

IMUNOLOGIJA V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI: DOLOČANJE ANTIMIKROBNIH PROTITELES S POMOČJO ENCIMSKOIMUNSKEGA TESTA (ELISA)

1. OSNOVE ENCIMSKOIMUNSKEGA TESTA

Encimskoimunski test, encimski imunski test ali ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je biokemijska metoda, ki se uporablja v imunologiji za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu ter predstavlja eno izmed najbolj občutljivih in specifičnih imunskih testov za kvantitativno določanje antigenov ali protiteles. Temelji na specifični interakciji antigen – protitelo. Poznamo številne izvedbe testov ELISA, ki jih lahko glede na osnovni način izvedbe ločimo na kompetitivne in nekompetitivne, oziroma glede na uporabljeno tehniko v eno izmed naslednjih treh skupin:

- Neposredna ELISA (angl. *Direct ELISA*),
- Posredna ELISA (angl. *Indirect ELISA*)
- Sendvič ELISA (angl. *Sandwich ELISA*)

Če želimo v vzorcu določiti specifična protitelesa, običajno uporabimo posredni test ELISA, če pa želimo določiti prisotnost antigena v nekem vzorcu, uporabimo sendvič test ELISA. V primeru, da so specifična primarna protitelesa že konjugirana z encimom, govorimo o neposrednem (sendvič) testu ELISA.

Neposredna ELISA

Najenostavnejša je neposredna tehnika, kjer v vdolbinice mikrotitrne ploščice v prvi stopnji vežemo antigen, nato pa dodamo za antigen specifična in z encimom konjugirana protitelesa. Ob dodatku encimskega substrata se razvije barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično.

Posredna ELISA

Pri posrednem testu ELISA so vdolbinice mikrotitrne ploščice prekrivane z antigenom. V vdolbinice nanese vzorce, v katerih določamo prisotnost specifičnih protiteles. Na antigen vezana primarna protitelesa nato dokazujemo z dodatkom sekundarnih z encimom označenih protiteles, specifičnih za konstantno regijo primarnih protiteles. Ob dodatku encimskega substrata se razvije barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično.

Sendvič ELISA

Pri sendvič testu ELISA največkrat uporabljamo dve različni monoklonski protitelesi razreda IgG, specifični za antigen, ki prepoznata dva različna epitopa – antigenski determinanti na antigenu. Prvo protitelo (lovilno) je vezano neposredno na mikrotitrsko ploščico, drugo (detekcijsko) protitelo pa uporabimo za določanje prisotnosti antigena v vzorcu. Sendvič test lahko izvajamo tako s posredno kot tudi z neposredno tehniko. Če je detekcijsko protitelo neposredno encimsko označeno, govorimo o neposrednem sendvič testu. V kolikor uporabimo še sekundarna encimsko označena protitelesa, ki specifično prepoznavajo detekcijsko protitelo, pa govorimo o posrednem sendvič testu ELISA.

2. DOLOČANJE PROTITELES PROTI DAVIČNEMU TOKSINU

1. Razdelitev dela

Delo poteka v skupinah po štirje na eno ploščico. Vsak študent zase v triplikatu nanese v svoje vdolbinice 5 standardnih raztopin/kalibratorjev ter 2 vzorca – glejte shemo pipetiranja.

2. Reagenti in pribor:

- Komplet MASTAZYME™ DIPHTHERIA (MAST)
- Pipete
- Čitalec mikrotitrskih plščic (Fotometer s filtrom 450 nm)

Komplet MASTAZYME™ DIPHTHERIA (MAST) vsebuje:

- 12 mikrotitrskih trakov - vdolbinice so prekrivane s prečiščenim toksinom *Corynebacterium diphtheriae*
- 1 x okvir za mikrotitrsko ploščico
- 4 x 2 mL kalibratorjev 1-5 - humani serum s protitelesi proti davičnemu toksinu (koncentracije so navedene spodaj) razredčen v PBS.
Konzervansa: 0.01% metilizotiazolon in 0.01% bromnitrodioksan

		IgG
Cal. 1	Koncentracija (U/mL)	0
Cal. 2		0,01
Cal. 3		0,1
Cal. 4		0,5
Cal. 5		1,0

- 1 x 60 mL pufra za redčenje seruma – pufer PBS/BSA, ki vsebuje < 0,1% natrijevega azida (konzervans)
- 1 x 12 mL raztopina konjugiranega encima – s HRP označeni kozji anti-humani-IgG
- 1 x 12 mL substrata TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
- 1 x 12 mL raztopine za ustavitev reakcije – 0,5 M žveplova kislina
- 1 x 60 mL pufra za spiranje (10x koncentriran) – pufer PBS/Tween, ki ga je potrebno pred uporabo redčiti v razmerju 1:10
- 2 x folija za pokrivanje ploščice – za pokrivanje ploščice med inkubacijo
- 1 x plastična vrečka – za shranjevanje neuporabljenih trakov

3. Priprava vzorca in reagentov

Vzorec:

Uporabimo lahko serum ali plazmo (v epruveti z EDTA ali heparinom). Vzorce lahko pri temperaturi 2 – 8 °C hranimo do 3 dni. Pred analizo serum razredčimo v razmerju 1:101 (npr. 5 µL seruma + 500 µL pufra za redčenje seruma).

Reagenti

Pufer za spiranje ploščice: če so v steklenici prisotni kristali, jih raztopite (segrejte na 37°C in dobro premešajte). Nato ga v razmerju 1:10 razredčite z destilirano vodo in dobro premešajte.

4. Postopek

- V ustrezne vdolbinice mikrotitrne ploščice pipetirajte po 100 μ L razredčenih vzorcev (1:101) in kalibratorjev.
- Ploščico prekrijte s priloženo folijo ter inkubirajte 60 minut pri sobni temperaturi.
- Ploščico 3x sperite s pufrom za spiranje. Navzdol obrnjeno ploščico nekajkrat udarite po papirnati brisači, da odstranite preostali pufer v vdolbinicah.
- V vdolbinice pipetirajte po 100 μ L raztopine protiteles, konjugiranih s HRP. Ploščico inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi.
- Ploščico ponovno 3x sperite s 300 μ L spiralnega pufera. Enako kot prej navzdol obrnjeno ploščico nekajkrat udarite po papirnati brisači, da odstranite preostali pufer v vdolbinicah.
- V vsako vdolbinico dodajte 100 μ L substrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin).
- Ploščico pokrijte s folijo in inkubirajte 20 minut v temnem prostoru pri sobni temperaturi.
- Po 20 minutah dodajte 100 μ L raztopine za ustavitev reakcije ('stopping solution')
- Intenzivnost barvne reakcije izmerimo pri 450 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic (referenčni filter 600-690 nm).

Shema pipetiranja:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SL	SL	SL									
B	C1	C1	C1									
C	C2	C2	C2									
D	C3	C3	C3									
E	C4	C4	C4									
F	C5	C5	C5									
G	VZ1	VZ1	VZ1									
H	VZ2	VZ2	VZ2									

Poročilo vaje:

1. Narišite umeritveno krivuljo ter odčitajte dobljene vrednosti vzorcev.
2. Izračunajte znotraj analizo napako.
3. Izračunajte medanalizo napako znotraj iste ploščice.
4. Komentirajte dobljene vrednosti.

3. DOLOČANJE PROTITELES PROTI HELICOBACTER PYLORI

2. Razdelitev dela

Delo poteka v skupinah po štirje na eno ploščico. Vsak študent zase v triplikatu nanese v svoje vdolbinice 4 standardne raztopine/kalibratorje ter 3 vzorce – glejte shemo pipetiranja.

3. Reagenti in pribor:

- Komplet MASTAZYME™ HELICOBACTER (MAST)
- Pipete
- Čitalec mikrotitrskih plščic (Fotometer s filtrom 450 nm)

Komplet MASTAZYME™ HELICOBACTER (MAST) vsebuje:

- 12 mikrotitrskih trakov - vdolbinice so prekrte s prečiščenim antigenom Helicobacter pylori
- 1 x okvir za mikrotitrsko ploščico
4 x 2 mL kalibratorjev 1-4 - humani serum s protitelesi proti Helicobacter pylori (koncentracije so navedene spodaj) razredčen v PBS.
Konzervansa: 0.01% metilizotiazolon in 0.01% bromnitrodioksan

		IgG	IgM	IgA
Cal. 1 (negativni)	Koncentracija (U/mL)	1	1	1
Cal. 2 (mejna vrednost)		10	10	10
Cal. 3 (šibko pozitivni)		25	25	30
Cal. 4 (pozitivni)		150	150	200

- 1 x 60 mL pufru za redčenje seruma – pufer PBS/BSA, ki vsebuje < 0,1% natrijevega azida (konzervans)
- 1 x 12 mL raztopina konjugiranega encima – s HRP označeni kozji anti-humani-IgG/-IgM/-IgA
- 1 x 12 mL substrata TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
- 1 x 12 mL raztopine za ustavitev reakcije – 0,5 M žveplova kislina
- 1 x 60 mL pufru za spiranje (10x koncentriran) – pufer PBS/Tween, ki ga je potrebno pred uporabo redčiti v razmerju 1:10
- 2 x folija za pokrivanje ploščice – za pokrivanje ploščice med inkubacijo
- 1 x plastična vrečka – za shranjevanje neuporabljenih trakov

4. Priprava vzorca in reagentov

Vzorec:

Uporabimo lahko serum ali plazmo (v epruveti z EDTA ali heparinom). Vzorce lahko pri temperaturi 2 – 8 °C hranimo do 3 dni. Pred analizo serum razredčimo v razmerju 1:101 (npr. 5 µL seruma + 500 µL pufru za redčenje seruma).

Reagenti

Pufer za spiranje ploščice: če so v steklenici prisotni kristali, jih raztopite (segrejte na 37°C in dobro premešajte). Nato ga v razmerju 1:10 razredčite z destilirano vodo in dobro premešajte.

5. Postopek

- V ustrezne vdolbinice mikrotitrne ploščice pipetirajte po 100 µl razredčenih vzorcev (1:101) in kalibratorjev.
- Ploščico prekrijte s priloženo folijo ter inkubirajte 60 minut pri sobni temperaturi.
- Ploščico 3x sperite z razredčenim pufrom za spiranje. Navzdol obrnjeno ploščico nekajkrat udarite po papirnati brisači, da odstranite preostali pufer v vdolbinicah.
- V vdolbinice pipetirajte po 100 µL raztopine protiteles, konjugiranih s HRP. Ploščico inkubirajte 30 minut pri sobni temperaturi.
- Ploščico ponovno 3x sperite s 300 µL spiralnega pufra. Enako kot prej navzdol obrnjeno ploščico nekajkrat udarite po papirnati brisači, da odstranite preostali pufer v vdolbinicah.
- V vsako vdolbinico dodajte 100 µL substrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)
- Ploščico prekrijte s priloženo folijo in inkubirajte 20 minut v temnem prostoru pri sobni temperaturi.
- Po 20 minutah dodajte 100 µL raztopine za ustavitev reakcije ('stopping solution')
- Intenzivnost barvne reakcije izmerimo pri 450 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic (referenčni filter 600-690 nm).

Shema pipetiranja:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SL	SL	SL									
B	C1	C1	C1									
C	C2	C2	C2									
D	C3	C3	C3									
E	C4	C4	C4									
F	VZ1	VZ1	VZ1									
G	VZ2	VZ2	VZ2									
H	VZ3	VZ3	VZ3									

Poročilo vaje:

1. Narišite umeritveno krivuljo ter odčitajte dobljene vrednosti vzorcev.
2. Izračunajte znotraj analizo napako.
3. Izračunajte medanalizo napako znotraj iste ploščice.
4. Komentirajte dobljene vrednosti.