

## Šíření infekčních agens – detekce positivity metodou ELISA - NEW

### Teoretický úvod

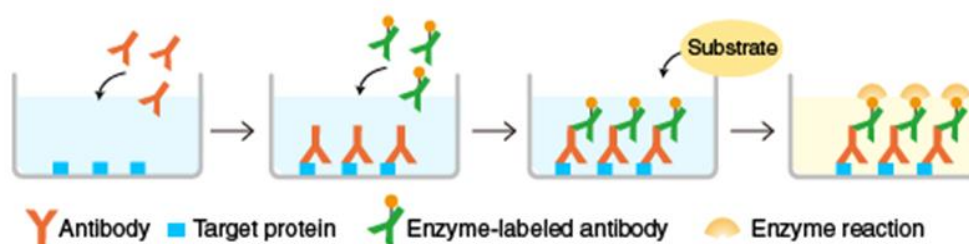
Úloha simuluje způsob a variabilitu šíření infekčních agens v populaci a výsledkem vyhodnocení testu je určení pravděpodobného původce infekčního onemocnění. Simulace šíření daného agens je prováděna vždy ve skupině 12 studentů, z nichž pouze jeden vzorek je nativní tj. pozitivní. Souprava ELISA-Immuno Explorer je určena pro didaktické účely. Umožňuje stanovení antigenů a protilátek v neznámých vzorcích a přibližné koncentrace agens ve vzorcích. Tento test umožňuje semikvantitativní analýzu – tedy určení přibližného obsahu antigenu (v případě manuálního vyhodnocení) nebo jeho kvantitativní stanovení (použitím fotometrického stanovení absorbance). Pro kvantitativní stanovení obsahu antigenu ve vzorku, připraví studenti dle návodu kalibrační řadu a výslednou křivku zpracují matematicky a určí slope. Zároveň odečtou z tohoto grafu hodnoty koncentrace antigenu ve vzorku. Úloha zároveň slouží jako demonstrace imunoanalytického stanovení látky na principu přímé kompetice analytu s detekční afinitní molekulou. V návodu jsou popsány jednotlivé kroky stanovení, doplněné praktickou ukázkou testu.

## Princip testu

ELISA-Immuno Explorer je imunoanalytický test na pevné fázi na principu přímé kompetice. Na povrch jamek mikrotitrační destičky je již navázaný antigen, který v této soupravě kompetuje („soupeří“) s volnou protilátkou ve vzorku o vazebné místo. Nadbytek protilátky je při následném promytí jamek pomocí promývacího roztoku odstraněn. Množství zachycené protilátky je přímo úměrné koncentraci neznámého agens ve vzorku. Aby bylo možné určit množství zachyceného agens, je tento spojen (konjugován) s enzymem HRP peroxidázou. Tento enzym reakcí s chromogenním substrátem proměňuje barvu roztoku substrátu z čiré na modrou, a to v intenzitě závislé na množství přítomného komplexu HRP peroxidázy v jamce. (Obr. 1)

Promývání: Mezi jednotlivými kroky testu je potřeba odstranit z jamek nenavázané komplexy. Pokud by nedošlo k promytí jamek, na konci testu by došlo k zabarvení jamek i bez přítomnosti hledaných látek.

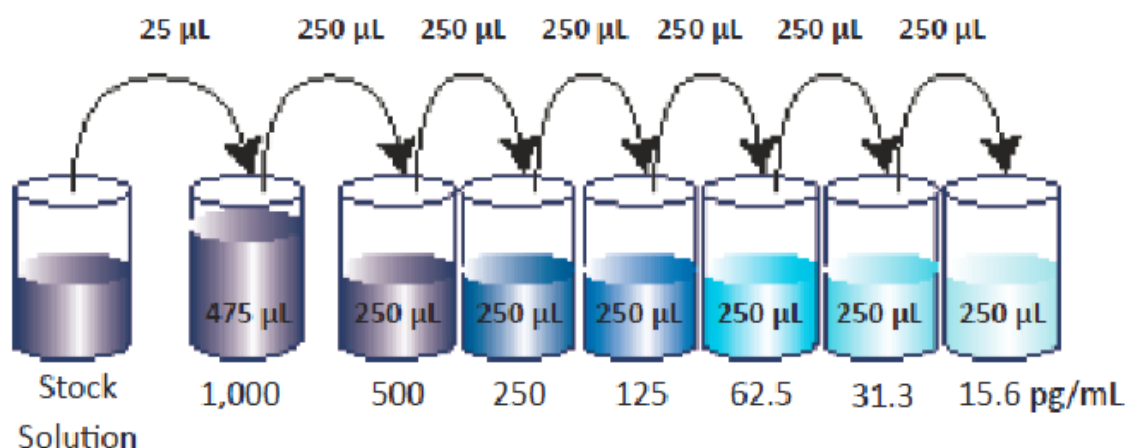
Substrátový roztok: Roztok na bázi barviva tetramethylbenzidin (TMB) s obsahem peroxidu vodíku. Díky enzymu (v tomto testu peroxidáza obsažená v konjugátu) dojde v substrátu ke katalytické reakci a postupně změní zbarvení roztoku do modra. Pokud v jamkách není navázaný peroxidázový konjugát, nedojde k aktivaci substrátu a jamky zůstanou bez zabarvení.



<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

Obr. 1 Metoda ELISA-nepřímá

Příprava kalibrační řady: Souprava obsahuje 1 standard – student sám připraví kalibrační řadu (viz obr.2 dle dvojkového ředění), dle které stanoví přibližný obsahu cizorodého agens ve vzorcích. Rozsah citlivosti je 1 až 1000 ng/ml.

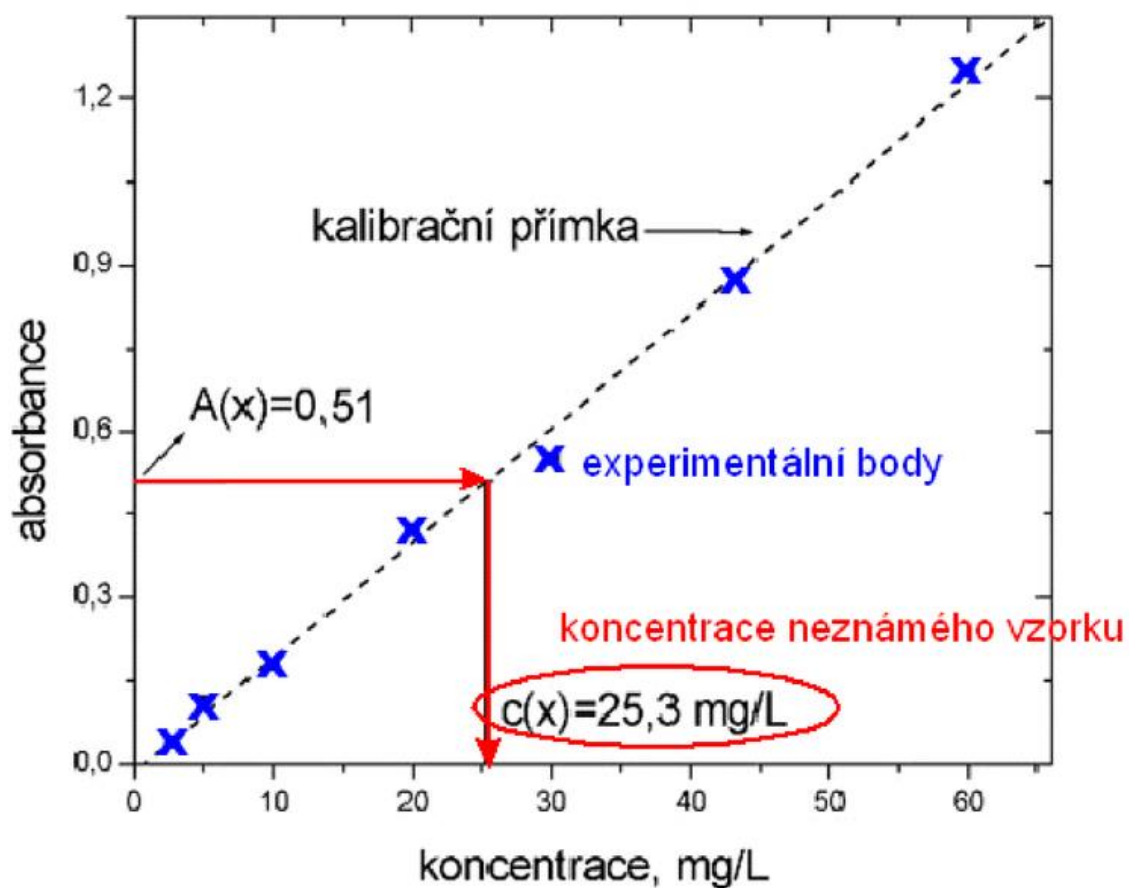


Obr.2 Dvojkové ředění zásobního roztoku(stock solution)

Použití: Výslednou koncentraci vzorku lze hodnotit pomocí speciálního laboratorního vybavení – ELISA reader/spektrofotometr.

Kalibrace: Student z naměřených hodnot absorbance a daných hodnot koncentrace vytvoří kalibrační křivku(viz. Graf 1)

Graf 1 Kalibrační křivka, <https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/2526>



## Reagencie:

ELISA stripy (12 jamek) potažené polymerem STRIPS

Sada reagensů obsahující:

testovaný vzorek – neznámý (0,75 ml)

pozitivní kontrola (antigen, 0,50 ml),

negativní kontrola (PBS 0,50 ml)

primární protilátku 1,5 ml (obsahuje anti –rabbit polyklonální protilátku)

sekundární protilátku s HRP (horseradish peroxidasa) enzymem (1,5 ml)

konjugát TMB chromogenní substrát (tetramethylbenzidin), r.t.u., (1,5 ml)

promývací roztok, cca 60 ml. (WASH pufr)

PBS (fosfátový pufr) r.t.u.

zásobní roztok antigenu (stock solution  $c = 1000 \text{ ng/ml}$ )

pozn.: \* r.t.u. – „ready to use“ (připraveno k použití), složka je v pracovní koncentraci a nevyžaduje další ředění

## Přístroje:

ELISA reader: SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader Unit2 - AV

### Pomůcky:

destilovaná voda pro ředění promývacího roztoku (lze použít i obyčejnou vodu, ta však může v závislosti na kvalitě slabě zabarvit pozadí reakce)

odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku

mikropipety

skleněné pipety

Pasteurovy pipety 1 ml se stupnicí členěnou po 0,25 ml 10 ks

mikrozkumavky

pipetovací špičky

kádinka nebo vanička s vodou

odpadní nádoba

zkumavky eppendorf

gáza/filtrační papír/buničitá vata na osušení stripů po promývání

hodinky/stopky na měření inkubačních časů,

popisovač

## Pracovní postup:

### 1. Příprava pufrů

1.1. Vyndejte složky soupravy na stůl a nechte je přizpůsobit laboratorní teplotě (cca 10 minut). Stripy s jamkami vyjměte ze sáčku až po vytemperování na laboratorní teplotu, aby nedošlo k orosení jamek. Všechny složky důkladně promíchejte několikanásobným otočením lahviček. Pokud provádíte test na barevném stole, je vhodné podložit si stripy bílým papírem pro lepší přehled při kapání do jamek a posouzení barvy v jamkách.

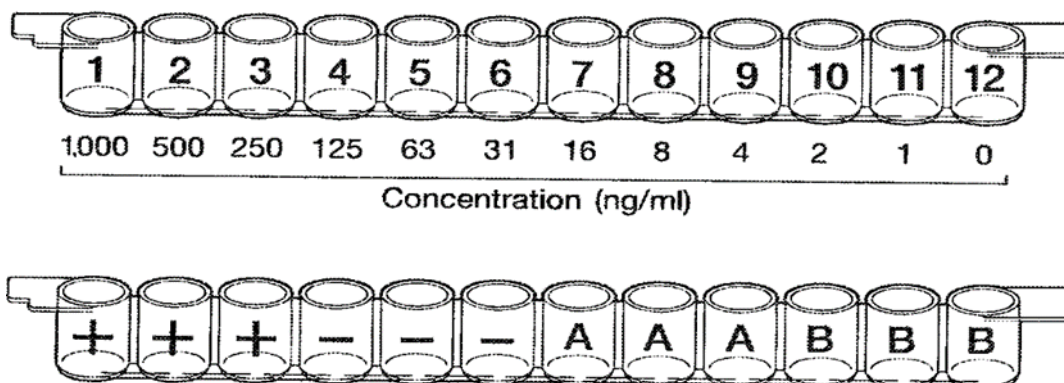
1.2. Připravte pracovní koncentraci promývacího roztoku jeho naředěním 10x ve vhodném objemu vody pomocí odměrného válce (60 ml promývacího roztoku + 540 ml H<sub>2</sub>O). Použitý postup přípravy promývacího roztoku zaznamenejte do protokolu. Promývací roztok přelijte do vhodné kádinky/vaničky, aby se dal při promývání snadno nasávat kapátkem. Nespotřebovaný promývací roztok naředěný na pracovní koncentraci lze skladovat maximálně 2 týdny při teplotě +2 až +10 °C. V případě, že se naředěný promývací roztok skladováním zakalí nebo v něm vznikne sediment, dál ho nepoužívejte a zlikvidujte ho.

## 2. Šíření infekčního agens, detekce antigenu:

### 2.1. Příprava kalibrační řady 1. strip

Do protokolu si připravte rozpis vzorků. Dva stripy dle obr3.

#### Stripč.1:



#### Strip č.2:

Obr.3 Rozpis vzorků ve stripu č.1 a 2

Jako negativní kontrolu (-) použijte PBS. Jako pozitivní (+) – roztok antigenu. Vzorky je vhodné přidat v tripletech – 3 jamky. Tři jamky se používají pro minimalizování laboratorní chyby. Doporučený způsob ředění pro kalibrační řadu je uveden ve schématu aplikace vzorků ( viz Obr.2)

### 2.2. Provedte simulaci šíření infekčního onemocnění v populaci:

2.2.1. Celý obsah vašeho vzorku séra pomocí Pasteurovi pipety přeneste kvantitativně do eppendorfky se vzorkem jiného studenta.

2.2.2. Promýchejte a přeneste zpět 500  $\mu$ l vzorku

2.2.3. Zopakujte ještě 1x s jiným studentem, vzniklé směsné sérum označte jako váš vzorek (např.A)



## 2.3. Příprava 1. a 2. stripu pro detekci antigenu

2.3.1. Nakapejte 2 kapky (50  $\mu$ l) standardů a vzorků do jamek podle rozpisu. (viz. Obr 3):

3 jamky s pozitivní kontrolou(+), 3 s negativní kontrolou(-) a dále 3 jamky neznámého studentského vzorku. (student A a B)

Po každém vzorku pipetu důkladně propláchněte vodou popřípadě vyměňte za čistou. Pozor!!! Pipetou se nedotýkejte stěn nebo dna jamek, aby nedošlo k porušení navázané vrstvy! Stopujte 5 minut.

2.3.2. Obsah jamek vylijte na papírové ubrousky a opatrně poklepejte otočeným stripem dnem vzhůru. Promytí: Všechny jamky naplňte (ne po okraj) Wash pufrem a znovu vylijte. Toto promytí zopakujte ještě 1x.

### **POZOR!!!**

Vyvarujte se přetékání roztoku ven z jamek. Poté opět vyklepněte promývací roztok z jamek. Celkem proveďte promytí 2x a na konci vyklepněte promývací roztok, aby jamky zůstaly před dalším krokem prázdné. Kapky na povrchu stripu můžete otřít poklepáním o kousek gázy nebo filtračního papíru.

2.3.3. Nakapejte 50  $\mu$ l primární protilátky do všech jamek. Stopuj 5 minut, vyprázdní jamky a znovu proveď promytí 2x viz. bod 2.2.2.

2.3.4. Přenes (50  $\mu$ l) sekundární protilátky do všech jamek. Stopuj 5 minut, vyprázdní všechny jamky a znovu opakuj promytí (bod 2.2.2.) 3x.

2.3.5. Nakapej 100  $\mu$ l chromogensubstrátového roztoku TMB (SUB) po 3 kapkách (0,1 ml TMB/jamka). Stopujte čas od přidání substrátu do první

jamky. Inkubujte 5 minut ( $\pm 1$  min.) při laboratorní teplotě. V jamkách s nízkou koncentrací by mělo se objevit slabě modré zbarvení.

2.3.6. Zkontrolujte výsledné zbarvení jamek. V jamkách s kalibračními standardy byste měli pozorovat snižování intenzity zbarvení v závislosti na koncentraci antigenu. Ve vzorku standardu 1000 ng/ml (nejvyšší koncentrace antigenu) by mělo dojít k maximálnímu modrému zbarvení. Podle schématu přiřadte jednotlivým standardům odpovídající hodnotu koncentrace (intenzivně zbarvené až nezbarvené). Srovnáním intenzity zbarvení standardů a vzorků přiřadte taktéž hodnocení jednotlivým vzorkům.

2.3.7. Provedte měření koncentrace v jamkách stripu, jak kalibrační řady, tak vašeho vzorku o neznámé koncentraci. Měření provádějte metodou End-point při  $\lambda = 650\text{nm}$  v přístroji ELISA reader. Výsledné hodnoty absorbance zanepte do tabulky:

Koncentrace antigenu <i>ng/ml</i>	Absorbance <i>nm</i>

2.3.8. Sestrojte kalibrační křivku závislosti koncentrace antigenu na absorbanci. (koncentraci uvádějte v ng/ml)

Postupujte podle návodu v Grafu 1

### Hodnocení testu:

A/ Vzorky antigenu po procesu šíření infekčního agens:

- zapiš pozitivitu nebo negativitu svého vzorku
- zakresli kalibrační křivku závislosti koncentrace na absorbanci ( viz graf č.1)
- odečet hodnot – odečti koncentraci směsných vzorků pomocí kalibrační křivky.

B/ Výsledky zapiš:

Koncentrace antigenu ve směsném vzorku séra je:

Původcem infekčního agens je student:

### Kontrolní otázky:

- Jaký je význam průkazu antigenu infekčního agens ve vztahu k pacientovi a proč se zjišťuje původce onemocnění?
- Proč je nutné používat jak primární tak sekundární protilátku?
- Jakou má funkci enzym v této reakci?