

### Principi della tecnica

Durante la prima incubazione l'anticorpo virus specifico aderisce sulla superficie al fondo della micropiastra. Durante il secondo passaggio, l'antigene virale si lega all'anticorpo formando il complesso antigene-anticorpo. Durante il terzo passaggio il complesso antigene-anticorpo reagisce con l'anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina formando il complesso anticorpo-antigene-anticorpo coniugato. Segue il saggio enzimatico in cui la presenza dell'antigene virale specifico è indicata dalla reazione positiva della fosfatasi alcalina con il 4-nitrofenilfosfato con produzione di 4-nitrofenolo libero. La reazione enzimatica è letta a 405 nm dopo una e due ore.

### Manipolazione e Conservazione

I nostri reagenti sono standardizzati per una diluizione di 1:200 e un volume di 200 µl/pozzeto. Conservare a 4°C e dopo l'apertura consumare entro 5 mesi.

### Procedimento

Procedura	Diluizione di Reagenti	Aggiungere (al pozzeto)	Incubazione	a	Lavaggi*
1. Incubazione dell'anticorpo (IgG)	IgG, <b>diluite 1:200</b> in <u>tampone sensibilizzante</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
2. Formazione del complesso anticorpo-antigene	<b>Campione</b> diluito <b>1:20</b> in <u>tampone di spremitura</u> , se non specificato altrimenti. (I <b>controlli di LOEWE®</b> devono essere diluiti in 2.1 ml di tampone di spremitura, se non specificato altrimenti.)	0.2 ml	overnight	4°C	4 x
3. Formazione dell'anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina.	Anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina <b>diluiti 1:200</b> in <u>tampone di spremitura</u>	0.2 ml	4 h	37°C	4 x
4. Saggio enzimatico	<u>Soluzione per substrato</u>	0.2 ml	1 - 2 h	Temp. ambiente	-

\***Lavaggi:** dopo ciascun'incubazione, i reagenti devono essere rimossi dalla piastra e deve seguire una serie di lavaggi come sopra indicato.

### Formulazioni

<b>Tampone di sensibilizzazione</b>	1.59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.93 g NaHCO <sub>3</sub>	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 9.6. (Conservazione ca. 4°C)
<b>Tampone di lavaggio</b>	8.0 g NaCl 2.9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 g KCl 0.5 ml Tween 20	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 7.2-7.4. (Conservazione ca. 4°C)
<b>Tampone di spremitura/coniugato</b>	Formulazione di tampone di lavaggio per 1 l addizionale: 20 g polivinilpirrolidone (K10 - K40) 2 g albumina di siero bovino 0.1 g NaN <sub>3</sub> (optional)	Sciogliere in acqua distillata e portare ad 1 l. Aggiustare il pH a 7.4. (Si consiglia di conservare in frigorifero più di una settimana. Aliquote può essere congelato e scongelato prima dell'uso.)
<b>Tampone per il substrato</b>	97 ml diethanolammina 0.2 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Sciogliere in acqua distillata e diluire ad 1 l. Aggiustare il pH a 9.8 con 1N HCl. (Conservazione ca. 4°C)
<b>Soluzione di substrato</b>	1 mg/ml di di-Na-4-nitrofenilfosfato in tampone per il substrato	Preparare questa soluzione immediatamente prima dell'uso!

### Valutazione

Si consiglia di aggiungere alla piastra i controlli negativi e positivi, per essere sicuri del corretto procedimento del saggio ELISA. Per determinare l'assorbanza del sano, diversi estratti freschi di piante sana della stessa specie dovrebbero essere aggiunte alla piastra. La soglia +/- deve essere determinata dall'operatore.