

# FLOCKTYPE® recNDV

ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Newcastle Disease Virus im Huhn



## Gebrauchsinformation

*in vitro*-Diagnostikum für Tiere

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17 c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: FLI-B 394

## Verwendungszweck

Der FLOCKTYPE® recNDV ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von Antikörpern gegen das Newcastle Disease Virus (NDV) in Serum- oder Plasmaproben vom Huhn.

## Allgemeine Informationen

Mit der Einführung der FLOCKTYPE®-Produktlinie präsentiert sich dem Anwender eine neue Generation von Testkits zur Geflügelbestandsdiagnostik. Durch die Verwendung rekombinanter Proteine als Antigen ist eine hohe Standardisierbarkeit aller FLOCKTYPE® ELISA-Kits gewährleistet.

Bei dem im FLOCKTYPE® recNDV ELISA verwendeten Antigen handelt es sich um ein rekombinant hergestelltes Protein des Newcastle Disease Virus. Das verwendete Nucleocapsid-Protein stellt ein wichtiges Strukturprotein des Virus dar. Der FLOCKTYPE® recNDV ELISA in Kombination mit der FlockSoft™-Auswertungssoftware ist in der Lage, die durch Impfung oder natürliche Infektion induzierten Antikörpertiter im Huhn zu erkennen und quantitativ darzustellen.

## Beschreibung des Testprinzips

Die Mikrotiterplatte ist mit rekombinant hergestelltem NDV-Antigen beschichtet. Während der Probeninkubation binden NDV-spezifische Antikörper an das immobilisierte Antigen, nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Die anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch ein Anti-Huhn-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-NDV-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 nichtinfektiösem NDV-Antigen | 2         | 5         |
| 2. Waschpuffer (10×), 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, NDV-reaktives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig   | 1x 2,5 ml | 1x 2,5 ml |
| 5. Negativkontrolle, NDV-negatives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig   | 1x 2,5 ml | 1x 2,5 ml |
| 6. Anti-IgY-HRP, Kaninchen-anti-Huhn-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). Nichtbenutzte 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 Einhaltung konstanter Zeiten bei der Farbreaktion 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!

## Reagenzien- und Probenvorbereitung

Waschpuffer:

Waschpuffer (10×), Flasche 2, 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen, z. B. für eine Testplatte 25 ml Waschpuffer (10×) 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.

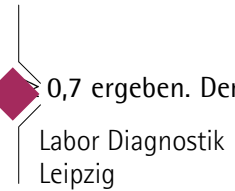
Vorlage für FLOCKTYPE® recNDV ELISA:

|   | 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:

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

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, fraglicher Testergebnisse zur Titergruppe 1 und positiver Testergebnisse zu den Titergruppen 2 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  $< 0,2$  werden als negativ befundet.** Spezifische Antikörper gegen NDV wurden nicht nachgewiesen.
- **Proben mit einem S/P-Quotienten  $\geq 0,2$  und  $< 0,3$  werden als fraglich befundet.** Fragliche Ergebnisse werden der Mehrheit der positiven oder negativen Ergebnisse zugeordnet. Zur Abklärung fraglicher Ergebnisse werden Wiederholungsuntersuchungen im Abstand von einigen Wochen empfohlen. Bei erstmalig bzw. frisch geimpften Tieren können fragliche Testergebnisse ein Hinweis auf eine beginnende Zunahme spezifischer Antikörper sein. Bei mehrfach geimpften Tieren sind fragliche Testergebnisse ein Hinweis auf eine unzureichende Bildung oder die Abnahme spezifischer Impfantikörper.
- **Proben mit einem S/P-Quotienten  $\geq 0,3$  werden als positiv befundet.** Es wurden spezifische Antikörper gegen NDV nachgewiesen.