

Produkt:**Dolfinin Q-fever ELISA1 bulk**
Antigén na diagnostiku Q horúčky s ELISA 1

Špecifikácia:

Biela suspenzia vysoko purifikovaných buniek *Coxiella burnetii* vo fáze II 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-immunosorbentovú analýzu (ELISA) na zistenie protilátok proti *C. burnetii* v krvnom sére zvierat a ľudí, ktorí sa dostali do styku s *C. burnetii*. Antigén sa používa najmä na detekciu IgM a IgG protilátok proti *C. burnetii* FII v skorých štádiách infekcie a je veľmi užitočný pri diagnostike akútnej formy Q horúčky v endemických oblastiach.

Pracovný postup:

Pred použitím sa antigén dôkladne resuspenduje a pripraví sa pracovné riešenie 1+19 použitím karbonátového tlmivého roztoku (pH 9,6). Možno použiť aj pracovné riešenie 1+39. Ku koncu expirácie antigénu sa doporučuje uskutočniť kontrolný pokus či obe riešenia 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 adsorbácii 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 H₂SO₄. Absorbancie (A₄₉₂) 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 A₄₉₂ ako je hodnota A₄₉₂ 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 Na_2CO_3 a 0,73 g NaHCO_3
rozpustiť v 200 ml destilovanej vody
upraviť pH na 9,5 s NaOH
pridať 2,5 ml 1% thiomersalu
doplniť destilovanou vodou do 250ml

Fosfátový tlmivý roztok (PBS)

40 g NaCl a 14,28 g $\text{NaHPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ a 1 g KCl
rozpustiť v 1000 ml destilovanej vody
upraviť pH na 7,2 s 0,5 M KH_2PO_4
doplniť destilovanou vodou do 5000 ml

Kazeín

rozpustiť 50 g kazeínu v 800 ml 0,3 M NaOH
miešať cez noc pri laboratórnej teplote
upraviť pH na 7,5 s HCl (25% HCl ca. 27 ml)
(pri úprave pH s HCl sa tvoria ťažko rozpustné zhluky, preto treba titrovať s HCl veľmi pomaly, až po rozpustení zhluku pridať ďalšiu kvapku HCl)
pridať 5,84 ml 0,5 M KH_2PO_4 a 32 ml 0,5 M Na_2HPO_4
upraviť pH na 7,3 s 25% HCl
(pri úprave pH s HCl sa tvoria ťažko rozpustné zhluky, preto treba titrovať s HCl veľmi pomaly, až po rozpustení zhluku pridať ďalšiu kvapku 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 H_3PO_4
doplniť destilovanou vodou do 100 ml