

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA FILOZOFICKÁ
Doplňující pedagogické studium

NÁVRH UČEBNÍHO TEXTU: LABORATORNÍ TECHNIKA ELISA PRO PŘEDMĚT
VYBRANÉ LABORATORNÍ METODY NA STŘEDNÍ ZDRAVOTNICKÉ ŠKOLE

Mgr. Michaela Břízová

Závěrečná práce (20. Běh DPS)

2016/2020

Univerzita Pardubice

Fakulta filozofická

ZADÁNÍ

tématu závěrečné písemné práce doplňujícího pedagogického studia

Jméno a příjmení studenta: Michaela Černá

titul: Mgr

rok ukončení VŠ: 2016

název absolvované VŠ: Univerzita Pardubice

rok zahájení DPS: 2016

Práce je svým obsahem zaměřena převážně do oblasti: **psychologie, pedagogika, obecná didaktika, oborová didaktika, metodologie, sociologie.** (podtrhni)

Téma práce: Návrh učebního textu: Laboratorní technika ELISA pro předmět Vybrané laboratorní metody na Střední zdravotnické škole

Obsah práce:

Práce se zaměřuje na vysvětlení laboratorní techniky ELISA. Tento text je určen pro Střední zdravotnické školy, obor Laboratorní asistent. Cílem této závěrečné práce je zhotovit ucelený studijní materiál pro výuku středoškolských studentů v rámci předmětu Vybrané laboratorní metody. Jednotlivé podkapitoly budou mít vymezen svůj cíl, uvedenou práci s učivem, vytyčené získané odborné způsobilosti. Tento odborný text není didakticky zpracován. Učební text bude kromě výkladového textu obsahovat i doplňující text s ilustračními příklady a rozšiřujícími poznatky. Dále zde bude zahrnut vysvětlující text zaměřený na vysvětlení cizích slov a zkratk. Vše bude doplněno o obrazový materiál obsahující schéma metody, obrázky přístrojů nebo grafů. Pedagogickým cílem je přehledně zpracovat danou metodu, podnítit zájem žáků o danou problematiku a rozvíjet jejich samostatnost.

Základní literatura dle ISO 690:

- 1) SKALKOVÁ, Jarmila. *Obecná didaktika: vyučovací proces, učivo a jeho výběr, metody, organizační formy vyučování.* Praha: Grada, 2007, 322 s.
- 2) LEPIL, Oldřich. *Teorie a praxe tvorby výukových materiálů: zvyšování kvality vzdělávání učitelů přírodovědných předmětů.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010, 97 s.
- 3) CROWTHER, John R. *The ELISA guidebook.* Springer Science & Business Media, Vol. 149, 2000.

Termín odevzdání práce: 15.4.2018

Vedoucí práce: PhDr. Mgr. Ilona Ďatko, Ph.D. Podpis vedoucího

Prohlašuji, že jsem se seznámil(a) se zásadami pro vypracování závěrečné písemné práce v rámci DPS.

V Pardubicích dne:..... **Podpis studující(ho):**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3.11.2019

Mgr. Michaela Břízová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala PhDr. Mgr. Iloně Ďatko, Ph. D. za odborné vedení, vstřícnost a rady při zpracování této práce. Mé poděkování patří též mé rodině a blízkým přátelům za pomoc a podporu během studia.

Abstrakt

Závěrečná práce je uceleným pracovním materiálem o laboratorní technice ELISA. Je určena pro výuku studentů středních zdravotních škol do předmětu Vybrané laboratorní metody. U každé podkapitoly je vymezen cíl, klíčová slova, vzhled do problematiky, vlastní výklad, cvičení a shrnutí. Každá kapitola je didakticky zpracována. Jsou vytyčeny vědomosti a dovednosti, jež by měly být výstupem každé kapitoly. Připravený materiál je doplněn o metody práce, aktivity studentů a klíčové kompetence.

Závěrečná práce je zaměřena tak, aby v budoucnu mohla sloužit jako podkladový materiál pro výuku laboratorní techniky ELISA.

Klíčová slova

Učební text, didaktika, ELISA, Vybrané laboratorní metody

Abstract

The final thesis is a comprehensive working material about ELISA laboratory method. It is intended for teaching of students at high schools of health and included in a subject called Selected laboratory methods. For each subchapter, the goal, keywords, insight into the issue, own interpretation, exercise, and summary are defined. Each chapter is didactically processed. Knowledges and skills are defined, which should be the output of each chapter. The prepared material is complemented by methods of work, student activities, and key competences.

The final thesis is aimed at serving as a background material for teaching Laboratory Technology ELISA.

Keywords

Teaching text, didactic, ELISA, Selected laboratory methods

Obsah

Úvod.....	9
1 Cíle závěrečné práce.....	10
2 Úvod do psaní učebního textu	11
2.1 Učebnice.....	11
2.2 Základní funkce učebnice	11
2.3 Učebnice z funkčního hlediska	12
2.4 Didaktická vybavenost učebnice.....	12
2.5 Struktura školní učebnice	14
2.6 Obtížnost textu	15
2.7 Požadavky na učebnici	17
3 Praktická část: Učební text	19
3.1 O laboratorní metodě ELISA	19
3.1.1 Výklad.....	19
3.1.2 Kontrolní otázky	22
3.1.3 Shrnutí.....	23
3.1.4 Rozšiřující téma	23
3.1.5 Rozšiřující literatura	23
3.2 Specifikace ELISA metody.....	24
3.2.1 Výklad.....	24
3.2.2 Cvičení	27
3.2.3 Shrnutí.....	27
3.2.4 Rozšiřující téma	28
3.2.5 Rozšiřující literatura	28
3.3 Stanovované analyty a laboratorní uspořádání ELISA testu.....	29
3.3.1 Výklad.....	29
3.3.2 Cvičení	35
3.3.3 Shrnutí.....	36
3.3.4 Rozšiřující téma	36
3.3.5 Rozšiřující literatura	36
3.4 Laboratorní stanovení obsahu lepku	37
3.4.1 Výklad.....	37

3.4.2	Otázky	41
3.4.3	Rozšiřující literatura	41
3.5	Závěrečné cvičení.....	42
3.6	Závěrečné shrnutí	43
3.7	Didaktický rozbor učiva – příručka pro učitele.....	44
4	Závěr.....	46
5	Seznam literatury	47

Úvod

O tom, co by měl učitel předat svým žákům a jaký by měl být, se napsalo už mnohé. Podle mě by je měl umět především motivovat a nadchnout. Vést je ke vzájemné spolupráci, ale zároveň je učit i samostatnosti. Měl by umět vyřešit krizové situace, být jim důvěrníkem ale i autoritou. Být učitelem není snadné. Jako učitel musíte být schopni vybrat pro svoje žáky i studenty učební text, který bude v tom nejlepším případě vyhovovat Vám i jim. V některých předmětech je učebnic velké množství a vybrat mezi nimi tu pravou je velmi těžké. U jiných předmětů je naopak nabídka učebnic velmi omezená a tam, je možná výběr té správné učebnice ještě náročnější.

Tato závěrečná práce je uceleným pracovním materiálem pro výuku laboratorní techniky ELISA na Středních zdravotnických školách. V teoretické části je přehledně shrnuto vše, co je zapotřebí vědět o psaní učebních textů a o tom, jak lze učebnice v učitelské praxi využít. V praktické části je ucelený učební text o laboratorní technice ELISA, která se stále častěji používá v laboratorní praxi. V každé kapitole je vymezen cíl, klíčová slova, vzhled do problematiky, vlastní výklad, cvičení a shrnutí. Práce díky svému obsahu shrnuje problematiku laboratorní techniky ELISA a je schopna posloužit jako výchozí učební text pro vyučovací hodiny v předmětu Vybrané laboratorní metody. Doufám, že bude pro každého učitele vyučujícího tuto laboratorní techniku přínosem.

1 Cíle závěrečné práce

Hlavním cílem této závěrečné práce bylo zhotovit návrh učebního textu o laboratorní technice ELISA do předmětu Vybrané laboratorní metody, který je vyučován na Středních zdravotnických školách. Laboratorní technika ELISA je důležitá analytická metoda, která využívá specifických reakcí mezi protilátkou a antigenem. Cílem učebního textu je didakticky tuto laboratorní metodu zpracovat, použít ilustrační příklady a aplikovat učební text v praxi. Všechny zpracované kapitoly mají vymezen svůj jasný cíl. Ve výkladu je jasně dáno to, co by měli studenti z každé kapitoly znát a pomocí závěrečných cvičení a kontrolních otázek se vědomosti studentů ověřují.

2 Úvod do psaní učebního textu

2.1 Učebnice

Učebnice slouží jako pomůcka pro učitele a žáky. Sestavit kvalitní učebnici není nic jednoduchého. Dobře zpracovaná školní učebnice má bohatě členěnou strukturu s dostatečným množstvím ilustrací a splňuje formální, rozsahová, kvantitativní a kvalitativní kritéria. Rozsah informací je dán počtem stran a množstvím ilustrací, které jsou přizpůsobeny svou obtížností věku a možnostem studentů. Ilustrace jsou důležitou součástí každé učebnice. Pomocí schémat se dají vysvětlit i relativně složité věci. Ilustrace udělají každou učebnici zajímavější a na pohled jednodušší. Mezi ilustrace patří např. obrazy, modely, fotografie, schémata a diagramy.

Kvalita textu je závislá na tzv. komunikativnosti, tedy sdělitelnosti učiva žákům daného věku a učebních předpokladů. Ke zlepšení kvality textu přispívá také lexikální, syntaktická a stylistická stránka textu. Informace by měly být sdělovány v jasných větách (max. 12 slov ve větě). Obsáhlá souvětí znesnadňují vnímání a pochopení učební látky. Je zapotřebí při psaní textu používat pouze výrazy, které žáci znají [1,2].

Každá učebnice by měla být schválena schvalovací doložkou MŠMT. Tato schvalovací doložka deklaruje, že byla učebnice schválena odborníky, neobsahuje tedy zásadní věcné chyby. Vytvořit a zavést novou učebnici není nic lehkého. Nově zaváděné učebnice musí být v souladu s osnovami (učebním plánem), politicky a nábožensky korektní a adekvátně vybavené jako didaktický prostředek. Základní funkce učebnice nejsou jednoznačně stanoveny. Některá rozdělení nebo pojetí učebnic jsou shrnuty v následujících kapitolách [3].

2.2 Základní funkce učebnice

Učebnice lze rozdělit podle základních funkcí, které plní a to na:

- 1) Prezentace učiva: učebnice je souborem informací, které předkládá svým čtenářům pomocí verbální a obrazové formy. Učivo musí být prezentováno jasně, bez zbytečných složitých výrazů a cizích slov.
- 2) Řízení učení a vyučování: učebnice je didaktickým prostředkem, kdy pomocí vhodných otázek a úkolů řídí žákovo učení, a navíc nastavuje i učitelovo vyučování – udává rozsah informací pro určitou časovou jednotku výuky.
- 3) Funkce organizační (orientační): učebnice obsahuje pokyny, rejstřík a obsah, a tak informuje studenty i učitele o možnostech jejího využívání. Díky organizační funkci je tak na první pohled vidět, co se v učebnici nachází a co nám tak může učebnice nabídnout [3].

2.3 Učebnice z funkčního hlediska

V moderní pedagogice Jana Průchy se rozdělují učebnice z funkčního hlediska na tyto základní pojetí:

- Učebnice jako kurikulární projekt
- Učebnice jako zdroj obsahu vzdělávání pro žáky
- Učebnice jako didaktický prostředek pro učitele

Učebnice jako kurikulární projekt

Učebnice je jednou z možností, jak regulovat edukační procesy ve škole. Je kurikulárním projektem. Určuje obsah vzdělávání, který je vymezen danou zemí, její politikou, postojem ke školství apod. Učebnice ovlivňují postoje a předsudky etnické, rasové i náboženské. Především na prvním stupni základní školy je výběr učebnice důležitý. Učebnice vychovávají. Je zapotřebí se vyvarovat možným nežádoucím předsudkům v mladé generaci. I vzory rodiny v čítankách v závislosti na kulturních a sociálních tradicích ovlivňují mladého čtenáře a jeho myšlení. Proto má každá země vlastní učebnice a není možné navrhnout učebnici pro celý svět stejnou.

Učebnice jako zdroj obsahu vzdělávání pro žáky

Obsah vzdělávání je dán učebním plánem, který je schvalován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy. Každá používaná učebnice musí být ověřena, aby se žáci a studenti dozvěděli pravdivé informace.

Učebnice jako didaktický prostředek pro učitele

Pojmem didaktický prostředek se rozumí vše, co vede ke splnění výchovně-vzdělávacích cílů. Jsou to prostředky materiální (učební pomůcky) i nemateriální (např. vyučovací metody). Mezi učební pomůcky patří např. učebnice, příručky, atlasy, přístroje, obrazy nebo modely [1,3].

2.4 Didaktická vybavenost učebnice

Didaktická vybavenost učebnic je dost často opomíjena, přitom právě ona určuje kvalitu učebnice z hlediska jejího využití pro učení žáků. Hodnotí se podle strukturních komponentů. Mezi strukturní komponenty patří např. verbální nebo obrazové komponenty. Celkové

rozdělení je poněkud složitější (rozlišuje se celkem 36 komponentů). V tabulce č. 1 je část komponentů přehledně shrnuta.

Tabulka č. 1: Didaktická vybavenost učebnic a její rozdělení na komponenty [3]

	Verbální komponenty	Obrazové komponenty
Aparát prezentace učiva 14 komponentů	výkladový text prostý	umělecká ilustrace
	shrnutí učiva k tématům	fotografie
	doplňující texty – citace, dokumentační materiál	nauková ilustrace – schémata, náčrtky
	slovníčky pojmů, cizích slov	
Aparát řídicí učení 18 komponentů	předmluva	grafické symboly vyznačující určité části textu – poučky, úkoly
	otázky a úkoly za lekci/tématy	užití zvláštní barvy pro určitý text
	cíle učení, sebehodnocení	užití zvláštního písma pro určitý text
	odkazy na jiné zdroje	
Aparát orientační 4 komponenty	obsah učebnice	
	členění (kapitoly, lekce)	
	rejstřík	

Při výpočtu didaktické vybavenosti učebnic, se zaznamenává každý využitý komponent v učebnici. Z těchto zaznamenaných údajů se vypočítávají kvantitativní koeficienty didaktické vybavenosti učebnic, které jsou vyjádřeny procentuálním podílem počtu skutečně využitých komponentů z možného počtu komponentů. Koeficienty se dělí na dílčí koeficienty a celkový koeficient didaktické vybavenosti učebnice.

Dílčí koeficienty se dále rozdělují na:

- Koeficient využití aparátu prezentace učiva
- Koeficient využití aparátu řídicího učení
- Koeficient využití aparátu orientačního
- Koeficient využití verbálních komponentů

- Koeficient využití obrazových komponentů

Koeficienty nabývají hodnot 0-100 procent. Čím je vyšší procento pro daný koeficient, tím je vyšší didaktická vybavenost učebnice. Ovšem 100procentní teoretická nebo tzv. ideální hodnota je v praxi nedosažitelná a slouží pouze jako porovnávací kritérium pro srovnávání učebnic mezi sebou.

2.5 Struktura školní učebnice

Učební text lze strukturně rozdělit na výkladový, doplňující a vysvětlující. Další strukturní rozdělení je přehledně shrnuto v tabulce č.2.

Tabulka č. 2: Struktura učebnice [4]

Výkladový	Doplňující	Vysvětlující
výchozí	úvodní	vysvětlivky
objasňující	určený k četbě	text k obrázkům
popis pokusu	dokumentační materiál	
základní		
aplikační		
shrnující		
přehled učiva		

U učebního textu se používají i nevýkladové složky, které se dělí na procesuální aparát, orientační aparát a obrazový materiál.

Procesuální aparát:

- Otázky a úkoly určené ke zpevnění vědomostí
- Otázky a úkoly vyžadující aplikace vědomostí
- Otázky a úkoly směřující k aktivnímu zpracování vědomostí
- Návody k pokusům

- Pokyny k činnosti
- Odpovědi a řešení

Orientační aparát:

- Nadpisy
- Výhmaty
- Odkazy
- Grafické symboly
- Rejstříky
- Obsah

Obrazový materiál

- Obrazy nahrazující věcný obsah výkladových složek
- Obrazy rozvíjející věcný obsah výkladových složek
- Obrazy doplňující věcný obsah výkladových složek [1,3]

2.6 Obtížnost textu

Obtížnost textu učebnice je dána jejím obsahem a zároveň i tzv. komunikačním ztvárněním. Komunikační ztvárnění si můžeme vysvětlit např. na jednoduchém textu, který lze napsat nezajímavě a nepochopitelně, a tak i jednoduchý text obsahově známý se může jevit jako těžký, nudný a obtížně vstřebatelný. Slovní zásoba žáků se s věkem rozšiřuje, proto pro mladší žáky je text, s lexikálně bohatším textem, složitější na pochopení než pro žáky vyšších ročníků.

Obtížnost textu je objektivní vlastností, která je dána jeho specifickými charakteristikami a lze ji proto měřit. Měření obtížnosti textu není nic jednoduchého. Přišlo se na to, že je to závislé na tzv. lexikálním faktoru, kdy učební text obsahuje slova vysoce frekventovaná (běžně známá, srozumitelná) a málo frekventovaná (neznámá, složitá, cizí). Dále se zohledňuje syntaktický faktor. Ten vyjadřuje složitost větných struktur. Do vzorců pro výpočet obtížnosti textu se také zohledňují slova s abstraktním obrazem, složitá souvětí apod. Mezi univerzální vzorec obtížnosti textu patří vzorec LIX, který se vypočítává:

$$LIX = Lm + Lo$$

Lm... průměrná délka věty v počtu slov v souboru 200 vět

Lo průměrná délka slov o počtu více než 6 písmen v souboru 2000 slov

Lm značí syntaktický faktor, kdy se systematicky z různých částí učebnice vybírá 20 vzorků po 10 větách a ty se analyzují. Lo značí lexikální faktor, kdy se vybírají soubory slov z 20 vzorků po 100 slovech. Podle výsledku (míra LIX) lze rozdělit texty na velmi snadné, středně obtížné, velmi obtížné a extrémně obtížné texty.

Vzorec LIX vymysleli ve Švédsku a např. na polské učebnice sedí a používá se. U českých textů se přišlo na to, že hodnocení obtížnosti neodpovídá a je lepší používat Mistríkův vzorec obtížnosti. Ten používá tři parametry textu:

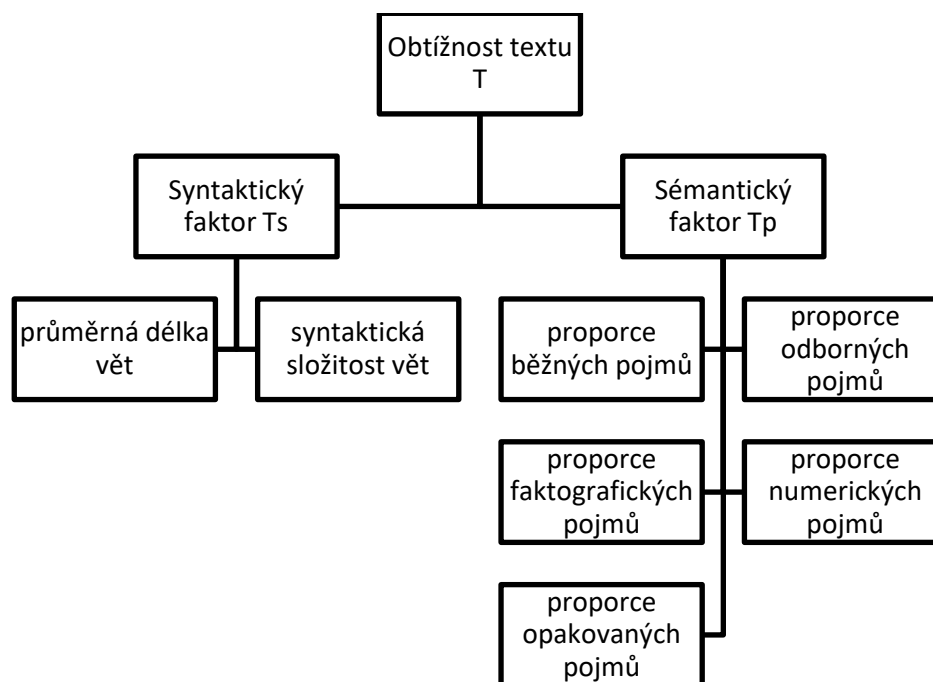
- průměrnou délku vět (V), která ukazuje na složitost vyjadřovaných myšlenek
- průměrná délka slov v počtu slabik (S), která ukazuje na pojmovou zatíženost textu
- index opakování slov (I), který je charakteristikou lexikální variability textu

Mistríkův vzorec obtížnosti se vypočítává:

$$R = 50 - (V * S / I)$$

Mistríkova míra nabývá hodnot od 0 do 50 bodů, kdy čím více bodů učebnice získá, tím je považována za snadnější.

Žádný vzorec ovšem není tak objektivní, aby výborně informoval o obtížnosti textu a byl variabilní pro různé předměty i učebnice jazyků. Obtížnost textů by měla postupně stoupat se zvyšujícím se vzděláním. To se v dřívějších učebnicích nestávalo. Proto byla zavedena míra obtížnosti didaktických textů podle Nestlerové-Průchy-Pluskala neboli míra *T*. Tato míra se v dnešní době používá pro hodnocení obtížnosti nových učebnic. Co všechno obsahuje tato míra *T* je znázorněno v diagramu:



Obr. č. 1: Diagram obtížnosti textu [3]

Míra T kromě stanovení míry obtížnosti učebnice dokáže určit, v čem spočívá neúměrná obtížnost textu. Nejčastěji to bývá způsobeno vysokou hustotou odborných informací, vysokým počtem odborných a faktografických pojmů. Při psaní učebnice si lze vzpomenout na O. Chlupa, který roku 1936 napsal: „Učebnice má být jasně psána, přizpůsobena věku a chápavosti žactva, její sloh má vyhovovat vytríbenosti jazykové formy“ [3,5].

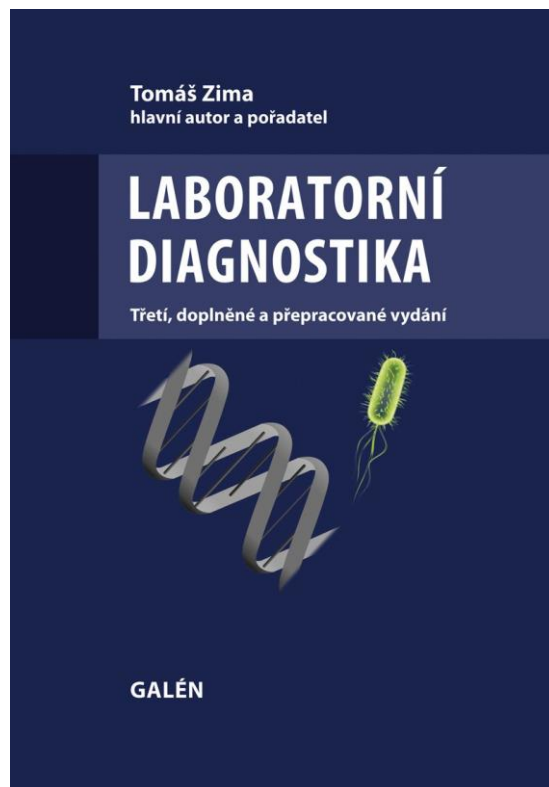
2.7 Požadavky na učebnici

Byly formulovány požadavky na učebnici:

- požadavky na obsah: každá učebnice musí splňovat didaktické zásady
- požadavky na didaktickou výstavbu: učební text musí být logicky strukturován. Výklad by měl být jasný a stručný s dostatkem ilustrujících příkladů (obrázky, mapy, grafy, schémata a diagramy), které budou popsány. Probírané téma by mělo být propojováno s realitou všedního dne. Na konci každé kapitoly by mělo být shrnutí učiva, důležité věty by měly být zvýrazněny. Učební text by měl vybízet k samostudiu např. pomocí kontrolních otázek nebo daných úloh.

- požadavky na jazykovou kulturu: učební text musí být psán spisovně, správně gramaticky, stylisticky i syntakticky. Slovní zásoba by měla být volena s ohledem na věk a jazykové zkušenosti žáků.
- požadavky na technickou, estetickou a hygienickou stránku: Učebnice by měla usnadňovat studium a motivovat k učení, proto by měla používat různé druhy písma a jednotlivé stránky či kapitoly by měly být graficky zvýrazněny. Vhodný papír, lákavý obal a kvalitní ilustrace nejsou též na škodu [1,6,7,8]

Na obrázku č. 2 je znázorněn příklad učebnice sloužící k výuce laboratorních metod. Jak je vidět už podle obalu, učebnice je vydána už ve třetím doplněném vydání. Právě učebnice laboratorních metod musí být často aktualizovány, protože vývoj v této oblasti jde neustále dopředu.



Obr. č. 2: Příklad učebnice laboratorních metod [9]

3 Praktická část: Učební text

3.1 O laboratorní metodě ELISA

Cíl kapitoly: po prostudování této kapitoly budou studenti seznámeni se základními pojmy, principem metody ELISA a s historií vzniku metody. Budou schopni vysvětlit pojmy jako antigen, protilátka, imunokomplex.

Klíčová slova: ELISA, antigen, protilátka, test

Vhled do problematiky:

ELISA je v praxi velmi často používaná metoda, která využívá základní imunologické reakce, a to mezi protilátkou a antigenem. Patří mezi imunoanalytické metody. Vychází z původní radioimunoanalytické metody. Používá se k diagnostice protilátek a antigenů ve vzorku.

3.1.1 Výklad

ELISA z anglického Enzyme-Linked Immunosorbent Assay je **imunoanalytická metoda**, která využívá **specifickou reakci mezi protilátkou a antigenem**. Reakce probíhá v mikrotitrační destičce za použití minimálního množství roztoků a biologického materiálu. Tato metoda se používá k detekci a kvantitativnímu stanovení specifických antigenů nebo protilátek ze vzorku. Test je vysoce citlivý a specifický.

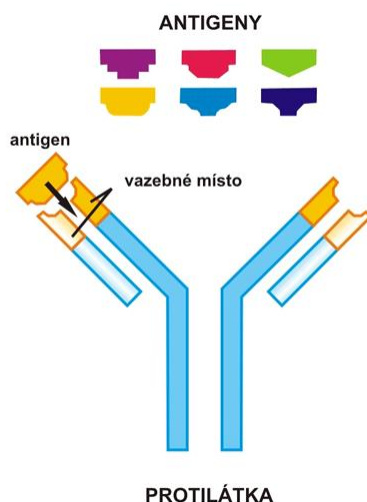
Výhody metody:

- jednoduchá obsluha
- běžně dostupné reagenty
- levné vybavení

Nevýhody metody:

- dlouhá inkubační doba mezi jednotlivými kroky
- každá malá chyba a nepřesnost v pipetování se velmi projeví

Díky komercializaci metody je postupně inkubační doba zkracována. Na obrázku č. 3 je vidět protilátka třídy IgG s dvěma vazebnými místy pro antigen. Toto spojení je principem vazby metody ELISA.



Obr. č. 3: Protilátka třídy G s vyznačeným vazebným místem a antigenem [10]

Pojmy pro připomenutí

Protilátka:

Protilátka neboli imunoglobulin hraje klíčovou roli v protilátkové imunitní odpovědi. Protilátky se skládají ze 2 těžkých a 2 lehkých řetězců. Rozdělují se do pěti tříd podle těžkého řetězce na IgA, IgD, IgE, IgG a IgM.

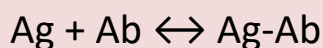
Protilátky používané pro imunoanalytické testy jsou buď polyklonální nebo monoklonální. Polyklonální protilátky se vyrábí imunizací pokusných zvířat a následnou typizací. Jejich výroba je levná, ale pokud se používají při testech, ustanovení reakční rovnováhy trvá delší dobu kvůli strukturním izoformám. Monoklonální protilátky se vyrábějí hybridomovou technologií a jejich výhoda spočívá v homogenitě a specifitě. Jsou vysokoafinitní, a proto se reakce uskutečňuje ve velmi rychlém čase. Při jejich používání dochází k vysoké reprodukovatelnosti a lze je tak použít při porovnávání výsledků mezi laboratořemi.

Antigen:

Antigen je látka, na kterou reaguje imunitní systém. Je to pro organismus cizorodá částice, která může být různé velikosti a chemického složení. Nejčastěji je antigenem protein, glykoprotein, polysacharid nebo lipoprotein. Antigen z vlastního organismu se označuje jako endoantigen. Pokud se jedná o antigen z vnějšího prostředí označuje se jako exoantigen. Mezi exoantigeny patří alergeny, které jsou u citlivého jedince schopny vyvolat imunitní reakci.

Princip metody ELISA

Princip imunoanalytické metody je založen na **rovnovážné reakci reaktantů** za vzniku **imunokomplexů** (Ag-Ab). **Reaktanty** jsou **antigeny** (Ag) a **protilátky** (Ab). Pomocí metody lze prokázat (**kvalifikovat**) i stanovit množství (**kvantifikovat**) stanovovaného analytu. K určení množství stanovovaného analytu (protilátka/antigen) se používá tzv. **sekundární protilátka** (protilátka s kovalentně navázaným indikátorem, **konjugát**), která se na imunokomplex specificky váže. Navázaný **indikátor (enzym)** katalyzuje **chemickou přeměnu** přidávaného **substrátu** na **produkt**. Vzniká **barevná změna**, která je specifická pro množství stanovované látky a měří se **spektrofotometricky**.



Historie metody

ELISA metoda se řadí mezi indikátorové imunoanalytické metody (IA). Vznikla úpravou první indikátorové metody, která využívala radioizotopy. Podle toho byla označena jako **RIA – radioimunoanalytická metoda**. Indikátorem je zde **radioizotop**, který označuje antigen přidávaný do reakce v daném množství. RIA metoda je dodnes používána pro stanovení hormonů štítné žlázy nebo bakteriálních toxinů. Jako radioizotop se využívá jod I ¹²⁵, I ¹³¹ nebo uhlík C ¹⁴. Výhodou RIA metody je její vysoká citlivost a možnost automatizace. Velkou nevýhodou jsou rizika, která jsou spojena s manipulací s radioaktivní látkou a jejím následným skladováním (poločas rozpadu). Proto se začaly radioizotopové metody postupně nahrazovat neizotopovými. V roce 1971 byl publikován již první vědecký článek, kdy byl radioizotop nahrazen enzymem.



Obr. č. 4: Radioimunoanalytická metoda a její hlavní nevýhoda [11]

Zajímavosti

Radioimunoanalytickou metodou (RIA) byla poprvé změřena hladina inzulínu v krvi, a to v padesátých letech dvacátého století. Bylo to vůbec první kvantitativní stanovení hladiny hormonu v krvi a za tento objev byla udělena i Nobelova cena za medicínu.

3.1.2 Kontrolní otázky

- 1) Z jaké metody ELISA vychází?
- 2) Co je principem metody ELISA?
- 3) Co je to antigen?
- 4) Co je to protilátka?
- 5) Jak vypadá imunokomplex?
- 6) Z čeho se skládá konjugát?
- 7) Jak se nazývá přístroj, který se používá k měření výsledků ELISA metody v mikrotitračním uspořádání?

3.1.3 Shrnutí

ELISA je imunoanalytická metoda, která slouží k detekci antigenů a protilátek. Principem metody je reakce mezi protilátkou a antigenem, kdy vzniká imunokomplex. Ten je pomocí sekundární protilátky s navázaným enzymem (konjugát) označen a pomocí substrátového roztoku může vzniknout produkt, který změní barvu roztoku. Výsledná barevná změna se měří na přístroji, který se nazývá spektrofotometr.

3.1.4 Rozšiřující téma

V následující kapitole se seznámíte s dalšími imunoanalytickými metodami. Rozšíříte si znalost o používané indikátory a detektory v imunoanalytických metodách. U ELISA testů se dozvíte podrobnější informace o enzymech, jejich substrátech a chromogenech. Zjistíte, jak se mění barva při vzniku produktu, jak se enzymatická reakce zastavuje a při jakých vlnových délkách se výsledek měří. Dále se seznámíte s druhy pevných fází používaných u ELISA testů. Dojde k propojení znalostí i s dalšími předměty. Ved'te diskuzi o tom, co znáte z jiných laboratorních metod a jak se tyto metody liší či jsou stejné. Rozšíříte si znalosti o důležité podrobnosti a nadstavbové informace.

3.1.5 Rozšiřující literatura

CROWTHER, John R.: *The ELISA guidebook*. Vol. 149. Springer Science & Business Media, 2001.

HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 2017.

ENGVALL, Eva, PERLMANN, Peter. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Protides of the biological fluids, 1971. 553-556.

MAISNAR Vladimír, TICHÝ Miloš. *Monoklonální imunoglobuliny – výskyt význam a možnosti jejich průkazu*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2012.

PAULÍK Milan. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada publishing a.s., 2005.

3.2 Specifikace ELISA metody

Cíl kapitoly: po prostudování této kapitoly budou studenti schopni rozpoznat různé indikátory a detektory a správně je zařadit do imunoanalytických metod. Budou mít dobrý přehled o používaných enzimech, substrátech a chromogenech.

Klíčová slova: indikátor, detektor, pevná fáze, mikrotitrační destička, chromogen, substrát

Vhled do problematiky:

ELISA spadá do imunoanalytických metod, které se liší použitým indikátorem a detektorem. Tyto metody jsou v praxi hojně užívané, a proto by o nich měli mít studenti alespoň základní přehled. U ELISA metody je velmi důležité vybrat při detekci analytů správný enzym, chromogen a sekundární protilátku. Mikrotitrační destička se používá nejčastěji jako pevná fáze u testu ELISA, jsou zde ovšem i další alternativy, které by v budoucnu mohly najít i širší využití.

3.2.1 Výklad

Indikátory a detektory

Imunoanalytické metody se především liší použitým indikátorem a následně detektorem nutným ke stanovení. Podle použitého indikátoru se tyto analytické metody rozdělují na: **RIA** (radioizotop), **EIA** (enzym), **FIA** (fluorescenční značka), **LIA** (luminiscenční značka), **CIA** (chemiluminiscenční značka) a **ECLIA** (elektrochemiluminiscenční značka). V následující tabulce č. 3 jsou shrnuty metody spolu s příklady běžně používaných indikátorů a potřebných detektorů.

Tabulka č. 3: Imunoanalytické metody a jejich indikátory a detektory

Metoda	Indikátor	Příklad indikátoru	Detektor
RIA	radioizotop	I 131, I125, C14	scintilátor
EIA, ELISA	enzym	křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza	spektrofotometr
FIA	fluorochrom	fluorescein izothiokyanát (FITC), fluoreskamin	fluorimetr
LIA	luminofor	umbeliferon	Analyzátor s přímou luminiscenční detekcí
CIA	chemiluminofor	luminol, isoluminol	Analyzátor s přímou chemiluminiscenční detekcí
ECLIA	elektrochemiluminofor	rutheniový komplex	Analyzátor s elektrodou a přímou chemiluminiscenční detekcí

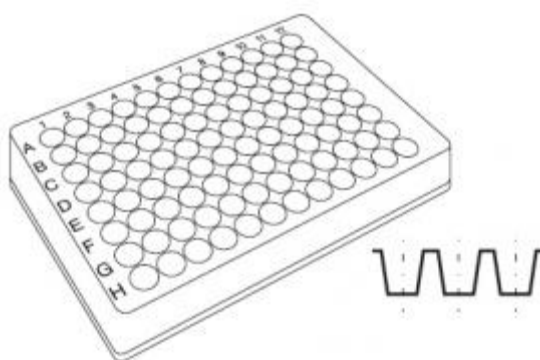
ELISA používá jako indikátor enzym. Enzymy se používají s co nejmenší molekulovou hmotností, aby neovlivňovali reakci v reakční směsi. Mezi běžně používané enzymy patří **křenová peroxidáza** nebo **alkalická fosfatáza**. Enzymy se váží kovalentně na protilátku a při vazbě nesmí ztratit svou enzymovou aktivitu a zůstat **stabilní**. Enzym se přidává v definovaném množství pro následné stanovení množství sledovaného analytu. V neposlední řadě musí být dostupný v čisté formě, aby náklady na jeho výrobu nebyly vysoké a neprodražily celkovou cenu stanovení. V tabulce níže jsou běžně používané enzymy pro ELISA testy spolu s používanými substráty a barevnými změnami.

Tabulka č. 4: Přehled používaných enzymů a jejich substrátů s chromogeny

Enzym	Substrát	Chromogen	Změna barvy + vlnová délka		Roztok pro zastavení
			Nezastavená reakce	Zastavená reakce	
křenová peroxidáza	peroxid vodíku	OPD – o-fenylendiamin	žlutá 450 nm	oranžová 492 nm	1M kyselina sírová
		TMB tetramethylbenzidine	modrá 650 nm	žlutá 450 nm	1% SDS
alkalická fosfatáza	para nitrofenylfosfát	není nutný	žlutá/zelená 405	žlutá/zelená 405	2M uhličitan sodný

Druhy pevných fází

ELISA je v heterogenním uspořádání, tedy probíhá s jedním reaktantem navázaným na pevnou fázi. Pevnou fází je nejčastěji **dno a stěny mikrotitrační destičky**. Mikrotitrační destička je nejčastěji plastová 96 jamková, ale může být i ze skla nebo polystyrenu. Kromě mikrotitrační destičky se jako pevná fáze může použít polystyrenová tyčinka, míchadlo, papírový disk nebo v poslední době stále více oblíbené magnetické částice. Na obrázku je znázorněna mikrotitrační destička od firmy Gama. Tato mikrotitrační destička je typu P. Typ se rozlišuje podle tvaru jamky. Typ P je nejvhodnější pro použití u testu ELISA.

**Obr. č. 5:** Mikrotitrační destička typu P s detailem jamky [17]

Zajímavosti

V dnešní době se běžně používají ELISA kity, kdy jsou všechny reagenty připraveny k okamžitému použití, protilátka nebo antigen je již navázán na pevné fázi a výsledek stanovení můžeme mít i do 30 minut od začátku analýzy.

3.2.2 Cvičení

- 1) Spojte dvě správné dvojice:

RIA – scintilátor

Enzym – křenová peroxidáza

Fluorescein – fluorimetr

Pevná fáze – mikrotitrační destička

- 2) Zaškrtněte správné možnosti:

ELISA používá jako indikátor enzym/radioizotop / fluorochrom a jako detektor scintilátor / fluorimetr / spektrofotometr. Jako pevná fáze může být použito: míchadlo / magnetické částice / vzduch / elektrické kolo / slepice / mikrotitrační destička / sklo.

- 3) Zamyslete se nad dvěma běžně používanými indikátory u ELISA testů
- 4) Co se nejčastěji používá jako pevná fáze u ELISA testu? Jaké jsou další varianty? Diskutujte se spolužákem.

3.2.3 Shrnutí

ELISA metoda spadá do imunoanalytických metod. Liší se použitým indikátorem a detektorem. ELISA používá jako indikátory enzymy (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza). ELISA v heterogenním uspořádání používá jako pevnou fázi nejčastěji mikrotitrační destičku.

3.2.4 Rozšiřující téma

Další kapitola Vás seznámí s poměrně složitými variantami EIA testů a to – homogenní, heterogenní, kompetitivní a nekompetitivní. Dále ukáže uspořádání ELISA testů a to: přímé, nepřímé a sendvičové. V neposlední řadě se seznámíte s nejčastěji stanovovanými analyty ELISA metody, které jdou stanovit kvalitativně i kvantitativně. Varianty ELISA metody jsou velmi důležité při správné laboratorní praxi proto budou vysvětleny pomocí schémat a animací. Kantor Vás seznámí s neduhy spojenými se špatným výběrem varianty. Zkuste si zahrát hru, kdy budete zastupovat jednotlivé prvky testu a navzájem se identifikovat.

3.2.5 Rozšiřující literatura

JANEWAY Charles, TRAVERS Paul, WALPORT Mark, SCHLOMCHIK Mark. *Immunobiology*. Garland science publishing, 2005. 6.

KODÍČEK Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004.

DE ALMEIDA Pondé, ROBÉRIO Amorim. *Enzyme-linked immunosorbent/chemiluminescence assays, recombinant immunoblot assays and nucleic acid tests in the diagnosis of HCV infection*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2013.32.8.985-988.

GAN, Stephanie D., PATEL, Kruti. *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. *J Invest Dermatol*, 2013. 133.9.

3.3 Stanovované analyty a laboratorní uspořádání ELISA testu

Cíl kapitoly: studenti budou schopni vybrat správné uspořádání ELISA metody pro stanovení různých analytů

Klíčová slova: ELISA, tumormarkery, hormony, alergen

Vhled do problematiky:

ELISA se používá při stanovení antigenů a protilátek a to např. hormonů, autoprotilátek, tumormarkerů, léčiv, drog nebo toxinů. V laboratorní praxi je nejčastěji používána ELISA metoda v nekompetitivním heterogenním uspořádání. Pro její pochopení je zapotřebí znát i varianty kompetitivní a homogenní.

3.3.1 Výklad

Stanovované analyty

Laboratorní metoda ELISA umožňuje stanovení velmi malého množství analytů v řádech **nanogramů až pikogramů**. Touto metodou lze stanovit vysokomolekulární i nízkomolekulární látky. Mezi vysokomolekulární látky patří např. **proteiny**, peptidy, glykoproteiny. Mezi látky nízkomolekulární se řadí **hormony, tumormarkery, léčiva, drogy** nebo **toxiny**. V laboratorní praxi nachází tato metoda využití při potvrzení infekce v organismu a stanovení fáze infekce.

Stanovují se pomocí ní specifické tumormarkery při podezření na nádorové onemocnění. Dále se používá ke stanovení autoprotilátek při podezření na autoimunitní onemocnění. Metodou lze monitorovat průběh onemocnění a účinnost léčby. Využití najde i při potravinových intolerancích. Můžeme stanovit např. množství lepku v těstovinách, pekařských a jiných cereálních výrobcích. U potravin můžeme stanovit i různé chemické kontaminanty (např. přítomnost toxinů, akrylamidu, pesticidů).

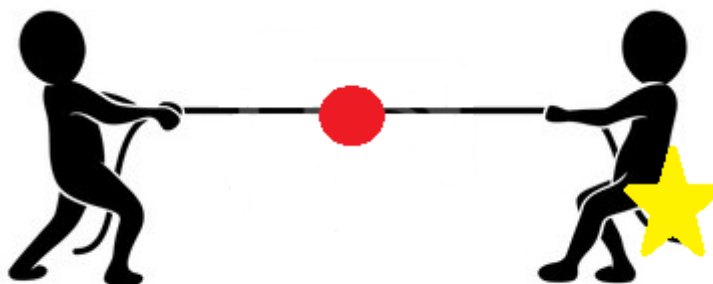


Obr. č. 6: Bakterie a toxiny číhající na oslabený organismus [22]

Uspořádání ELISA metody

ELISA spadá do imunoanalytických metod, které využívají jako indikátor značený enzym (EIA). EIA metody se dále dělí podle uspořádání na **homogenní** nebo **heterogenní**. Homogenní EIA probíhá v kapalném prostředí. U heterogenního uspořádání testu (ELISA) je jedna z reagujících složek (antigen/protilátka) navázána na pevnou fázi.

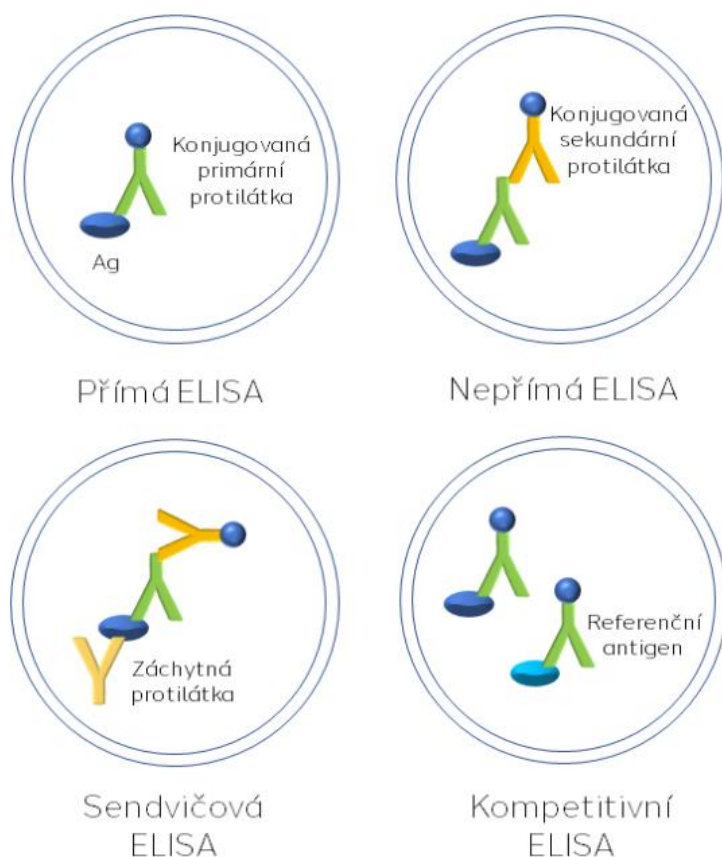
EIA metody se dále dělí na **kompetitivní** nebo **nekompetitivní**. U kompetitivního uspořádání dochází k soutěži mezi přidaným reaktantem a reaktantem ze vzorku o daný počet vazebných míst. Protože dochází k soutěži je měřený signál nepřímo úměrný koncentraci protilátky/antigenu ze vzorku. Čím více reaktantu je ve vzorku, tím je menší zbarvení roztoku/je méně měřeného signálu. U nekompetitivního uspořádání probíhá reakce mezi protilátkou a antigenem odděleně a až v dalším kroku je přidáván indikátorový systém. Měřený signál je přímo úměrný koncentraci protilátky/antigenu ze vzorku. Na obrázku je vidět, jak soutěží značená protilátka (s hvězdičkou) a neznačená protilátka o antigen (červené kolečko). Protože neznačená protilátka nemusí držet ještě enzym, vždy soutěž vyhraje právě ona.



Obr. č. 7: Soutěž značené a neznačené protilátky o antigen [Autor]

Rozdělení ELISA metody

Laboratorní technika ELISA se dělí podle varianty testu na přímou, nepřímou, sendvičovou a kompetitivní. Každá varianta je v textu vysvětlena samostatně s jednotlivými reakčními kroky. Důvodem, proč je více variant testu je to, že většina stanovovaných analytů je velmi malá. Aby došlo k co nejlepšímu zachytu a reprodukovatelnosti metody, je proto zapotřebí test upravit. Dalším důvodem je také to, že se test provádí přímo ze séra, které obsahuje velké množství dalších látek, které by mohly reagovat a tak snížit reprodukovatelnost a nebo také způsobit, že by test byl falešně pozitivní či negativní.



Obr. č. 8: Rozdělení ELISA metody podle variant [23]

Přímá ELISA

Toto je nejjednodušší uspořádání ELISA metody. Dochází zde k reakci antigenu, který je imobilizován na pevnou fázi (dno a stěny mikrotitrační destičky), s protilátkou, která je značena enzymem (konjugát). Vzniká imunokomplex antigen-konjugát. Po přidání substrátového roztoku dochází pomocí enzymu ke vzniku produktu za vzniku viditelné a měřitelné barevné

změny. Používá se při kvalitativním a kvantitativním stanovení antigenu ve vzorku. Na každý stanovovaný antigen je zapotřebí specifické protilátky značené enzymem. Proto je výhodná pro laboratoře, které stanovují často stejné antigeny.



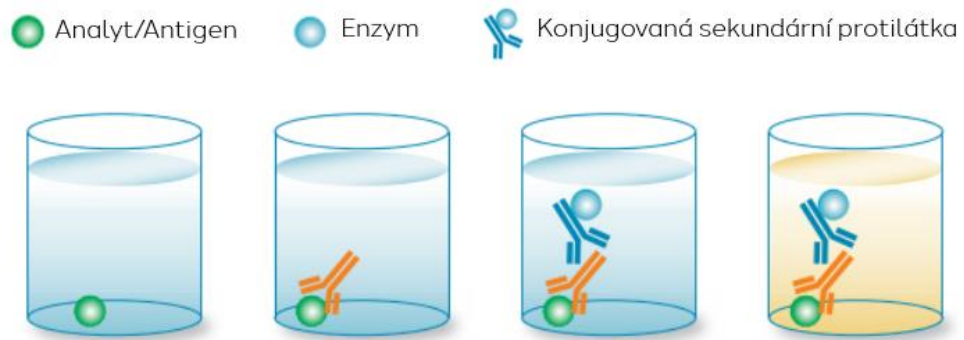
Obr. č. 9: Přímé uspořádání ELISA metody [23]

Kroky přímé ELISA metody:

- 1. krok – navázání antigenu (analytu ze vzorku) na pevnou fázi (inkubace)
- 2. krok – odstranění nenavázaných reaktantů (promytí)
- 3. krok – navázání protilátky s enzymem (inkubace)
- 4. krok – odstranění nenavázané protilátky (promytí)
- 5. krok – přidání substrátu, enzymatická reakce (inkubace)
- 6. krok – měření barevné změny na spektrofotometru (detekce)

Nepřímá ELISA

I zde dochází k reakci antigenu, který je imobilizován na pevnou fázi (dno a stěny mikrotitrační destičky), s primární protilátkou. Protilátka není nijak značená pouze se naváže na imobilizovaný antigen. Následuje přidání další protilátky, tentokrát sekundární, která je značena enzymem. Vzniká imunokomplex antigen-primární protilátka-sekundární protilátka. Po přidání substrátového roztoku dochází pomocí enzymu ke vzniku produktu za vzniku viditelné a měřitelné barevné změny. Tato varianta ELISA metody má vyšší citlivost, protože se na komplex antigen-protilátka díky primární protilátce může navázat více sekundárních protilátek a tak dochází ke zvýšení signálu. Toto uspořádání je vhodné pro laboratoře, které chtějí provádět variabilní testy. Protože sekundární protilátka může být pořád stejná a mění se pouze primární s ohledem na stanovovaný antigen. Protože je zde další inkubační krok, dochází k časovému prodloužení analýzy oproti přímé ELISA metodě.



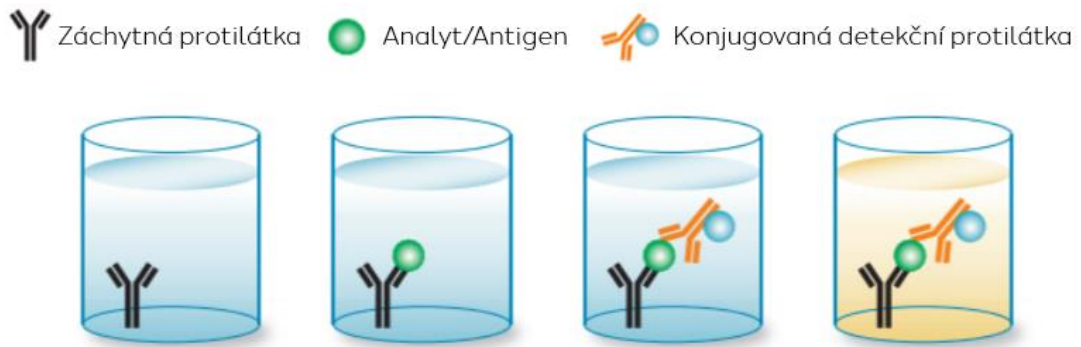
Obr. č. 10: Nepřímé uspořádání ELISA metody [23]

Kroky nepřímé ELISA metody:

- 1. krok – navázání antigenu (analytu ze vzorku) na pevnou fázi (inkubace)
- 2. krok – odstranění nenavázaných reaktantů (promytí)
- 3. krok – navázání primární protilátky (inkubace)
- 4. krok – odstranění nenavázané protilátky (promytí)
- 5. krok – navázání sekundární protilátky s enzymem (inkubace)
- 6. krok – odstranění nenavázané protilátky (promytí)
- 7. krok – přidání substrátu, enzymatická reakce (inkubace)
- 8. krok – měření barevné změny na spektrofotometru (detekce)

Sendvičová ELISA

U sendvičové ELISA metody se využívá dvou protilátek, které jsou schopny pomocí epitopů navázat jeden antigen. První protilátka se imobilizuje na pevnou fázi (dno a stěny mikrotitrační destičky) a označuje se jako tzv. záchytná protilátka. Dále se přidá stanovovaný antigen, který se na tuto protilátku může snadněji navázat. Druhá protilátka, která je značena enzymem (konjugovaná detekční protilátka) se naváže na komplex protilátka-antigen a dochází k tzv. sendviči protilátka-antigen-protilátka. Po přidání substrátového roztoku dochází pomocí enzymu ke vzniku produktu za vzniku viditelné a měřitelné barevné změny. Výhodou tohoto uspořádání je vysoká citlivost a specifita, protože se k detekci jednoho antigenu používá dvou protilátek. Používá se k detekci jednoho antigenu ve vzorcích, kde je antigenů hodně.



Obr. č. 11: Sendvičové uspořádání ELISA metody [23]

Kroky sendvičové ELISA metody:

- 1. krok – navázání protilátky na pevnou fázi (inkubace)
- 2. krok – odstranění nenavázané protilátky (promytí)
- 3. krok – navázání antigenu ze vzorku na záchytnou protilátku (inkubace)
- 4. krok – odstranění nenavázaných reaktantů (promytí)
- 5. krok – navázání sekundární protilátky s enzymem (inkubace)
- 6. krok – odstranění nenavázané protilátky (promytí)
- 7. krok – přidání substrátu, enzymatická reakce (inkubace)
- 8. krok – měření barevné změny na spektrofotometru (detekce)

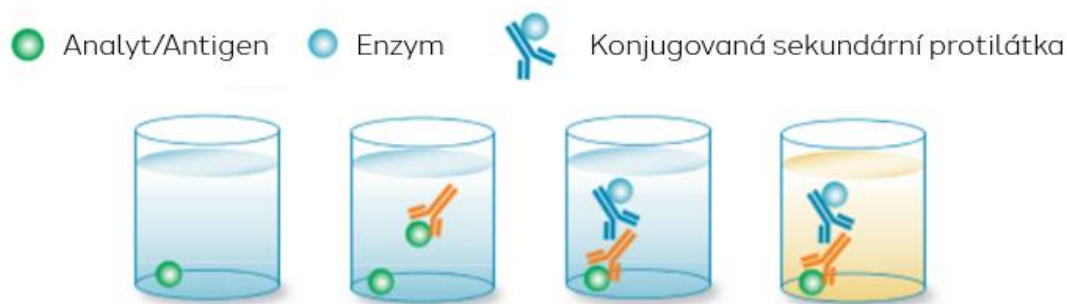
Kompetitivní ELISA

Toto uspořádání už podle názvu znamená, že bude docházet k soutěži. Toto uspořádání lze použít u všech předchozích variant testu ELISA tedy u: přímé, nepřímé i sendvičové varianty. Využívá se zde soutěže mezi antigenem, který je do reakcí přidáván a antigenem ze vzorku, který je předem smíchán s protilátkou. Kompetitivní ELISA se v praxi používá u vzorků, které nejsou purifikované – tedy nijak upravené před analýzou. Také se používá při detekci antigenů, které jsou příliš malé.

Pro jasnější představu je uveden příklad nepřímé kompetitivní ELISA metody:

Antigen je imobilizován na pevnou fázi. Tento antigen není antigen stanovovaný ale antigen přidávaný do reakce. Náš stanovovaný vzorek je nejprve smíchán s protilátkou a teprve poté se přidává do reakční jamky. Po ustanovení rovnováhy se analyzovaný vzorek vymyje. Přidá se sekundární protilátka značená enzymem. Po přidání substrátového roztoku dochází pomocí enzymu ke vzniku produktu za vzniku viditelné a měřitelné barevné změny. Čím více

primární protilátka bude vyvázáno antigenem ze vzorku, tím slabší detekovaný signál. Signál je tedy nepřímo úměrný množství stanoveného antigenu.



Obr. č. 12: Nepřímé kompetitivní uspořádání ELISA metody [23]

Kroky nepřímé kompetitivní ELISA metody:

- 1. krok – navázání referenčního antigenu na pevnou fázi (inkubace)
- 2. krok – odstranění nenavázaného antigenu (promytí)
- 3. krok – přidání antigenu ze vzorku s navázanou primární protilátkou
- 4. krok – rozdělení antigenu a protilátky, protilátka se váže na referenční antigen (inkubace)
- 5. krok – odstranění nenavázaných reaktantů (promytí)
- 6. krok – přidání sekundární protilátky (inkubace)
- 7. krok – odstranění nenavázané sekundární protilátky (promytí)
- 8. krok – přidání substrátu, enzymatická reakce (inkubace)
- 9. krok – měření barevné změny na spektrofotometru (detekce)

3.3.2 Cvičení

- 1) Nakreslete schéma sendvičové ELISA metody
- 2) Jaký je rozdíl mezi homogenní a heterogenní EIA metodou
- 3) Kdy je signál přímo úměrný množství stanoveného analytu? U kompetitivní nebo nekompetitivní varianty?
- 4) Spojte varianty testu

Kompetitivní – soutěživá

Nekompetitivní – sendvičová

Homogenní – v jednom roztoku

Heterogenní – s pevnou fází

3.3.3 Shrnutí

Existuje několik variant uspořádání ELISA testů a to: přímá, nepřímá a sendvičová. Každá varianta může probíhat v nekompetitivním nebo kompetitivním uspořádání. ELISA metoda používá pevnou fázi pro imobilizaci látek na svém povrchu a proto se označuje jako heterogenní. Pokud by vše probíhalo pouze v roztoku byla by metoda označována jako homogenní EIA. Pomocí ELISA metody lze stanovit (kvalitativně i kvantitativně) velké množství analytů a to např. hormony, autoprotilátky, tumormarkery, hormony, alergeny, léčiva, drogy nebo toxiny.

3.3.4 Rozšiřující téma

V závěrečné kapitole se seznámíte s tím, jak vypadá opravdový laboratorní postup. Jaké analytické vybavení, laboratorní nádobí či roztoky jsou zapotřebí. Dále jaká je časová náročnost testu a jak se výsledek hodnotí a co znamená. Vypracujete laboratorní protokol se všemi náležitostmi. Tedy postupem, principem metody, používanými reagensy, nádobím, roztoky. Dále bude protokol obsahovat výsledek a hodnocení. Do závěru napište výsledek a co to pro daného člověka znamená.

3.3.5 Rozšiřující literatura

<https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>

<https://docs.abcam.com/pdf/kits/elisaguide.pdf?elqTrackId=d6ba4a9cf2494de599dd122902c74227>

<https://www.bio-rad-antibodies.com/blog/deciding-which-elisa-technique-is-right-for-you.html>

3.4 Laboratorní stanovení obsahu lepku

Cíl kapitoly: studenti budou schopni provést jednoduchý laboratorní postup. Zároveň budou schopni tento test vyhodnotit.

Klíčová slova: ELISA, laboratoř, celiakie

Vhled do problematiky:

V laboratorní praxi se metoda ELISA velmi často používá při stanovení různých druhů alergenů. Mezi rozšířené alergeny patří lepek, který je zodpovědný za nemoc nazvanou celiakie. Správné laboratorní stanovení alergenu je nezbytné pro potvrzení nemoci a nasazení celoživotní diety.

3.4.1 Výklad

Celiakie a její stanovení

ELISA se používá k posouzení aktuálního stavu celiakie a dodržování bezlepkové diety. Celiakie je autoimunitní onemocnění, kdy jeho imunitní systém nadměrně reaguje na lepek (gluten). Lepek je bílkovina obsažená v zrnech pšenice, žita a ječmene. Následkem imunitní odpovědi dochází k zánětům v oblasti sliznice tenkého střeva, které obsahuje velké množství mikrokloků, které postupně mizí a zmenšuje se tak množství resorpční plochy střeva. Dochází tak k špatnému vstřebávání vitamínů, minerálů a ostatních živin. Tělo při tomto onemocnění vytváří protilátky proti lepku (antigliadiny - AGA), ale také proti vlastní sliznici střeva. Celiakie je čtené onemocnění, které bohužel i přes dobrou diagnostiku zůstává dost často skryto, protože příznaky onemocnění nejsou charakteristické nebo se objevují pouze v některém období života.

Možné příznaky: zažívací obtíže, plynatost, průjmy, chudokrevnost z nedostatku železa, bolesti kloubů, hubnutí, únava, afty, gynekologické obtíže, potraty, neplodnost, migréna nebo deprese. Jedinou léčbou je celoživotní bezlepková dieta, kdy je zapotřebí vynechat i stopové množství lepku. Při dodržování diety se zvolna upravuje hladina protilátek a zlepšuje stav sliznice. Stanovení množství antigliadinových protilátek (AGA) pomocí ELISA metody je vysoce citlivé a levné. Spolehlivost detekce má značnou variabilitu vzhledem k používanému antigenu a především k třídám protilátek IgG a IgA. Velká část populace nemá dostatek IgA protilátek (deficit IgG) a právě u nich tento test může ukazovat na falešnou negativitu. Je zapotřebí stanovit množství IgA protilátek spolu s provedením tohoto testu. Naopak

informovaného lékaře, který ví, že jeho pacient má nízké hladiny IgA výsledek tohoto testu informuje o dodržování diety pacienta, vzhledem k tomu, že IgG protilátky mají delší životnost. V dnešní době se častěji používá stanovení hladiny protilátek proti tkáňové transglutamináze, které je ale dražší. Pro potvrzení diagnózy celiakie se provádí biopsie sliznice.



Obr. č. 13: Potraviny bez obsahu lepku [26]

Princip stanovení

K testu se používá purifikovaný α -gliadin, který je navázaný na pevnou fázi (dno a stěnu mikrotitrační destičky). Neobsazená vazebná místa destičky je zapotřebí zablokovat (aby se na ně nenavazovaly protilátky a další látky ze vzorku). Jsou-li ve vyšetřovaném biologickém materiálu (sérum pacienta) přítomny specifické protilátky AGA, vytvoří se imunokomplex (antigen-protilátka). Ten zůstane navázaný i po promytí promývacím roztokem. Dále se k imunokomplexu přidá sekundární protilátka (konjugát), který je značený enzymem (křenová peroxidáza). Znovu dochází k promytí a odstranění nezreagovaných složek. Po promytí se přidá substrátový roztok, který obsahuje peroxid vodíku a chromogen tetramethylbenzidin (TMB). Dojde k enzymatické reakci, kdy enzym křenová peroxidáza rozloží peroxid vodíku na kyslík a vodu. Kyslík oxiduje chromogen TMB, který změní barvu roztoku do žluta. Intenzita zabarvení roztoku je přímo úměrná množství specifických protilátek ze séra. Zabavení měříme pomocí spektrofotometru přímo v destičce.

Potřeby a reagensie

- Antigen: purifikovaný alfa gliadin (koncentrace 100 mg/l ve fosfátovém pufru pH 7,4)
- Sekundární protilátka (konjugát): prasečí proti lidskému IgA značená křenovou peroxidázou

- Vzorčky sér: naředěné 1:125 fosfátovým pufrém pH 7,4
- Kontrolní sérum: pozitivní(sérum s obsahem AGA) a negativní (redestilovaná voda)
- Aktivační roztok: uhličitanový pufr pH 9,49 s 2,5% glutaraldehydem
- Blokovací roztok: fosfátový pufr pH 7,4 s 0,05% Tweenem 20 a 5% BSA
- Ředící roztok pro vzorky: PBS pufr 7,4 s 0,05% Tweenem 20 a 0,1% BSA
- Ředící roztok pro konjugát: uhličitanový pufr pH 9,49 s 0,05% Tweenem 20 a 0,1% BSA
- Stop roztok: 1M H₂SO₄
- Substrátový roztok: 0,1M octanový pufr pH 5,5, 0,1 mg/ml TMB (zásobní roztok 6 mg/ml v DMSO), 0,003% H₂O₂ (10,37 ml redestilované H₂O, 0,55 ml 2M octanového pufru pH 5,5, 180 µl zásobního roztoku TMB, 1,1 µl H₂O₂)
- Mikrotitrační destička typu P
- Mikropipety jednokanálové – různé objemy
- Mikropipeta vícekanálová
- Mechanická promývačka (lze nahradit vícekanálovou pipetou)
- Spektrofotometr
- Termostat

Postup

- ✓ Do mikrotitrační destičky typu P napipetovat vícekanálovou pipetou uhličitanový pufr pH 9,49 s přídavkem 2,5% glutaraldehydu (150 µl na jamku).
- ✓ Inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě.
- ✓ Po inkubaci obsah destičky vyklepnout a napipetovat antigen naředěný ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (150 µl na jamku).
- ✓ Inkubace minimálně 20 hodin při 4 stupních Celsia v lednici.
- ✓ Po inkubaci obsah destičky vyklepnout, 3x promýt redestilovanou vodou, osušit a napipetovat blokovací roztok (150 µl na jamku).
- ✓ Inkubace 1 hodinu při 37 stupních Celsia v termostatu.
- ✓ Po inkubaci obsah destičky vyklepnout, 5x promýt redestilovanou vodou, osušit a napipetovat vzorek séra naředěného 1:125 ředícím roztokem pro vzorky. Pipetovat dvojkovou řadou tzn. 200 µl vzorku séra 1:125 do první jamky a do dalších jamek 100 µl ředícího roztoku a přepipetovávat 100 µl z předešlé jamky do další. Napipetovat

pozitivní a negativní kontrolu a slepé vzorky tzv. blanky po 100 µl na jamku. Vše znázorněno na následujícím schématu.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
B	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
C	1:125	1:250	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
D								
E	Pozitivní	Negativní	Blank					
F	Pozitivní	Negativní	Blank					
G	Pozitivní	Negativní	Blank					
H								

- ✓ Inkubace 1 hodinu při 37 stupních Celsia v termostatu.
- ✓ Po inkubaci obsah destičky vyklepnout, 5x promýt redestilovanou vodou, osušit a napipetovat po 100 µl na jamku konjugátu ředěného 1: 16 000 ředěného uhličitanovým pufrům pH 9,49.
- ✓ Inkubace 1 hodinu při 37 stupních Celsia v termostatu.
- ✓ Po inkubaci obsah destičky vyklepnout, 5x promýt redestilovanou vodou, osušit a napipetovat po 100 µl na jamku substrátového roztoku.
- ✓ Substrátový roztok se musí připravovat těsně před pipetováním. Roztok je citlivý na vzdušný kyslík a mohlo by dojít k oxidaci chromogenu a k falešně pozitivním výsledkům.
- ✓ Inkubace 15 minut při 37 stupních Celsia ve tmě (destičku obalit alobalem).
- ✓ Po inkubaci rychle napipetovat 50 µl stop roztoku na jamku.
- ✓ Ihned měřit absorbanci pomocí spektrofotometru při 450 nm.

Hodnocení

Ze spektrofotometru dostaneme číselná data o každé jamce. Nejdříve je zapotřebí podívat se na kontrolní séra a blank. Pozitivní sérum by mělo mít hodnotu absorbance minimálně 1 a maximálně 1,5. Pokud je absorbance vyšší bylo sérum špatně naředěno. Negativní sérum a blank by měli mít hodnotu absorbance maximálně 0,15. Vyšší absorbance je dána: špatným pipetováním, kontaminací jamky, špatně připraveným substrátovým roztokem (oxidace).

Při správných hodnotách kontrol je nutné udělat průměrnou hodnotu ze stejně řaděných sér. Pokud je některá hodnota hodně mimo rozpětí, lze ji z počítání vyřadit, aby nedošlo ke zkreslení. To samé se provede i s hodnotou blanku. Poté se odečte od každé hodnoty hodnota blanku.

Posledním úkolem je zjistit, která hodnota titru séra ještě dává pozitivní výsledek. Jako pozitivní výsledek můžeme uvažovat hodnotu absorbance po odečtení blanku 0,25 a vyšší.

3.4.2 Otázky

- 1) Jaký jste použili enzym a detektor?
- 2) Co je to blank?
- 3) Jaký je nejnižší pozitivní výsledek absorbance?
- 4) Jaká kyselina se přidává do substrátového roztoku?

3.4.3 Rozšiřující literatura

<https://behejsrdcem.com/clanky/problem-s-travenim-lepku-reste-pricinu-ne-priznaky/>

SHOENFELD, Yehuda, GERSHWIN, M. Eric, MERONI, Pier Luigi. *Autoantibodies*. Elsevier, 2014.

ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén-Karolinum, 2007.

RASHTAK, Shadi, ELTORE W. Michael. *Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease*. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008.426-432.

3.5 Závěrečné cvičení

Vysvětlete tyto pojmy:

ELISA

Protilátka

Antigen

Imunokomplex

Konjugát

TMB

Nakreslete nepřímé provedení ELISA testu v nekompetitivním uspořádání

Křížovka:

					S	C	I	N	T	I	L	Á	T	O	R							
					P	I	P	E	T	A												
					E	L	I	S	A													
I	M	U	N	O	K	O	M	P	L	E	X											
M	A	G	N	E	T	I	C	K	É													
					R	A	D	I	O	I	Z	O	T	O	P							
					K	O	N	J	U	G	Á	T										
					F	L	U	O	R	O	CH	R	O	M	Y							
I	N	D	I	K	Á	T	O	R	Y													
					A	N	T	I	G	E	N											
					T	U	M	O	R	M	A	R	K	E	R	Y						
										M	I	K	R	O	T	I	T	R	A	Č	N	Í
										D	E	T	E	K	T	O	R	Y				
										P	R	O	T	I	L	Á	T	K	A			
										B	A	R	V	Y								

- 1) Jak se nazývá přístroj, který se používá jako detektor u RIA metody?
- 2) Jak se nazývá stroj na pipetování?
- 3) Která metoda je nekompetitivní v heterogenním uspořádání?
- 4) Co vznikne při reakci antigenu s protilátkou?
- 5) Jaké částice se mohou používat jako pevná fáze u ELISA metody?
- 6) Jaký indikátor se používá u RIA testu?
- 7) Jak můžeme jinak pojmenovat sekundární protilátku?
- 8) Jaký indikátor se používá u FIA metody?
- 9) Co se mění kromě detektorů u imunoanalytických metod? Je to např. enzym, radioizotop...
- 10) Jaká látka navozuje produkci protilátek?
- 11) Co můžeme stanovovat pomocí ELISA testu u podezření na nádorová onemocnění?
- 12) Jaké destičky se používají u ELISA metod?
- 13) Spektrofotometry nebo scintilátory jsou
- 14) Co reaguje s antigenem za vzniku imunokomplexu?
- 15) Změna čeho se měří na spektrofotometru?

3.6 Závěrečné shrnutí

- ✓ ELISA pracuje na principu reakce mezi antigenem a protilátkou
- ✓ měří se barevná změna roztoku, která je způsobena přítomným stanovovaným analytem a navázanou sekundární protilátkou s enzymem, který mění substrátový roztok na produkt
- ✓ jako pevná fáze se nejčastěji používá mikrotitrační destička
- ✓ barevná změna se měří na přístroji nazývaném spektrofotometr
- ✓ metoda je specifická a citlivá
- ✓ nejčastěji se používá při detekci protilátek nebo antigenů

3.7 Didaktický rozbor učiva – příručka pro učitele

V kapitole „**O laboratorní metodě ELISA**“ si studenti osvěží základní pojmy, které jsou pro další studium této problematiky zásadní. Je zapotřebí si osvojit a pochopit, co jednotlivé pojmy užívané v laboratorní metodě ELISA znamenají, a proto bude práce s učebním textem doplněná o výklad přednášejícího velmi důležitá. To samé platí i pro princip metody, který bude vysvětlen názorně pomocí dalších školních pomůcek a to: schéma na tabuli + video. Pochopení základních pojmů je pro ELISA metodu klíčové a proto je zapotřebí je na správných příkladech vysvětlit. Učitel může výklad doplnit vhodnými zajímavostmi z historie metody.

V kapitole „**Specifikace ELISA metody**“ se studenti seznamují s dalšími imunoanalytickými metodami ke kterým náleží i dané indikátory a detektory. Zde je významný přesah učiva s dalšími laboratorními i teoretickými předměty. Od počátku bude kladen důraz právě na propojení znalostí z předchozích nebo podobných předmětů. Bude vedena diskuze o tom, co si studenti pamatují a učební látka bude doplněna i o spoustu pro ně nových věcí. Budou zde podrobně zmíněny jednotlivé detektory, indikátory, enzymy a chromogeny. V rámci opakování již dříve probraných kapitol imunoanalytických metod bude tato kapitola probíhat hodně diskuzně. Ve výkladu kantora se objeví důležité podrobnosti, nadstavbové informace nebo zajímavosti.

Kapitola „**Stanovované analyty a laboratorní uspořádání ELISA testu**“ je co se týče práce s učivem stěžejní. Od počátku zde bude kladen důraz na vysvětlení všech variant ELISA testu s podrobnými schématy jak na tabuli, tak s možností puštění animace jednotlivých variant. Kantor vysvětlí důležitost zvolení správné varianty testu a upozorní na neduhy spojené se špatným výběrem. Po diskuzi ověřující znalosti studentů bude přistoupeno k praktickému nacvičování pomocí hry, kdy budou studenti zastupovat jednotlivé prvky ELISA testu a budou se navzájem identifikovat.

V závěrečné kapitole „**Ukázkový laboratorní postup**“ si studenti v laboratoři ověří všechny své znalosti a prakticky si je vyzkouší. I zde bude nejprve výklad kantora spolu s ukázkou nově používaného laboratorního nádobí. Studenti budou pracovat ve dvojicích, kdy budou některé části úlohy dělat společně a část každý sám pro porovnání správnosti pipetování. To, jaké části budou dělat společně jim určí kantor i s ohledem na časovou náročnost a

laboratorní vybavení. Své laboratorní výsledky budou prezentovat před studenty v následující hodině, kdy vytvoří laboratorní protokol, který musí obsahovat výsledky laboratorní práce a diskuzi nad nimi.

4 Závěr

Závěrečná práce je uceleným pracovním materiálem pro výuku laboratorní techniky ELISA, jež spadá do předmětu Vybrané laboratorní metody.

V teoretické části závěrečné práce jsem se zabývala psaním učebního textu a učebnic. Tato teoretická část je takovým průvodním listem, podle kterého by měl být učební text napsán a co vše by měl obsahovat. Je zde popsáno, jak lze učebnice využít z jejího funkčního hlediska. Je zde také rozebrána didaktická vybavenost učebnice, její strukturní komponenty a jak se didaktická vybavenost stanovuje.

Důležitou kapitolou je také struktura školní učebnice, kdy lze učební text rozdělit na výkladový, doplňující a vysvětlující. Další kapitolou, která je při psaní učebnice důležitá, je kapitola o obtížnosti textu. Obtížnost textu je dána jejím obsahem a komunikačním ztvárněním. Protože je dána specifickými charakteristikami, lze ji měřit, a proto v této kapitole nechybí ani její výpočet. Poslední kapitolou teoretické části jsou požadavky na učebnici, které jsou také nepochybně velmi důležité.

V praktické části je zhotoven ucelený učební text o laboratorní technice ELISA. Text je didakticky zpracován. Každá podkapitola obsahuje cíl, klíčová slova, vzhled do problematiky, vlastní výklad, cvičení/kontrolní otázky a závěrečné shrnutí. Text obsahuje ilustrační příklady a lze ho aplikovat v učební praxi. Po prostudování tohoto učebního textu budou studenti schopni vysvětlit princip laboratorní techniky ELISA, budou znát základní pojmy, uspořádání metody, používané chromogeny, enzymy a substráty. V neposlední řadě budou schopni studenti nejen teoreticky vysvětlit vše potřebné k laboratorní technice ELISA, ale především ji budou umět i prakticky provést v laboratoři.

Tento učební text může být velmi dobře zařazen do výuky Vybraných laboratorních metod. Studenti středních zdravotnických škol získají ucelený přehled a vzhled do problematiky metody a učební text jim může sloužit jako dobrý podklad pro tvorbu maturitních otázek či při následném studiu na vysokých školách.

5 Seznam literatury

- 1) ZORMANOVÁ, Lucie. *Obecná didaktika*. Praha: Grada publishing a.s., 2014.
- 2) SKALKOVÁ, Jarmila. *Obecná didaktika*. Praha: Grada publishing a.s., 2007.
- 3) PRŮCHA, Jan. *Moderní pedagogika*. 4. vyd. Praha: Portál, 2009.
- 4) KALHOUS, Zdeněk. *Školní didaktika*. Praha: Portál, 2002. 447 s.
- 5) KLEČKA, Milan. *Teorie a praxe tvorby učebnic chemie pro střední školy*. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, 2011.
- 6) KURELOVÁ, Milena. *Učitelská profese v teorii a v praxi*. Ostrava: Ostravská univerzita, 1998.
- 7) SKALKOVÁ, Jarmila. *Obecná didaktika: vyučovací proces, učivo a jeho výběr, metody, organizační formy vyučování*. 2. vyd. Praha: Grada, 2007.
- 8) LEPIL, Oldřich. *Teorie a praxe tvorby výukových materiálů: zvyšování kvality vzdělávání učitelů přírodovědných předmětů*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2010.
- 9) <https://www.kosmas.cz/knihy/233703/laboratorni-diagnostika/> [16.1.2020]
- 10) https://www.wikiskripta.eu/w/Protil%C3%A1tko#/media/File:Protilatka_cz.png [16.1.2020]
- 11) <https://www.reoamos.cz/znacka-vystrahy-pozor-radioaktivni-zareni/d-5708/> [16.1.2020]
- 12) CROWTHER, John R.: *The ELISA guidebook*. Vol. 149. Springer Science & Business Media, 2001.
- 13) HOŘEJŠÍ, Václav, BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 2017.
- 14) ENGVALL, Eva, PERLMANN, Peter. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Protides of the biological fluids, 1971. 553-556.
- 15) MAISNAR Vladimír, TICHÝ Miloš. *Monoklonální imunoglobuliny – výskyt význam a možnosti jejich průkazu*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2012.
- 16) PAULÍK Milan. *Výšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada publishing a.s., 2005.
- 17) <https://www.gama.cz/katalog/mikrotitracni-desticka-p-pro-elisa-testy> [16.1.2020]
- 18) JANEWAY Charles, TRAVERS Paul, WALPORT Mark, SCHLOMCHIK Mark. *Immunobiology*. Garland science publishing, 2005. 6.
- 19) KODÍČEK Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004.

- 20) DE ALMEIDA Pondé, ROBÉRIO Amorim. *Enzyme-linked immunosorbent/chemiluminescence assays, recombinant immunoblot assays and nucleic acid tests in the diagnosis of HCV infection*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2013.32.8.985-988.
- 21) GAN, Stephanie D., PATEL, Kruti. *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. *J Invest Dermatol*, 2013. 133.9.
- 22) http://www.stockphotos.cz/image.php?img_id=3131789&img_type=1 [16.1.2020]
- 23) <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/> [16.1.2020]
- 24) <https://docs.abcam.com/pdf/kits/elisaguide.pdf?elqTrackId=d6ba4a9cf2494de599dd122902c74227> [16.1.2020]
- 25) <https://www.bio-rad-antibodies.com/blog/deciding-which-elisa-technique-is-right-for-you.html> [16.1.2020]
- 26) <https://behejsrdcem.com/clanky/problem-s-travenim-lepku-reste-pricinu-ne-priznaky/> [16.1.2020]
- 27) SHOENFELD, Yehuda, GERSHWIN, M. Eric, MERONI, Pier Luigi. *Autoantibodies*. Elsevier, 2014.
- 28) ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén-Karolinum, 2007.
- 29) RASHTAK, Shadi, ELTORE W. Michael. *Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008.426-432.