

FLOCKTYPE® recAIV Screening

ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza in Huhn und Pute



Gebrauchsinformation

in vitro-Diagnostikum für Tiere

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17 c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 435

Verwendungszweck

Der FLOCKTYPE® recAIV Screening ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza (AI) in Serum- oder Plasmaproben von Huhn und Pute.

Allgemeine Informationen

Die Aviäre Influenza wird durch Typ-A-Influenzaviren hervorgerufen und befällt sowohl Wildvögel als auch Wirtschaftsgeflügel. Es sind niedrig und hoch pathogene Influenza-A-Viren bekannt. Die hoch pathogenen AI-Viren gehören zu den Subtypen H5 oder H7 und rufen schwere systemische Krankheitsbilder hervor (Geflügelpest).

Der FLOCKTYPE® recAIV Screening ELISA ermöglicht die schnelle und zuverlässige Überwachung von Geflügelbeständen hinsichtlich der Freiheit von Aviärer Influenza. Bei dem im FLOCKTYPE® recAIV Screening ELISA verwendeten Antigen handelt es sich um ein rekombinant hergestelltes Strukturprotein des Influenza-Virus. Das verwendete Protein ist stark immunogen und unter den AIV-Stämmen hoch konserviert. Es werden alle Subtypen der Influenza-A-Viren erfasst. Der FLOCKTYPE® recAIV Screening ELISA in Kombination mit der FlockSoft™-Auswertungssoftware ist in der Lage, Antikörper gegen Influenza A-Viren in Huhn und Pute zu erkennen und quantitativ darzustellen.

Beschreibung des Testprinzips

Die Mikrotiterplatte ist mit rekombinant hergestelltem AIV-Antigen beschichtet. Während der Probeninkubation binden AIV-spezifische Antikörper an das immobilisierte Antigen, nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Die anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch ein anti-Huhn/Pute-IgY-Peroxidase-Konjugat. Ungebundenes Konjugat wird heraus gewaschen und die Farbreaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Nach Abstoppen der Reaktion wird die optische Dichte im Photometer gemessen; sie ist proportional zu der Konzentration der anti-AIV-Antikörper in der Probe.

Reagenzien

	2er Kit	5er Kit
1. Testplatte, 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen bzw. Testplatte, Mikrotitrationsplatte mit 96 Vertiefungen, beschichtet mit rekombinant hergestelltem nicht-infektiösem AIV-Antigen	2	5
2. Waschpuffer (10x), Pufferlösung mit Tween, enthält Konservierungsmittel	1x 125 ml	2x 125 ml
3. Verdünnungspuffer, Pufferlösung mit Protein und Konservierungsmittel	1x 125 ml	2x 125 ml
4. Positivkontrolle, AIV-reaktives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1x 2,5 ml	1x 2,5 ml
5. Negativkontrolle, AIV-negatives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1x 2,5 ml	1x 2,5 ml
6. Anti-IgY-HRP, Kaninchen-anti-Huhn/Pute-IgY-Peroxidasekonjugat in Puffer mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	1x 24 ml	1x 60 ml
7. TMB, Tetramethylbenzidinsubstratlösung, gebrauchsfertig	1x 24 ml	1x 60 ml
8. Stopplösung, 0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig (Vorsicht ätzend!)	1x 24 ml	1x 60 ml

Benötigte Geräte und Materialien, die nicht mitgeliefert werden

Bechergläser, Messzylinder, Präzisionspipetten, Multikanalpipetten, Einwegpipettenspitzen, Pipettierwannen, Mikrotiterplattenphotometer, Röhrchen oder Mikrotiterplatten für die Verdünnung der Proben, destilliertes Wasser

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Lagern Sie die Reagenzien bei 2-8 °C und bringen Sie diese erst unmittelbar vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18-25 °C). Eventuell gebildete Salzkristalle im Waschpuffer (10x) müssen durch Schwenken und leichtes Erwärmen wieder aufgelöst werden. Zur Vermeidung der Salzkristallbildung können Waschpuffer (10x, Flasche 2) und Stopplösung (Flasche 8) bei Raumtemperatur (18-25 °C) gelagert werden. Nicht benutzte Teststreifen sollen bis zur Verwendung im wieder verschlossenen Plattenbeutel mit Trockenmittel bei 2-8 °C gelagert werden. Nach erstmaliger Öffnung des Beutels sind die Teststreifen mindestens 6 Wochen haltbar.

Den Test sollten nur für Labortätigkeit qualifizierte Personen ausführen. Lagern Sie die TMB-Substratlösung im Dunkeln und setzen Sie diese während der Testdurchführung nicht starkem Lichteinfluss oder direktem Sonnenlicht aus. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. Benutzen Sie die Bestandteile des Testkits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums. Das für die Verdünnung des Pufferkonzentrates verwendete Wasser, insbesondere Wasser aus Ionenaustauscheranlagen, kann bei ungenügender Reinheit die Reaktion beeinträchtigen. Wasser mit der Qualität von bidestilliertem Wasser oder Reinstwasser (Milli-Q) ist geeignet.

Die für ELISA-Prozeduren übliche Umsichtigkeit wie die Verwendung sorgfältig gereinigter Glasmaterialien, sorgfältiges Pipettieren und Waschen während der Testdurchführung und die Einhaltung konstanter Inkubationszeiten sind unabdingbare Voraussetzungen, um die Genauigkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Einige Bestandteile des Testkits enthalten gefährliche Stoffe (Schwefelsäure). Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen. Nur für den tierärztlichen Gebrauch!

Reagenzienvorbereitung

Waschpuffer:

Waschpuffer (10x), Flasche 2, 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen, z. B. für eine Testplatte 25 ml Waschpuffer (10x) in 225 ml destilliertem Wasser verdünnen und mischen.

Serum, Plasma:

Die Proben sind 1:500 mit Verdünnungspuffer verdünnt im Test einzusetzen, z. B. 1 µl Serum oder Plasma in 499 µl Verdünnungspuffer verdünnen und mischen. Die Pipettenspitze muss nach jeder Probe gewechselt werden. Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

Alternativ können die Proben ausgehend von einer Vorverdünnung (1:50 in Verdünnungspuffer) direkt in der Testplatte verdünnt werden (s. u. Testdurchführung, 1. Befüllen der Testplatte).

Testdurchführung

Alle Reagenzien vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18-25 °C) bringen und mischen.

1. Befüllen der Testplatte:

Registrieren der Kontrollen- und Probenlokalisationen entsprechend der Vorlage, Negativkontrolle (NK) = A1/B1; Positivkontrolle (PK) = C1/D1; übrige Positionen für Proben.

Jeweils 100 µl der gebrauchsfertigen Negativ- und Positivkontrolle (in Doppelbestimmung) sowie der 1:500 verdünnten Proben in die Kavitäten der Testplatte pipettieren. Alternativ können in alle Probenkavitäten 90 µl Verdünnungspuffer vorgelegt werden und jeweils 10 µl der 1:50 vorverdünnten Proben zupipettiert werden; anschließend gut mischen.

Die Testplatte abdecken.

Vorlage für FLOCKTYPE® recAIV Screening ELISA:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	P5	P13	P21	P29	P37	P45	P53	P61	P69	P77	P85
B	NK	P6	P14	P22	P30	P38	P46	P54	P62	P70	P78	P86
C	PK	P7	P15	P23	P31	P39	P47	P55	P63	P71	P79	P87
D	PK	P8	P16	P24	P32	P40	P48	P56	P64	P72	P80	P88
E	P1	P9	P17	P25	P33	P41	P49	P57	P65	P73	P81	P89
F	P2	P10	P18	P26	P34	P42	P50	P58	P66	P74	P82	P90
G	P3	P11	P19	P27	P35	P43	P51	P59	P67	P75	P83	P91
H	P4	P12	P20	P28	P36	P44	P52	P60	P68	P76	P84	P92

- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
- 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer entleeren.
- In jede Vertiefung 100 µl gebrauchsfertiges anti-IgY-HRP-Konjugat geben.
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und danach die Vertiefungen durch Absaugen oder Ausschlagen entleeren.
- 3× waschen mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer, nach jedem Waschen den Puffer entleeren.
- In jede Vertiefung 100 µl TMB Substratlösung geben.
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Vertiefung.
- Kalibrierung des Photometers gegen Luft als Leerwert, Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 450 nm und optional einer Referenzwellenlänge von 620-650 nm sofort oder innerhalb von 20 min nach dem Abstoppen.

Testvalidierung

Für eine gültige Messung soll der Mittelwert (MW) der OD der Positivkontrolle einen Wert $\geq 0,7$ ergeben. Der MW der OD der Negativkontrolle soll $\leq 0,2$ sein.

Auswertung

1. Aus den OD-Werten der Negativkontrolle sowie den OD-Werten der Positivkontrolle sind jeweils die Mittelwerte zu berechnen.
2. Vom OD-Wert der Probe und dem OD-Mittelwert der Positivkontrolle ist jeweils der OD-Mittelwert der Negativkontrolle abzuziehen.
3. Es ist das Verhältnis der OD der Probe zum OD-Mittelwert der Positivkontrolle nach der folgenden Formel zu berechnen:

$$\text{S/P-Quotient} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}$$

4. Aus dem S/P-Quotienten bei einer Verdünnung von 1:500 kann der Endpunkttiter nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Log}_{10} \text{Titer} = 1,54 (\text{Log}_{10} \text{S/P}) + 3,77$$

Eine automatische Testauswertung inklusive der Titerkalkulation und der Gruppierung der Ergebnisse in 19 Titergruppen ist mit Hilfe der Software FlockSoft™ möglich. Die Zuordnung negativer Testergebnisse erfolgt zur Titergruppe 0, positiver Testergebnisse zu den Titergruppen 1 bis 18 entsprechend dem S/P-Quotienten. Nähere Informationen zur Anwendung der Software FlockSoft™ sind dem Handbuch zu entnehmen.

Beurteilung

- **Proben mit einem S/P-Quotienten $< 0,3$ werden als negativ befundet.** Spezifische Antikörper gegen AIV wurden nicht nachgewiesen.
- **Proben mit einem S/P-Quotienten $\geq 0,3$ werden als positiv befundet.** Zur Überprüfung eines positiven Befundes wird der FLOCKTYPE® recAIV Verification ELISA empfohlen. In diesem Test werden seltene unspezifische Wechselwirkungen erfasst, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.