

Diagnostyka Diagnostics

Test ELISA dla bakterii patogenicznych dla roślin

Zakres

Testy immunoenzymatyczne (ELISA) dla bakterii mogą być zastosowane, alternatywnie do testu immunofluorescencji (IF), jako testy przesiewowe w przypadku dużej liczby próbek (patrz PM 7/97 Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin). Mogą być one również użyte jako etap identyfikacji czystej kultury bakterii. Standard ten opisuje w jaki sposób wykonać test ELISA w celu wykrycia i/lub identyfikacji w diagnostyce bakterii używając: (i) Pośredniego testu ELISA; (ii) Testu podwójnego wiązania – kanapkowego — DAS; (iii) Pośredniego testu podwójnego wiązania – kanapkowego — DASI nazywanego również testem potrójnego wiązania kanapkowego — TAS; oraz (iv) Direct tissue-print, squash lub colony-dot.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzono jako Standard EPPO 2010-09.

Wprowadzenie

W Załączniku 1 zawarto instrukcję wykonania różnych testów. Dla prawidłowego wykonania testów ELISA decydujące znaczenie mają przeciwciała. Należy używać tylko zwalidowanych przeciwciał poliklonalnych, monoklonalnych lub przeciwciał łączonych specyficznych dla określonego organizmu (patrz procedury walidacji opisane w standardzie PM 7/98 *Wymagania szczególne dla laboratoriów przygotowujących akredytację w zakresie diagnostyki organizmów szkodliwych dla roślin*). Zmiana partii/pakietów odczynnika może mieć wpływ na przeprowadzenie testu jak to przedstawiono w Standardzie PM 7/98. W takich przypadkach należy przeprowadzić weryfikację tego odczynnika polegającą na porównaniu go z odczynnikiem używanym poprzednio lub postępować zgodnie ze wskazówkami przedstawionymi w Standardzie PM 7/98. W przypadku stosowania przeciwciał poliklonalnych do testu ELISA mogą być dodatkowo potrzebne szczegółowe informacje jak to opisano w Dyrektywie UE 2006/63/CE (UE, 2006).

Testy mogą być przeprowadzone na świeżym materiale roślinnym (fragmenty tkanki lub maceraty lub materiał rozdrobniony), na świeżych lub zamrożonych ekstraktach próbki, na świeżych lub zamrożonych zawiesinach komórek bakterii lub na wyciekach bakteryjnych. W przypadku gdyby były one przechowywane w temp. -20 °C pod glicerolem należy usunąć glicerol poprzez dodanie buforu PBS, odwirowanie w temp. około 10 °C przez 15 min z przyspieszeniem 7000 g, a następnie zawieszenie uzyskanego osadu w odpowiedniej objętości buforu PBS. Do każdej serii testów należy dołączyć kontrolę pozytywną i negatywną. Szczegóły dotyczące przygotowania kontroli pozytywnej i negatywnej zostały przedstawione w Załączniku 2.

Ponieważ czułość testu ELISA dla wykrywania bakterii patogenicznych dla roślin jest

zwykle stosunkowo niska (około 10^5 – 10^6 komórek bakterii na mililitr), z powodu małej zdolności bakterii do powlekania płytek w porównaniu z wirusami, a także z powodu innych problemów (Alvarez, 2004). W celu zwiększenia czułości przy zachowaniu specyficzności można przed wykonaniem testu ELISA (pośredniego, DAS lub DASI) przeprowadzić proces wzbogacania. Proces ten jest szczególnie potrzebny w przypadku użycia przeciwciał monoklonalnych (Lopez *et.al.* 2003). Nie jest to konieczne w przypadku identyfikacji czystej kultury. Wzbogacenie należy przeprowadzić w najbardziej odpowiednich warunkach inkubacji określonych w protokole diagnostycznym dla danego organizmu (np. temperatura, warunki tlenowe, wytrząsanie oraz podłoże). Wzbogacanie może się nie powieść z powodu obecności lub rozwoju innych mikroorganizmów i powinno się go unikać jeśli jest to przewidziane.

Podziękowanie

Niniejszy opis testu został wstępnie opracowany przez M.M. Lopez (IVIA, Hiszpania), a następnie zweryfikowany przez J. Janse (NAK, Holandia).

Materiały źródłowe

zachowana wersja oryginalna (przyp. tłum)

Alvarez A. (2004) Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 42, 339-366.

UE (2006) Dyrektywa Komisji 2006/63/WE z 14 lipca 2006 zmieniająca Załączniki II do VII do Dyrektywy Rady 98/57/WE dotyczącej zwalczania *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Dziennik Urzędowy Wspólnoty Europejskiej* nr L206, 36-106.

Lopez M.M, Bertolini E, Olmos A, Caruso P, Gorris M.T. Llop P, Penyalver R & Cambra M. (2003) Innovative tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses. *International Microbiology* 6, 233-243.

Załącznik 1 – Instrukcja wykonania testu ELISA

Opis testu

(i) ELISA pośrednia

- (1) Użyć 200 µl ekstraktu próbki, maceratu lub zawiesiny bakterii (ilość próbki można zredukować do 100 µl w zależności od wielkości próbki) przygotowanego w 1,5 do 2,0 ml mikroprobówkach (zgodnie z instrukcją zawartą w protokole) .
- (2) Dodać równoważną objętość buforu powlekającego o podwójnym stężeniu (Załącznik 3) i wstrząsnąć na wortexie.
- (3) Nanieść równoważną objętość próbki do dwóch studzienek płytki titracyjnej o dobrej charakterystyce powlekania (np. Nunc- Polysorp lub równoważne). W celu uzyskania lepszej powtarzalności testu należy unikać studzienek brzegowych płytki. Istnieją techniki zabezpieczające przed efektem brzegowym polegające na przykrywaniu płytki przezroczystą folią w celu uniknięcia parowania, w takim przypadku można używać studzienki brzegowe. Inkubować w temp. 37 °C przez 4 godziny lub w temp. 4 °C

przez noc. W ten sam sposób należy przygotować kontrolę pozytywną i negatywną. Należy również włączyć kontrolę negatywną buforu do ekstrakcji oraz jeśli to konieczne również wzbogacone podłoże.

- (4) Wypłukać delikatnie studzienki (np. używając butelki do płukania) trzykrotnie buforem PBS z dodatkiem Tween (Załącznik 3), zbyt silne płukanie płytki za pomocą płuczki może wpłynąć na proces powlekania, a w ostateczności na czułość testu, szczególnie w przypadku zastosowania testu do wykrywania bakterii.
- (5) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie specyficznych przeciwciał w odpowiednim buforze blokującym (Załącznik 3). W przypadku przeciwciał zwalidowanych przez producenta należy zastosować zalecane rozcieńczenia robocze.
- (6) Dodać 200 µl do każdej studzienki i inkubować przez 2 godziny w temperaturze 37 °C.
- (7) Wypłukać jak poprzednio (pkt.4).
- (8) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie koniugatu, drugich specyficznych przeciwciał (zwykle koniugat alkalicznej fosfatazy, ale mogą być również użyte inne enzymy) w odpowiednim buforze blokującym. Dodać 200 µl do każdej studzienki i inkubować przez 1 godzinę w temp. 37 °C.
- (9) Wypłukać jak poprzednio (pkt.4).
- (10) Przygotować świeży roztwór 1mg/ml paranitrofenylofosfatu w buforze substratowym (Załącznik 3). W przypadku innych enzymów należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Dodać 200 µl tego roztworu do każdej studzienki. Inkubować w ciemności w temperaturze pokojowej i odczytać absorbancję przy długości fali 405 nm (lub w przypadku innych enzymów przy zalecanej przez producenta długości fali) w równych odstępach czasu w ciągu 120 minut lub zgodnie z protokołem.

(ii) *DAS ELISA*

- (1) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie przeciwciał w powlekającym buforze węglanowym pH 9,6 (Załącznik3). Dodać 200 µl do każdej studzienki płytki titracyjnej o dobrej charakterystyce powlekania (np. Nunc- Polysorp lub równoważne) należy unikać studzienek brzegowych płytki w celu uzyskania lepszej powtarzalności. Istnieją techniki zabezpieczające przed efektem brzegowym polegające na przykrywaniu płytki przezroczystą folią w celu uniknięcia parowania, w taki przypadku można używać studzienki brzegowe. Inkubować w temp. 37 °C przez 4 godziny lub w temp. 4 °C przez noc.
- (2) Wypłukać delikatnie studzienki (np. używając butelki do płukania) trzykrotnie buforem PBS z dodatkiem Tween (Załącznik 3), zbyt silne płukanie płytki za pomocą płuczki może wpłynąć na proces powlekania, a w ostateczności na czułość testu, szczególnie w przypadku zastosowania testu do wykrywania bakterii.
- (3) Do dwóch studzienek dodać po 200 µl każdej próbki wcześniej wzbogaconej lub jeżeli to jest konieczne poddanej obróbce (ekstrakt roślinny, macerat lub zawiesina bakterii). Włączyć dla każdej płytki po dwie studzienki dla kontroli pozytywnej i negatywnej. Należy również włączyć kontrolę negatywną buforu do ekstrakcji oraz użyte wzbogacone podłoże. Inkubować w temp. 37 °C przez 4 godziny lub w temp. 4 °C przez noc.
- (4) Wypłukać jak poprzednio (pkt.2).
- (5) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie specyficznych przeciwciał połączonych z fosfatazą alkaliczną w buforze PBS (lub połączonych z innym enzymem). Dodać do każdej studzienki po 200 µl. Inkubować w temp. 37 °C przez 2 godziny.

- (6) Wyplukać jak poprzednio (pkt.2).
- (7) Przygotować świeży roztwór 1mg/ ml paranitrofenylofosfatu w buforze substratowym (Załącznik 3). W przypadku innych enzymów należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Dodać 200 µl tego roztworu do każdej studzienki. Inkubować w ciemności w temperaturze pokojowej i odczytać absorbancję przy długości fali 405 nm (lub w przypadku innych enzymów przy zalecanej długości fali przez producenta) w równych odstępach czasu w ciągu 120 minut lub zgodnie z protokołem.

(iii) *DASI ELISA*

- (1) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie przeciwciał poliklonalnych w powlekającym buforze węglanowym pH 9,6. Dodać po 200 µl do każdej studzienki płytki titracyjnej o dobrej charakterystyce powlekania. W celu uzyskania lepszej powtarzalności testu należy unikać studzienek brzegowych płytki. Istnieją techniki zabezpieczające przed efektem brzegowym polegające na przykrywaniu płytki przezroczystą folią w celu uniknięcia parowania. W takim przypadku można używać studzienki brzegowe. Inkubować płytkę w temp. 37 °C przez 4 godziny lub w temp. 4 °C przez noc.
- (2) Wyplukać delikatnie studzienki (np. używając butelki do płukania) trzykrotnie buforem PBS z dodatkiem Tween (Załącznik 3), płukanie płytki zbyt silnie za pomocą płuczki może wpłynąć na proces powlekania a w ostateczności na czułość testu, szczególnie w przypadku zastosowania testu do wykrywania bakterii.
- (3) Do dwóch studzienek dodać po 200 µl każdej próbki wcześniej wzbogaconej lub jeżeli to jest konieczne poddanej obróbce (ekstrakt roślinny, macerat lub zawiesina bakterii). Włączyć dla każdej płytki po dwie studzienki dla kontroli pozytywnej i negatywnej. Należy również włączyć kontrolę negatywną buforu do ekstrakcji oraz użyte wzbogacone podłoże. Płytkę inkubować w temp. 37 °C przez 4 godziny lub w temp. 4 °C przez noc.
- (4) Wyplukać jak poprzednio (pkt.2).
- (5) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie specyficznych przeciwciał (najlepiej przeciwciała monoklonalne) w buforze PBS o pH 7,2 (Załącznik 3) z dodatkiem 0,5% surowiczej albuminy wołowej (BSA), a następnie dodać po 200 µl do każdej studzienki. Inkubować w temp. 37 °C przez około 2 godziny.
- (6) Wyplukać jak poprzednio (pkt.2).
- (7) Przygotować odpowiednie rozcieńczenie w buforze PBS przeciwciał skierowanych przeciw przeciwciałom specyficznym (w przypadku przeciwciał monoklonalnych: immunoglobuliny przeciw mysie) połączonym z fosfatazą alkaliczną (lub połączonym z innym enzymem). Dodać do każdej studzienki po 200 µl. Inkubować płytkę w temp. 37 °C przez około 2 godziny.
- (8) Wyplukać jak poprzednio (pkt.2).
- (9) Przygotować świeży roztwór 1mg/ ml paranitrofenylofosfatu w buforze substratowym (Załącznik 3). W przypadku innych enzymów należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Dodać do każdej studzienki po 200 µl tego roztworu. Inkubować płytkę w ciemności w temperaturze pokojowej i odczytać absorbancję przy długości fali 405 nm (lub w przypadku innych enzymów przy zalecanej długości fali przez producenta) w równych odstępach czasu w ciągu 120 minut lub zgodnie z protokołem.

(iv) *Tissue print, squash lub colony dot ELISA*

Należy użyć mikrocelulozowej membrany z tabelami wydrukowanymi przez producenta lub wyciąć prostokąty z arkusza mikrocelulozowego i narysować tabele (za pomocą linijki i ołówka). Każda tabela powinna zawierać 12 kolumn i 8 rzędów. Zaznaczyć rzędy A-H i kolumny 1-12. Dobry szablon stanowi płytka do testu ELISA.

- (1) (a) Przygotować gładkie, świeżo pocięte fragmenty tkanek roślinnych wykazujących objawy i odcisnąć na membranie mikrocelulozowej tak, aby uzyskać odcisk tkanki. (b) Bezpośrednio odcisnąć materiał roślinny z objawami lub wyciek bakteryjny na membranie mikrocelulozowej. (c) Nanieść bezpośrednio na membranę mikrocelulozową kroplę kolonii lub zawiesiny poszukiwanej bakterii. Włączyć kontrolę pozytywną i negatywną odpowiednio w postaci odcisku tkanki, wycieków lub czystych kultur (bakterie mogą pochodzić z szalki lub stanowić zawiesinę). Odcisk tkanki, wyciek bakteryjny lub krople albo plamy uzyskane z czystych kultur wysuszyć w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Membrany po wykonaniu odcisków lub plam mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej w ciemności przez długi okres czasu (dłużej niż rok) i są wystarczająco trwałe aby mogły być przesłane na przykład do innego laboratorium.
- (2) Umieścić membranę mikrocelulozową w roztworze 1% albuminy wołowej (BSA) rozpuszczonej w PBS o pH 7,2 (Załącznik 3). W odpowiednim pojemniku użyć takiej ilości roztworu aby pokryć nim membranę. Etap ten można wykonać przez noc w temperaturze 4 °C lub przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Usunąć roztwór BSA bez etapu płukania.
- (3) Przygotować w buforze PBS 0,01M o pH 7,2 odpowiednie rozcieńczenie koniugatu stanowiącego specyficzne przeciwciała z alkaliczną fosfatazą. W odpowiednim pojemniku dodać taką ilość roztworu aby pokryć nim membranę. Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej podczas delikatnego wstrząsania (100 rpm).
- (4) Usunąć koniugat, a następnie trzykrotnie wypłukać membranę w buforze PBS-Tween (Załącznik 3) lub w innym odpowiednim buforze wytrząsając przez 5 minut (100 rpm).
- (5) Przygotować zgodnie z zaleceniami producenta roztwór substratowego buforu strącającego dla fosfatazy alkalicznej (np. NBT + BCIP) (Załącznik 3) rozpuszczonego w buforze substratowym lub w wodzie destylowanej. W odpowiednim pojemniku pokryć membranę tym roztworem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 do 15 minut. Zatrzymać reakcję poprzez wypłukanie pod wodą z kranu, następnie wysuszyć na bibule i obserwować przy użyciu mikroskopu stereoskopowego lub przy użyciu szkła powiększającego w małym powiększeniu (5x) końcowy osad w kolorze czerwono-fioletowym.

Interpretacja odczytanego testu

Weryfikacja kontroli

Negatywny wynik odczytu testu ELISA w studzienkach/odciskach lub plamach z kontrolą pozytywną wskazuje na to, że test został przeprowadzony niewłaściwie lub reakcja została zahamowana. Pozytywny wynik odczytu testu ELISA w studzienkach/odciskach lub plamach z kontrolą negatywną wskazuje na to, że nastąpiła reakcja krzyżowa lub wystąpiło niespecyficzne wiązanie przeciwciał. W takich przypadkach należy ponownie przeprowadzić test z zastosowaniem odpowiednich modyfikacji.

Interpretacja pośredniego testu ELISA, DAS ELISA lub DASI ELISA.

Interpretacja testów ELISA wykonanych w celu identyfikacji bakterii (czysta kultura)

Test ELISA można uznać za negatywny jeśli średnia wartość absorbancji lub gęstość optyczna (OD) odczytana dla dwóch studzienek jest $<2 \times OD$ niż wartość odczytana w studzienkach z kontrolą negatywną, pod warunkiem, że wartość OD dla kontroli pozytywnej jest powyżej 1,0 (po 120 minutach inkubacji z substratem) oraz jest dwukrotnie większa niż wartość OD otrzymana dla negatywnego ekstraktu próbki.

Test ELISA można uznać za pozytywny jeśli średnia wartość OD odczytana dla każdej z dwóch studzienek próbki jest $\geq 2 \times OD$ niż wartość odczytana w studzienkach dla ekstraktu próbki negatywnej pod warunkiem, że wartości OD odczytane dla wszystkich studzienek kontroli negatywnych są $< 2 \times OD$ wartości kontroli pozytywnej.

W przypadku próbek, które wykazują reakcję poniżej progu wykrywalności zaleca się powtórne wykonanie testu.

Interpretacja testów ELISA wykonanych w celu wykrycia bakterii (materiał roślinny).

W przypadku interpretacji wykrycia, wartość OD dla próbki ekstraktu negatywnego powinna być podstawą do określenia progu wykrywalności (tło) minus wartość OD uzyskana dla studzienki zawierającej substrat.

Wynik pozytywny jest określany indywidualnie w zależności od poszukiwanego organizmu oraz od zastosowanej matrycy.

W przypadku próbek, które wykazują reakcję poniżej progu wykrywalności zaleca się powtórne wykonanie testu.

Interpretacja testów: tissue print, squash lub dot ELISA

Test ELISA można uznać za negatywny jeśli nie obserwuje się kolorowego osadu w przypadku odcisku tkanki lub plamy uzyskanej z próbki, pod warunkiem że kontrola pozytywna dała wynik pozytywny a kontrola negatywna dała wynik negatywny.

Test ELISA można uznać za pozytywny jeśli obserwuje się zabarwienie na kolor czerwono-fioletowy osadu w przypadku odcisku tkanki lub plamy uzyskanej z próbki, pod warunkiem że kontrola pozytywna dała wynik pozytywny a kontrola negatywna dała wynik negatywny.

Odczyt kontroli pozytywnej dającej wynik negatywny wskazuje, że test nie został wykonany poprawnie lub wystąpił problem w postaci zahamowania reakcji przeciwciała – antygen lub nastąpiło wytrącenie osadu. Odczyt kontroli negatywnej dającej wynik pozytywny wskazuje, że wystąpiła reakcja niespecyficznego materiału roślinnego lub reakcja krzyżowa.

Załącznik 2 – Kontrole pozytywne i negatywne

W przypadku użycia zestawu do testu ELISA dostępnego w handlu dołączone powinny być oprócz kontroli pozytywnej i negatywnej następujące kontrole:

- Kontrola pozytywna w przypadku wykorzystania testu ELISA do wykrywania bakterii powinna zawierać tą samą matrycę, która została zainokulowana lub nakłuta poszukiwaną bakterią, a w przypadku wykorzystania testu ELISA do identyfikacji

powinna zawierać zawiesinę poszukiwanej bakterii.

- Kontrola negatywna w przypadku wykorzystania testu ELISA do identyfikacji bakterii powinna zostać przygotowana ze zdrowej rośliny wykorzystując bufor lub gdy jest to konieczne wzbogacony bufor, a w przypadku wykorzystania testu ELISA do wykrywania bakterii - matryca w odpowiednim buforze.

Kontrole pozytywne i negatywne zgodnie z procedurą powinny zostać sprawdzone przed przystąpieniem do wykonania testu ELISA (najlepiej wcześniej) z wykorzystaniem tych samych przeciwciał.

Kontrole należy przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta albo w lodówce przez kilka dni albo w temperaturze poniżej -16°C przez dłuższy okres czasu.

Kontrole pozytywne

Przygotować osobno kontrole pozytywne szczepu homologicznego lub jakiegoś innego szczepu referencyjnego poszukiwanego organizmu poprzez wykonanie zawiesiny w ekstrakcie uzyskanym ze zdrowej rośliny żywicielskiej oraz w buforze PBS w sposób opisany poniżej (Załącznik 3). Zaleca się aby używać jako kontroli pozytywnych szczepów referencyjnych w celu uniknięcia błędnej interpretacji z powodu wystąpienia reakcji krzyżowych. Szczepy referencyjne są dostępne z następujących kolekcji: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB), FERA, York, Wielka Brytania; Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Holandia lub Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), INRA Stadion Phytobacteriologie, Angers, Francja. Jeśli istnieje taka możliwość należy użyć naturalnie zainfekowaną tkankę (przechowywaną w postaci liofilizatu lub zamrożoną w temp. poniżej -16°C).

Dla kontroli pozytywnych należy użyć dwóch studzienek lub dwóch odcisków tkanki.

Kontrole negatywne

Jako kontrole negatywne należy użyć ekstrakt uzyskany ze zdrowego materiału roślinnego (w przypadku wykrywania bakterii) lub zawiesiny innego gatunku bakterii niż poszukiwany (w przypadku identyfikacji bakterii). W celu dokonania lepszego porównania z próbką badaną należy użyć do analizy zdrowej rośliny tego samego gatunku i najlepiej tej samej odmiany, wykorzystując tą samą część rośliny będącej w tym samym stadium wzrostu co roślina badana. Jako kontrolę negatywną można użyć roztwór/ekstrakt tej samej rośliny żywicielskiej, która we wcześniejszych testach dała wynik negatywny dla poszukiwanego organizmu.

Kontrole pozytywne i negatywne należy przygotować w następujący sposób:

1. Uzyskać 48-godziną kulturę wirulentnego szczepu poszukiwanej bakterii na agarze odżywczym lub innym odpowiednim podłożu podstawowym i zawiesić ją w buforze PBS (Załącznik 3), tak aby uzyskać zawiesinę o gęstości 10^8 komórek na mililitr. Można to zwykle uzyskać poprzez przygotowanie słabo gęstej zawiesiny odpowiadającej optycznej gęstości 0,1 przy długości fali 600 nm.
2. Przygotować sterylne mikroprobówki o pojemności 1,5 ml i wlać do nich po 900 μl ekstraktu roślinnego, który został wcześniej uznany w wyniku przeprowadzonych testów za wolny do poszukiwanego organizmu. Do pierwszej mikroprobówki przenieść 100 μl zawiesiny bakterii o gęstości 10^8 komórek na mililitr. Wstrząsnąć za pomocą worteksu. Wykonać trzy dziesięciokrotne rozcieńczenia poprzez dalsze

rozcieńczenie w następujących mikroprobówkach. Przenieść 100 µl buforu do zawieszania do tych mikroprobówek, które nie zawierają zawiesiny bakterii. Wstrząsnąć za pomocą wortexu. Mikroprobówki, które zawierają zawiesinę bakterii można użyć jako kontrole pozytywne oraz do celów oszacowania czułości protokołu. Mikroprobówki, które nie zawierają zawiesiny bakterii można użyć jak kontrole negatywne.

3. Za pomocą odpowiedniego testu ELISA należy najpierw potwierdzić obecność oraz ilość poszukiwanego organizmu w próbkach kontrolnych.
4. W sterylnych mikroprobówkach o pojemności 1,5 ml należy przygotować po 100 µl roztworu tak aby uzyskać powtórzenia każdej próbki kontrolnej.
5. Skontaminowaną zawiesinę rozcieńczyć tak aby otrzymać poziom kontaminacji 10^8 , 10^7 i 10^6 komórek na mililitr. Nanieść do studzienek standardową objętość każdego rozcieńczenia oraz kontrolę negatywną. Jeśli jest to możliwe nanieść także naturalnie porażoną próbkę oraz jej dwa dziesięciokrotne rozcieńczenia.

Załącznik 3 – Bufory i substraty do testu ELISA

Podwójnie stężony bufor węglanowy, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	3,18 g
NaHCO ₃	5,86 g
Woda destylowana	1000 ml
Składniki rozpuścić, ustalić pH równe 9,6	

Węglanowy bufor powlekający, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Woda destylowana	1000 ml
Składniki rozpuścić, ustalić pH równe 9,6	

10 x Bufor fosforanowy z dodatkiem soli (PBS), pH 7,2

(przed użyciem rozcieńczyć 1:10)

NaCl	80,0 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	4,0 g
NaH ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	27,0 g
Woda destylowana	1000 ml

PBS – Tween

10 x PBS	50 ml
10% Tween 20	0,5 ml
Woda destylowana	950 ml

Bufor substratowy alkalicznej fosfatazy, pH 9,8

Dietanolamina	100 ml
Woda destylowana	900 ml

Składniki wymieszać i ustalić pH 9,8 za pomocą stężonego kwasu solnego.

Bezpośrednio przed użyciem dodać paranitrofenylofosfat (pNPP) tak aby otrzymać końcowe stężenie równe 1mg/ml.

Substratowy bufor strącający dla fosfatazy alkalicznej

NBT + BCIP (18,75 mg/ml, NBT (nitro blue tetrazolium chloride) i 9,4 mg/ml BCIP (5-bromo-4chloro-3indolo phosphate toluidine salt) w 67% DMSO (obj./obj.) lub SIGMA FAST™ BCIPP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue trtrazolium) tabletki z firmy Sigma Aldrich.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Anna Kołodziejska (GIORiN CL)	Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
04.11.2011	04.11.2011	04.11.2011

