jednotka imunoglobulinu obsahuje 4 polypeptidové řetězce, z nichž dva řetězce jsou označovány jako lehké neboli L (přibližná velikost 25 kDa) a dva řetězce jsou označovány jako těžké neboli H (přibližná velikost 50–75 kDa). Těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými vazbami. Oblast, ve které jsou těžké řetězce spojeny disulfidickými vazbami, se nazývá pantová oblast. Ke každému H řetězci je disulfidickou vazbou připojen jeden L řetězec. Těžké řetězce se skládají ze čtyř (u některých tříd z pěti) strukturně podobných domén, každá doména je tvořena sekvencí 110-120 aminokyselin. Polypeptidický řetězec obsahuje variabilní část na N konci svého řetězce, zbytek molekuly je konstantní částí. Detaily struktury variabilních částí se individuálně liší mezi molekulami

produkovanými různými klony B lymfocytů. Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí společné vazebné místo pro antigen. Molekulu imunoglobulinu lze za vhodných podmínek proteolyticky rozštěpit na fragmenty. Pepsinem lze imunoglobulin štěpit na jeden F_c fragment a jeden bivalentní $F(ab)_2$ fragment (Obr. 7). Použitím enzymu papainu lze získat dva identické fragmenty Fab a jeden fragment F_c . Lehké řetězce existují ve dvou typech (κ a λ), liší se primární strukturou konstantních domén a jsou kódovány odlišnými geny, jež se nacházejí na různých chromozomech. Geny, kódující konstantní části různých izotypů těžkých řetězců (α , δ , γ , ϵ , a μ), leží na úseku chromozomu č. 14. U řetězců γ rozlišujeme čtyři subtypy $\gamma 1$ - $\gamma 4$ a u α dva subtypy $\alpha 1$, $\alpha 2$. Dle typu těžkého řetězce se rozdělují imunoglobuliny do tříd IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgG (IgG1 – IgG4), IgE a IgM (Hořejší, Bartůňková, 2002).



Obr. 7 Molekula imunoglobulinu, dostupné z: <<http://labguide.cz/protilatky/>>

Dělení imunoglobulinu dle typu těžkého řetězce:

a) třída IgG – tvoří asi 75 % celkových imunoglobulinů v lidském séru. Třída IgG se skládá z podtříd IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Jednotlivé podtřídy se liší schopností vázat komplementový C1 protein a většinou se dobře váží na F_c -receptory fagocytů. V séru se IgG vyskytuje jako monomer. Tato třída udává sérologický obraz o prodělané infekci (sekundární infekci).

b) třída IgM – představuje asi 10 % celkových imunoglobulinů v lidském séru. IgM je protilátkou časně imunitní odpovědi na většinu antigenů, protože je hlavním imunoglobulinem přítomným na povrchu B lymfocytů (monomer). IgM po navázání na antigen dobře váže komplementový protein C1 a aktivuje takto klasickou dráhu komplementu, neváže se však na *Fc*-receptory fagocytů. V séru se nachází převážně jako pentamer.

c) Třída IgD – v lidském séru je přítomno asi 0,2 % z celkového množství imunoglobulinů. Spolu s IgM je hlavním povrchovým imunoglobulinem přítomným na B lymfocytech. Jeho základní funkce zatím nebyla zcela objasněna. Předpokládá se, že se podílí na diferenciaci B lymfocytů. V séru se nachází jako monomer.

d) Třída IgA – její podíl je asi 15 % z celkových imunoglobulinů v lidském séru, vyskytuje se ve dvou formách, slizniční a sérové. Molekuly IgA jsou ve velkých množstvích sekretované na povrch sliznic, kde tvoří významnou součást ochrany proti mikroorganismům. Slizniční IgA se skládá ze dvou monomerů. Sérový IgA je buď monomer, dimer nebo trimer. IgA funguje jako opsonin, neaktivuje komplement.

e) Třída IgE – na celkovém množství sérových imunoglobulinů se podílí pouze 0,004 %. Hraje významnou úlohu v obraně organismu proti parazitárním infekcím a je hlavní příčinou alergických reakcí. V séru se vyskytuje jako monomer (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Protilátky se rozlišují na tzv. polyklonální a monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou heterogenní směsí produktů mnoha aktivovaných klonů B-lymfocytů. Různé klony B-lymfocytů produkují strukturálně různé protilátky, které se vážou k různým epitopům antigenu, jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo proti směsi antigenů. Jestliže je do organismu savce vstříknuta cizí substance (antigen), aktivované B-lymfocyty proliferují v buňky plazmatické a začnou produkovat protilátky, jež se k tomuto antigenu vážou. Tím, že spektrum buněk i spektrum jimi tvořených protilátek je proměnlivé, je obtížné tak komplexní směs protilátek standardizovat. Specifita polyklonálních protilátek velice závisí na průběhu imunizace, resp. na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi protilátky analyzujeme. Oproti tomu jsou monoklonální protilátky produktem jen jednoho klonu B-lymfocytů a jsou specifické proti jediné antigenní determinantě (Vrána *et al.*, 2011).

3.8.1.3 Reakce antigen – protilátka

Pro vznik imunologické odpovědi, tzn. obrany těla proti cizím látkám, je důležitá reakce antigenu s protilátkou (označována jako interakce Ag/Ab). K této reakci může docházet jak *in vivo*, tedy uvnitř těla jedince, tak i *in vitro*, tedy v laboratorních podmínkách. Produkovaná protilátka proti danému antigenu nebo ta, která je již v krvi obsažena, nasedá svým vazebným místem ve variabilní oblasti na antigenní determinantu a spojuje se s ní silami Coulombovými, dále prostřednictvím vodíkových můstků, hydrofobní vazbou a silami van der Walsovými. Mezi antigenní determinantou a vazebným místem protilátky nemusí být naprostá shoda. Proti každé determinantě tělo tvoří řadu protilátek, které s ní korespondují (polyklonální protilátky). Protilátka se může kombinovat i s antigenem, který její tvorbu nevyvolal, jde o tzv. zkřížené reakce, přičemž síla těchto vazeb je různá (Strejček a Lokaj, 1985).

- a) Interakce Ag/Ab *in vivo* – biologický význam této interakce závisí především na specifické eliminaci antigenního materiálu. Protilátkové molekuly jsou schopny neutralizovat toxiny tím, že se vážou na antigenní determinanty uvnitř nebo v blízkosti aktivního toxického místa a brzdí tak reakci toxinu s jeho substrátem. Po navázání protilátky na antigen dochází k aktivaci komplementu, což vede k lýze buňky. Protilátky jsou schopny aglutinovat nejrůznější korpuskulární antigeny (např. antigeny cizí krevní skupiny) a usnadňovat tak jejich fagocytózu. Schopnost protilátek eliminovat antigen je často spjata s mechanismy nespecifické imunity, tím že antigenní materiál opsonizují, umožňují jeho fagocytózu.
- b) Interakce Ag/Ab *in vitro* – reakce probíhá ve dvou fázích. Primární fáze je reakce specifická a sekundární je vlastní reakce sérologická, která je určena fyzikálním stavem komplexu antigen/protilátka a jeho biologickými následky. Někdy se k této reakci využívá metoda imunoprecipitace. V tomto případě se smíchá antigen s protilátkou a za vhodných podmínek, jako je např. optimální kvantitativní poměr Ag/Ab, vznikají imunokomplexy, které nejsou dostatečně hydrofilní, a proto jsou schopny precipitace, tzn. tvorby nerozpustné sraženiny (Strejček a Lokaj, 1985).

3.8.2 Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA je jednou z nejrozšířenějších imunologických – enzymatických metod. U ELISY je jeden z reaktantů (antigen nebo protilátka) imobilizován na pevnou fázi, nejčastěji na stěny jamek mikrotitračních destiček. Podle uspořádání reakce dělíme ELISU na kompetitivní a nekompetitivní.

- Kompetitivní (soutěživá) ELISA

Stanovovaný antigen soutěží se známým množstvím stejného antigenu, na který je navázán enzym, o vazbu na limitované množství protilátky zakotvené na pevné fázi. Po odmytí nenavázaných antigenů následuje přidání bezbarvého substrátu, ze kterého se účinkem enzymu stává barevný reakční produkt. Intenzita zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Ze sestrojené kalibrační křivky ze standardních vzorků se odečítají hodnoty koncentrace neznámých vzorků. Těto techniky se využívá především ke kvantifikaci nízkomolekulárních látek, které mají málo vazebných míst pro protilátku, takže je nelze stanovit sendvičovou technikou. Musí být vždy k dispozici čistý antigen pro značení enzymem. Určité obtíže mohou v případě značení nízkomolekulárních antigenů enzymem vzniknout z nepoměru jejich molekulových hmotností. Na relativně malou molekulu antigenu (cca 1000 Da) se váže např. peroxidáza o velikosti 44 000 Da. Mohou se proto někdy projevovat problémy sférického bránění při reakci značeného antigenu s protilátkou. Tento problém lze často úspěšně vyřešit použitím detekčního systému biotin – avidin nebo biotin – streptavidin.

- Nekompetitivní (nesoutěživá, sendvičová) ELISA pro kvantifikaci antigenů

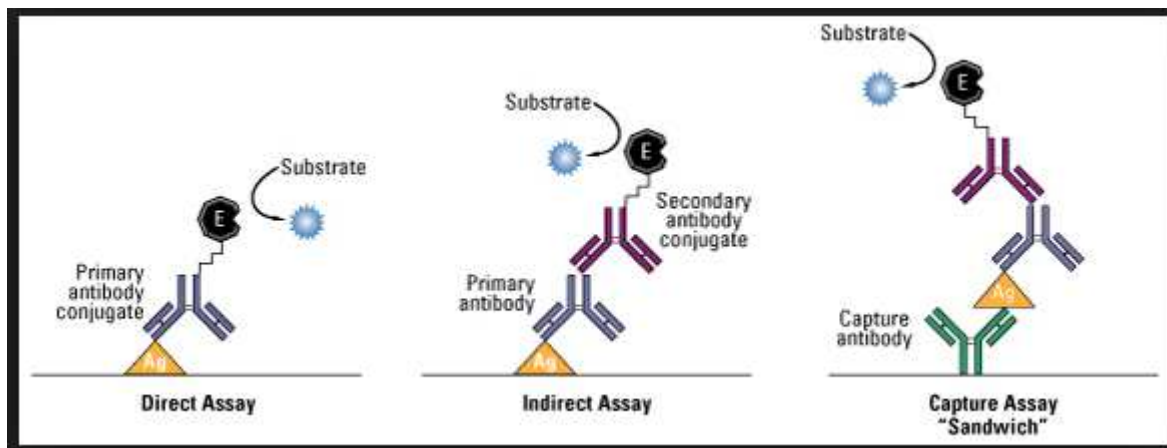
Na pevný nosič, na kterém jsou imobilizované protilátky, se váže standardní nebo neznámé množství antigenu. Po promytí následuje přidání druhé protilátky, tentokrát označené enzymem. Nutným předpokladem tedy je, aby stanovovaný antigen měl alespoň dva odlišné epitopy. Specifita značené protilátky musí být proti jinému epitopu, než je specifita protilátky vázané na pevné fázi. Po promytí se přidává vhodný substrát, dochází k enzymem katalyzované přeměně bezbarvého substrátu na barevný produkt. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Pro vyhodnocování se

opět sestrojíte kalibrační křivka ze standardních vzorků. Stejně jako u kompetitivní ELISY lze citlivost sendvičové ELISA metody zvýšit biotin – avidinovou nebo biotin – streptavidinovou reakcí.

K výhodám sendvičové ELISA metody patří, že nemusí být k dispozici značený čistý antigen. Stačí mít standardní antigen se známým obsahem sledovaného antigenu. K tomuto testu lze také použít monoklonální protilátky tak, že jedna se použije k vazbě na pevnou fázi a druhá (proti jinému epitopu antigenu) k detekci. Rovněž lze použít kombinaci jedné protilátky monoklonální a druhé polyklonální. Pomocí monoklonálních protilátek můžeme provádět tzv. *one step assay*, jedná se o modifikovanou podobu metody sendvičové, ve které nelze použít polyklonální protilátky. Jedna monoklonální protilátka je navázaná na pevný nosič, druhá protilátka proti jinému epitopu stejného antigenu je značená enzymem. Všechny reagensie se inkubují najednou, vyšetřovaný vzorek, konjugát a protilátka na pevné fázi. Po inkubaci následuje jedno promytí a přidání substrátu.

- Nekompetitivní (nesoutěživá, sendvičová) ELISA pro detekci protilátek

Antigen vázaný na stěnu jamky mikrotitrační destičky reaguje s testovanou protilátkou a po promytí se aplikuje značený antiglobulin. Do testu lze použít pouze antigen o dostatečné čistotě, značené antiglobuliny jsou běžně dostupné. Obvykle se srovnává testovaná protilátka (sérum) s kontrolním pozitivním a negativním sérem na každé destičce. Metoda se hodí k titraci protilátek třídy IgG i IgM, rozdíl je v použitém značeném antiglobulinu anti-IgG nebo anti-IgM. Není-li k dispozici čistý antigen, používá se modifikace sendvičové metody tak, že se váže na pevnou fázi nejprve specifická protilátka, která na sebe specificky váže antigen ze směsi. Další postup je stejný, jako je uvedeno výše. Další variantou vyšetření přítomnosti protilátek je uspořádání, kdy je na pevnou fázi navázán purifikovaný antigen, na který se aplikuje vyšetřované sérum. Po inkubaci a promytí se přidá značená protilátka proti antigenu imobilizovanému na povrchu mikrotitrační destičky. Negativní reakce značí přítomnost protilátek ve vzorku. I zde je možno antigen (nepurifikovaný) vázat na destičku přes protilátku, tento systém má výhodu vysoké specifity (Bartůňková a Paulík, 2005, Mančal, 1987).



Obr. 8 Zobrazení principů ELISY, dostupné z:

<<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>>

3.8.3 Western blotting

Western blotting je přenos elektroforeticky separovaných bílkovin na speciální membránu s následnou specifickou detekcí. V roce 1975 byl jako první popsán přenos fragmentů DNA z agarózového gelu na nitrocelulóзовou membránu a podle svého objevitele (E. M. Southerna) byla metoda nazvána Southern blotting. O pár let později byl blotting zdokonalen, místo nitrocelulóзовé byla použita diazobenzylxymethylcelulóзовá membrána, která umožnila přenos i menších fragmentů DNA a RNA. Žertem se této modifikaci začalo říkat Northern blotting. V roce 1979 Towbin a jeho kolektiv elektroforeticky přenesli proteiny z polyakrylamidového gelu na nitrocelulóзовou membránu a pokračovali v „geografické“ nomenklatuře blotovacích metod.

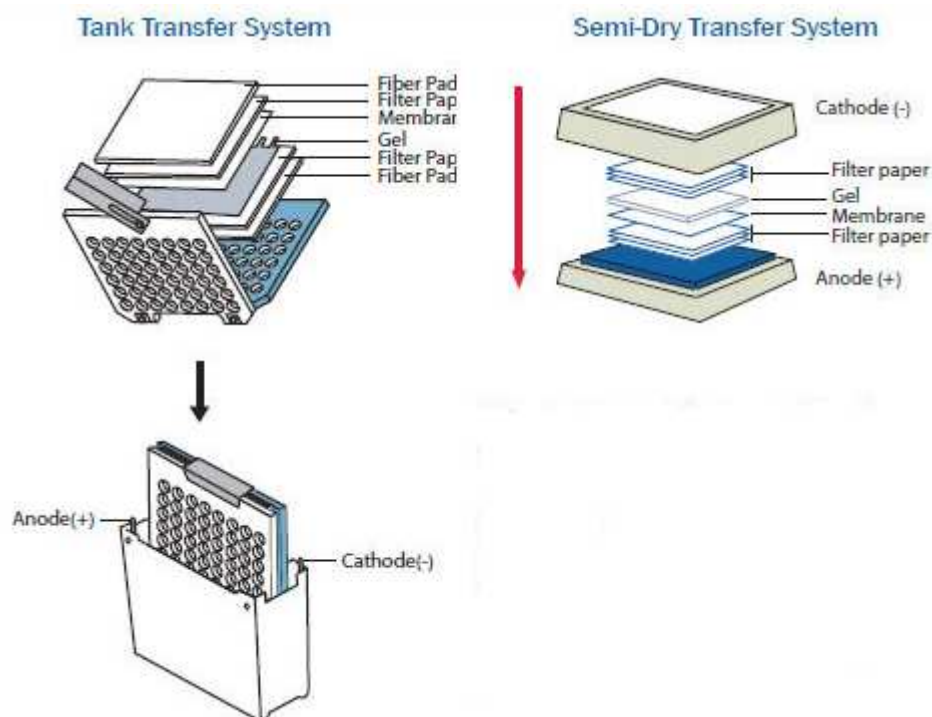
Blotting bílkovin se stal obvyklou laboratorní technikou, mezi jeho výhody patří zvýšená dostupnost bílkovin po přenosu na speciální membránu. Toho se využívá především u imunodetekce, která by na vlastním gelu nebyla uskutečnitelná, jelikož vysokomolekulární protilátky špatně difundují do gelu. Další výhodou je zakoncentrování bílkovin na membráně, což vede ke zvýšení citlivosti detekce. Protože jsou bílkoviny na membráně kovalentně nebo nekovalentně imobilizovány, nedochází k jejich difúzi, a tím ke ztrátě elektroforetického rozlišení. Mezi přednosti blottingu rovněž patří jednodušší manipulace i následné uchování membrány, která je mnohem pevnější a odolnější než vlastní gel (Glatz, 1995).

Samotnému blotování předchází elektroforéza, nejčastěji SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfátová polyakrylamidová gelová elektroforéza). Tato metoda odděluje proteiny primárně podle jejich molekulární hmotnosti. SDS (dodecylsulfát sodný) se váže k hydrofobním částem proteinu, rozrušuje jeho sbalenou strukturu a umožňuje mu existovat stabilně v roztoku v jeho rozvinuté konformaci. Délka komplexu SDS-protein je přímo úměrná k jeho molekulární hmotnosti (Bollag *et al.*, 1996). Přídavkem vzorkovacího pufru s obsahem SDS, který se smíchá se vzorkem, dochází jednak k denaturaci proteinů a také všechny proteiny získávají negativní náboj tím, že se na ně navazují anionty SDS. Proteiny migrují k anodě a rychlost jejich migrace závisí jen na jejich molekulové hmotnosti. Proteiny s nejnižší molekulovou hmotností doputují v gelu nejdále. Vzorkovací pufr obsahuje také dithiothreitol nebo merkaptoethanol, který slouží k redukci disulfidových vazeb. Před nanesením vzorku proteinu do gelu je třeba směs vzorkovacího pufru a proteinu povařit, což napomáhá kompletní denaturaci proteinů. SDS-PAGE analyzuje proteiny v rozsahu 1-100 kDa (Westermeier, 2005). Pro velmi malé proteiny, které mají být separovány, je vhodné použít elektroforézu s tricinem, kdy jsou rozlišeny proteiny o velikosti 5-20 kDa. Proteiny nad 30 kDa jsou separovány už v zaostřovacím gelu (Schägger a Von Jagow, 1987). Western blot můžeme rozdělit do dvou částí, a to přenos proteinů z gelu na membránu a označení cílových epitopů specifickou protilátkou (Bollag *et al.*, 1996).

Existuje několik variant blottingu, které se liší silou použitou pro přenos bílkovin, tyto varianty jsou: difuzní, kapilární, vakuový blotting a elektroblotting. Nejrychlejší, nejpoužívanější a nejúčinnější je elektroblotting. Používají se dvě metody elektroblottingu, každá s trochu odlišným principem, ale pro obě je hnací silou přenosu elektrické pole.

- Při první metodě tzv. wet (tankovém) blottingu provedení je na jednu stranu gelu umístěna membrána, na ni a na druhou stranu gelu několik vrstev filtračního papíru. Vše je vloženo mezi dva držáky a umístěno do tanku s přenosovým pufrem. Na povrchu tanku jsou elektrody tvořené platinovými dráty, nerezovými nebo grafitovými deskami.
- U druhé metody, tzv. semi-dry elektroblottingu se používají plošné grafitové nebo nerezové elektrody. Na elektrody je položeno několik vrstev filtračního papíru nasycených pufrem, na ně gel, blotovací membrána a opět vrstvy filtračních papírů nasycené přenosovým pufrem. Takových uspořádání může být mezi elektrodami

několik, ale musí být odděleny dialyzační membránou, aby nedocházelo k přenosu bílkovin mezi jednotlivými blotovacími jednotkami. Mezi přednosti polosuchého blottingu především patří homogenní elektrické pole, zaručující rovnoměrný a účinnější přenos, menší spotřeba přenosového pufru a možnost přenosu bílkovin z několika gelů zároveň (Glatz, 1995).



Obr 9. Schematické znázornění tank a semi-dry varianty elektroblottingu, dostupné z:

<<https://www.novusbio.com/support/support-by-application/protein-transfer-gel>>

Kromě přenosu, který je realizován buď užitím jednosměrného elektrického proudu (elektroblotting) nebo klasickou difúzí položením membrány na gel (blotting) existuje i metoda dot blotting, kdy dojde k filtraci roztoku přes membránu na speciálních přístrojích (Ferenčík, 1989).

3.8.3.1 Blotovací membrány

Blotování probíhá nejčastěji na nitrocelulóзовou membránu (NC) nebo na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Výhodou nitrocelulóзовé membrány je její

vysoká afinita k proteinu a její retenční schopnosti, nicméně je poměrně křehká. V tomto ohledu PVDF membrány poskytují lepší mechanickou podporu a mohou být déle skladovány. U PVDF membrán se ovšem může více zbarvit pozadí, proto je důležité důkladné promytí po použití protilátky (Mahmood a Yang, 2012). Pro transport proteinů je důležitý typ gelu, molekulové hmotnosti, které chceme transportovat a membrána. Každá membrána má limit vazebné kapacity proteinů: NC membrána 80-250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, PVDF: $\sim 170 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nadbytek proteinů, který se pevně nenaváže, je odmyt při následném promývání (Sambrook a Russel, 2001). Membrány se před použitím musí zvlhčit v methanolu, jelikož jsou příliš hydrofobní. Dalším typem jsou pozitivně nabitě nylonové membrány, které mají mnohonásobně vyšší vazebnou kapacitu a pevnost. Používají se především pro přenos vysokomolekulárních bílkovin, protože nevyžadují přítomnost methanolu. Bílkoviny se na ně vážou silnou elektrostatickou silou, a proto může být na jediné membráně prováděna opakovaná detekce bez ztrát proteinů (Glatz, 1995).

3.8.3.2 Blokace vazebných míst

Po přenosu proteinů se membrána nechá inkubovat s látkou, která blokuje nespecifické navázání protilátky na membránu. Často se pro blokování používá odtučněné sušené mléko, které je levné a široce dostupné. Dále se pro blokování využívá hovězí sérový albumin (BSA), kasein nebo hemoglobin. Molekuly BSA obsadí všechna místa na membráně, kam se nepřenesly proteiny a kde by se potenciálně mohla navázat primární protilátka nespecifickou interakcí s membránou (Mahmood a Yang, 2012). Jinou možností je aplikace speciálních neiontových detergentů (Triton X 100, Tween 20), které volná vazebná místa neobsazují, ale zabraňují nespecifické vazbě bílkovin na membránu. Blokovací roztok nesmí vytěšňovat nebo modifikovat přenesené bílkoviny a ovlivňovat následnou detekci (Glatz, 1995).

3.8.3.3 Detekční metody po blottingu

Detekční metody používající se po blottingu můžeme rozdělit na specifické a nespecifické. Mezi specifické metody patří imunodetekce, detekce enzymů, glykoproteinů a detekce receptorových bílkovin. Pro nespecifickou detekci všech bílkovin na blotovací membráně jsou využívána klasická barviva, jako je Amido black, Coomassie Blue R 250 a Fast green. Všechna tato barviva nejsou příliš citlivá a nesmějí se používat pro barvení bílkovin na diazotovaných a nylonových membránách, které by poškodily. Dostatečně

citlivou a membránu nedeformující je metoda barvení roztoky koloidního zlata. Nevýhodou je její vyšší cena. Jinou možností je modifikace přenesených bílkovin nízkomolekulárními látkami, proti kterým byly připraveny protilátky. Tyto primární protilátky se váží na všechny bílkoviny na membráně a detekce je provedena značenou sekundární protilátkou (Glatz, 1995).

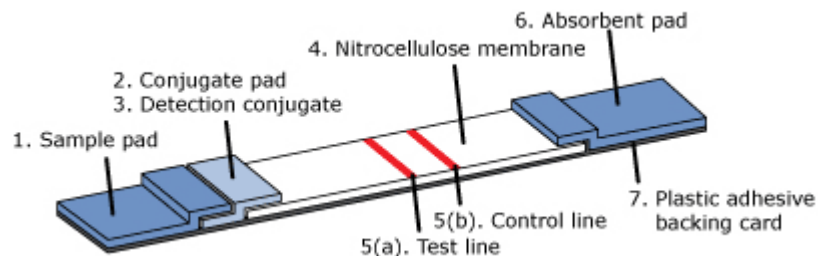
3.8.3.4 Imunodetekce

Imunodetekce patří k nejběžnějším navazujícím metodám analýzy bílkovin pomocí Western blottingu. V této specifické detekci se využívá vazba protilátky na bílkoviny. Po inkubaci specifickou primární protilátkou je membrána promyta promývacím pufrům a následně je přidána protilátka sekundární, která je vůči primární protilátce rovněž specifická. Promývání membrány po použití protilátky je velmi důležité, protože minimalizuje pozadí a odstraňuje nenávanou protilátku. Avšak promývání by nemělo trvat zbytečně dlouho, protože by mohlo zapříčinit snížení signálu detekovaného proteinu. Sekundární protilátky jsou značené, například radioaktivně, fluorescenčně nebo enzymaticky. K enzymatickému značení se nejčastěji používají peroxidázy nebo fosfatázy. Protože sekundární protilátky vytvářejí polyvalentní vazbu, zesilují indikační signál (Glatz, 1995, Mahmood a Yang, 2012). Kritickou částí této metody je detekce signálu pomocí protilátky. Důležité je určení koncentrace primární a sekundární protilátky, ty udávají sílu konečného signálu. Výsledek je také ovlivněn metodikou detekce a metodou měření detekce signálu. Vhodné je testovat různé blokovací roztoky a upřesňovat expoziční časy.

Pro analýzu Western blottingu mohou být využity jak monoklonální, tak polyklonální protilátky, ale v praxi jsou více využívány polyklonální protilátky. Jedna z jejich výhod je, že pokrývají větší množství molekul, o které máme zájem a vzniká tak větší signál. Nevýhodou je, že sérum může specificky vázat i molekuly, které pro nás nejsou důležité. Monoklonální protilátky jsou více sensitivní a specifické pro daný antigen. Omezení vzniká, pokud je specifita antigenu porušena (denaturována) elektroforézou (MacPhee, 2010). V porovnání s metodou ELISA, která slouží rovněž k detekci protilátek, je Western blotting citlivější a je schopen detekovat protilátky i u negativních výsledků ELISA testu (Litzman *et al.*, 2007).

3.8.4 Imunochromatografie (Lateral Flow)

Imunochromatografické testy jsou považovány za tzv. zjednodušenou verzi ELISA metody. Základem testu je membrána z nitrocelulózy, polyvinylidendifluoridu či nylonu, na kterou je aplikován kapalný vzorek. Membrána obsahuje protilátky, které jsou konjugovány obvykle s koloidním zlatem. Když je imunochromatografický proužek ponořen do suspenze vzorku, migruje kapilárně vzorek i protilátky konjugované s koloidním zlatem (konjugát). V přítomnosti námi hledaného proteinu vzniká komplex antigen – konjugát – protilátka, vizualizovaný v podobě pozitivní (červené) linie na detekčním proužku. Nezreagovaný konjugát dále vzlíná do kontrolní zóny, kde zreaguje s protilátkami a vznikne tak další proužek, který hodnotíme jako kontrolu funkčnosti testu. Velkou výhodou imunochromatografických testů je finanční nenáročnost a rychlost testu (3–15 minut). Nevyžadují školený personál a náročné laboratorní vybavení. Oproti testům ELISA však bývají o 10–15 % méně přesné. Imunochromatografické testy se využívají obvykle pro detekci alergenních proteinů a je možné provést jen kvalitativní detekci alergenu, případně semikvantitativní stanovení (Göselová *et al.*, 2014; Schubert *et al.*, 2009).



Obr. 10 Imunochromatografický test, dostupné z: <<http://sites.path.org/dx/rapid-dx/technologies/lateral-flow/test-components/>>

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Původ a ředění vzorků, bakteriální kmen MRSA

Odběry vzorků plazmy z krve pacientů probíhaly v roce 2016 až 2017 ve fakultní nemocnici Praha. Ředění vzorků sér a plazem bylo použito 1:51. Pro izolaci proteinu PBP2a byl použit bakteriální kmen methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* NCTC 8511.

4.1.2 Laboratorní přístroje

Váha AFP-2100L (ADAM Equipment Inc.)

Váha analytická HA-180M (AND A&D Company, Limited)

BioDot AD1500 (BIODOT Inc.)

Třepačka Biosan Vortex V-1 plus (MERCY, spol. s.r.o.)

Třepačka Mix-30 Bloty (TOOL Ltd.)

Řezačka stripů Guillotine cutter GCI-800 (ZETA Corporation)

Lednice HZOS3366 (GORENJE, spol. s r.o.)

Magnetická míchačka RCT Basic (IKA, NEOTECH, spol. s r.o.)

Mini Protean (BIO-RAD, spol. s.r.o.)

Ultrazvukový dezintegrátor Soniprep 150 (MSE Ltd.)

Digitální fotoaparát Coolpix FS570 (NIKON Corporation)

Mikrovlnná trouba Sencor SMW 1917WH (FAST ČR, a.s.)

Vodní lázeň GFL 1003 (LAB-MET, spol. s.r.o.)

Tiskárna Work force pro WF-5690 (Seiko EPSON Corporation)

Scanner HP Scanjet G2710 (HP Development Company, L. P.)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf AG)

Profinia Protein Purification System (BIO-RAD, spol. s.r.o.)

pH metr Mettler Toledo FiveEasy Plus FEP20 (FISHER SCIENTIFIC Co. L. L. C.)

Spektrofotometrický detektor Sunrise (TECAN GROUP Ltd.)

4.1.3 Materiál a laboratorní pomůcky

Nitrocelulózová membrána o porozitě 0,2 μm (SARTORIUS AG)
Dialyzační střevo – Dialysis tubing seamless, 43 mm (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Plastová podložka s adhezním lepidlem (BARTUŇKOVÁ, spol. s.r.o.)
Blotovací vanička pro detekci stripů (OBALPLAST SMRČÍ, spol. s.r.o.)
Pinzeta anatomická rovná 140 mm, nerezová (MERCY, spol. s.r.o.)
Červený popisovač Edding 142M (BÜROPROFI, spol. s.r.o.)
Univerzální etikety barevné (BÜROPROFI, spol. s.r.o.)
Lepicí tyčinka Pritt (BÜROPROFI, spol. s.r.o.)
Minutka digitální (VITRUM VWR, spol. s.r.o.)
Kopírovací papír First class (BÜROPROFI, spol. s.r.o.)
Souprava pipet Finnpiquette F1 4700850, 1–10 μl mikro, 10–100 μl , 100–1000 μl (THERMO FISHER SCIENTIFIC, spol. s r.o.)
Špičky Fisherbrand 2–200 μl , žluté (THERMO FISHER SCIENTIFIC, spol. s r.o.)
Špičky pipetovací 1000 μl (SARSTEDT, spol. s r.o.)
Magnetická míchadla (MERCK, spol. s.r.o.)
Mikrozkumavky typu Eppendorf 1,5 ml, bílé (MERCY, spol. s.r.o.)
Laboratorní sklo – odměrné válce, kádinky, nálevky (MERCY, spol. s.r.o.)
Lahve reagenční s GL 45 (MERCY, spol. s.r.o.)
Plastová blotovací miska (TESCO STORES ČR, a.s.)
Prosvětlovací stolek pro SDS-PAGE (TESTLINE, spol. s.r.o.)
Filtrační papír (MERCY, spol. s.r.o.)
F Sartorius NC filtr 1,5 μm ; 0,8 μm ; 0,45 μm ; 0,2 μm (BIOVENDOR, a.s.)
Záložka pro BLOT (BRNĚNSKÁ DRUTĚVA, výrobní družstvo)
Oboustranná lepicí páska (DDT, spol. s.r.o.)

4.1.4 Roztoky a chemikálie

Deionizovaná voda (TestLine, spol. s.r.o.)
Kyselina chlorovodíková p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
Hydroxid sodný p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
TRIS čistý (hydrometyl) aminome (LACH-NER, s.r.o.)

Chlorid sodný ČL 97 (PENTA, spol. s.r.o.)
Imidazole (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Směs inhibitorů proteáz, Complete EDTA-free (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Benzonase nuclease HC (MERCK, spol. s.r.o.)
Lysozyme from chicken egg white (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Complete His-Tag purification resin, 1 ml (ROCHE, spol. s.r.o.)
Chelaton III p.a. (EDTA), (VERKON, spol. s.r.o.)
Glycerol-glycerin ČL2005 (LACH-NER, s.r.o.)
DDT (Dithiothreitol), (BioTech a.s.)
Acrylamide suitable for elect. (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Methylene bis-acrylamide (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Amonium persulfate (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Temed (Tetramethyldiamin), (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Laurylsíran sodný (SDS) p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
Butylalkohol-n p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
Triton (R) X-100 (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Brilliant Coomassie Blue G (MERCK, spol. s.r.o.)
Ethanol 96% vol AnalaR NORMAPUR (VWR International, spol. s.r.o.)
Kyselina octová 99% p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
Black Protein Ladder ready to use (CENTRAL EUROPEAN BIOSYSTEMS, spol. s.r.o.)
BCA protein assay kit (GeneTiCA s.r.o.)
Trisma base (pro blot), (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Glycin p.a. (LACH-NER, s.r.o.)
Methanol p.a. (PENTA, spol. s.r.o.)
Ponceau'S Sigma, čern (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Casein Sodium Salt (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Tween 20 Sabosorp MLE (ACE Trade, spol. s.r.o.)
ProClin 300 Supelco (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Gentamycin inj. 40 mg/ml (MVDr. Michal Vitek)
Azid sodný extra pure (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)
Albumin hovězí sérový lyof. BSA (BIOVETA a.s.)
Chlorid hořečnatý hexahydrát (LACH-NER, s.r.o.)
Substrátový roztok BCIP/NBT (NBT: nitroblue tetrazolium, BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyfosfát dvojsodná sůl), (TESTLINE, spol. s.r.o.)

Konjugát Goat Anti-Human IgG, γ -Chain Specific Alkaline Phosphatase, Calbiochem (MERCK, spol. s.r.o.)

Konjugát Goat Anti-Human IgM, μ -Chain Specific Alkaline Phosphatase, Calbiochem (MERCK, spol. s.r.o.)

Konjugát Goat Anti-Human IgA, α -Chain Specific Alkaline Phosphatase, Calbiochem (MERCK, spol. s.r.o.)

Chlorid zinečnatý p.a. (MERCK, spol. s.r.o.)

Immunoglobulin IgG from human serum (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)

Immunoglobulin IgM from human serum (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)

Immunoglobulin IgA from human serum (SIGMA-ALDRICH, spol. s.r.o.)

4.1.5 Příprava pracovních roztoků

10% roztok HCl

K 3,74 ml deionizované vody bylo přidáno 1,27 ml kyseliny chlorovodíkové p.a. Přidává se vždy kyselina do vody. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

1 M roztok NaOH

K 0,08 g hydroxidu sodného p.a. se přidá 2 ml deionizované vody. Přidává se vždy voda k hydroxidu. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

Vazebný pufr 50T

Bylo naváženo 0,303 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 1,461 g chloridu sodného ČL 97 a 0,017 g Imidazolu a rozpuštěno v 50 ml deionizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl.

Promývací pufr 50T 2

Bylo naváženo 0,1212 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,5844 g chloridu sodného ČL 97 a 0,0136 g Imidazolu a rozpuštěno ve 20 ml deionizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl.

Eluční pufr 50T 1

Bylo naváženo 0,0909 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,4383 g chloridu sodného ČL 97 a 0,2553 g Imidazolu a rozpuštěno v 15 ml deionizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl.

Chelaton (EDTA) 0,5 M roztok

Navážka 0,186 g chelatonu III p.a. (EDTA) byla rozpuštěna v 1,0 ml deionizované vody.

Dialyzační pufr 9

Navážky 4,84 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 11,68 g chloridu sodného ČL 97; 0,4 ml chelatonu (EDTA) 0,5 M roztoku; 200 g glycerol-glycerinu ČL2005 a 0,3 g DDT (Dithiothreitolu) se rozpustí ve 2000 ml deionizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl.

Blotovací pufr

Navážka 3,03 g Trisma base (pro blot) a 14,41 g glycinu p.a. byla rozpuštěna v 750 ml deionizované vody, poté bylo přidáno 200 ml methanolu p.a. Roztok se skladuje při 2-8 °C.

Roztok Ponceau'S v 0,5% kyselině octové

K navážce 5 g Ponceau'S Sigma čern se přidá 10 ml kyseliny octové 99% p.a. a 990 ml deionizované vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Univerzální roztok BLOT

Navážky 33,88 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 409,08 g chloridu sodného ČL 97 se rozpustí v 10500 ml deionizované vody. Poté se roztok upraví na hodnotu pH 7,35-7,45 pomocí 10% roztoku HCl nebo 1 M roztoku NaOH. Po úpravě pH se k roztoku přidá 56,0 g Caseinu sodium salt a rozpouští se po malých dávkách za intenzivního míchání na míchadle. Poté se opět upraví pH roztoku na hodnotu 7,4-7,5 pomocí 10% roztoku HCl. K takto připravenému roztoku se přidá 14,0 ml Tweenu 20; 7,14 ml ProClinu 300 a 2,8 ml Gentamycinu inj. 40 mg/ml. Roztok se poté zfiltruje přes kaskádu AC/NC membrán Sartorius: pomocí filtru 1,5 µm; filtru 0,8 µm; filtru 0,45 µm; filtru 0,2 µm. Roztok se skladuje při 2-8 °C.

Blokovací pufr se 4% caseinu

K navážce 40 g Caseinu sodium salt jsem přidala 1000 ml Univerzálního roztoku BLOT. Roztok se míchá na míchadle s magnetickým míchadlem do druhého dne a uchovává se při teplotě 2-8 °C.

Azid sodný 10% vodný roztok

Navážka 0,5 g azidu sodného extra pure se rozpustí v 5 ml deionizované vody.

Pufr dialyzační TRIS pro ředění antigenu

Navážky 1,21 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 1,46 g chloridu sodného ČL 97 a 25 g glycerol-glycerinu ČL2005 se rozpustí v 500,0 ml deionizované vodě, poté se přidá 0,1 ml chelatonu (EDTA) 0,5 M roztoku a 5,0 ml azidu sodného 10% vodný roztok. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl. Namíchaný pufr se uchovává při teplotě 2-8 °C.

Inaktivovaný albumin 5% roztok

Bylo naváženo 9,68 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome a 116,88 g chloridu sodného ČL 97 a rozpuštěno ve 4000,0 ml deionizované vodě. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 7,55-7,65 pomocí 10% roztoku HCl. K takto připravenému roztoku se přidalo 200,0 g hovězího sérového lyof. albuminu (BSA) a 2,04 g ProClinu 300. Po rozpuštění se roztok inaktivuje 1 hodinu při 56 °C ve vodní lázni.

Ředící roztok konjugátu

Bylo naváženo 47,8 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 584,4 g chloridu sodného ČL 97; 20,0 g Tweenu 20 a rozpuštěno v 11000,0 ml deionizované vody. Poté se přidalo 4000,0 ml inaktivovaného albuminu 5% roztoku. Po promíchání se upravilo pH na hodnotu 7,4-7,5 pomocí 10% roztoku HCl. K takto připravenému roztoku se přidalo 10,2 g ProClinu 300 a 4,0 ml Gentamycinu inj. 40 mg/ml. Po opětovném důkladném promíchání se roztok zfiltraval přes kaskádu AC/NC membrán Sartorius: pomocí filtru 0,8 µm; filtru 0,45 µm; filtru 0,2 µm. Takto připravený roztok se skladuje při 2-8 °C.

Ředící roztok alkalické fosfatázy

Bylo naváženo 0,03 g Trisma base (pro blot); 0,00005 g chloridu zinečnatého p.a.; 0,001 g chloridu hořečnatého hexahydrátu a rozpuštěno v 5,0 ml deionizované vody. Roztok se skladuje při teplotě 2-8 °C.

4.1.6 Příprava ředící řady konjugátů třídy IgG, IgM, IgA

K 1000,0 ml ředícího roztoku konjugátu se přidá příslušný objem konjugátu Goat Anti-Human IgG, γ -Chain Specific Alkaline Phosphatase nebo konjugátu Goat Anti-Human IgM, μ -Chain Specific Alkaline Phosphatase či konjugátu Goat Anti-Human IgA, α -Chain Specific Alkaline Phosphatase, podle ředění (Tab. 2–4). Takto připravený roztok se musí míchat na míchačce pomocí magnetického míchadla 2 dny při laboratorní teplotě, po skončení míchání se roztok skladuje v lednici při teplotě 2-8 °C.

Tab. 2 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgG.

Ředění konjugátu třídy IgG, pro objem 1000 ml	
Ředění	Konjugát GoAHu/IgG AP Calbioch.
1:700	1,43 ml
1:1000	1,00 ml
1:1500	0,67 ml
1:1700	0,59 ml
1:1800	0,56 ml
1:2000	0,50 ml
1:2300	0,44 ml
1:2500	0,40 ml
1:3000	0,33 ml
1:3500	0,29 ml

Tab. 3 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgM.

**Ředění konjugátu třídy IgM,
pro objem 1000 ml**

Ředění	Konjugát GoAHu/IgM AP Calbioch.
1:1000	1,00 ml

Tab. 4 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgA.

**Ředění konjugátu třídy IgA,
pro objem 1000 ml**

Ředění	Konjugát GoAHu/IgA AP Calbioch.
1:500	2,00 ml
1:700	1,43 ml
1:1000	1,00 ml
1:1500	0,67 ml

4.1.7 Příprava kontrolní linie

K 4,55 ml ředícího roztoku alkalické fosfatázy se přidá 0,46 ml konjugátu GoAHu/IgM AP Calbioch. Takto připravený roztok se musí míchat na míchačce pomocí magnetického míchadla 1 hodinu při laboratorní teplotě, po skončení míchání se roztok skladuje v lednici při teplotě 2-8 °C.

4.1.8 Příprava kontroly konjugátu třídy IgG, IgM nebo IgA

K 4,277 ml ředícího roztoku konjugátu se přidá 0,728 ml Immunoglobulinu IgG from human serum (c=5,50 mg/ml) nebo k 4,600 ml ředícího roztoku konjugátu se přidá 0,400 ml Immunoglobulinu IgM from human serum (c=1,0 mg/ml) či k 4,750 ml ředícího roztoku konjugátu se přidá 0,250 ml Immunoglobulinu IgA from human serum (c=1,20 mg/ml). Takto připravený roztok se musí míchat na míchačce pomocí magnetického míchadla 1 hodinu při laboratorní teplotě, po skončení míchání se roztok skladuje v lednici při teplotě 2-8 °C.

4.1.9 Příprava roztoků pro SDS-PAGE

Pufř pro separační gel

Bylo naváženo 0,3634 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome a 0,0059 g chelatonu III p.a. (EDTA) a rozpuštěno ve 2 ml deonizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí 10% roztoku HCl.

Acrylamid 30% vodný roztok

Bylo naváženo 1,168 g Acrylamide suitable for elect. a 0,0032 g Methylene bis-acrylamide a rozpuštěno ve 4 ml deonizované vody.

APS 10% roztok

Navážka 0,1 g Amonium persulfate byla rozpuštěna v 1 ml deonizované vody.

Příprava PAA 12% dělicího gelu

K 1,25 ml pufřu pro separační gel se přidaly 2 ml akrylamidu 30% vodného roztoku; 0,025 ml 10% APS; 0,0025 ml temedu a 1,73 ml deonizované vody.

Pufř pro koncentrační gel

Bylo naváženo 0,06056 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,0030 g chelatonu III p.a. (EDTA); 0,004 g laurylsíranu sodného (SDS) p.a. a rozpuštěno v 1 ml deonizované vody. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí 10% roztoku HCl.

Příprava PAA 6% zaostřovacího gelu

K 0,38 ml purfu pro koncentrační gel se přidaly 0,3 ml akrylamidu 30% vodného roztoku; 0,0075 ml 10% APS; 0,002 ml temedu a 0,83 ml deonizované vody.

Anodový pufr

K 800,0 ml deonizované vody se přidalo 3,03 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,37 g chelatonu III p.a. (EDTA) a 14,41 g Glycinu p.a.. Roztok se promíchá a poté se přidá 200,0 ml deonizované vody, pH se upraví na hodnotu 8,3-8,5 pomocí 10% roztoku HCl.

Katodový pufr 2x koncentrovaný

K 400,0 ml deonizované vody se přidalo 6,055 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,745 g chelatonu III p.a. (EDTA); 28,82 g Glycinu p.a a 1,0 g laurylsíranu sodného (SDS) p.a. Roztok se promíchá a poté se přidá 500,0 ml deonizované vody, pH se upraví na hodnotu 8,3-8,5 pomocí 10% roztoku HCl. Před použitím se roztok ředí v poměru 1:1 deonizovanou vodou.

Lyzační pufr 10T

K 10,0 ml deonizované vody se přidalo 0,0122 g TRISu čistého (hydrometyl) aminome; 0,05 ml Tritonu (R) X-100 a 0,02 ml chelatonu (EDTA) 0,5 M roztoku. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí 10% roztoku HCl.

Barvicí roztok Brilliant Coomassie Blue

Pro přípravu roztoku se použije láhev z hnědého skla. K 0,75 g Brilliant Coomassie Blue G jsem přidala 417,5 ml deonizované vody; 467,5 ml etanolu 96% vol AnalaR NORMAPUR a 115 ml kyseliny octové 99% p.a., roztok se důkladně promíchá.

4.1.7 Počítačový software

Pro zpracování analýzy obrazu a pro potvrzení pozitivní exprese pomocí SDS-PAGE jsem použila software Adobe Photoshop. Vyhodnocení detekcí probíhalo pomocí Immunoblot Software TestLine, spol. s.r.o. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství detekovaného proteinu.

4.2 Metodika

Tato diplomová práce se uskutečnila ve společnosti TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., Křižíkova 68, 612 00 Brno. Diagnostická souprava k detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a byla připravena metodou blot-line pro manuální i automatizované zpracování. Intenzitu jednotlivých linií je možné hodnotit vizuálně nebo pomocí Immunoblot Software. Pro ověření validity a citlivosti testu stripu obsahují kontrolní linie.

4.2.1 Příprava rekombinantního antigenu PBP2a

4.2.1.1 Klonování, exprese a izolace proteinu PBP2A (*mecA* MRSA)

Klonování a izolace proteinu PB2a byla provedena na Masarykově univerzitě Brno. Pro klonování byl použit vektor pET28a/EcoRI + XhoI, templátová DNA *Staphylococcus aureus* (MRSA) *mecA* gen (AA27-668). Klonovaný gen byl exprimován jako fúzní protein. Součástí fúzního proteinu je 6 x His tag, který umožňuje izolaci a purifikaci cílového proteinu PB2a. Rekombinantní antigen je produkován pomocí bakterií *E. coli*. Použité *E. coli* byly odvozené od expresního kmene BL21-CodonPlus (DE3) -RIL (Cam) (Strains Rosetta™(DE3) pLysS and BL21(DE3) pLysS). Pro přípravu rekombinantního proteinu byl využit QIAquick PCR Purification Kit od firmy Qiagen, který je založený na klonování do vektoru pET s T7 promotorem. Syntéza T7 RNA polymerázy s využitím *Lac* promotoru a následně syntéza mRNA vloženého genu je indukovatelná pomocí IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu).

Jako vstupní materiál pro izolaci proteinu byl použit plazmid s inzertem DNA kódujícím antigen, plazmid pET-PBP2a. Transformace *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL (Cam) plazmidovým konstruktem pET-PB2a probíhala takto:

1. den: očkování- 3 ml LB média (50 μ g/ml kanamycinu + 25 μ g/ml chloramfenikolu) se čtyřmi různými klony z Petriho misky. Kultivace při 32 °C, přes noc.
2. den ráno: do 20 ml čerstvého LB média se přidaly 3 ml bakteriální kultury z prvního dne, inkubace při 37 °C.

2. den večer: centrifugace bakteriální kultury (4500 rpm, 15 minut v 50 ml zkumavce) Resuspendování pelet se 30 ml čerstvého LB média. Inkubace při 32 °C po dobu jedné hodiny. Po této době se přidá ITG (isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid) o koncentraci 0,5 mM, inkubace při 30-32 °C přes noc.
3. den: centrifugace – sklizeň čtyř různých bakteriálních pelet a uložení do doby převzetí při -80 °C.

Po následném předběžném screeningu exprese genu se ten, který vykazoval ze čtyř různých bakteriálních klonů nejvyšší expresi, vyrobil z množství 2 x 500 ml.

4.2.1.2 Kritéria hodnocení kvality, analýza vzorků surového produktu, purifikace a dialýza rekombinantního antigenu PBP2a a zjištění koncentrace produktu

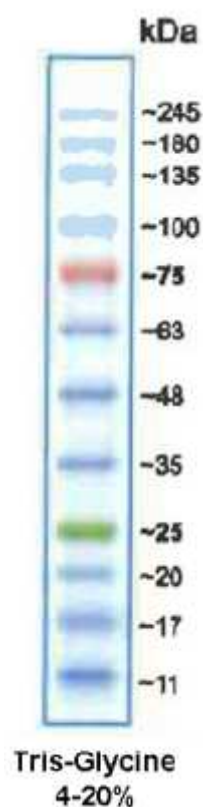
Jedná se o práci s geneticky modifikovanými organismy. Práce je umožněna v souladu se zákonem č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů. Práce je rovněž prováděna v souladu se schváleným Provozním řádem TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. pro práci s GMO.

a) Kritéria hodnocení kvality a potvrzení molekulové hmotnosti rekombinantního proteinu, provedení SDS-PAGE

Pro hodnocení kvality výsledného rekombinantního antigenu slouží fotografie z polyakrylamidového (PAA) gelu, která potvrzuje molekulovou hmotnost produktu a zároveň jeho čistotu. Významným parametrem je dosažení čistoty alespoň 90 %, avšak není rozhodující. Byla použita metodika SDS-PAGE, gel o vhodné koncentraci (Tab. 5). Gel pro proteinovou elektroforézu lze vyrobit v různých koncentracích a o různých velikostech pórů. Velikost pórů určuje poměr složek akrylamidu a bisakrylamidu v gelu. Se vzrůstající koncentrací akrylamidu se póry v gelu zmenšují. Jako velikostní standart se používá proteinový marker o známé velikosti, ten umožňuje potvrdit vypočtenou velikost rekombinantního proteinu (Obr. 11).

Tab. 5 Optimální dělení na akrylamidovém gelu (dle manuálu přístroje Bio-Rad k preparativní elektroforéze model 491 Prep Cell).

Velikost proteinu (kDa)	Rozmezí koncentrací (% PAA)
15-30	6-10
30-50	9-12
50-70	7-10
70-100	5-9
100-200	4-8



Obr. 11 Hmotnostní proteinový standard, dostupné z:
<<http://www.cebiosys.cz/products/black-protein-ladder-ready-to-use/>>

Sodiumdodecylsulfátová polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) je metoda, která se používá k separaci proteinů podle velikosti, na základě jejich migrace v gelu

v elektrickém poli. SDS je detergent, který způsobí denaturaci proteinu a také mu udělí negativní náboj. Polyakrylamidový dělicí gel o hustotě 12% a polyakrylamidový 6% zaostřovací gel se vždy musí namíchat čerstvě. Jako poslední se k roztoku přidává 10% APS a TEMED. Roztok se velmi pečlivě zamíchá a pipetou se nalije mezi sestavená skla, cca do 2/3 objemu. Nalitý roztok se převrství butylalkoholem-n p.a. a gel se nechá ztuhnout. Po ztuhnutí se butylalkohol-n p.a. vylije, namíchá se čerstvý 6% zaostřovací gel (10% APS a TEMED se přidává jako poslední), pečlivě se promíchá a pipetou se nanese na 12% dělicí gel. Mezi skla se vloží hřebínek, který v gelu vytvoří jamky pro nanesení vzorku. 6% zaostřovací gel se nechá zatuhnout, hřebínek se vyndá a jamky se mohou propláchnout destilovanou vodou. Takto připravený gel mezi skly se použije k sestavení elektroforézy. Vzorek proteinů (bakteriální suspenze) se smíchá v poměru 1:1 se lyačným pufrům T10 (celkový protein). Vzorek se dále centrifuguje na maximum (cca 5000 otáček) po dobu 1 minuty a ze supernatantu se získá vzorek rozpustného proteinu. Takto připravené vzorky se nanesou do jamky v gelu. Spolu se vzorky se poté do gelu nanese i proteinový marker molekulových hmotností.

Proteiny jsou separovány při 90 V po dobu cca 15 minut (minimálně po dobu, než vzorky zajedou do gelu a vytvoří jednu linii). Poté se napětí zvýší na 120 V. Elektroforéza běží cca 1–1,5 hodiny, podle použitého napětí. Po dokončení elektroforézy se od sebe opatrně oddělí skla, mezi kterými je gel. Od gelu se odřízne horní 6% zaostřovací gel a odřízne se i kousek horního rohu u markeru, tím si lze označit orientaci gelu. Gel se vloží do misky s barvicím roztokem Brilliant Coomassie Blue a poté se v barvivo povaří cca 1,5 minuty za pomoci mikrovlnné trouby. Takto připravený gel je zpracován analýzou obrazu, pomocí využití prosvětlovacího stolku, digitálního fotoaparátu a software Adobe Photoshop.

b) Analýza vzorků surového produktu

Pro analýzu čtyř bakteriálních klonů byla provedena lýza buněk *E. coli* pomocí sonikace na přístroji Soniprep 150, MSE s použitím nástavce microtip a intenzitou 8-10 x 10 sec. přerušovaných pulzů. Analýza surového produktu byla provedena pomocí elektroforézy SDS-PAGE na přístroji Mini Protean (Bio-Rad, spol. s.r.o.) na polyakrylamidovém gelu o hustotě 12 %. Vhodná koncentrace akrylamidového gelu vyplývá z molekulové hmotnosti proteinu PBP2a, která je 76 kDa. Gel byl následně obarven v barvicím roztoku Brilliant Coomassie Blue a zpracován analýzou obrazu – využívající prosvětlovací stůl, digitální

fotoaparát a software Adobe Photoshop. Dále následovala identifikace proteinu na základě určení molekulové hmotnosti z PAA gelu. Po potvrzení pozitivní exprese pomocí SDS-PAGE se vybral jeden bakteriální klon s nejvyšší expresí a poté následovala jeho purifikace, dialýza a zjištění koncentrace finálního rekombinantního proteinu z expresního objemu 2 x 500 ml.

c) Purifikace

Provedení lýzy biomasy *E. coli* z daného objemu media (1000 ml) pomocí 30 ml vazebného pufru 50T; 0,5 ks směsi inhibitorů proteáz Complete EDTA-free; 0,5 ks Benzonase nuklease HC a 0,012 g lysozymu vaječného bílku. Směs nechat inkubovat 30 minut ve zkumavce v lednici při 4 °C. Následuje sonikace v ledové lázni na přístroji Soniprep 150, MSE s použitím nástavce microtip a intenzitou 8-10, po dobu 6 x 60 s a centrifugace lyzátu při 11000 ot/min po dobu 30 minut na centrifuze Eppendorf 5804 R. Pro další zpracování lze použít 30 ml supernatantu. Pro purifikaci byla použita metodika metaloafinitní purifikace, kdy je preparaci možné provádět pouze u rekombinantních proteinů s 6 x His fúzním tagem. Hlavním proměnným kritériem při purifikaci jednotlivých proteinů je koncentrace imidazolu u promývacího a elučního pufru. Purifikace probíhá na automatickém digitálním purifikátoru Profinia Protein Purification System od firmy Bio-Rad a skládá se z těchto kroků:

- Ekvilibrace kolony
- Přidání objemu pufru, který odpovídá 15- ti násobku objemu matrice (20 ml vazebného pufru 50T + 1 ml purifikační směsi Complete His-Tag resin), antigen se naváže na matici
- 1. promytí, objem pufru odpovídá 40- ti násobku objemu matrice (40 ml vazebného pufru 50T)
- 2. promytí, objem pufru odpovídá 20- ti násobku objemu matrice (20 ml promývacího pufru 50T 2)
- Finální eluce, objem pufru odpovídá 15- ti násobku objemu matrice (15 ml elučního pufru 50 T 1)

Po purifikaci byla provedena elektroforéza SDS-PAGE na přístroji Mini Protean (Bio-Rad) na polyakrylamidovém gelu o hustotě 12 % pro ověření čistoty rekombinantního proteinu. Gel byl následně obarven v barvicím roztoku Brilliant Coomassie Blue (gel byl

v barvivo na 1,5 minuty povařen v mikrovlnné troubě) a zpracován analýzou obrazu – využívající prosvětlovací stolek, digitální fotoaparát a software Adobe Photoshop.

d) Dialýza

Dialýza následuje ihned po purifikaci antigenu a ověření čistoty pomocí SDS-PAGE. Dialýza slouží k oddělení velkých molekuly proteinů od malých molekul (např. solí) přes semipermeabilní membránu (v našem případě celulózová membrána). Doba dialýzy je 6-18 hodin a závisí na objemu dialyzovaného roztoku antigenu do dosažení výsledného teoretického ředění 1:2500. Dialýza probíhala přes noc při 4 °C v dialyzačním střevu (šířka 43 mm, molekulová hmotnost cut-off = 14,000), následovala výměna dialyzačního pufru za čerstvý a opět dialyzovat při 4 °C po dobu 6 hodin. Výsledný objem rekombinantního antigenu PBP2a byl 10,0 ml.

e) Zjištění koncentrace proteinu PBP2a

Pro zjištění koncentrace výsledného produktu byl použit BCA protein assay kit od společnosti GeneTiCA s.r.o. Celková koncentrace proteinu se projevuje změnou barvy roztoku ze zelené do purpurové v poměru ke koncentraci bílkovin, kdy byla pomocí kalibrační křivky naměřena hodnota koncentrace kolorimetricky, při vlnové délce 450 nm.

4.2.2 Příprava stripů pro metodu detekce blot-line

• Příprava nitrocelulózové membrány

Membrána se nařeže na řezačce na velikost 23 x 9,5 cm. Veškerá manipulace s membránou musí být provedena pomocí pinzety. Membrána se smáčí minimálně 10 minut v destilované vodě do dokonalého smočení. Poté se membrána přenesse do misky s blotovacím puftrem a smáčí se 30 minut. Poté se membrána přenesse opět do destilované vody a propláchně. Z vody se membrána přesune do roztoku Ponceau'S a barví se 10 minut na třepačce při laboratorní teplotě, poté se opět membrána přenesse do destilované vody a promyje se do světle růžového zbarvení. Takto obarvená membrána se skladuje při laboratorní teplotě na filtračním papíře do doby uschnutí. Poté se membrána nalepí na

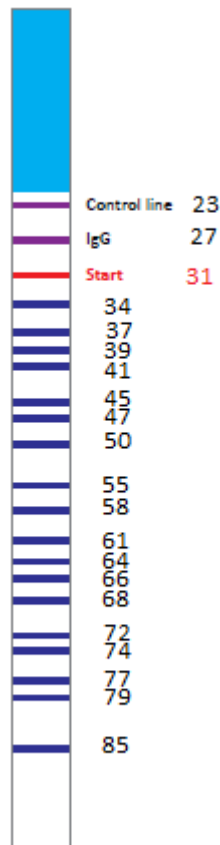
plastovou podložku, která již má nanosenou vrstvu s adhezním lepidlem a takto vyrobená karta se uloží mezi dva filtrační papíry do doby dalšího použití.

- **Nanesení rekombinantního antigenu PBP2a na nitrocelulóзовou membránu**

Nanesení antigenu je provedeno pomocí přístroje BioDot AD1500 (Obr. 12) v podobně kapek o objemu 20 nL a rozteči kapek 0,4 mm vypouštěných v těsné blízkosti rychle za sebou, tím se docílí vytvoření celistvé linie. Tento přístroj je stolní počítačově řízený XYZ systém pohybu pro rychlé a přesné nanášení antigenů na nitrocelulóзовou membránu umístěnou na pracovní ploše přístroje. K přenosu na membránu dochází bezkontaktně, do předem nastavených pozic (Obr. 13), za použití injekční pumpy s mikroelektromagnetickým ventilem. Na membránu je zároveň s antigenem nanesena kontrolní cut-off linie a linie kontroly konjugátu.



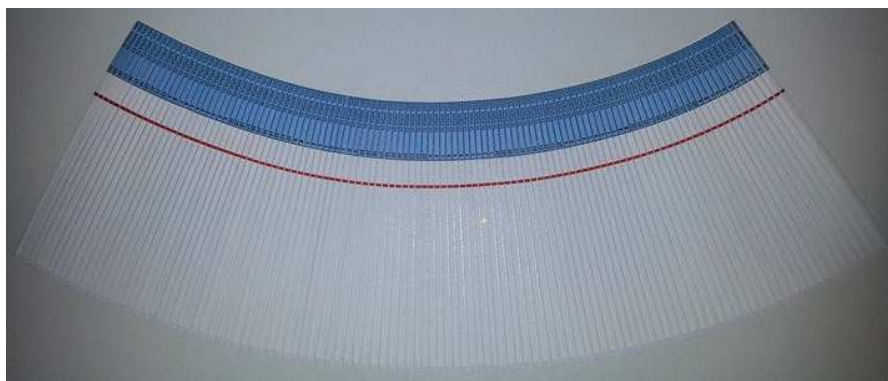
Obr. 12 Přístroj BioDot AD 1500, dostupné z: <<https://www.biodot.com/ad1500/>>



Obr. 13 Validační strip s pozicemi pro třídu IgG na membráně v milimetrech.

- **Úprava nitrocelulózové membrány s navázaným proteinem – blokování, lepení etikety, kreslení startovní line a sekání na stripy**

Nitrocelulózová membrána nesepecificky váže proteiny elektrostatickými interakcemi. Poté, co byl na membránu navázán protein (přístrojem BioDot), bylo nutné zablokovat neobsazená místa na membráně tak, aby nedocházelo k nesepecifické vazbě protilátek na membránu. Blokování se provádí 30 minut na třepačce v blokovacím pufru obsahujícím 4 % kaseinu, poté se membrána vloží na 10 minut do destilované vody. Po blokaci se stripy vloží na filtrační papír a schnou při laboratorní teplotě. Na nitrocelulózovou membránu s navázanými proteiny se po usušení nalepí etiketa, která slouží pro identifikaci a nakreslí se červenou fixou startovní linie v pozici 31 mm od vrchu karty, která je důležitá pro vyhodnocovací Immunoblot Software. Takto upravená nitrocelulózová membrána se naseká na sekačce na stripy o definované velikosti 2 mm (Obr. 14).

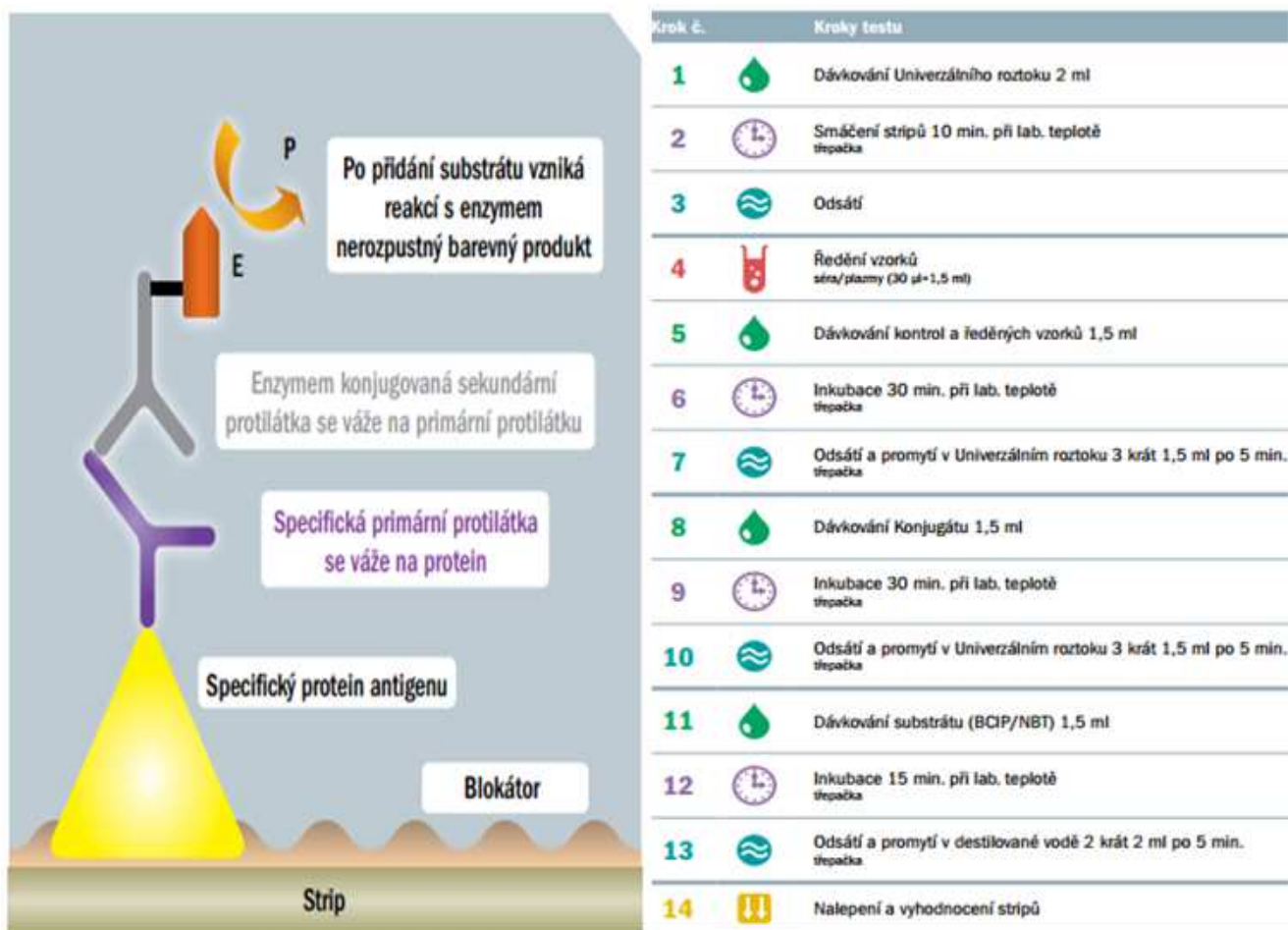


Obr. 14 Upravená nitrocelulósová membrána po nanesení antigenu PBP2a.

4.2.3 Provedení optimalizované metody blot-line pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a

Před použitím se všechny komponenty musí vytemperovat cca 60 min. při laboratorní teplotě a musí se důkladně promíchat. Jednotlivé stripy se vloží do jamek blotovací vaničky. Následuje pipetování řaděných vzorků sér či plazem (1:51 = 1,5 ml univerzálního roztoku BLOT + 30 μ l vzorku) k jednotlivým stripům. Stripy jsou inkubovány 30 minut s primární protilátkou (sérum pacienta), která specificky interaguje s proteiny na membráně a v případě přítomnosti specifických protilátek dochází k jejich vazbě na separovaný antigen. Po promytí stripu (3x5 min.) je přidána sekundární protilátka proti *Fc* fragmentu lidského imunoglobulinu IgG, IgM nebo IgA, značená molekulou alkalické fosfatázy (tzv. konjugát). Po 30minutové inkubaci s konjugátem následuje opět promytí (3x5 min.) a následně je přidán na 15 minut chromogenní substrát (v tomto případě substrátový roztok NBT/BCIP). Na místa, kde se navázaly protilátky, alkalická fosfatáza katalyzuje barevnou reakci. Po této inkubaci se stripy promyjí destilovanou vodou (2x5 minut). Celá detekce probíhá při laboratorní teplotě. Následuje vysušení stripů a nalepení pomocí lepidla na protokol (obr. 15).

Tato optimalizovaná metoda blot-line pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a byla provedena u šedesáti vzorků lidské plazmy, referenční pozitivní vzorky byly označeny P1 – P30 a referenční negativní vzorky byly označeny N31 – N60 a stanovení proběhlo ve třídách imunoglobulinů IgG a IgM. Pro třídu imunoglobulinů IgA bylo použito deset referenčních pozitivních vzorků lidské plazmy (označeny P2, P3, P14, P15, P16, P17, P20, P24, P25, P29) a třicet referenčních negativních vzorků (označeny N31 – N60).



Obr. 16 Princip blot-line testu a stručný pracovní postup, dostupné z: <http://www.testlinecd.cz/imunoblot-soupravy-pro-imunologii/c-317/>

4.2.4. Hodnocení výsledků optimalizované metody blot-line

Po ukončení detekce byly blot-line stripy nalepeny na vyhodnocovací protokol, který byl naskenován na scanneru a vyhodnotila se intenzita zabarvení linií každého jednotlivého stripu pomocí softwaru Immunoblot TestLine, spol. s.r.o., podle kritérií uvedených v Tab. 6, kdy se zobrazí záznam jasových úrovní linií jednotlivých koncentrací proteinu PBP2a. Na každém stripu je nanášena kontrolní cutt-off linie, která slouží ke kontrole funkčnosti a citlivosti stripu a dále linie pro kontrolu přítomnosti příslušné třídy konjugátu.

Tab. 6 Kritéria validity softwaru Immunoblot TestLine, spol. s.r.o.

Intenzita linie [a.u.]	Hodnocení
0 – 5,49	Negativní
5,50 – 12,99	Hraniční
≥ 13,00	Pozitivní

4.2.4.1 Stanovení diagnostické citlivosti (senzitivity)

Klinická senzitivita je schopnost testu správně určit nemocné jedince, jinými slovy počet správně nemocných. Stanovuje se na panelu **pozitivních** sér. Jejich pozitivita je známa z jiných nezávislých zdrojů (metod), včetně klinického obrazu.

Pozn. Hraniční výsledky jsou považovány za nehodnotitelné a vyřadí se.

- Výpočet:

$$\text{Diagnostická citlivost v \%} = \frac{\text{počet pozitivních výsledků}}{\text{celkový počet testovaných vzorků}} \times 100$$

4.2.4.2 Stanovení diagnostické specifity

Klinická specificita je schopnost testu správně vyloučit jedince, kteří nemají dané onemocnění, jinými slovy počet správně zdravých. Stanovuje se na panelu **negativních** sér. Jejich negativita je známa z jiných nezávislých zdrojů (metod), včetně klinického obrazu.

Pozn. Hraniční výsledky jsou považovány za nehodnotitelné a vyřadí se.

- Výpočet:

$$\text{Diagnostická specificita v \%} = \frac{\text{počet negativních výsledků}}{\text{celkový počet testovaných vzorků}} \times 100$$

4.2.4.3 Stanovení celkové diagnostické shody (efektivita)

Efektivita je procento správně klasifikovaných pacientů jako zdravých nebo nemocných. Stanovuje se na panelu pozitivních i negativních sér. Jejich pozitivita či negativita je známa z jiných nezávislých zdrojů (metod), včetně klinického obrazu. Počet sér – minimálně 10 hodnotitelných.

Pozn. Hraniční výsledky jsou považovány za nehodnotitelné a vyřadí se.

- Výpočet:

$$\text{Celková diagnostická shoda v \%} = \frac{\text{počet pozit. a negativ. výsledků}}{\text{celkový počet testovaných vzorků}} \times 100$$

4.2.4.4 Stanovení opakovatelnosti (intra-assay)

Opakovatelnost je preciznost měření stanovená za podmínek opakovatelnosti (tzn. v jedné laboratoři, stejným operátorem, na stejném přístroji, během jednoho dne). Optimalizovaná blot-line detekce se provedla se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P29 pro IgG, P24 pro IgA), hraniční (N42 pro IgG, N33 pro IgA) a negativní (N52 pro IgG, N38 pro IgA). Vzorky byly 16x analyzovány v jednom experimentu. Pro každý vzorek se pomocí softwaru odečetly hodnoty intenzity zbarvení specifických linií a vypočítala se průměrná hodnota výsledků, směrodatná odchylka a variační koeficient. Následně se vypočítala směrodatná odchylka a variační koeficient pro celý rozsah měření.

- Výpočty:

$$\text{Průměr} \quad \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\text{Směrodatná odchylka výběrová} \quad SD_i = \sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{n_i - 1}}$$

$$\text{Variační koeficient} \quad CV_i = \frac{s}{\bar{x}_i} \times 100$$

Přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2 \dots (n_k - 1) s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) v_1^2 + (n_2 - 1) v_2^2 \dots (n_k - 1) v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

4.2.4.5 Stanovení reprodukovatelnosti (inter-assay)

Reprodukovatelnost je preciznost měření získaná za různých podmínek (tzn. v různých laboratořích, různými operátory, s použitím různých výrobních šarží komponent, různých zařízení a v delším časovém intervalu). Za tímto účelem byla opakovaně (v šestnácti nezávislých stanoveních) provedena optimalizovaná blot-line detekce se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P29 pro IgG, P24 pro IgA), hraniční (N42 pro IgG, N33 pro IgA) a negativní (N52 pro IgG, N38 pro IgA). Jednotlivá stanovení se lišila dnem provedení a kombinacemi šarží všech použitých složek, detekce se provedla na dvou různých zařízeních. Na stanovení se podíleli tři pracovníci laboratoře. Pro každý vzorek se pomocí softwaru odečetly hodnoty intenzity zbarvení specifických linií a vypočítala se průměrná hodnota výsledků, směrodatná odchylka a variační koeficient pro každou koncentrační hladinu testovaného vzorku. Následně se vypočítala směrodatná odchylka a variační koeficient pro celý rozsah měření.

- Výpočty:

Průměr $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Směrodatná odchylka výběrová $SD_i = \sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{n_i - 1}}$

Variační koeficient $CV_i = \frac{s}{\bar{x}_i} \times 100$

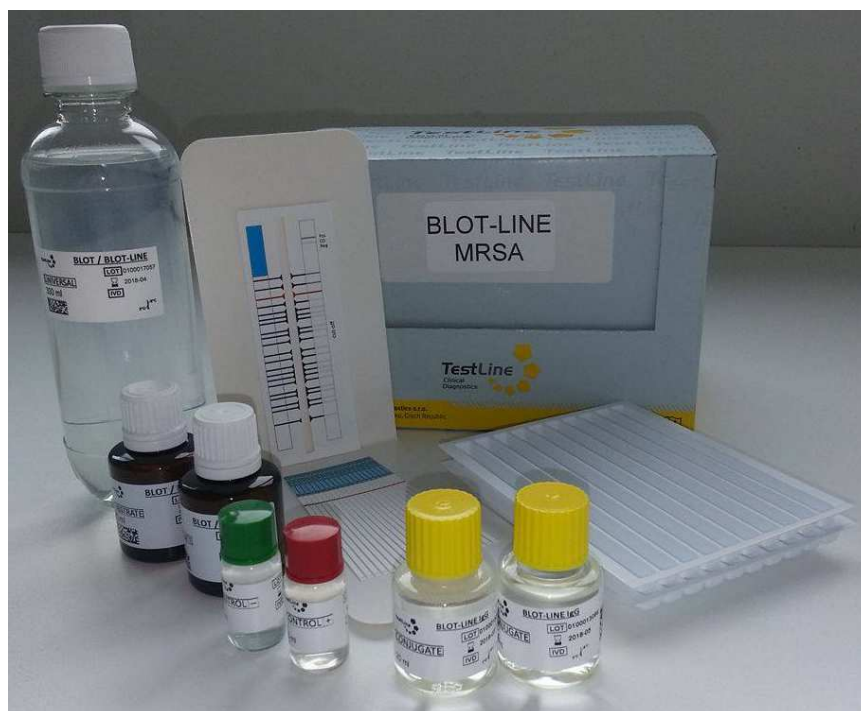
Přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2 \dots (n_k - 1) s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) v_1^2 + (n_2 - 1) v_2^2 \dots (n_k - 1) v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

4.2.5. Návrh podoby blot-line soupravy MRSA

Blot-line souprava MRSA obsahuje 20 stripů (barevné odlišení stripů dle třídy konjugátu, IgG modrá nebo IgA zelená, případně IgM červená). Souprava by měla obsahovat pozitivní a negativní kontroly (složené z pozitivního či negativního séra ředěného v Univerzálním roztoku BLOT, ředění 1:51) umožňující validaci testu. Všechny roztoky budou dodávány již v pracovním ředění. Soupravu je možno zpracovávat postupně, roztoky budou dodány v dostatečném nadbytku. Expiraci by bylo možno stanovit až po zkoušce stability. Výhodou soupravy je krátká inkubační doba, celková doba vyšetření je asi 1,5 hodiny, dále vysoká specifita a citlivost testu. Souprava musí obsahovat tyto komponenty: blot-line stripy, konjugát příslušné třídy imunoglobulinu, substrátový roztok, univerzální roztok, negativní a pozitivní kontroly, protokol s vyobrazením validačního stripu, pracovní návod, případně šablonu pro oko metrické vyhodnocení, blotové detekční vaničky, průhledná samolepící fólie na přelepení stripů (Obr. 17).

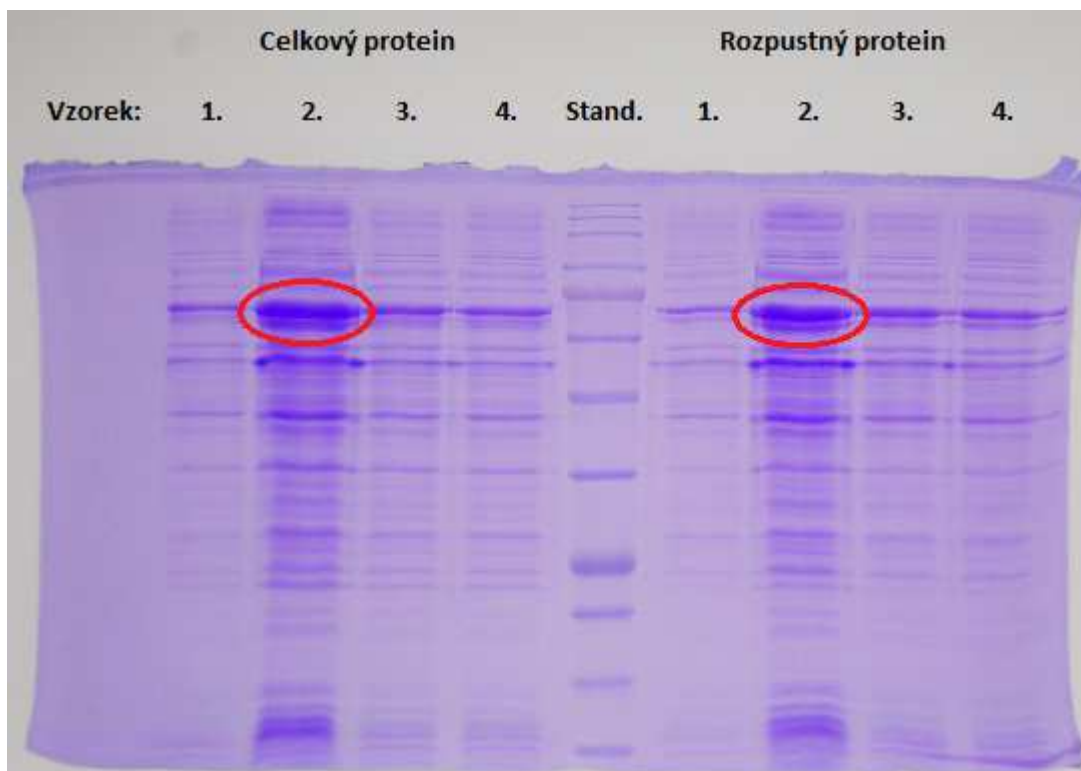


Obr. 17 Kompletní sada soupravy blot-line MRSA.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

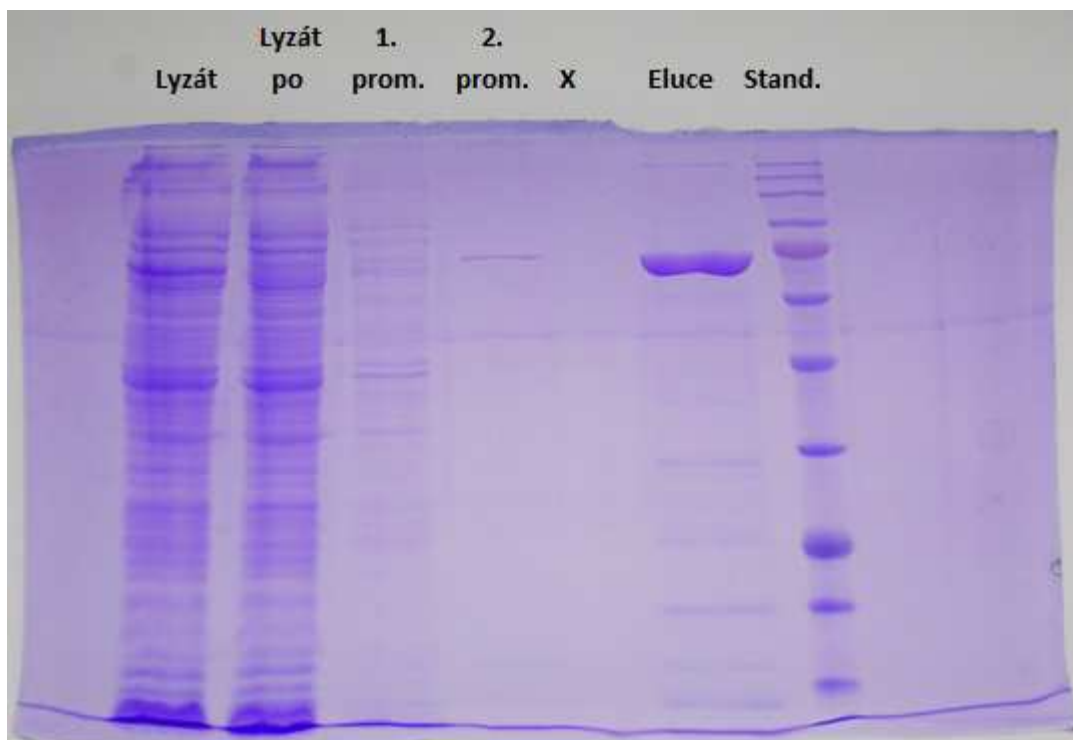
5.1. Příprava rekombinantního antigenu PBP2a

Pro přípravu diagnostické soupravy bylo nejprve potřeba vyrobit rekombinantní protein PBP2a z biomasy bakteriálního klonu bakterie methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Z Masarykovy univerzity byly dodány čtyři bakteriální pelety. Následovala sonikace a analýza surového produktu pomocí denaturující proteinové elektroforézy: SDS-PAGE. Po následném předběžném screeningu exprese genu z SDS-PAGE vykazoval nejvyšší expresi bakteriální klon č. 2. Molekulární hmotnost proteinu PB2a je přibližně 76 kDa a z tohoto důvodu byly sledovány intenzity proužků v této oblasti. Celkový protein (rozpuštěný i nerozpuštěný) byl získán smícháním vzorku s lyzačním pufrům T10, rozpuštěný protein byl získán ze supernatantu po odstředění (Obr. 18).



Obr. 18 Polyakrylamidový gel o hustotě 12 % získaný pomocí SDS-PAGE, 4 bakteriální klony. Červená elipsa značí výskyt optimálního množství proteinu PB2a o velikosti cca 76 kDa. Barvení gelu proběhlo v barvicím roztoku Brilliant Coomassie Blue, jako standard byl použit Black protein ladder od společnosti Central European Biosystems, spol. s.r.o.

Po potvrzení pozitivní exprese pomocí SDS-PAGE a následném výběru bakteriálního klonu č. 2, následovala jeho purifikace a eluce. Purifikace a eluce probíhala na automatickém digitálním purifikátoru Profinia Protein Purification Systém. Tento systém se skládá z několika kroků, které byly následně naneseny na SDS-PAGE. Z Obr. 19 je patrné, že purifikace a výsledná eluce pro ověření správnosti procesu a ověření čistoty rekombinantního proteinu proběhla zcela bezproblémově. Po purifikaci a eluci následovala dialýza, při které byly odděleny velké molekuly proteinů od malých molekul (např. solí) přes celulózovou membránu. Po dialýze byl změřen výsledný objem rekombinantního antigenu, který byl 10,0 ml. Následně byla kolorimetrickým měřením pomocí BCA protein assay kitu zjištěna koncentrace rekombinantního proteinu PBP2a, která byla 0,59 mg/ml.



Obr. 19 Polyakrylamidový gel o hustotě 12 % získaný pomocí SDS-PAGE, klon č. 2. Vzorky byly získány z purifikace a finální eluce. Barvení gelu proběhlo v barvicím roztoku Brilliant Coomassie Blue, jako standard byl použit Black protein ladder od společnosti Central European Biosystems, spol. s.r.o.

5.2 Úvodní titrace antigenu č. 1, pro třídu imunoglobulinů IgG

Úvodní analýza byla provedena ve třídě imunoglobulinů IgG, je to nejpočetnější skupina protilátek v těle, tvoří $\frac{3}{4}$ všech protilátek v séru a jsou sekundární protilátkou u infekcí, které již organismus prodělal. Rekombinantní antigen PBP2a ($c= 0,59$ mg/ml) byl naředěn na šest koncentrací: $c= 0,05; 0,01; 0,25; 0,4; 0,45; 0,50$ mg/ml v dialyzačním Tris pufru, na konečný objem 160,0 μ l. Tyto koncentrace byly naneseny na nitrocelulózovou membránu. Poté byla provedena detekce stripů pomocí optimalizované metody blot-line, za použití šesti koncentrací konjugátu IgG (1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500). Bylo testováno šedesát vzorků lidské plazmy, referenční pozitivní vzorky byly označeny P1 – P30 a referenční negativní vzorky byly označeny N31 – N60. Pozitivní vzorky mají potvrzenou diagnózu, tito pacienti byli léčeni na MRSA. Získané výsledky pro vybrané koncentrace antigenu a konjugátu jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 7–12).

Tab. 7 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]						Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]					
	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50		0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	4,71	4,31	15,69	20,00	25,10	24,31	N31	0,00	0,00	1,96	2,75	3,92	3,53
P2	2,35	3,92	10,20	12,16	14,90	14,51	N32	0,00	0,00	1,57	3,92	4,71	3,53
P3	6,27	8,63	27,45	32,16	32,55	34,12	N33	0,00	0,00	3,14	7,06	5,49	4,71
P4	4,31	6,67	18,04	21,96	23,53	23,53	N34	1,57	1,18	3,14	4,31	5,10	5,10
P5	6,27	8,63	20,39	24,71	28,63	29,02	N35	0,00	0,12	2,35	3,53	4,31	4,31
P6	4,31	6,27	17,25	21,18	24,31	22,75	N36	0,00	0,00	1,18	2,75	3,14	2,75
P7	9,41	12,16	29,41	32,16	35,29	33,73	N37	0,74	1,18	2,75	3,53	4,71	4,71
P8	21,18	24,31	36,47	38,43	38,82	39,61	N38	0,29	0,78	1,96	3,14	3,92	3,53
P9	26,27	30,20	44,71	46,27	47,84	44,31	N39	1,96	1,18	3,14	3,92	5,10	4,71
P10	8,63	9,80	51,37	54,12	54,51	57,25	N40	1,18	1,18	5,49	7,06	9,02	9,80
P11	17,25	21,96	36,86	39,61	41,18	40,78	N41	2,35	1,96	4,31	5,10	5,88	5,10
P12	5,49	8,24	20,00	23,92	25,88	26,67	N42	1,18	0,78	3,14	3,92	5,49	5,10
P13	3,92	4,31	20,00	25,10	27,84	29,80	N43	0,00	0,00	2,35	3,14	5,10	4,71
P14	16,47	21,57	35,69	38,04	39,61	38,43	N44	0,00	0,00	1,18	1,57	2,75	2,35
P15	43,92	50,20	56,08	58,82	59,22	58,43	N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	10,98	12,94	25,88	29,41	30,59	29,80	N46	0,00	0,39	4,31	5,88	8,24	7,45
P17	12,94	17,65	31,37	34,51	36,47	37,25	N47	0,00	0,00	0,78	1,57	3,14	2,75
P18	13,73	17,65	31,76	34,51	36,47	34,90	N48	0,39	0,39	2,35	3,53	4,71	4,31
P19	10,98	14,51	27,84	31,76	34,12	32,94	N49	0,78	0,78	3,53	4,31	5,49	5,10
P20	9,02	12,16	24,71	29,41	32,16	32,55	N50	0,39	0,00	2,75	3,14	3,53	3,53
P21	8,24	10,20	20,39	21,96	23,92	23,53	N51	0,00	0,39	0,39	2,35	3,14	3,14
P22	5,10	5,88	14,12	17,25	19,61	19,61	N52	1,18	1,18	1,96	3,92	3,92	3,92
P23	6,67	9,02	21,18	24,71	26,27	28,63	N53	0,00	0,39	1,57	8,24	7,84	7,06
P24	1,18	2,35	13,73	16,86	21,18	21,18	N54	0,78	1,57	3,14	7,84	7,84	8,24
P25	3,53	3,92	30,59	37,25	40,78	41,18	N55	1,96	3,92	5,88	10,98	10,59	10,59
P26	10,59	11,37	50,20	54,90	55,69	53,73	N56	0,39	1,18	3,53	8,24	10,20	10,59
P27	5,49	7,06	23,14	25,88	30,20	29,02	N57	1,18	1,57	2,35	6,27	6,67	7,06
P28	17,65	23,14	42,35	45,49	46,27	45,49	N58	0,00	0,78	2,35	3,92	4,71	4,71
P29	40,00	49,80	51,76	55,69	54,51	57,65	N59	0,78	2,35	3,92	7,84	8,24	8,63
P30	23,53	33,73	44,31	50,98	50,20	51,37	N60	1,96	3,14	4,71	7,84	7,45	8,24

Tab. 8 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]						Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]					
	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50		0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	10,98	14,51	31,37	35,29	39,22	38,04	N31	0,39	0,00	1,57	1,57	2,75	2,75
P2	6,27	7,45	16,08	18,43	20,78	20,78	N32	0,39	0,00	2,35	3,53	4,71	4,71
P3	10,98	13,73	38,82	45,10	45,10	48,24	N33	0,78	0,78	4,31	8,63	9,02	8,24
P4	10,59	13,73	34,90	38,04	41,18	45,88	N34	1,57	1,57	3,92	4,31	6,27	5,88
P5	11,76	15,29	34,12	38,43	42,35	40,39	N35	2,75	2,75	7,45	9,41	12,94	11,76
P6	8,63	12,16	28,24	32,94	36,47	36,47	N36	1,18	1,57	6,27	7,84	10,59	10,59
P7	14,90	19,61	41,18	45,49	47,06	47,06	N37	1,96	1,18	3,92	4,71	6,67	6,27
P8	38,04	44,71	52,16	55,69	55,69	56,47	N38	1,57	1,18	5,49	5,49	7,84	6,67
P9	33,73	40,78	50,98	52,55	50,59	54,12	N39	1,96	2,35	4,31	5,88	9,02	7,06
P10	2,75	4,31	34,90	46,27	47,06	49,80	N40	1,57	1,96	7,84	9,80	12,94	12,16
P11	19,61	27,06	44,31	47,84	48,63	48,63	N41	12,55	8,24	15,29	16,08	16,86	19,22
P12	6,67	10,20	23,14	26,67	30,20	29,80	N42	2,75	2,35	5,10	4,31	7,45	6,67
P13	7,84	7,45	30,59	34,51	37,65	38,82	N43	1,96	2,35	5,49	6,67	10,59	9,41
P14	20,00	26,27	41,18	46,27	46,27	47,45	N44	0,78	0,39	2,75	3,53	4,31	3,92
P15	47,06	55,29	59,61	62,35	60,39	63,92	N45	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18	1,18
P16	15,29	21,96	37,25	41,18	41,96	41,96	N46	1,57	2,35	6,27	8,24	10,59	9,41
P17	16,47	21,57	41,96	44,71	46,27	46,27	N47	2,75	2,75	10,98	14,12	15,69	16,08
P18	20,00	25,10	43,14	46,67	47,06	46,67	N48	1,96	2,35	6,27	6,67	9,02	9,41
P19	14,51	20,00	38,04	42,35	42,35	44,71	N49	1,57	1,57	7,06	7,84	10,20	11,76
P20	10,98	14,90	31,76	36,86	38,82	39,22	N50	2,75	1,96	7,06	7,45	10,20	9,41
P21	10,98	14,90	26,67	29,02	30,20	30,59	N51	0,00	0,00	0,00	0,78	1,57	1,18
P22	6,27	7,45	20,39	23,92	28,63	29,02	N52	0,39	0,39	0,78	1,96	2,35	2,35
P23	6,67	9,41	23,53	30,98	33,33	32,94	N53	0,00	0,39	1,18	6,67	4,71	5,10
P24	3,92	5,49	18,82	22,75	27,84	27,45	N54	1,18	1,18	2,75	5,88	6,67	7,06
P25	10,20	10,59	43,92	50,59	53,33	54,51	N55	0,78	2,75	3,92	7,84	7,06	7,45
P26	2,75	3,92	29,80	41,96	48,63	51,76	N56	0,00	0,00	2,75	6,27	8,24	7,06
P27	6,67	9,80	28,24	32,55	38,43	38,04	N57	0,39	1,18	2,75	4,71	4,71	4,71
P28	23,53	32,16	51,76	56,08	53,33	58,82	N58	0,00	0,00	0,00	0,78	0,78	1,18
P29	40,00	52,94	52,94	57,65	55,29	58,43	N59	0,39	1,18	2,75	5,49	5,88	5,88
P30	22,75	36,47	45,10	50,20	49,80	52,16	N60	1,57	1,96	4,31	6,27	7,06	7,06

Tab. 9 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]						Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]					
	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50		0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	5,10	8,63	20,78	26,67	29,80	31,37	N31	0,39	1,18	5,10	9,02	10,20	10,98
P2	2,75	5,10	10,98	14,51	16,86	18,04	N32	1,57	2,35	7,45	13,33	14,90	15,69
P3	3,92	7,45	24,71	33,33	34,12	38,43	N33	0,78	3,30	7,06	12,94	12,16	13,73
P4	5,10	9,02	22,75	27,84	28,63	31,76	N34	0,39	0,39	2,35	3,53	4,31	4,71
P5	5,88	9,02	21,96	29,02	33,33	33,73	N35	1,57	2,35	7,06	11,76	14,12	14,12
P6	3,53	6,67	16,47	21,18	25,10	25,88	N36	0,00	1,18	4,71	6,27	7,84	8,24
P7	6,67	10,59	24,31	30,59	34,12	34,51	N37	0,39	0,71	4,31	5,10	7,06	7,84
P8	18,82	26,67	39,22	45,10	44,31	45,49	N38	0,38	0,39	4,31	6,67	8,24	8,63
P9	25,10	32,16	43,92	48,63	49,41	50,98	N39	0,00	0,39	2,75	3,92	5,10	5,10
P10	2,35	5,10	26,67	38,43	43,14	43,92	N40	0,78	1,96	5,10	7,06	9,02	8,63
P11	9,80	14,90	31,76	35,29	37,25	38,04	N41	3,53	3,92	12,16	16,08	17,25	17,65
P12	4,31	6,27	16,47	20,00	24,31	24,71	N42	0,39	0,78	3,14	4,71	6,27	6,67
P13	4,31	6,27	23,53	30,59	32,55	34,12	N43	1,18	1,57	4,71	6,67	8,63	9,41
P14	10,59	17,25	30,59	36,47	36,47	38,04	N44	1,96	1,57	7,06	12,94	14,51	14,51
P15	36,86	48,63	55,29	59,61	58,82	60,00	N45	0,00	0,00	0,00	0,78	1,57	1,96
P16	6,27	10,20	22,35	24,31	27,45	27,45	N46	1,96	2,35	6,27	8,63	10,59	10,98
P17	6,27	10,59	23,53	27,84	30,20	30,59	N47	2,35	2,35	9,80	15,69	18,82	18,82
P18	10,59	18,43	32,94	37,25	38,43	40,00	N48	0,78	1,57	5,10	8,24	9,80	11,37
P19	7,06	13,33	27,06	31,76	34,12	35,29	N49	1,18	1,57	4,71	6,67	8,63	8,24
P20	5,10	10,20	23,53	29,02	30,20	32,16	N50	1,18	1,57	5,10	9,41	9,02	10,20
P21	6,67	10,98	21,57	24,31	25,10	25,88	N51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P22	1,57	3,14	10,59	14,51	17,65	18,82	N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78
P23	3,92	7,45	17,65	24,71	25,88	26,67	N53	0,00	0,00	0,00	0,78	1,57	1,18
P24	1,96	3,14	10,98	16,08	19,22	20,39	N54	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	1,18
P25	1,57	3,92	23,14	32,55	35,69	38,04	N55	0,44	0,00	0,00	1,96	1,57	1,96
P26	2,35	3,53	15,69	28,24	37,25	37,65	N56	0,00	0,00	0,78	3,92	5,10	5,10
P27	5,10	8,63	23,92	30,59	32,94	34,90	N57	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78
P28	21,96	24,31	41,57	47,06	48,24	52,94	N58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P29	36,47	44,71	50,59	55,69	59,61	60,39	N59	0,00	0,00	1,18	3,53	4,71	4,31
P30	22,35	27,84	40,39	44,31	46,67	48,24	N60	0,00	0,78	2,75	3,14	3,53	3,53

Tab. 10 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]						Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]					
	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50		0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	0,00	0,00	1,57	3,14	4,71	3,92	N31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	0,00	0,78	1,96	3,53	4,31	5,10	N32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	0,00	0,00	6,27	7,84	10,20	12,16	N33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	0,00	0,00	1,96	4,31	6,27	5,88	N34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,00	2,75	5,10	8,24	7,84	N35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,00	1,18	2,75	3,92	3,92	N36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P7	0,00	0,00	3,92	6,67	9,41	9,80	N37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	2,75	4,71	12,16	13,33	14,12	15,29	N38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P9	3,53	8,24	17,25	21,57	23,14	23,14	N39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P10	0,00	0,00	18,82	25,88	30,59	30,20	N40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	0,29	0,78	7,84	9,80	10,98	10,98	N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P12	0,00	0,00	2,35	4,71	7,45	7,84	N42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P13	0,00	0,39	4,71	8,63	11,37	11,76	N43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	1,18	2,75	10,20	12,94	14,51	14,12	N44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P15	0,00	0,00	3,14	3,92	5,10	5,49	N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	0,00	2,35	3,53	4,71	5,49	N46	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P17	0,00	0,52	7,84	10,20	12,16	11,76	N47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	0,00	5,10	7,06	8,63	10,59	N48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P19	0,00	0,00	6,27	7,84	9,02	7,84	N49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P20	0,00	0,00	6,27	7,45	9,41	8,63	N50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P21	0,00	0,00	3,53	3,92	6,67	4,71	N51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P22	0,00	0,00	3,14	4,31	7,06	7,45	N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P23	0,00	0,00	1,18	5,10	3,53	3,53	N53	0,00	0,00	0,36	0,30	0,00	0,00
P24	0,00	0,00	0,00	1,96	3,14	3,53	N54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P25	0,00	0,00	3,14	7,45	11,76	13,33	N55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P26	0,00	0,00	20,00	27,06	27,84	26,27	N56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P27	0,00	0,00	3,53	4,31	7,84	7,06	N57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P28	0,00	1,96	11,37	14,51	16,47	16,08	N58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P29	21,18	34,51	41,96	47,84	48,24	49,80	N59	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00
P30	8,24	17,65	25,10	29,80	31,76	34,51	N60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 11 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:3000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]						Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]					
	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50		0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	0,00	0,00	1,96	5,49	6,27	6,67	N31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	0,39	1,57	3,92	6,67	7,45	7,84	N32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	0,00	1,96	9,41	14,12	14,51	16,08	N33	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00
P4	0,00	0,00	4,31	8,24	9,02	10,20	N34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	0,00	0,39	5,10	10,20	10,98	11,76	N35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	0,00	0,07	3,53	7,06	8,24	9,41	N36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P7	0,00	3,14	10,20	16,08	17,25	19,22	N37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P8	3,14	7,45	14,90	18,04	17,25	18,43	N38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P9	7,84	18,43	24,71	29,80	30,59	32,55	N39	0,00	0,00	0,00	0,39	1,18	1,57
P10	0,00	6,27	25,88	36,47	39,22	41,18	N40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P11	1,96	4,71	13,33	16,86	17,25	18,82	N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P12	0,00	1,57	6,67	9,80	12,16	13,33	N42	0,00	0,00	0,00	0,78	1,57	1,96
P13	0,00	0,00	3,92	10,98	12,94	15,69	N43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P14	2,75	7,06	13,33	16,86	18,04	19,61	N44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P15	21,18	32,16	41,18	42,75	42,75	43,53	N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	1,18	3,53	7,84	11,37	11,76	12,94	N46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P17	0,76	5,10	11,37	15,69	17,65	18,43	N47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P18	0,00	2,35	9,41	12,55	13,33	15,29	N48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P19	0,00	3,53	7,45	12,55	13,33	14,90	N49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P20	0,00	1,96	8,24	12,55	14,90	16,86	N50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P21	0,39	1,96	5,10	8,24	8,24	9,80	N51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P22	0,00	0,78	5,49	9,41	11,37	12,94	N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P23	0,00	0,00	4,31	6,67	7,06	13,33	N53	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00
P24	0,00	0,00	1,57	7,06	7,84	9,41	N54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P25	0,00	0,00	5,49	15,69	17,65	18,43	N55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	1,18
P26	0,00	5,88	28,24	38,43	40,78	41,18	N56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P27	0,00	0,00	7,06	12,16	15,29	15,29	N57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P28	0,78	9,41	18,04	24,71	24,71	27,06	N58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P29	18,82	33,33	39,22	42,75	43,14	43,53	N59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P30	1,96	9,02	16,47	22,75	23,92	25,10	N60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 12 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:3500.

		Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]							Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]				
Číslo vzorku	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50	Číslo vzorku	0,05	0,10	0,25	0,40	0,45	0,50
P1	0,00	0,00	0,78	2,35	5,10	4,31	N31	0,78	0,00	0,39	0,39	0,78	1,18
P2	0,00	0,00	3,14	4,31	6,27	6,27	N32	1,18	0,78	0,78	2,35	1,96	2,35
P3	0,00	0,00	9,02	10,59	12,16	12,94	N33	0,00	0,00	3,53	2,75	3,14	4,71
P4	0,00	0,00	3,92	6,67	8,24	9,41	N34	0,00	0,00	0,78	1,18	1,18	1,18
P5	0,00	0,00	3,92	7,06	8,63	10,20	N35	0,39	0,78	1,57	1,57	2,35	2,75
P6	0,00	0,00	3,14	5,49	6,67	7,84	N36	0,00	0,00	0,78	0,78	0,72	1,57
P7	0,00	0,78	7,45	11,76	14,12	14,51	N37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78
P8	3,14	5,88	13,73	16,08	17,25	16,86	N38	0,39	0,39	1,18	1,57	2,35	2,75
P9	8,63	12,55	23,53	27,84	28,24	29,02	N39	0,39	1,18	1,18	2,75	3,92	3,14
P10	0,00	0,00	16,47	27,84	32,55	34,12	N40	0,00	0,39	2,35	3,14	3,92	3,92
P11	1,57	4,31	12,16	15,69	16,86	16,86	N41	1,57	1,57	2,75	4,71	4,31	4,71
P12	0,00	1,18	6,67	9,80	11,37	11,76	N42	0,12	0,78	1,18	1,57	1,96	2,35
P13	0,39	0,00	4,71	9,80	12,16	12,94	N43	0,39	0,78	1,18	1,96	2,35	1,96
P14	1,57	3,92	12,55	15,29	15,69	16,47	N44	0,00	0,39	1,18	2,35	2,35	2,75
P15	19,22	25,49	35,29	37,65	38,04	38,43	N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P16	0,00	0,00	5,49	8,63	9,80	10,59	N46	0,39	0,39	1,18	1,57	2,75	2,75
P17	1,18	2,35	9,80	12,94	14,51	15,69	N47	0,00	0,00	0,39	1,57	2,35	2,75
P18	0,29	3,14	10,59	13,33	14,51	15,69	N48	0,39	0,39	0,78	1,57	1,96	1,96
P19	0,00	1,96	9,41	12,55	14,51	15,29	N49	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,61
P20	0,00	0,29	7,06	9,80	11,37	12,55	N50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78
P21	1,18	1,96	4,71	5,49	6,67	7,06	N51	0,00	0,00	0,00	0,78	1,96	2,35
P22	1,57	1,57	5,49	8,24	9,41	10,20	N52	0,00	0,39	1,18	1,57	1,96	2,35
P23	1,18	1,18	5,49	5,10	5,88	10,59	N53	0,00	0,78	1,96	3,92	3,92	5,10
P24	0,00	0,00	1,96	3,14	5,49	5,88	N54	0,00	0,39	1,96	3,14	3,92	4,31
P25	1,57	2,75	16,47	25,88	29,02	30,98	N55	0,00	0,00	0,12	1,57	2,35	2,35
P26	1,96	2,35	25,88	37,25	41,57	44,31	N56	0,00	0,39	1,57	2,75	3,14	3,92
P27	4,31	5,10	14,51	20,00	21,96	24,31	N57	0,00	0,78	1,96	3,92	4,31	4,71
P28	9,41	13,33	29,41	34,51	36,86	38,43	N58	0,00	0,00	0,78	1,96	1,96	1,96
P29	26,27	37,65	45,10	48,24	47,84	51,76	N59	0,00	0,00	1,18	2,75	3,53	3,92
P30	11,76	20,39	31,76	36,86	38,82	41,18	N60	0,00	0,00	0,66	3,14	3,14	3,53

Po určení vybraných koncentrací antigenu PBP2a a konjugátu IgG a následné detekci a po vyhodnocení hodnot intenzity zbarvení linií byla vypočítána diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda (Tab. 13–18). Vhodné koncentrace antigenu a konjugátu jsou takové, při kterých je diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda co nejlépe hodnotě 100 % a počet hraničních výsledků je co nejnižší.

Tab. 13 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,05 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	9	13	6	1	2	2
Hraniční	0	11	14	9	1	1	3
Negativní	0	10	3	15	28	27	25
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	0	1	0	0	0	0
Negativní	30	30	29	30	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		47,37%	81,25%	28,57%	3,45%	6,90%	7,41%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		79,59%	93,33%	70,59%	52,54%	54,24%	56,14%

Tab. 14 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,10 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	11	19	10	2	3	4
Hraniční	0	14	8	14	1	6	2
Negativní	0	5	3	6	27	21	24
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	0	1	0	0	0	0
Negativní	30	30	29	30	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		68,75%	86,36%	62,50%	6,90%	12,50%	14,29%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		89,13%	94,12%	86,96%	54,24%	61,11%	58,62%

Tab. 15 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,25 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	29	30	27	5	10	10
Hraniční	0	1	0	3	8	9	9
Negativní	0	0	0	0	17	11	11
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	1	0	0	0	0
Hraniční	0	1	8	7	0	0	0
Negativní	30	29	21	23	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	22,73%	47,62%	47,62%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	95,45%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	98,08%	100,00%	67,31%	78,43%	78,43%

Tab. 16 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,40 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	29	30	30	7	14	13
Hraniční	0	1	0	0	10	15	11
Negativní	0	0	0	0	13	1	6
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	2	3	0	0	0
Hraniční	0	10	15	12	0	0	0
Negativní	30	20	13	15	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	35,00%	93,33%	68,42%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	86,67%	83,33%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	95,56%	93,75%	74,00%	97,78%	87,76%

Tab. 17 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,45 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	30	30	30	8	18	16
Hraniční	0	0	0	0	15	12	12
Negativní	0	0	0	0	23	0	2
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	2	5	0	0	0
Hraniční	0	10	10	12	0	0	0
Negativní	30	20	18	13	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	53,33%	100,00%	88,89%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	90,00%	72,22%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	96,00%	89,58%	84,44%	100,00%	95,83%

Tab. 18 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,50 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG					
		1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500
Referenční panel pozitivních vzorků							
Pozitivní	30	30	30	30	9	21	16
Hraniční	0	0	0	0	13	9	13
Negativní	0	0	0	0	8	0	1
Referenční panel negativních vzorků							
Pozitivní	0	0	2	6	0	0	0
Hraniční	0	9	19	11	0	0	0
Negativní	30	21	9	13	30	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	52,94%	100,00%	94,12%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	81,82%	68,42%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	95,12%	87,76%	82,98%	100,00%	97,87%

Úvodní titrace prokázala, že připravený antigen PBP2a (o c = 0,59 mg/ml) je funkční. Při použití vhodné koncentrace antigenu a konjugátu lze získat zařazení referenčních vzorků podle jejich diagnostického zařazení (tj. pozitivní nebo negativní).

Z výsledků diagnostické citlivosti, diagnostické specifity a celkové diagnostické shody (Tab. 13–18) je patrné, že při nižších koncentracích antigenu PBP2a než 0,25 mg/ml je celková diagnostická shoda výsledků nejnižší. Dále platí, že se zvyšující se koncentrací konjugátu IgG klesá počet pozitivních výsledků v panelu referenčních pozitivních sér a stoupá počet hraničních výsledků (Tab. 11, 12). Z toho lze předpokládat, že koncentrace konjugátu nad 1:2500 jsou nevyhovující.

Jako nejvhodnější z úvodní titrace č. 1 vyplývá koncentrace antigenu 0,25 mg/ml, při použití koncentrace konjugátu 1:1000, kdy byl kromě 100% diagnostické citlivosti, diagnostické specifity a celkové diagnostické shody naměřen i nejnižší počet hraničních výsledků (Tab. 15). Vhodně se jeví i koncentrace antigenu 0,45 mg/ml a 0,50 mg/ml, při koncentraci konjugátu 1:1000. Při další analýze bylo potřeba zaměřit se na titraci antigenu o hodnotách koncentrací okolo 0,25 – 0,50 mg/ml a na použití více koncentrací konjugátu IgG v rozmezí 1:1000–1:2500.

5.3 Titrace antigenu č. 2, pro třídu imunoglobulinů IgG

Titrace č. 2 byla provedena opět ve třídě imunoglobulinů IgG, tato třída je považována za sérologický obraz prodělané infekce. Rekombinantní antigen PBP2a ($c = 0,59$ mg/ml) byl naředěn na dvanáct koncentrací: $c = 0,25; 0,28; 0,30; 0,33; 0,35; 0,38; 0,40; 0,43; 0,45; 0,48; 0,50; 0,52$ mg/ml v dialyzačním Tris pufru, na konečný objem 160,0 μ l. Tyto koncentrace byly nanášeny na nitrocelulózovou membránu. Poté byla provedena detekce stripů pomocí optimalizované metody blot-line, za použití osmi koncentrací konjugátu IgG (1:700, 1:1000, 1:1500, 1:1700, 1:1800, 1:2000, 1:2300, 1:2500). Bylo testováno šedesát vzorků lidské plazmy, referenční pozitivní vzorky byly označeny P1 – P30 a referenční negativní vzorky byly označeny N31 – N60. Pozitivní vzorky mají potvrzenou diagnózu, tito pacienti byli léčeni na MRSA. Získané výsledky pro vybrané koncentrace antigenu a konjugátu jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 19–26).

Tab. 19 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:700.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	21,18	23,53	23,53	23,92	25,10	26,27	26,27	27,84	28,24	29,41	29,41	30,98
P2	36,86	37,65	41,18	41,18	43,14	43,92	43,92	45,88	45,88	45,10	44,71	46,67
P3	36,47	40,00	40,78	43,14	43,14	44,71	46,27	46,27	45,88	45,88	44,31	45,49
P4	23,14	25,49	25,49	27,84	28,63	28,63	29,80	30,20	31,37	31,76	31,76	32,16
P5	26,27	28,63	29,41	30,98	30,98	31,37	34,51	35,29	35,69	36,08	36,08	35,29
P6	17,65	21,96	20,39	21,57	21,96	23,92	26,27	26,27	25,49	27,84	26,67	28,24
P7	29,41	33,33	34,12	34,90	35,69	36,86	36,08	38,82	38,04	39,22	37,65	40,00
P8	47,06	47,45	46,67	47,06	46,67	48,24	47,45	49,02	47,84	48,24	45,88	46,27
P9	45,88	47,06	47,06	49,80	49,02	50,20	51,37	52,16	51,76	52,16	50,20	51,37
P10	38,43	38,82	42,75	47,84	49,02	49,02	53,33	55,29	50,59	51,76	52,94	51,37
P11	42,35	43,14	43,92	43,53	43,92	45,49	47,06	47,06	45,49	45,49	43,53	44,31
P12	17,65	20,78	19,22	20,78	21,57	22,35	24,31	25,49	25,88	25,49	25,88	25,49
P13	29,41	30,98	32,55	34,51	34,90	35,29	38,04	38,82	38,04	37,65	36,86	37,65
P14	41,18	42,75	41,96	42,75	43,53	43,14	44,71	44,71	45,10	43,92	44,31	43,53
P15	57,25	58,43	57,25	58,43	58,43	58,43	60,00	60,78	58,43	59,22	58,04	59,61
P16	34,12	34,51	34,51	35,69	35,69	36,47	37,65	38,43	38,04	38,82	38,04	37,65
P17	36,47	38,82	37,65	40,39	40,00	40,78	45,88	42,35	40,78	41,96	40,78	39,61
P18	41,96	42,75	41,96	43,14	43,53	45,10	45,10	45,88	45,49	45,49	44,31	44,71
P19	34,90	36,86	36,08	36,86	37,25	38,04	40,39	39,61	40,00	40,00	39,61	39,61
P20	30,59	32,94	31,76	31,76	32,16	34,51	36,08	36,47	36,86	36,86	36,08	35,69
P21	19,61	22,35	20,39	21,57	21,18	21,96	23,14	23,53	23,14	22,75	21,96	21,18
P22	25,49	27,06	26,67	28,24	29,02	29,80	31,76	32,55	33,33	32,94	33,33	33,33
P23	22,75	26,27	24,31	25,10	24,31	29,02	25,10	27,06	27,84	27,84	27,45	28,24
P24	19,22	23,53	21,18	21,18	21,96	23,14	25,88	25,49	28,24	27,06	29,41	28,24
P25	38,43	41,18	41,96	43,92	44,71	46,27	47,45	48,63	50,20	49,80	52,16	52,16
P26	30,98	34,12	38,04	40,78	41,96	44,71	47,45	48,63	47,84	47,84	49,02	50,20
P27	27,45	30,98	29,41	30,20	31,76	32,16	34,12	35,69	35,69	36,47	36,86	37,25
P28	49,41	50,20	50,20	50,98	51,37	50,98	52,94	53,73	53,73	53,73	54,12	53,33
P29	57,25	58,82	56,08	59,22	58,43	58,82	58,43	60,39	55,69	58,04	56,08	57,65
P30	48,24	50,20	49,41	50,98	50,20	52,16	52,55	53,73	52,94	52,94	54,12	53,73
N31	4,31	13,33	5,10	7,06	5,88	6,27	6,27	7,06	6,67	7,06	7,84	7,84
N32	6,27	12,94	7,06	8,24	7,45	7,84	9,02	10,20	9,80	10,20	10,98	10,59
N33	6,67	10,98	9,02	9,80	8,63	15,29	21,96	10,98	10,59	11,76	12,16	12,94
N34	4,31	13,33	5,10	7,06	6,27	6,67	7,84	7,06	7,06	7,45	7,45	7,84
N35	11,37	17,65	12,94	14,12	14,12	14,12	14,90	15,69	15,69	16,08	16,86	17,25
N36	5,10	14,51	5,88	6,27	6,27	7,45	7,84	8,24	8,24	8,63	9,02	9,02
N37	5,10	14,51	5,88	7,06	6,27	7,45	7,45	7,84	8,24	9,02	8,24	8,24
N38	7,45	15,69	7,84	11,37	8,63	10,20	9,41	10,20	10,98	13,73	12,55	12,55
N39	6,27	16,08	7,45	8,63	7,45	9,80	8,24	9,02	9,41	9,41	10,20	11,37
N40	6,67	15,29	7,84	9,02	9,02	10,59	10,98	11,37	11,37	12,55	13,73	13,33
N41	14,12	21,18	16,08	16,47	16,47	17,25	16,08	16,86	16,08	17,65	16,86	17,65
N42	11,37	18,82	12,94	14,51	14,51	15,29	14,51	15,69	15,69	17,25	17,25	17,65
N43	5,88	14,12	6,67	8,24	7,06	8,24	7,84	9,02	9,02	9,02	9,80	10,20
N44	7,45	13,33	7,84	9,41	8,63	9,41	9,02	9,80	10,20	10,98	11,37	12,16
N45	7,84	15,29	9,41	10,98	9,80	10,20	10,98	10,98	10,98	12,16	11,76	12,16
N46	7,06	15,69	7,45	10,20	9,02	10,59	10,59	11,37	11,76	12,55	12,55	13,33
N47	12,94	21,18	14,12	15,69	14,90	16,47	16,86	17,25	18,43	19,22	18,43	20,00
N48	6,67	14,12	8,63	9,80	10,20	10,20	10,20	12,16	11,76	12,94	12,16	12,55
N49	11,37	21,96	12,55	14,12	13,73	15,69	15,29	16,08	16,47	17,25	17,25	18,43
N50	6,27	12,55	7,06	7,84	7,45	8,63	9,02	9,02	9,80	10,59	10,98	14,51
N51	14,51	21,57	15,69	17,65	17,25	20,39	20,39	21,18	21,96	21,96	21,96	23,53
N52	3,53	7,06	4,31	4,71	4,71	5,10	6,27	7,06	6,27	7,45	7,84	7,06
N53	10,98	17,65	14,51	12,16	13,73	16,86	15,29	15,29	16,86	16,08	16,47	15,69
N54	9,41	12,16	10,59	11,37	12,16	14,12	13,33	14,51	15,29	15,69	16,47	16,86
N55	12,55	18,04	14,51	15,69	16,47	16,08	13,73	17,65	17,65	18,82	19,22	19,22
N56	11,37	18,04	12,94	14,12	15,69	15,69	18,04	17,65	18,43	19,22	20,78	19,61
N57	7,45	14,12	8,24	10,59	9,80	11,37	11,76	12,94	12,55	14,12	13,73	14,51
N58	9,02	15,69	7,45	10,59	8,24	9,80	9,80	10,59	9,80	11,37	10,20	11,76
N59	12,16	17,25	13,33	15,69	14,90	16,47	17,25	18,04	18,04	18,82	18,82	19,22
N60	9,41	13,73	10,59	12,16	12,16	12,94	14,12	13,73	14,12	14,51	14,51	15,69

Tab. 20 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	16,08	18,82	16,86	18,43	19,22	19,61	22,35	22,75	23,53	24,71	24,71	26,27
P2	29,41	29,41	34,12	34,90	37,25	40,39	41,18	43,92	43,92	44,31	45,10	46,67
P3	26,67	28,63	29,41	29,80	32,94	33,73	36,47	37,25	37,65	37,25	38,04	38,43
P4	20,00	21,96	19,61	21,96	21,96	22,75	24,31	25,49	27,06	27,45	27,84	28,24
P5	16,86	20,39	18,43	18,43	20,39	21,96	22,75	23,53	24,71	24,71	26,67	25,88
P6	13,73	16,86	13,73	14,12	15,69	17,25	18,43	18,43	20,78	18,82	20,78	19,61
P7	21,18	25,49	23,53	26,27	26,27	26,67	27,84	30,59	30,98	32,55	31,76	32,16
P8	43,14	45,10	44,31	44,71	45,10	44,31	46,27	45,88	45,88	46,67	45,88	45,49
P9	45,10	45,10	45,49	46,67	47,45	47,45	49,02	49,02	49,41	49,41	48,63	49,02
P10	24,71	28,63	33,33	36,86	41,18	44,31	43,92	46,27	47,06	48,24	50,59	50,98
P11	32,94	36,47	33,33	34,51	34,90	35,69	36,08	35,29	35,29	34,51	34,51	35,29
P12	12,94	17,65	16,08	17,25	18,04	18,04	19,22	20,00	20,78	21,96	21,96	23,14
P13	25,49	26,67	29,80	32,16	31,76	31,37	33,73	34,12	35,29	36,08	38,04	38,04
P14	29,02	32,16	30,98	32,16	30,98	32,94	32,16	40,78	44,31	44,31	42,35	39,22
P15	57,25	58,43	57,65	58,04	58,04	57,65	58,04	58,43	57,25	58,82	58,04	59,61
P16	26,27	27,06	27,06	27,45	27,45	26,67	28,63	28,24	29,41	30,20	30,20	30,59
P17	29,02	30,59	30,59	31,76	30,98	31,37	31,37	30,98	31,76	31,76	31,76	30,98
P18	33,73	36,08	36,47	34,51	36,47	36,47	36,08	34,51	36,47	36,47	37,25	37,65
P19	29,41	32,55	30,98	31,37	32,16	31,76	31,76	30,98	31,76	31,37	32,55	33,73
P20	23,53	27,45	25,10	27,06	27,06	25,88	27,84	27,06	29,41	28,63	29,41	28,63
P21	16,47	19,22	17,65	17,25	17,65	17,25	18,43	18,04	18,04	18,82	18,82	18,82
P22	25,10	26,27	26,67	25,88	26,67	27,84	28,24	27,84	29,80	29,80	29,80	29,80
P23	21,18	25,10	22,75	24,31	23,53	23,53	23,92	23,92	23,14	23,14	24,71	24,71
P24	14,90	20,39	16,08	18,04	20,00	19,22	19,22	20,39	21,18	21,57	22,75	23,14
P25	32,16	36,47	41,96	40,78	41,18	41,18	43,14	41,96	43,53	43,14	43,92	44,31
P26	32,55	33,33	38,04	40,39	41,96	43,53	43,92	42,35	43,53	44,31	42,75	44,31
P27	21,18	23,14	23,53	23,92	24,71	25,88	26,67	24,71	27,84	29,02	30,59	29,80
P28	43,53	43,53	44,71	45,10	45,88	45,88	47,45	45,88	47,06	46,27	47,84	47,06
P29	52,16	56,08	54,12	56,47	54,90	54,12	56,47	55,69	55,69	55,29	55,29	56,08
P30	40,39	41,96	41,57	41,18	40,78	41,57	43,53	41,18	43,53	43,53	43,53	42,75
N31	1,57	6,27	1,96	2,35	2,35	2,35	2,75	3,14	3,14	2,75	3,14	2,35
N32	2,75	6,67	2,75	3,92	3,53	3,92	4,31	3,92	4,71	4,71	4,31	3,92
N33	2,35	5,10	2,75	3,14	2,75	9,80	3,53	3,53	4,71	5,10	4,31	5,10
N34	2,75	11,76	3,14	4,31	3,53	3,53	4,31	3,14	4,31	4,71	6,27	5,88
N35	5,88	10,98	6,67	7,06	6,27	7,06	7,06	7,06	7,06	8,24	9,80	9,02
N36	1,96	7,84	3,14	3,53	3,14	4,71	3,92	3,92	4,31	3,92	3,92	3,92
N37	2,75	10,20	3,53	3,53	3,53	3,92	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53
N38	4,31	9,02	3,92	4,71	5,10	5,10	4,71	4,71	5,88	5,49	5,88	5,49
N39	3,53	11,37	3,53	4,71	3,92	4,71	6,67	5,49	5,10	5,49	5,88	5,49
N40	3,92	6,27	5,88	5,88	5,88	6,67	7,06	9,80	6,67	7,84	8,24	7,45
N41	10,59	4,71	12,55	12,16	8,63	9,80	16,08	10,59	9,41	9,80	9,02	9,80
N42	8,63	10,20	8,63	10,59	9,80	10,98	10,98	11,76	12,16	12,94	12,94	12,94
N43	3,53	5,88	4,71	4,71	3,92	4,31	5,49	5,10	5,88	5,88	5,88	6,67
N44	3,14	4,71	3,92	5,10	5,88	5,49	6,27	6,27	7,06	7,06	6,67	7,84
N45	3,53	6,27	4,31	5,49	5,88	5,49	5,10	5,49	5,49	6,67	5,10	5,49
N46	4,31	6,67	9,02	7,06	5,88	6,67	7,06	7,45	7,84	7,84	8,24	8,63
N47	7,84	9,02	7,06	9,02	8,63	9,41	9,41	9,80	10,20	10,98	10,98	11,76
N48	5,49	7,06	5,10	5,88	5,49	5,88	7,06	7,06	7,06	7,45	7,84	9,80
N49	6,67	9,41	8,24	8,24	8,24	10,20	10,59	10,98	10,98	11,37	11,76	11,76
N50	3,53	5,88	4,31	5,88	5,49	6,27	6,27	6,27	6,67	7,06	7,06	7,06
N51	9,41	13,73	13,33	12,94	13,33	13,33	14,90	15,69	15,69	16,86	17,25	17,25
N52	2,35	3,14	2,75	3,53	2,75	3,53	3,53	4,31	4,31	4,31	4,31	4,31
N53	7,06	10,59	7,45	9,41	9,80	10,20	10,20	10,59	10,98	12,16	11,76	12,55
N54	7,45	9,80	8,63	9,80	10,20	11,37	12,16	12,16	12,16	13,33	12,94	13,73
N55	10,20	12,16	12,94	14,51	12,16	13,73	12,94	17,65	14,51	16,47	15,69	14,90
N56	11,37	15,69	14,12	15,29	15,69	16,08	19,22	18,04	20,78	20,00	21,57	21,57
N57	5,49	9,02	7,45	8,63	8,24	9,02	9,80	10,20	10,98	10,59	10,98	10,98
N58	9,41	8,24	5,88	7,45	5,88	7,06	6,27	7,06	7,06	7,84	7,45	7,84
N59	7,06	9,41	8,24	9,02	8,24	9,02	9,80	10,20	10,98	10,98	11,76	12,16
N60	7,45	9,41	8,63	9,80	9,41	10,59	10,59	10,98	10,98	11,37	11,76	11,76

Tab. 21 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	9,41	10,59	10,20	10,20	10,59	11,37	11,76	11,76	12,94	12,55	13,73	14,12
P2	22,75	21,96	26,27	27,45	29,80	31,37	30,98	35,29	37,65	40,78	40,78	41,96
P3	18,43	21,96	19,61	24,31	23,92	24,71	25,49	25,88	25,88	25,49	28,24	27,45
P4	15,69	18,43	16,47	16,08	18,04	18,82	20,00	19,22	20,00	20,39	20,39	19,61
P5	14,12	17,65	15,69	16,08	16,86	18,04	20,00	18,82	20,78	21,18	22,35	21,57
P6	12,55	14,51	14,12	14,90	14,90	16,86	17,25	17,25	17,65	17,65	17,65	18,43
P7	21,18	24,31	23,14	23,53	25,49	25,88	27,06	25,49	27,84	28,63	29,41	29,02
P8	32,55	35,69	35,69	34,51	35,29	36,47	36,47	36,08	36,86	36,86	36,08	35,69
P9	38,82	41,57	38,82	41,96	41,57	42,35	42,35	43,14	42,75	42,75	40,39	42,35
P10	38,43	40,78	44,71	48,24	48,24	49,02	50,20	50,59	49,02	49,41	49,02	50,98
P11	29,41	31,37	31,37	31,76	32,16	32,94	33,73	32,94	32,55	31,76	30,98	30,59
P12	14,12	16,86	16,08	17,25	17,25	19,22	19,61	20,00	20,78	21,57	21,57	21,18
P13	17,65	23,14	21,96	23,92	25,49	25,88	27,45	27,84	28,24	28,24	28,24	27,06
P14	28,63	32,55	30,59	31,37	32,55	31,76	33,73	32,94	33,73	33,33	33,33	33,33
P15	54,12	55,29	54,51	55,69	55,69	55,69	56,47	56,08	56,08	55,69	54,90	55,29
P16	21,18	23,53	23,53	22,35	24,31	24,31	25,49	26,27	27,06	28,24	26,67	25,88
P17	22,75	24,31	24,71	24,71	27,06	25,88	27,84	26,27	27,45	26,67	27,45	27,45
P18	28,24	30,98	29,41	29,41	31,76	30,98	32,94	30,98	32,55	30,98	31,37	31,76
P19	23,14	25,10	22,75	24,71	25,10	25,88	27,06	26,67	27,06	26,67	27,06	26,67
P20	20,78	21,96	21,96	21,57	24,71	23,53	25,49	25,10	26,67	26,27	29,80	26,27
P21	14,51	16,47	15,69	14,51	15,69	16,08	17,65	16,86	18,04	18,04	18,82	18,43
P22	18,82	20,39	19,61	20,78	21,18	22,75	23,92	24,71	25,10	25,49	25,88	26,67
P23	15,29	21,18	16,86	18,82	19,22	23,92	19,61	20,78	20,78	21,57	21,57	21,57
P24	10,98	15,69	12,16	12,55	12,94	14,90	15,69	15,69	17,25	17,25	18,82	16,86
P25	23,14	23,92	28,24	28,24	30,98	32,55	34,12	33,73	35,69	36,86	37,25	36,86
P26	40,00	40,78	40,39	43,14	44,31	45,88	47,45	49,02	47,84	48,24	48,24	50,20
P27	17,65	19,61	19,61	19,22	20,39	20,78	23,92	22,75	25,88	24,31	25,88	26,27
P28	36,08	37,25	38,04	36,47	38,43	38,82	40,78	40,00	40,78	40,39	40,39	40,39
P29	54,51	56,47	54,12	56,47	56,08	56,08	57,25	56,86	56,47	56,47	56,47	56,47
P30	35,69	38,04	38,43	39,61	39,61	38,43	40,78	39,61	40,78	39,61	39,61	38,82
N31	0,78	5,49	0,39	0,78	0,39	0,39	0,78	0,78	1,18	1,57	1,18	1,57
N32	0,78	5,10	1,18	1,57	1,57	1,57	1,57	1,96	1,96	1,96	2,35	2,35
N33	0,39	2,35	0,78	2,23	1,18	0,78	1,18	1,18	1,96	1,96	2,39	1,96
N34	1,57	7,84	1,57	1,96	1,57	2,35	2,35	2,35	2,35	3,14	3,14	2,35
N35	3,14	8,24	3,14	3,92	3,14	3,53	3,53	3,53	3,92	4,31	4,31	3,92
N36	0,78	5,88	1,96	1,57	1,18	1,57	2,35	1,57	1,57	1,96	1,96	1,57
N37	1,18	7,06	0,78	1,57	0,78	1,18	1,18	1,18	1,57	3,53	1,96	1,96
N38	3,92	7,06	3,14	3,53	3,53	3,53	3,53	3,92	4,71	5,10	5,10	5,10
N39	1,96	9,02	1,57	2,75	1,96	2,75	2,35	2,35	2,35	2,75	2,75	2,35
N40	1,57	6,27	2,35	2,75	2,35	2,75	2,75	3,14	3,53	4,71	5,49	5,49
N41	5,49	12,94	7,84	9,02	7,45	7,84	7,45	6,67	7,45	7,06	7,45	7,06
N42	5,88	11,37	6,67	7,45	7,06	7,06	7,84	7,45	8,24	8,24	9,02	8,63
N43	1,57	7,45	1,96	2,35	2,75	2,35	2,35	2,35	2,75	2,35	2,75	2,75
N44	3,14	7,84	2,75	3,53	3,14	3,53	3,92	3,92	3,92	4,31	4,71	4,31
N45	1,96	5,49	1,96	1,96	1,96	1,96	2,35	2,35	2,35	2,35	2,75	2,75
N46	1,96	5,49	2,35	2,35	2,75	2,75	3,14	3,14	3,14	3,14	4,31	3,53
N47	2,75	7,45	3,53	3,92	3,92	3,92	4,31	4,31	5,10	5,10	5,88	5,88
N48	1,57	4,31	1,96	1,96	1,96	2,35	3,14	3,14	3,53	3,53	3,53	3,53
N49	2,35	5,49	2,75	2,75	2,75	2,75	3,14	3,53	3,92	4,31	5,10	5,10
N50	4,31	6,67	2,75	2,75	2,75	3,14	3,14	3,53	3,92	3,14	3,51	5,10
N51	6,67	11,37	7,45	8,24	8,24	9,02	9,41	9,02	10,59	11,37	11,76	11,76
N52	1,57	3,92	1,57	1,57	1,96	1,96	3,14	1,96	1,96	2,75	2,75	2,35
N53	4,71	11,37	5,10	7,45	6,27	11,37	6,67	6,27	7,06	7,45	8,24	8,24
N54	7,45	9,02	7,84	8,24	9,02	9,41	10,98	10,59	11,76	12,55	13,73	12,94
N55	8,63	14,12	10,20	9,80	9,41	10,59	12,16	10,98	12,55	11,76	13,73	11,37
N56	7,06	12,55	9,02	8,24	9,02	9,80	10,98	9,80	12,55	12,55	13,33	12,55
N57	3,53	10,98	3,92	4,71	5,10	5,88	5,49	5,49	6,67	7,06	7,84	7,84
N58	3,14	10,59	2,75	3,92	2,75	3,53	3,53	3,53	3,92	3,53	4,31	3,92
N59	5,49	10,59	7,06	7,06	12,16	8,63	8,24	8,24	9,02	8,24	9,80	9,80
N60	7,45	12,16	9,02	8,63	10,20	9,80	11,76	10,20	11,37	10,20	11,37	11,76

Tab. 22 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1700.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	14,12	18,04	15,29	15,69	16,47	17,65	18,82	17,65	20,39	19,22	21,96	23,92
P2	32,16	29,41	33,73	32,94	34,90	34,90	39,22	38,04	41,57	41,18	43,14	43,92
P3	22,75	24,31	24,71	25,49	27,06	29,02	33,33	30,59	30,98	32,16	32,55	33,73
P4	16,86	20,00	18,82	20,78	20,78	20,39	21,57	21,18	22,35	23,14	24,71	23,14
P5	17,65	19,22	21,57	17,25	20,39	20,39	22,75	21,18	25,10	23,53	25,10	24,31
P6	12,55	16,47	14,90	14,12	16,08	16,47	20,39	18,43	20,39	19,22	21,18	19,22
P7	23,53	26,67	25,88	26,67	28,24	28,24	30,20	30,20	31,37	30,59	32,16	30,59
P8	32,55	33,33	32,94	33,33	34,51	34,12	36,08	35,29	41,57	35,29	36,47	36,47
P9	40,00	40,39	42,75	41,57	42,75	42,75	44,31	43,53	45,49	45,49	45,88	45,49
P10	43,14	42,35	45,49	46,67	45,88	49,02	49,41	50,98	51,76	53,33	51,37	51,76
P11	30,98	32,16	31,76	31,37	33,33	31,37	33,73	33,73	34,90	33,33	34,12	33,73
P12	15,69	18,82	16,86	16,86	18,43	18,04	20,39	20,39	22,35	22,75	24,71	23,92
P13	18,43	21,18	22,75	21,57	23,53	25,10	27,84	29,41	29,80	29,80	30,20	31,37
P14	32,16	33,73	31,76	31,76	32,55	32,16	33,33	34,12	35,69	33,73	34,90	33,73
P15	54,90	54,51	54,90	55,69	56,08	56,08	56,47	58,04	56,47	56,47	55,29	57,25
P16	25,10	25,88	25,10	25,49	25,88	26,67	28,63	28,63	29,80	28,63	28,24	27,84
P17	25,49	27,06	25,88	27,06	28,24	28,24	29,80	30,59	31,37	31,76	30,59	30,98
P18	29,80	30,20	30,20	29,41	30,59	30,59	32,16	32,94	33,73	32,55	32,94	31,76
P19	25,49	27,84	26,67	25,88	27,45	27,45	29,41	29,02	30,98	30,20	30,59	29,80
P20	23,14	26,27	25,88	24,71	26,67	27,06	28,63	29,41	31,76	29,80	31,76	33,33
P21	16,08	18,04	16,86	16,86	16,47	16,86	18,82	18,43	19,22	18,82	19,61	18,82
P22	22,75	24,31	24,31	24,31	25,49	26,27	28,24	27,84	30,20	29,80	31,76	30,20
P23	17,25	22,35	19,61	20,78	20,00	19,22	21,57	20,78	22,75	22,35	23,14	21,18
P24	14,90	16,86	16,08	14,51	16,86	16,86	19,61	19,61	21,57	19,61	22,75	20,39
P25	27,06	24,71	29,80	28,24	32,94	32,16	35,29	35,69	38,43	37,65	39,22	36,86
P26	46,67	44,71	46,27	48,24	49,41	50,98	52,16	53,73	52,94	53,33	50,20	52,55
P27	22,75	21,18	23,53	20,78	25,10	23,14	26,27	24,71	28,24	26,27	29,41	27,45
P28	38,82	37,25	39,22	38,82	41,18	41,96	42,75	43,53	43,92	43,92	44,31	43,53
P29	54,51	56,47	53,33	56,08	56,08	56,86	57,25	58,43	57,65	57,65	55,69	57,65
P30	39,22	40,39	39,61	41,18	42,35	43,14	44,31	44,31	45,10	45,10	45,10	44,71
N31	0,39	6,67	1,18	1,57	1,57	1,96	1,96	2,35	2,35	2,35	2,75	2,35
N32	3,14	9,02	2,76	3,92	3,92	4,31	4,71	5,10	5,49	5,88	5,88	5,88
N33	2,35	3,92	2,75	4,31	2,75	2,75	5,10	2,75	2,75	2,75	3,14	2,35
N34	2,35	7,84	1,57	2,75	2,75	6,27	3,14	2,75	2,35	3,14	2,75	2,75
N35	2,35	8,24	3,53	3,53	3,53	3,53	3,53	3,92	4,31	3,53	3,53	3,92
N36	1,96	7,06	1,57	1,96	3,14	1,57	4,71	1,57	1,96	2,75	2,35	1,96
N37	3,14	10,20	2,35	3,14	3,14	3,14	3,14	8,24	5,10	6,27	4,31	4,71
N38	3,45	6,27	3,14	3,92	3,92	3,92	4,31	4,31	4,71	4,71	9,02	10,20
N39	2,75	9,80	2,35	3,53	2,75	3,53	3,14	3,53	3,53	3,53	3,53	3,14
N40	3,53	8,24	3,53	3,14	4,31	3,53	3,92	3,92	5,49	4,71	5,88	5,10
N41	3,14	13,73	12,55	7,84	7,45	6,67	7,06	7,06	6,67	7,45	6,27	6,27
N42	5,88	12,55	6,67	7,06	6,67	7,84	8,24	7,84	9,02	9,41	9,41	9,02
N43	2,75	8,24	3,14	3,14	2,75	2,75	4,31	2,75	3,53	3,14	3,53	3,53
N44	2,35	6,67	2,75	3,53	2,75	2,75	4,31	3,53	4,31	3,92	4,71	4,31
N45	0,78	5,88	1,18	1,57	1,57	1,96	1,96	2,35	2,75	2,35	1,96	1,96
N46	3,14	9,41	3,53	4,31	3,92	4,31	4,31	3,92	5,10	4,31	4,31	4,31
N47	3,92	9,80	3,53	4,31	3,92	3,92	4,71	5,88	4,31	4,31	5,10	4,71
N48	2,75	7,45	2,75	3,14	3,92	2,75	3,53	3,14	3,92	4,31	3,92	3,53
N49	2,35	3,53	3,14	3,14	3,53	3,14	3,53	3,92	4,31	5,10	5,10	5,88
N50	1,18	2,35	3,92	1,96	1,96	1,96	2,35	2,35	3,53	2,75	3,14	2,29
N51	5,88	7,84	7,06	7,45	7,84	8,24	7,84	8,63	9,02	9,80	9,80	9,41
N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,00	0,39	0,00	0,00
N53	2,35	3,92	2,75	3,53	3,53	3,99	3,92	4,71	4,31	5,10	5,49	5,49
N54	3,92	4,31	3,92	4,31	4,71	6,27	5,88	5,10	5,88	6,27	6,67	5,88
N55	5,10	6,67	6,27	6,27	7,06	7,06	8,24	9,02	9,02	9,80	10,20	12,55
N56	3,92	5,88	5,10	5,10	6,27	6,67	8,63	8,63	9,02	9,41	10,20	9,80
N57	2,35	4,71	3,53	4,31	5,49	5,10	5,49	5,88	6,27	6,67	7,06	7,06
N58	1,04	4,31	1,18	1,96	1,96	1,96	2,35	2,35	2,35	2,75	3,14	3,14
N59	5,49	7,84	7,06	7,06	8,63	8,63	9,02	8,63	10,59	10,59	11,37	39,22
N60	5,10	7,45	6,27	7,06	7,06	7,45	8,24	8,24	9,02	9,41	9,80	9,80

Tab. 23 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1800.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	5,49	6,27	7,06	7,45	7,84	9,41	9,41	10,20	10,20	11,37	11,37	12,16
P2	8,63	11,76	14,51	16,86	18,82	20,00	20,78	22,35	22,75	23,92	25,10	26,67
P3	7,84	10,98	12,55	12,94	13,73	14,90	16,86	17,65	17,65	19,22	20,00	20,39
P4	3,53	5,49	5,10	6,27	5,88	8,24	6,67	8,24	7,45	9,41	9,02	9,80
P5	3,53	4,71	5,10	5,49	5,49	7,06	6,27	9,02	9,41	9,41	9,41	9,80
P6	2,75	4,31	3,14	3,14	3,92	4,71	5,10	5,88	6,27	7,45	7,45	7,45
P7	6,67	7,84	8,63	6,67	7,06	9,41	7,84	9,02	9,41	10,59	10,98	11,76
P8	18,43	15,69	15,29	16,86	12,16	14,12	13,73	16,08	16,86	17,25	16,08	16,86
P9	26,27	30,98	27,84	30,20	30,59	31,76	31,76	32,94	33,33	35,29	35,29	35,29
P10	3,92	5,88	6,67	7,84	10,20	11,37	12,55	12,55	14,51	16,86	14,51	16,08
P11	10,98	12,55	15,69	13,33	12,94	14,12	14,90	15,29	15,69	17,25	16,47	17,65
P12	3,53	5,10	5,10	5,49	6,27	6,67	7,06	6,67	8,24	7,84	9,80	9,41
P13	11,76	15,69	17,25	18,43	21,18	23,53	22,75	23,53	23,92	25,10	26,67	26,67
P14	12,55	14,51	14,12	15,69	16,08	17,65	16,47	17,65	17,25	19,22	19,22	19,61
P15	42,75	43,92	43,14	45,10	45,10	45,10	46,27	46,27	46,27	47,06	46,67	47,45
P16	10,59	12,16	12,55	13,33	14,12	14,90	14,90	14,51	15,29	16,08	15,69	16,08
P17	12,16	13,73	13,73	14,90	15,69	19,22	16,47	17,65	17,65	18,82	19,61	20,00
P18	14,12	15,29	15,69	17,25	18,04	18,82	18,04	18,43	19,22	20,00	20,78	21,96
P19	10,20	11,76	12,16	12,55	13,33	14,12	14,51	14,51	15,29	16,47	18,04	17,65
P20	5,88	9,80	7,45	7,45	9,02	9,41	10,59	10,98	15,29	12,16	12,94	17,25
P21	6,27	5,88	5,88	6,67	6,67	7,45	8,24	9,02	10,98	9,80	10,98	10,59
P22	7,84	7,84	8,24	12,55	9,41	10,20	10,59	14,51	12,94	13,33	14,51	14,12
P23	5,88	5,49	6,27	6,27	7,06	7,45	10,98	9,02	10,98	11,76	12,55	10,98
P24	6,67	6,67	8,63	7,06	9,02	9,02	13,73	10,59	14,12	12,94	16,47	13,33
P25	25,88	25,49	29,41	28,24	33,33	32,16	36,08	32,16	37,65	36,08	38,82	37,25
P26	9,80	11,37	14,51	12,55	17,25	16,86	21,96	20,39	27,06	26,67	30,59	26,27
P27	11,37	10,20	13,73	11,76	13,73	14,12	17,25	15,69	19,61	17,65	21,96	18,82
P28	31,37	27,84	32,55	30,98	34,12	33,33	37,25	34,90	39,22	37,65	38,43	39,22
P29	46,27	46,27	47,45	46,67	48,63	47,45	48,63	48,63	47,84	49,02	48,24	50,20
P30	32,16	31,37	33,33	32,94	34,51	34,90	38,04	36,08	39,61	37,25	40,78	39,61
N31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39	0,39	0,39
N32	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N33	0,00	0,00	0,00	1,96	0,00	0,39	0,48	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00
N34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N35	2,35	2,35	1,13	1,18	1,96	1,96	2,75	2,75	3,14	3,14	3,14	3,53
N36	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00
N39	0,78	0,78	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N40	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N41	2,75	3,14	4,71	3,53	3,53	3,53	3,92	3,53	3,92	6,27	4,71	3,92
N42	2,75	1,96	2,35	2,35	0,97	1,23	3,14	3,14	3,92	5,10	4,31	3,92
N43	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N44	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N45	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N46	1,18	0,22	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18	2,35	1,96	3,53	2,75
N47	1,96	0,79	1,96	0,67	0,66	1,96	2,75	2,75	3,14	3,14	3,53	3,14
N48	1,96	0,68	2,35	1,57	1,96	1,96	2,35	1,96	0,00	0,00	0,00	0,00
N49	0,78	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N50	0,35	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,00	0,39
N51	2,75	1,57	1,96	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57	1,18	1,57	0,78
N52	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N53	3,14	2,35	2,75	2,50	0,00	0,00	0,00	1,18	0,67	1,28	5,88	3,53
N54	2,35	1,96	2,75	1,96	0,00	0,00	0,00	1,96	3,53	3,14	4,71	3,92
N55	3,14	2,75	2,75	0,64	0,36	0,31	3,53	3,53	4,31	4,31	5,10	4,71
N56	2,75	0,83	3,53	3,14	3,14	2,75	3,92	3,14	5,10	4,31	6,27	4,71
N57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	1,18	1,18	1,57	0,78	1,18	0,78
N59	2,75	2,35	3,53	3,53	3,53	3,53	4,31	4,31	5,10	4,31	5,10	4,31
N60	2,75	2,35	2,35	1,96	0,68	0,76	1,13	2,75	3,14	3,53	3,92	3,92

Tab. 24 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	4,31	4,71	5,10	5,49	5,49	7,06	6,67	7,45	8,24	9,02	9,41	10,59
P2	10,59	16,08	16,08	17,65	18,04	20,00	18,82	23,14	21,96	24,71	23,92	25,10
P3	9,80	12,94	12,94	14,12	13,73	18,04	14,90	15,69	15,29	17,65	17,25	18,04
P4	5,10	6,67	6,67	8,63	7,84	10,20	9,02	11,37	10,59	12,55	11,37	12,16
P5	6,67	8,24	8,63	9,41	8,63	11,37	9,80	11,76	11,76	12,16	13,33	14,12
P6	3,14	4,71	4,71	5,88	4,71	7,45	7,06	7,84	7,45	8,24	8,63	9,41
P7	7,84	10,59	10,20	11,76	11,37	13,33	12,55	13,73	14,90	17,25	16,86	18,82
P8	18,82	19,61	19,22	20,39	20,78	21,18	20,78	22,35	21,96	22,35	20,78	20,78
P9	25,49	27,84	27,06	28,63	27,84	30,59	28,63	32,16	30,59	32,55	31,76	33,33
P10	3,92	6,67	9,41	8,24	9,80	12,94	12,94	14,90	14,12	15,69	17,65	18,82
P11	18,82	16,47	18,04	20,39	18,43	20,78	19,61	21,18	20,78	21,57	21,57	21,96
P12	5,49	6,67	6,67	8,24	7,45	9,41	9,02	10,20	9,41	11,37	11,37	12,55
P13	10,59	15,29	14,90	16,86	17,65	19,61	20,00	22,35	21,18	23,14	21,96	23,14
P14	14,90	16,47	16,08	16,86	15,69	17,65	17,25	18,82	18,43	20,00	21,18	21,57
P15	42,35	43,92	42,75	44,31	43,92	45,10	45,49	47,45	45,10	45,49	45,49	46,27
P16	7,45	9,41	9,02	10,59	9,80	11,37	11,37	12,55	12,55	14,12	14,12	14,90
P17	13,73	15,29	16,08	17,25	16,47	16,86	18,04	19,61	18,82	19,61	19,22	20,39
P18	12,16	14,51	14,90	16,08	15,29	17,65	16,86	18,04	17,65	18,82	18,43	19,22
P19	9,41	10,20	9,80	11,76	10,59	12,94	12,55	13,73	12,55	14,12	13,33	14,12
P20	7,06	10,98	8,63	9,80	9,41	11,37	11,37	14,12	15,69	14,12	16,08	20,00
P21	4,71	5,49	5,49	5,88	5,88	6,67	6,67	8,24	7,45	7,45	7,45	7,06
P22	6,27	8,24	7,06	7,84	7,45	9,80	9,02	10,98	10,59	12,16	11,37	12,16
P23	4,71	14,90	6,67	15,29	7,06	8,24	7,84	9,41	9,80	10,20	10,59	10,59
P24	1,96	3,53	2,75	3,53	3,53	4,31	4,31	5,10	5,49	5,49	5,49	6,67
P25	6,27	10,98	11,37	13,33	15,29	23,92	23,92	33,73	24,31	27,06	22,35	22,75
P26	3,53	5,10	5,88	7,45	7,84	11,76	11,37	12,16	13,73	17,65	23,92	31,37
P27	6,27	7,84	7,84	9,41	9,02	11,76	10,59	11,76	13,33	19,22	17,25	22,35
P28	19,61	22,75	23,53	24,31	24,31	27,84	27,45	30,98	30,59	30,59	36,86	40,00
P29	41,18	44,71	43,92	43,92	44,31	45,10	45,10	47,84	44,71	46,67	49,41	48,63
P30	21,57	24,71	25,10	25,10	25,88	28,24	28,24	29,80	30,20	31,76	30,59	31,37
N31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N32	1,18	1,96	0,78	0,78	0,39	0,39	0,39	0,00	0,39	0,78	0,39	0,78
N33	0,78	0,39	0,39	3,53	0,00	0,00	0,39	0,78	0,39	0,00	0,71	0,78
N34	0,39	1,18	0,39	0,46	0,00	0,39	0,12	0,39	0,39	0,00	0,00	0,00
N35	1,57	2,35	1,57	1,96	1,57	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	1,96	2,35
N36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N38	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,78	0,39	0,66	0,78	1,18	0,78	1,57
N39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
N40	0,00	0,39	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78	1,57	0,71	0,70	1,57	0,78
N41	5,49	3,92	4,31	3,92	3,92	5,49	4,71	5,88	4,71	5,49	5,10	5,49
N42	2,75	3,53	5,10	3,53	4,31	9,80	4,71	4,31	4,71	5,88	5,49	5,10
N43	0,78	0,78	0,78	0,78	0,39	0,38	0,39	0,78	0,78	1,18	0,78	1,18
N44	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,30	0,78	0,78
N46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00
N47	0,00	0,78	0,39	0,39	0,39	0,78	1,18	1,96	2,35	2,35	2,75	2,35
N48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,78	0,78	0,52	1,18	0,64	0,37	0,35
N49	0,00	0,30	1,18	1,57	0,64	2,75	2,75	2,35	2,35	2,35	2,75	3,53
N50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63
N51	1,96	2,35	2,75	3,14	2,75	3,53	3,53	3,92	3,53	4,31	3,53	3,92
N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26
N53	0,00	0,00	1,57	0,00	0,78	1,18	0,78	1,18	0,78	0,78	0,78	0,78
N54	0,38	1,57	1,57	1,96	1,57	2,35	1,96	1,06	1,96	1,96	1,96	1,06
N55	1,57	2,75	2,35	2,75	2,35	3,14	3,53	5,49	4,71	4,71	4,31	4,31
N56	0,39	1,18	0,72	1,18	0,67	1,96	3,14	2,75	2,75	3,14	2,75	2,75
N57	0,30	0,78	0,78	0,66	1,18	1,18	1,57	1,57	3,14	2,75	1,96	1,96
N58	0,07	0,35	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78	1,18	0,78	0,49	0,00	0,00
N59	0,39	1,57	1,96	2,75	2,75	3,53	2,75	2,35	3,14	2,75	1,96	2,35
N60	1,18	1,96	1,57	2,35	1,96	2,35	2,35	1,90	1,96	1,57	1,57	1,96

Tab. 25 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2300.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	9,02	10,59	10,98	12,16	10,59	13,33	12,55	13,33	13,73	15,29	14,51	15,29
P2	22,35	25,88	27,84	29,02	31,37	32,94	34,51	35,69	34,90	36,86	36,86	37,25
P3	12,94	16,47	16,86	19,22	19,22	21,18	20,78	23,53	24,31	25,49	26,27	29,02
P4	10,20	12,55	12,16	12,55	12,16	12,94	13,73	14,90	15,29	16,47	16,47	16,08
P5	10,59	13,73	14,51	14,12	13,73	16,08	14,90	16,47	17,25	18,82	20,00	19,61
P6	7,45	8,63	8,63	8,63	9,02	10,20	11,76	14,51	15,29	14,90	13,73	13,73
P7	13,73	15,69	15,29	16,86	16,08	17,65	18,04	18,43	19,22	20,39	20,39	20,39
P8	27,84	25,88	25,49	26,27	25,49	25,88	26,27	27,06	27,45	28,24	28,24	27,84
P9	27,45	28,63	30,20	30,59	30,98	31,37	32,55	33,73	34,12	33,33	34,90	34,51
P10	32,16	36,08	41,96	40,00	41,18	41,96	43,53	41,18	42,75	42,75	43,14	44,31
P11	22,35	24,31	23,14	25,10	23,53	24,31	24,31	23,53	23,92	25,10	24,31	24,71
P12	9,41	10,98	11,37	11,76	11,37	12,16	12,94	13,73	14,12	14,90	15,69	16,08
P13	11,76	12,94	15,29	16,86	16,08	18,43	18,04	18,82	20,39	20,39	21,96	22,75
P14	18,43	20,39	21,18	21,57	21,96	23,53	23,92	24,31	25,49	25,49	26,67	25,88
P15	49,80	50,20	50,98	49,80	50,20	50,59	50,98	50,59	51,37	50,98	50,98	51,37
P16	14,51	16,47	16,47	16,08	16,47	16,86	16,86	15,69	16,86	18,04	18,82	19,61
P17	18,43	20,78	21,57	23,14	22,35	23,14	23,53	24,71	25,10	25,49	26,27	27,06
P18	14,90	16,47	18,04	18,82	18,82	19,22	20,00	20,00	20,39	20,00	21,18	21,18
P19	14,90	16,86	16,08	16,86	16,86	17,65	17,65	17,65	18,04	18,04	19,61	19,61
P20	11,37	13,33	15,69	14,90	15,29	16,86	16,47	16,47	18,04	18,04	18,82	20,39
P21	10,59	11,76	11,37	10,20	10,98	11,37	11,76	11,37	10,98	11,76	11,76	12,94
P22	11,37	12,94	14,12	14,51	14,12	14,90	16,08	15,69	17,25	17,65	18,04	17,65
P23	7,84	9,41	9,41	10,59	9,41	10,59	10,20	11,76	11,76	12,16	12,16	12,55
P24	5,49	8,24	8,24	8,63	9,02	10,59	12,16	11,76	12,94	12,94	14,51	14,12
P25	10,59	13,33	16,86	16,47	20,00	20,78	20,39	20,39	21,57	22,75	23,53	24,31
P26	27,84	30,98	34,90	32,94	36,47	38,43	39,22	37,65	38,82	41,57	39,61	40,78
P27	9,41	12,94	12,55	12,94	13,73	16,08	16,08	16,86	18,04	19,61	20,00	18,82
P28	25,10	27,45	29,02	28,63	30,59	29,80	31,37	31,76	31,76	31,37	32,55	31,76
P29	47,84	49,02	49,41	49,02	49,02	48,24	49,02	48,63	48,63	48,63	48,24	48,63
P30	23,92	25,88	27,06	28,24	28,24	29,41	29,80	30,20	30,20	30,20	30,20	30,59
N31	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N33	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	0,78	1,96	0,00	0,00	0,00	0,78	0,00
N34	0,39	1,18	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78
N35	0,39	1,96	0,78	1,18	1,18	1,57	1,57	1,96	1,57	1,57	1,57	1,57
N36	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N37	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,39	0,39	0,78	0,78	0,78
N38	0,34	1,57	0,78	0,78	0,78	0,39	0,39	0,39	0,78	0,78	1,57	0,79
N39	0,34	2,35	0,35	0,78	0,78	1,18	1,18	0,69	1,18	1,18	1,57	1,57
N40	0,00	0,35	0,39	0,78	0,78	1,18	1,18	2,35	1,57	1,57	1,96	1,96
N41	2,27	7,84	3,53	3,53	5,88	4,31	4,71	4,31	3,92	5,10	4,31	4,71
N42	3,53	5,10	4,71	5,10	6,27	6,27	5,88	6,27	5,49	6,27	6,67	6,67
N43	0,78	1,96	1,18	1,57	1,57	1,96	1,57	1,96	1,57	1,96	1,17	0,67
N44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39	0,78	0,34	0,54	0,68	0,64
N45	0,00	0,78	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N46	0,39	0,71	0,39	0,78	0,39	0,78	1,18	1,18	0,72	1,18	1,96	1,57
N47	0,00	1,18	0,39	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	1,18	1,18	1,96	1,96
N48	0,15	0,61	0,00	0,29	0,00	0,00	0,78	0,78	0,78	0,78	0,35	0,35
N49	1,18	2,35	1,18	1,18	0,78	1,18	1,18	1,18	1,18	1,96	2,75	3,53
N50	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,34
N51	2,75	3,53	3,53	3,14	3,53	3,53	4,31	4,71	5,10	5,49	6,67	5,88
N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N53	0,00	1,57	0,78	1,96	1,57	1,96	1,57	1,57	1,96	2,35	3,53	3,14
N54	2,75	3,53	2,75	2,75	3,14	3,14	4,31	4,31	5,49	5,49	6,67	6,67
N55	2,35	3,53	2,75	3,53	3,14	3,92	4,31	3,92	4,71	5,10	5,10	5,10
N56	2,75	3,14	5,10	2,75	3,53	4,31	5,49	5,49	6,27	7,06	7,45	7,06
N57	0,39	1,96	0,78	0,39	0,78	1,18	1,18	1,18	1,57	1,96	2,35	2,35
N58	0,00	1,18	0,00	0,78	0,00	0,00	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,78
N59	1,57	2,35	1,57	3,14	2,35	2,75	3,14	3,53	3,92	3,92	4,31	4,31
N60	3,53	4,31	4,71	3,92	3,53	3,92	4,71	4,71	5,49	5,88	6,27	6,27

Tab. 26 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	5,49	6,67	6,67	7,06	7,06	7,84	8,63	9,02	9,80	10,20	10,59	9,80
P2	20,39	23,14	25,88	27,45	29,02	30,59	30,98	32,94	33,73	35,69	35,69	36,47
P3	12,94	14,51	16,08	16,47	18,04	18,43	20,39	20,78	20,78	21,18	22,75	22,35
P4	6,27	7,84	7,84	8,24	8,63	9,41	10,59	10,20	10,59	10,59	11,37	12,16
P5	8,24	10,20	10,98	11,37	12,16	12,55	13,33	13,73	14,90	16,08	17,65	16,86
P6	5,88	7,06	6,67	6,27	7,45	7,84	8,24	7,84	9,41	9,02	10,59	9,80
P7	11,37	12,94	13,33	13,73	14,12	14,90	15,29	15,69	16,86	16,86	17,65	17,65
P8	21,57	21,57	20,39	21,57	21,18	24,71	23,53	24,31	27,45	25,10	25,10	25,10
P9	29,02	29,41	29,80	30,98	30,59	32,55	32,16	32,55	32,16	33,33	33,33	33,33
P10	27,06	30,20	33,73	36,86	40,39	40,39	41,96	42,35	43,14	44,71	43,92	46,27
P11	15,69	18,04	20,78	19,22	19,61	20,39	20,00	19,61	19,61	20,00	20,39	20,00
P12	7,06	7,84	7,45	8,24	8,63	9,41	10,20	11,37	11,76	12,55	12,16	12,55
P13	10,20	12,55	14,51	15,69	17,25	17,65	18,82	17,65	19,61	19,22	19,61	19,61
P14	14,51	16,08	14,90	16,08	15,69	17,25	17,65	17,65	18,04	18,04	17,25	17,65
P15	44,71	45,88	45,49	46,67	45,88	46,67	45,49	45,88	44,71	45,88	43,53	44,31
P16	11,37	11,37	10,98	10,59	11,37	12,16	12,16	11,37	12,55	11,76	12,94	12,55
P17	14,90	16,47	16,08	16,47	16,47	19,61	18,04	18,43	18,82	19,22	18,82	19,61
P18	15,69	17,25	16,08	18,04	15,69	17,25	17,25	17,65	17,65	18,43	18,82	18,82
P19	12,16	13,33	12,94	12,94	13,73	14,12	15,29	14,90	16,47	16,08	25,88	28,63
P20	9,02	9,80	9,41	9,80	10,98	12,16	14,90	13,73	16,08	22,35	17,25	18,43
P21	7,45	8,24	7,45	8,24	7,45	8,63	8,63	9,80	9,80	11,37	12,55	10,20
P22	7,84	9,02	9,80	9,41	10,59	11,76	12,94	12,94	14,51	14,12	15,69	15,29
P23	6,67	8,63	7,45	11,76	8,63	8,63	10,20	9,80	10,59	10,98	14,51	12,16
P24	4,31	5,49	5,49	5,88	5,88	7,45	7,84	8,63	8,24	10,98	9,80	9,80
P25	9,02	10,20	14,90	21,57	14,51	19,22	17,65	19,22	20,00	22,75	23,14	22,75
P26	29,02	34,12	39,22	40,78	42,35	42,35	44,71	45,10	46,67	49,41	47,84	48,24
P27	5,88	9,41	9,02	9,41	9,80	10,20	11,37	12,55	12,55	14,12	13,73	14,51
P28	16,47	20,39	20,39	23,14	23,53	22,35	25,49	25,49	26,67	27,06	27,06	27,45
P29	30,98	38,43	38,43	43,92	44,31	47,06	44,71	45,88	45,10	46,67	41,57	46,27
P30	18,04	20,39	20,39	21,96	22,75	24,31	25,88	25,49	25,88	27,06	26,27	27,84
N31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N33	0,00	0,37	0,33	0,97	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	4,71	0,00
N34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78	0,78	0,39	0,39
N35	0,00	0,39	0,39	1,18	1,18	1,57	1,57	3,53	3,92	2,75	1,57	1,57
N36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N37	1,18	1,18	0,78	1,96	0,39	0,78	1,18	1,57	1,57	1,57	1,57	1,18
N38	1,18	1,18	0,78	1,18	1,18	1,57	1,57	1,57	1,18	1,18	1,57	1,96
N39	0,39	0,78	0,78	1,18	0,78	1,18	0,39	1,57	1,18	1,18	1,18	1,18
N40	1,18	1,57	1,18	1,57	1,18	1,18	0,78	1,57	1,57	2,35	1,57	1,57
N41	2,75	2,75	2,35	2,75	1,96	2,35	2,35	3,14	3,14	3,53	3,53	3,53
N42	2,35	2,75	2,35	3,14	3,14	3,92	3,53	4,31	3,92	5,10	5,10	5,10
N43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39	0,39	0,78
N44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,39	0,39	0,39
N45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N46	1,18	1,18	0,78	1,18	0,78	1,18	0,78	0,39	0,00	0,39	0,00	0,78
N47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	1,18	1,18	1,96	1,96	2,35	2,35	2,75
N48	0,00	0,78	0,39	0,39	0,00	0,78	0,35	0,71	0,69	1,96	1,96	1,96
N49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,64
N50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,39	1,11
N51	0,00	1,57	0,35	0,67	0,30	1,06	1,96	2,75	3,53	4,31	4,71	5,49
N52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N53	0,00	0,00	0,00	1,57	0,00	1,43	0,12	0,39	0,39	1,57	0,68	1,96
N54	0,39	0,78	0,78	1,18	0,78	1,96	1,18	1,96	1,96	2,75	2,35	2,75
N55	1,96	3,14	2,35	2,75	1,57	4,31	2,75	3,14	2,75	3,14	3,92	4,71
N56	0,78	1,57	1,18	1,96	1,57	2,75	2,35	3,53	3,53	5,10	5,10	5,49
N57	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,39	0,00	0,39	0,39	1,18	0,78	0,78
N58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N59	0,78	1,18	0,78	1,18	1,18	1,57	1,57	2,35	2,35	3,14	3,14	3,53
N60	0,78	1,18	0,78	1,57	1,57	2,35	1,96	3,53	2,75	2,75	2,35	2,35

Po určení vybraných koncentrací antigenu PBP2a a konjugátu IgG a následné detekci a po vyhodnocení hodnot intenzity zabarvení linií byla vypočítána diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda (Tab. 27–38). Vhodné koncentrace antigenu a konjugátu jsou takové, při kterých je diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda co nejbližší hodnotě 100 % a počet hraničních výsledků je co nejnižší.

Tab. 27 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,25 mg/ml**.

	Koncentrace konjugátu IgG								
	1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500	
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	29	27	29	8	9	16	13
Hraniční	0	0	1	3	1	16	12	13	15
Negativní	0	0	0	0	0	6	9	1	2
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	23	13	24	2	0	0	0	0
Negativní	30	5	17	6	28	30	30	30	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	57,14%	50,00%	94,12%	86,67%	
Shoda neg. výsledků (specifita)	71,43%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	
Celk. diagn. shoda (efektivita)	85,71%	100,00%	100,00%	100,00%	78,57%	75,00%	97,06%	93,33%	

Tab. 28 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,28 mg/ml**.

	Koncentrace konjugátu IgG							
	1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků								
Pozitivní	30	30	29	30	11	13	20	15
Hraniční	0	0	1	0	14	12	10	14
Negativní	0	0	0	0	5	5	0	1
Referen. panel neg. vzorků								
Pozitivní	0	25	2	1	1	0	0	0
Hraniční	0	5	24	21	21	0	1	0
Negativní	30	0	4	8	8	30	29	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	68,75%	72,22%	100,00%	93,75%
Shoda neg. výsledků (specifita)	0,00%	66,67%	88,89%	88,89%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)	50,00%	83,33%	94,44%	94,44%	84,38%	86,11%	100,00%	96,88%

Tab. 29 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,30 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	28	30	15	12	22	17
Hraniční	0	0	0	2	0	11	14	8	12
Negativní	0	0	0	0	0	4	4	0	1
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	6	2	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	21	14	8	6	0	0	0	0
Negativní	30	3	14	22	24	30	30	30	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	78,95%	75,00%	100,00%	94,44%
Shoda neg. výsledků (specifita)		33,33%	87,50%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		66,67%	93,75%	100,00%	100,00%	89,47%	87,50%	100,00%	97,22%

Tab. 30 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,33 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	28	30	14	15	22	17
Hraniční	0	0	0	2	0	13	13	8	13
Negativní	0	0	0	0	0	3	2	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	9	2	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	20	16	9	6	0	0	0	0
Negativní	30	1	12	21	24	30	30	30	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	82,35%	88,24%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		10,00%	85,71%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		55,00%	92,86%	100,00%	100,00%	91,18%	94,12%	100,00%	100,00%

Tab. 31 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,35 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	28	30	16	14	23	18
Hraniční	0	0	0	2	0	12	13	7	12
Negativní	0	0	0	0	0	2	3	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	10	2	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	19	16	9	7	0	0	2	0
Negativní	30	1	12	21	23	30	30	28	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	88,89%	82,35%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		9,09%	85,71%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		54,55%	92,86%	100,00%	100,00%	94,44%	91,18%	100,00%	100,00%

Tab. 32 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,38 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	29	30	18	15	24	18
Hraniční	0	0	0	1	0	11	14	6	12
Negativní	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	12	3	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	17	16	10	9	0	1	1	0
Negativní	30	1	11	20	21	30	29	29	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	94,74%	93,75%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		7,69%	78,57%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		53,85%	89,29%	100,00%	100,00%	97,37%	96,88%	100,00%	100,00%

Tab. 33 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,40 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	29	30	19	14	24	20
Hraniční	0	0	0	1	0	10	15	6	10
Negativní	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	13	3	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	17	17	9	8	0	0	1	0
Negativní	30	0	10	21	22	30	30	29	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	95,00%	93,33%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	76,92%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	88,46%	100,00%	100,00%	97,50%	96,67%	100,00%	100,00%

Tab. 34 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,43 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	29	30	19	18	27	20
Hraniční	0	0	0	1	0	11	11	3	10
Negativní	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	12	3	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	18	16	9	10	0	1	1	0
Negativní	30	0	11	21	20	30	29	29	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	94,74%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	78,57%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	89,29%	100,00%	100,00%	100,00%	97,37%	100,00%	100,00%

Tab. 35 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,45 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	29	30	21	19	27	21
Hraniční	0	0	0	1	0	9	10	3	9
Negativní	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	12	3	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	18	18	10	9	0	0	1	0
Negativní	30	0	9	20	21	30	30	29	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	95,00%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	75,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	87,50%	100,00%	100,00%	100,00%	97,50%	100,00%	100,00%

Tab. 36 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,48 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	29	30	20	21	27	22
Hraniční	0	0	0	1	0	10	8	3	8
Negativní	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	14	4	0	0	0	0	0	0
Hraniční	0	16	17	10	11	1	1	3	0
Negativní	30	0	9	20	19	29	29	27	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	95,45%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	69,23%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	84,62%	100,00%	100,00%	100,00%	97,73%	100,00%	100,00%

Tab. 37 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,50 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	30	30	21	22	28	23
Hraniční	0	0	0	0	0	9	7	2	7
Negativní	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	14	3	3	0	0	0	0	0
Hraniční	0	16	20	8	12	2	0	5	0
Negativní	30	0	7	19	18	28	30	25	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	95,65%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	70,00%	86,36%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	85,00%	93,18%	100,00%	100,00%	97,83%	100,00%	100,00%

Tab. 38 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu **0,52 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgG							
		1:700	1:1000	1:1500	1:1700	1:1800	1:2000	1:2300	1:2500
Referen. panel poz. vzorků									
Pozitivní	30	30	30	30	30	22	22	28	22
Hraniční	0	0	0	0	0	8	8	2	8
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Referen. panel neg. vzorků									
Pozitivní	0	16	4	0	1	0	0	0	0
Hraniční	0	14	17	11	11	0	0	5	0
Negativní	30	0	9	19	18	30	30	25	30
Shoda poz. výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda neg. výsledků (specifita)		0,00%	69,23%	100,00%	94,74%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celk. diagn. shoda (efektivita)		50,00%	84,62%	100,00%	97,37%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Z výsledků celkové diagnostické shody (Tab. 27–38) je patrné, že 100% efektivita se vždy pohybuje kolem ředění konjugátu IgG 1:1500–1:1800. I při ředění konjugátu IgG 1:2300 a 1:2500 je efektivita také 100%, ale klesá počet pozitivních výsledků v panelu referenčních pozitivních sér a stoupá počet hraničních výsledků. Z toho vyplývá, že tyto

koncentrace konjugátu lze považovat za nevhodné. Naopak koncentrace konjugátu silnější než 1:1500 (tzn. 1:1000 a 1:700) ukazují pozitivitu i u některých referenčních negativních vzorků, což znamená, že tyto koncentrace nejsou vhodné. Jako nejvhodnější se u titrace č. 2 jeví koncentrace konjugátu 1:1700, kdy je efektivita analýzy pro vybrané koncentrace antigenu téměř vždy 100% (Tab. 22). Vyhodnocovací protokoly pro koncentraci konjugátu IgG 1:1700 jsou pro názornost přiloženy k této práci (Příloha č. 1–4).

Nejvhodnější koncentrace antigenu PBP2a se u této titrace ukazuje koncentrace v rozmezí 0,30–0,35 mg/ml, kdy všechny referenční pozitivní vzorky dávají pozitivní výsledek a u referenčních negativních vzorků je nejmenší počet hraničních výsledků. Lze konstatovat, že jako vhodné pro výrobu soupravy IgG se jeví koncentrace antigenu PBP2a od 0,30 mg/ml do 0,45 mg/ml (Tab. 29–35) a koncentrace konjugátu IgG v rozmezí 1:1500–1:1800.

Získané výsledky nám ukázaly, že stejně jako u úvodní titrace lze říci, že koncentrace nižší než 0,25 mg/ml se jeví jako nevhodné, protože specifita výsledků je velmi nízká. Vyšší koncentrace antigenu než 0,45 mg/ml se projevují také jako nevhodné, protože při těchto vyšších koncentracích se počet negativních výsledků v panelu referenčních negativních vzorků snižuje a počet hraničních výsledků se zvyšuje.

Z hodnocení titrace č. 1 vyplývá, že by bylo vhodné pro výrobu soupravy použití koncentrace antigenu PBP2a 0,25 mg/ml, při použití koncentrace konjugátu IgG 1:1000 a titrace č. 2 ukazuje jako nejvhodnější koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí 0,30–0,35 mg/ml, při použití koncentrace konjugátu IgG 1:1700. Z rozdílnosti analýz výsledků titrace č. 1 a č. 2 se dají konstatovat určitá pravidla pro výrobu blot-line soupravy pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a. Před každou výrobou nové šarže se na zkušební nitrocelulózovou membránu nanese různé koncentrace antigenu PBP2a v daném rozmezí (tj. v tomto případě koncentrace antigenu 0,25–0,45 mg/ml). Na panelu referenčních sér se provede optimalizovaná detekce s použitím nejvhodnější koncentrace konjugátu IgG (tj. v tomto případě koncentrace 1:1700). Následně se vybere nejvhodnější koncentrace antigenu PBP2a, která se nanese na všechny výrobní karty s nitrocelulózovou membránou. K této koncentraci antigenu se poté vytitruje, s použitím panelu referenčních sér vhodný konjugát IgG, přičemž se budou zkoušet koncentrace v rozmezí 1:1000–1:1800. Tato nepsaná pravidla platí obecně pro všechny soupravy blot-line a potvrdila se i v tomto případě.

5.4 Charakteristika metody pro třídu imunoglobulinů IgG

5.4.1 Opakovatelnost

Bylo provedeno šestnáct detekcí optimalizovanou metodou blot-line v jednom dni (20.3.2017) na stejném přístroji a stejným operátorem. Detekce byla provedena se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P29), hraniční (N42) a negativní (N52). Konjugát IgG byl použit o koncentraci 1:1700, opakovatelnost byla sledována pro koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí 0,30–0,45 mg/ml (celkem sedm koncentrací). Tyto vybrané koncentrace antigenu a konjugátu byly zvoleny na základě výsledků titrace č. 2.

Tab. 39 Tabulka opakovatelnosti výsledků pro konjugát IgG 1:1700.

Číslo měření	Vzorek P29							Vzorek N42							Vzorek N52													
	Hodnota intenzity zabarvení linie [a.u.], pro vybrané koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]																											
	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45							
1	31,76	35,69	32,16	35,69	35,69	37,65	36,86	6,67	9,41	7,06	9,80	7,45	10,20	9,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
2	32,94	38,04	35,69	38,82	37,65	40,78	42,75	6,67	9,80	7,84	10,20	8,63	10,98	10,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
3	33,73	34,51	35,29	38,82	36,86	39,22	36,86	8,63	9,80	9,02	11,37	8,63	10,98	9,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
4	27,06	31,37	28,63	33,33	30,98	33,33	31,76	8,24	11,37	9,41	12,16	10,59	12,55	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
5	34,51	39,22	36,08	39,22	37,25	39,61	38,04	5,49	7,84	7,45	10,98	8,63	10,20	8,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
6	29,80	33,73	31,76	36,08	34,90	38,43	36,86	7,84	10,59	9,41	11,76	10,20	14,12	12,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
7	30,98	33,73	32,16	35,69	34,90	38,04	36,47	6,67	11,37	7,84	11,76	9,80	11,76	10,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
8	36,47	38,82	37,25	41,57	39,61	42,75	41,96	10,20	12,16	10,59	13,33	14,90	14,51	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
9	36,86	41,18	37,65	41,18	38,82	41,57	39,22	10,59	12,55	11,37	13,33	12,94	14,90	14,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
10	32,55	36,47	33,73	38,04	36,47	39,61	38,43	9,80	12,16	10,98	13,73	12,55	14,90	13,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
11	36,86	41,96	39,22	42,75	39,61	42,75	40,39	10,20	12,55	10,98	13,73	12,16	14,12	13,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
12	38,82	42,35	40,78	43,53	42,75	44,71	40,78	9,02	11,37	10,59	13,73	12,55	14,12	12,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
13	37,65	41,18	38,82	42,35	40,00	41,57	38,43	8,63	9,80	9,02	11,37	11,37	12,16	12,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
14	34,51	38,82	36,08	39,22	37,65	40,00	38,04	10,59	13,33	10,98	13,73	12,55	13,73	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
15	35,69	40,00	37,25	40,00	39,61	40,39	38,43	8,63	9,80	9,02	10,20	9,02	10,98	11,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						
16	36,86	40,78	37,65	43,14	41,18	43,92	41,57	10,98	12,55	10,98	13,73	12,16	14,51	13,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00						

Tab. 40 Tabulka pro opakovatelnost IgG, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchytky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchytky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.

	Vzorek P29							Vzorek N42							Vzorek N52								
Počet testů	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Průměrná intenzita [a.u.]	34,19	37,99	35,64	39,34	37,75	40,27	38,55	8,68	11,03	9,53	12,18	10,88	12,79	11,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Směrodatná odchytky	3,20	3,36	3,22	3,02	2,85	2,76	2,67	1,67	1,51	1,44	1,44	2,07	1,75	1,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Variační koeficient [%]	9,35	8,85	9,03	7,69	7,56	6,86	6,92	19,24	13,67	15,07	11,84	19,05	13,66	14,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Směrodatná odchytky pro celý rozsah	1,99																						
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	10,09																						

Z výsledků se vypočítala hodnota průměrné intenzity zabarvení linií, směrodatná odchytky a variační koeficient pro jednotlivá měření. Dále se vypočítala směrodatná odchytky pro celý rozsah, která je 1,99 a variační koeficient pro celý rozsah, který činí 10,09 %, (Tab. 40). Těsnost shody opakovaného vyšetření téhož vzorku je vyjádřena variačním koeficientem, variační koeficient je matematické vyjádření míry shody mezi výsledky (neboli rozptylu výsledků). Variační koeficient daného stanovení by měl být do 15 %. Pokud je variační koeficient vyšší, je nutno stanovení opakovat, neboť výsledky nejsou dostatečně přesné. Z toho lze usuzovat, že preciznost metody za podmínek opakovatelnosti je dostačující.

5.4.2 Reprodukovatelnost

Bylo provedeno šestnáct detekcí optimalizovanou metodou blot-line v časovém rozmezí od 27.2.2017 do 20.3.2017 (Tab. 41), s použitím čtyř šarží komponent, na dvou různých zařízeních a třemi různými operátory. Detekce byla provedena se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P29), hraniční (N42) a negativní (N52). Konjugát IgG byl použit o koncentraci 1:1700, reprodukovatelnost byla sledována pro koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí 0,30–0,45 mg/ml (celkem sedm koncentrací). Tyto vybrané koncentrace antigenu a konjugátu byly zvoleny na základě výsledků titrace č. 2.

Tab. 41 Tabulka reprodukovatelnosti výsledků pro konjugát IgG 1:1700.

Datum měření, číslo měření	Vzorek P29							Vzorek N42							Vzorek N52							
	Hodnota intenzity zabarvení linie [a.u.], pro vybrané koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]																					
	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	
27.2.2017	1	33,73	36,86	32,16	36,86	34,90	35,69	34,51	8,63	10,59	9,02	11,76	10,59	12,16	11,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28.2.2017	2	32,94	37,25	33,73	36,47	34,90	38,04	36,47	9,80	11,37	9,80	11,76	10,59	11,76	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.3.2017	3	39,22	40,39	38,43	40,39	38,82	39,61	39,22	9,41	10,59	9,02	10,98	9,80	11,37	10,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.3.2017	4	36,47	39,22	37,25	40,00	38,04	39,22	38,82	9,80	10,98	10,59	12,55	11,76	12,94	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3.3.2017	5	35,29	37,25	35,29	37,25	35,29	37,65	37,65	8,24	10,20	9,02	10,59	9,80	10,59	10,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5.3.2017	6	39,22	40,78	40,00	41,18	41,18	43,14	40,39	10,20	10,59	10,59	10,59	11,37	12,94	12,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.3.2017	7	34,90	37,65	33,33	35,69	32,94	35,69	33,33	5,88	7,45	6,67	8,24	7,84	8,24	7,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8.3.2017	8	34,12	36,47	36,08	38,82	38,04	39,22	39,61	8,24	9,80	9,41	10,98	11,76	11,37	10,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9.3.2017	9	36,86	40,00	37,25	39,22	39,61	41,57	40,00	8,63	10,20	9,41	10,98	10,59	11,76	11,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10.3.2017	10	36,47	39,61	36,08	38,82	37,65	39,61	38,04	9,80	10,98	10,20	11,76	11,76	13,33	12,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12.3.2017	11	38,43	40,00	39,22	41,18	40,78	41,57	39,61	9,02	9,80	9,41	10,59	10,20	10,59	11,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14.3.2017	12	38,43	40,78	39,61	41,57	40,78	42,75	41,96	10,20	10,98	10,20	11,37	11,76	12,94	14,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15.3.2017	13	34,12	35,29	32,55	34,12	34,12	36,08	34,90	7,06	7,84	7,06	8,24	8,63	8,63	9,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17.3.2017	14	38,04	38,82	35,29	39,22	39,61	40,39	40,39	7,06	8,63	8,24	9,41	9,80	12,16	10,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18.3.2017	15	37,25	39,61	39,22	40,39	41,18	41,96	41,57	7,45	7,84	7,06	7,84	8,63	8,24	8,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20.3.2017	16	30,98	33,33	33,33	33,73	33,73	34,51	34,90	7,45	7,45	7,84	8,63	8,63	9,41	10,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 42 Tabulka pro reprodukovatelnost IgG, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.

	Vzorek P29							Vzorek N42							Vzorek N52							
Počet testů	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Průměrná intenzita [a.u.]	36,03	38,33	36,18	38,43	37,60	39,17	38,21	8,55	9,71	8,97	10,39	10,22	11,15	11,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka	2,42	2,14	2,65	2,48	2,88	2,69	2,66	1,30	1,38	1,26	1,47	1,29	1,72	1,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Variační koeficient [%]	6,72	5,58	7,33	6,46	7,66	6,88	6,96	15,18	14,27	14,09	14,12	12,65	15,41	15,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	1,71																					
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	9,23																					

Z výsledků se vypočítala hodnota průměrné intenzity zabarvení linií, směrodatná odchylka a variační koeficient pro jednotlivá měření. Dále se vypočítala směrodatná odchylka

pro celý rozsah, která je 1,71 a variační koeficient pro celý rozsah, který činí 9,23 % (Tab. 42). Variační koeficient pro celý rozsah vyjadřuje analytickou preciznost v rámci stanovení. Variační koeficient daného stanovení by měl být do 15 %. Pokud je variační koeficient vyšší, je nutno stanovení opakovat, neboť výsledky nejsou dostatečně přesné. Z toho lze usuzovat, že výsledky preciznosti metody za podmínek reprodukovatelnosti jsou výborné a nastavená metoda splňuje požadovaná kritéria.

5.5 Titrace antigenu č. 3, pro třídu imunoglobulinů IgM

Titrace č. 3 byla provedena ve třídě imunoglobulinů IgM. Tato třída je dominantní třídou imunoglobulinů v primární imunitní odpovědi. Jejich koncentrace po několik týdnů stoupá a pak klesá, zatímco nastupuje tvorba IgG. Rekombinantní antigen PBP2a ($c = 0,59$ mg/ml) byl naředěn na dvanáct koncentrací: $c = 0,25; 0,28; 0,30; 0,33; 0,35; 0,38; 0,40; 0,43; 0,45; 0,48; 0,50; 0,52$ mg/ml v dialyzačním Tris pufru, na konečný objem 160,0 μ l. Tyto koncentrace byly nanášeny na nitrocelulóзовou membránu. Poté byla provedena detekce stripů pomocí optimalizované metody blot-line. Bylo testováno šedesát vzorků lidské plazmy, referenční pozitivní vzorky byly označeny P1 – P30 a referenční negativní vzorky byly označeny N31 – N60. Použitá koncentrace konjugátu IgM byla 1:1000, při této koncentraci lze již předpokládat pozitivitu u vzorů plazem pacientů s akutním onemocněním (Tab. 43).

Tab. 43 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgM 1:1000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P1	0,39	0,78	0,78	0,00	0,78	0,39	0,00	0,78	0,39	0,78	0,39	0,00
P2	1,18	1,18	1,18	0,00	2,35	3,14	0,00	3,14	5,49	3,14	4,71	0,00
P3	1,18	1,57	2,35	2,35	1,96	1,06	0,00	2,35	2,75	2,75	2,35	0,00
P4	1,57	1,18	1,96	0,39	1,57	2,75	0,00	2,75	2,35	2,35	2,35	0,39
P5	1,96	1,96	1,96	1,18	2,35	2,35	0,39	0,39	2,75	1,96	3,53	0,00
P6	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P7	2,75	2,35	2,75	0,00	3,53	3,53	0,00	5,49	4,31	4,71	4,71	0,00
P8	2,35	3,14	3,14	0,39	3,92	4,31	0,39	4,71	3,92	4,31	4,71	0,39
P9	1,18	1,57	1,57	0,39	1,57	2,35	0,39	2,35	1,96	2,35	2,75	0,00
P10	1,96	1,57	2,35	0,78	2,75	2,35	0,00	2,35	2,75	3,14	3,14	0,39
P11	0,00	0,39	0,65	0,31	0,78	1,18	0,00	0,78	0,78	0,39	0,78	0,00
P12	0,39	0,39	0,39	0,00	0,39	0,39	0,00	0,39	0,39	0,00	0,39	0,00
P13	1,18	1,57	1,18	0,00	1,57	1,18	0,39	1,57	1,96	1,18	1,57	0,00
P14	1,57	0,39	1,18	0,39	1,18	1,18	0,00	1,18	1,18	1,18	0,78	0,00
P15	0,78	0,78	0,78	0,00	0,78	1,18	0,00	1,18	1,18	1,18	1,57	0,00
P16	0,39	2,75	0,31	3,53	0,39	1,18	0,00	1,18	0,39	4,71	1,57	0,39
P17	1,96	2,35	2,35	0,39	2,75	3,14	0,00	0,00	3,14	3,53	3,53	0,39
P18	1,57	1,57	1,57	0,00	1,96	1,57	0,00	2,75	1,96	1,96	2,75	0,00
P19	0,78	0,78	0,39	0,00	0,39	0,78	0,00	0,36	1,18	1,96	1,57	0,00
P20	1,18	3,53	1,96	0,00	2,35	0,00	1,18	0,39	3,53	0,00	2,75	0,39
P21	0,78	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39	0,78	0,00	0,39	0,00	0,39	0,00
P22	1,57	1,18	1,57	0,00	1,96	1,96	0,39	2,35	2,35	2,75	2,35	0,00
P23	1,18	0,00	3,92	4,71	1,57	5,10	0,00	0,00	0,78	0,39	2,35	0,00
P24	0,78	0,78	0,78	0,00	0,78	1,57	0,00	1,18	1,18	1,57	1,18	0,00
P25	0,78	0,78	0,39	0,00	0,39	0,39	0,00	0,78	1,18	1,57	1,18	0,00
P26	1,96	3,14	3,14	0,39	2,75	3,14	0,00	3,53	3,92	4,31	5,49	2,35
P27	1,57	1,96	1,96	0,00	2,35	3,14	0,39	3,92	3,14	3,53	3,53	0,00
P28	1,18	1,57	2,35	2,35	1,96	1,96	0,39	2,35	2,75	2,35	2,75	0,00
P29	1,96	1,96	3,14	0,00	3,53	3,14	0,00	4,31	3,92	4,31	3,53	0,78
P30	2,35	3,14	3,53	0,00	3,53	3,53	0,00	3,92	4,31	5,10	5,10	0,00
N31	0,78	0,00	0,00	0,00	0,78	0,39	0,00	0,78	0,78	0,78	0,78	0,00
N32	1,18	1,18	1,18	0,39	2,35	2,35	0,39	1,96	2,75	2,35	2,35	0,00
N33	1,18	0,78	0,78	2,35	0,39	4,71	0,39	0,00	1,18	1,57	1,18	0,00
N34	0,39	0,39	0,00	0,00	0,78	0,78	0,78	0,39	0,00	0,39	0,39	0,00
N35	2,35	2,35	2,35	0,00	3,92	2,75	0,00	3,53	3,14	3,53	3,14	0,00
N36	0,78	1,18	0,78	0,00	1,18	0,00	0,00	1,57	1,57	1,57	1,57	0,00
N37	0,78	0,78	0,78	0,39	1,57	1,18	0,00	0,00	0,78	1,18	1,18	0,00
N38	1,57	1,57	0,78	0,39	2,35	1,18	0,00	0,00	1,57	1,18	1,18	0,00
N39	1,96	0,78	0,78	0,00	1,57	1,57	0,39	0,78	1,18	0,00	1,18	0,00
N40	0,39	0,39	0,78	0,00	0,39	1,18	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78	0,39
N41	3,14	0,78	1,96	0,00	1,57	0,00	0,00	0,00	2,35	1,57	1,57	0,39
N42	0,78	0,39	0,39	0,00	1,96	0,78	3,53	1,96	1,18	1,18	1,18	0,39
N43	0,78	1,18	1,57	0,00	1,18	1,18	0,00	0,00	1,57	0,00	1,57	0,00
N44	1,18	1,96	1,57	0,00	1,96	2,75	0,00	0,00	2,35	3,53	3,14	0,00
N45	1,18	0,00	1,18	0,39	0,78	0,00	1,18	0,39	0,39	0,00	0,78	0,00
N46	0,39	0,39	1,18	0,78	0,78	0,00	0,00	0,78	0,78	0,00	0,39	0,00
N47	1,18	1,18	1,18	0,00	1,18	1,18	0,00	0,00	1,96	1,57	1,18	0,00
N48	0,00	0,39	0,78	0,39	1,18	0,78	0,39	0,00	1,18	0,00	1,18	0,00
N49	0,78	1,57	1,18	0,00	1,18	1,96	0,00	0,00	1,96	2,35	3,53	0,39
N50	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00
N51	1,57	1,57	1,57	0,00	1,57	0,00	0,00	0,00	1,96	0,00	3,53	0,39
N52	1,57	1,57	2,35	4,71	3,14	3,53	1,57	1,96	1,96	2,75	3,14	1,57
N53	1,57	3,53	2,75	1,18	2,35	3,53	1,57	0,00	2,75	0,39	2,35	0,00
N54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N55	1,18	1,57	1,96	0,00	1,57	0,78	1,57	0,00	2,35	2,75	2,75	0,39
N56	0,78	1,18	1,18	0,00	1,96	0,39	0,78	0,39	1,96	0,39	1,57	0,00
N57	0,78	0,78	1,18	0,39	1,18	0,00	0,39	0,29	1,57	0,00	1,57	0,00
N58	0,78	1,18	1,18	0,00	0,67	0,78	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,00
N59	1,96	1,18	1,18	0,00	1,96	0,00	0,00	0,00	1,57	0,39	2,35	0,00
N60	1,18	1,18	1,18	0,12	1,57	1,18	0,00	1,18	1,96	1,57	1,18	0,38

Z výsledku je patrné, že testované referenční pozitivní vzorky vykazují v této třídě imunoglobulinů negativitu. Třída protilátek IgM je zapojena do časné imunitní odpovědi, a proto je přítomnost IgM užitečná při stanovení, zda se jedná o akutní infekci (přítomny protilátky IgM). Potvrdilo se, že pacienti neprodělávají akutní infekci MRSA, ale že tito pacienti byli na tuto infekci již léčeni (výskyt protilátek IgG).

5.6 Titrace antigenu č. 4, pro třídu imunoglobulinů IgA

Titrace č. 4 byla provedena ve třídě imunoglobulinů IgA. Třída IgA jsou slizniční protilátky, jsou produkovány B-lymfocyty, které se vyskytují ve slizničních vrstvách (ve slinách, slzách, sekretech dýchacího a zažívacího ústrojí, v sekretech vaginální sliznice a v mateřském mléce). Rekombinantní antigen PBP2a ($c = 0,59$ mg/ml) byl naředěn na dvanáct koncentrací: $c = 0,25; 0,28; 0,30; 0,33; 0,35; 0,38; 0,40; 0,43; 0,45; 0,48; 0,50; 0,52$ mg/ml v dialyzačním Tris pufru, na konečný objem 160,0 μ l. Tyto koncentrace byly nanášeny na nitrocelulózovou membránu. Poté byla provedena detekce stripů pomocí optimalizované metody blot-line, za použití čtyř koncentrací konjugátu IgA (1:500, 1:700, 1:1000, 1:1500). V titraci č. 4 bylo testováno čtyřicet vzorků lidské plazmy, z toho deset referenčních pozitivních vzorků (označeny P2, P3, P14, P15, P16, P17, P20, P24, P25, P29) a třicet referenčních negativních vzorků (označeny N31 – N60). Referenční pozitivní vzorky byly získány od pacientů, kteří mají potvrzenou diagnózu MRSA na sliznicích. Získané výsledky pro vybrané koncentrace antigenu a konjugátu jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 44–47).

Tab. 44 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P2	14,51	16,47	20,00	19,61	22,35	19,61	25,10	23,14	26,27	25,10	25,88	26,67
P3	12,16	13,73	14,90	15,29	16,08	15,29	16,86	16,47	17,65	17,25	17,65	16,86
P14	17,65	19,61	21,18	23,53	23,53	22,35	25,49	25,10	26,67	26,27	27,45	27,45
P15	33,73	34,51	34,51	34,90	36,47	35,29	37,65	38,04	37,65	37,65	39,22	37,25
P16	10,59	11,76	16,47	14,51	16,08	15,29	18,43	16,86	19,61	18,43	20,78	20,78
P17	14,51	16,08	16,86	16,47	16,86	17,25	18,43	17,65	19,22	20,00	19,61	18,82
P20	17,65	22,75	39,61	24,31	26,67	24,71	27,84	27,06	28,24	28,24	29,02	27,45
P24	33,33	35,69	36,86	39,22	40,78	41,18	42,35	43,53	43,53	43,92	42,75	44,71
P25	21,96	23,53	27,45	29,41	29,41	29,41	32,94	31,76	33,73	34,12	34,90	35,69
P29	13,73	14,12	16,08	16,08	18,04	16,86	20,00	18,43	20,00	20,39	21,18	20,39
N31	3,92	4,31	6,27	5,10	7,06	5,49	7,84	6,67	7,84	7,45	8,63	7,84
N32	4,31	4,71	7,06	6,67	7,84	7,06	9,80	9,80	10,98	9,80	11,76	10,98
N33	7,84	7,84	9,41	12,94	9,80	9,80	11,76	10,59	12,16	11,76	12,16	12,55
N34	1,18	1,18	2,35	1,18	1,96	1,57	1,96	1,57	1,96	1,96	1,96	1,57
N35	6,67	4,31	7,45	5,49	6,27	5,49	7,06	5,88	6,67	6,67	9,41	7,06
N36	3,53	3,53	6,27	5,10	6,27	5,49	7,45	6,27	7,84	7,45	9,02	8,63
N37	1,57	1,18	2,35	1,57	1,57	1,57	1,57	1,96	1,57	1,57	2,75	1,57
N38	1,18	1,57	2,35	1,18	1,96	1,18	1,57	1,57	1,57	2,35	1,96	1,96
N39	2,75	1,96	3,53	2,35	3,14	2,75	3,92	3,14	3,53	3,53	4,31	3,53
N40	3,53	1,57	2,75	1,57	2,75	1,96	3,14	2,35	2,75	2,75	4,31	2,75
N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78
N42	4,31	4,31	5,88	4,31	5,10	4,71	5,49	5,10	5,88	5,88	6,27	6,27
N43	1,57	1,18	3,14	1,18	1,57	1,57	1,57	1,57	1,96	1,57	2,75	1,96
N44	3,92	4,31	5,88	5,10	5,88	5,49	6,67	5,88	7,45	7,06	8,24	7,45
N45	3,92	4,31	5,88	4,71	5,10	5,10	5,88	6,27	5,88	5,49	6,67	5,49
N46	1,96	1,57	2,75	1,18	1,96	1,18	2,35	2,35	2,75	1,96	3,92	2,35
N47	4,71	3,53	4,71	4,31	5,10	4,71	6,27	5,88	6,27	6,27	7,45	6,27
N48	2,35	2,35	3,14	2,75	2,75	2,75	3,14	2,75	3,53	3,14	4,31	3,53
N49	4,71	3,53	5,49	3,92	5,10	4,71	5,10	4,31	5,49	5,49	5,88	5,49
N50	2,75	3,14	5,49	3,53	3,92	3,92	3,92	3,92	5,10	4,31	5,49	3,07
N51	3,14	3,92	4,31	3,53	4,31	3,53	5,10	4,71	5,10	5,49	6,27	5,10
N52	4,71	4,71	6,27	5,49	6,67	5,88	7,45	7,45	7,84	7,84	8,63	7,06
N53	0,78	0,39	0,12	0,78	1,32	1,18	0,78	1,57	1,18	1,57	1,96	2,75
N54	4,71	7,06	5,88	6,27	6,27	6,67	7,84	7,06	9,80	10,59	10,20	8,24
N55	4,31	3,14	5,10	3,14	4,71	3,53	4,31	3,53	3,92	6,27	5,10	4,31
N56	1,96	1,96	3,14	1,96	1,96	2,35	2,75	2,75	3,14	3,14	3,53	3,14
N57	3,53	3,92	5,49	5,10	5,88	5,10	6,27	5,49	6,27	6,27	7,06	6,27
N58	4,31	4,71	5,88	4,71	5,10	4,31	5,49	5,10	6,67	7,45	6,67	6,27
N59	5,49	5,49	7,45	7,84	8,24	6,67	8,63	7,45	9,80	8,24	9,80	9,02
N60	2,35	1,96	3,14	1,96	2,35	1,96	3,53	2,75	3,92	3,14	3,92	3,53

Tab. 45 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:700.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P2	12,55	13,33	14,90	14,51	16,86	16,47	19,22	18,04	21,18	19,61	21,57	20,78
P3	8,63	9,02	10,98	10,98	12,16	12,55	12,94	12,55	14,12	14,12	14,12	14,12
P14	13,73	14,90	16,86	18,04	18,04	16,47	20,00	19,61	21,96	21,57	23,92	21,57
P15	27,06	27,84	28,63	30,20	30,20	30,59	30,59	31,37	31,37	33,33	32,55	34,12
P16	7,84	9,41	11,37	11,76	12,94	12,55	13,73	12,94	14,90	14,90	14,90	14,90
P17	11,37	11,76	12,94	12,16	12,55	12,94	13,73	13,73	14,90	14,90	16,08	14,51
P20	14,90	16,47	19,22	19,22	20,39	18,82	22,75	20,39	22,75	21,18	21,18	23,14
P24	29,80	31,76	34,90	35,29	35,69	35,69	36,08	36,47	36,86	38,82	35,29	38,43
P25	12,55	13,73	16,08	16,47	18,43	17,65	20,39	19,22	24,31	25,10	27,06	27,45
P29	9,80	10,98	12,94	13,73	13,33	12,16	14,12	13,73	15,29	16,08	18,04	16,47
N31	3,14	3,14	4,31	3,14	4,31	4,71	5,10	4,31	5,10	4,71	6,27	5,10
N32	3,53	4,31	5,49	4,31	5,49	4,71	6,27	5,10	7,06	5,88	7,45	7,06
N33	6,27	7,06	10,20	9,02	9,02	7,84	9,02	8,63	10,20	9,02	9,80	9,02
N34	0,78	0,37	1,18	0,39	0,78	0,00	0,78	0,78	0,78	0,39	0,78	0,78
N35	3,92	3,14	4,71	3,14	3,92	3,92	4,71	4,31	5,10	4,31	5,88	4,71
N36	2,35	3,14	4,31	3,92	4,71	3,92	5,49	3,92	5,49	5,10	6,27	5,49
N37	1,57	1,18	1,57	0,69	1,18	1,18	1,57	1,18	1,96	1,57	1,96	1,03
N38	0,00	0,78	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N39	1,96	3,53	3,53	1,57	1,96	1,96	2,35	2,35	2,75	2,75	3,14	3,53
N40	1,18	1,18	1,96	0,66	1,18	1,18	1,96	1,96	2,35	1,96	3,14	1,96
N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,72
N42	4,31	3,92	4,71	3,53	5,10	3,92	4,31	5,49	5,10	5,10	5,10	5,49
N43	2,35	1,96	3,14	0,78	0,71	1,18	2,75	1,57	1,57	1,18	1,57	0,67
N44	3,92	4,31	3,92	2,75	3,53	3,53	4,71	3,92	5,10	5,49	5,88	5,10
N45	9,02	3,92	4,71	4,31	5,10	4,31	5,10	5,88	5,88	5,88	5,88	5,10
N46	2,75	2,35	3,14	1,96	2,75	2,35	3,14	3,53	4,71	3,92	4,31	3,14
N47	1,96	2,75	3,14	2,75	3,14	3,14	3,53	3,92	5,10	4,71	5,10	4,31
N48	2,75	2,35	3,14	2,35	2,75	2,35	2,75	2,75	2,75	2,75	3,14	3,14
N49	3,14	3,53	3,53	3,53	3,92	3,92	3,92	3,09	4,71	4,31	4,71	4,71
N50	1,96	1,96	3,92	2,35	2,35	1,57	1,96	2,35	3,92	1,05	2,75	4,31
N51	3,14	2,75	3,53	3,14	3,53	2,75	3,53	3,53	3,92	3,92	3,92	4,71
N52	3,53	3,53	4,71	3,53	4,31	3,92	5,10	4,71	5,10	5,49	5,49	5,10
N53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,39	0,00	0,39	0,39	0,78	1,18	1,18
N54	4,71	4,31	5,10	4,71	5,88	5,10	6,27	6,27	6,27	6,27	6,27	6,67
N55	3,14	3,14	3,92	2,35	3,14	2,75	3,14	2,75	3,53	3,14	4,31	3,92
N56	0,39	0,78	1,57	0,78	0,78	0,78	1,18	1,18	1,57	1,57	2,35	1,96
N57	3,14	3,53	4,31	3,92	3,92	3,53	4,31	4,71	4,71	5,88	4,71	4,71
N58	3,22	3,92	4,71	4,31	4,71	4,31	5,10	5,10	5,10	5,10	5,49	5,49
N59	3,14	4,31	4,31	4,31	5,10	6,27	5,49	4,71	5,49	5,49	5,49	5,49
N60	1,57	1,18	2,35	1,96	1,47	2,35	2,35	2,75	2,35	2,75	2,75	2,35

Tab. 46 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:1000.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P2	10,59	14,12	12,94	15,29	15,69	14,90	16,86	17,25	18,82	18,82	19,22	20,00
P3	9,80	11,76	12,16	12,16	11,76	12,55	13,33	13,33	13,73	13,73	14,90	14,51
P14	15,29	17,25	18,04	20,00	19,61	18,82	20,00	21,18	21,57	21,18	21,18	21,57
P15	32,16	34,90	33,73	36,08	35,69	37,25	36,47	37,65	35,29	37,65	36,08	36,47
P16	8,24	10,98	13,73	11,37	11,37	11,37	12,94	12,16	14,12	14,12	15,29	14,90
P17	11,76	13,33	13,73	14,12	13,33	14,12	14,90	14,51	15,29	15,69	15,29	16,47
P20	13,73	18,43	19,22	18,82	20,39	19,22	22,35	20,78	21,18	21,18	23,53	23,14
P24	26,67	32,16	30,98	32,55	32,16	32,94	33,73	34,51	33,33	35,29	34,90	36,47
P25	12,55	16,86	17,25	17,25	16,86	18,43	20,00	19,22	20,39	20,78	23,14	22,75
P29	10,59	14,12	13,73	14,12	14,90	14,51	15,29	16,47	16,86	17,65	17,25	17,25
N31	2,35	2,75	3,14	2,35	3,14	3,14	4,31	4,71	4,71	4,31	5,49	4,71
N32	3,14	3,92	4,31	3,92	5,10	4,31	5,10	5,49	6,67	5,88	6,67	6,67
N33	5,49	6,67	7,45	9,02	7,84	7,45	9,02	9,02	9,41	9,41	9,41	9,02
N34	0,78	0,78	1,18	0,39	0,12	0,78	1,57	0,38	1,57	1,57	1,57	1,57
N35	3,37	4,31	5,49	4,31	5,10	4,71	5,88	5,49	7,06	6,67	8,24	6,67
N36	2,75	3,14	3,92	3,14	4,31	3,92	4,31	4,31	5,49	4,71	5,88	5,49
N37	0,78	0,78	1,57	0,78	0,78	1,18	1,18	1,18	1,96	1,57	2,35	1,96
N38	0,00	0,00	0,39	0,00	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,78	0,39
N39	2,35	1,96	2,75	1,96	2,75	2,35	2,75	2,35	2,35	2,35	2,75	2,75
N40	0,78	0,39	2,75	1,18	0,78	0,78	1,57	1,57	2,35	1,57	2,75	1,96
N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,72
N42	3,92	4,71	5,10	4,31	5,10	4,71	5,10	4,71	5,10	4,71	5,10	5,10
N43	1,18	1,18	1,57	1,18	1,57	1,18	1,57	1,18	1,18	3,14	1,18	0,39
N44	2,75	2,75	3,92	3,14	3,53	3,14	4,31	3,53	3,92	4,31	4,71	3,92
N45	3,92	3,53	4,71	4,31	5,49	4,71	5,88	5,49	7,06	5,49	6,27	5,49
N46	2,35	1,96	4,71	2,35	2,75	2,75	3,53	2,75	3,14	2,75	3,92	2,75
N47	2,75	3,14	3,53	3,14	3,14	3,14	3,92	3,53	3,92	3,53	4,31	3,92
N48	2,75	1,18	0,15	0,64	0,30	0,29	0,00	0,00	0,26	0,34	0,19	0,00
N49	1,57	1,96	2,75	1,96	1,96	1,96	2,75	2,75	2,75	3,53	3,53	3,53
N50	0,78	0,29	0,77	0,78	1,18	0,78	1,18	0,78	0,89	1,96	4,31	2,27
N51	1,96	1,96	2,75	2,35	2,35	2,35	3,14	3,14	3,92	3,14	3,92	3,53
N52	3,53	3,53	5,10	4,31	4,31	4,31	4,71	4,31	5,49	5,10	6,27	5,49
N53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,78	0,78	0,00
N54	4,31	4,71	4,71	4,31	4,71	5,10	6,27	4,31	6,27	5,88	7,06	5,88
N55	2,35	2,75	3,14	1,96	2,75	1,96	2,75	2,35	3,14	3,14	4,31	3,14
N56	0,39	0,00	0,78	0,00	0,39	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N57	1,57	1,57	2,75	1,96	1,96	1,96	2,75	3,14	3,53	3,92	4,31	4,31
N58	3,92	3,14	3,53	3,53	3,92	3,53	4,31	5,10	5,49	5,49	5,49	5,49
N59	4,31	4,31	5,10	4,71	5,10	7,84	5,88	5,49	6,67	6,27	6,67	6,67
N60	0,39	0,78	0,78	0,00	0,39	0,78	0,78	0,78	1,18	1,18	1,96	1,57

Tab. 47 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:1500.

Číslo vzorku	Koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]											
	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
P2	7,06	7,84	8,24	9,02	9,41	9,02	10,98	10,98	13,33	12,94	14,12	14,51
P3	6,27	7,45	7,84	9,02	10,98	8,63	9,02	9,41	9,80	9,80	10,20	9,41
P14	9,80	11,76	11,37	11,76	11,37	12,94	16,47	14,12	15,69	16,08	16,86	17,65
P15	21,57	22,35	21,96	23,14	24,31	23,14	24,31	24,71	25,10	25,88	23,92	26,27
P16	3,53	4,31	6,67	5,10	5,10	4,71	6,27	6,27	7,45	7,45	7,84	7,06
P17	6,27	7,84	9,02	8,24	8,24	7,84	8,63	8,63	9,80	10,20	9,80	10,98
P20	7,45	9,80	10,98	11,76	13,73	12,16	13,73	12,55	14,12	14,12	14,12	14,51
P24	17,25	19,61	20,39	21,18	22,35	21,57	23,92	23,92	24,71	25,10	24,31	25,49
P25	7,84	9,80	10,98	11,37	12,16	11,37	14,12	13,73	16,08	16,08	16,47	17,25
P29	5,88	6,27	7,45	7,45	8,63	8,24	10,20	9,80	10,98	10,98	11,37	10,98
N31	2,35	2,35	3,14	2,75	2,75	3,14	3,14	3,14	3,92	3,53	3,92	3,53
N32	1,57	1,57	1,96	1,57	1,96	3,53	2,35	3,53	2,75	2,75	2,75	2,75
N33	3,92	2,75	3,14	0,71	3,14	4,71	3,92	3,92	4,31	4,31	5,10	4,31
N34	0,78	0,00	1,18	0,78	0,39	0,12	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
N35	2,35	1,57	1,57	1,96	1,96	2,35	3,14	1,96	2,35	1,96	2,35	2,35
N36	1,96	1,96	1,45	1,96	0,00	0,39	2,75	2,75	3,14	3,14	3,14	3,14
N37	0,78	0,78	0,78	0,39	1,18	0,78	1,09	1,18	1,18	1,18	1,37	1,18
N38	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N39	1,57	1,18	0,38	1,18	2,35	1,18	1,57	1,96	1,96	1,64	3,53	1,96
N40	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,71	0,00	0,00
N41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,00	0,34
N42	2,35	1,96	2,35	1,96	2,35	2,35	2,75	2,35	3,14	3,14	3,55	2,75
N43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,39	0,00	0,00
N44	0,68	1,18	0,36	0,00	0,39	0,64	0,78	1,18	1,18	0,78	1,18	1,18
N45	1,96	1,18	1,96	1,57	1,18	0,71	1,96	0,69	2,35	1,96	1,96	2,35
N46	0,78	1,18	0,00	0,39	0,00	0,00	0,39	0,39	0,78	1,57	1,96	1,18
N47	1,57	1,18	1,18	0,39	0,39	1,18	1,18	0,30	1,57	1,57	2,75	1,96
N48	3,53	2,75	3,92	3,53	3,53	3,92	4,31	4,31	4,71	4,71	5,10	4,71
N49	2,75	0,61	1,18	1,18	1,18	0,37	0,71	0,57	1,06	1,96	1,96	1,96
N50	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,47
N51	2,35	1,96	1,57	1,57	1,57	1,96	1,96	2,35	2,75	2,35	3,14	2,75
N52	4,71	3,92	3,92	3,53	3,53	3,92	4,31	5,88	5,10	5,49	5,88	5,49
N53	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N54	3,92	4,31	4,31	5,10	4,31	3,53	4,71	4,71	5,10	5,49	4,71	4,71
N55	1,96	2,35	2,35	1,18	0,39	0,78	1,18	1,18	3,53	2,35	2,35	1,96
N56	0,39	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
N57	2,35	1,96	2,75	1,57	1,96	1,96	1,96	1,96	1,57	1,96	1,96	1,96
N58	3,14	2,75	2,54	2,35	1,96	2,35	2,75	2,75	3,92	3,14	3,53	2,75
N59	3,92	2,75	2,75	1,96	1,96	2,35	3,53	2,75	3,53	3,53	3,53	3,92
N60	0,78	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Po určení vybraných koncentrací antigenu PBP2a a konjugátu IgA a následné detekci a po vyhodnocení hodnot intenzity zabarvení linií byla vypočítána diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda (Tab. 48–59). Vhodné koncentrace antigenu a konjugátu jsou takové, při kterých je diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda co nejbližší hodnotě 100 % a počet hraničních výsledků je co nejnižší.

Tab. 48 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,25 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	8	4	4	2
Hraniční	0	2	6	6	7
Negativní	0	0	0	0	1
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	2	2	0	0
Negativní	30	28	28	30	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	66,67%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	83,33%

Tab. 49 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,28 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	9	6	8	2
Hraniční	0	1	4	2	7
Negativní	0	0	0	0	1
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	2	1	1	0
Negativní	30	28	29	29	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	66,67%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	83,33%

Tab. 50 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,30 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	6	8	2
Hraniční	0	0	4	2	8
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	12	1	1	0
Negativní	30	18	29	29	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 51 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,33 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	7	8	2
Hraniční	0	0	3	2	7
Negativní	0	0	0	0	1
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	4	1	1	0
Negativní	30	26	29	29	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	66,67%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	83,33%

Tab. 52 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,35 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	7	8	3
Hraniční	0	0	3	2	6
Negativní	0	0	0	0	1
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	10	2	1	0
Negativní	30	20	28	29	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	75,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	87,50%

Tab. 53 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,38 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	6	8	2
Hraniční	0	0	4	2	7
Negativní	0	0	0	0	1
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	5	2	2	0
Negativní	30	25	28	28	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	66,67%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	83,33%

Tab. 54 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,40 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	9	9	5
Hraniční	0	0	1	1	5
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	12	3	5	0
Negativní	30	18	27	25	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 55 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,43 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	8	9	4
Hraniční	0	0	2	1	6
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	11	3	1	1
Negativní	30	19	27	29	29
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 56 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,45 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	10	10	6
Hraniční	0	0	0	0	4
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	14	4	6	0
Negativní	30	16	26	24	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 57 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,48 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	10	10	5
Hraniční	0	0	0	0	5
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	14	5	5	0
Negativní	30	16	25	25	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 58 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,50 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	10	10	6
Hraniční	0	0	0	0	4
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	16	8	8	1
Negativní	30	14	22	22	29
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tab. 59 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu **0,52 mg/ml**.

		Koncentrace konjugátu IgA			
		1:500	1:700	1:1000	1:1500
Referenční panel pozitivních vzorků					
Pozitivní	10	10	10	10	6
Hraniční	0	0	0	0	4
Negativní	0	0	0	0	0
Referenční panel negativních vzorků					
Pozitivní	0	0	0	0	0
Hraniční	0	13	3	5	0
Negativní	30	17	27	25	30
Shoda pozitivních výsledků (citlivost)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Shoda negativních výsledků (specifita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Celková diagnost. shoda (efektivita)		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Z výsledků je patrné, že 100% citlivost, specifita a efektivita se vždy pohybuje kolem ředění konjugátu IgA 1:500 – 1:1000 (Tab. 48–59), lze tedy konstatovat, že tyto koncentrace se jeví jako vhodné pro výrobu soupravy IgA. Při použití konjugátu IgA 1:500 se jeví jako nejvhodnější použít koncentraci antigenu PBP2a 0,33 mg/ml (Tab. 48), ale koncentrace antigenu nižší nebo vyšší než 0,33 mg/ml se již pro naše účely neprojeví, tudíž lze konstatovat, že mnohem vhodnější pro tuto titraci bude použití koncentrace konjugátu IgA 1:700, kdy při koncentracích antigenu vyšších (od 0,40 mg/ml do 0,52 mg/ml) je nejnižší počet hraničních výsledků. Při koncentraci konjugátu 1:1500 se v panelu referenčních pozitivních sér objevují hraniční výsledky (Tab. 47), naopak se při koncentraci konjugátu silnější než 1:700 hraniční výsledky objevují v panelu referenčních negativních sér (Tab. 44).

Jako vhodná koncentrace se dle výsledků ukazuje koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí od 0,40 do 0,52 mg/ml. U koncentrace antigenu 0,52 mg/ml z Tab. 42 vyplývá, že vzorky N36, N42, N58 a N59 mají hodnotu intenzity zbarvení linií 5,49, což je na úplné hranici mezi negativním a hraničním hodnocením, tudíž lze konstatovat, že jako nejvhodnější koncentrace antigenu PBP2a se u této titrace ukazuje koncentrace antigenu 0,45 mg/ml, při použití koncentrace konjugátu IgA 1:700 (Tab. 45).

Opět platí nepsaná pravidla pro výrobu blot-line soupravy a ty jsou, že se před každou výrobou nové šarže na zkušební nitrocelulózovou membránu nanese různé koncentrace antigenu PBP2a v daném rozmezí (tj. v tomto případě koncentrace antigenu 0,40–0,52 mg/ml). Na panelu referenčních sér se provede optimalizovaná detekce s použitím nevhodnější koncentrace konjugátu IgA (tj. v tomto případě koncentrace 1:700). Následně se vybere nevhodnější koncentrace antigenu PBP2a, která se nanese na všechny výrobní karty s nitrocelulózovou membránou. K této koncentraci antigenu se poté vytitruje, s použitím panelu referenčních sér vhodný konjugát IgA, přičemž se budou zkoušet koncentrace v rozmezí 1:500–1:1000.

5.7 Charakteristika metody pro třídu imunoglobulinů IgA

5.7.1 Opakovatelnost

Bylo provedeno šestnáct detekcí optimalizovanou metodou blot-line v jednom dni (20.3.2017) na stejném přístroji a stejným operátorem. Detekce byla provedena se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P24), hraniční (N33) a negativní (N38). Konjugát IgA byl použit o koncentraci 1:700, opakovatelnost byla sledována pro koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí 0,40–0,52 mg/ml (celkem šest koncentrací). Tyto vybrané koncentrace antigenu a konjugátu byly zvoleny na základě výsledků titrace č. 4.

Tab. 60 Tabulka opakovatelnosti výsledků pro konjugát IgA 1:700.

Číslo měření	Vzorek P24						Vzorek N33						Vzorek N38					
	Hodnota intenzity zabarvení linie [a.u.], pro vybrané koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]																	
	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52
1	32,16	31,76	32,94	31,76	31,76	32,55	5,88	5,49	5,49	6,27	7,06	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	32,55	32,16	34,12	37,65	44,31	47,45	8,63	8,24	8,63	9,02	9,41	9,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	33,73	33,73	33,73	33,33	33,33	33,73	8,24	7,84	8,63	8,24	9,80	9,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	34,90	35,69	36,08	36,86	37,25	37,65	7,06	7,06	7,06	7,45	8,24	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	32,94	33,73	32,55	33,33	31,76	33,33	7,06	6,27	7,06	6,27	6,27	6,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	30,59	31,37	32,55	33,33	33,33	33,73	8,24	9,02	8,63	8,63	9,80	9,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	34,12	35,29	34,12	34,12	33,33	34,51	5,49	6,27	6,27	9,80	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	32,55	33,33	33,73	34,12	34,12	37,65	5,23	7,84	7,45	7,45	6,67	8,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	32,94	33,73	34,12	34,12	34,12	35,29	9,02	8,63	8,63	7,45	7,84	7,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	33,73	34,12	34,51	34,51	34,51	34,51	8,63	8,63	8,63	9,02	9,41	9,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	32,55	32,94	34,12	34,51	34,90	33,73	7,06	7,45	8,63	8,63	8,24	8,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	33,33	33,33	34,12	33,73	33,73	33,73	9,02	9,80	10,20	9,02	9,02	8,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	30,98	33,33	32,94	32,94	32,94	32,16	8,24	8,24	8,63	8,63	8,24	8,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	30,98	31,37	32,16	34,12	32,55	32,94	8,63	8,63	8,63	7,45	8,24	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	33,33	33,33	33,33	31,76	32,55	33,33	7,84	7,45	8,24	8,24	9,02	8,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	31,37	32,16	31,37	31,76	31,76	32,55	8,24	8,63	8,63	8,24	9,41	9,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 61 Tabulka pro opakovatelnost IgA, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.

	Vzorek P24						Vzorek N33						Vzorek N38					
Počet testů	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Průměrná intenzita [a.u.]	32,67	33,21	33,53	33,87	34,14	34,93	7,66	7,84	8,09	8,11	8,33	8,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka	1,22	1,25	1,11	1,62	3,05	3,71	1,23	1,14	1,14	0,99	1,17	1,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Variační koeficient [%]	3,74	3,75	3,31	4,78	8,93	10,61	16,08	14,49	14,15	12,19	14,01	12,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	1,44																	
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	8,91																	

Z výsledků se vypočítala hodnota průměrné intenzity zbarvení linií, směrodatná odchylka a variační koeficient pro jednotlivá měření. Dále se vypočítala směrodatná odchylka pro celý rozsah, která je 1,44 a variační koeficient pro celý rozsah, který činí 8,91 % (Tab. 61). Těsnost shody opakovaného vyšetření téhož vzorku je vyjádřena variačním koeficientem, variační koeficient je matematické vyjádření míry shody mezi výsledky (neboli rozptylu výsledků). Variační koeficient daného stanovení by měl být do 15 %. Pokud je variační koeficient vyšší, je nutno stanovení opakovat, neboť výsledky nejsou dostatečně přesné. Z toho lze usuzovat, že preciznost metody za podmínek opakovatelnosti je dostačující.

5.7.2 Reprodukovatelnost

Bylo provedeno šestnáct detekcí optimalizovanou metodou blot-line v časovém rozmezí od 27.2.2017 do 20.3.2017 (Tab. 62), s použitím čtyř šarží komponent, na dvou různých zařízeních a třemi různými operátory. Detekce byla provedena se třemi vzorky, v zastoupení pozitivní (P24), hraniční (N33) a negativní (N38). Konjugát IgA byl použit o koncentraci 1:700, reprodukovatelnost byla sledována pro koncentrace antigenu PBP2a v rozmezí 0,40–0,52 mg/ml (celkem šest koncentrací). Tyto vybrané koncentrace antigenu a konjugátu byly zvoleny na základě výsledků titrace č. 4. Vyhodnocovací protokoly pro reprodukovatelnost výsledků pro konjugát IgA 1:700 jsou pro názornost přiloženy k této práci (Příloha č. 5–7).

Tab. 62 Tabulka reprodukovatelnosti výsledků pro konjugát IgA 1:700.

Datum měření, číslo měření	Vzorek P24						Vzorek N33						Vzorek N38						
	Hodnota intenzity zbarvení linie [a.u.], pro vybrané koncentrace antigenu PBP2a [mg/ml]																		
	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,52	
27.2.2017	1	33,33	32,94	33,73	32,94	32,16	32,16	6,67	7,45	7,06	6,67	7,06	7,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28.2.2017	2	30,98	30,20	29,80	29,80	28,63	30,20	7,45	6,67	7,84	6,67	7,84	7,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1.3.2017	3	29,41	29,41	30,59	29,41	30,20	29,80	8,63	9,02	8,63	9,02	9,41	8,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.3.2017	4	29,80	31,37	32,16	31,37	30,98	31,76	9,02	9,41	9,02	9,41	9,41	8,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3.3.2017	5	30,98	32,16	32,55	33,33	32,55	33,73	7,06	7,06	7,06	7,45	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5.3.2017	6	31,76	33,73	34,51	34,51	35,29	35,29	7,84	8,24	7,45	7,06	7,45	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.3.2017	7	29,02	28,63	28,24	29,41	30,98	31,76	6,27	5,88	6,27	6,67	7,45	10,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8.3.2017	8	29,41	30,59	29,80	29,80	30,98	32,16	5,49	5,88	6,27	6,67	7,45	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9.3.2017	9	34,12	33,33	33,73	32,55	33,73	33,33	5,49	6,27	6,27	7,45	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10.3.2017	10	32,94	32,55	32,94	32,55	32,94	33,33	7,06	5,49	6,27	5,49	6,27	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12.3.2017	11	29,02	29,02	30,59	29,80	34,90	32,55	6,67	7,06	7,06	7,45	8,24	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14.3.2017	12	28,63	30,20	30,20	30,59	30,98	31,76	6,27	6,67	7,45	6,27	6,27	6,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15.3.2017	13	28,63	29,80	30,59	29,80	31,37	31,76	6,27	7,06	6,67	6,67	5,88	5,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17.3.2017	14	27,06	27,45	28,63	29,02	29,80	29,02	7,45	7,06	7,06	6,67	7,06	6,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18.3.2017	15	30,20	29,80	30,20	29,80	31,37	32,55	5,88	4,31	4,71	5,88	6,27	5,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20.3.2017	16	31,37	31,37	32,16	31,76	32,16	31,76	6,67	7,06	7,84	8,24	6,27	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 63 Tabulka pro reprodukovatelnost IgA, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.

	Vzorek P24						Vzorek N33						Vzorek N38					
Počet testů	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Průměrná intenzita [a.u.]	30,42	30,78	31,27	31,03	31,81	32,06	6,89	6,91	7,06	7,11	7,23	7,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka	1,93	1,81	1,88	1,70	1,78	1,53	1,01	1,27	1,03	1,05	1,07	1,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Variační koeficient [%]	6,35	5,87	6,00	5,48	5,58	4,78	14,70	18,40	14,63	14,79	14,82	16,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Směrodatná odchylka pro celý rozsah	1,21																	
Variační koeficient pro celý rozsah [%]	9,60																	

Z výsledků se vypočítala hodnota průměrné intenzity zbarvení linií, směrodatná odchylka a variační koeficient pro jednotlivá měření. Dále se vypočítala směrodatná odchylka pro celý rozsah, která je 1,21 a variační koeficient pro celý rozsah, který činí 9,60 %. (Tab. 63). Variační koeficient pro celý rozsah nám vyjadřuje analytickou preciznost v rámci stanovení. Variační koeficient daného stanovení by měl být do 15 %. Pokud je variační koeficient vyšší, je nutno stanovení opakovat, neboť výsledky nejsou dostatečně přesné. Z toho lze usuzovat, že výsledky preciznosti metody za podmínek reprodukovatelnosti jsou výborné a nastavená metoda splňuje požadovaná kritéria.

6 ZÁVĚR

Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* patří mezi nejvýznamnější multirezistentní patogeny. Prevalence invazivních infekcí způsobených MRSA má vzrůstající tendenci a jedná se o problém většiny celosvětových zdravotnických zařízení poskytujících akutní a následnou péči v lůžkové i ambulantní části, proto je u pacientů velmi důležitá včasná a rychlá diagnostika a cílená terapie. Pro cílenou detekci MRSA u pacientů v rutinních klinických laboratořích bylo potřeba vyvinout metodu, která splňuje požadavky na jednoduchou, rychlou, přesnou a citlivou metodu.

V předkládané diplomové práci byl nejprve vyroben rekombinantní protein PBP2a. Ze čtyř bakteriálních pelet dodaných z Masarykovy univerzity vykazoval, po následném předběžném screeningu exprese genu (SDS-PAGE) nejvyšší expresi bakteriální klon č. 2, jeho molekulární hmotnost je přibližně 76 kDa. Po následné purifikaci a dialýze tohoto vybraného bakteriálního klonu byl získán rekombinantní protein PBP2a v množství 10,0 ml a jeho koncentrace činila 0,59 mg/ml. Následně byl tento antigen navázán na upravenou nitrocelulózovou membránu v různých naředěných koncentracích na přístroji BioDot AD1500. Membrána byla dále upravena na stripy o definované velikosti.

Poté byla provedena optimalizovaná metoda blot-line pro detekci specifických protilátek proti rekombinantnímu antigenu PBP2a. Tato detekce byla analyzována u šedesáti vzorků lidské plazmy, referenční pozitivní vzorky byly označeny P1 – P30 a referenční negativní vzorky byly označeny N31 – N60 a stanovení proběhlo ve třídách imunoglobulinů IgG a IgM. Pro třídu imunoglobulinů IgA bylo použito deset referenčních pozitivních vzorků lidské plazmy, tyto vzorky mají potvrzenou diagnózu MRSA na sliznicích (označeny P2, P3, P14, P15, P16, P17, P20, P24, P25, P29) a třicet referenčních negativních vzorků (označeny

N31 – N60). Po vyhodnocení intenzity zabarvení linií každého jednotlivého stripu pomocí softwaru Immunoblot TestLine, spol. s.r.o., byla hodnocena diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda. Z výsledků úvodní titrace č. 1 pro třídu IgG bylo zjištěno, že připravený rekombinantní antigen PBP2a je funkční, a že je vhodné v následující titraci použít větší rozsah naředěných koncentrací tohoto antigenu. Dále bylo zjištěno, že koncentrace konjugátu IgG nad 1:2500 jsou nevyhovující, jelikož záchyt referenčních pozitivních vzorků je velmi nízká. Z výsledků diagnostické citlivosti, specifity a celkové diagnostické shody v titraci č. 2 vyplynulo, že nejvhodnější pro výrobu soupravy IgG je koncentrace antigenu PBP2a od 0,30 mg/ml do 0,45 mg/ml a koncentrace konjugátu IgG je vhodná v rozmezí 1:1500–1:1800. V titraci č. 3 byl použit konjugát třídy IgM o koncentraci 1:1000. V této titraci se ukázalo, že žádný vzorek plasmy pacienta není pozitivní, tudíž se potvrdilo, že pacienti neprodělávají akutní infekci MRSA, ale že tito pacienti byli již na tuto infekci léčeni. Titrace č. 4 byla provedena ve třídě imunoglobulinů IgA. Z výsledků diagnostické citlivosti, specifity a celkové diagnostické shody lze konstatovat, že jako nejvhodnější se jeví použití koncentrace konjugátu IgA v rozmezí 1:500–1:1000 a koncentrace antigenu PBP2a okolo hodnot koncentrací od 0,40 mg/ml do 0,52 mg/ml.

Z výsledků titrace č. 1, č. 2 a č. 4 jasně vyplývá, že vyrobené konkrétní šarže karet nitrocelulóзовé membrány s naneseným antigenem PBP2a musí být vždy ověřeny na panelu referenčních vzorků a dle toho se nastaví hodnoty koncentrací (jak antigenu, tak konjugátu) dle potřeby, odlišně však pro třídu imunoglobulinů IgG a IgA.

Následně se hodnotila opakovatelnost (intra-assay) a reprodukovatelnost (inter-assay) pro třídy imunoglobulinů IgG a IgA. Preciznost opakovaného vyšetření téhož vzorku je vyjádřena variačním koeficientem, variační koeficient je matematické vyjádření míry shody mezi výsledky. Variační koeficient za podmínek opakovatelnosti pro celý rozsah u třídy IgG je 10,09 % a u třídy IgA je 8,91 %. Variační koeficient za podmínek reprodukovatelnosti pro celý rozsah u třídy IgG je 9,23 % a u třídy IgA je 9,60 %. Variační koeficient daného stanovení by měl být do 15 %. Pokud je variační koeficient vyšší, je nutno stanovení opakovat, neboť výsledky nejsou dostatečně přesné. Z výsledků plyne, že preciznost metody za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti pro třídy imunoglobulinů IgG a IgA vyhovuje kritériím pro výrobu diagnostické soupravy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AMAGAI, M., MATSUYOSHI, N., WANG, Z. H., ANDL, C. AND STANLEY, J. R., Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat. Med.* 2000, 6: 1275-1277.

ARCHER, G. L. a E. PENNELL., Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sep 1990, 34 (9), 1720-1724.

ASPERGER, H., ZANGERL, P., *Staphylococcus aureus*, 2563-2569. In ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W., FOX, P. F (ed.). *Encyclopedia of Dairy sciences*. 2nd ed. London: Academic press. 2002, 2799 pp., ISBN 0-12-227235-8.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005. 176 s. ISBN 8024706911.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. *et al.*, *Vyšetřovací metody v imunologii*, 2. přepracované a doplněné vydání, Praha: Grada Publishing, a.s. 2011. 164 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

BENEŠ, J., *Infekční lékařství*. Praha: Galén. 2009, 651 s. 200, ISBN 978-807-2626-441.

BERGER-BÄCHI, B., BARBERIS-MAINO, L., STRÄSSLE, A. AND KAYSER, F. H., *FemA*, a hostmediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 219: 263-269.

BERGEROVÁ T., HEDLOVÁ D., JINDRÁK V., URBÁŠKOVÁ P., CHMELÍK V., *Doporučení postup pro kontrolu výskytu kmenů Staphylococcus aureus rezistentních k oxacilinu (MRSA) a s jinou nebezpečnou antibiotickou rezistencí ve zdravotnických zařízeních*. Zprávy CEM (SZÚ Praha). 2006, roč. 15, příloha 1, s. 2.

BOLLAG D. M., ROZYCKI M. D., EDELSTEIN S. J., *Protein methods*. Second edition. Willey-Liss. 1996, New York.

BROWN, D. F. J., D. I. EDWARDS, P. M. HAWKEY, D. MORRISON, *et al.*, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Dec 2005, 56 (6), 1000-1018.

DATTA, P., N. GULATI, N. SINGLA, H. R. VASDEVA, *et al.*, Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. *Journal of Medical Microbiology*. Nov 2011, 60 (11), 1613-1616.

DEURENBERG R. H. A STOBBERINHG E. E., The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 2008, 8: 747-763.

DROZENOVÁ J., PETRÁŠ P., Vlastnosti koaguláza-negativních stafylokoků izolovaných z hemokultur. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2000, 49: 51-58.

DURAN, N., OZER, B., DURAN, G. G., DEMIR, C., Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in Staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*. 2012, vol. 135, no. 3, p. 389-396.

EUZÉBY, J. P., *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [online]. LPSN bacterio.net. ©2013, [cit. 4. 2. 2017]. Dostupné z: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>.

GARRITY, G. M., BELL, J. A., AND LILBURN, T. G., Taxonomic *outline of the Prokaryotes*. In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology, second edition*, [online]. Springer-Verlag, New York. ©2004 [cit. 21. 3. 2016]. Dostupné z: <http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf>.

GENESTIER, A. L., MICHALLET, M. C., PREVOST, G., BELLOT, G., CHALABREYSSE, L., PEYROL, S., THIVOLET, F., ETIENNE, J., LINA, G., VALLETTE, F. M., VANDENESH, F. AND GENESTIER, L., Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 3117-3127.

GLATZ Z., Způsoby a použití přenosu bílkovin z gelů po elektroforéze–blotting bílkovin, *Chem. listy* 89. 1995, 437-443.

GÖRNER, F., VALÍK, L., *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum. 2004, p. 502-504, ISBN 80-967064-9-7.

GÓSELOVÁ, S., BLAŽKOVÁ M., HOLUBOVÁ B., KARAMANOVÁ L., RAUCH P., Imunodetekce v laterálnom toku na membráne. *Chemické listy* 108(2). 2014, 114-119. ISSN 0009-2770.

HAKENBECK, R. AND COYETTE, J., Resistant penicillin-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998, 54: 332-340.

HANSEN, A. AND ERICSON SOLID, J. U., SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006, 46: 8-20.

HODOVÁ, S., LIPOVÝ, B., Význam edukácie perioperačných sestier v prevencii rozvoje a šírenia MRSA. *Sestra*. 2010, 20 (10), s. 58-59, ISSN 1210-0404.

HOLDEN, M. T. G., LINDSAY, J. A., Whole Genomes: Sequence, Microarray and Systems Biology. In: Lindsay, J. A. (ed.), *Staphylococcus Molecular Genetics*. 2008, pp: 1–28. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

CHOI, Y. W., KOTZIN, B., HERRON, L., CALLAHAN, J., MARRACK, P. AND KAPPLER, J., Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, USA 86: 8941-8945.

FEIL, E. J., COOPER, J. E., GRUNDMANN, H., ROBINSON, D. A., ENRIGHT, M. C., BERENDT, T., PEACOCK, S. J., SMITH, J. M., MURPHY, M., SPRATT, B. G., MOORE, C. E. AND DAY, N. P. J., How Clonal Is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 2003, 185: 3307-3316.

FERENČÍK M., *Imunochémia*, Alfa. 1989, str. 348, Bratislava, Slovensko.

GILL, S. R., FOUTS, D. E., ARCHER, G. L., MONGODIN, E. F., DEBOY, R. T., RAVEL, J., PAULSEN, I. T., KOLONAY, J. F., BRINKAC, L., BEANAN, M., DODSON, R. J., DAUGHERTY, S. C., MADUPU, R., ANGIUOLI, S. V., DURKIN, A.S., HAFT, D. H., VAMATHEVAN, J., KHOURI, H., UTTERBACK, T., LEE, CH., DIMITROV, G., JIANG, L., QIN, H., WEIDMAN, J., TRAN, K., KANG, K., HANCE, I. R., NELSON, K. E. AND FRASER, C. M., Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*. 2004, 187: 2426-2438.

HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M, ITO, T., The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends of Microbiology*. 2001, vol. 9, no. 10, p. 486-493.

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., *Základy Imunologie*. Praha: Triton. 2002, ISBN 80-7254-215-X.

ITO, T., KATAYAMA, Y., HIRAMATSU, K., Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43: 1449-1458

ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSASITORN, CH. AND HIRAMATSU, K., Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45: 1323-1336.

ITO, T., OKUMA, K., MA, X. X., YUZAWA, H. AND HIRAMATSU, K., Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 2003, 6: 41-52.

ITO, T., MA, X. X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H. AND HIRAMATSU, K., Novel tape V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48: 2637-2651.

JANICE HANEY CARR, Scanning electron micrograph of *S. aureus* [online]. Bacteria in photos. ©2011 [cit. 21. 3. 2016]. Dostupné z: <<http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html>>.

JEVONS, M. P. Celbenin-resistant staphylococci. *British medical journal*. 1961, roč. 1, č., s. 124-125. ISSN 2044-6055.

JINDRÁK, V. *Klinický význam stafylokoků v nemocničních infekcích*. Zprávy EM (SZÚ, Praha). 1998, 7(12): 492-496.

KAMIKADO M. T., KOBAYASHI H. H., HONJOH K., IIO M., *J. Food Prot.* 2003, 66, 1222.

KATAYAMA, Y., ITO, T. AND HIRAMATSU, K., A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1549-1555, ISSN 0066-4804

KATAYAMA, Y., ITO, T. AND HIRAMATSU, K., Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45: 1955-1963.

KLOOS, W. E., SCHLEIFER, K. H. *The genus Staphylococcus*. 1991. 1420 s. ISBN 3-540-08871-7.

KLOOS, W. E., BANNERMAN, T. L. Update on clinical-significance of coagulase – negative *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994, roč. 7, č. 1, s. 117-140. ISSN 0893-8512.

KRAJSKÁ HYGIENICKÁ STANICE MORAVSKOSLEZSKÉHO KRAJE, *Problematika methicilin rezistentních kmenů Staphylococcus aureus (MRSA)* [online]. Ostrava. ©2004 [cit. 21. 3. 2016]. Dostupné z: <http://www.khsova.cz/01_obcanum/mrsa.php?datum=2004-11-25>.

KRUPKOVÁ, S., MÍČKOVÁ, E., Problematika MRSA ve zdravotnickém zařízení. *Diagnóza v ošetrovatelství*. 2008, č. 2, s. 10.

LAUPLAND, K. B., CHURCH, D. L., MUCENSKI, M., SUTHERLAND, L. R. AND DAVIES, H. D., Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J. Infect.* 2003, Dis. 187: 1452-1459.

LER S. G., FOOK KAY LEE P., *J. Chromatogr.* 2006, A 1133, 1.

LIM, T. T., CHONG, F. N., O'BRIEN, F. G. AND GRUBB, W. B., Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their *mec* regions. *Pathology*. 2003, 35: 336-343.

LINDSAY, J. A., HOLDEN, M. T., *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 2004, 12: 378-385.

LINDSAY, J. A., HOLDEN, M. T., Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics*. 2006 6: 186-201.

LITZMAN J., *Základy vyšetření v klinické imunologii. 1.* Masarykova univerzita, Brno. 2007, str. 59.

MAĎAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ, J., *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada. 2006, 178 s. 136-137, ISBN 80-247-1673-9.

MAHMOOD, T., YANG PC., Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *Journal of Medical Science*, 4. 2012, 429-434.

MANČAL, P., *Metody enzymové imunoanalýzy*. Praha: Ústav sér a očkovacích látek. 1987, 83 s.

MARTIN S. E., MYERS E. R., *Foodborne Disease Handbook: Diseases Caused by Bakteria* (Hui Y. H., Richard Gorham J., Murrell K. D., ed.). 1994, sv. 1, kap. 11. Marcel Dekker, Inc., New York.

McCORMICK, J. K., YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P. M., Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55: 77-104.

MacPHEE, D. J., Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* Vol. 61. 2010, 171-177.

McKEEGAN, K. S., BORGES-WALMSLEY, M. I., WALMSLEY, A. R., Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends in Microbiology.* 2002, 10: S8-S14.

McMEEKIN T. A. (ed.), *Detecting Pathogens in Food.* Woodhead Publishing Limited. 2003, Cambridge.

METODICKÝ NÁVRH MZ ČR, Protiepidemická opatření u osob s nálezem meticilin rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA) v zařízeních sociálních služeb s pobytovou formou, *Nozokomiální nákazy.* 2010, č. 1, s. 7–8.

MLYNARCZYK, A., MLYNARCZYK, G. AND JELJASZEWICZ, J., The Genom of *Staphylococcus aureus*: A Review. *Zent. bl. Bakteriologie.* 1998, 287: 277–314.

MURRAY P. R., R. L., KEN S., PFALLER, MICHAEL A., *Medical microbiology,* Elsevier, Philadelphia. 2009. 960 s. ISBN 978-0-323-05470-6.

OLIVEIRA, D. C., TOMASZ, A. AND LENCASTRE, H., The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic background and the associated *mec* elements. *Microb. Drug. Resist.* 2001, 7: 349-361.

OMOE K., ISHIKAWA M., SHIMODA Y., HU D. L., UEDA S., SHINAGAWA, K., *Int. J. Food Microbiol.* 2002 40, 857.

PEACOCK, S. J., DE SILVA, I. AND LOWY, F. D., What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol.* 2001, Dec. 9 (12), 605-610, ISSN 1878-4380.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. *et al.*, *Hematologie a transfuzní lékařství II*. Praha: Grada Publishing, a.s. 2012, 192 s., ISBN 978-80-247-3460-6.

PETRÁŠ, P. *Taxonomické změny v rodu Staphylococcus*, *Zprávy CEM*. 1998, roč. 7, č. 9. ISSN 1211-7358.

PETRÁŠ, P., *Aktuality v taxonomii v rodu Staphylococcus*, *Zprávy CEM*. 2004, roč. 13, č. 7, s. 297-300. ISSN 1211-7358.

PINHO M. G., LUDOVICE A. M., WU S., DE LENCASTRE H., Massive reduction in methicillin resistance by transposon inactivation of the normal PBP2 in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 1997, 3: 409-413.

PINHO, M. G., FILIPE, S. R., DE LENCASTRE, H. AND TOMASZ, A., Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2a in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2001, 183: 6525-6531, ISSN 0021-9193.

POUROVÁ, E., MARYŠKOVÁ, J., MRSA–závažný problém. *Diagnóza v ošetrovatelství*. 2007, č. 5, s. 182.

RAMPACHOVÁ, V., MRSA infekcia v zdravotníckom prostredí. *Sestra a lekár v praxi*. 2010, č. 7–8, s. 19.

RASOOLY A., RASOOLY, R. S., *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 41, 205.

SAKOULAS, G., H. S. GOLD, L. VENKATARAMAN, P. C. DEGIROLAMI, *et al.*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *Journal of Clinical Microbiology*. Nov 2001, 39 (11), 3946-3951.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D., *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY 2344. 2001, (převzato z MacPhee, 2010).

SEDLÁČEK I., *Taxonomie stafylokoků*. Remedica. 1999, Klin. Mikrobiol. 3: 43-46.

SCHÄGGER H., VON JAGOW G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166. 1987, 368-379.

SCHLIEVERT P. M., CASE L. C., *Methods Mol. Biol.* 2007, 391, 113.

SCHUBERT-ULLRICH P., RUDOLF J., ANSARI P., GALLER B., FÜHRER M., MOLINELLI M., BAUMGARTNER S., Commercialized rapid immunoanalytical test for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 395. 2009, 69-81.

STREJČEK, J., LOKAJ, J., *Imunologie v klinické praxi*. Avicenum, Praha. 1985, 1. vydání, str. 293.

ŠRÁMOVÁ, H. aj., *Nozokomiální nákazy II.*, Praha: Maxdorf-Jessenius. 2001, ISBN 80-85912-25-2.

ŠTĚPÁN, J., PANT ŮČEK, R., DOŠKÁ Ŕ, J. Molecular Diagnostics of Clinically important Staphylococci, *Folia Microbiologic.* 2004, vol., 49, no. 4, p. 353-386.

ŠŤÁSTKOVÁ, Z., KARPÍŠKOVÁ, R., BORKOVCOVÁ, I., Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*. 2012, vol. 106, no. 4, p. 745-749.

TIEMERSMA E. W., BRONZWAER S. L., LYTIKAINEN O., DEGENER J. E., SCHRIJNEMAKERS P., BRUINSMA N., MONEN J., WITTE W., GRUNDMAN H., European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe*. 1999-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1627-1634.

URBÁŠKOVÁ, P., Antibiotika a antibiotická rezistence z hlediska mikrobiologa. *Remedia*. 2001, vol. 11, č. 3, s. 170-176.

URBÁŠKOVÁ, P., BÉBROVÁ, E., BERGEROVÁ, T., HENYŠOVÁ, J., HORNÍKOVÁ, M., CHMELAŘOVÁ, E., KOLÁŘ, M., MELTER, O., VANIŠ, V., *Mikrobiologický průkaz kmenů MRSA, GISA GRSA*. Zprávy CEM. 2003, 12: 164-171.

URBÁŠKOVÁ, P., MACKOVÁ, B., MELTER, O., *Disk s cefoxitinem – spolehlivá metoda pro vyhledávání kmenů stafylokoků rezistentních k oxacilinu*. Zprávy CEM. 2004, 13: 296-297.

URBÁŠKOVÁ, P. O EARS-Net v České republice, *Centrum epidemiologie a mikrobiologie* [online]. SZÚ Praha. ©2008 [cit. 6. 2. 2017]. Dostupné z: <<http://www.szu.cz/ears-net-4/o-earss-v-ceske-republice>>.

VAN LOO I., HUIJSDENS X., TIEMERSMA E., DE NEELING A., SANDE-BRUIJNSMA N., BEAUJEAN D., VOSS A., KLUYTMANS J., Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13: 1834-1839.

VESELÝ, D., Infekce MRSA – přístup k pacientům v domácí i nemocniční péči. *Zdravotnictví a medicína*. 2015, roč. 2015, č. 5, s. 35-36. ISSN: 2336-2987.

VOTAVA, M., *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun Brno. 2003, 1. vydání, dotisk 2006, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

VRÁNA, A., FELLNEROVÁ, I., VRÁNOVÁ, J., *Imunologie a imunomodulační terapie*. Univerzita Palackého v Olomouci. 2011, 1. vydání, str. 38-39, ISBN 978-80-244-2748-5.

WARREN, D. K., R. S. LIAO, L. R. MERZ, M. EVELAND, *et al.*, Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. Dec 2004, 42 (12), 5578-5581.

WERTHEIM, H. F. L., VOS, M. C., OTT, A., VAN BELKUM, A., VOSS, A., KLUYTMANS, J. A. J., VAN KEULEN, P. H. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E., MEESTER, M. H. M. AND VERBRUGH, H. A., Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*. 2004, Aug 21-27; 364 (9435), 703-5, ISSN 1474-547X.

WESTERMEIER R., *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. 4, Wiley-VCH. 2005, Weinheim, 406 stran.

YINDUO, J., *Methicillin-Resistant *Styphylococcus aureus*: (MRSA) Protocols*. New Jersey, Humana Press. 2007, 264 pp.

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Detekce MRSA pomocí fenotypových metod.....	31
Tab. 2 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgG.....	52
Tab. 3 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgM.....	53
Tab. 4 Tabulka ředící řady pro konjugát třídy IgA.....	53
Tab. 5 Optimální dělení na akrylamidovém gelu.....	58
Tab. 6 Kritéria validity softwaru Immunoblot TestLine, spol. s.r.o.....	67
Tab. 7 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1000.....	74
Tab. 8 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1500.....	75
Tab. 9 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2000.....	76
Tab. 10 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zbarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2500.....	77

Tab. 11 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:3000.....	78
Tab. 12 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:3500.....	79
Tab. 13 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,05 mg/ml	80
Tab. 14 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,10 mg/ml	80
Tab. 15 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,25 mg/ml	81
Tab. 16 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,40 mg/ml	81
Tab. 17 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,45 mg/ml	82
Tab. 18 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,50 mg/ml	82
Tab. 19 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:700.....	84
Tab. 20 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1000.....	85
Tab. 21 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1500.....	86
Tab. 22 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1700.....	87
Tab. 23 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:1800.....	88

Tab. 24 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2000.....	89
Tab. 25 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2300.....	90
Tab. 26 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgG 1:2500.....	91
Tab. 27 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,25 mg/ml	92
Tab. 28 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,28 mg/ml	92
Tab. 29 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,30 mg/ml	93
Tab. 30 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,33 mg/ml	93
Tab. 31 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,35 mg/ml	94
Tab. 32 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,38 mg/ml	94
Tab. 33 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,40 mg/ml	95
Tab. 34 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,43 mg/ml	95
Tab. 35 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,45 mg/ml	96
Tab. 36 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,48 mg/ml	96

Tab. 37 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,50 mg/ml	97
Tab. 38 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgG při koncentraci antigenu 0,52 mg/ml	97
Tab. 39 Tabulka opakovatelnosti výsledků pro konjugát IgG 1:1700	99
Tab. 40 Tabulka pro opakovatelnost IgG, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.....	100
Tab. 41 Tabulka reprodukovatelnosti výsledků pro konjugát IgG 1:1700.....	101
Tab. 42 Tabulka pro reprodukovatelnost IgG, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.....	101
Tab. 43 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgM 1:1000.....	103
Tab. 44 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:500.....	105
Tab. 45 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarvení linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:700.....	106
Tab. 46 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:1000.....	107
Tab. 47 Antigen PBP2a, hodnoty intenzity zabarv. linií [a.u.], ředění konjugátu IgA 1:1500.....	108
Tab. 48 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,25 mg/ml	109
Tab. 49 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,28 mg/ml	110

Tab. 50 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,30 mg/ml	110
Tab. 51 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,33 mg/ml	111
Tab. 52 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,35 mg/ml	111
Tab. 53 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,38 mg/ml	112
Tab. 54 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,40 mg/ml	112
Tab. 55 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,43 mg/ml	113
Tab. 56 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,45 mg/ml	113
Tab. 57 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,48 mg/ml	114
Tab. 58 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,50 mg/ml	114
Tab. 59 Diagnostická citlivost, diagnostická specifita a celková diagnostická shoda výsledků pro vybrané koncentrace konjugátu IgA při koncentraci antigenu 0,52 mg/ml	115
Tab. 60 Tabulka opakovatelnosti výsledků pro konjugát IgA 1:700.....	117
Tab. 61 Tabulka pro opakovatelnost IgA, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.....	117
Tab. 62 Tabulka reprodukovatelnosti výsledků pro konjugát IgA 1:700.....	119

Tab. 63 Tabulka pro reprodukovatelnost IgA, výpočet průměrné intenzity [a.u.], směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro jednotlivá měření, směrodatné odchylky a variačního koeficientu [%] pro celý rozsah.....119

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Systematické zařazení <i>S. aureus</i> dle Garrity.....	15
Obr. 2 Mikrofotografie kolonií <i>S. aureus</i> pořízena pomocí elektronového mikroskopu.....	16
Obr. 3 Kolonizace míst lidského těla druhem <i>S. aureus</i>	17
Obr. 4. Znázornění genomu <i>S. aureus</i>	21
Obr. 5 Distribuce složek genomu u kmene MRSA252.....	26
Obr. 6 Třídy <i>mec</i> genového komplexu vyskytující se u stafylokoků.....	27
Obr. 7 Molekula imunoglobulinu.....	35
Obr. 8 Zobrazení principů ELISY.....	40
Obr 9. Schematické znázornění tank a semi-dry varianty elektroblottingu.....	42
Obr. 10 Imunochromatografický test.....	45
Obr. 11 Hmotnostní proteinový standard.....	58
Obr. 12 Přístroj BioDot AD 1500.....	62
Obr. 13 Validační strip s pozicemi pro třídu IgG na membráně v milimetrech.....	63
Obr. 14 Upravená nitrocelulósová membrána po nanesení antigenu PBP2a.....	64
Obr. 15 Vzor protokolu pro detekci blot-line MRSA ve třídě IgG.....	65
Obr. 16 Princip blot-line testu a stručný pracovní postup.....	66
Obr. 17 Kompletní sada soupravy blot-line MRSA.....	71
Obr. 18 Polyakrylamidový gel o hustotě 12 % získaný pomocí SDS-PAGE, 4 bakteriální klony.....	72
Obr. 19 Polyakrylamidový gel o hustotě 12 % získaný pomocí SDS-PAGE, klon č. 2.....	73

