

**Produkt:****Dolfinin Chlamydia ELISA bulk**  
**Antigén na diagnostiku chlamýdií s ELISA**

---

**Špecifikácia:**

Biela alebo mierne nažltlá suspenzia vysoko purifikovaných buniek *Chlamydomphila psittaci* v izotonickom roztoku chloridu sodného s fosfátovým tlmivým roztokom a tiomersalom ako konzervačnou látkou. Pri dlhšom státi vytvára sediment. Vzniknutý sediment možno ľahko resuspendovať. Antigén má titer 40.

**Použitie:**

Pre enzýmovu-imunoadsorbentovú analýzu (ELISA) na zistenie protilátok proti chlamýdiám v krvnom sére zvierat a ľudí, ktorí sa dostali do styku s chlamýdiami. Antigén je vhodný na sérologický skrining a surveillance.

**Pracovný postup:**

Pred použitím sa antigén dôkladne resuspenduje a pripraví sa pracovné riedenie 1+19 použitím karbonátového tlmivého roztoku (pH 9,6). Možno použiť aj pracovné riedenie 1+39. Ku koncu expirácie antigénu sa doporučuje uskutočniť kontrolný pokus či obe riedenia dávajú rovnaké výsledky. Metóda sa uskutočňuje na mikrotitračných platničkách typu P.

Nariadený antigén sa naniesie na mikrotitračné platničky v objeme 50 µl na jednu jamku. Uzavreté platničky necháme cez noc v chladničke (pri +4 °C dochádza k adsorbcií antigénu na dno platničky). Potom sa platničky premývajú trikrát s destilovanou vodou. Do každej jamky sa pridá 150 µl 2,5 %-ného kazeínu (blokovanie) a inkubujeme 1 h pri 37 °C. Platničky sa potom vymyjú jedenkrát destilovanou vodou a trikrát izotonickým roztokom chloridu sodného s fosfátovým tlmivým roztokom (PBS) a po pridaní testovaných sér (50 µl/jamku) zriedených postupne od 1 : 100 v 2,5 % roztoku kazeínu obsahujúcom 1,7 % albumínu hovädzieho séra (BSA)\* sa inkubujú 1 h pri 37 °C. Znovu sa trikrát vymyjú s PBS a pridá sa po 50 µl/jamka príslušný, peroxidázou konjugovaný anti IgG, IgM, alebo IgA imunoglobulín zriedený podľa návodu výrobcu v 2,5 %-nom kazeíne. Po inkubácii 1 h pri 37 °C sa platničky vymyjú trikrát s PBS, pridá sa po 50 µl/jamka čerstvo pripravený 0,05 % 1,2-fenyléndiamín v 2,9 % citráte sodnom (pH 5,0), obsahujúcom ako substrát 0,01 % peroxid vodíka. Platničky sa inkubujú 20 min. pri 37 °C v tme a reakcia sa zastaví pridaním 50 µl /jamka 2,3 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbancie (A<sub>492</sub>) sa odčítavajú na prístroji ELISA reader pri vlnovej dĺžke 492 nm.

Pri každom stanovení sa ako kontroly použijú pozitívne a negatívne séra.

\*Ak sa testujú hovädzie séra BSA sa nepridáva k 2,5% roztoku kazeínu.

**Vyhodnotenie testu:**

Za pozitívne sa považuje to zriedenie séra, ktoré dáva rovnakú, alebo väčšiu hodnotu A<sub>492</sub> ako je hodnota A<sub>492</sub> negatívnej kontroly plus tri štandardné odchýlky.

**Skladovanie:**

Uchovávať na suchom a tmavom mieste pri teplote 2-8 °C.

**Expirácia:**

1 rok od dátumu výroby.

# Roztoky pre ELISA

## Karbonátový tlmivý roztok

0,4 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,73 g  $\text{NaHCO}_3$   
rozpustiť v 200 ml destilovanej vody  
upraviť pH na 9,5 s  $\text{NaOH}$   
pridať 2,5 ml 1% thiomersalu  
doplniť destilovanou vodou do 250ml

## Fosfátový tlmivý roztok (PBS)

40 g  $\text{NaCl}$  a 14,28 g  $\text{NaHPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  a 1 g  $\text{KCl}$   
rozpustiť v 1000 ml destilovanej vody  
upraviť pH na 7,2 s 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
doplniť destilovanou vodou do 5000 ml

## Kazeín

rozpustiť 50 g kazeínu v 800 ml 0,3 M  $\text{NaOH}$   
miešať cez noc pri laboratórnej teplote  
upraviť pH na 7,5 s  $\text{HCl}$  (25%  $\text{HCl}$  ca. 27 ml)  
(pri úprave pH s  $\text{HCl}$  sa tvoria ťažko rozpustné zhluky, preto treba titrovať s  $\text{HCl}$  veľmi pomaly, až po rozpustení zhluku pridať ďalšiu kvapku  $\text{HCl}$ )  
pridať 5,84 ml 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 32 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
upraviť pH na 7,3 s 25%  $\text{HCl}$   
(pri úprave pH s  $\text{HCl}$  sa tvoria ťažko rozpustné zhluky, preto treba titrovať s  $\text{HCl}$  veľmi pomaly, až po rozpustení zhluku pridať ďalšiu kvapku  $\text{HCl}$ )  
pridať 20 ml 1% thiomersalu  
doplniť destilovanou vodou do 2000 ml

## Substrátový tlmivý roztok

2,94 g citronanu sodného rozpustiť v 50 ml destilovanej vody  
upraviť pH na 5,0 s  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
doplniť destilovanou vodou do 100 ml