



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Vyšetření specifických IgG pomocí metody ELISA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Kamila Bicanová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph. D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vyšetření specifických IgG pomocí metody ELISA*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3.5.2022

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce Ing. Tomášovi Nixovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, přínosné rady a za čas, který mi věnoval.

Vyšetření specifických IgG pomocí metody ELISA

Abstrakt

Cílem této práce je stanovit hodnoty specifických IgG anti-SARS-CoV-2 pomocí metody ELISA u vybraných osob a zhodnotit, zdali je kit QuantiVac ELISA (IgG) vhodný ke stanovení.

V teoretické části je bakalářská práce zaměřena na imunochemické metody. Imunochemické metody jsou založené na vzájemné interakci antigenu a protilátky. Díky imunochemickým metodám můžeme stanovit přítomnost specifických protilátek. Jednou z významných imunochemických metod je ELISA neboli Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA je speciálním druhem enzymové imunoanalýzy. Základním principem je interakce antigenu a protilátky za vzniku imunokomplexu. Aby byl tento imunokomplex měřitelný, musí se přidat konjugát, který způsobí barevnou reakci.

Praktická část je zaměřená na vyšetření specifických protilátek třídy IgG proti SARS-CoV-2. Bylo vyšetřováno šestnáct vzorků lidského séra. Vyšetřované sérum bylo od osob různých věkových skupin. Séra byla od osob s očkováním, s očkováním a prodělaným onemocněním Covid 19, neočkovaných s prodělaným onemocněním Covid 19 anebo od neočkovaných osob co neprodělaly onemocnění Covid 19.

Dále bylo měřeno šest kalibrátorů, pozitivní a negativní kontrola. Celkem bylo obsazeno 24 mikrotitračních jamek. Byla použita testovací sada Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA od firmy EUROIMMUN. Vše bylo měřeno pomocí fotometru DYNAREAD a zpracováno pomocí softwaru AlaDYN. Výsledkem byly různé hladiny protilátek. Z šestnácti vzorků sér vyšly 2 vzorky jako negativní, jeden vzorek vyšel jako hraniční a 13 vzorků vyšlo pozitivně.

Klíčová slova

ELISA, AlaDYN, QuantiVac, SARS-CoV-2, IgG

Examination of specific IgGs with the ELISA method

Abstract

The aim of this study is to determine the levels of specific IgG anti-SARS-CoV-2 by ELISA in selected individuals and to evaluate whether the QuantiVac ELISA (IgG) kit is suitable for the determination.

In the theoretical part, the bachelor thesis focuses on immunochemical methods. Immunochemical methods are based on the interaction between antigen and antibody. Thanks to immunochemical methods we can determine the presence of specific antibodies. One of the important immunochemical methods is ELISA or Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA is a special type of enzyme immunoassay. The basic principle is the interaction of antigen and antibody to form an immunocomplex. In order for this immunocomplex to be measurable, a conjugate must be added to cause a colour reaction.

The practical part is focused on the testing of specific IgG antibodies against SARS-CoV-2. Sixteen human serum samples were examined. The serum samples were from people of different age groups. The sera were from vaccinated persons, vaccinated persons with a history of Covid 19 disease, unvaccinated persons with a history of Covid 19 disease, or unvaccinated persons without a history of Covid 19 disease.

In addition, six calibrators, a positive and a negative control were measured. A total of 24 microtiter wells were occupied. The Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA kit from EUROIMMUN was used. All measurements were performed using a DYNAREAD photometer and processed using AlaDYN software. The results were different levels of antibodies. Out of 16 serum samples, 2 samples came out negative, one sample came out borderline and 13 samples came out positive.

Key words

ELISA, AlaDYN, QuantiVac, SARS-CoV-2, IgG

Obsah

Úvod.....	8
1 Imunitní systém	9
2 Protilátky	9
2.1 Polyklonální protilátky	11
2.2 Monoklonální protilátky.....	11
2.2.1 Monoklonální protilátky pro léčbu a prevenci onemocnění COVID-19 ..	11
3 Imunochemické metody	12
3.1 Precipitační imunochemické metody	12
3.2 Neprecipitační imunochemické metody se značkou	14
4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	16
4.1 Přímá	17
4.2 Nepřímá.....	17
4.3 Kompetitivní	18
4.4 Nekompetitivní.....	18
4.5 Uplatnění metody ELISA ve virologii	19
4.6 Neprecipitační imunochemické metody bez značky	20
4.6.1 Imunoafinitivní chromatografie	20
4.6.2 Imunosenzory.....	20
5 Onemocnění SARS-CoV-2	21
5.1 Detekce onemocnění	22
5.2 Vakcinace proti onemocnění COVID-19.....	23
5.3 Dopad onemocnění COVID-19.....	24
5.4 Dopad na ochranu přírody.....	24
6 Cíl práce.....	25
7 Vlastní práce	26
7.1.1 Princip metody	26
7.1.2 Obsah testovací sady	27
7.1.3 Pomůcky a přístroje	28
7.1.4 Odběr vzorků	29
7.1.5 Příprava lidského séra	30
7.1.6 Příprava promývacího pufu	30
7.1.7 Pipetovací protokol	31
7.1.8 Stanovení	32

7.2	Přístroj DYNAREAD.....	33
7.2.1	Ovládání přístroje	33
7.3	Softwar AlaDYN.....	33
7.3.1	Tvorba a editace testu	34
7.3.2	Zpracování dat	34
7.3.3	Spuštění testu	36
8	Výsledky.....	37
9	Diskuse	41
10	Závěr.....	44
11	Literatura	45
12	Seznam zkratk.....	49
13	Přílohy	50

Úvod

Po prodělání infekce nebo po očkování se vyvíjí v našem těle specifická imunitní odpověď. U většiny lidí dochází po aktivaci specifické imunitní reakci k tvorbě protilátek a aktivaci T buněčné imunity. Nejprve vznikají při onemocnění IgM protilátky a poté nastupují protilátky třídy IgG, které jsou v krvi přítomny dlouhodobě. Protilátky lze stanovit metodou ELISA. ELISA je imunochemická metoda, která je založena na vzájemné interakci antigenu s protilátkou. Po vzájemné interakci vzniká imunokomplex. Aby mohl být imunokomplex detekován, musí být přidán konjugát, který způsobí barevnou reakci. Tato metoda může přispět ke stanovení protilátek nebo k laboratorním výzkumům.

Bakalářská práce bude zaměřena v teoretické části na imunochemické metody s podrobnějším zaměřením na metodu ELISA a na poměrně nové onemocnění Covid 19, které způsobilo pandemii po celém světě. Onemocnění Covid 19 způsobuje těžké respirační onemocnění, které mohou provázet bolesti, hlavy, horečka a únava. V praktické části se bakalářská práce bude zabývat vyšetřením specifických protilátek třídy IgG proti SARS-CoV-2. Ke stanovení bude použit fotometr DYNAREAD od firmy DYNEX, software AlaDYN a testovací sada QuantiVac ELISA od firmy Euroimmun. Bude podrobně popsáno použití a popis přístroje DYNAREAD. Dále bude popsána práce se softwarem AlaDYN a bude popsán i obsah testovací sady QuantiVac ELISA. Praktická část bude zahrnovat i odběr krve, ředění lidského séra a přípravu promývacího roztoku.

Bude vyšetřováno celkem šestnáct vzorků lidských sér. Vzorky budou vybrány tak, aby osoby, které poskytnou krev ke stanovení protilátek byly po prodělání onemocnění, očkovaný, očkovaný a po prodělání onemocnění anebo neočkovaný a bez prodělání onemocnění. Tímto výběrem lze předpokládat pozitivní i negativní výsledky. V dalších mikrotitračních jamkách bude šest kontrolních kalibrátorů, pozitivní a negativní kontrola. Celkem bude měřeno 24 hodnot. Tyto hodnoty budou následně zhodnoceny.

1 Imunitní systém

Imunitní systém je schopen v našem těle udržovat vnitřní homeostázu. Základní vlastností imunitního systému je rozpoznávat škodlivé od neškodlivého, a to jak z vnitřního, tak i zevního původu. Dle hrozby jsou škodliviny buď likvidovány anebo tolerovány (Bartůňková, 2011). Díky rozpoznávání škodlivin chrání imunitní systém organismus. Tato funkce se projevuje jako obranyschopnost, kdy díky rozeznávání škodlivin brání tělo před patogenními mikroorganismy a toxiny, které mohou produkovat. Díky autotoleranci rozpoznává imunitní systém vlastní tkáň organismu. Dále imunitní systém průběžně odstraňuje staré, poškozené nebo zmutované buňky (Hořejší, 2017). Stejně jako nervová soustava má imunitní systém schopnost učení a paměti. Imunitní systém můžeme rozdělit na nespecifickou a specifickou imunitu (Bartůňková, 2011). Nespecifická neboli vrozená imunita je evolučně starší. Molekuly a buňky jsou v těle předem připraveny bojovat proti patogenům. Jedná se především o fagocytující buňky a cytotoxické buňky. Specifická imunita reaguje na každou cizorodou látku prostřednictvím T lymfocytů nebo protilátkou. Typický pro specifickou imunitu je imunologická paměť (Hořejší, 2017).

2 Protilátky

Koncem 19. století už lidé věděli, že u lidí a zvířat obsahuje krevní sérum jakési látky, které po prodělání onemocnění dokážou jedince ochránit před opakovaným onemocněním. Sérum dokázalo shlukovat mikrobiální onemocnění, vysrážet rozpustné antigeny a zneškodňovat toxiny. Roku 1891 je pan Paul Ehrlich pojmenoval jako protilátky. V roce 1908 dostal Nobelovu cenu spolu s panem Iljou Iljičem Mečnikovem za vypracování první teorie tvorby protilátek. Protilátky jsou základními molekulami imunitního systému. Patří mezi imunoglobuliny (Ferenčík, 2005). Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které jsou sekretovány z plazmatických buněk a plasmablastů. Imunoglobuliny na sebe vážou antigen, kdy antigenem může být nějaký protein, glykoprotein, sacharid, DNA, fosfolipid nebo nízkomolekulární látka (Křupka, 2017).

Rozlišujeme pět tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Imunoglobuliny IgG a IgM jsou protilátky, které cirkulují v krvi a jsou tvořeny při specifické imunitní reakci na antigen (Ferenčík, 2005).

Imunoglobulin G

IgG tvoří asi 75 % z celkového počtu imunoglobulinů. Je schopen projít placentou (Kopřiva, 2011). IgG se vážou více na antigen a přetrvávají dlouhou dobu v organismu. IgG, které jsou obsaženy v séru představují různé protilátky, se kterými se člověk setká v průběhu svého života (Bartůňková, 2011). Imunoglobuliny G se vyskytují jako monomery. Jeho podtřídy jsou IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Mayer, 2017). Jeho koncentrace v séru je 8-18 g/l. Biologický poločas má 21 dní (Strašík, 2014).

Imunoglobulin M

Imunoglobulin M se skládá z pěti molekul spojených v jeden celek (pentamer). V imunitní reakci se tvoří jako první (Bartůňková, 2011). Tvoří asi 3-10 % z celkového podílu imunoglobulinů. U novorozenců zvířat se IgM tvoří jako první protilátka (Kopřiva, 2011). Biologický poločas má 6 dní a koncentrace v séru je 0,9-2,5g/l (Strašík, 2014).

Imunoglobulin A

15-20 % z celkového počtu imunoglobulinů tvoří imunoglobulin A, který se vyskytuje například v kolostru, slinách, slzách či sekretu nosní sliznice (Kopřiva, 2011). Hlavní úkol IgA je neutralizovat antigeny, které se dostanou na sliznice (Bartůňková, 2011). Může neutralizovat viry. V séru se nachází jako monomer. (Kopřiva, 2011) Koncentrace je 0,9-3,5g/l a biologický poločas je 6 dní (Strašík, 2014).

Imunoglobulin D

Koncentrace IgD v séru je velmi nízká. Nachází se na B lymfocytech, kde je uchycen na membráně a tvoří receptor pro antigen BCR (Bartůňková, 2011). Koncentrace je 0,1g/l a biologický poločas rozpadu má 3dny (Strašík, 2014).

Imunoglobulin E

IgE je termolabilní imunoglobulin, který má velmi nízký zastoupení (Kopřiva, 2011). Jeho funkcí je ochrana proti mnohobuněčným parazitům (Bartůňková, 2011). Účastní se také alergických reakcí, díky vazbě na bazofily a mastocyty. Zvýšené hladiny imunoglobulinu E mohou poukazovat na atopické kožní problémy jako například ekzémy, sennou rýmu nebo astma (Mayer, 2017). V séru zdravích lidí je pouze v hladině 3×10^{-4} g/l a biologický poločas rozpadu má 2 dny (Strašík, 2014).

2.1 Polyklonální protilátky

Na základě stimulace specifických B lymfocytů dochází k produkci množství protilátek. Jelikož je stimulované velké množství různých lymfocytů, vzniká velké množství různých klonů B-lymfocytů. Jednotlivé klony produkují protilátky, které se mírně odlišují ve vazbě na protilátku (Labguide, 2014-2019). Polyklonální protilátky jsou spíše směsí odlišných klonů imunoglobulinů (Hořejší, 2017). Jelikož sérum obsahuje heterogenní směs protilátek, jsou polyklonální protilátky schopny rozpoznávat různé epitopy na jednom antigenu. Jsou tvořeny především imunoglobuliny třídy G (Labguide, 2014-2019).

2.2 Monoklonální protilátky

První generování monoklonálních protilátek bylo v roce 1975 panem Georgem Kohlerem a panem Cesarem Milsteinem (SinoBiological, 2007-2022).

Monoklonální protilátky, oproti polyklonálním protilátkám, jsou produkcí jednoho klonu B lymfocytů. Detekují na antigenu pouze jeden epitop (Labguide, 2014-2019).

Monoklonální protilátky představují identické kopie imunoglobulinů. Ty mají stejnou primární strukturu a stejnou specifitu vazebných míst (Beránek, 2016). V organismu se mohou monoklonální protilátky objevovat v nepatrném množství. Výjimkou je patologický stav, kdy mohou monoklonální protilátky převládat. Tento případ se může objevit například v případě nádoru z plazmatických buněk tzv. plazmocytomu (myelomu) (Hořejší, 2017).

2.2.1 Monoklonální protilátky pro léčbu a prevenci onemocnění COVID-19

Výzkumné skupiny vědců izolovaly monoklonální protilátky z pacientů, kteří prodělali SARS-CoV-2. Neutralizační monoklonální protilátky se zaměřují na povrchový spike glykoprotein, který zprostředkovává vstup do hostitelské buňky. Neutralizační monoklonální buňky blokuje interakci mezi virovou špičkou a receptorem ACE2. Monoklonální protilátky mají být použity k léčbě infekce nebo jako prevence před onemocněním. Většina lidí si po prodělání onemocnění vytvoří buněčnou humorální imunitu. Pacientům, kteří prodělali onemocnění COVID-19 byla odebrána rekonvalescentní plazma a byla podána pacientům s těžkým průběhem onemocnění. Úspěch ve výzkumu rekonvalescentní plazmy slouží spíše k inspiraci pro vývoj a použití monoklonálních protilátek (Marovich, 2020).

3 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na vzájemné interakci mezi antigenem a protilátkou (Beránek, 2016). Nejčastěji je interakce protilátek s antigenem, heptenem, složkami komplementu, popř. buněčnými receptory. Nejvíce se využívá protilátka s antigenem (heptenem) za tvorby imunokomplexu (Králová a kol., 2008). Díky imunochemickým metodám prokazujeme nebo stanovujeme právě přítomnost specifických protilátek proti antigenu (Švecová, 2018).

Používají se in vitro protilátky v podobě antiséra, globulinové frakce antiséra, IgG frakce, specifických IgG izolovaných afinitní chromatografií, fragmentů molekuly IgG, nebo monoklonálních či rekombinantních protilátek (Králová a kol., 2008).

Imunochemické metody našly velké uplatnění především v lékařské chemii a při stanovení některých analytů jsou nezastupitelné. Mezi přednosti patří vysoká citlivost a specifická interakce antigenu s protilátkou (Káš a kol., 2005).

3.1 Precipitační imunochemické metody

Nejjednodušší imunochemické metody využívají sekundárního jevu, který za určitých podmínek doprovází vznik imunokomplexu. Je jím vypadnutí imunokomplexu z roztoku v podobě viditelného precipitátu (imunoprecipitace). Zatímco k vytvoření rozpustného imunokomplexu dochází za jakéhokoliv poměru koncentrací antigenu a protilátek v roztoku, imunoprecipitát se vytváří pouze v určitém rozmezí poměru těchto koncentrací. Oblast optimálních koncentrací se nazývá zóna ekvivalence (poměr počtu molekul antigenu a protilátky je zde blízký hodnotě 1:1). Výrazný nadbytek jednoho z partnerů imunointerakce brání vzniku precipitátu (Králová a kol., 2008).

Precipitační reakci odlišuje od reakce aglutinační pouze rozdílná charakteristika antigenu. Antigen je nekorpuskulární, nízké molekulové hmotnosti. Tím je daná jeho „rozpustnost“ tj. schopnost existence v pravém roztoku (nikoliv suspenzi). Precipitační reakce lze provádět v tekutém (vodném) nebo polotekutém (semisolidním, gelovém) prostředí (Král, 2020).

3.1.1.1 Precipitace v roztoku

Při precipitační reakci integruje rozpustný antigen s protilátkou za tvorby nerozpustného precipitátu. Průběh tvorby lze sledovat prostřednictvím změn optických vlastností reakčního roztoku. Tak lze kvalitativně posuzovat přítomnost příslušného antigenu nebo protilátky ve vzorku pouze zrakem, kdy se hodnotí, zda se vytvořil či nevytvořil viditelný precipitát (Králová a kol., 2008). Intenzita precipitátu je při konstantním množství přidané protilátky úměrná koncentraci vyšetřovaného antigenu. K měření intenzity zákalu se používají dvě metodiky a to turbidimetrie (měří množství procházejícího světla) a nefelometrie (měří množství světla rozptýleného při průchodu paprsku). Obě metodiky umožňují kvantitativní stanovení obsahu proteinu ve vzorku odečtem z kalibrační křivky. Pro její sestavení se používají standardizované vzorky o známé koncentraci proteinů (tzv. standardy, kalibrátory) a počítačové zpracování získaných dat pomocí firemních programů (Král, 2020).

3.1.1.2 Imunoprecipitace v gelu

Imunoprecipitační reakce v gelu jsou založeny na difuzi látek v prostředí koncentračního gradientu. Antigeny i protilátky difundují polotekutou strukturou gelu a v místě, kde koncentrace antigenu i protilátky dosáhnou optimálního (ekvimolárního) poměru, vzniká makroskopicky zřetelný precipitát. Precipitační zóna je označována taky jako zóna ekvivalence. Mimo tuto zónu jsou podmínky pro vznik precipitátu neoptimální (Král, 2020). Rychlost difuze látek se u některých technik zvyšuje působením stejnosměrného proudu. Nejčastěji používaný formát je tvořen 1 mm vysokou vrstvou agarového nebo agarózového gelu na skleněné desce. Difunduje-li do gelu antigen i protilátka, pak se jedná o dvojitou imunodifuzi. Pokud difunduje pouze jeden imunoreaktant (většinou antigen), a druhý je v gelu homogenně rozptýlen, jedná se jednoduchou imunodifuzi (Králová a kol., 2008).

3.2 *Neprecipitační imunochemické metody se značkou*

Tato skupina metod je založena na myšlence detekovat či stanovit tak nízké koncentrace antigenu a protilátky, které neumožňují vznik imunoprecipitátu anebo je jeho množství tak malé, že nemůže být sledován precipitačními imunochemickými metodami. Stanovení imunokomplexu antigen-protilátka lze zcitlivět navázáním vhodné značky na jednoho z imunoreaktantů ještě před ukončením jejich interakce. Prostřednictvím intenzivního měřitelného signálu značky je pak možno sledovat i velice malá množství vzniklého imunokomplexu, která by za použití precipitačních technik byla nedetekovatelná. Tyto metody dovolují imunochemicky stanovit analyty charakteru heptenů. K uvedenému značení imunoreaktantů jsou vhodné některé enzymy (enzymová imunoanalýza, zkráceně EIA), fluorescenční a chemiluminiscenční látky (fluorescenční imunoanalýza, FIA), radionuklidy (radioimunoanalýza, RIA), i některé jiné látky (Králová a kol., 2008).

3.2.1.1 *Fluorescenční imunoanalýza FIA*

Jako značka se používá molekula fluorochromu a detekce signálu se provádí fluorometricky (Král, 2020). Mezi metodami FIA jsou nejčastěji zastoupeny kompetitivní homogenní metody, při kterých není třeba separovat volný a v imunokomplexu vázaný značený antigen. Jejich podstatou je skutečnost, že navázání protilátky na značený antigen zapříčiní určité změny ve fluorescenčních vlastnostech značky (Králová a kol., 2008). V posledních 20 letech se podařilo převést metodiku heterogenních imunoesejí do automatizovatelného strojového provedení těchto testů (Král, 2020).

3.2.1.2 Radioimunoanalýza RIA

Radioimunoanalýza (RIA, Radio-Immuno Assay) je historicky významná jako první metoda s následnou detekcí vyvinutá pro kvantitativní stanovení analytů (60. léta 20. století). Metoda je založena na detekci reakce antigen-protilátka pomocí radioaktivního izotopu (nejčastěji ¹²⁵I) jako značky navázané na jednu ze složek reakce. Testy RIA mohou probíhat jednak na povrchu pevné fáze, nejčastěji na stěně zkumavky (jamky, kyvety), nebo ve fázi kapalné. Pokud probíhají na pevné fázi, jejich princip je velmi blízký ELISA testům (heterogenní, nekompetitivní metoda) Pouze s tím rozdílem, že je místo enzymů použit radioizotop (IRMA, Immuno Radiometric Assay). Ke zjištění intenzity reakce není třeba přidávat žádný substrát, ale po závěrečném promytí se změří intenzita radioaktivního záření. V současnosti je ale většina RIA aplikací nahrazena neizotopovými imunoanalytickými metodami. Metodami RIA jsou doposud stanovovány některé hormony, vitamíny, a jejich metabolity a některé speciální autoprotilátky, např. vyšetření protilátek proti acetylcholinovému receptoru u myasthenia gravis, protilátky proti insulinu nebo proti receptoru pro TSH (Král, 2020).

3.2.1.3 Enzymová imunoanalýza

Enzymová imunoanalýza (zkratka EIA) je skupina imunoanalytických metod, které ve fázi detekce používají enzymovou reakci. Enzym je přitom kovalentně vázán na některý z reaktantů (dle uspořádání testu může být detekčním reagens antigen nebo protilátka). Značení Ag enzymem je méně obvyklé (Král, 2020). Imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňují stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky, obecně analytu. Indikátor imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu je reakci možno detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky. EIA metody lze rozdělit na heterogenní (vyžaduje separaci volné a vázané frakce analytu) a homogenní (nevyžadují tuto separaci). Heterogenní EIA mohou být kompetitivní (buď se značenou protilátkou, nebo značeným antigenem), nebo nekompetitivní (se značenou protilátkou) (Bartůňková a Paulík 2011).

4 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Základní princip techniky ELISA sahá do roku 1941 (Yadin, 2020). V roce 1971 byla vynalezena na Stockholmské univerzitě metoda ELISA vědcem Peterem Perlmannem a vědkyní Evou Engvallovou (SinoBiological, 2007-2022).

Tito vědci modifikovali metody RIA a tím vznikla metoda ELISA. Tuto novou metodu použili ke stanovení hladin IgG v králičím séru. V roce 1972 ji využil Carlson a kolegové. K diagnostické mikrobiologii byla použita vědci o rok později. Dále byla ELISA v roce 1974 použita v parazitologii na přítomnost trichinelózy a v roce 1975 k diagnostice malárie. V dalších letech byla metoda použita k identifikaci infekcí viru chřipky, parainfluenzy a příušnic. V roce 1980 byl ELISA test upraven panem Sieglem a kolektivem. Začlenili mikrotitrační destičky k identifikaci koncentrací různých hormonů, proteinů a peptidů. Postupem času se tato metoda stala používanou metodou v laboratořích po celém světě (Yadin, 2020).

ELISA je speciálním druhem EIA. V současné době je drtivá většina metod postavena právě na principu heterogenní kompetitivní EIA se značnou protilátkou, tedy ELISA. Reakce probíhá tak, že protilátka je navázaná na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustaví rovnováha. Nenavázaný konjugát je odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen (Bartůňková a Paulík, 2011).

Testy ELISA jsou v současné době zřejmě nejčastěji využívanými metodikami používanými jak v imunologických, tak v jiných klinických laboratořích k průkazu řady specifických protilátek (antivirových, antibakteriálních, autoprotilátek) nebo antigenů. Vysoká analytická citlivost testu umožňuje průkaz analytů s nízkou koncentrací ve vyšetřovaných vzorcích, např. virových a antibakteriálních antigenů, cytokinů, specifického IgE, nádorových markerů typu karbohydrátových antigenů (Král, 2020).

4.1 Přímá

Přímá ELISA je považována za nejjednodušší formu metody ELISA. Metoda probíhá tak, že se přidá antigen k pevné fázi a při inkubaci se pasivně absorbuje. Po inkubaci se navázaný antigen smyje a zůstává pouze „potažená“ pevná fáze. Přidají se specifické protilátky pro antigen, které jsou značené enzymem (konjugátem) a jsou dále inkubovány. Konjugát s antigenem se naváže na pevnou fázi a nenavázaný konjugát je následně vymyt. Přidá se roztok substrátu/chromogenu a enzym katalyzuje reakci, čímž je získán barevný produkt. Reakce je později zastavena a zbarvení se čte pomocí spektrofotometru (Crowther, 2009).

4.2 Nepřímá

Fáze u nepřímé metody ELISA jsou první dvě fáze podobné jako u přímé metody ELISA. Ve třetí fázi se přidají neznačené detekční protilátky, které jsou naředěné v pufru, aby se zabránilo nespecifickému připojení proteinů v antiséru na pevnou fázi. Dále dochází k inkubaci a následně k vymytí nenavázaných protilátek. Přidají se protilátky značené konjugátem (enzymem), které jsou namířené proti konkrétním druhům, ve kterých byly původní protilátky produkovány. Přidá se substrát/chromofor, který způsobí barevnou reakci. Reakce je následně zastavena a zbarvení odečítá spektrofotometr (Crowther, 2009).

Výhodou nepřímé metody je, že dokáže vyšetřit pomocí jednoho proti druhového konjugátu jakýkoliv počet antisér na vazbu k danému antigenu. Tyto systémy byly intenzivně využívány při screeningu velkého množství vzorků. Jediný problém, který systémy mají je různý stupeň nespecifické vazby v jednotlivých sérech. To má tendenci rozšiřovat rozptyl ve výsledcích testu, a proto zvyšuje potřebu zpracovat mnoho sér pro posouzení spolehlivosti (Crowther, 2009)

4.3 Kompetitivní

K detekci antigenu nebo haptenu se často používá technika ELISA využívající kompetitivní vazebnou reakci na pevné fázi (Zajoncová, 2009).

V kompetitivní metodě ELISA je neznačená protilátka navázána na substrát (mikrotitrační destička). Tato primární protilátka se poté inkubuje s neznačenými standardy nebo se vzorky, které se mají změřit. Když reakce dosáhne rovnováhy, přidá se konjugovaný antigen nebo protilátka, na kterou je navázaný enzym. Primární protilátka váže konjugát všude kde se navázala na neznačený antigen. Platí tedy, že čím více antigenu je ve vzorku nebo standardu, tím méně konjugovaného antigenu lze vázat. Díky barevné reakci, kterou poskytuje substrát lze reakci změřit. Výhodou kompetitivní metody ELISA je, že lze použít nečištěnou protilátku. V kompetitivní metodě ELISA je poměr mezi koncentrací hledaného antigenu a silou signálu nepřímo úměrný, tj. Čím nižší je síla signálu, tím větší je množství požadovaného proteinu ve vzorku. (antibodies-online, 2022).

4.4 Nekompetitivní

Nekompetitivní neboli sendvičová metoda měří množství antigenu mezi dvěma vrstvami protilátek. Aby se při nekompetitivní metodě ELISA mohly navázat alespoň dvě různé protilátky musí mít antigen alespoň dvě vazebná místa. Využívá se, když je koncentrace antigenu nízká nebo naopak vysoká koncentrace jiných antigenů, které kontaminují vzorek (antibodies-online, 2022).

Základem stanovení antigenů jsou polystyrenové kuličky s adsorbovaným nadbytkem specifické protilátky (většinou monoklonální) proti antigenu. Zbytek nenavázaného materiálu odstraníme a pomocí další enzymem značené protilátky stanovíme množství antigenu. Po druhé inkubaci a separaci nadbytečného nenavázaného konjugátu, je stanovena aktivita enzymu, který je navázaný na sendviči, přidáním vhodného substrátu. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné množství antigenu ve vzorcích. Jestliže je druhá protilátka monoklonální, mohou se obě protilátky přidat současně, což značně zkrátí celkovou dobu analýzy. Změna zabarvení je přímo úměrná množství antigenu ve vzorku. Vhodným enzymem pro značení bývá alkalická fosfatáza (Zajoncová, 2009).

4.5 Uplatnění metody ELISA ve virologii

Metoda ELISA umožňuje detekci virových Ag přímo ve vyšetřovaném materiálu a vysoce citlivý průkaz specifických protivirových Ab, včetně identifikace jejich izotopu. Dovoluje vyšetřování nejširšího spektra virových nákaz jednotnou metodikou při využití mechanizace a automatizace. Ideální pomůckou pro uplatnění metody ELISA v diagnostické praxi jsou kvalitní komerční soupravy, zabezpečující standardní podmínky laboratorního průkazu jednotlivých infekcí. Při stanovení protivirových Ab metodou ELISA má významnou úlohu čistota Ag. Průkaz virových Ag metodou ELISA v materiálech odebraných v akutní fázi onemocnění se výhodně uplatňuje zejména při rychlém průkazu nákazy vyvolaných obtížně kultivovatelnými viry nebo u virových infekcí s krátkou inkubační dobou. Používá se pro vyšetření sér u infekcí HBV, stolic u podezření z virové hepatitidy A, infekcí rotavirových, adenovirových nebo enterovirových nebo při stanovení cytomegaloviru v moči. Stále častěji je metoda ELISA využívána pro detekci virových Ag v sekretech dýchacích cest při rychlé diagnostice respiračních nákaz vyvolaných např. RS virem, adenoviry a viry parainfluenzy. Alternativní možností rychlého laboratorního průkazu virových infekcí je stanovení specifických IgM v séru, popř. likvoru (zejména u onemocnění s delší inkubací, kde je na začátku klinických příznaků protilátková odpověď již rozvinuta) (Procházková, 1986).

4.6 Neprecipitační imunochemické metody bez značky

4.6.1 Imunoafinitivní chromatografie

Imunoafinitivní chromatografie je stejně jako každá bioafinitní chromatografie založena na specifické nekovalentní interakci mezi ligandem, který je kovalentně navázan na pevném nosiči, a látkou, kterou chceme izolovat z roztoku. Tady jsou partnery v interakci antigen a protilátka. Častější uspořádání imunoafinitní chromatografie představuje izolaci antigenu z biologického vzorku pomocí imunosorbentu (imobilizované protilátky). Ale obdobně lze realizovat i obrácený postup k separaci protilátek na nosiči se zakotveným antigenem (Králová a kol., 2008).

4.6.2 Imunosenzory

Imunosenzory neboli samostatná elektrická zařízení, jsou zařízení, díky kterým můžeme sledovat přímo nebo nepřímo interakce mezi protilátkou a antigenem. Díky přímým sensorům můžeme monitorovat změnu koncentrace analytu v mediu. Měří se změny elektrických nebo optických vlastností ve vrstvě ze speciálního materiálu, na kterém jsou imobilizované protilátky po interakci protilátky s antigenem. Nepřímé imunosenzory jsou zařízení s potenciometrickými nebo amperometrickými elektrodami, které v kvantifikační koncepci enzymové imunoanalýzy umožňují na základě elektrochemického stanovení produktu enzymové reakce kvantifikovat antigen. Měří se výsledek interakce, nikoliv vlastní děj (Králová a kol., 2008).

5 Onemocnění SARS-CoV-2

Těžký akutní respirační syndrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2) je vysoce přenosný a patogenní koronavirus. Objevil koncem roku 2019 vyvolal pandemii akutního respiračního onemocnění s názvem „koronavirová nemoc 2019“ (COVID-19), která ohrožuje zdraví člověka. Poprvé se nový virus objevil v čínském městě Wuhan. Dne 31.prosince zdravotnická komise ve Wu-chanu nahlásila Světové zdravotní organizaci propuknutí pneumonie z neidentifikovatelné příčiny. Odtud se vysoce nakažlivé onemocnění rozšířilo po celé zemi. Genetické důkazy naznačují, že virus SARS-CoV-2 není uměle vytvořen a pravděpodobně vznikl u zvířat. Zatím není známo, kde poprvé vir nakazil člověka. Nejbližší příbuzný viru SARS-CoV-2, který detekovali vědci z provincie Yunnan je netopýří koronavirus. Tento netopýří koronavirus má z 96,2 % totožnou sekvenaci genu s virem SARS-CoV-2. Díky této vysoké podobnosti se podporuje hypotéza, že vir SARS-CoV-2 pravděpodobně pochází z netopýřů (Hu a kol., 2020).

Koronaviry mají největší genom ze všech RNA virů. Genom viru SARS-CoV-2 má 29800 bází, které kódují 4 strukturální a 16 nestrukturálních proteinů. Vir SARS-CoV-2 běžně využívá buňku pro svůj prospěch například ke své replikaci. Jedna z nejdůležitějších ochran viru proti vrozené buněčné imunitě je takzvaná čepička. Specifické uspořádání na 5' konci molekuly RNA, která se skládá z N-methylového guanosintrifosfátu a C2'-O-methyl-ribosyladeninu. Toto uspořádání, které připomíná nativní mRNA hostitelských buněk, stabilizuje a zajišťuje proces translace RNA (Krafčíková a kol., 2020).

U lidí s onemocněním COVID-19 byla hlášena celá řada příznaků, od mírných až po závažné. Mezi příznaky patří horečka, zimnice, kašel, dušnost, problémy s dýcháním, únava, bolest svalů a těla, bolest hlavy, ztráta chuti nebo čichu, bolest krku, rýma nebo ucpaný nos, nevolnost nebo zvracení, průjem. Starší lidé a lidé s vážnými zdravotními problémy, jako jsou srdeční nebo plicní onemocnění nebo cukrovka, mají vyšší riziko vzniku závažnějších komplikací způsobených onemocněním COVID-19 (National Center for Immunization and Respiratory Diseases, 2021)

5.1 Detekce onemocnění

Nejsnazší způsob, jak získat vzorek je výtěrem ze zadní stěny nosohltanu, z ústní dutiny nebo z krku. U hospitalizovaných pacientů můžeme odebrat vzorek z dolních cest dýchacích, kde je vyšší pravděpodobnost výskytu viru. Vir můžeme detekovat pomocí RT-PCR testu. Výsledek může být v preanalytické fázi nepřesný například díky špatnému transportu, špatnému odběru nebo fázi onemocnění. Laboratoř sděluje kvalitativní výsledek RT-PCR testu. Dále můžeme využívat antigenních rychlotestů. Ty jsou založeny na průkazu různých proteinů SARS-CoV-2. Výhodou antigenních testů je jejich nízká cena a rychlost provedení. Bohužel senzitivita u antigenních testů je dostačující pro pacienty s vysokou virovou náloží. Onemocnění můžeme také detekovat pomocí serologických testů, které jsou založené na průkazu IgG, IgM nebo IgA protilátek. Bohužel má své nevýhody. V akutní fázi není sérologie užitečná. Nevypovídá o délce onemocnění a specificita je ovlivněna potencionálem pro zkříženou reaktivitu protilátek s jinými koronaviry. Protilátky proti SARS-CoV-2 se začínají tvořit asi 10.-14.den od začátku onemocnění. Nejpřesnější testy jsou ty, které detekují protilátky IgG, případně můžeme detekovat celkové protilátky. Sérologie pro diagnostiku onemocnění COVID19 se používá u pacientů s protahovaným trváním obtíží, s podezřením na výskyt pozdních komplikací nebo při podezření na COVID19, kdy ale RT-PCR test vychází opakovaně negativní. V diagnostice nám mohou pomoci i zobrazovací metody. Například plicní postižení má typické neohrazené infiltráty predilekčně lokalizovaných na periferii a v bazálních segmentech plic. Na CT plic mohou chybět nálezy v časném stádiu nákazy (Grebenyuk a Trojánec, 2020).

5.2 *Vakcinace proti onemocnění COVID-19*

Účinná cesta, jak vymýtit onemocnění COVID-19 je proočkovat obyvatelstvo. V Evropské Unii se používají dva typy vakcín k vpravení informace pro syntézu antigenu viru SARS-CoV-2, který vyvolává imunizaci. Máme mRNA vakcíny a vektorové vakcíny. Mezi vektorové vakcíny patří AstraZeneca. Ta využívá obal viru na vpravení DNA pro syntézu S-proteinu, proti kterému začne tělo vytvářet protilátky. Po vakcinaci AstraZenecou se v březnu 2021 objevily první zprávy o výskytu atypické trombózy spojené s trombocytopenií. Díky dosavadním statistikám není velké riziko těchto komplikací. Mezi vektorové vakcíny patří také vakcína Johnson & Johnson. Tato vakcína byla ve výrobě pozastavena, následně byla znova analyzována rizika a později byla opět povolena k vakcinaci. Mezi mRNA vakcíny patří vakcína Pfizer-BioNTech a Moderna. Syndrom VITT (vakcínou indukovaná imunitní trombotická trombocytopenie) vzniká několik dní po vakcinaci. Momentálně není známá žádná predispozice a pravděpodobnost ke vzniku syndromu VITT. Vakcínou indukovaná imunitní trombotická trombocytopenie vzniká jiným patologickým mechanismem než běžné typy trombóz. Nepředpokládá se ani tedy, že by se VITT vyskytoval častěji na příklad u lidí s anamnézou rodinné trombózy, u žen či dívek, které užívají hormonální antikoncepci, nebo u těhotných žen či u pacientů na antikoagulační léčbě. Vznik závažných příznaků nastává 4-28 dní po vakcinaci. Mezi příznaky patří například silná bolest hlavy, neurologické příznaky, křeče, bolest na hrudníku, bolest břicha, opuch nebo bolest končetin. Jestliže se některé z těchto příznaků objeví, musí se ověřit datum očkování, vyšetřit krevní obraz, kdy se změny budou hledat v počtu trombocytů. Dále je zapotřebí vyšetřit fibrinogen, kdy bude hladina snižená, D-dimer, který bude mít vysokou koncentraci, protilátky anti-PF4 pomocí testu ELISA. (Bátorová, 2021)

Nově jsou vyvinuty i nové vakcíny proti onemocnění COVID19. Ty čekají na schválení EMA pro použití v EU. Jedná se o pět vakcín. Vakcína NVX-COV2373 od výrobce Novavax. Má se jednat o proteinovou, adjuvovanou vakcínu. Další vakcína s názvem CVNCOV je od výrobce CureVac. Je typu mRNA obalená lipidovými nanočásticemi. Vakcína Sputnik je vektorová vakcína, kterou vynalezli v Moskvě. Výrobce Sinovac vyrobil adjuvovanou, inaktivovanou vakcínu VEROCELL. Poslední vakcína, která čeká na schválení je vakcína VIDPREVTYN. Jedná se o proteinovou, adjuvovanou vakcínu od výrobce SanofiPasteur/GlaxoSmithKline (Ministerstvo zdravotnictví, 2021).

5.3 Dopad onemocnění COVID-19

Studie ECLB-COVID19, která zhodnotila výsledky u prvních 1047 účastníků, kteří odpovídali na online průzkum, došla ke zjištění, která naznačují významně negativní dopady současné pandemie COVID-19 na duševní zdraví, zejména na duševní pohodu, náladu a pocity. Největší dopady byly pozorovány v otázkách týkajících se optimistického citění, uzavřenosti pro ostatní. Výsledky z dotazníků o náladách a pocitech navíc ukázaly negativní výsledky. U více lidí byly pozorovány depresivní příznaky zejména u otázek, které souvisely s neštěstím, radostí, špatným pocitem, nejasným myšlením a osamělostí. Tato zjištění naznačují na několik psychologických poruch jako je stres, deprese, podrážděnost, nespavost, strach, zmatenost, hněv, frustrace. Oslabením fyzických a sociálních kontaktů s narušením normálního životního stylu jako například omezení pohybu, finanční ztráty, sedavost, poruchy spánku, nezdravá strava. Během pandemie se berou tyto příklady jako hlavní rizikové faktory pro nižší emoční pohodu a duševní poruchy. Kromě stresu spojeného s nemocí samotnou, výsledky průzkumu ECLB-COVID19 odhalují negativní vliv domácího vězení na duševní a emocionální pohodu, kdy více lidí vyvíjí depresivní příznaky. Cílem je zmírnit negativní dopady omezení a podpořit aktivní a zdravý životní styl (Ammar a kol., 2020).

5.4 Dopad na ochranu přírody

Většina zemí zaznamenává díky pandemii úbytek turistů. Neoficiálně se například objevily zprávy o lepším líhnutí želv na prázdných plážích. Jestliže mláďata želv přežijí do dospělosti, může to posílit reprodukci želv až na několik let. Naopak existují i velká rizika z omezeného cestovního ruchu. V zemích s veřejně financovanými systémy chráněných oblastí, kdy strážci parku nejsou schopni provozu, může vést k neregulovatelnému protizákonnému přístupu k lovu zvěře, těžbě dřeva, sběru rostlin bez ohledu na ekosystém. V důsledku snížení cestovního ruchu se pytláctví ohrožených druhů výrazně zvyšuje. Ochrana se spoléhá na obnovení cestovního ruchu, financování programů proti pytláctví a na podporu místní ekonomiky (Buckley, 2020).

6 Cíl práce

Hlavní cíle práce jsou shrnuty do dvou následujících bodů.

- optimalizace metody ELISA s využitím fotometru DYNAREAD a softwarem AlaDYN
- vyšetření specifických IgG souboru vzorků séra pomocí kitu Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) a zpracování získaných dat

7 Vlastní práce

Enzymatický imunotest (ELISA) umožňuje stanovení kvantitativní in vitro stanovení lidských protilátek třídy IgG proti SARS-CoV-2 v séru, EDTA, citrátové nebo heparinové plazmě. Protilátky můžeme stanovit také ve vysušených kapkách krve (DBS). Tento test můžeme využít jako podporu ke stanovení diagnózy SARS-CoV-2 a představuje doplněk přímé detekce patogenů. Sérologické vyšetření můžeme použít i ke sběru epidemiologických údajů (Euroimmun, 2021).

7.1.1 Princip metody

Testovací souprava obsahuje mikrotitrační stripy po 8 odlomitelných jamkách, které jsou potažené rekombinantní S1 doménou spikového proteinu SARS-CoV-2. V první fázi se vzorky lidské sérum nebo plazma inkubuje v jamkách. V případě pozitivních vzorků se specifické protilátky třídy IgG, případně třídy IgA a třídy IgM navážou na antigeny. K detekci vázaných protilátek se provede druhá inkubace, kdy se použije enzymem značený konjugát anti-lidského IgG, který katalyzuje barevnou reakci (Euroimmun, 2021).

7.1.2 *Obsah testovací sady*

Testovací sada Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) musí být skladována při teplotě +2 °C až +8 °C. Pokud není sada zkontaminována je testovací sada stabilní do uvedené doby expirace (Euroimmun, 2021). Sada byla před použitím vytemperována na pokojovou teplotu po dobu 30 minut.

- mikrotitrační jamky potažené antigeny: 12 mikrotitračních stripů po 8 jamkách, které lze jednotlivě odlomit
- kalibrátor 1: 120 RU/ml, lidské IgG
- kalibrátor 2: 80 RU/ml, lidské IgG
- kalibrátor 3: 40 RU/ml, lidské IgG
- kalibrátor 4: 20 RU/ml, lidské IgG
- kalibrátor 5: 10 RU/ml, lidské IgG
- Kalibrátor 6: 1 RU/ml, lidské IgG
- Pozitivní kontrola: lidské IgG
- negativní kontrola: lidské IgG
- enzymový konjugát: peroxidázou značené anti-lidské IgG
- vzorkový pufr
- promývací pufr
- roztok chromogen/substrát – čirý, při modrém zbarvení nelze použít
- stop roztok: 0,5M kyselina sírová
- ochranná folie
- certifikát kontroly kvality
- návod k použití

7.1.3 *Pomůcky a přístroje*

- gumové rukavice
- dezinfekce
- jehly
- Esmarchovo škrtidlo
- bezpečnostní jehly tzv. kloboučky
- dělená buničitá vata, gázové čtverečky
- náplast
- zlaté vakuety
- fix
- sada na testování
- odměrný válec
- baňka
- špičky
- automatická pipeta
- savý papír
- eppendorfký
- čtečka mikrotitrační destičky – vlnová délka 420 nm, referenční vlnová délka od 620 nm do 650 nm
- centrifuga
- přístroj-vortexování=doplnit
- flowbox
- termostat
- stopky

7.1.4 Odběr vzorků

Odběr žilní krve byl proveden na Zdravotně sociální fakultě zdravotnickým záchranářem. Pokyny k odběru krve byly převzaty z laboratorní příručky Fakultní nemocnice Olomouc.

Nejprve byla odebrána žilní krev šestnácti lidem, kteří byli seznámeni s postupem odběru a nemuseli dodržet dietní omezení. Před samotným odběrem byly zkontrolovány jehly, zkumavky a tzv. kloboučky. Dalším krokem bylo zaškrcení ruky a sevření pěsti s následným pumpováním. Místo vpichu bylo vydesinfikováno vhodným dezinfekčním přípravkem, který musel před vpichem na kůži zaschnout. Odběr byl proveden ve vhodné poloze paže, tj. podložení paže opěrkou v natažené pozici, bez pokrčení v lokti. Jehla byla vložena do tzv. kloboučku, palcem byla přimáčknuta žíla asi 2 až 5 cm pod místem vpichu a následně byla žíla zafixována. Zkumavka byla natlačena až na doraz aplikátoru. Jakmile byla ve zkumavce krev, bylo sejmuto škrtidlo. Pro odstranění jehly byl na místo vpichu přiložen gázový čtvereček a na místo bylo mírně zatlačeno a pomalým tahem byla jehla odstraněna ze žíly. Místo odběru bylo očištěno gázovým čtverečkem a následně přelepeno náplastí (Duchoslavová, 2015).

Žilní krev byla odebrána do zlatých vakuet ve kterých je obsažen separační gel. Díky separačnímu jsou po centrifugaci oddělené krevní elementy a koagulum pod gel a nad gelem zůstává sérum. Výhoda gelu je, že sérum zůstává nekontaminované obsahem krevních elementů. Sérum má lepší stabilitu pro většinu analytů. Po odebrání žilní krve byla vakueta řádně popsána. Vakuety byly při pokojové teplotě a byly do šedesáti minut zcentrifugovány. Bylo centrifugováno při 4000 otáčkách po dobu 10 minut. Vzorky byly vloženy do lednice. Sérum ze vzorků bylo vyšetřováno dva dny po odběru. Stabilita vzorků při +2 °C až 8 °C je až 14dní.

Vzorky byly anonymizovány a vybrané osoby podepsaly informovaný souhlas s vyšetřením.

7.1.5 Příprava lidského séra

Šestnáct vzorků lidského séra bylo zředěno v poměru 1:101 do eppendorfek. Bylo naředěno 10 μ lidského séra s 1000 μ vzorkového pufru. Následně byly eppendorfky zvortexovány. Takto promíchané vzorky byly připraveny k použití.

7.1.6 Příprava promývacího pufru

V sadě se promývací pufr dodává 10x koncentrovaný. Dojde-li v koncentrovaném pufru ke krystalizaci, je třeba pufr ohřát na 37 °C a řádně promíchat. Pufr byl naředěn v poměru 1:10 destilovanou vodou. Bylo napipetováno 15 ml koncentrovaného promývacího pufru a odměřeno v odměrném válci 135 ml destilované vody. Následně bylo vše smícháno v baňce. Takto naředěný pufr vydrží při teplotě +2 °C až +8 °C a správném zacházení stabilní až 4 týdny.

7.1.7 Pipetovací protokol

Na pipetovací protokol (tabulka č.1) byly použity tři mikrotitrační stripy po 8 jamkách. V prvním stripu byly použity kalibrátory (C1 až C6) a pozitivní kontrola (Poz.) a negativní kontroly (Neg.). Ve zbylých dvou stripech jsou v jamkách P1 až P16 napipetovány lidská séra. Kalibrátory, kontroly i vzorky byly inkubovány, každý zvlášť v jedné jamce. Spolehlivost testu ELISA lze zlepšit měřením duplikátů každého vzorku. Pozitivní i negativní kontroly slouží jako vnitřní kontrola spolehlivosti testovací procedury. Měla by se přezkoušet při každém stanovení.

Tab. 1: Pipetovací protokol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	P1	P9									
B	C2	P2	P10									
C	C3	P3	P11									
D	C4	P4	P12									
E	C5	P5	P13									
F	C6	P6	P14									
G	Poz.	P7	P15									
H	Neg.	P8	P16									

C1 – Kalibrátor 1

P1 – vzorek 1

P9 – vzorek 9

C2 – Kalibrátor 2

P2 – vzorek 2

P10 – vzorek 10

C3 – Kalibrátor 3

P3 – vzorek 3

P11 – vzorek 11

C4 – Kalibrátor 4

P4 – vzorek 4

P12 – vzorek 12

C5 – Kalibrátor 5

P5 – vzorek 5

P13 – vzorek 13

C6 – Kalibrátor 6

P6 – vzorek 6

P14 – vzorek 14

Poz. – pozitivní kontrola

P7 – vzorek 7

P15 – vzorek 15

Neg. – negativní kontrola

P8 – vzorek 8

P16 – vzorek 16

7.1.8 Stanovení

Jedná se o manuální provedení ELISA testu, kdy prvním krokem byla inkubace vzorku. Nejprve bylo přeneseno 100 μ l kalibrátoru, pozitivních a negativních kontrol a zředěných sér od náhodně vybraných lidí do mikrotitračních jamek. Vše bylo pipetováno dle pipetovacího protokolu. Testovací destička byla přikryta ochrannou folií. Inkubace takto připravené testovací destičky trvala 60 minut při teplotě 37 °C. Dále byla folie odkryta a následně byly jamky vyprázdněny a promyty třikrát 300 μ l naředěným promývacím pufrem. Tento objem byl pro každé jednotlivé promytí. Každý promývací cyklus byl pufr ve zkušavce 30 až 60 sekund a poté vyprázdněn z jamek. Po dokončení promývání byl promývací pufr vyklepán poklepem desky dnem vzhůru na savý papír.

Dalším krokem byla inkubace konjugátu. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l enzymového konjugátu (peroxidázou značený anti-lidský IgG). Destička byla inkubována 30 minut při 37 °C a byla opět přikryta folií. Opět byly jamky promyty stejným způsobem.

Třetím krokem byla inkubace substrátu. Do každé mikrotitrační jamky bylo napipetováno 100 μ l chromogen/substrátového roztoku. Inkubováno bylo ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po uplynulé době byl přidán stop roztok o objemu 100 μ l ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako chromogen/substrát. Fotometrické měření intenzity zbarvení probíhalo při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 620 nm. Měření bylo provedeno do 30 minut po přidání stop roztoku. Destička byla mírně protřepána kvůli homogenní distribuci vzorku.

7.2 *Přístroj DYNAREAD*

Přístroj DYNAREAD od firmy DYNEX je destičkový fotometr. Je určen pro odečítání absorbancí 96jamkových mikrotitračních ELISA destiček. Přístroj DYNAREAD obsahuje 12kanálovou čtecí hlavu a referenční kanál. Jako spolehlivý a stabilní zdroj světla je LED s dlouhou životností. Přístroj měří rozsah vlnových délek od 405-790 nm a měřicí rozsah 0,000-4,000 OD (optická denzita). Přístroj lze osadit až 8 filtry současně. Rychlost čtení pro jeden filtr je 10 sekund. Pohyb destičky je po ose Y. Přístroj po vložení destičky provádí lineární třepání s nastavitelnou rychlostí a amplitudou. Měření je realizováno pomocí řídicího počítače a ovládacího software.

Na zadní straně přístroje je umístěn konektor pro napájení 230 V, síťový vypínač, USB konektor na propojení s počítačem a pryžová krytka. Destička, kterou budeme chtít změřit se vkládá do rámečku, který se vysouvá z přední strany přístroje. Deska se vkládá do rámečku při pohledu shora pro pozici jamky A1 vlevo nahoře (Dynex technologies, 2015).

7.2.1 *Ovládání přístroje*

Přístroj se zapíná vypínačem na zadní straně přístroje. Při indikaci zapnutí se rozsvítí zelené LED. Symbol I – zapnuto a symbol 0 – vypnuto.

Měření optických denzit je řízeno příslušným softwarem. Při této bakalářské práci bylo pracováno se softwarem „AlaDYN“ (Dynex technologies, 2015).

7.3 *Softare AlaDYN*

AlaDYN je softwarová aplikace. Ta je určená k použití s přístrojem DYNAREAD. Tato softwarová aplikace slouží k ovládání přístroje, k provedení čtecí sekvence s vybraným nastavením a také k zobrazení výsledků ke čtení (Dynex technologies, 2015).

7.3.1 Tvorba a editace testu

Test neboli esej je kompletní soubor pokynů pro provoz čtečky mikrotitračních destiček. Tento soubor pokynů obsahuje informace o různých procesech sběru, výpočtu a hlášení dat, které mají být provedené na mikrotitrační destičce. Editor Assay Wizard je přívětivý nástroj, který slouží k vytváření a editaci testů (Dynex technologies, 2015).

Tvorbě nového testu se provádí stisknutím tlačítka průvodce tvorby testu, který se nachází na hlavním panelu nástrojů. Zobrazí se pole Nadpis testu. Ten obsahuje pole k vyplnění. Vyplňuje se nadpis testu, jméno tvůrce testu a heslo, které je požadováno pouze při úpravě testu. Dále okno obsahuje kód testu, který se používá k označení kódu mikrotitrační destičky, která má být v testu použita. Poslední ikona je dokončit, kdy je veškerá editace testu dokončena, ale nikoliv uloženo (Dynex technologies, 2015).

7.3.2 Zpracování dat

Software AlaDYN umožňuje analytikům vyvíjet a tvořit protokoly, které mohou být použity ke stanovení a hlášení přijatelných dat ve zprávě. Tyto protokoly mají společný formát a jsou k dispozici pro velké množství testů (Dynex technologies, 2015).

7.3.2.1 Kontrola kvality primárních dat a editace rovnic

Rovnice kvalitativních kontrol se používají k zadání kritérií pro správné provedení testu. Okno kontroly kvality primárních dat obsahuje několik polí například rovnice, popis chyby, funkce atd. Nejsou-li kritéria splněna, budou i tak data zpracována, ale ve výsledné zprávě o výsledcích bude poznámka, že kontrola kvality primárních dat selhala (Dynex technologies, 2015).

7.3.2.2 *Kvalitativní zpracování dat*

Používá se k označení rozmezí pro vzorky, u kterých bude kvalitativní stanovení pozitivní nebo negativní podle parametrů testu. Kvalitativní zpracování dat se používá ke generování různých rovnic pro definování prahových podmínek. Ty určují, jestli je vzorek pozitivní nebo negativní. Kladný a záporný limit se stanovuje pomocí rovnice. Rovnice pro poměrové vyhodnocení se používá k převodu dat na data v jiném měřítku. Data jsou na výstupu jako matice nebo tabulka převedených výsledků. Rovnice pro přepočítání výsledků převádí nezpracovaná data testu na různé jednotky (Dynex technologies, 2015).

Kalibrační křivka, když program měří optickou densitu pro řadu vzorků, u kterých je známá koncentrace. Pomocí odečtu se vytvoří graf, který je důležitý pro výpočet koncentrací u testovaných vzorků. Na ose y jsou hodnoty optické denzity a na ose x jsou zadaná čísla pro známé standardy. K vložení nebo výběru křivky slouží záložka Fity. Standardní křivky jsou pojmenovány Fit1, Fit2 atd. Aby mohla být využívána funkce kalibrační křivky, musí být nejprve vytvořen kontrolní seznam obsahující alespoň jeden standard. Uživatel si může zvolit i extrapolaci. Extrapolace je obvykle platná z lineární regresní kalibrační křivky. Uživatel si může vybrat ze 4 možností osy.

- Lin/Lin-osa x a y jsou v lineární stupnici
- Log/Lin-osy používají logaritmickou stupnici
- Log/Lin-osa x je graficky znázorněna v logaritmickém měřítku, zatímco osa y s O.D. hodnotami je graficky znázorněna v lineární stupnici
- Auto-přístroj DYNAREAD automaticky vybere osy fitů

Záložka s názvem graf používá k zahrnutí grafu koncentrací do výsledků a definování způsobu jeho výstupu. Záložka výběr se používá k označení vzorků, které mají být zahrnuty do výpočtu kalibrační křivky. Všechny vzorky (T1-T96) jsou zobrazeny v poli s názvem vzorky. Obsažené vzorky v této křivce jsou uvedeny v poli kontrolní seznam. Vývoj rovnic pro kontrolu kvality se používá záložka kontrola kvality. Používají se k umístění kritérií na vzorky vypočtené z kalibrační křivky. Kritéria kontroly kvality se umístí na jamky až když se vykreslí křivka a vypočítají se koncentrace nebo titry (Dynex technologies, 2015).

7.3.3 *Spuštění testu*

Podkapitola spuštění testu popisuje kroky, které by měli sloužit ke shromáždění požadovaných dat pro další zpracování a analýzu vzorků. Před použitím systému musí být provedeno pár kroků. Prvním krokem je zapnutí hlavního vypínače na zadní straně přístroje DYNAREAD. Druhým krokem je spuštění softwaru AlaDYN, kdy po spuštění provede přístroj DYNAREAD autotest, který slouží jako příprava přístroje pro vlastní měření. Uživatel musí zvolit podmínky před měřením mikrotitračních destiček. Tyto podmínky nalezneme v okně přečíst destičku. V tomto okně se určí a zkontrolují následné podmínky (Dynex technologies, 2015).

- ID destičky – využívá se jako dočasný název datového souboru destičky. Tento soubor se vytváří až na konci testu.
- operátor – uvádí se jméno osoby, která test provádí
- volby – v tomto poli lze vybrat pouze možnost Načíst soubor s ID
- testy – zde se dá vybrat test, který má být spuštěn
- Pozice první jamky – pozice jamky, kterou test začíná
- Počet jamek – udává, kolik jamek má být vyhodnoceno z pozice první jamky

Vlastní test se spouští tlačítkem přečíst destičku na pracovní ploše a po výběru podmínek se spouští pomocí tlačítka start. Protokol, který zobrazuje výsledky testu spolu s výpočty je ve formátu, který byl v naprogramovaném testu (Dynex technologies, 2015).

8 Výsledky

Měřeno bylo pomocí fotometru DYNAREAD a použita byla softwarová aplikace AlaDYN, která zpracovala naměřené výsledky. Filtry byly nastaveny tak, že hlavní filtr měřil při vlnové délce 450 nm a referenční filtr při vlnové délce 630 nm. Třepání probíhalo o frekvenci 14 Hz a amplitudě 1,7 mm.

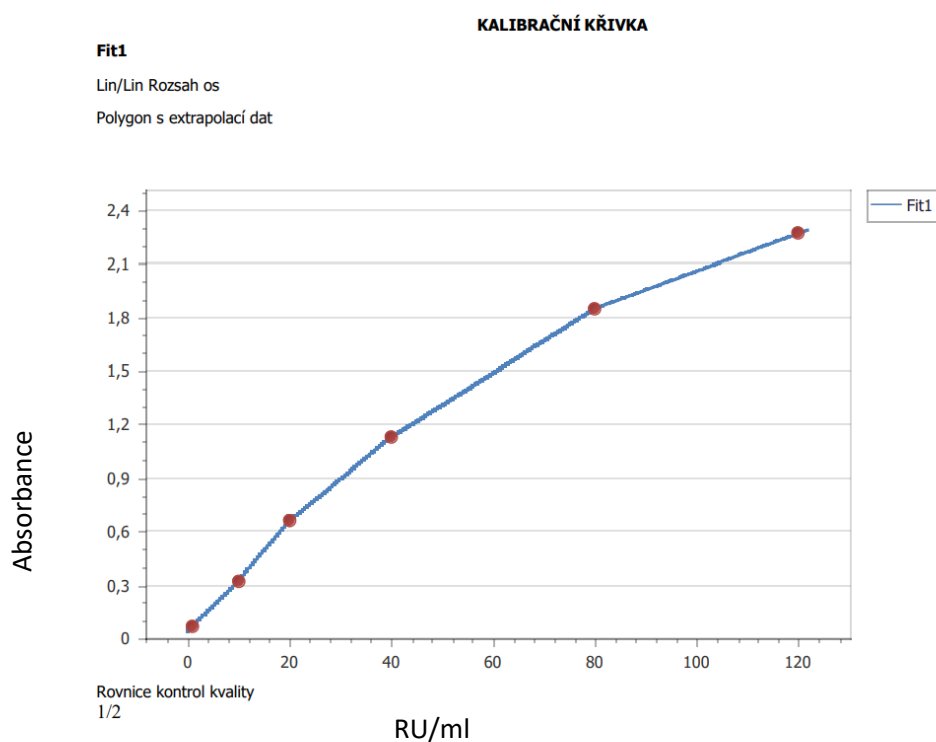
Rovnice pro kontrolu kvality je $PC > NC$. Což znamená, že pozitivní kontrola musí být větší než negativní kontrola. Pokud by rovnice nevyšla, test by byl neúspěšný. Rovnice pro kontrolu kvality tedy vyšla $1,227 > 0,036$. Jedná se o hodnoty optické denzity.

V tabulce číslo 2 jsou naměřené hodnoty optické denzity. Kalibrátory jsou na pozicích od 2A – 2F. Na pozici 2G se nachází pozitivní kontrola a na pozici 2H se nachází negativní kontrola. Vzorky sér jsou na pozicích od 3A – 4H.

Tab. 2: Hodnoty optických denzit

	2	3	4
A	2,268	2,954	0,284
B	1,849	3,001	0,020
C	1,127	2,984	0,873
D	0,657	3,425	2,108
E	0,320	0,217	1,532
F	0,068	0,410	1,845
G	1,227	0,544	2,483
H	0,036	0,380	1,362

Vyhodnocení testu ELISA je kvantitativní a data byla zpracována pomocí kalibrační křivky. Byly měřeny hodnoty optické denzity kalibračních vzorků, u kterých jsou známé koncentrace. Díky tomu lze vypočítat koncentrace testovaných vzorků. Graf znázorňuje kalibrační křivku. Osa x a y jsou v lineární stupnici. Na ose x se nachází hodnoty koncentrace kalibrátoru, které jsou známé od výrobce. Jsou to koncentrace s hodnotami 1, 10, 20, 40, 80, 120 RU/ml (relativní jednotky na mililitr). Na ose y se nachází optické denzity ze známých kalibrátorů.



Graf 1: Kalibrační křivka

Tabulka číslo 3 znázorňuje kalibrátory, které jsou označeny jako S1 až S6. Tyto kalibrátory nalezneme v mikrotitračních jamkách na pozicích A2 – F2. Důležité jsou naměřené hodnoty optické denzity a koncentrace. Tyto hodnoty jsou od nejvyšší hodnoty po nejnižší. Nejvyšší koncentrace kalibrátoru je 120 RU/ml a nejnižší koncentrace je 1 RU/ml. Stejně tak i optická denzita má nejvyšší hodnotu 2,268 a postupně se snižuje až na hodnotu 0,068. Postupné snižování můžeme pozorovat i na mikrotitrační destičce pouhým okem, kdy žluté zbarvení se snižováním optické denzity a koncentrace zesvětluje.

Tab. 3: Hodnoty kalibrátorů

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Koncentrace (RU/ml)
S1	A2	2,268	120,000
S2	B2	1,849	80,000
S3	C2	1,127	40,000
S4	D2	0,657	20,000
S5	E2	0,320	10,000
S6	F2	0,068	1,000

Na pozicích G2 a H2 (tabulka č. 4) se nachází pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola je označena jako PC1 a má hodnotu optické denzity 1,227 a koncentraci 45,561 RU/ml. Negativní kontrola nese označení NC1 a její hodnota optické denzity je 0,036 a koncentrace -0,160 RU/ml. Žluté zbarvení můžeme vidět pouze u pozitivní kontroly, negativní kontrola má průhlednou barvu.

Tab. 4: Hodnoty pozitivní a negativní kontroly

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Koncentrace (RU/ml)
PC1	G2	1,227	45,561
NC1	H2	0,036	-0,160#

Vzorky lidského séra (tabulka č.5) jsou na mikrotitrační destičce na pozicích A3-H4. Jsou označené jako T1-T16. Vzorek T1 je osoba, která je dvakrát očkovaná a v listopadu 2021 prodělala onemocnění Covid 19. Osoba pod vzorkem T2 je zajímavá tím, že jako jediná je očkovaná jednodávkovou vakcínou Johnson & Johnson. Vzorky T3, T5, T6, T8, T9, T11, T12 a T16 jsou osoby, které prodělaly pouze onemocnění Covid 19 s různě silnými příznaky. Osoby, které jsou pod označením T4 a T15 mají tři dávky vakcíny Pfizer-BioNTech, vzorky T7 a T14 jsou očkovaný také touto vakcínou, ale mají pouze dvě dávky. Osoby, které jsou pod vzorky T10 a T13 nejsou očkovaný a údajně neprodělaly onemocnění.

Tab. 5: Hodnoty vzorků sér

ID vzorku	Umístění	Optická denzita	Konzentrace (RU/ml)
T1	A3	2,954	185,386#
T2	B3	3,001	189,865#
T3	C3	2,984	188,289#
T4	D3	3,425	230,303#
T5	E3	0,217	6,321
T6	F3	0,410	12,667
T7	G3	0,544	16,636
T8	H3	0,380	11,794
T9	A4	0,284	8,732
T10	B4	0,020	-0,714#
T11	C4	0,873	29,192
T12	D4	2,108	104,745
T13	E4	1,532	62,456
T14	F4	1,845	79,814
T15	G4	2,483	140,506#
T16	H4	1,362	53,028

Podle výrobce kitu Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA, který doporučuje výsledky interpretovat tak, že koncentrace nižší než 8 RU/ml je negativní výsledek, koncentrace ≥ 8 až < 11 RU/ml je hraniční a koncentrace vyšší nebo rovna 11 RU/ml. Celkem bylo naměřeno 13 pozitivních vzorků, 2 negativní vzorky (T5, T10) a jeden hraniční (T8). Opět lze pozorovat žluté zbarvení v různé sytosti barvy při pozitivním výsledku a při negativním výsledku čiré zbarvení.

9 Diskuse

Protilátky proti onemocnění Covid 19 můžeme diagnostikovat různými způsoby. Testy obvykle pracují s rekombinantně připravenými antigeny a jejich S1 doménou spikového proteinu, v menším zastoupením se pracuje s přirozeným virem (virusneutralizační test, nepřímá imunofluorescence) nebo lze pracovat s geneticky manipulovaným virem (pseudovirusneutralizační test). Standardní biologický materiál určený k testování je sérum nebo plazma a pro rychlé imunochromatografické metody lze využít plnou krev, případně sliny. Kromě metody ELISA lze využít ke stanovení protilátek i chemiluminiscenci, nepřímou imunofluorescenci, imunochromatografické testy, imunoblooty, virusneutralizační test a pseudovirusneutralizační test. Nevýhodou některých testů je, že musí být prováděny ve specializovaných laboratořích s určitým stupněm ochrany (Hajdúch, 2020).

Metodou ELISA pomocí testovací sady QuantiVac ELISA byly detekovány protilátky třídy IgG proti SARS-CoV-2 v šestnácti vzorcích séra. Mikrotitrační jamky byly potaženy antigenem s doménou S1 spike proteinu SARS-CoV-2 exprimovaného rekombinantně v lidské buněčné linii HEK 293 (Euroimmun, 2021). Odběry i veškerá laboratorní práce byla prováděna v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě za použití fotometru DYNAREAD a softwaru AlaDYN.

Díky dobře naměřené pozitivní a negativní kontrole a díky kalibrační křivce lze předpokládat, že naměřené hodnoty jsou v pořádku. Když se zaměříme na vzorky sér, zjistíme, že ve většině případů mají nejvíce protilátek osoby po očkování či po očkování a prodělání onemocnění Covid 19. Podle článku je nadějí v boji proti novému typu koronavirů vývoj bezpečné a účinné vakcíny, která by vedla ke snížení výskytu těžkých forem onemocnění Covid 19. Jedním z problému je výskyt mutací. S velkou pravděpodobností se stane vakcína proti SARS-CoV-2 sezónní záležitostí s nutností pravidelných přeočkování (Smetanová a kol., 2020).

Vzorek číslo 13 by měl vyjít negativně, jelikož osoba není očkovaná, neprodělala onemocnění a ani nepociťovala příznaky onemocnění. Výsledek ale vyšel pozitivně. Gheyath K. Narallah a Duaa W. Al-Sadeq, kteří prováděli studii, došli k výsledku že asymptomatický výskyt onemocnění Covid 19 ve velkém počtu vzorků (více než 1000) poukazuje až na 12,9% výskyt bezpříznakového onemocnění. Studie s malým počtem vzorků ukázala až 87,9% výskyt bezpříznakového onemocnění (Gheyath K. Narallah a Duaa W. Al-Sadeq, 2020). Díky této studii lze předpokládat bezpříznakový průběh onemocnění.

Další zajímavostí ve výsledcích jsou vzorky s čísly 5 a 16. Jedná se o dvě stejně staré osoby ve věku 23 let, které prodělaly onemocnění ve stejnou dobu. Onemocnění bylo potvrzeno PCR testem. Osoba pod vzorkem číslo 5 měla lehké příznaky naopak osoba pod vzorkem 16 měla těžší průběh onemocnění. I po prodělání onemocnění u osoby se vzorkem číslo 5, vychází vzorek jako negativní.

Podle studie na univerzitě ve Wuhanu se dají detekovat protilátky IgG detekovány už 4. den onemocnění. Závažnější případy byly zjištěny u pacientů s vysokými hladinami IgG ve srovnání s pacienty, kteří měli nízké hladiny IgG (Bicheng Zhang a kol., 2020).

Další vědecký výzkum z Bruselu tvrdí, že kinetika protilátek zůstává z části nepochopena. Výzkum zjistil, že protilátky IgG klesají v průběhu času, kdy protilátky po 1 roce od onemocnění jsou ve většině případů tak nízké, že tělo nechrání (Greef a kol., 2021).

Z těchto studií můžeme tedy usoudit, že negativní výsledek u vzorku číslo 5 je z důvodu, že od onemocnění uplynuly 4 měsíce. Po 4. měsících dochází ke snižování protilátek. Mírný průběh onemocnění mohl způsobit nižší hladiny IgG.

Co se týče metody ELISA od firmy Euroimmun tak na základě testování, které proběhlo v laboratoři klinické mikrobiologie a imunologie na University of Chicago, vyšla vynikající citlivost pro detekci protilátek IgG a vynikající specifita pro IgG (Beavis a kol., 2020)

Na základě naměřených výsledků se metoda ELISA s použitým kitem QuantiVac ELISA ověřila. Jedním z důvodů je i snadná a časově nenáročná metoda. K provedení potřebujeme pouze sérum či plazmu, testovací sadu, která je kromě promývacího pufru připravena k použití, fotometr a software. Provedení testu trvalo přibližně 5 hodin, kdy nejdelší dobu trvaly inkubace vzorků. Samotné měření bylo zhotoveno chvíli po vložení do fotometru. Výhodou metody taky je měření více vzorků najednou na jedné mikrotitrační destičce.

10 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala v teoretické části imunochemickým metodám, hlavně metodou ELISA, která je podrobněji zpracovaná. V teoretické části se také věnuji onemocnění Covid 19. Toto nové respirační onemocnění způsobené koronavirem, způsobilo ve světě pandemii. V praktické části je popsán přístroj DYNAREAD a software AlaDYN. Dále jsou naměřené protilátky anti-SARS-CoV-2 třídy IgG, pomocí sady QuantiVac ELISA, zhodnoceny. Naměřeno je celkem 16 vzorků sér, od osob, které byly po prodělání onemocnění, očkovaný, očkovaný a po prodělání onemocnění anebo neočkovaný a bez prodělání onemocnění.

Koncentrace protilátek, které byly naměřeny, vyšly ve většině případech a shodují se sdělenými informacemi od osob, které poskytly krev ke stanovení protilátek. Vzorky, které se neshodují s informacemi od osob jsou například z důvodu poklesu protilátek po onemocnění nebo prodělání onemocnění bezpříznakově.

Na závěr této práce bych chtěla říct, že metoda ELISA je poměrně citlivá, rychlá a jednoduchá metoda, která má mnoho využití. ELISA od firmy Euroimmun byla testovaná i v laboratoři klinické mikrobiologie a imunologie na University of Chicago a vyšla jim vynikající citlivost pro detekci protilátek IgG a vynikající specifita pro IgG. Tuto metodu bych tedy označila jako přesnou a spolehlivou. Cílem práce tedy bylo stanovit hodnoty specifických IgG, což tyto hodnoty byly stanoveny. Kit QuantiVac ELISA lze zhodnotit jako vhodný ke stanovení protilátek.

11 Literatura

1. AMMAR, Achraf, Patrick MUELLER, Khaled TRABELSI, et al. Psychological consequences of COVID-19 home confinement: The ECLB-COVID19 multicenter study. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(11) [cit. 2022-04-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0240204
2. ANTIBODIES-ONLINE, 2022. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* [online]. [cit. 2021-09-14] Dostupné z: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (antikoerper-online.de)
3. AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4-15 [cit. 2022-04-27]. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
4. BARTŮŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, ISBN 978-80-247-3533-7.
5. BÁTOROVÁ, A., 2021. *Odporúčenia Slovenskej hematologickej a transfúziologickej spoločnosti SLS pre diagnostiku a manažment vakcínou indukovanej imunitnej trombotickej trombocytopenie (VITT) po očkovaní proti COVID-19* [online]. [cit. 2021-12-14] Dostupné z: <https://d6scj24zvfbo.cloudfront.net/e59a66ec82ee9dd0010548a399f1010b/200000839-926cd926cf/odporucenia-diagnostika-lie%C4%8Dba-VITT-po-ockovani.pdf?ph=f0abd53db6>
6. BEAVIS, Kathleen G., Scott M. MATUSHEK, Ana Precy F. ABELEDA, Cindy BETHEL, Carlissa HUNT, Stephanie GILLEN, Angelica MORAN a Vera TESIC. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *Journal of Clinical Virology* [online]. 2020, **129** [cit. 2022-04-27]. ISSN 13866532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2020.104468
7. BERÁNEK, B., 2016. *Imunochemické metody* [online]. [cit. 2021-10-24] Dostupné z: <https://docplayer.cz/18643780-Imunochemicke-metody.html>
8. BUCKLEY, Ralf. Conservation implications of COVID19: Effects via tourism and extractive industries. *Biological Conservation* [online]. 2020, **247** [cit. 2022-04-27]. ISSN 00063207. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocon.2020.108640 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247974/>

9. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022. *Symptoms of Covid 19* [online]. [cit. 2022-04-14] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
10. CROWTHER, John R. *The ELISA Guidebook* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009 [cit. 2022-04-28]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60327-253-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-254-4
11. DE GREEF, Julien, Anaïs SCOHY, Francis ZECH, et al. Determinants of IgG antibodies kinetics after severe and critical COVID-19. *Journal of Medical Virology* [online]. 2021, **93**(9), 5416-5424 [cit. 2022-04-27]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.27059
12. DUCHOSLAVOVÁ, J., 2015. *Postup při odběru žilních vzorků* [online]. [cit. 2022-02-23] Dostupné z: https://www.fnol.cz/pdf/imuno/Priloha1_Odber_krevnich_vzorku.pdf
13. DYNEX, TECHNOLOGIES, 2015. *Přístroj pro odečítání 96 jamkových mikrotitračních destiček pro zpracování ELISA metod – Uživatelský manuál pro software*. Praha: DYNEX TECHNOLOGIES. 37 s
14. EUROIMMUN, 2021. EI_2606–10G_A_UK_C02, Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG).
15. FERENČÍK, M., 1989. *Imunochémia*. 2. přeprac. vyd. Bratislava: Alfa, Edícia chemickej literatúry, ISBN 80-05-00043-X
16. GREBENYUK, V., TROJÁNEK, M., 2020. *Nový koronavirus SARS-CoV-2 a onemocnění COVID19 pohledem infektologa* [online]. [cit. 2021-12-07] Dostupné z: https://urgentnimedica.cz/dokumenty/UM-4-2020_Grebenyuk-Trojanek.pdf
17. HAJDÚCH, M., 2020. *Národní strategie testování nemoci covid-19* [online]. [cit. 2021-12-04] Dostupné z: https://koronavirus.mzcr.cz/wp-content/uploads/2020/07/Na%CC%81rodni%CC%81-strategie-testova%CC%81ni%CC%81-COVID-19_draft_v0.5.pdf
18. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA T. a ŠPÍŠEK, J., 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, ISBN 978-80-7553-250-3.
19. HU, Ben, Hua GUO, Peng ZHOU a Zheng-Li SHI. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(3), 141-154 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00459-7
20. KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
21. KOPŘIVA, V., 2011. *Imunoglobuliny* [online]. [cit. 2021-07-21] Dostupné z: https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/VY_04_01.pdf

22. KRAFCIKOVA, Petra, Jan SILHAN, Radim NENCKA a Evzen BOURA. Structural analysis of the SARS-CoV-2 methyltransferase complex involved in RNA cap creation bound to sinefungin. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1) [cit. 2022-04-27]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-17495-9
23. KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P. a RUMML, T., 2008. *Bioanalytické metody*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, ISBN 978-807080-449-0.
24. KŘUPKA, M., 2017. *Mechanismy specifické imunity – antigen, humorální imunita, slizniční imunita* [online]. [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: https://new.imunologie.upol.cz/_files/200000328-d1536d2523/Mechanismy%20specifick%C3%A9%20imunity%20-%20antigen,%20humor%C3%A1ln%C3%AD%20imunita,%20slizni%C4%8Dn%C3%AD%20imunita.pdf
25. LABGUIDE., 2014-2019. *Protilátky* [online]. [cit. 2021-09-17] Dostupné z: <https://labguide.cz/protilatky/>
26. LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 2., přepracované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7853-6.
27. MAROVICH, Mary, John R. MASCOLA a Myron S. COHEN. Monoclonal Antibodies for Prevention and Treatment of COVID-19. *JAMA* [online]. 2020, **324**(2) [cit. 2022-04-27]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2020.10245
28. Mayer, G., 2017. *Imunoglobulíny – štruktúra a funkcia* [online]. [cit. 2021-10-17] Dostupné z: <https://www.microbiologybook.org/Slovak-immunol/slovak-imm4.htm>
29. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ, 2022. *Informace o dostupných vakcínách* [online]. [cit. 2021-12-14] Dostupné z: <https://covid.gov.cz/situace/informace-o-vakcine/informace-o-dostupnych-vakcinach>
30. PROCHÁZKOVÁ, J., JOHN, C., 1986. *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie*. Praha: Avicenum, ISBN 08-043-86
31. SINOBIOLOGICAL, 2017-2022. *ELISA history* [online] [cit. 2021-10-24] Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/category/elisa-history>
32. STRAŠÍK, S., 2014. *Imunoglobuliny a jejich terapeutické použití* [online]. [cit. 2021-08-16] Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2014/06/10.pdf>
33. ŠVECOVÁ, M., 2018. *Imunochemické metody* [online]. [cit. 2021-11-27] Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Imunochemick%C3%A9_metody

34. ZAJONCOVÁ, L., 2009. *Imunochemické metody*[online]. [cit. 2021-10-24] Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-KBC_Imunochemicke_metody.pdf
35. ZHANG, Bicheng, Xiaoyang ZHOU, Chengliang ZHU, et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2020, 7 [cit. 2022-04-27]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2020.00157
36. SMETANOVÁ, J., STRÍŽOVÁ, Z., BARTUŇKOVÁ, J., MILOTA, T., 2020. *Principy a výhledy vakcinace proti viru SARS-CoV-2*[online] [cit. 2022-04-27]. ISSN 1805–4420. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/archiv-cisel/2020-7-8-1>

12 Seznam zkratek

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
COVID-19	Koronavirové onemocnění 2019 (z angl. Coronavirus disease)
EIA	Enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme Immunoassay)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Ig	Imunoglobulin
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
OD	Optická denzita
RIA	Radioimunoanalýza (z angl. Radioimmunoassay)
S	Spikový protein
SARS-CoV-2	Koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem (z angl. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus)

13 Přílohy

Obrázek 1: Odebrané vzorky ve zlatých vakuetách

Obrázek 2: Vzorek ve zlaté vakuete

Obrázek 3: Napipetované kalibrátory, pozitivní a negativní kontrola a patientská séra

Obrázek 4: Testovací sada QuantiVac ELISA (IgG)

Obrázek 5: Mikrotitrační jamky po napipetování chromogen/substrátového roztoku

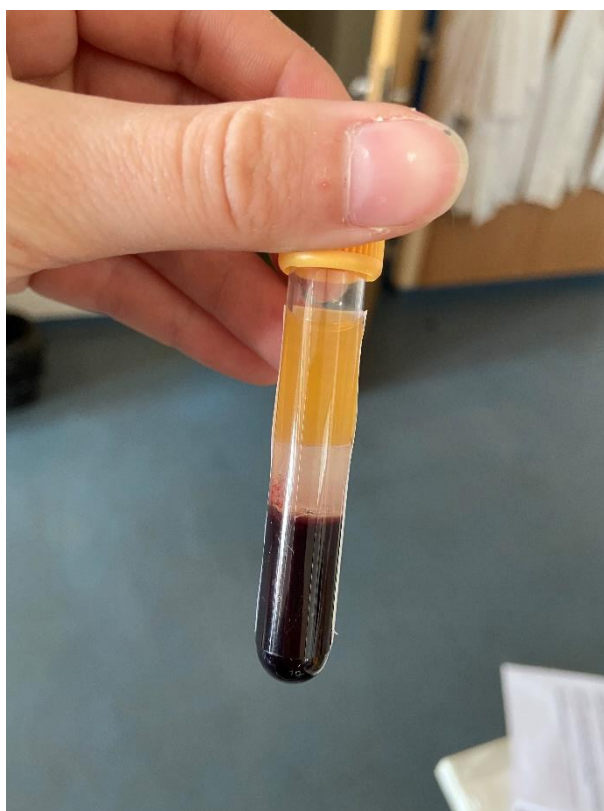
Obrázek 6: Mikrotitrační jamky po napipetování stop roztoku

Protokol 1: DYNEX AlaDYN – výsledky měření

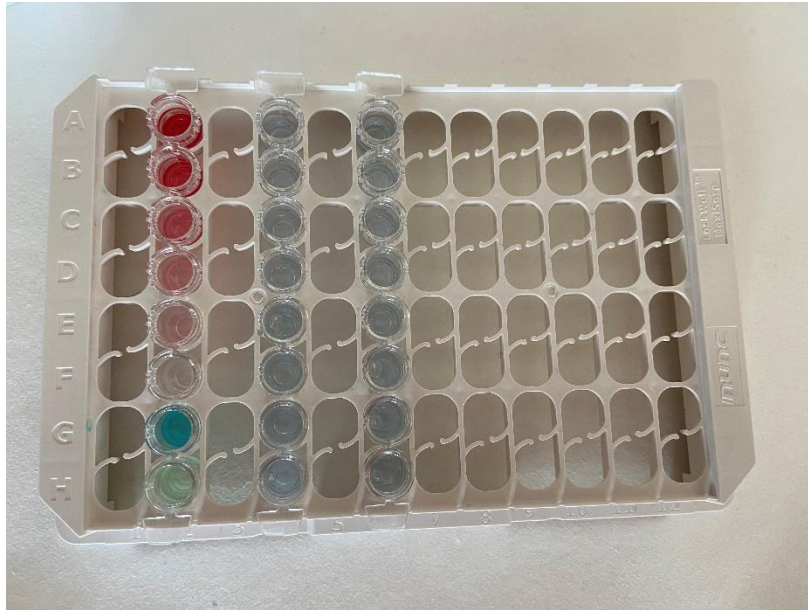
Protokol 2: DYNEX AlaDYN – výsledky měření



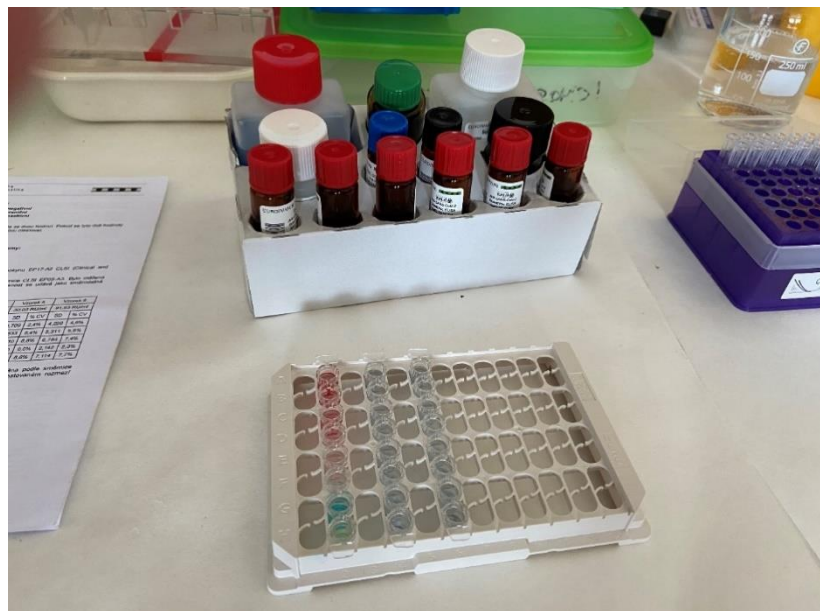
Obr. 1: Odebrané vzorky ve zlatých vakuetách



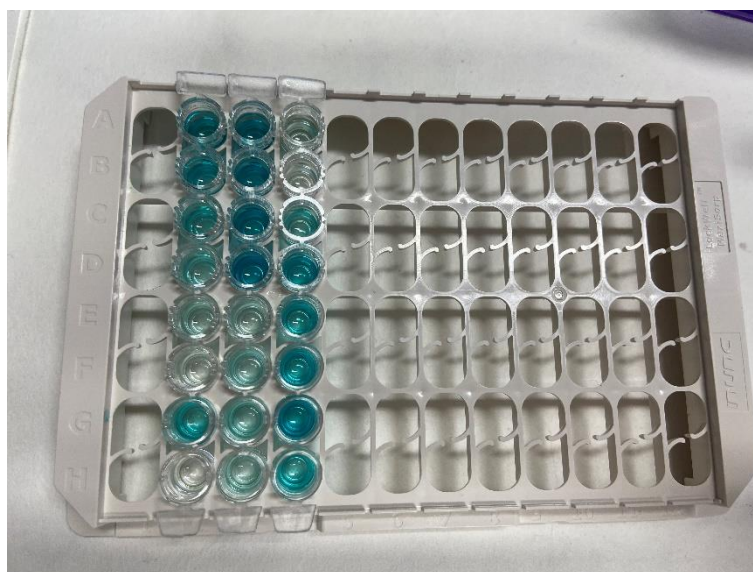
Obr. 2: Vzorek ve zlaté vakuete



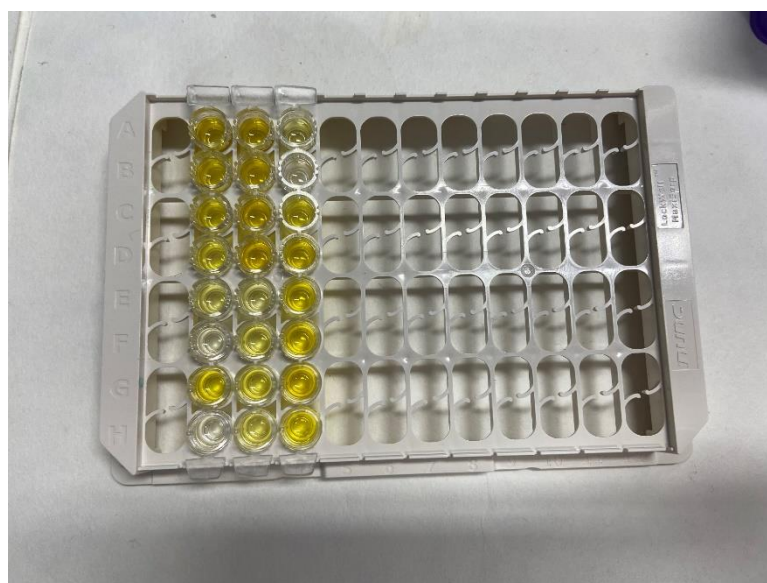
Obr. 3: Napipetované kalibrátory, pozitivní a negativní kontrola a pacientská séra



Obr. 4: Testovací sada QuantiVac ELISA (IgG)



Obr. 5: Mikrotitrační jamky po napipetování chromogen/substrátového roztoku



Obr. 6: Mikrotitrační jamky po napipetování stop roztoku

Dynex AlaDYN

ČÍSLO TESTU :0 REŽIM FILTRŮ :HLAVNÍ A REF. DATUM :26.03.2022
 JMÉNO TESTU :SARS-CoV-2, Hlavní filtr :450 ČAS :02.41.22
 QuantIVac
 DESTIČKA :ELISA Kamila REF. FILTR :630 OPERÁTOR :Kamila Bicanová

Rovnice kontrol kvality

PC>NC 1,227>0,036

DATA MATICE/TABULKA: OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*****	2,268	2,954	0,284	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
B	*****	1,849	3,001	0,020	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
C	*****	1,127	2,984	0,873	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
D	*****	0,657	3,425	2,108	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
E	*****	0,320	0,217	1,532	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
F	*****	0,068	0,410	1,845	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
G	*****	1,227	0,544	2,483	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
H	*****	0,036	0,380	1,362	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

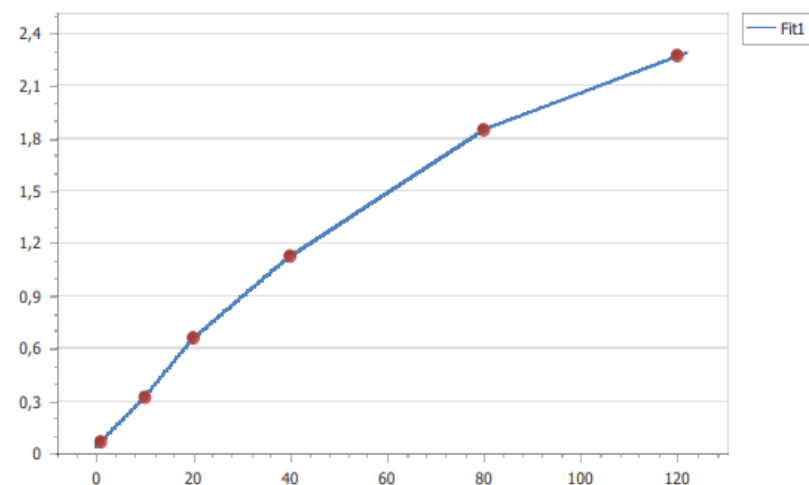
*****Indikuje nečtenou jamku nebo hodnotu mimo platný rozsah

KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Fit1

Lin/Lin Rozsah os

Polygon s extrapolací dat



Rovnice kontrol kvality
1/2

Protokol 1: DYNEX AlaDYN – výsledky měření

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
T1	A3	2,954	2,954	*****	*****	1	185,386#
T2	B3	3,001	3,001	*****	*****	1	189,865#
T3	C3	2,984	2,984	*****	*****	1	188,289#
T4	D3	3,425	3,425	*****	*****	1	230,303#
T5	E3	0,217	0,217	*****	*****	1	6,321
T6	F3	0,410	0,410	*****	*****	1	12,667
T7	G3	0,544	0,544	*****	*****	1	16,636
T8	H3	0,380	0,380	*****	*****	1	11,794
T9	A4	0,284	0,284	*****	*****	1	8,732
T10	B4	0,020	0,020	*****	*****	1	-0,714#
T11	C4	0,873	0,873	*****	*****	1	29,192
T12	D4	2,108	2,108	*****	*****	1	104,745
T13	E4	1,532	1,532	*****	*****	1	62,456
T14	F4	1,845	1,845	*****	*****	1	79,814
T15	G4	2,483	2,483	*****	*****	1	140,506#
T16	H4	1,362	1,362	*****	*****	1	53,028

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
S1	A2	2,268	2,268	*****	*****	1	120,000
S2	B2	1,849	1,849	*****	*****	1	80,000
S3	C2	1,127	1,127	*****	*****	1	40,000
S4	D2	0,657	0,657	*****	*****	1	20,000
S5	E2	0,320	0,320	*****	*****	1	10,000
S6	F2	0,068	0,068	*****	*****	1	1,000

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
N1	H2	0,036	0,036	*****	*****	1	-0,160#

ID vzorku	Umístění	Data	Průměr	S.D.	C.V.	Ředění	Koncentrace
PC1	G2	1,227	1,227	*****	*****	1	45,561

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

Dynex