



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Charakterizace protilátkové odpovědi u lidí očkovaných vakcínou Pfizer-BioNTech

Characterization of antibody response in people vaccinated by Pfizer-BioNTech vaccine

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Karolína Šilhová

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Šilhová** Jméno: **Karolína** Osobní číslo: **491703**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Charakterizace protilátkové odpovědi u osob očkováných vakcínou Pfizer BioNTech

Název bakalářské práce anglicky:

Characterization of Antibody Response in Persons Vaccinated by Pfizer BioNTech Vaccine

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude detekce a kvantifikace protilátek v séru periferní krve u jedinců očkováných mRNA vakcínou proti SARS-CoV-2. Teoretická část bakalářské práce bude zaměřena na mechanismus antiinfekční imunity se zaměřením na antivirovou imunitní odpověď. Stručně budou shrnuty informace o rozpustných (secernovaných) imunoglobulinech a imunitních reakcích založených na protilátkách. Dále bude pojednáno o očkování a druzích dostupných vakcín proti SARS-CoV-2. V praktické části bakalářské práce bude studována schopnost mRNA vakcíny od firmy Pfizer-BioNTech indukovat vznik protilátek. Množství protilátek bude kvantifikováno v séru periferní krve očkováných jedinců pomocí imunoenzymatické metody Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Sledováním vývoje hodnot hladiny protilátek v průběhu 6 měsíců po provedeném očkování druhou dávkou vakcíny Pfizer-BioNTech, budeme schopni ověřit dlouhodobý protektivní efekt očkování.

Seznam doporučené literatury:

- [1] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, Základy imunologie, ed. 6 aktualizované vydání, Triton, 2017, ISBN 978-80-7553-250-3
- [2] WANG, Zijun, Fabian SCHMIDT, Yiska WEISBLUM, et al, mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants, online, Nature, ed. 2021, číslo 592, 7855, Přístupné z: doi:10.1038/s41586-021-03324-6, ISSN 0028-0836
- [3] BARNES, Christopher O., Claudia A. JETTE, Morgan E. ABERNATHY, et al, SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies, online, Nature, ed. 2020, ročník 588, číslo 7839, Přístupné z: doi:10.1038/s41586-020-2852-1, ISSN 0028-0836

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Charakterizace protilátkové odpovědi u lidí očkovanych vakcínou Pfizer-BioNTech, vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 05.05.2022

.....

Karolína Šilhová

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala doc. RNDr. Jířimu Hrdému, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a cenné informace při vedení mé diplomové práce a také za odborný dohled při experimentálním měření. Za provedení statistické analýzy bych ráda poděkovala MUDr. Ing. Lubomíru Štěpánkovi.

Dále bych chtěla poděkovat Všeobecné fakultní nemocnici v Praze za zajištění odběru vzorků pro studii a také Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za umožnění realizace praktické části této bakalářské práce.

ABSTRAKT

V průběhu infekce virem SARS-CoV-2 (z angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) se tvoří izotypy imunoglobulinů (IgA, IgM, IgG), které jsou namířené proti různým virovým epitopům (polyklonální protilátky). Nejspolehlivější ochranný efekt je u protilátek proti antigenu S1 podjednotky spikového proteinu, který je zodpovědný za vazbu na receptor pro angiotensin konvertující enzym 2 (ACE2 z angl. angiotensin-converting enzyme 2), po jehož navázání dochází ke vstupu viru SARS-CoV-2 do buněk hostitele.

V této studii byla studována dynamika změny hladin protilátek IgM a IgG proti spikovému proteinu v průběhu 6 měsíců po očkování dvěma dávkami messenger RNA (mRNA) vakcíny Comirnaty (od společnosti Pfizer-BioNTech). Ke kvantitativnímu stanovení specifické humorální odpovědi po očkování byla použita enzymová imunoanalýza se zaměřením na detekci protilátek anti-S1 IgM a anti-S1 IgG. Byly prokázány nejvyšší titry specifických protilátek ve 3. měsíci po ukončeném očkování, a naopak byl zjištěn výrazný pokles specifických protilátek v odběrech 4,5 měsíce po podání 2. dávky vakcíny Comirnaty (BNT162b2).

V rámci studie byla zjištěna korelace mezi hodnotami specifických protilátek proti spikovému proteinu viru SARS-CoV-2 ve třídě IgM a indexem tělesné hmotnosti (BMI z angl. body mass index) i věkem jedince. Další korelace byla zjištěna mezi vlivem prodělaného onemocnění COVID-19 (z angl. coronavirus disease 2019) s tvorbou specifických protilátek IgG proti spikovému proteinu. Pro prodloužení protektivní imunity je kvůli postupnému poklesu specifických protilátek doporučeno využít posilovací dávku.

Klíčová slova

SARS-CoV-2; protilátky; očkování; spikový protein; ELISA

ABSTRACT

During the infection caused by SARS-CoV-2 virus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), isotypes of immunoglobulins (IgA, IgM, IgG) are developing, which are directed against different viral epitopes (polyclonal antibodies). The best protecting effect is mediated by antibodies against S1 antigen, the subunit of the spike protein, which is responsible for binding to the receptor for angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), after its bonding, it leads to the entrance of the SARS-CoV-2 virus into the host's cells.

In this study, the dynamic changes of antibodies IgM and IgG against the spike protein in period of 6 months after accomplished vaccination by two doses of messenger RNA (mRNA) Comirnaty vaccine (from Pfizer-BioNTech) was followed. For quantitative determination of the specific humoral response, an enzyme immunoanalysis was used with the specialization on detection of antibodies anti-S1 IgM and anti-S1 IgG. It was discovered, that the highest titres of specific antibodies are in the 3rd month after vaccination, but on the other hand, a significant drop of the specific antibodies was detected 4.5 months after the second dose of the vaccine Comirnaty (BNT162b2).

In the frame of the study, a correlation between the development of specific IgM antibodies against the spike protein of the SARS-CoV-2 virus with BMI (body mass index) and with the age of the person was discovered. The next correlation was between the impact of the experience of COVID-19 (covid disease 2019) and the development of specific IgG antibodies against the spike protein. For the prolongation of the protective immunity, a booster dose is recommended, because of the drop of the specific antibodies.

Keywords

SARS-CoV-2; antibodies; vaccination; spike protein; ELISA

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce	10
3	Přehled současného stavu.....	11
3.1	Imunitní systém	11
3.2	Vrozená a adaptivní imunita v antiinfekční obraně	13
3.2.1	Složky adaptivní imunity	15
3.3	Humorální imunita.....	18
3.3.1	Funkce imunoglobulinů	20
3.4	Obrana organismu proti virům	25
3.5	Koronaviry.....	27
3.5.1	SARS-CoV-2.....	29
3.6	Monoklonální protilátky používané v terapii COVID-19.....	31
3.7	Aktivní imunizace (vakcinace).....	33
3.7.1	Přehled vakcín proti onemocnění COVID-19	33
4	Metodika	38
4.1	Časový rozvrh sběru dat	38
4.2	Metoda ELISA.....	39
4.2.1	Sendvičová ELISA.....	39
4.3	Používané soupravy Matriks Biotek®.....	40
4.4	Používané přístroje	40

4.5	Pracovní pomůcky pro kalibrované měření.....	40
4.6	Používané chemikálie	41
4.6.1	Příprava promývacího pufru (wash buffer).....	41
4.6.2	Ředění vzorků	42
4.7	Princip měření	42
4.8	Postup měření	43
4.9	Kontrola kvality měření.....	45
4.10	Interpretace výsledků.....	46
5	Výsledky	47
5.1	Koncentrace specifického IgM proti spikovému proteinu	47
5.2	Koncentrace specifického IgG proti spikovému proteinu	51
6	Diskuze.....	55
7	Závěr	61
8	Seznam použitých zkratk	62
9	Bibliografie	66
10	Seznam použitých obrázků	78
11	Seznam použitých tabulek	80
12	Seznam příloh	81

1 ÚVOD

První případy beta-koronaviru SARS-CoV-2, který je původcem koronavirového onemocnění COVID-19 byly v České republice potvrzeny 1. 3. 2020. (Piler, 2021) Vzhledem k velkému tlaku na nemocniční systém a rychlost šíření se jako zásadní způsob v boji s epidemií uplatnilo očkování, které bylo v České republice zahájeno 27. 12. 2020. Po zahájení očkování následovalo postupné spouštění registrace do očkovacího systému. (Blatný, 2020) Cílem očkování proti delta variantě SARS-CoV-2 bylo ochránit zejména starší osoby, zdravotníky, ohrožené skupiny obyvatel a především zajistit kontrolu nad situací, aby se zabránilo dalším celosvětovým pandemiím. (Evropská komise, 2022) Otázkou však zůstává reálná doba přetrvávání protektivních protilátek vzniklých po očkování, které zajišťují jedinci ochrannou imunitu proti infekci SARS-CoV-2 (či alespoň proti závažnému průběhu COVID-19). (MZČR, 2021)

Po prodělané infekci SARS-CoV-2 nebo po očkování se v organismu vyvíjí specifická imunitní odpověď, jejímž cílem je potlačení primární infekce a nastavení dlouhodobé humorální ochrany proti SARS-CoV-2. Imunitní systém nejdříve brání vstupu infekce přirozenou (vrozenou) imunitou a následně aktivací adaptivní (specifické) imunity. Cílem adaptivní antiinfekční imunity je tvorba specifických protilátek detekovatelných v séru a sloužících pro potvrzení prodělané virové infekce či potvrzení ochranné (protektivní) imunity. (Krátká, 2021) V rámci získaných studií došlo 15. 2. 2022 na území České republiky ke zkrácení platnosti očkovacích certifikátů (po jedné dávce vakcíny Janssen od firmy Johnson & Johnson nebo druhé dávce ostatních vakcín) na 270 dní. V případě očkování posilovací dávkou není platnost certifikátu zatím omezena. (Covid Portál, 2022)

V rámci této studie byla zkoumána dynamika protilátkové odpovědi v průběhu šesti měsíců po naočkování druhé dávky vakcíny Comirnaty od společnosti Pfizer-BioNTech. Tato studie přináší nové poznatky o získaných ochranných protilátkách a přispívá k lepší epidemiologické charakterizaci infekce SARS-CoV-2. Výsledky této studie by rovněž mohly sloužit pro porovnání získaných protilátek po posilovací dávce, případnému přeočkování či konfirmacím s jinými studiemi.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je charakterizovat protilátkovou odpověď u zdravotnických osob, které byly očkovány dvěma dávkami vakcíny Comirnaty od společnosti Pfizer-BioNTech.

V teoretické části bude popsáno základní fungování imunitního systému se zaměřením na adaptivní imunitu a její složky uplatňující se při antiinfekční obraně. Další část se bude věnovat problematice ohledně SARS-CoV-2 a s ním spojenou vakcinací, zaměřenou na princip fungování mRNA vakcín.

Praktická část bakalářské práce bude zaměřena na zhodnocení výsledků získaných enzymovou imunoanalýzou pro kvantitativní stanovení anti-S1 IgM protilátek v lidském séru v průběhu šesti měsíců po ukončeném očkování druhou dávkou vakcíny Comirnaty. Druhá část bude orientována na zhodnocení výsledků kvantitativního stanovení protilátek anti-S1 IgG rovněž v průběhu šesti měsíců.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Imunitní systém

Imunitní systém zastává v organismu tři významné funkce. Primární funkcí je udržování integrity organismu neboli rozpoznávání cizorodých látek z vnějšího prostředí (exoantigeny), od látek z vlastního organismu (autoantigeny). (Husáková, 2015)

Druhou funkcí imunitního systému je zneškodnit a vyloučit rozpoznané patogenní mikroorganismy z organismu, přičemž se využívají procesy obranyschopnost a autotolerance. (Hamplová, 2019) Obranyschopnost se uplatňuje v případě rozpoznávání vnějších škodlivin, kterými jsou např. patogeny i jejich toxické metabolity. (Hořejší, 2017) Autotolerance je označení pro přirozenou imunologickou toleranci k vlastním antigenům, která vzniká v lymfatických orgánech při ontogenetickém vývoji jedince během zrání T a B lymfocytů. (Martinek, 2011)

Imunologická tolerance je důležitou vlastností imunitního systému, při které buňky imunitního systému aktivně rozpoznávají antigeny a tolerují je. (Hamplová, 2019) Imunologickou toleranci lze rozdělit na periferní a centrální. Centrální tolerance potlačuje neadekvátní imunitní odpověď vůči autoantigenům a periferní imunologická tolerance se naopak týká některých exoantigenů, kterými mohou být složky potravy či složky mikrobioty. (Chapel, 2018) Pokud dojde v organismu ke ztrátě imunologické tolerance, může nastat následná tvorba autoprotilátek nebo také vznik cytotoxických CD8+ T lymfocytů. (Hořejší, 2017)

K obraně proti značnému množství infekčních agens, dochází prostřednictvím komplexní řady obranných imunitních mechanismů, které jsou založeny na buněčných a humorálních složkách vrozené nebo získané imunity. (CHAPLIN, 2010)

Obranné mechanismy reagují na strukturní nebo funkční rysy cizorodých molekul a umožňují, aby hostitel mohl eliminovat patogena bez nadměrného poškození vlastních tkání. Složky vrozené i adaptivní imunity se vzájemně liší (*viz Tabulka 1*). (Chapel, 2018)

Reakce vrozeného imunitního systému představují první linii obrany organismu. Reakce adaptivní imunity se stávají prominentní až po několika dnech, kdy v reakci na antigenní stimulaci dochází k proliferaci vysoce specifických klonů lymfocytů schopných rozpoznávat dané infekční agens. (CHAPLIN, 2010)

Ačkoliv se vrozené a adaptivní imunitní reakce zásadně liší ve svých mechanismech účinku, synergie mezi nimi je nezbytná pro neporušenou a plně účinnou imunitní odpověď. (CHAPLIN, 2010)

Třetí funkcí organismu je imunitní dohled, zodpovídající za rozpoznávání vnitřních škodlivin (např. poškozené, změněné či nádorové buňky) a jejich následné odstranění imunitním systémem. (Hořejší, 2017)

Tabulka 1 Složky vrozené a adaptivní imunity (Chapel, 2018)

Složky	Vrozená imunita	Adaptivní imunita
Rozpoznání cizorodých molekul	Rozpoznání antigenních znaků MAMP (struktury charakteristické pro mikroorganismy), např.: opakování glykoproteinů v molekule	Rozpoznání antigenních podnětů širokého spektra specifických molekul i jejich fragmentů na všech typech struktur
Receptory rozpoznávající signály	Receptory PRR jsou kódovány v zárodečných liniích dendritických buněk, makrofágů, monocytů, neutrofilů a epitelálních buněk a rozpoznávají DAMP (molekuly uvolněné z poškozených buněk), a také MAMP	Somatickými mutacemi je způsoben vznik širokého spektra specifických receptorů s různou afinitou
Rychlost imunologické odpovědi	Okamžitá	Pomalejší => potřebný čas pro vznik specifických klonů buněk, pohyb buněk a interakce mezi buňkami
Imunologická paměť	Ne	Ano
Humorální složky	Komplement, interferony (1.typu)	Protilátky
Buněčné složky	Neutrofilů, makrofágů, dendritické buňky (DC), přírodní zabíječi (NK), monocytů, žírné buňky, bazofily, eozinofily, přirozené lymfoidní buňky	T lymfocyty regulační, pomocný T lymfocyt (Th1, Th2, Th17), B lymfocyty

Použité zkratky: PRR-receptor pro rozpoznání struktur (pattern recognition receptors); MAMP-struktury charakteristické pro mikroorganismy (microbe associated molecular patterns); DAMP- molekuly uvolněné z poškozených buněk (danger associated molecular patterns); Th-pomocný T lymfocyt (helper T-cell).

3.2 Vrozená a adaptivní imunita v antiinfekční obraně

Obranoschopnost (imunitu) lze rozdělit na vrozenou a adaptivní. (Drnková, 2019) Na vrozené imunitě se podílí řada dalších mechanismů, mezi které patří bariérová funkce kůže a sliznice, přispívající k obraně proti infekci. (Hamplová, 2019) Přírozená imunita se skládá z rozpustných faktorů, jako jsou proteiny komplementu, a z buněčné složky reprezentované především granulocyty (bazofily, eozinofily a neutrofilové), žírnými buňkami, makrofágy, dendritickými buňkami a NK (přírozenými zabíječi z angl. natural killers) (viz *Obrázek 1*). (Dranoff, 2004)

Pokud nastane prolomení některé z bariér, začínají se uplatňovat mechanismy vrozeného imunitního systému, mezi které řadíme fagocytózu, komplementový systém a proteiny akutní fáze. (Hořejší, 2017) V případě obrany proti virům se uplatňují NK buňky a interferony. (Dranoff, 2004) Vrozené obranné reakce většinou doprovází vznik akutní zánětlivé reakce. K aktivaci vrozených obranných mechanismů dochází během prvních hodin po setkání s antigenem. (Chapel, 2018) Rezistence vůči infekcím je založena především na interferonech, komplementu, přírodních protilátkách, NK buňkách a aktivovaných fagocytech, neboť jsou zodpovědné za více než 95 % obrany hostitele. (Zinkernagel, 2003) Pro vznik vrozené imunity není třeba předchozího kontaktu s daným infekčním agens, neboť všechny složky vrozené imunity jsou přítomny v organismu již před vlastním setkáním s antigenem. Pro aktivaci složek vrozené imunity není vyžadována prezentace antigenu a neuplatňuje se zde ani imunologická paměť. (Dranoff, 2004)

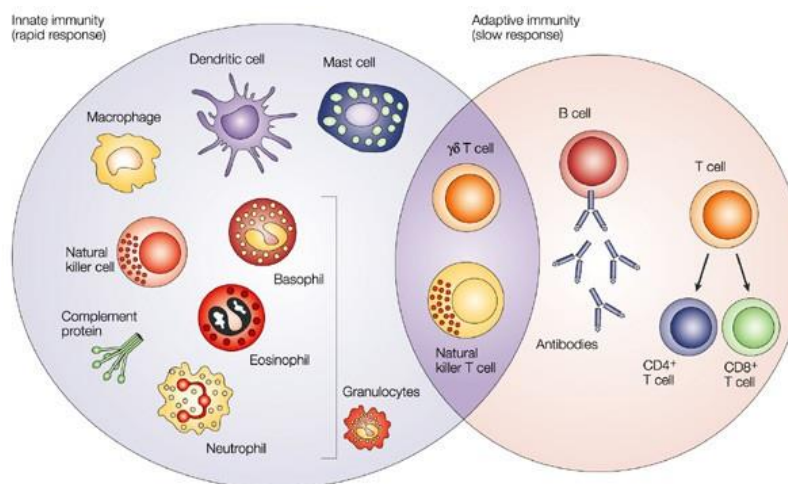
Naproti tomu mechanismy adaptivní imunity reagují po setkání s antigenem na všechny cizorodé látky prostřednictvím vysoce specifických molekul, kterými jsou protilátky (imunoglobuliny) a také antigenně specifické receptory T lymfocytů. (Hamplová, 2019) Aby došlo k iniciaci adaptivních mechanismů, je nezbytná aktivita složek vrozené imunitní odpovědi. Adaptivní imunitní odpověď se na rozdíl od vrozené imunitní odpovědi plně rozvíjí až za několik dní či týdnů po setkání s antigenem a projevuje se zvýšenou antigenní specificitou v porovnání se složkami přírozené imunity. (Dranoff, 2004)

Typickým rysem adaptivní imunity je imunologická paměť. (Dranoff, 2004) Imunologická paměť vzniká při prvním setkání s antigenem, kdy dochází v organismu k vytvoření otisku informace. (Drnková, 2019)

V případě opakovaného kontaktu se stejným antigenem se zahajuje sekundární (amnestická) odpověď, která je rychlejší a intenzivnější, než tomu bylo u primární odpovědi. (Hořejší, 2017) Za imunologickou paměť, při které se uplatňují T a B lymfocyty, jsou zodpovědné paměťové buňky, kterými jsou intermediární, diferencované B lymfocyty se schopností rychle se stát plazmatickými buňkami, produkující specifické protilátky (imunoglobuliny). (Vaillant, 2021)

Na rozhraní vrozené a adaptivní imunity se nachází invariantní NKT lymfocyty (iNKT), a $\gamma\delta$ T lymfocyty (také viz *Obrázek 1*), které mohou reagovat na glykolipidové antigeny bez nutnosti zpracování daného antigenu s jeho následnou prezentací na buňkách předkládajících antigeny. (Dranoff, 2004)

Ochranná role adaptivní imunitní odpovědi hostitele během infekce SARS-CoV-2, se stala kritickou otázkou při absenci specifické léčby, preventivní vakcíny nebo imunoterapie. Během infekce SARS-CoV-2 imunitní odpověď ve většině případů přispívala k hostitelské obraně, ale u některých pacientů došlo k její dysregulaci, a tím neadekvátní imunitní odpověď přispívala k patogenezi. Zejména u těžkých forem COVID-19 může být špatná regulace mezi vrozenou a adaptivní imunitní odpovědí fatální. (Combadière, 2020)



Obrázek 1 Vrozená a adaptivní imunitní reakce (Dranoff, 2004)

Vrozená imunita: makrofág, dendritická buňka, žírná buňka, NK buňky, komplementový protein, granulocyty (bazofil, eozinofil, neutrofil).

Na rozhraní vrozené a adaptivní imunity: iNKT lymfocyt, $\gamma\delta$ T lymfocyt.

Adaptivní imunita: B lymfocyt, protilátky, T lymfocyt, koreceptor pro hlavní histokompatibilní komplex II (MHC-II) na pomocných Th lymfocytech (CD4+) a koreceptor pro MHC-I na cytotoxických (Tc) lymfocytech (CD8+).

3.2.1 Složky adaptivní imunity

Mezi základní humorální složky adaptivní imunity patří protilátky tvořící buněčnou složku adaptivní imunity B lymfocyty a T lymfocyty. T lymfocyty rozlišujeme pomocí diferenciačních antigenů CD4 a CD8 na CD4+ (pomocné) a CD8+ (cytotoxické) T lymfocyty. (Dranoff, 2004)

T lymfocyty vznikají v kostní dřeni a následně vycestovávají jako nezralé T lymfocyty krevním řečištěm do thymu. V thymu se vlivem cytokinů, produkovaných podpůrnou tkání, přeměňují v buňky schopné reagovat s antigeny. Tyto zralé buňky prochází v thymu selekcí a opouštějí ho jako CD4+ nebo CD8+ T lymfocyty, které se uplatňují v buněčné složce adaptivní imunity. (Hořejší, 2017)

CD4+ je znakem pomocných T lymfocytů (Th) a nachází se na membráně blízko receptoru pro antigen, který napomáhá jeho rozeznání. Znakem Tc lymfocytů je CD8+, s funkcí obdobnou jako u CD4+ (Hořejší, 2017). Na rozdíl od B lymfocytů a protilátek rozeznávají T lymfocyty malé peptidy prezentované na povrchu buňky v komplexech MHC pomocí svého T buněčného receptoru (TCR, T cell receptor). (Zinkernagel, 2003)

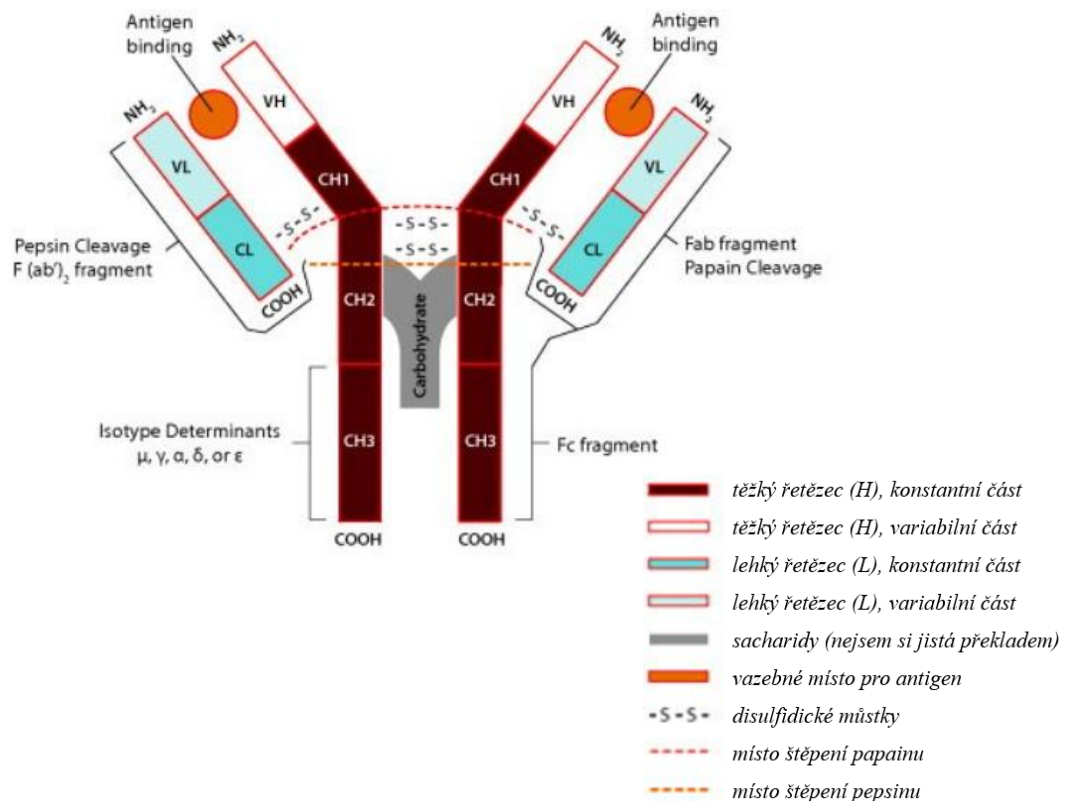
Cytotoxické CD8+ T lymfocyty jsou specifické pro fragmenty proteinů syntetizovaných samotnou buňkou a prezentovaných na MHC I. třídy. Prezentace antigenů na MHC I. třídy je typická také pro antigeny pocházející z virů či nádorových buněk. (Zinkernagel, 2003)

Druhou skupinu lymfocytů dozrávající přímo v kostní dřeni označujeme jako B lymfocyty. B lymfocyty se běžně vyskytují v kostní dřeni, slezině, krvi i lymfatických uzlinách. (Drnková, 2019) V okamžiku setkání B lymfocytu s antigenem dochází k reakci imunogenu s receptorem na buněčném povrchu B lymfocytu (BCR, z angl. B cell receptor). Výsledkem reakce je vznik signálů, řídicího aktivaci transkripčních faktorů, které vedou ke stimulaci syntézy vysoce specifických protilátek (imunoglobulinů). (Vaillant, 2021) Každý klon plazmocytů vznikl z jednoho mateřského B lymfocytu a tvoří protilátku se stejnou specifitou. (Hamplová, 2019)

Strukturně jsou imunoglobuliny čtyřřetězcové glykoproteiny se dvěma vazebnými místy. Imunoglobuliny jsou tvořeny dvěma identickými těžkými řetězci (H-heavy), k nimž je pomocí disulfidických (cystinových) můstků v pantové oblasti, kovalentně připojen vždy jeden lehký řetězec (L-light). Těžké řetězce jsou tvořeny 4-5 imunoglobulinovými doménami, jež jsou spojeny úseky polypeptidového řetězce. (Hořejší, 2017)

Lehké řetězce jsou tvořeny pouze dvěma imunoglobulinovými doménami, z nichž každá je tvořena přibližně 110 aminokyselinami. Počet domén ovlivňuje výslednou molekulovou hmotnost, která se u těžkých řetězců pohybuje v rozmezí 50-75 kilodaltonů (kDa) a u lehkých řetězců je rovna 25 kDa. Domény na N – konci obou typů řetězců se označují jako variabilní domény a společně tvoří vazebné místo pro antigen. (Hořejší, 2017)

Molekula imunoglobulinu má tvar písmene Y (viz Obrázek 2) a pro její rozštěpení na dva shodné fragmenty (Fab (fragment vážící antigen) a Fc (konstantní fragment)), lze využít enzym papain. Fc část imunoglobulinu slouží k vazbě na Fc receptory fagocytů nebo komplementového proteinu C1 a také zde dochází ke glykosylaci těžkých řetězců. (Hořejší, 2017)



Obrázek 2 Struktura imunoglobulinu (Antibody Basics)

Podle Fc části H řetězců se sérové imunoglobuliny rozdělují do pěti izotypů. Izotyp imunoglobulinu A (IgA), D (IgD), E (IgE), G (IgG), M (IgM). (Hořejší, 2017)

Lehké řetězce (L) kappa (κ) a lambda (λ) jsou si strukturně, funkčně i velikostně velice podobné a mohou se párovat s jakýmkoliv těžkým řetězcem (H) s cílem vytvoření kompletního imunoglobulinu. (Encyclopedia Britannica)

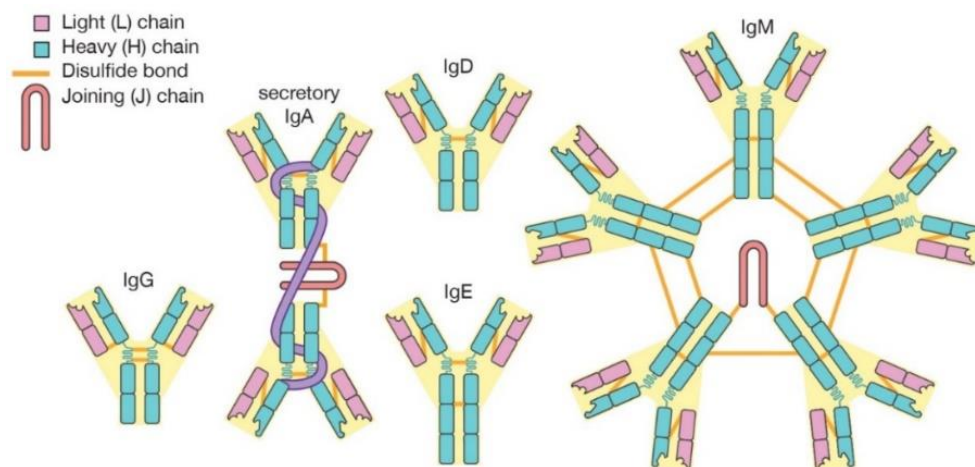
Tím, že se jednotlivé druhy L řetězců mohou spojit s jakoukoliv třídou H řetězců, se zvyšuje obrovská diverzita imunoglobulinů. (Encyclopedia Britannica)

Vzájemně se od sebe řetězce L a H liší v primární struktuře a počtu konstantních domén. Rovněž geny, které kódují lehké a těžké řetězce, jsou uloženy na odlišných chromozomech. (Hořejší, 2017)

Těžké řetězce jsou označovány řeckými písmeny α , γ , ϵ , δ , μ . U řetězců α a γ se ještě rozlišují subtypy α_{1-2} , a také γ_{1-4} . Těžký řetězec poté určuje třídu imunoglobulinů (viz Obrázek 3). Konstantní domény pro řetězce α a γ u H řetězců jsou C1-C3, pro ϵ , δ , μ jsou dokonce čtyři, tedy C1-C4. Cystinové můstky v pantové oblasti společně se strukturními detaily domén odlišují podtřídy imunoglobulinu izotypu G (IgG). (Hořejší, 2017)

Izotypy protilátek IgA a IgM jsou složeny z více jednotek, spojených J řetězcem. Sekretovaný IgM ve formě pentameru má deset vazebných míst pro antigen a molekulovou hmotnost okolo 900 kDa. (Hořejší, 2017)

V molekule slizničního imunoglobulinu A (sIgA) se nachází ještě sekreční komponenta, což je zbytek receptoru pro transport polymerních imunoglobulinů (polyIgR), která zajišťuje imunoglobulinu rezistenci vůči střevním proteázám. (Hořejší, 2017)



Obrázek 3 Přehled jednotlivých tříd imunoglobulinů (Encyclopedia Britannica)

3.3 Humorální imunita

Humorální imunita je založena na produkci a aktivitě protilátek, které brání náš imunitní systém třemi možnými způsoby:

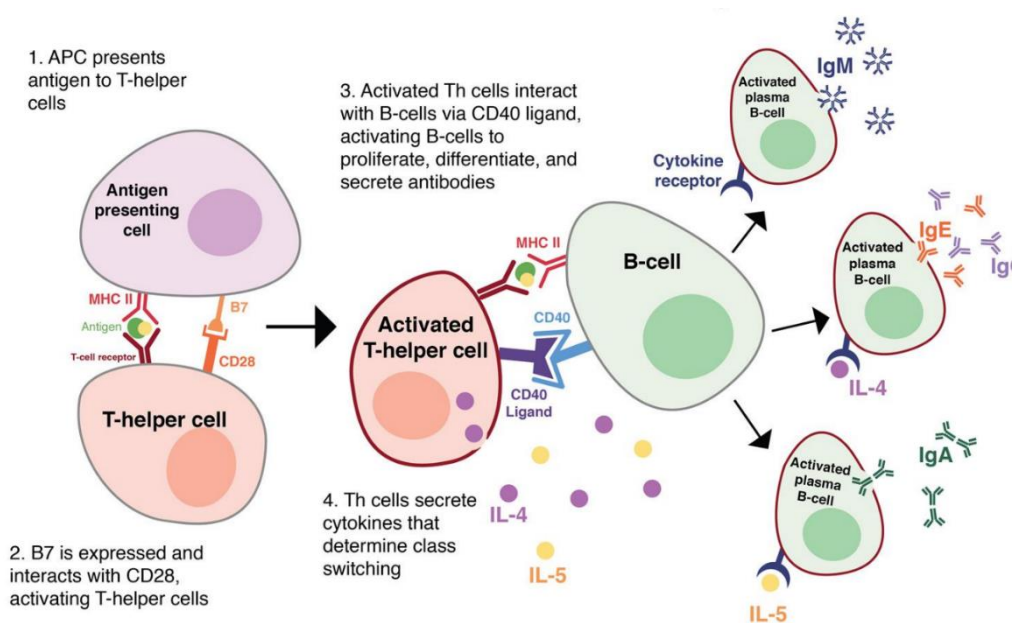
1. Oponizací, což je proces obalení antigenu komplementem či protilátkami, při kterém se antigen stává lépe rozpoznatelným a následně i pohltitelným fagocyty (buňkami vrozeného imunitního systému, účastnících se fagocytózy). (Chapel, 2018)
2. Neutralizací patogenů a virů způsobenou blokováním interakce proteinů patogena s receptory hostitele, a dále inaktivací faktorů virulence exprimovaných patogeny. (Husáková, 2015)
3. Aktivací komplementového systému klasickou cestou. (Hořejší, 2017)

Protilátková odpověď proti různým epitopům antigenu je za normálních podmínek polyklonální. Jedná se o směs velkého množství molekul imunoglobulinů, vzniklých z různých klonů plazmocytoů.

Protikladem jsou monoklonální protilátky, vzniklé z jednoho klonu plazmatických buněk (rozpoznávající stejný epitop), které v organismu převládají za patologických stavů (např. maligní nádor plazmocytoomu). (Hořejší, 2017) Monoklonální protilátky produkované hybridomy a nádorovými buňkami se připravují i pro léčebné účely. (Linkos: Monoklonální protilátky)

U pacientů s onemocněním COVID-19 se k léčbě využívá intravenózní lidský imunoglobulin (IVIG). (Ostrý, 2020) Další terapeutickou možností je podání rekonvalescentní plazmy, která obsahuje anti-SARS-CoV-2 protilátky získané od osob vyléčených z COVID-19. (SZÚ, 2020) V terapii pacientů pozitivních na SARS-CoV-2, kteří zatím nevyžadují doplňkovou léčbu kyslíkem, ale hrozí u nich přechod do těžké formy onemocnění COVID-19, se využívá monoklonálních protilátek kasirivimabu, imdevimabu, bamlanivimabu a etesevimabu viz kapitola 3.6. (SÚKL, 2021)

Na vzniku protilátkové odpovědi se kromě B lymfocytů podílí i antigen prezentující buňky (APC z angl. antigen-presenting cell) a T lymfocyty v případě tzv. T dependentních antigenů. APC aktivuje Th lymfocyty, které následně aktivují B lymfocyty (viz Obrázek 4). (Chapel, 2018)



Obrázek 4 Aktivace B lymfocytů (Don, 2018)

1. Antigen prezentující buňka vystaví pomocí MHC II. třídy antigen pro Th lymfocyt
2. B7 je vystaven a interaguje s kostimulační molekulou T lymfocytů (CD28), a tím dochází k aktivaci Th lymfocytu
3. Aktivované Th lymfocyty interagují s B lymfocyty prostřednictvím kostimulačního proteinu (CD 40) a aktivují B lymfocyt. Dochází k proliferaci, diferenciaci a sekreci protilátek
4. Th lymfocyty produkují cytokiny, podporující izotypový přesmyk. (Don, 2018)

Poté, co jsou B lymfocyty aktivovány, mohou podstoupit dva hlavní procesy:

- Jedním procesem je afinitní zrání pro zvýšení afinity protilátek k antigenu, které probíhá jako:
 1. Migrace B lymfocytů do sekundárních lymfoidních orgánů (kde dochází k další proliferaci a diferenciaci). (Don, 2018)
 2. Výběr buněk s receptory s nejvyšší afinitou v kolonii. (Husáková, 2015)
- Dalším procesem je izotypový přesmyk neboli proces ireversibilního přepínání konstantních oblastí přeskupením deoxyribonukleové kyseliny (DNA), při kterém nedochází ke změně antigenní specifity. (Don, 2018) Konstantní oblastí je pro IgD (δ), IgG3 (γ 3), IgG1 (γ 1), IgA1 (α), IgG2 (γ 2) a pro IgG4 (γ 4). (Valenzuela, 2016) Odstraněním určitých úseků μ (IgM) a δ (IgD) kódujících další izotypy protilátek, dochází k tvorbě IgG, IgE a IgA, což umožňuje přepnutí z produkce IgM či IgD na některou z dalších tříd imunoglobulinů. (Chapel, 2018) Primární odpověď je zajišťována především IgM a sekundární odpověď hlavně IgG. (Chapel, 2018)

Izotypový přesmyk je řízen specifickými cytokiny (interleukiny). Interleukin 4 (IL-4) podporuje izotypový přesmyk na IgE a podtřída IgG3 je podporována interferonem gama (IFN γ). (Don, 2018) Signalizace růstového faktoru TGF- β receptoru (TGFBR z angl. transforming growth factor beta receptor) je důležitá pro systémovou produkci IgA. (Borsutzky, 2004) Produkci IgA zvyšuje TGF- β a IL-10. (Sonoda, 1992)

3.3.1 Funkce imunoglobulinů

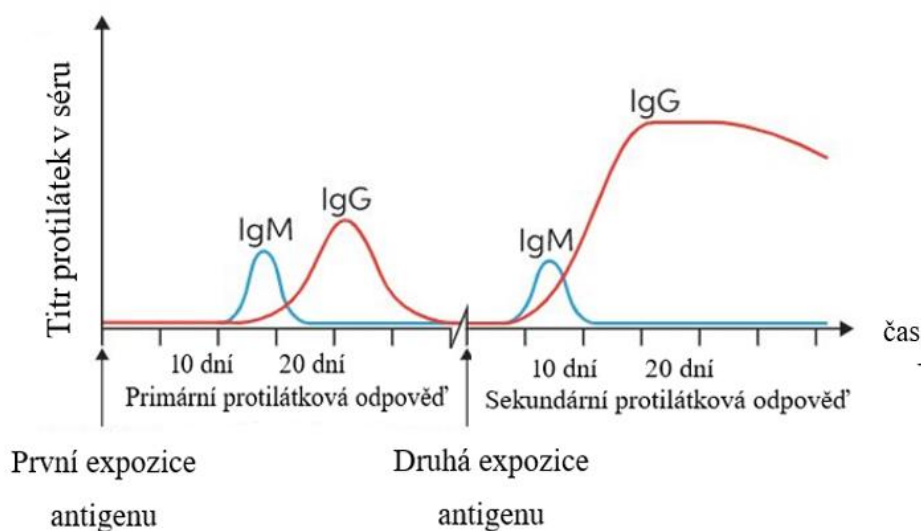
Každá třída imunoglobulinů má své vlastnosti a funkce určené strukturálními variacemi H řetězců (viz *Tabulka 2*). (Encyclopedia Britannica)

Tabulka 2 Koncentrace imunoglobulinů v séru zdravých dospělých (Hořejší, 2017)

Izotyp	Molekulová hmotnost (kDa)	Obsah v séru (g/l)	Lokalizace	Biologický poločas (dny)	Funkce
IgG	155	8-18	Sérum, intersticiální tekutina	21	Oponizace; neutralizace; přestupuje placentu; sekundární odpověď
IgA	160-1000	0,9-3,5	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mléko	6	Ochrana sliznic, oponizace
IgM	900	0,9-2,5	Sérum, povrch B buněk	6	Aktivace komplementu; primární odpověď; receptor pro antigen
IgD	180	0,1	Sérum, povrch B lymfocytů	3	Receptor pro antigen
IgE	190	0,0003	Sérum, intersticiální tekutina	2	Ochrana proti parazitům

Na povrchu B buněk se nachází monomerní IgM nebo imunoglobulin izotypu D (IgD) a vytváří BCR. (Hořejší, 2017) V momentě, kdy je již IgM navázán na antigen, se komplementový protein C1 váže na Fc část IgM, čímž dochází k aktivaci klasické komplementové dráhy. (Hořejší, 2017)

V krvi je nejvíce zastoupen sérový izotyp IgG, především IgG1. IgG se v krvi objevuje přibližně po 10–14 dnech od setkání s antigenem vyvolávajícím protilátkovou odpověď (viz Obrázek 5). (Hamplová, 2019) IgG jako jediný izotyp prostupuje v posledních týdnech těhotenství placentou a zajišťuje dočasnou imunitu novorozence. (Drnková, 2019)

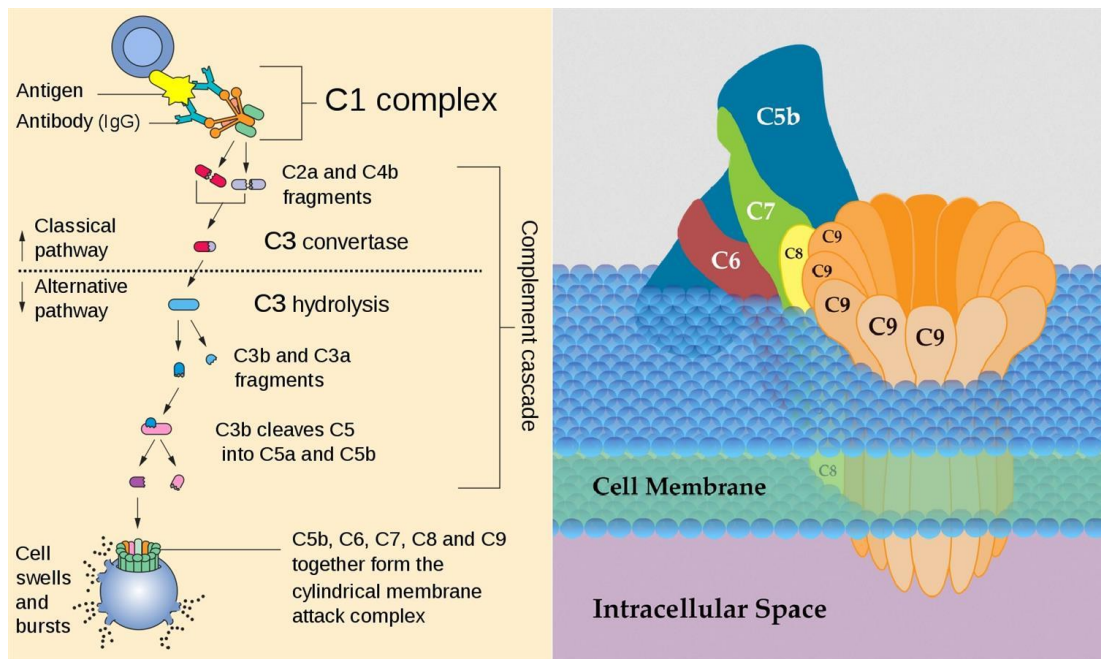


Obrázek 5 Fáze protilátkové reakce (Chegg, 2003-2021)

Při první expozici s antigenem reaguje organismus tvorbou malého množství protilátek a po delší době dochází k poklesu protilátkové hladiny. Při opětovném setkání i s malým množstvím antigenu, organismus reaguje okamžitým a prudkým vzestupem titru protilátek.

(Hamplová, 2019)

Podtřídy IgG1 a IgG3 jsou schopné vazby na komplementový protein C1, a tedy i aktivace komplementu (viz Obrázek 6). IgG2 je také schopný aktivace klasické cesty komplementové kaskády, přestože poněkud hůře. IgG4 schopnost aktivace komplementové kaskády zcela postrádá. Všechny podtřídy IgG se umí vázat na Fc receptory fagocytů. (Hořejší, 2017)

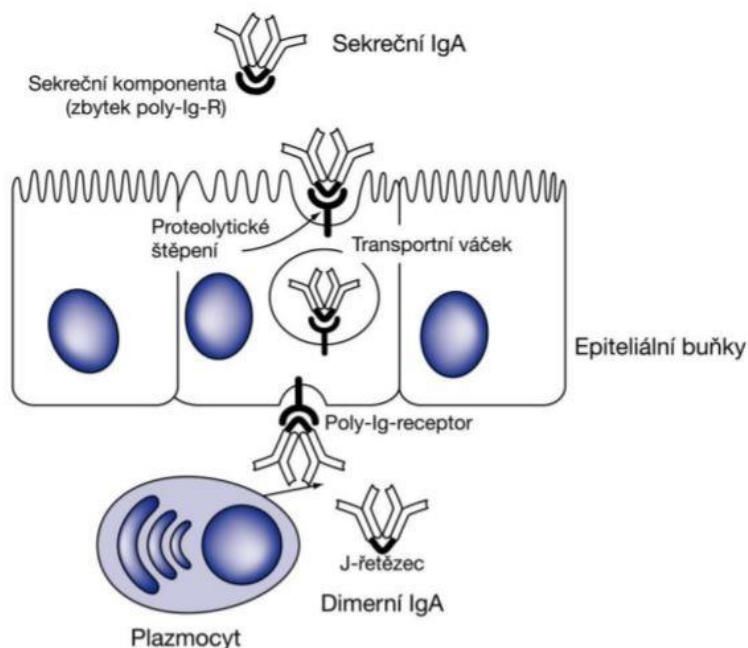


Obrázek 6 Aktivace komplementu klasickou cestou (protilátkami) (Don, 2021)

Aktivace se účastní protilátky IgG a IgM, které se váží na komplementový protein C1. Z fragmentů C2a a C4b vzniká C3 konvertáza, která se podílí na aktivaci komplementu klasickou cestou. Spontánní aktivaci alternativní cesty dochází ke kaskádovému štěpení proteinových fragmentů C3. Imunitní systém hostitele je schopen regulovat aktivaci komplementu tím, že dochází k inhibici nebo rozkladu složek komplementu účastnících se opsonizace a vlastní aktivace komplementu. (Don, 2021)

IgA v slizniční formě představuje nejpočetnější izotyp protilátky v našem těle, a tvoří součást obrany proti virovým a bakteriálním infekcím, na slizničních površích našeho těla. (Hamplová, 2019) Proces přenosu IgA na slizniční povrch se nazývá transcytóza (viz Obrázek 7). (Hořejší, 2017) Transcytózou též dochází k přenosu IgA do mateřského mléka, z něhož se následně dostává do trávicího traktu novorozence. V trávicím traktu poskytuje IgA novorozenci ochranu proti infekčním agens, neboť novorozenci neprodukují vlastní IgA v dostatečném množství. (Hořejší, 2017)

Sérová forma IgA má funkci opsoninu, který se váže na specifické receptory Fc fagocytů. (Chapel, 2018) IgA lze rozdělit ještě na dvě podtřídy, IgA1 a IgA2. Izotyp IgA1 pochází především ze slizničních plazmocytů a izotyp IgA2 z kostní dřeně. (Hořejší, 2017)



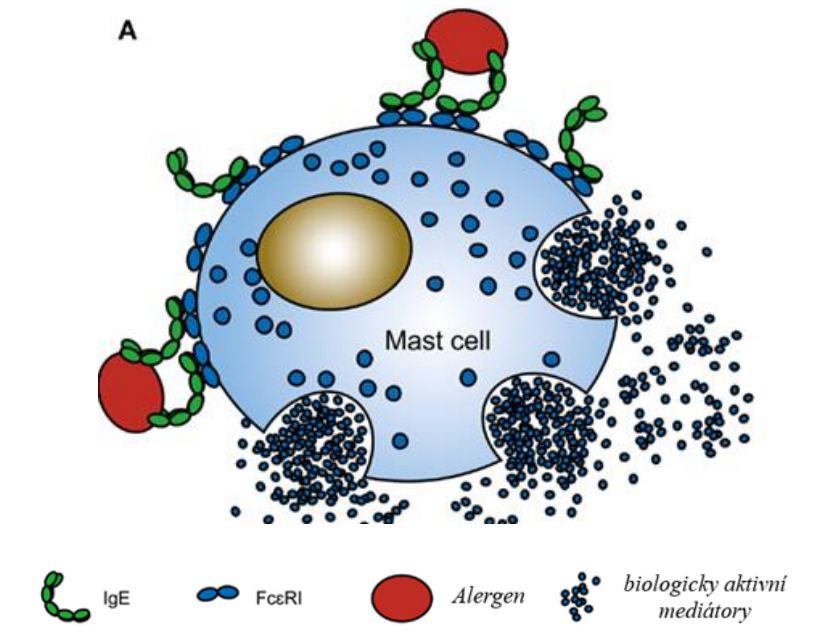
Obrázek 7 Transcytóza (Hořejší, 2017)

IgA (produkovaný B lymfocyty, plazmatickými buňkami) se váže na vnitřní stranu epiteliálních buněk na Fc receptor (konkrétně receptor pro transport polymerních imunoglobulinů – polyIgR) Vzniká komplex, který je endocytózou přenesen na druhou stranu buňky, kde se proteolyticky rozštěpí polyIgR. Část molekuly polyIgR, která zůstane ve spojení s IgA je označována jako sekreční komponenta. (Hořejší, 2017)

IgD se kromě jeho přítomnosti v BCR nachází na povrchu lymfocytů embrya a jeho přesná funkce zatím není zjištěna. (Drnková, 2019)

IgE chrání epiteliální povrchy dýchacího, trávicího a urogenitálního systému. (Hamplová, 2019) V lidském organismu zdravých lidí se IgE nachází v nízkých koncentracích a jeho zvýšená koncentrace bývá hlavní příčinou alergických reakcí u alergiků nebo lidí s hyper IgE syndromem. Největší uplatnění má IgE v obranných reakcích zaměřených proti mnohobuněčným parazitům vyskytujících se na sliznicích. (Drnková, 2019) Na povrchu žírných buněk a bazofilů se nachází vysoce-afinitní Fc receptory pro IgE (FcεRI z angl. high-affinity Fc receptor for IgE), na které se váže IgE. Tato vazba způsobuje degranulaci a uvolnění biologicky aktivních mediátorů z žírných buněk a bazofilů (viz Obrázek 8). (Hořejší, 2017)

V případě setkání s antigenem (parazitární antigen, alergen) se antigen váže na vazebná místa IgE, který je navázan na receptorech FcεRI. V případě aktivace žírných buněk alergenem se uvolňují cytokiny, eikosanoidy a obsah jejich sekrečních granul. (Amin, 2012)



Obrázek 8 Aktivace žírné buňky pomocí alergenu (Bax, 2012)

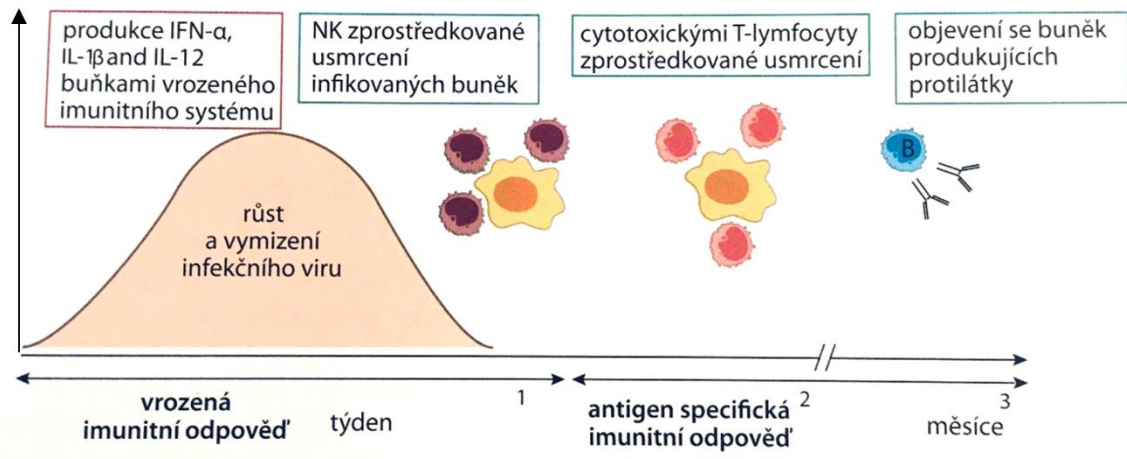
Alergeny vytváří na povrchu žírné buňky komplexy IgE – FcεRI, které aktivují žírnou buňku. Následně dochází k degranulaci žírných buněk a uvolnění biologicky aktivních mediátorů. (Bax, 2012)

3.4 Obrana organismu proti virům

Viry jsou striktně intracelulární parazité replikující se vždy uvnitř živé hostitelské buňky, kterou potřebují, protože nemají vlastní proteosyntetický aparát. (Melter, 2019) Virová částice označovaná jako virion se skládá z proteinů a genomu DNA či ribonukleové kyseliny (RNA). Genomy viru jsou kódovány funkcí viru (zejména klíčové enzymy a proteiny kapsidy). (Hamplová, 2019) Virové proteiny se vážou na povrchové receptory hostitelských buněk a následný průchod virionu či jeho genomu do hostitelské buňky je označován jako infekce. (Bunešová, 2017)

Interferony I. typu a NK buňky jsou řazeny mezi antigenně nespecifické mechanismy tvořící první linii obrany proti virům. V buňkách, které nebyly dosud infikovány, dochází k navození antivirového stavu bránícího rozvoji infekce vlivem α a β interferonů I. typu. (Hořejší, 2017) IL-12 produkovaný infikovanými makrofágy aktivuje NK buňky, které napadají potenciální zdroj další infekce (infikované buňky) a následně je ničí (viz Obrázek 9). (Chapel, 2018)

V obraně proti virové infekci dalších buněk se uplatňují protilátky IgA, IgG a IgM. Sekreční IgA zabraňuje adhezi respiračních virů na mukózní epitel. (Chapel, 2018) Neutralizační protilátky IgG, IgM aktivují klasickou cestu komplementu (způsobující rozpad některých druhů virů) v případě, že došlo k průniku virů do krevního oběhu. (Husáková, 2015) Mechanismus spolupráce pomocných Th2 lymfocytů a B buněk se uplatňuje při protilátkové odpovědi proti virům. Protilátky, které vznikají při virové infekci mohou zabránit sekundární infekci. (Hořejší, 2017) Tc lymfocyty stimulované po rozpoznání fragmentů asociovaných s MHC glykoproteiny I se významně podílí na eliminaci virové infekce a také produkují cytokiny, které necytotoxicky inhibují replikaci virů. (Chapel, 2018) Jedinci, kteří se vyznačují poruchami T lymfocytů či kombinovanými poruchami imunity, jsou ohroženější virovými infekcemi než ostatní osoby. (Hořejší, 2017)



Obrázek 9 Časová osa dynamiky přirozené a adaptivní imunitní odpovědi na virovou infekci (Chapel, 2018)

IL-1 β je prozánětlivým cytokinem a uplatňuje se jako důležitý mediátor zánětlivé reakce. IL-1 β se účastní řady buněčných aktivit, včetně buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Zvýšená hladina IL-1 β je ve vzorcích tekutiny z bronchiální alveolární laváže pozorována u pacientů s těžkým průběhem onemocnění COVID-19. Poškození plic vyvolané SARS-CoV-2 je do značné míry výsledkem zánětlivé reakce podporované cytokiny, jako je IL-1 β . (Chapel, 2018)

3.5 Koronaviry

Koronaviry jsou obalené, nesegmentované, jednovláknové RNA viry. Klinicky jsou považovány za druhou nejčastější příčinu běžných nachlazení po rhinovirech, a též jsou příčinou závažného respiračního syndromu SARS (severe acute respiratory syndrome) a MERS (middle east respiratory syndrome). (Melter, 2019) Koronaviry patří do řádu *Nidovirales* a v současné době je známo 7 typů způsobujících onemocnění u člověka. Primárně koronaviry napadají trávicí a dýchací trakt. (SZÚ, 2020)

Přestože koronaviry mají sdílený způsob přenosu prostřednictvím respiračních kapének, klinický obraz je odlišný, neboť se vyvíjí v závislosti na virovém sérotypu. (Melter, 2019) Příležitostně vyvolávají onemocnění dolních cest dýchacích a záněty plic.

Rizikovými skupinami jsou imunokompromitovaní jedinci, pacienti s kardiovaskulárním nebo jiným chronickým onemocněním, malé děti a osoby vyššího věku. Koronaviry v aktuální době vyvolávají závažná onemocnění, která dříve byla způsobována pouze vzácně např.: těžký akutní respirační syndrom. (SZÚ, 2020)

Koronaviry čeledi *Coronaviridae* se dělí do 4 rodů α ; β ; γ ; δ . Alfa koronaviry (konkrétně HCoV-229E) a beta koronaviry (konkrétně HCoV-OC43, HCoV-HKU1) se u dospělých jedinců vyskytují běžně, nebezpečné jsou pouze pro výše zmíněné rizikové osoby. (SZÚ, 2020) Gama a delta koronaviry infikují ptáky i savce a nebyl zatím zaznamenán případ infekce člověka. (SZÚ: COVID-19, 2021)

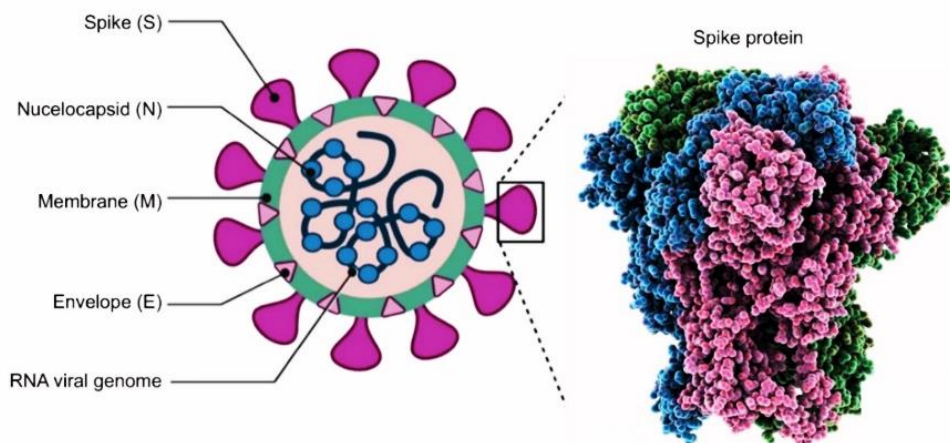
1. V letech 2002-2003 SARS-CoV (rod *Betacoronavirus*, podrod *Sarbecovirus*) způsobil závažné onemocnění akutním respiračním syndromem (smrtnost 10 %). Zdrojem nákazy byli netopýři, kteří infikovali další zvířata, od kterých došlo k přenosu na lidi. (SZÚ, 2020)
2. V roce 2012 MERS-CoV (rod *Betacoronavirus*, podrod *Merbecovirus*), objevený na Arabském poloostrově, vyvolával onemocnění MERS (smrtnost 35 %). Rezervoárem viru byli dromedáři a k většině nákaz došlo ve zdravotnických zařízeních. (SZÚ, 2020)
3. V prosinci roku 2019 ve Wu-chanu v provincii Hubei v Číně se objevil nový beta koronavirus SARS-CoV-2. (Wu, 2020) Koronavirus SARS-CoV-2 (delta varianta B.1.617.2) byl diagnostikován po pneumonii, která se u různých pacientů rozvinula bez specifické příčiny. (Cucinotta, 2020)

Onemocnění COVID-19 způsobuje v těžších formách mírné až těžké poškození plic a multiorgánové selhání, které vede k úmrtí především u výše zmíněných rizikových skupin. (Pomplun, 2021) Kvůli úspěšným vládním opatřením bylo v první vlně na jaře 2020 (do konce května) zaznamenáno pouze 9 301 případů (86,9 potvrzených případů na 100 000 osob během tří měsíců). Zrušení omezení přes léto však mělo za následek výrazné zhoršení epidemie na podzim 2020. Na vrcholu druhé vlny bylo každý den diagnostikováno přes 10 000 nových případů (přes 100 potvrzených případů na 100 000 osob denně) a Česká republika se zařadila mezi země s největší zátěží COVID-19 v Evropě i ve světě. K datu 31. května 2021 měla Česká republika kumulativně celkem 1 661 787 potvrzených případů (15 528 na 100 000 osob). (Piler, 2021) Rychlost přenosu viru z osoby na osobu, se zvýšila v polovině ledna 2020. Světová zdravotnická organizace (WHO z angl. world health organization) vyhlásila celosvětovou epidemii 11. března 2020. (WHO director, 2020) Příčinou SARS-CoV-2 byl zoonotický zdroj, který způsobil celosvětovou pandemii. Většina epidemiologických a sekvenčních údajů naznačuje, že k primárnímu přenosu došlo z netopýrů na člověka, avšak načasování a místo přenosu zůstává prozatím předmětem intenzivní diskuse. (Matyášek, 2020) Zdá se, že destrukce plic u osob s COVID-19 souvisí s cytokinovou bouří, která je spojena se zvýšenou hladinou IL-6. Velký význam má IL-6 v progresi onemocnění COVID-19 a blokáda signalizační kaskády IL-6 může u některých pacientů zmírnit cytokinovou bouří. (Smetana, 2020)

4. Začátkem listopadu 2021 došlo v Jižní Africe k identifikaci nové varianty B.1.1.529 označované omikron, která do značné míry nahradila variantu delta. WHO prohlásila 26. listopadu 2021 omikron za znepokojující variantu, protože ve studii testů neutralizace živých virů se ukázalo, že omikron uniká neutralizaci protilátek indukovaných mRNA vakuínou firmy Pfizer-BioNTech. (Collie, 2022) Přestože je varianta omikron nakažlivější než jiné varianty, vykazuje nižší riziko hospitalizace osob infikovaných omikronem. Na základě studií z Jižní Afriky, Velké Británie a některých zemí Evropské unie (EU z angl. European union) se riziko snížilo oproti delta variantě až na polovinu. (Brunclíková, 2021a) K datu 22. dubna 2022 měla Česká republika kumulativně celkem 3 892 504 potvrzených případů z toho aktuálně hospitalizovaných 1 005 osob. (MZČR, 2022)

3.5.1 SARS-CoV-2

Částice viru SARS-CoV-2 má kulovitou nebo oválnou strukturu a na její struktuře se podílejí čtyři proteiny (viz Obrázek 10). (Melter, 2019) Genom SARS-CoV-2 kóduje čtyři hlavní strukturální proteiny, včetně povrchového spikového glykoproteinu, který se nazývá S protein, malý obalový protein (E), matrix protein (M) a nukleokapsidový protein (N). (Yi, 2020) Protein N je přítomen v jádru. Jádro je obklopeno membránou, ve které jsou ukotveny glykoproteiny (S, E a M). Velikost virových částic se v průměru pohybuje v rozmezí 60-140 nm a tzv. hroty proteinu S (spikový protein) na povrchu se pohybují v rozmezí 8-12 nm. (Mahalingam, 2021) Pandemie způsobená šířením SARS-CoV-2 vedla ke značnému zájmu o jeho evoluční původ a strukturu genomu. (Matyášek, 2020) Genom SARS-CoV-2 je podobný genomu jiných koronavirů. (Mahalingam, 2021)

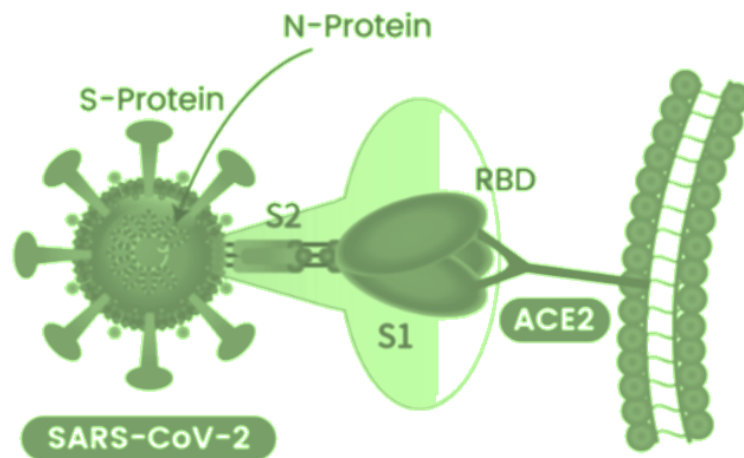


Obrázek 10 Schématické znázornění viru SARS-CoV-2 (Amawi, 2020)

Genom SARS-CoV-2 kóduje spikový protein (S), obalový protein (E), membránový protein (M) a nukleokapsidový protein (N). (Stratech, 2021) Vpravo znázorněn glykosylovaný spikový protein (S), zprostředkávající membránovou fúzi vazbou na buněčné receptory. (Amawi, 2020)

Z hlediska neutralizace protilátek a také z hlediska vakcinace je nejvýznamnější spikový protein (S). (Barnes, 2020) Spikový protein má receptor vázající doménu (RBD z angl. receptor-binding domain), která se váže na ACE2, což je považováno za důležité v případě interakcí mezi hostitelem a virem. (Matyášek, 2020)

Spikový protein obsahuje dvě podjednotky S1 a S2. Podjednotka S1 obsahuje RBD zprostředkovávající navázání koronaviru na buňky lidského těla. (Stratech, 2021) Podjednotka S2 obsahuje další základní prvky potřebné pro membránovou fúzi. (Barnes, 2020)



Obrázek 11 Znárodnění vazby spikového proteinu na receptor ACE2 (Stratech, 2021)

Nukleokapsidový protein (N) je vysoce imunogenní fosfoprotein, který je často používán jako marker v diagnostických testech.

RBD = receptorová vazebná doména (receptor-binding domain);

ACE2 = Angiotenzin konvertující enzym 2 (angiotensin-converting enzyme 2).

3.6 Monoklonální protilátky používané v terapii COVID-19

Monoklonální protilátky jsou proteiny, které napodobují schopnost imunitního systému v obraně proti virům. Cílem terapie využívající monoklonální protilátky je zabránit adhezenci viru SARS-CoV-2 na receptory (ACE2) našich buněk. Terapie monoklonálními protilátkami spočívá v aplikaci monoklonálních protilátek subkutánně nebo častěji intravenózně. (Logan Regional Medical Center, 2021) Aplikace monoklonálních protilátek nenahrazuje očkování (vakcinaci) sloužící pro prevenci rozvoje COVID-19, ale je určena pro léčbu počínající nemoci. (Fakultní Thomayerova nemocnice (FTN), 2022)

Základní kritéria, která musí být splněna před zahájením terapie:

- Laboratorně potvrzený pozitivní výsledek testu na SARS-CoV-2 (antigenní či PCR);
- Pacient nevyžaduje hospitalizaci, má mírný či středně závažný průběh COVID-19;
- Maximálně do 10 dnů od nástupu příznaků COVID-19;
- Splnění rizikového profilu pro přínos terapie (kritéria určena Ministerstvem zdravotnictví);
- Příznivá dlouhodobá prognóza pacienta
- Příkaz od poskytovatele zdravotní péče pro podstoupení terapie. (Logan Regional Medical Center, 2021)

Terapie monoklonálními protilátkami se neprovádí u pacientů, kteří jsou hospitalizováni kvůli COVID-19, vyžadují kyslíkovou terapii nebo u nich byla zjištěna přecitlivělost na monoklonální protilátky. Před podáním jsou vyžadovány ještě některé podmínky, lišící se pro jednotlivý druh monoklonálních protilátek, se kterými je pacient obeznámen v konkrétní nemocnici, kde by měla být terapie prováděna. (Logan Regional Medical Center, 2021)

V České republice se objevují různé druhy monoklonálních protilátek a přípravky vytvořené z jejich kombinací:

- Fakultní Thomayerova nemocnice (FTN) využívá protilátky bamlanivimab, casirivimab, etesevimab, imdevimab. (Fakultní Thomayerova nemocnice (FTN), 2022) V terapii se nejčastěji uplatňuje kombinace bamlanivimab a etesevimab nebo casirivimab a imdevimab, protože takto mají větší účinek než při samostatném použití. (Falcone, 2021)
- Klinika infekčních nemocí Fakultní nemocnice Bulovka (FNB) nabízí podání monoklonálních protilátek REGN-CoV-2 a bamlanivimab. Terapie neutralizačními monoklonálními protilátkami proti viru SARS-CoV-2 je ve FNB umožněna od 21. 4. 2021. (FNB, 2021) U neregistrovaného humánního léčiva REGN-CoV-2 obsahujícího monoklonální protilátky casirivimab a imdevimab byla Ministerstvem zdravotnictví České republiky (MZ ČR) v rozhodnutí ze 3. 12. 2021 dočasně povolena distribuce, výdej a používání tohoto přípravku. (FN KH, 2022) Terapii přípravkem REGN-CoV-2 nabízí Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) a od dubna 2021 i Fakultní nemocnice Brno (Fakultní nemocnice Brno, 2021). Tyto přípravky REGN-CoV-2 nelze použít u pacientů s variantou viru SARS-CoV-2 omikron, která ve světě způsobila zatím nejvyšší počty potvrzených infekcí. (FNKV, 2010-2022) V případě omikronu je terapie monoklonálními protilátkami nahrazena terapií antivirotek s názvem Lagevrio a účinnou látkou molnupiravir. Předpisu neregistrovaného přípravku Lagevrio taktéž předchází splnění platných indikačních kritérií. (Fakultní nemocnice Brno, 2021) Distribuce a používání přípravku Lagevrio se řídí rozhodnutím MZČR ze dne 7. 12. 2021. (MZČR, 2021)

3.7 Aktivní imunizace (vakcinace)

Prevence šíření infekčních onemocnění spočívá v eliminaci zdroje infekce, přerušení řetězce přenosu nebo zajištění imunity pomocí pasivní či aktivní imunizace. Aktivní imunizace může být získána dvěma způsoby.

1. Jednak vznikem imunitní paměti po prodělání přirozené infekce, kdy se vlivem setkání organismu s antigenní stimulací spouští imunitní reakce, která přirozeně zajistí jedinci získání imunity po prodělaném onemocnění.
2. Další možností aktivní imunizace je podání očkovací látky (vakcíny) s antigenem, pocházejícím přímo z infekčního agens či antigenem podobným infekčnímu agens. (Chapel, 2018)

S vakcinací jsou vždy spojena rizika vedlejších účinků či riziko rozvoje anafylaktického šoku. Aby bylo dosaženo optimálního imunogenního účinku, bývají používány látky napomáhající pohlcení antigenu APC, které jsou označovány adjuvancia. (Hořejší, 2017) Při použití očkovacích látek je nutné dbát na způsob jejich přípravy, také zda obsahují vhodný antigen, a ještě na vhodný způsob podání a případné kontraindikace k očkování. (Hamplová, 2019)

3.7.1 Přehled vakcín proti onemocnění COVID-19

V České republice se používají různé druhy očkovacích vakcín proti onemocnění COVID-19, kterými se podle EU plně naočkovalo téměř 80 % dospělé populace. (Evropská komise, 2022) Z hlediska schvalování vakcín proti onemocnění COVID-19 byla rychlost vývoje i schvalování mnohem vyšší z důvodu naléhavé epidemiologické potřeby. V březnu 2021 v České republice probíhala masivní očkovací kampaň, jejímž cílem bylo proočkovat celou dospělou populaci proti SARS-CoV-2 do konce září 2021. (SÚKL, 2021) Vakcíny se nejdříve testují v laboratoři (preklinické testování), poté následuje klinické hodnocení u lidí dobrovolně zapojených do výzkumu. Před schválením se vakcíny hodnotí v EU podle přísných norem a je nutné dodržet požadavky kladené na jakost, bezpečnost a účinnost. (SÚKL, 2021) Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA- European medicines agency) vytvořila expertní pracovní skupinu ETF (emergency task force) s cílem urychlit posuzování žádostí předkládaných farmaceutickými společnostmi. (SÚKL, 2021)

Inaktivované (usmrcené) vakcíny

Inaktivované vakcíny využívají usmrcenou formu viru SARS-CoV-2. Původce choroby je možné inaktivovat použitím vysoké teploty nebo chemicky či ozařováním. Mechanismus inaktivované vakcíny využívají společnosti Sinopharm, Sinovac. Rizikem při použití inaktivované vakcíny může být silná stimulace imunitního systému a vzniklá silná reakce může poškodit příslušný orgán. Potíže mohou nastat při vytvoření protilátek, které po navázání na virus ho nezneškodní, ale pouze označí. (Šindelková, 2020)

Virové vektorové vakcíny (lidské adenovirové vektory)

Virové vektorové vakcíny využívají vektor, kterým je oslabený nepatogenní virus nejčastěji adenovirus. Průnikem genetické informace přes vektor do buněk se produkují proteiny koronaviru. V reakci na vzniklé proteiny koronaviru vzniká bezpečná imunitní odpověď. Výhodou vektorových vakcín je celkem snadná i finančně méně náročná výroba. Nevýhodou lidských adenovirů je naopak široká cirkulace, která může vyvolat chřipku či běžné nachlazení. Mechanismus virových vektorových vakcín využívají společnosti Astra Zeneca (Vaxzevria), Johnson & Johnson (Janssen Pharmaceutica), Generium Pharmaceutical (Sputnik V). (Šindelková, 2020)

Vakcíny na bázi proteinů (proteinové vakcíny)

K bezpečnému vytvoření imunitní odpovědi se využívají neškodné fragmenty proteinů či proteinových obalů, které napodobují virus SARS-CoV-2. Proteinové částice pronikají do organismu a následně stimulují imunitní odpověď. Výhodou vakcín je bezpečnost, avšak často pro stimulaci dostatečné tvorby protilátek vyžadují další látky, tzv. adjuvans. K přípravě těchto vakcín na bázi proteinů se využívají metody rekombinantního genetického inženýrství. Mechanismus vakcín na bázi proteinů využívá společností Novavax (Nuvaxovid). (Šindelková, 2020) Vakcína Nuvaxovid byla registrována Evropskou komisí v prosinci 2021 a jako první proteinová podjednotková vakcína proti COVID-19, byla doporučena k registraci společností EMA. (Brunclíková, 2021b)

RNA vakcíny

V České republice jsou nyní dostupné dvě mRNA vakcíny od společností Moderna a Pfizer-BioNTech (viz *Tabulka 3*). Vakcína Comirnaty od společnosti Pfizer-BioNTech byla schválena 23. 8. 2021 po splnění požadavků na bezpečnost, účinnost, a výrobu Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA z angl. food and drug administration). (Patel, 2022) Nevýhodou mRNA vakcín je, že jsou termolabilní a je nutné uchovávat je při nízkých teplotách v rozmezí -60°C až -90°C maximálně po dobu 6 měsíců. (Vakciny.net, 2021) Za výhodu mRNA vakcín se považuje především jejich velmi snadné přizpůsobení novým mutacím viru, kdy se pouze upraví sekvence RNA, která se použije pro přípravu nové vakcíny. (Kříž, 2022)

Tabulka 3 Složení mRNA vakcín proti COVID-19 (Vakciny.net, 2021)

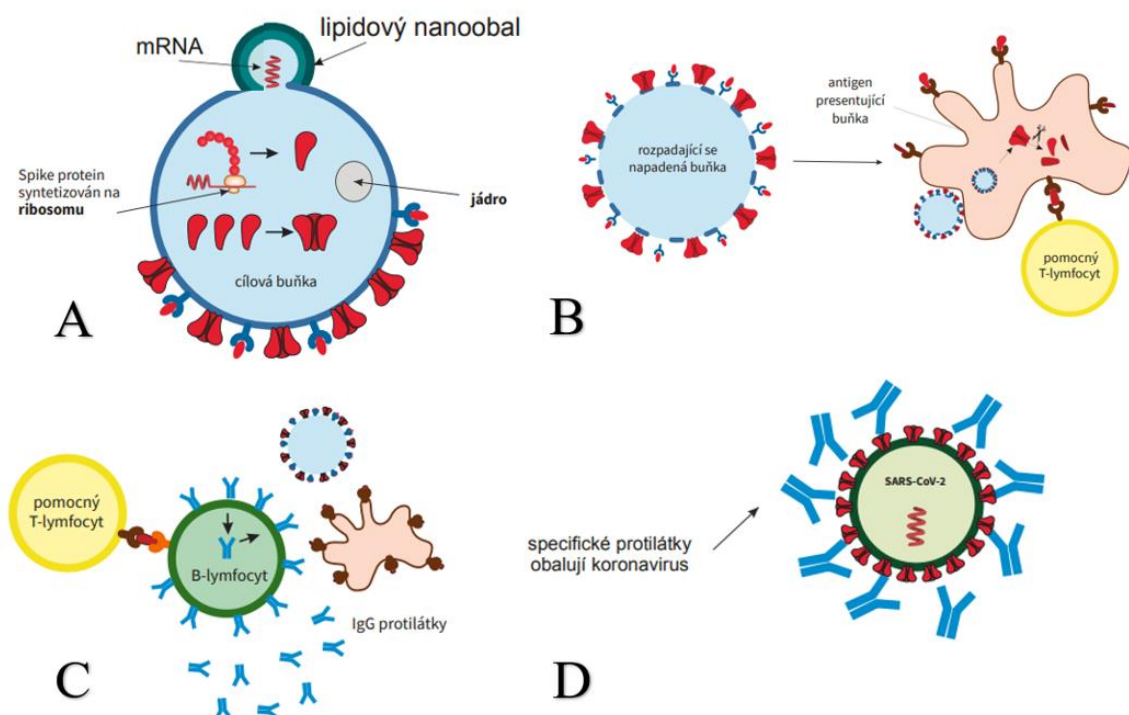
Označení	Comirnaty (BNT162b2)	Spikevax (mRNA-1273)
Výrobce	Pfizer-BioNTech	Moderna
Velikost dávky	30 $\mu\text{g}/0,3$ ml	100 $\mu\text{g}/0,5$ ml
Lipidy	Funkční a strukturální lipidy	Funkční a strukturální lipidy
Kryoprotektant	Sacharóza	Sacharóza
mRNA	Nukleosid-modifikovaná mRNA kódující spikový glykoprotein SARS-CoV-2	Nukleosid-modifikovaná mRNA kódující spikový glykoprotein SARS-CoV-2

RNA vakcíny využívají mRNA jako předlohu neboli templát k syntéze povrchového spikového proteinu, který je buňkou vystaven na povrch (stejně jako při reálné infekci SARS-CoV-2). (Mishra, 2020) Aby nebyla molekula mRNA rychle degradována, neboť je v lidském organismu samostatně nestabilní, využívají se k její ochraně lipidy. Lipidy společně s mRNA vytváří lipidové nanočástice, které splynou s cytoplazmatickou membránou buňky a uvolní mRNA do cytoplasmy, kde se na ribozomu syntetizuje spikový protein (viz *Obrázek 12A*). Nově vzniklý spikový protein je následně vystaven na povrchu buňky, která ho syntetizovala. Zároveň v buňkách dochází ke štěpení spikových proteinů na fragmenty rozpoznávané imunitním systémem. (Kříž, 2022)

K rozpoznání patogenního agens dochází po nekróze buňky (infikované virem SARS-CoV-2). Nekrotické zbytky obsahující mnoho spikových proteinů a proteinových fragmentů jsou fagocytovány buňkami APC. Buňky APC vystaví na povrchu fragmenty spikových proteinů prostřednictvím povrchových MHC glykoproteinů II. třídy, a tím zprostředkují rozpoznání fragmentů CD4+ Th lymfocyty (viz Obrázek 12B). (Kříž, 2022)

Aby došlo ke tvorbě protilátek musí být vystavené fragmenty spikových proteinů na povrchu APC rozpoznány B lymfocyty, které se po aktivaci Th lymfocyty, začnou množit a produkovat protilátky (IgG), které cílí na spikové proteiny (viz Obrázek 12C). (Kříž, 2022)

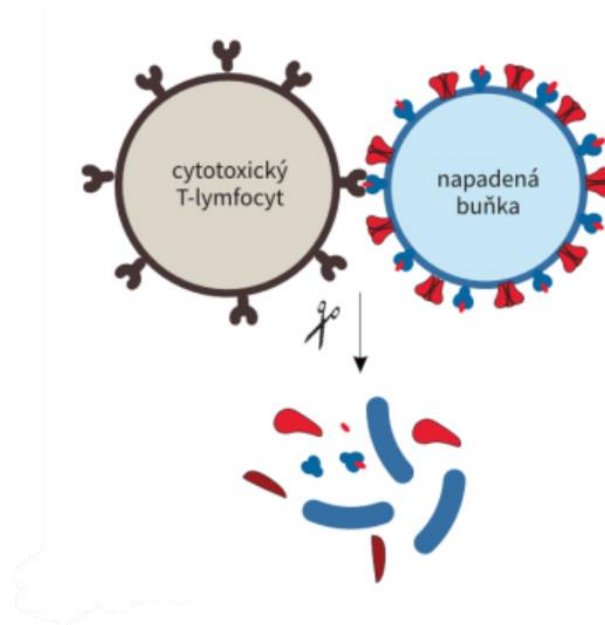
Vytvořené specifické protilátky se naváží na rozpoznáný povrchový spikový protein virové částice a označí ho pro degradaci, s cílem zabránit viru ve vazbě na ACE2 receptor (viz Obrázek 12D). (Kříž, 2022) Přestože cirkulující protilátky odvozené z plazmatických buněk v průběhu času ubývají, dlouhodobá imunitní paměť může přetrvávat v expandovaných klonech paměťových B lymfocytů, dále v CD8+ Tc lymfocytech a v CD4+ Th lymfocytech pomáhající B lymfocytům. (Wang, 2021)



Obrázek 12 Princip mRNA vakcíny Pfizer-BioNTech a Moderna (Kříž, 2022)

A) Interakce mezi vakcínou a buňkou; B) Rozpoznání patogenního agens;
C) Tvorba imunoglobulinů (protilátek); D) Obrana proti viru SARS-CoV-2.

Zneškodnění napadených buněk (infikovaných virem SARS-CoV-2) je možné prostřednictvím APC buněk. Buňky APC vystaví na povrchu fragmenty prostřednictvím povrchových MHC glykoproteinů I. třídy, které rozpoznají CD8+ Tc lymfocyty. Aktivované Tc lymfocyty následně vyhledají a zneškodnění všechny infikované buňky s prezentovanými fragmenty spikových proteinů na jejich povřších (viz *Obrázek 13*). (Kříž, 2022)



Obrázek 13 Zneškodnění buněk infikovaných virem SARS-CoV-2 (Kříž, 2022)

4 METODIKA

Detekce a kvantifikace protilátek IgM a IgG specifických proti spikovému proteinu u jedinců očkovaných mRNA vakcínou proti SARS-CoV-2 se prováděla sendvičovou metodou ELISA. Odběr vzorků periferní krve zajistila Všeobecná fakultní nemocnice v Praze (VFN) za dodržení podmínek pro venepunkci. Krev byla odebrána od dobrovolníků účastnících se této studie po podepsání písemného informovaného souhlasu. Samotné stanovení protilátkové odpovědi probíhalo v Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty (LF) Univerzity Karlovy (UK) a VFN v Praze.

4.1 Časový rozvrh sběru dat

Vzorky se pacientům odebíraly čtyřikrát v průběhu 6 měsíců (červenec/srpen 2020 až leden 2021) v časovém odstupu:

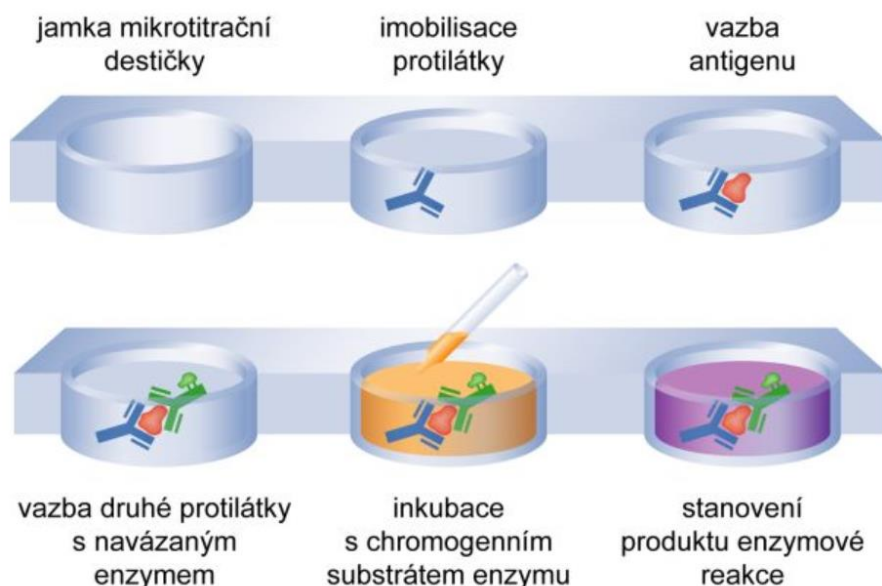
- Jeden a půl měsíce od očkování druhou dávkou vakcíny Pfizer-BioNTech.
- Tři měsíce od očkování druhou dávkou vakcíny Pfizer-BioNTech.
- Čtyři a půl měsíce od očkování druhou dávkou vakcíny Pfizer-BioNTech.
- Šest měsíců od očkování druhou dávkou vakcíny Pfizer-BioNTech.

4.2 Metoda ELISA

Název metody ELISA vychází z anglického označení enzyme-linked immunosorbent assay a jedná se o rychlou a jednoduchou laboratorní techniku. Využívána je zejména ve zdravotnických laboratořích či v laboratorním výzkumu. Metoda ELISA se označuje jako zlatý standard v průkazu imunologických reakcí a uplatňuje se v diagnostice biomarkerů nejrůznějších onemocnění, detekci infekčních onemocnění či kontrole kvality v různých odvětvích průmyslu. Rozlišují se čtyři druhy uspořádání metody ELISA (přímá, nepřímá, sendvičová, kompetitivní). (Singh, 2015)

4.2.1 Sendvičová ELISA

Sendvičová ELISA patří mezi třetí nejpoužívanější možnost uspořádání metody ELISA a její schéma je znázorněno viz *Obrázek 14*. Metodu charakterizuje použití dvou protilátek, které jsou specifické na různé epitopy jednoho antigenu. Na povrch jamky mikrotitrační destičky je navázána primární protilátka, jejíž funkcí je vychytávání antigenu ze vzorku. Sekundární protilátka je označená enzymem a slouží pro detekci navázaného antigenu na primární protilátku. (Bauerová, 2008)



Obrázek 14 Schéma sendvičového uspořádání metody ELISA (ELISA, 2020)

4.3 Používané soupravy Matriks Biotek®

K měření byly využity soupravy (viz *Tabulka 4*) od biotechnologické společnosti Matriks Biotek. Soupravy byly skladovány při teplotě 2-8 °C a chráněny před teplem a přímým slunečním světlem z důvodu stability mikrotitračních destiček dle instrukcí výrobce Matriks Biotek.

Tabulka 4 Soupravy CORONAHUNTER™ ELISA (Matriks Biotek, 2020)

Referenční kód	Název výrobku	Popis
COR-QNS-IGG-S1	Q-CORS 1 IgG	Enzymová imunoanalýza pro kvantitativní stanovení anti-Spike 1 IgG protilátek v séru a plazmě
COR-QNS-IGM-S1	Q-CORS 1 IgM	Enzymová imunoanalýza pro kvantitativní stanovení anti-Spike 1 IgM protilátek v séru a plazmě

4.4 Používané přístroje

- ELISA spektrofotometr SUNRISE (výrobce Tecan)

4.5 Pracovní pomůcky pro kalibrované měření

- Kalibrované pipety, vícekanálová mikropipeta, sterilní špičky
- Mikrozkuhavky (typ Eppendorf) pro ředění vzorků
- Adhezivní fólie (pro zakrytí mikrotitrační desky během inkubace)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky (s navázaným spikovým proteinem)
- Papírové utěrky
- Časovač

4.6 Používané chemikálie

Reagencie dodané výrobcem Matriks Biotek:

- Referenční vzorky nízké a vysoké hladiny specifických protilátek (low and high levels)
- Ředící pufr (assay buffer)
- Konjugát (křenová peroxidáza, HRP z angl. horseradish peroxidase)
- Substrát (roztok substrátu TMB = tetramethylbenzidin)
- Zastavovací roztok (stop buffer)
- Promývací roztok (wash buffer)
- Destilovaná voda
- Standardy A-F o různých koncentracích viz *Tabulka 5*

Tabulka 5 Koncentrace standardů pro stanovení protilátek IgG a IgM (Matriks Biotek, 2020)

Standardy	Pro IgG (ng/ml)	Pro IgM (ng/ml)
Standard A (standard s nejvyšší koncentrací)	200	100
Standard B	100	50
Standard C	50	25
Standard D	25	12,5
Standard E	12,5	6,25
Standard F (standard s nejnižší koncentrací)	0	0

4.6.1 Příprava promývacího pufru (wash buffer)

Promývací roztok se musí připravit před zahájením analýzy. Dodaný promývací roztok (wash buffer) se ředí dvacetkrát destilovanou vodou.

4.6.2 Ředění vzorků

Ředění vzorků séra pro třídu IgG

Ředění vzorků se provádí v ředicím poměru 1/100. K 5 μ l vzorku séra se přidá 495 μ l ředícího pufru (assay buffer).

Ředění vzorků séra pro třídu IgM

Ředění se provádí v ředicím poměru 1/200. Nejdříve se k 10 μ l vzorku séra přidá 90 μ l ředícího pufru (assay buffer), následně se k 10 μ l zředěného vzorku přidá 190 μ l ředícího pufru (assay buffer).

4.7 Princip měření

Standardy a vzorky séra jsou inkubovány v mikrotitrační destičce, jejíž dno je potažené Spike 1 proteinem. Po inkubaci se jamky promyjí a následně se přidá konjugát, kterým je sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou, vázající se na komplex antigen-primární protilátka. Po další inkubaci se jamky opět promyjí a vázaná enzymatická aktivita je detekována přidáním TMB, což je chromogenní substrát. Reakce je ukončena kyselým zastavovacím roztokem (stop buffer). Vzniklé zabarvení je úměrné množství anti Spike 1 protilátky ve vzorku nebo standardu. Výsledky vzorku se určují přímo pomocí standardní křivky.

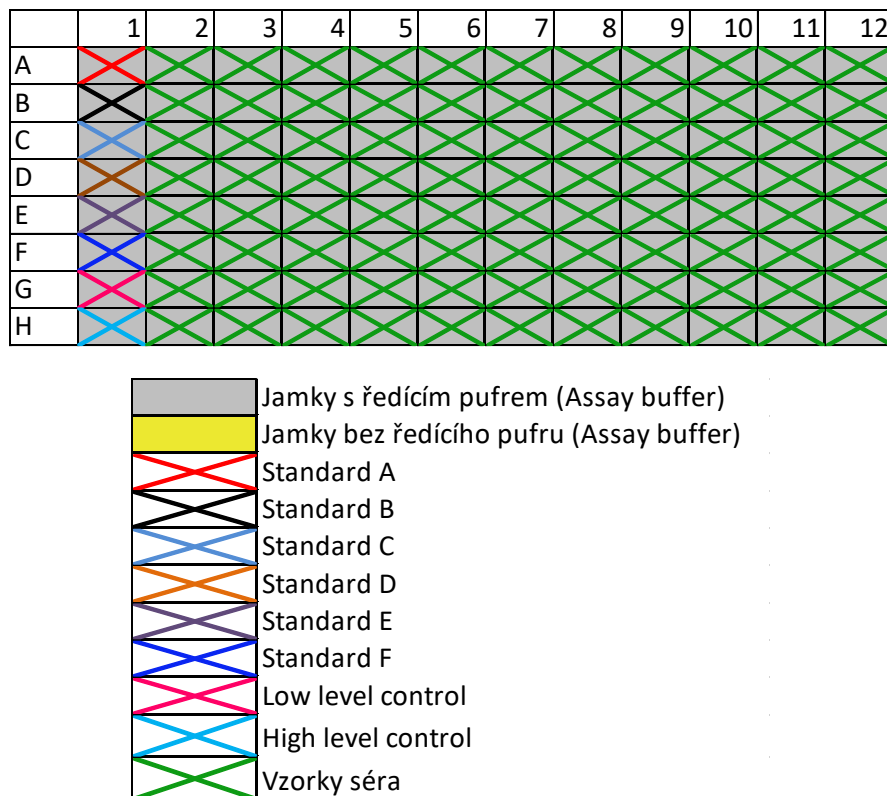
4.8 Postup měření

Protilátky byly stanoveny dle doporučeného postupu výrobce Matriks Biotek. Postup měření pro stanovení izotypů protilátek IgG i IgM je téměř identický výjimkou jsou odchylky:

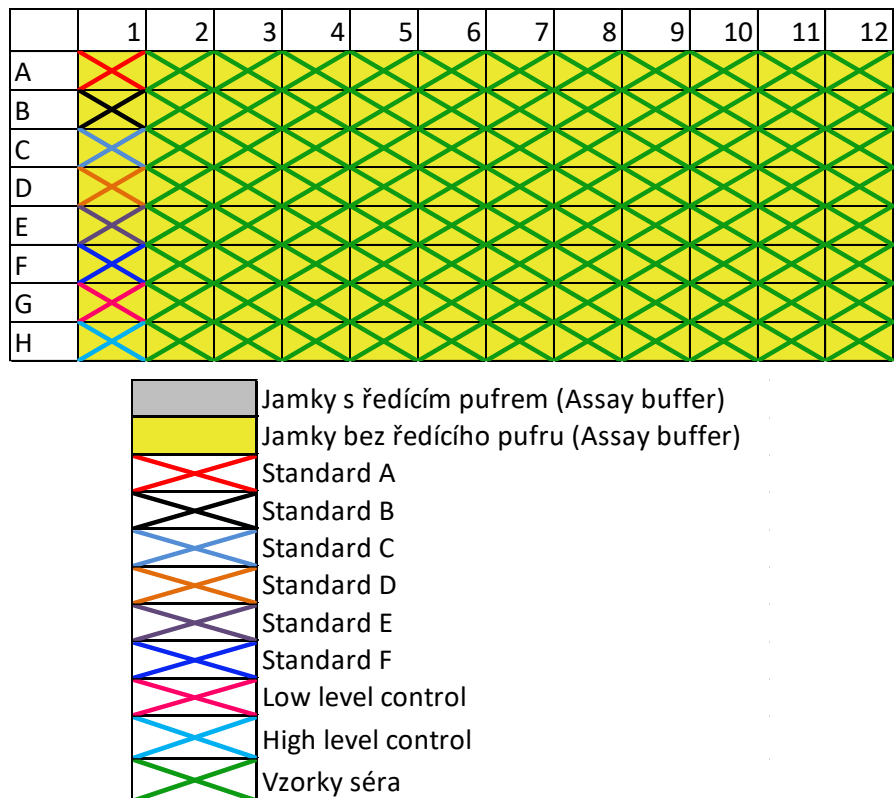
- Krok 1 je vynechán v případě měření izotypu protilátek IgM.
- Krok 2 se liší v pipetovaném objemu.

Postup

1. Pipetování 100 μ l ředícího pufru (assay buffer) do každé z použitých jamek (platí pouze pro měření izotypu protilátek IgG)
2. Pipetování standardů, referenčních vzorků nízké a vysoké hladiny specifických protilátek (low level control, high level control) a zředěných vzorků do příslušných jamek mikrotitrační destičky v množství:
 - 20 μ l při stanovení izotypu protilátek IgG (viz Obrázek 15)
 - 100 μ l při stanovení izotypu protilátek IgM (viz Obrázek 16)



Obrázek 15 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení protilátek třídy IgG (vlastní zdroj)



Obrázek 16 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení protilátek třídy IgM (vlastní zdroj)

3. Překrytí mikrotitrační destičky lepicí (adhezivní) fólií, následované krátkým promícháním obsahu (jemným protřepáním mikrotitrační destičky) a inkubací 60 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).
4. Odstranění lepicí fólie, vylití inkubačního roztoku do výlevky a následné promytí mikrotitrační destičky 300 µl promývacího roztoku (wash buffer). Poklepáním obrácené desky na papírovou utěrku se odstraní zbývající roztok na dně jamek. Promytí se opakuje třikrát.
5. Pipetování 100 µl konjugátu do každé jamky.
6. Opět překrytí mikrotitrační destičky lepicí fólií s následnou inkubací 30 minut při pokojové teplotě (18-25 °C).
7. Odstranění lepicí fólie, vylití inkubačního roztoku do výlevky a následné promytí mikrotitrační destičky 300 µl promývacího roztoku (wash buffer). Poklepáním obrácené desky na papírovou utěrku se odstraní zbývající roztok. Promytí se opakuje třikrát.
8. Pipetování 100 µl substrátu do každé jamky.
9. Inkubace ve tmě 15 minut bez lepicí fólie při pokojové teplotě (18-25 °C).

10. Přidání 100 µl zastavovacího roztoku (stop buffer) do každé jamky s lehkým protřepáním mikrotitrační destičky. Zastavovací roztok (stop buffer) zastavuje reakci substrátu a výsledkem je barevná změna z modré na žlutou.
11. Do 30 minut po přidání zastavovacího roztoku (stop buffer) se měří absorbance fotometricky při 450 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm (450/650 nm).

4.9 Kontrola kvality měření

Výsledky zkoušky lze prohlásit za platné po provedení měření přesně podle pokynů uvedených v zakoupené soupravě a při dodržení pravidel správné laboratorní praxe (SLP) nebo jiných použitelných norem či zákonů.

Pro platnou studii optické hustoty při 450/650 nm:

- Standard A (standard s nejvyšší koncentrací) musí být >1500
- Standard F (standard s nejnižší koncentrací) musí být <0,150

V případě jakékoli odchylky by mělo být přezkoumáno: datum expirace činidel, podmínky skladování, pipety, zařízení, inkubační podmínky, způsoby mytí atd.

4.10 Interpretace výsledků

Po provedení enzymatické imunoanalýzy a kontrole kvality měření, byly naměřené hodnoty přepočítány na koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2. Přepočet se prováděl pomocí kalibrační křivky, která byla stanovena na základě změřených hodnot standardů. Výsledné koncentrace v jednotkách ng/ml jsou pro protilátky anti-SARS-CoV-2 S1 IgG uvedeny v *Příloze 1* a pro protilátky anti-SARS-CoV-2 S1 IgM v *Příloze 2*.

Při interpretaci výsledků koncentrace specifických protilátek proti spikovému proteinu viru SARS-CoV-2 je rozhodující detekční limit či rozhodovací hladina (cut-off). Detekčním limitem u analytické metody je označena nejnižší detekovatelná koncentrace analytu ve vzorku, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. (Kozlík, 2020) Pro měření specifických protilátek v rámci této studie byl použit detekční limit 800 ng/ml, který je stanoven na základě doporučení výrobce.

Hladiny koncentrací protilátek anti-SARS-CoV-2 S1 IgG nebo IgM, které jsou nižší než 800 ng/ml se označují jako negativní (pod detekčním limitem). V případě výskytu koncentrace protilátek anti-SARS-CoV-2 S1 IgG či IgM v rozmezí 800-1500 ng/ml se používá označení šedá zóna či hraniční výsledek. Koncentrace, které jsou vyšší nebo rovny 1500 ng/ml se označují jako pozitivní (nad detekčním limitem). Procentuální zastoupení hodnot koncentrací specifických protilátek proti spikovému proteinu ve výše uvedených rozmezech u námi sledovaných probandů je pro úplnost znázorněno v *Tabulkách 6 a 9*.

Sloupcové grafy viz *Obrázek 17 a 18* byly zpracovány v programu GraphPad Prism9 a znázorňují koncentraci protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgG a IgM v jednotlivých odběrech v závislosti na střední nebo také směrodatné chybě průměru (SEM či SE = standard error of the mean). SE kvantifikuje přesnost průměru a značí míru, jak bude průměr vzorku studie daleko od skutečného průměru populace. SE se vyjadřuje ve stejných jednotkách jako vlastní koncentrace specifických protilátek proti spikovému proteinu. Čím více je zahrnuto probandů v souboru, tím se více minimalizuje odlišnost průměru znázorněného v grafu od průměru v celé populaci.

5 VÝSLEDKY

5.1 Koncentrace specifického IgM proti spikovému proteinu

V přehledu zjištěných koncentrací protilátek specifických proti spikovému proteinu ve třídě IgM (viz *Tabulka 6*) je pro úplnost znázorněno procentuální zastoupení probandů podle hodnocení v závislosti na detekčním limitu. Detekčním limit byl pro tuto studii stanoven 800 ng/ml na základě výrobcem otestovaných referenčních sér WHO.

Tabulka 6 Procentuální rozdělení koncentrací specifických protilátek proti spikovému proteinu ve třídě IgM na základě detekčního limitu (vlastní zdroj)

IgM	počet probandů	Počet probandů		
		Negativní (pod 800 ng/ml)	Šedá zóna (800 - 1500 ng/ml)	Pozitivní (nad 1500 ng/ml)
1. odběr	46	6,5	0	93,5
2. odběr	42	7,1	0	92,9
3. odběr	54	9,3	18,5	72,2
4. odběr	34	17,6	38,2	44,1

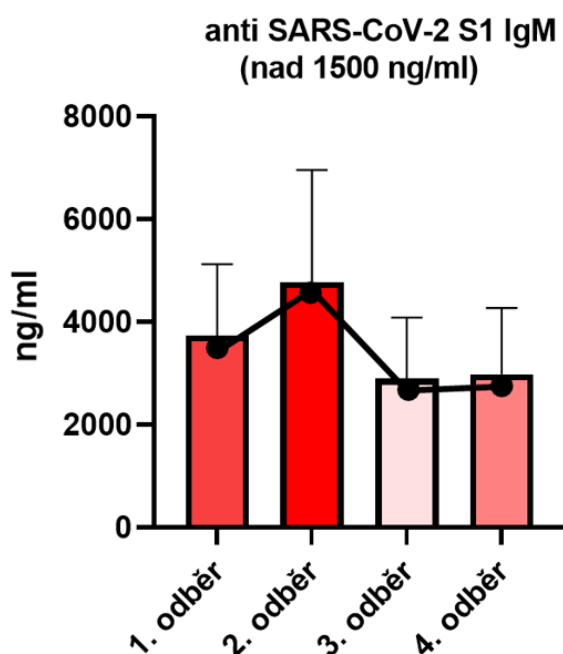
Výsledkem 1. odběru periferní krve dobrovolníků po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny od firmy Pfizer-BioNtech je 93,5 % pozitivních výsledků (nad detekčním limitem) a 6,5 % negativní výsledků. Hraniční hodnoty specifických protilátek proti spikovému proteinu nebyly zaznamenány. Ve 2. odběru bylo zjištěno 92,9 % pozitivních výsledků, hraniční hodnoty také nebyly zastoupeny a 7,1 % tvořily negativní výsledky. Ve 3. odběru byly zjištěny pozitivní výsledky u 72,2 % jedinců, hraniční výsledky (šedá zóna) u 18,5 % a negativní výsledky (pod detekčním limitem) u 9,3 % probandů. Ve 4. odběru byly pozitivní výsledky zjištěny u 44,1 % probandů, hraniční výsledky u 38,2 % probandů a negativní výsledky u 17,6 % jedinců.

Pro statistické zpracování získaných koncentrací protilátek anti-SARS-CoV-2 SI IgM byly následně využity pouze pozitivní hodnoty (n=136/176), které se nachází nad detekčním limitem. Hodnoty, které byly stanoveny v šedé zóně, by bylo pro přesnost vhodnější znovu přeměřit. Deskriptivní parametry vypočítané z pozitivních výsledků jsou znázorněny v *Tabulce 7*.

Tabulka 7 Přehled vypočítaných parametrů u pozitivních výsledků anti-SARS-CoV-2 S1 IgM (vlastní zdroj)

	Počet pozitivních výsledků z celkových stanovení v daný termín	Průměr (ng/ml)	Střední chyba průměru (ng/ml)	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka (ng/ml)
1. odběr	43/46	3738	119,4	3550	1388,27
2. odběr	39/42	4774	197,3	4240	2183,88
3. odběr	39/54	2897	106,9	2520	1183,80
4. odběr	15/34	2985	187,3	2564	1285,77

Dynamika změny koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgM je znázorněna na *Obrázku 17*, kde jsou data zobrazena jako průměry a střední chyba průmětu SE je zaznamenána prostřednictvím chybových úseček. *Obrázek 17* je grafickým zpracováním získaných pozitivních výsledků a také parametrů z *Tabulky 7*.



Obrázek 17 Změna koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgM mezi jednotlivými odběry po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny Comirnaty (vlastní zdroj)

Odběry byly realizovány v období červenec/srpen 2021 až leden 2022 a je mezi nimi časový rozestup 1,5 měsíce.

Výsledkem 1. odběru (n=43), který odpovídá hodnocení 1, 5 měsíce po podání 2. dávky vakcíny Comirnaty (BNT162b2) byla průměrná koncentrace pozitivních výsledků 3 738 ng/ml a SE 119,4 ng/ml. Ve 2. odběru (n=39), kde hodnocení odpovídá vzorkům odebraných 3 měsíce po podání 2. dávky vakcíny, se průměrná koncentrace rovnala 4 774 ng/ml a SE 197,3 ng/ml. Výsledkem 3. odběru (n=39), který byl odebrán s odstupem 4,5 měsíce od naočkování 2 dávek, byla průměrná koncentrace 2 897 ng/ml a SE 106,9 ng/ml. V posledním 4. odběru (n=15) s odstupem 6 měsíců od očkování 2 dávkami vakcíny byla zjištěna průměrná koncentrace protilátek 2 985 ng/ml a SE 187,3 ng/ml.

Na základě naměřených hodnot byla provedena i statistická analýza vlivu věku a ostatních prediktorů na protilátkovou odpověď viz *Tabulka 8*. Statistiku, která zahrnovala zdravotnické pracovníky VFN v Praze ve věkovém rozmezí od 21 let do 86 let provedl MUDr. Ing. Lubomír Štěpánek.

Tabulka 8 Závislost hladiny IgM na prediktorech (vlastní zdroj)

	Odhad	Střední chyba průměru	p hodnota (označující míru signifikance)
Onemocnění COVID-19	240,281	332,744	0,47078
Rok narození	29,177	9,136	0,00155**
BMI	-52,442	24,533	0,03335*
Pohlaví – žena	-452,091	282,819	0,11098

*Signifikantní kódy: ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$*

Použitá zkratka: BMI – index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)

Zhodnocení závislosti prediktorů na hladině IgM viz *Tabulka 8*:

- P hodnota 0,47078 nemá na hladině významnosti 5 % statisticky významný vztah s proměnnou odezvy, zda daný jedinec prodělal onemocnění COVID-19.
- P hodnota 0,00155 je na hladině významnosti 1 % statisticky významná pro rok narození.
- P hodnota 0,03335 je na hladině významnosti 5 % statisticky významná pro index tělesné hmotnosti označovaný BMI (Body Mass Index).
- P hodnota 0,11098 nemá na hladině významnosti 5 % statisticky významný vztah pro korelaci závislosti pohlaví na protilátkové odpovědi (koncentraci specifických IgM proti spikovému proteinu)

Výsledkem statistické analýzy vlivu prediktorů na protilátkovou odpověď je zjištění statisticky významné závislosti koncentrací specifických protilátek IgM proti spikovému proteinu na věku jedince a BMI. S rostoucím rokem narození rostou hodnoty protilátek a s rostoucím BMI klesají hodnoty protilátek.

5.2 Koncentrace specifického IgG proti spikovému proteinu

Pro úplnost je v přehledu zjištěných koncentrací protilátek specifických proti spikovému proteinu ve třídě IgG (viz *Tabulka 9*) znázorněno procentuální zastoupení probandů podle hodnocení v závislosti na detekčním limitu. Detekční limit byl pro tuto studii stanoven rovněž 800 ng/ml na základě výrobcem otestovaných referenčních sér WHO.

Tabulka 9 Procentuální rozdělení koncentrací specifických protilátek proti spikovému proteinu ve třídě IgG na základě detekčního limitu (vlastní zdroj)

IgG	počet probandů	Počet probandů		
		Negativní (pod 800 ng/ml)	Šedá zóna (800 - 1500 ng/ml)	Pozitivní (nad 1500 ng/ml)
1. odběr	46	0	0	100
2. odběr	42	0	0	100
3. odběr	54	20,4	11,1	68,5
4. odběr	34	26,5	11,8	61,8

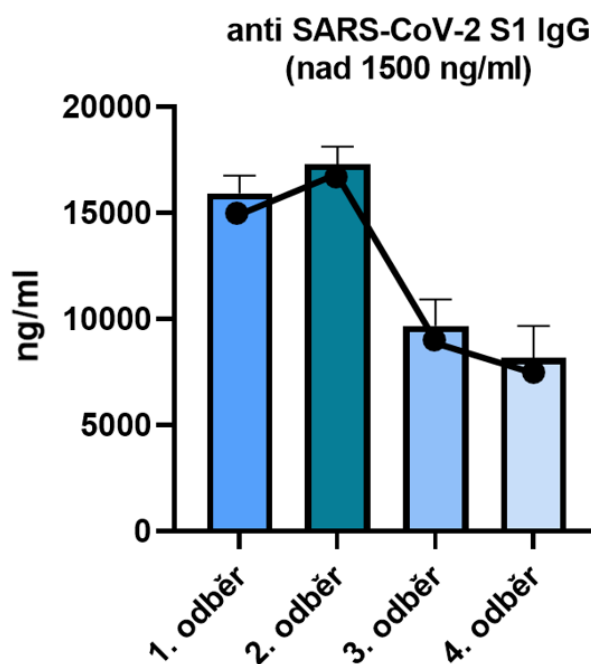
Výsledkem je 100% zastoupení pozitivních výsledků (nad detekčním limitem) v 1. a 2. odběru periferní krve dobrovolníků po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny od firmy Pfizer-BioNTech. Ve 3. odběru byly zjištěny pozitivní hodnoty specifických protilátek proti spikovému proteinu u 68,5 % jedinců, hraniční výsledky (šedá zóna) u 11,1 % a negativní výsledky (pod detekčním limitem) u 20,4 % probandů. Ve 4. odběru byly pozitivní výsledky stanoveny u 61,8 % probandů, hraniční výsledky u 11,8 % probandů a negativní výsledky u 26,5 % jedinců.

Pro přesnost výsledků by hodnoty, nacházející se v šedé zóně, měly být znovu přeměřeny. Ze zjištěných koncentrací protilátek anti-SARS-CoV-2 S1 IgG byly pro statistické zpracování dále využity pouze pozitivní hodnoty (n=146/176), které se nacházejí nad detekčním limitem (nad 1500 ng/ml). V *Tabulce 10* jsou z pozitivních výsledků vypočítané deskriptivní parametry.

Tabulka 10 Přehled vypočítaných parametrů u pozitivních výsledků anti-SARS-CoV-2 S1 IgG (vlastní zdroj)

	Počet pozitivních výsledků z celkových stanovení v daný termín	Průměr (ng/ml)	Střední chyba průměru (ng/ml)	Medián (ng/ml)	Směrodatná odchylka (ng/ml)
1. odběr	46/46	15926	467,8	20000	5623,05
2. odběr	42/42	17307	462,5	20000	5312,64
3. odběr	37/54	9676	708,2	6154	7635,79
4. odběr	21/34	8161	857,0	5869	6960,91

Na Obrázku 18 je znázorněna dynamika změny koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgG. Data jsou zobrazena jako průměry a střední chyba průmětu SE je zaznamenána prostřednictvím chybových úseček. Obrázek 18 je grafickým zpracováním získaných pozitivních výsledků a také vypočítaných parametrů z Tabulky 10.



Obrázek 18 Změna koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgG mezi jednotlivými odběry po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny Comirnaty (vlastní zdroj)

Odběry byly realizovány v období červenec/srpen 2021 až leden 2022 a je mezi nimi časový rozestup 1,5 měsíce.

V 1. odběru (n = 46), který odpovídá hodnocení 1, 5 měsíce po podání 2. dávky vakcíny Comirnaty (BNT162b2) byla průměrná koncentrace pozitivních výsledků 15 926 ng/ml a SE 467,8 ng/ml. Výsledkem 2. odběru (n = 42) s časovým odstupem 3 měsíce po podání 2. dávky mRNA vakcíny se průměrná koncentrace rovnala 17 307 ng/ml a SE 462,5 ng/ml. Ve 3. odběru (n = 37), který byl realizován s odstupem 4,5 měsíce po podání 2. dávky vakcíny byla průměrná koncentrace 9 676 ng/ml a SE 708, 2 ng/ml. Výsledkem 4. odběru (n = 21), získaného s odstupem 6 měsíců po podání 2. dávky vakcíny, byla zjištěna průměrná koncentrace protilátek 8 161 ng/ml a SE 857,0 ng/ml.

Statistická analýza vlivu prediktorů na protilátkovou odpověď viz *Tabulka 11* byla rovněž provedena MUDr. Ing. Lubomírem Štěpánkem na základě naměřených hodnot. Statistika zahrnovala zdravotnické pracovníky VFN v Praze ve věkovém rozmezí od 21 let do 86 let.

Tabulka 11 Závislost hladiny IgG na prediktorech (vlastní zdroj)

	Odhad	Střední chyba průměru	p hodnota (označující míru signifikance)
Onemocnění COVID-19	6469,404	963,553	2,25E-10**
Rok narození	18,094	26,048	0,488141
BMI	-20,617	73,501	0,799404
Pohlaví – žena	1540,635	801,268	0,056048

*Signifikantní kód: ** $p \leq 0,01$*

Použitá zkratka: BMI – index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)

Vyhodnocení závislosti hladiny IgG na prediktorech viz *Tabulka 11*:

- P hodnota $2,25 \times 10^{-10}$ má na hladině významnosti 1 % statisticky významný vztah s proměnnou odezvy, zda daný jedinec prodělal onemocnění COVID-19.
- P hodnota $4881,41 \times 10^{-4}$ není na hladině významnosti 5 % statisticky významná pro závislost roku narození a hodnot specifických protilátek.
- P hodnota $7994,04 \times 10^{-4}$ nemá na hladině významnosti 5 % statisticky významný vztah mezi koncentrací specifických protilátek s prediktorem BMI.
- P hodnota $560,48 \times 10^{-4}$ má na hladině významnosti 5 % statisticky hraniční významný vztah pro korelaci závislosti pohlaví na protilátkové odpovědi proti spikovému proteinu.

Výsledkem statistické analýzy vlivu prediktorů na protilátkovou odpověď je potvrzen statistický významný vztah pouze prodělaného onemocnění COVID-19 v závislosti na koncentrací specifických protilátek IgG proti spikovému proteinu. Hraniční vztah korelace závislosti pohlaví na koncentraci IgG nelze považovat za významný. Hodnoty protilátek IgG rostou s proděláním onemocnění COVID-19.

6 DISKUZE

Cílem bakalářské práce bylo charakterizovat protilátkovou odpověď u zdravotnických pracovníků VFN v Praze, v průběhu 6 měsíců po 2. dávce ukončeného očkování mRNA vakcínou Comirnaty (BNT162b2) od společnosti Pfizer-BioNTech. Realizace odběrů probíhala od přelomu července a srpna 2021 do ledna 2022 vždy s 1,5-měsíčním odstupem od předchozího odběru. Hodnoceny byly koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu (Spike S1) SARS-CoV-2 ve třídě IgM a IgG, které byly získány metodou ELISA. V případech obou izotypů protilátek byl zaznamenán nárůst protilátek ve 3. měsíci a výrazný pokles specifických protilátek v časovém odstupu 4,5 měsíce od ukončeného očkování. Dynamika protilátek ve třídě IgG mírně klesala i 6 měsíců po ukončeném očkování, naopak protilátky ve třídě IgM se mírně zvýšily. Hladiny anti-SARS-CoV-2 S1 IgG byly výrazně vyšší v porovnání s anti-SARS-CoV-2 S1 IgM, rovněž jako ve studii (Wang, 2021), která uvedla vyšší zjištěné hladiny anti-S a anti-RBD IgG než hladiny anti-S a anti-RBD IgM.

V humorální odpovědi vznikající po očkování se jako faktor, který může ovlivnit výsledky či sledované parametry, ukazuje předchozí prodělání infekce SARS-CoV-2. Studie (Cham, 2022) zjistila po očkování minimální humorální odpověď anti-Spike IgM u osob, které neprodělaly COVID-19, a naopak vyšší humorální odpověď anti-Spike IgM u pracovníků, kteří prodělali přirozenou infekci. Studie (Yang, 2021) uvedla, že pracovníkům ve zdravotnictví hrozí 3,4krát vyšší riziko onemocnění COVID-19.

V souvislosti s pandemií COVID-19 je realizováno mnoho studií s odlišným stanovením i interpretací naměřených dat. Velké množství studií např.: (Yang, 2021); (Borgonovo, 2022); (Einarsdottir, 2022); (Furer, 2021); (Blain, 2022) interpretuje naměřené výsledky v jednotkách BAU/ml (z angl. binding antibody unit) postupně nahrazujících jednotky AU/ml (z angl. arbitrary concentration unit). Jednotky BAU/ml byly definovány WHO jako nový standard, který bude v budoucnu nejspíše použit pro stanovení hranice dostatečné ochranné hladiny IgG protilátek proti onemocnění COVID-19, která je zatím stále nejasná. (Rubin, 2021)

Podle Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC z angl. European centre for disease prevention and control) by se mohlo stanovení hladiny celkových nebo neutralizačních protilátek (nAbs) pomocí spolehlivých testů stát důležitým nástrojem lékařské péče a prevence, především u rizikových skupin pacientů. (Adlhoch, 2021)

Na jednu z rizikových skupin se zaměřila studie (Furer, 2021), která zkoumala bezpečnost a účinnost mRNA vakcíny BNT162b2 u dospělých pacientů s autoimunitními zánětlivými revmatickými onemocněními. Výsledkem studie (Furer, 2021) bylo zjištění, že u pacientů s autoimunitním onemocněním byly v porovnání s kontrolami zjištěny významně nižší hladiny S1/S2 IgG protilátek (86 % séropozitivních jedinců, kteří byli infikováni virem SARS-CoV-2), avšak počet relapsů u očkováných jedinců byl stejný jako před očkovaním. Z vyhodnocení vyplývá, že očkování má význam i u osob s autoimunitním onemocněním, u nichž lze předpokládat nižší indukci protektivní imunity, jak s ohledem na vlastní onemocnění, tak i na terapii.

Výsledky bývají často interpretovány i pomocí poměru indexu kontroly (S/C z angl. sample control index ratio) viz serologická studie (Carbonare, 2021), která po očkovaní měřila mikročástice výsledné chemiluminiscenční reakce jako relativní světelnou jednotku (RLU z angl. Relative Luminescence Units) označenou (S) a porovnávala ji se specifickým kalibrátorem RLU označeného (C). Naměřené hodnoty v jednotkách AU/ml a S/C popisuje i studie (Nguyen, 2020), zaměřená na korelaci serologických metod s metodou ELISA, které jsou využívány v souvislosti nukleokapsidových či spikových proteinů proti stanovení SARS-CoV-2. Za účelem vyhodnocení časové dynamiky protilátek proti SARS-CoV-2 je vhodnější používat metody zaměřené proti spikovému proteinu, které mají ve vakcinaci největší význam, jak již bylo zmíněno i v teoretické části viz kapitola 3.5.1 a zároveň to potvrzuje i studie (Cham, 2022), kde nikdo z účastníků (na rozdíl od metod proti spikovým proteinům) neprokázal humorální odpověď proti nukleokapsidovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgM a ve třídě IgG prokázal odpověď pouze jeden účastník.

Ve studii (Blain, 2022) byl rovněž zaznamenán pokles protilátek ve třídě IgG po druhé dávce BNT162b2. Naměřené hodnoty byly interpretovány v jednotkách BAU/ml a S/C. Dále byla zjištěna vysoká humorální odpověď po třetí dávce, která podpořila naše doporučení posilovací dávky vakcíny, na které upozorňovala i studie (Danese, 2021). Studie (Blain, 2022) ještě doporučuje využít posilovací dávku nejpozději 6 měsíců po druhé dávce a navrhuje upřednostnit osoby bez předchozího onemocnění COVID-19, které vykazují nižší humorální odpověď než osoby s prodělaným onemocněním, což potvrzují i námi naměřená data.

Pokles (po 3. měsíci, který pokračoval až do 6. měsíce) polyklonální IgG odpovědi v identickém časovém období v porovnání s naší studií zaznamenala i menší studie (Cham, 2022), publikovaná v odborném časopise PLOS ONE. Studie (Cham, 2022) byla prováděna prostřednictvím multiantigenního panelu Raw Maverick SARS-CoV-2 umožňujícího stanovovat zároveň protilátky proti nukleokapsidovému proteinu a proti různým epitopům spikového proteinu (Spike S1, Spike S2, Spike S1/S2, Spike RBD). Výsledky protilátkové odpovědi byly uvedeny v jednotkách GRU (z angl. genalyte response units) určených společností Genalyte, Tedy není možné diskutovat konkrétní číselné odchylky od naší studie, která uvádí naměřené výsledky v ng/ml.

Na vliv prodělání infekce SARS-CoV-2 se zaměřila i studie (Yang, 2021), která prováděla stanovení anti-S1-RBD IgG v porovnání s geometrickým průměrem titru protilátek (GMT z angl. geometric mean titre) u zdravotnických pracovníků. Studie potvrdila, že osoby po předchozím prodělání COVID-19 měly hladiny GMT 1,6 až 6krát vyšší než ti, kteří dosud infekci neprodělali. (Yang, 2021) Taktéž studie (Borgonovo, 2022), která zahrnovala pracovníky a pacienty pečovatelského domu, potvrdila po 6 měsících vyšší produkci anti-S IgG u osob s prodělaným COVID-19 (2467,4 BAU/ml) než u osob, které COVID-19 neprodělaly (904,8 BAU/ml). Studie (Fraley, 2021) dokonce zaznamenala téměř srovnatelné hladiny protilátek po jedné dávce vakcíny BNT162b2 u séropozitivních jedinců (s potvrzenou předchozí infekcí SARS-CoV-2 30-60 dní před vakcinací) s hladinami pozorovanými u séronegativních jedinců (bez předchozí infekci SARS-CoV-2) po dvou dávkách vakcíny BNT162b2. Vyšší hladiny protilátek ve třídě IgG u osob s koordinovanými reakcemi IgM-S/IgG-S popisuje studie (Ruggiero, 2022), která uvádí, že zmíněná koordinace obou izotypů pravděpodobně značí vyšší úroveň ochrany.

Otázkou zůstává souvislost specifických protilátek IgM s již existující imunitou v reakci na očkování. Objevují se důkazy, že imunitní odpověď na SARS-CoV-2 je ovlivněna zkříženou koronavirovou imunitou. Studie z armádní komunitní nemocnice v Jižní Koreji publikovaná 3. 6. 2021 odhalila zkříženou reaktivitu mezi SARS-CoV-2 a SARS-CoV-1, MERS-CoV a sezónními beta koronaviry (HKU1 a OC43) u neočkovaných osob. (Chaudhury, 2021) Odpověď protilátek IgM na SARS-CoV-2 byla vysoce specifická, zatímco humorální odpověď IgG byla více zkříženě reaktivní napříč řadou lidských koronavirů. Stejně výsledky byly pozorovány v Massachusettské nemocnici (Kaplonek, 2021), kde došlo u osob, s již existující běžnou humorální imunitou β -koronaviru OC43, k rozvoji imunity specifické proti SARS-CoV-2. Nabízí se tedy otázka, zda hodnoty specifických protilátek ve třídě IgM i IgG po očkování nejsou ovlivněny imunitou jedince vytvořenou již dříve prodělanými běžnými sezónními beta koronaviry, což by bylo zajímavým námětem pro další studie. Studie (Khor, 2022) zmiňuje, že mRNA vakcíny proti COVID-19 vykazují vysokou interpersonální variabilitu ohledně buněčné odpovědi (CD4 + a CD8 + T lymfocytů) i humorální odpovědi (anti-SARS-CoV-2 spike IgG, IgA, IgM i nAbs), což je v souladu se zmiňovanými studiiemi v naší práci.

V návaznosti na ověření faktorů ovlivňující humorální odpověď po očkování byla v naší studii provedena statistická analýza vlivu prediktorů na protilátkovou odpověď. V případě IgM se potvrdil statistický významný vztah hodnot proti spikovému proteinu s věkem a BMI. Humorální odpověď byla snížena u osob s vyšším BMI, a naopak byla zvýšena s klesajícím věkem. V případě koncentrace specifických protilátek proti spikovému proteinu ve třídě IgG se potvrdil statistický významný vztah pouze s onemocněním COVID-19, kde humorální odpověď roste po prodělaném onemocnění COVID-19. Vztah protilátek IgG s předchozí infekcí COVID-19 potvrdila i studie (Yang, 2021), která brala v potaz ještě vliv věku na protilátkovou odpověď, který v naší studii prokázán nebyl. Významnost věku ke specifickým protilátkám potvrdila i studie (Levin, 2021), která probíhala v lékařském centru v Izraeli od prosince 2020 do července 2021 a rovněž zahrnovala zdravotnické pracovníky.

Ve zmíněné studii (Levin, 2021) byla nižší humorální odpověď IgG spojena s mužským pohlavím, vyšším věkem a přítomností imunosuprese, autoimunitního onemocnění nebo dvou či více souběžných onemocnění. Nižší humorální odpověď specifických IgG protilátek u autoimunitních onemocnění ve studii (Furer, 2021) byla popsána již výše. V této studii nebyl tento prediktor předmětem zkoumání.

Studie (Wang, 2021) v odborném časopisu Nature uvedla, že mRNA vakcíny může být nutné pravidelně aktualizovat, s cílem zabránit potenciální ztrátě klinické účinnosti. Podle výsledků klinických studií je účinnost 95,0 % (proti středně těžké a symptomatické infekci SARS-CoV-2) u vakcín od společností Pfizer-BioNTech a Moderna. (Patel, 2022) Tento údaj vychází ze studie (Polack, 2020), která zahrnovala 43 548 účastníků starších 16 let, očkovaných dvěma dávkami BNT162b2 s odstupem 21 dní. Účastníci studie (Polack, 2020) byli odebíráni na 152 místech po celém světě v rozmezí červenec až listopad 2020. V rámci vyhodnocení byla mezi první a druhou dávkou zjištěna 52% účinnost vakcíny proti SARS-CoV-2, která poskytuje časnou ochranu proti infekci a minimálně 7 dní po druhé dávce vakcíny byla zjištěna účinnost 95 %. Studie (Polack, 2020) vyhodnotila pravděpodobnost 99,99 %, že skutečná účinnost vakcíny přesahuje hranici 30 %.

V současné době již probíhají studie na ověření humorální odpovědi ve třídě IgG po posilovací dávce v delším časovém odstupu, které by mohly prokázat či vyvrátit nutnost aktualizace vytvořených mRNA vakcín. V souvislosti s účinností vakcíny BNT162b2, upozorňuje studie (Danese, 2021), že je též vhodné uvažovat o úpravě stávajících vakcín pro dosažení ochranného titru protilátek proti novým variantám SARS-CoV-2, které by se mohly ještě objevit.

Zajímavostí je, že mírné hladiny protilátek lze po očkování pozorovat nejen v krvi, ale i v mateřském mléce či slinách. Studie (Charepe, 2021), která zahrnovala kojící i nekojící ženy prokázala humorální imunitu (IgM, IgA a IgG) po očkování vakcínou BNT162b2. Ve zmíněné studii (Charepe, 2021) byly v mateřském mléce pozorovány mírné hladiny protilátek u kojících matek a dominantní sérovou protilátkou se prokázala IgG rovněž jako ve studii (Jin, 2020) či v naší studii. Ve studii (Ketas, 2021) byl v několika vzorcích slin detekován anti-S-protein IgG, který byl zároveň přítomen ve všech vzorcích séra jedinců očkovaných dvěma dávkami mRNA vakcín od společností Moderna či Pfizer-BioNTech.

Současné používané mRNA vakcíny jsou založeny na spikovém proteinu SARS-CoV-2, který vychází z původního wuchanského kmene (Wuhan-1). (Rubin, 2021) Námí zjišťované specifické protilátky IgG a IgM sledují humorální odpověď proti tomuto spikovému proteinu, ale nevypovídají o účinnosti mRNA vakcín proti novým mutacím. K posouzení ochrany před infekcí či reinfekcí proti specifickému SARS-CoV-2 slouží přítomnost nAbs, uplatňujících se v obraně proti viru. Trvalé titry nAbs by podle studií (Štěpánek, 2022) a (Danese, 2021) zajistily dostatečnou ochranu před infekcí SARS-CoV-2. Sledování nAbs je předmětem mnoha studií a často se využívají k porovnání účinnosti se specifickými IgG a IgM viz studie (Jiang, 2022) nebo (Choe, 2022). Neutralizační protilátky u osob očkovaných mRNA vakcínami zkoumala studie (Wang, 2021), která zároveň uvedla, že ačkoliv v průběhu času klesají cirkulující protilátky vyšetřované v rámci naší studie, dlouhodobá imunitní paměť může přetrvávat v expandovaných klonech paměťových B lymfocytů.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla uvedena problematika zabývající se základním fungováním imunitního systému se zaměřením na adaptivní imunitu a její složky. V následujících kapitolách byly popsány funkce imunoglobulinů a antiinfekční imunita, která se uplatňuje v obraně proti virovým infekcím. Další část byla věnována problematice ohledně SARS-CoV-2 a aktivní imunizaci (vakcinace) včetně dostupných vakcín proti probíhajícímu onemocnění COVID-19 se zaměřením na princip fungování mRNA vakcín, neboť byl studován vliv očkování (mRNA vakcínami) na indukci protektivní protilátkové odpovědi.

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na zhodnocení výsledků získaných enzymovou immunoanalýzou pro kvantitativní stanovení anti-S1 IgG a anti-S1 IgM v lidském séru zdravotnických pracovníků ve věku ≥ 21 let, po podání 2. dávky mRNA vakcíny Comirnaty (BNT162b2) od společnosti Pfizer-BioNTech. Současně s dynamikou specifických protilátek proti spikovému proteinu byla sledována významnost závislost prediktorů na specifických protilátkách ve třídě IgM a IgG.

Koncentrace specifického IgM proti spikovému proteinu se zvyšovala ve 3. měsíci a následně výrazně klesala u odběrů získaných 4,5 měsíce až 6 měsíců po podání 2. dávky mRNA. Statistická analýza vlivů prediktorů na humorální odpověď IgM prokázala statisticky významný vztah s věkem a BMI. Protilátková odpověď proti spikovému proteinu ve třídě IgM byla zvýšena s klesajícím věkem, a naopak snížena byla u osob s vyšším BMI. V případě specifického IgG se koncentrace proti spikovému proteinu rovněž zvyšovala ve 3. měsíci a klesala 4,5 měsíce po ukončeném očkování s nepatrným nárůstem u odběrů získaných v 6 měsících. Statisticky významný vztah hodnot proti spikovému proteinu ve třídě IgG se potvrdil pouze u osob s prodělaným onemocněním COVID-19, kdy proděláním nemoci zvyšuje hodnoty protilátek.

Pokles protilátek ve třídě IgG v závislosti na době po očkování svědčí pro vhodnost využití doporučené posilovací dávky. Velké množství pozitivních hodnot zjištěných ve třídě IgM lze přisuzovat vyšší expozici viru SARS-CoV-2, neboť vyšetřovaným souborem byli pracovníci ve zdravotnictví.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

IgA	imunoglobulin izotypu A
IgM	imunoglobulin izotypu M
IgG	imunoglobulin izotypu G
ACE2	angiotenzin konvertující enzym 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019 (coronavirus disease 2019)
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
Tc	cytotoxický T lymfocyt (cytotoxic T-cell)
CD8+	koreceptor pro MHC-I na cytotoxických Tc lymfocytech
MAMP	struktury charakteristické pro mikroorganismy (microbe associated molecular patterns)
PRR	receptor pro rozpoznání struktur (pattern recognition receptors)
DAMP	molekuly uvolněné z poškozených buněk (danger associated molecular patterns)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
NK	přírození zabíječi (natural killer cells)
Th	pomocný T lymfocyt (helper T-cell)
iNKT	invariantní NKT lymfocyt
$\gamma\delta$ T	gama delta T lymfocyt
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
CD4+	koreceptor pro MHC-II na pomocných Th lymfocytech

TCR	T buněčný receptor (T cell receptor)
BCR	receptor lymfocytů B pro antigen (B cell receptor)
H	těžký řetězec (heavy chain)
L	lehký řetězec (light chain)
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
Fab	fragment vážící antigen (antigen binding fragment)
Fc	konstantní fragment (constant fragment)
C1–C9	sérové proteiny komplementu
IgD	imunoglobulin izotypu D
IgE	imunoglobulin izotypu E
sIgA	slizniční imunoglobulin A
PolyIgR	receptor pro transport polymerních imunoglobulinů
IVIG	intravenózní lidský imunoglobulin
APC	antigen prezentující buňky (antigen-presenting cell)
CD28	koreceptorová molekula u T lymfocytů
CD40	kostimulační protein na buňkách prezentujících antigen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
IL	interleukin
IFN γ	interferon gama
TGFBR	TGF- β receptor (transforming growth factor beta receptor)
C3b	fragment komplementu napomáhající opsonizaci

FcεRI	vysoko-afinitní Fc receptor IgE (high-affinity Fc receptor for IgE)
RNA	ribonukleová kyselina
SARS	severe acute respiratory syndrome
MERS	middle east respiratory syndrome
RBD	receptorová vazebná doména (receptor-binding domain)
WHO	Světová zdravotnická organizace (world health organization)
EU	Evropská unie (European union)
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (European medicines agency)
ETF	expertní pracovní skupina (emergency task force)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (food and drug administration)
mRNA	messenger RNA
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
LF	lékařská fakulta
UK	Univerzita Karlova
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	křenuv peroxidáza (horse radish peroxidase)
TMB	tetramethylbenzidin
ng/ml	nanogramy na mililitr (jednotka hmotnostní koncentrace)
μl	mikrolitr (jednotka objemu, rovna jedné tisícině litru)
SLP	správná laboratorní praxe

FTN	Fakultní Thomayerova nemocnice
FNB	Fakultní nemocnice Bulovka
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
SEM, SE	střední/směrodatná chyba průměru (standard error of the mean)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BAU/ml	mezinárodní standard vazebné jednotky protilátky (binding antibody unit) vztažený na mililitr
AU/ml	koncentrační jednotky (arbitrary concentration units)
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (european centre for disease prevention and control)
nAbs	neutralizační protilátky
S/C	poměr indexu kontroly (sample control index ratio)
RLU	relativní světelná jednotka (relative luminescence units)
GRU	jednotky protilátkové odpovědi (genalyte response units)
GMT	geometrický průměr titru (geometric mean titre)

9 BIBLIOGRAFIE

ADLHOCH, C., A. BAKA, P. KRAMARZ, A. KRAUS, A. MELIDOU a A. OMOKANYE, 2021. The use of antibody tests for SARS-COV-2 in the context of Digital Green Certificates. In: *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* [online]. [cit. 2022-02-13].

AMAWI, Haneen, Ghina'a ABU DEIAB, Alaa A ALJABALI, Kamal DUA a Murtaza TAMB UWALA, 2020. COVID-19 pandemic: an overview of epidemiology, pathogenesis, diagnostics and potential vaccines and therapeutics. *Therapeutic Delivery* [online]. **11**(4), 245-268 [cit. 2021-12-21]. ISSN 2041-5990. Dostupné z: doi:10.4155/tde-2020-0035

AMIN, Kawa, 2012. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* [online]. **106**(1), 9-14 [cit. 2021-11-06]. ISSN 09546111. Dostupné z: doi:10.1016/j.rmed.2011.09.007

Antibody Basics: BASIC ANTIBODY STRUCTURE. In: *MERCK* [online]. [cit. 2021-10-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/western-blotting/antibody-basics>

BARNES, Christopher, Claudia JETTE, Morgan ABERNATHY et al., 2020. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature* [online]. (588), 682–687 [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1>

BAUEROVÁ, Mária, 2008. *Metódy analýzy génov a genómov*. 1. vyd. Nitra: Fakulta prírodných vied Univerzity Konštantína Filozofa v Nitre. Prírodovedec. ISBN 978-80-8094-408-7.

BAX, Heather, Anthony KEEBLE a Hannah GOULD, 2012. Cytokinergic IgE Action in Mast Cell Activation. *Frontiers in Immunology* [online]. **3** [cit. 2021-11-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2012.00229

- BLAIN, Hubert, Edouard TUAILLON, Lucie GAMON, Amandine PISONI, Stéphanie MIOT a Marie-Christine PICOT, 2022. Strong Decay of SARS-CoV-2 Spike Antibodies after 2 BNT162b2 Vaccine Doses and High Antibody Response to a Third Dose in Nursing Home Residents. *Journal of the American Medical Directors Association* [online]. **23**(5), 750-753 [cit. 2022-05-01]. ISSN 15258610. Dostupné z: doi:10.1016/j.jamda.2022.02.006
- BLATNÝ, Jan, 2020. *Ministerstvo zdravotnictví: mimořádné opatření; Č. j.: MZDR 60876/2020-1 /MIN/KAN* [online]. In: . Praha [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: https://www.fulsoft.cz/download/fulsoft/covid19_326.pdf
- BORGONOVO, Fabio, Carlo STANGALINI, Carmine TINELLI et al., 2022. Decay rate of antiS1/S2 IgG serum levels after 6 months of BNT162b2 vaccination in a cohort of COVID-19-naive and COVID-19-experienced subjects. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 1-5 [cit. 2022-05-06]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2022.2060018
- BORSUTZKY, Stefan, Balthazar CAZAC, Jürgen ROES a Carlos GUZMÁN, 2004. TGF- β Receptor Signaling Is Critical for Mucosal IgA Responses. *The Journal of Immunology* [online]. **173**(5), 3305-3309 [cit. 2021-11-19]. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.173.5.3305
- BRUNCLÍKOVÁ, Klára, 2021a. *SÚKL: Předběžné údaje k účinnosti vakcín proti covid-19 na variantu omikron* [online]. In: . [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: https://www.sukl.cz/sukl/predbezne-udaje-k-ucinnosti-vakcin-proti-covid-19-na#_ftnrefl
- BRUNCLÍKOVÁ, Klára, 2021b. *SÚKL: EMA doporučila k registraci Nuvaxovid, vakcínu proti covid-19* [online]. In: . [cit. 2022-03-22].
- BUNEŠOVÁ, Věra, 2017. *Fundamentals of microbiology: for students of the Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Science Prague*. 1st edition. Prague: Czech University of Life Science. ISBN 9788021327573.
- CARBONARE, Luca, Maria VALENTI, Zeno BISOFFI et al., 2021. Serology study after BNT162b2 vaccination in participants previously infected with SARS-CoV-2 in two different waves versus naïve. *Communications Medicine* [online]. **1**(1) [cit. 2022-03-02]. ISSN 2730-664X. Dostupné z: doi:10.1038/s43856-021-00039-7

COLLIE, Shirley, Jared CHAMPION, Harry MOULTRIE, Linda-Gail BEKKER a Glenda GRAY, 2022. Effectiveness of BNT162b2 Vaccine against Omicron Variant in South Africa. *New England Journal of Medicine* [online]. **386**(5), 494-496 [cit. 2022-03-05]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMc2119270

COMBADIÈRE, Béhazine, 2020. Immunité adaptative contre le virus SARS-CoV-2. *Médecine/sciences* [online]. **36**(10), 908-913 [cit. 2021-10-29]. ISSN 0767-0974. Dostupné z: doi:10.1051/medsci/2020168

Covid Portál: Posilovací a dodatečná dávka [online], 2022. In: . [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://covid.gov.cz/situace/registrace-na-ockovani/posilovaci-dodatecna-davka>

CUCINOTTA, Domenico a Maurizio VANELLI, 2020. *WHO Declares COVID-19 a Pandemic* [online]. 911157–160 [cit. 2022-02-08]. Dostupné z: doi:10.23750/abm.v9i1.9397

DANESE, Elisa, Martina MONTAGNANA, Gian SALVAGNO et al., 2021. Comprehensive assessment of humoral response after Pfizer BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccination: a three-case series. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. **59**(9), 1585-1591 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2021-0339

DON, Li, 2018. Humoral mediated immunity. In: *Medbullets* [online]. [cit. 2021-11-10].

DON, LI, 2021. Molecular immunology - complement. In: *Medbullets* [online]. [cit. 2021-11-06].

DRANOFF, Glenn, 2004. Cytokiny v patogenezi rakoviny a terapii rakoviny. *Nat Rev Cancer* **4**. 1-10. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1252

DRNKOVÁ, Barbora, 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. 1. vydání. Praha: GRADA Publishing, a.s., str. 35, 39-40. ISBN 978-80-271-0693-6.

EINARSDOTTIR, Sigrun, Anna MARTNER, Jesper WALDENSTRÖM et al., 2022. Deficiency of SARS-CoV-2 T-cell responses after vaccination in long-term allo-HSCT survivors translates into abated humoral immunity. *Blood Advances* [online]. **6(9)**, 2723-2730 [cit. 2022-05-05]. ISSN 2473-9529. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2021006937

ELISA, 2020. In: *VŠCHT v Praze* [online]. [cit. 2022-02-04].

Encyclopedia Britannica: Imunne system physiology [online]. Samuel Scott Perdue, The Information Architects of Encyclopaedia Britannica [cit. 2021-11-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/immune-system/Classes-of-immunoglobulins>

EVROPSKÁ KOMISE, 2022. *Bezpečné vakcíny proti covidu-19 pro Evropu: Zajištění bezpečných a účinných očkovacích látek* [online]. In: . [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/info/live-work-travel-eu/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_cs

Fakultní nemocnice Brno: Léčba covidu-19 antivirotiky (Legevrio) a monoklonálními protilátkami (REGN-COV2) - informace [online], 2021. In: . [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/lecba-covidu-19-antivirotiky-legevrio-a-monoklonalnymi-protilatkami-regn-cov2-informace/t7130>

Fakultní Thomayerova nemocnice (FTN): Aplikační centrum monoklonálních protilátek BAMLANIVIMAB A ETESEVIMAB [online], 2022. In: . [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://www.ftn.cz/bamlanivimab-a-etesevimab-1187/>

FALCONE, Marco, Giusy TISEO, Beatrice VALORIANI et al., 2021. Efficacy of Bamlanivimab/Etesevimab and Casirivimab/Imdevimab in Preventing Progression to Severe COVID-19 and Role of Variants of Concern. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. **10(4)**, 2479-2488 [cit. 2022-02-13]. ISSN 2193-8229. Dostupné z: doi:10.1007/s40121-021-00525-4

FN KH, 2022. *Obecné informace neutralizační monoklonální protilát REGN-COV2: Neutralizační monoklonální protilátky REGN-COV2 proti viru SARS-CoV-2* [online]. In: . [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://www.fnhk.cz/pacient-a-jeho-blizci/koronavirus-covid-19/informace-pro-prakticke-lekare>

FNB: *Monoklonální protilátky proti SARS-CoV-2* [online], 2021. In: . [cit. 2022-02-14].
Dostupné z: <https://bulovka.cz/monoklonalni-protilatky-proti-sars-cov-2>

FNKV: *COVID monoklonální protilátky* [online], 2010-2022. In: . [cit. 2022-02-14].
Dostupné z: <https://www.fnkv.cz/odkaz-covid-monoklonalni-protilatky>

FURER, Victoria, Tali EVIATAR, Devy ZISMAN et al., 2021. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **80**(10), 1330-1338 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2021-220647

HAMPLOVÁ, Lidmila, 2019. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol. 2., aktualiz. vydání*. Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON, str. 64-70, 89-95. ISBN 978-80-7553-729-4.

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek SPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton.*, ISBN 978-80-7553-250-3.

HUSÁKOVÁ, Martina, 2015. *Conceptual modelling in computational immunology*. Řepín: Tomáš Bruckner. Academic series. ISBN 9788087924006.

CHAM, Jason, Amitabh PANDEY, Jacob NEW et al., 2022. 6 month serologic response to the Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine among healthcare workers. *PLOS ONE* [online]. **17**(4) [cit. 2022-04-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0266781

CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj MISBAH a Neil SNOWDEN, 2018. *Základy klinické imunologie. 6. vydání. Přeložil Vojtěch THON*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-396-8.

CHAPLIN, D, 2010. 1. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. **117**(2), 430-435 [cit. 2021-10-29]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2005.09.034

CHAREPE, Nadia, Juliana GONÇALVES, A. JULIANO, David LOPES, Helena CANHÃO, Helena SOARES a e SERRANO, 2021. COVID-19 mRNA vaccine and antibody response in lactating women: a prospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth* [online]. **21**(1) [cit. 2022-05-03]. ISSN 1471-2393. Dostupné z: doi:10.1186/s12884-021-04051-6

CHAUDHURY, Sidhartha, Jack HUTTER, Jessica BOLTON et al., 2021. Serological profiles of pan-coronavirus-specific responses in COVID-19 patients using a multiplexed electro-chemiluminescence-based testing platform. *PLOS ONE* [online]. **16**(6) [cit. 2022-05-02]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0252628

Chegg: Primary Immune Response, 2003-2021. In: <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/primary-immune-response-in-anatomy-and-physiology> [online]. [cit. 2021-11-22].

CHOE, Pyoeng, Jisu HONG, Jiyoung PARK et al., 2022. Persistent Antibody Responses Up to 18 Months After Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. [cit. 2022-04-07]. ISSN 0022-1899. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jiac099

JIANG, Ruiwei, Xiaowen DOU, Min LI, Enyun WANG, Jiwen HU, Dan XIONG a Xiuming ZHANG, 2022. Dynamic observation of SARS-CoV-2 IgM, IgG, and neutralizing antibodies in the development of population immunity through COVID-19 vaccination. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. **36**(4) [cit. 2022-05-03]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.24325

JIN, Yujiao, Miaochan WANG, Zhongbao ZUO et al., 2020. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. **94**, 49-52 [cit. 2022-02-02]. ISSN 12019712. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijid.2020.03.065

KAPLONEK, Paulina, Chuangqi WANG, Yannic BARTSCH et al., 2021. Early cross-coronavirus reactive signatures of humoral immunity against COVID-19. *Science Immunology* [online]. **6**(64) [cit. 2022-05-02]. ISSN 2470-9468. Dostupné z: doi:10.1126/sciimmunol.abj2901

KETAS, Thomas, Devidas CHATURBHUI, Victor CRUZ PORTILLO et al., 2021. Antibody Responses to SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Are Detectable in Saliva. *Pathogens and Immunity* [online]. **6**(1), 116-134 [cit. 2022-01-03]. ISSN 2469-2964. Dostupné z: doi:10.20411/pai.v6i1.441

KHOR, Seik-Soon, Yosuke OMAE, Junko TAKEUCHI et al., 2022. An Association Study of HLA with the Kinetics of SARS-CoV-2 Spike Specific IgG Antibody Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine. *Vaccines* [online]. **10**(4) [cit. 2022-05-02]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines10040563

KOZLÍK, Petr, 2020. *Přírodovědecká fakulta UK: Lecture 1 - Klinická a farmaceutická analýza* [online]. In: . Katedra analytické chemie [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Klinicka%20a%20farmaceuticka%20analyza>

KRÁTKÁ, Zuzana, Václav FEJT, Radek KUČERA, Tomáš FÜRST a Hana ZELENÁ, 2021. Protilátky po prodělané infekci poskytují dostatečnou a dlouhodobou ochranu proti onemocnění COVID-19. In: *Zdravotní ústav: se sídlem v Ostravě* [online]. [cit. 2022-02-16]. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Clanek/protilatky-po-prodelane-infekci-poskytuji-dostatecnou-a-dlouhodobou-ochranu-proti-onemocneni-covid-19>

KŘÍŽ, Jan, 2022. Jak fungují vakcíny proti Covid-19: Princip mRNA vakcín (Pfizer/BioNTech, Moderna). In: *VŠCHT v Praze* [online]. [cit. 2022-03-24].

LEVIN, Einav, Yaniv LUSTIG, Carmit COHEN et al., 2021. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *New England Journal of Medicine* [online]. **385**(24) [cit. 2022-02-15]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2114583

Linkos: Monoklonální protilátky [online]. In: . [cit. 2021-11-06]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/monoklonalni-protilatky/>

Logan Regional Medical Center: Monoclonal Antibody Infusion COVID-19 [online], 2021. In: . [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://www.loganregionalmedicalcenter.com/monoclonal-antibody-infusion-covid-19>

MAHALINGAM, Sundarasamy, John PETER, Ziyang XU, Devivasha BORDOLOI, Michelle HO, Vaniambadi KALYANARAMAN, Alagarsamy SRINIVASAN a Kar MUTHUMANI, 2021. Landscape of humoral immune responses against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 disease and the value of antibody testing. *Heliyon* [online]. 7(4) [cit. 2021-12-21]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06836

MARTINEK, Jan, 2011. *Některé možnosti imunoterapie nádorových onemocnění* [online]. České Budějovice [cit. 2022-02-05]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/gbggpu/1187787>. Bakalářská práce (Bc.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDEJOVICÍCH, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Jan ŽENKA, CSc.

Matriks Biotek: Seznam produktů SHIKARI® a CORONAHUNTER™ [online], 2020. [cit. 2022-02-06]. Dostupné z: <http://www.matriksbiotek.com/product.html>

MATYÁŠEK, Roman a Aleš KOVAŘÍK, 2020. Mutation Patterns of Human SARS-CoV-2 and Bat RaTG13 Coronavirus Genomes Are Strongly Biased Towards CU Transitions, Indicating Rapid Evolution in Their Hosts. *Genes* [online]. 11(7) [cit. 2021-12-25]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11070761

MELTER, Oto a Rute CASTELHANO, ed., 2019. *The MicroBook: clinical microbiology for medical students*. First edition. Prague: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 9788024638713.

MISHRA, Sanjay, 2020. How mRNA vaccines from Pfizer and Moderna work, why they're a breakthrough and why they need to be kept so cold. In: *The Conversation* [online]. [cit. 2022-02-24].

MZČR, 2021. Očkování proti onemocnění covid-19: NUVAXOVID (NOVAVAX) VAKCÍNA PROTI ONEMOCNĚNÍ COVID-19. In: *Informační leták: Zajímá vás více o vakcíně Nuvaxovid (Novavax)* [online]. [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/nuvaxovid-otazky-a-odpovedi-k-vaccine-od-spolecnosti-novavax>

MZČR: *Aktuálně o koronaviru* [online], 2022. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://koronavirus.mzcr.cz/>

MZČR: *Rozhodnutí o dočasném povolení distribuce, výdeje a používání léčivého přípravku LAGEVRIO* [online], 2021. In: . [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/rozhodnuti-o-docasnem-povoleni-distribuce-vydeje-a-pouzivani-leciveho-pripravku-lagevrio/>

NGUYEN, Nguyen, Manohar MUTNAL, Richard GOMEZ et al., 2020. Correlation of ELISA method with three other automated serological tests for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *PLOS ONE* [online]. **15**(10) [cit. 2022-04-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0240076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240076)

OSTRÝ, Svatopluk, Ondřej SOBEK, Aleš CHRDLÉ a Robert RUSINA, 2020. COVID-19 associated encephalopathy responding to treatment with intravenous immunoglobulins. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. **83**116(6), 640-642 [cit. 2021-12-25]. ISSN 12107859. Dostupné z: [doi:10.48095/ccsnn2020640](https://doi.org/10.48095/ccsnn2020640)

PATEL, Rikin, Mohamad KAKI, Venkat POTLURI, Payal KAHAR a Deepesh KHANNA, 2022. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. **18**(1) [cit. 2022-05-06]. ISSN 2164-5515. Dostupné z: [doi:10.1080/21645515.2021.2002083](https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083)

PILER, Pavel, Vojtěch THON, Lenka ANDRÝSKOVÁ et al., 2021. Dynamics of Seroconversion of Anti-Sars-Cov-2 Igg Antibodies in the Czech Unvaccinated Population: Nationwide Prospective Seroconversion (Proseco) Study. *SSRN Electronic Journal* [online]. [cit. 2022-04-12]. ISSN 1556-5068. Dostupné z: [doi:10.2139/ssrn.3902465](https://doi.org/10.2139/ssrn.3902465)

POLACK, Fernando, Stephen THOMAS, Nicholas KITCHIN et al., 2020. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine* [online]. **383**(27), 2603-2615 [cit. 2022-04-06]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: [doi:10.1056/NEJMoa2034577](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577)

POMPLUN, Sebastian, 2021. Targeting the SARS-CoV-2-spike protein: from antibodies to miniproteins and peptides. *RSC Medicinal Chemistry* [online]. **12**(2), 197-202 [cit. 2021-12-21]. ISSN 2632-8682. Dostupné z: [doi:10.1039/D0MD00385A](https://doi.org/10.1039/D0MD00385A)

RUBIN, Rita, 2021. COVID-19 Vaccines vs Variants—Determining How Much Immunity Is Enough. *JAMA* [online]. **325**(13) [cit. 2022-03-07]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2021.3370

RUGGIERO, Alessandra, Chiara PIUBELLI, Lucia CALCIANO et al., 2022. SARS-CoV-2 vaccination elicits unconventional IgM specific responses in naïve and previously COVID-19-infected individuals. *EBioMedicine* [online]. **77** [cit. 2022-04-02]. ISSN 23523964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2022.103888

SINGH, Harpal, Takahiro MORITA, Yuma SUZUKI, Masayuki SHIMOJIMA, An LE VAN, Masami SUGAMATA a Ming YANG, 2015. High sensitivity, high surface area Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Bio-Medical Materials and Engineering* [online]. **26**(3-4), 115-127 [cit. 2022-04-09]. ISSN 18783619. Dostupné z: doi:10.3233/BME-151561

SMETANA, Karel a Jan BRÁBEK, 2020. Role of Interleukin-6 in Lung Complications in Patients With COVID-19: Therapeutic Implications. *In Vivo* [online]. **34**(3), 1589-1592 [cit. 2021-12-25]. ISSN 0258-851X. Dostupné z: doi:10.21873/invivo.11947

SONODA, Eiichiro, Yasumichi HITOSHI, Naoto YAMAGUCHI, Takehisa ISHII, Akira TOMINAGA, Shukuro ARAKI a Kiyoshi TAKATSU, 1992. Differential regulation of IgA production by TGF- β and IL-5: TGF- β induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cellular Immunology* [online]. **140**(1), 158-172 [cit. 2021-11-19]. ISSN 00088749. Dostupné z: doi:10.1016/0008-8749(92)90184-Q

Stratech: Research Solutions for Coronavirus – Sino Biological, 2021. In: : *Gene* [online]. [cit. 2021-12-21]. Dostupné z: https://www.stratech.co.uk/sino_biological/research-solutions-for-coronavirus-2/

SÚKL, 2021. *Vakcíny proti COVID-19* [online]. In: . [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/vakciny-proti-covid-19>

SÚKL: Léčba COVID-19: EMA hodnotí data k možnosti použití několika monoklonálních protilátek [online], 2021. In: . [cit. 2022-02-13]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/lecba-covid-19-ema-hodnoti-data-k-moznosti-pouziti-nekolika>

SZÚ: COVID-19: Zařazení koronavirů – taxonomie – klasifikace, 2021. In: *Nzip.cz* [online]. [cit. 2022-02-05]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/447-covid-19-zakladni-informace>

SZÚ: *Doporučený postup pro použití rekonvalescentní plazmy v léčbě dospělých pacientů s COVID-19* [online], 2020. In: . [cit. 2021-12-25]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/Darci_transplantace/Rekonvalescentni_plasma_u_Covid_19_doporuceny_postup.pdf

SZÚ: *Koronaviry - přehled* [online], 2020. In: . Centrum epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ [cit. 2021-12-21]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/koronaviry-prehled-1>

ŠINDELKOVÁ, Martina, 2020. Přehled vakcín proti COVID-19: mechanismy účinku, výhody a nevýhody. In: *Medicínské centrum Praha* [online]. Praha [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://www.mc-praha.cz/mcp/prehled-vakcin-proti-covid-19-mechanismy-ucinku-vyhody-a-nevyhody/>

ŠTĚPÁNEK, Ladislav, Magdaléna JANOŠÍKOVÁ, Lubomír ŠTĚPÁNEK, Marie NAKLÁDALOVÁ a Alena BORIKOVÁ, 2022. The kinetics and predictors of anti-SARS-CoV-2 antibodies up to 8 months after symptomatic COVID-19: A Czech cross-sectional study. *Journal of Medical Virology* [online]. [cit. 2022-05-01]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: [doi:10.1002/jmv.27784](https://doi.org/10.1002/jmv.27784)

VAILLANT, Angel, Zohaib JAMAL a Kamleshun RAMPHUL, 2021. *Imunoglobulin*. StatPearls Publishing LLC. PMID: 30035936.

Vakciny.net: Genetické mRNA vakcíny proti COVID-19 [online], 2021. In: . [cit. 2021-12-26]. Dostupné z: https://www.vakciny.net/geneticke-mRNA-vakciny-proti-COVID-19#chapter18_public

VALENZUELA, Nicole, Michelle HICKEY a Elaine REED, 2016. Antibody Subclass Repertoire and Graft Outcome Following Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 7 [cit. 2021-11-10]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2016.00433](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00433)

WANG, Zijun, Fabian SCHMIDT, Yiska WEISBLUM et al., 2021. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* [online]. **592**(7855), 616-622 [cit. 2022-04-02]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03324-6

WHO director: General's opening remarks at the media briefing on COVID19 [online], 2020. [cit. 2022-02-08]. Dostupné z: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---18-august-2020>

WU, Fan, Su ZHAO, Bin YU et al., 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* [online]. **579**(7798), 265-269 [cit. 2021-12-21]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2008-3

YANG, Su, Adiratna MAT RIPEN, Chin LEONG et al., 2021. COVID-19 breakthrough infections and humoral immune response among BNT162b2 vaccinated healthcare workers in Malaysia. *Emerging Microbes & Infections* [online]. **11**(1), 1262-1271 [cit. 2022-03-01]. ISSN 2222-1751. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2022.2065936

YI, Changhua, Yongxiang YI a Junwei LI, 2020. mRNA Vaccines: Possible Tools to Combat SARS-CoV-2. *Virologica Sinica* [online]. **35**(3), 259-262 [cit. 2021-12-26]. ISSN 1674-0769. Dostupné z: doi:10.1007/s12250-020-00243-0

ZINKERNAGEL, Rolf M., 2003. On Natural and Artificial Vaccinations. *Annual Review of Immunology* [online]. **21**(1), 515-546 [cit. 2021-10-29]. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141045

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vrozená a adaptivní imunitní reakce (Dranoff, 2004)	14
Obrázek 2 Struktura imunoglobulinu (Antibody Basics)	16
Obrázek 3 Přehled jednotlivých tříd imunoglobulinů (Encyclopedia Britannica).....	17
Obrázek 4 Aktivace B lymfocytů (Don, 2018).....	19
Obrázek 5 Fáze protilátkové reakce (Chegg, 2003-2021).....	21
Obrázek 6 Aktivace komplementu klasickou cestou (protilátkami) (Don, 2021).....	22
Obrázek 7 Transcytóza (Hořejší, 2017)	23
Obrázek 8 Aktivace žírné buňky pomocí alergenu (Bax, 2012)	24
Obrázek 9 Časová osa dynamiky přirozené a adaptivní imunitní odpovědi na virovou infekci (Chapel, 2018).....	26
Obrázek 10 Schématické znázornění viru SARS-CoV-2 (Amawi, 2020)	29
Obrázek 11 Znázornění vazby spikového proteinu na receptor ACE2 (Stratech, 2021)..	30
Obrázek 12 Princip mRNA vakcíny Pfizer-BioNTech a Moderna (Kříž, 2022).....	36
Obrázek 13 Zneškodnění buněk infikovaných virem SARS-CoV-2 (Kříž, 2022)	37
Obrázek 14 Schéma sendvičového uspořádání metody ELISA (ELISA, 2020).....	39
Obrázek 15 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení protilátek třídy IgG (vlastní zdroj).....	43
Obrázek 16 Schéma mikrotitrační destičky při stanovení protilátek třídy IgM (vlastní zdroj).....	44
Obrázek 17 Změna koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgM mezi jednotlivými odběry po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny Comirnaty (vlastní zdroj).....	48

Obrázek 18 Změna koncentrace protilátek specifických proti spikovému proteinu SARS-CoV-2 ve třídě IgG mezi jednotlivými odběry po ukončeném očkování 2. dávkou mRNA vakcíny Comirnaty (vlastní zdroj)..... 52

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Složky vrozené a adaptivní imunity (Chapel, 2018).....	12
Tabulka 2 Koncentrace imunoglobulinů v séru zdravých dospělých (Hořejší, 2017)	20
Tabulka 3 Složení mRNA vakcín proti COVID-19 (Vakciny.net, 2021).....	35
Tabulka 4 Soupravy CORONAHUNTER™ ELISA (Matriks Biotek, 2020)	40
Tabulka 5 Koncentrace standardů pro stanovení protilátek IgG a IgM (Matriks Biotek, 2020).....	41
Tabulka 6 Procentuální rozdělení koncentrací specifických protilátek proti spikovému proteinu ve třídě IgM na základě detekčního limitu (vlastní zdroj)	47
Tabulka 7 Přehled vypočítaných parametrů u pozitivních výsledků anti-SARS-CoV-2 S1 IgM (vlastní zdroj)	48
Tabulka 8 Závislost hladiny IgM na prediktorech (vlastní zdroj).....	49
Tabulka 9 Procentuální rozdělení koncentrací specifických protilátek proti spikovému proteinu ve třídě IgG na základě detekčního limitu (vlastní zdroj)	51
Tabulka 10 Přehled vypočítaných parametrů u pozitivních výsledků anti-SARS-CoV-2 S1 IgG (vlastní zdroj)	52
Tabulka 11 Závislost hladiny IgG na prediktorech (vlastní zdroj)	53

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Výchozí data koncentrací izotypu protilátek IgM

IgM							
1. odběr	Hodnocení	2. odběr	Hodnocení	3. odběr	Hodnocení	4. odběr	Hodnocení
7232	Pozitivní	11084	Pozitivní	5976	Pozitivní	5428	Pozitivní
6044	Pozitivní	10506	Pozitivní	5740	Pozitivní	5192	Pozitivní
5956	Pozitivní	8930	Pozitivní	5248	Pozitivní	4650	Pozitivní
5632	Pozitivní	8636	Pozitivní	5184	Pozitivní	3946	Pozitivní
5588	Pozitivní	7232	Pozitivní	4658	Pozitivní	3382	Pozitivní
5558	Pozitivní	6952	Pozitivní	4306	Pozitivní	3070	Pozitivní
5370	Pozitivní	6860	Pozitivní	3900	Pozitivní	3026	Pozitivní
5196	Pozitivní	6268	Pozitivní	3870	Pozitivní	2564	Pozitivní
5082	Pozitivní	6254	Pozitivní	3606	Pozitivní	2366	Pozitivní
4926	Pozitivní	5866	Pozitivní	3448	Pozitivní	2134	Pozitivní
4868	Pozitivní	5326	Pozitivní	3314	Pozitivní	2054	Pozitivní
4798	Pozitivní	5010	Pozitivní	3180	Pozitivní	1916	Pozitivní
4784	Pozitivní	4868	Pozitivní	3070	Pozitivní	1909	Pozitivní
4672	Pozitivní	4868	Pozitivní	3040	Pozitivní	1610	Pozitivní
4448	Pozitivní	4826	Pozitivní	2930	Pozitivní	1536	Pozitivní
4268	Pozitivní	4770	Pozitivní	2820	Pozitivní	1492	Šedá zóna
4090	Pozitivní	4672	Pozitivní	2798	Pozitivní	1478	Šedá zóna
4062	Pozitivní	4504	Pozitivní	2776	Pozitivní	1470	Šedá zóna
3940	Pozitivní	4254	Pozitivní	2528	Pozitivní	1456	Šedá zóna
3858	Pozitivní	4240	Pozitivní	2520	Pozitivní	1397	Šedá zóna
3818	Pozitivní	4062	Pozitivní	2338	Pozitivní	1315	Šedá zóna
3550	Pozitivní	3968	Pozitivní	2272	Pozitivní	1256	Šedá zóna
3524	Pozitivní	3846	Pozitivní	2258	Pozitivní	1256	Šedá zóna
3314	Pozitivní	3846	Pozitivní	2258	Pozitivní	1189	Šedá zóna
3144	Pozitivní	3590	Pozitivní	2250	Pozitivní	1174	Šedá zóna
2860	Pozitivní	3418	Pozitivní	2236	Pozitivní	1062	Šedá zóna
2846	Pozitivní	3418	Pozitivní	2206	Pozitivní	1032	Šedá zóna
2796	Pozitivní	3326	Pozitivní	2170	Pozitivní	1009	Šedá zóna
2618	Pozitivní	3274	Pozitivní	2148	Pozitivní	0	Negativní
2594	Pozitivní	3234	Pozitivní	2098	Pozitivní	0	Negativní
2568	Pozitivní	3182	Pozitivní	2018	Pozitivní	0	Negativní
2556	Pozitivní	3170	Pozitivní	2010	Pozitivní	0	Negativní
2444	Pozitivní	2886	Pozitivní	1872	Pozitivní	0	Negativní
2382	Pozitivní	2860	Pozitivní	1843	Pozitivní	0	Negativní
2332	Pozitivní	2770	Pozitivní	1705	Pozitivní		
2332	Pozitivní	2556	Pozitivní	1646	Pozitivní		
2220	Pozitivní	2468	Pozitivní	1632	Pozitivní		
2208	Pozitivní	2382	Pozitivní	1566	Pozitivní		
2136	Pozitivní	2014	Pozitivní	1551	Pozitivní		
2136	Pozitivní	0	Negativní	1434	Šedá zóna		
2026	Pozitivní	0	Negativní	1397	Šedá zóna		
1989	Pozitivní	0	Negativní	1352	Šedá zóna		
1977	Pozitivní			1345	Šedá zóna		
0	Negativní			1286	Šedá zóna		
0	Negativní			1278	Šedá zóna		
0	Negativní			1197	Šedá zóna		
				1047	Šedá zóna		
				1009	Šedá zóna		
				994	Šedá zóna		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		

Příloha 2: Výchozí data koncentrací izotypu protilátek IgG

IgG							
1. odběr	Hodnocení	2. odběr	Hodnocení	3. odběr	Hodnocení	4. odběr	Hodnocení
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	25290	Pozitivní	24740	Pozitivní
20000	Pozitivní	22210	Pozitivní	22650	Pozitivní	20000	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	16120	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	13300	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	12450	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	8639	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	8088	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	17580	Pozitivní	6802	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	16760	Pozitivní	6479	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	16260	Pozitivní	5869	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	15320	Pozitivní	5680	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	14870	Pozitivní	4904	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	12400	Pozitivní	3233	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	10630	Pozitivní	3123	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	10370	Pozitivní	2673	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	6716	Pozitivní	2159	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	6301	Pozitivní	2145	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	6154	Pozitivní	1829	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	5436	Pozitivní	1607	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	5312	Pozitivní	1545	Pozitivní
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	4771	Pozitivní	1467	Šedá zóna
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	4674	Pozitivní	1173	Šedá zóna
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	3798	Pozitivní	1145	Šedá zóna
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	3714	Pozitivní	1107	Šedá zóna
20000	Pozitivní	20000	Pozitivní	3380	Pozitivní	0	Negativní
18570	Pozitivní	20000	Pozitivní	3216	Pozitivní	0	Negativní
17170	Pozitivní	20000	Pozitivní	2573	Pozitivní	0	Negativní
17060	Pozitivní	20000	Pozitivní	2535	Pozitivní	0	Negativní
14790	Pozitivní	20000	Pozitivní	2528	Pozitivní	0	Negativní
14160	Pozitivní	19750	Pozitivní	2468	Pozitivní	0	Negativní
13980	Pozitivní	17500	Pozitivní	2351	Pozitivní	0	Negativní
13900	Pozitivní	16640	Pozitivní	2300	Pozitivní	0	Negativní
13440	Pozitivní	13770	Pozitivní	2083	Pozitivní	0	Negativní
12930	Pozitivní	12790	Pozitivní	2035	Pozitivní		
12110	Pozitivní	11140	Pozitivní	2035	Pozitivní		
9996	Pozitivní	7078	Pozitivní	1515	Pozitivní		
9142	Pozitivní	6339	Pozitivní	1349	Šedá zóna		
7643	Pozitivní	6170	Pozitivní	1308	Šedá zóna		
7246	Pozitivní	6026	Pozitivní	1291	Šedá zóna		
6559	Pozitivní	4385	Pozitivní	1101	Šedá zóna		
6331	Pozitivní	3086	Pozitivní	978	Šedá zóna		
5455	Pozitivní			973	Šedá zóna		
4945	Pozitivní			0	Negativní		
3734	Pozitivní			0	Negativní		
3450	Pozitivní			0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		
				0	Negativní		