

## Equine Infectious Anemia Virus Antibody Test Kit

VMRD EIAV AGID

Agargel-Immundiffusionstest zum Nachweis von Antikörpern gegen EIAV

### Gebrauchsinformation

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17 c TierSG zugelassen.  
Zulassungs-Nr.: FLI-B 490

Hersteller: VMRD Inc., P.O. Box 502, Pullman, WA 99163, USA  
USDA Zulassungsnummer 5515.21

Der Vertrieb in Deutschland erfolgt durch:

Labor Diagnostik GmbH Leipzig  
Deutscher Platz 5b - 04103 Leipzig  
Tel: ++49 (0)341 12454-26  
Fax: ++49 (0)341 12454-60  
www.lab-leipzig.de

### Verwendungszweck

Der Equine Infectious Anemia Virus Antibody Test Kit, ist ein Agargel-Immundiffusionstest (AGID) zum Nachweis präzipitierender Antikörper gegen das p26-Kernprotein des Virus der Equinen Infektiösen Anämie (EIAV) in Serum- und Plasmaproben von Equiden.

### Allgemeine Informationen

Der EIAV AGID weist präzipitierende Antikörper gegen rekombinantes EIA-Virusprotein (p26) nach. Positive Proben bilden eine Präzipitatlinie, die mit der Linie der Positivkontrolle verschmilzt oder sie lenken die Linie der Positivkontrolle in Richtung Antigenvertiefung ab, ohne eine sichtbare Präzipitatlinie zu bilden. Bei negativen Seren kommt es weder zur Ausbildung einer Präzipitatlinie zwischen Probe und Antigen, noch zur Ablenkung der Positivkontrolle in Richtung Antigenvertiefung.

### Reagenzien

<b>A</b> Antigen, EIAV p26	1 Flasche, 3,35 ml
<b>R</b> Reference Positive Control Serum / Positivkontrolle	1 Flasche, 10 ml

Im Kit enthaltene Reagenzien sind ausreichend für bis zu 200 Untersuchungen. Die Reagenzien enthalten ein Konservierungsmittel (0,09 % Natriumazid).

### Bestellinformation

VMRD EIAV AGID (Coggins-Test)    200 Reaktionen

Artikelnummer VMRD400-200

## **Benötigte Materialien, die nicht mitgeliefert werden**

Heizplatte, Autoklav oder Mikrowelle, Waage, Messzylinder, Pipetten mit variablem Pipettiervolumen, Einwegpipettenspitzen, Kühlschrank, 7-Loch-Gelstanze, Vakuum-Pumpe oder Wasserstrahlpumpe, Plastischale, feuchte Kammer oder Inkubator, Lichtquelle (Schräglicht), 45 °C Wasserbad (empfohlen, aber nicht unbedingt benötigt), Noble Agar, Natriumhydroxid (NaOH), Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), destilliertes oder entionisiertes Wasser, Plastik-Petrischalen oder Plastikwannen.

## **Lagerung**

Alle Reagenzien müssen bei 2–7 °C gelagert werden. (Nicht gefroren lagern!)

Die Reagenzien sind bei Einhaltung der angegebenen Lagerbedingungen bis zum Ablauf des aufgedruckten Haltbarkeitsdatums stabil. Der Testkit darf nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## **Vorsichtsmaßnahmen**

Während des Umgangs mit Reagenzien und Serum- oder Plasmaproben ist das Essen, Trinken und Rauchen zu unterlassen. Nicht mit dem Mund pipettieren! Die Reagenzien enthalten Natriumazid – gesundheitsschädlich. Falls Reagenzien verschluckt werden, suchen Sie einen Arzt auf. Beachten Sie die Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge beim Umgang mit Natriumhydroxid. Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht verunreinigt und nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen vermischt werden. 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!

## **Herstellung von Agargel**

1. Stellen Sie Boratpuffer her, indem Sie 2 g Natriumhydroxid und 9 g Borsäure zu 1 l destilliertem Wasser hinzugeben. Der pH-Wert des Puffers sollte  $8,6 \pm 0,1$  betragen.
2. Geben Sie 1 % Noble Agar zum Boratpuffer, z. B. 1 g Noble Agar zu 99 g Boratpuffer geben.
3. Kochen und mischen Sie bis alle Reagenzien gelöst sind und autoklavieren Sie dann bei 121 °C für 7 Minuten. Alternativ können Sie die Agar-/Pufferlösung in 30 Sekundenintervallen in der Mikrowelle für ca. 3 Minuten erhitzen bis der Agar völlig gelöst ist.
4. Kühlen Sie die Lösung auf 45 °C und geben Sie diese in eine Petrischale oder eine Plastikwanne (z. B. 15 ml der Lösung in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser oder 11 ml der Lösung in eine 45 x 90 mm Plastikwanne). Der Agar sollte ca. 3 mm dick sein.
5. Der fertige Agar sollte in einer staubarmen Umgebung abkühlen. Die Petrischalen sollten dabei nicht abgedeckt sein, um ein Abziehen von Wasserdampf zu ermöglichen. Es wird empfohlen, die frisch vorbereiteten Platten vor Verwendung über Nacht bei 2–8 °C zu lagern. Die Petrischalen oder Platten können in verschlossenen Plastikbeuteln bis zu einer Woche gelagert werden. Vor Verwendung sollte der Agar überprüft werden, um sicherzustellen, dass er weder eingetrocknet noch mit Kondenswasser bedeckt ist.

## **Stanzen der Vertiefungen in das Agargel**

Verwenden Sie eine 7-Loch-Stanze mit sechs zirkulär angeordneten Stanzen und einer Stanze in der Mitte (Abb. 1). Die Vertiefungen sollen 2,4 mm voneinander entfernt und 5,3 mm im Durchmesser sein. Der Agar darf erst gestanzt werden, wenn er ausreichend fest geworden und auf 2–7 °C abgekühlt ist.

Die Agar-Stanzstücke sind vollständig mittels Metall- oder Glashohlnadeln mit einem Innendurchmesser der Spitze von 1–2 mm, Außendurchmesser der Spitze kleiner 5 mm, mittels Vakuum, abzusaugen. Achten Sie darauf, dass Sie den umliegenden Agar nicht von der Unterlage ablösen. Wenn sich in den Stanzvertiefungen noch Flüssigkeit befindet, sollte diese erst abgesaugt werden bzw. verdunsten. Die Platten sollten unmittelbar vor Gebrauch gestanzt werden.

## Füllen der Vertiefungen und Inkubation der Agar-Platten

Etwa 50 µl vom Antigen (A) werden in die mittlere Stanzvertiefung pipettiert.

Etwa 50 µl der Positivkontrolle (R) werden jeweils in die Vertiefungen zwischen den für die Proben vorgesehenen Vertiefungen pipettiert (Abb. 1). Durch diese Anordnung entsteht zu beiden Seiten jeder Probe eine positive Kontrolllinie, was eine genaue Bestimmung übereinstimmender Linien ermöglicht.

In die verbleibenden 3 Vertiefungen werden jeweils etwa 50 µl Probe pipettiert. Es können Serum- oder Plasmaproben getestet werden, wobei im Plasma enthaltene Antikoagulantien einen Schleier um diese Probenvertiefungen hervorrufen können.

Die Probenvertiefungen sollten vollständig und ohne Meniskus gefüllt sein, so dass sie glatt mit der Agaroberfläche abschließen. Positivserum, Probe oder Antigen dürfen nicht auf die Agaroberfläche laufen. In Abhängigkeit von der Schichtdicke des Agars und den Abmessungen der verwendeten Lochstanze kann es erforderlich sein, etwas mehr oder weniger als 50 µl Positivserum, Probe oder Antigen zu verwenden, um die Vertiefungen exakt zu befüllen. Lassen Sie die Reagenzien einige Minuten eindiffundieren bevor Sie die befüllten Platten transportieren, um ein Aus- bzw. Überlaufen zu vermeiden. Die Platten werden bei Raumtemperatur (20-25 °C) in einer geschlossenen feuchten Kammer inkubiert. Wenn die Raumtemperatur außerhalb dieses Bereiches liegt, sollte ein Inkubator mit 22 °C verwendet werden.

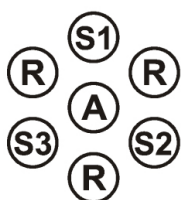


Abb. 1

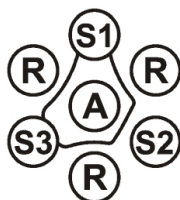


Abb. 2



Abb. 3

## AbleSEN der Testergebnisse

Ein heller, gebündelter Lichtstrahl (Schräglcht) gewährleistet die richtige Beleuchtung. Die Lichtquelle soll höhenverstellbar und in der Intensität regulierbar sein. Die Betrachtung sollte gegen einen schwarzen Hintergrund erfolgen. Ein Vergrößerungsglas kann in einigen Fällen hilfreich sein. Auswertegeräte für gefärbte Immundiffusionstests sind nicht geeignet.

Mindestens 24 Stunden sind für eine komplette Immundiffusionsreaktion notwendig. Wenn die Reaktion nach 24 Stunden vollständig ist, kann das Ergebnis protokolliert werden. Die Reaktion ist vollständig, wenn die positiven Kontrolllinien bis in die Stanzvertiefung einer negativen Probe hineinlaufen oder wenn sich eine deutliche, spezifische Linie von der Probe bis zur Positivkontrolle ausgebildet hat. Einige schwach positive Proben benötigen 48 Stunden bis die Reaktion vollständig ausgeprägt ist. Daher sollten negative oder schwach positive Proben mindestens 48 Stunden inkubiert werden. Der Typ der Reaktionslinie variiert mit dem Antikörpergehalt der Probe. Die Präzipitatlinie der Positivkontrolle ist die Grundlage für die Testablesung. Wenn diese nicht als deutliche Linie ausgebildet ist, dann ist der Test nicht valide und muss wiederholt werden.

### 1. Negativ:

Im Bereich zwischen Probenvertiefung (S1) und Antigenvertiefung (A) wird keine Präzipitatlinie ausgebildet. Die Präzipitatlinie der Positivkontrolle (R) verlängert sich ohne oder nur mit leichter Ablenkung weg von der Antigenvertiefung (A) bis zur Probenvertiefung (S1), (Abb. 2).

### 2. Positiv:

Es wird eine deutliche Präzipitatlinie zwischen Antigen (A) und Probe (S2) ausgebildet. Die Präzipitatlinie der Probe (S2) verschmilzt mit der Linie der Positivkontrolle (R) und bildet mit ihr eine durchgehende Linie, (Abb. 2).

### 3. Schwach positiv:

Es wird keine komplette Präzipitatlinie zwischen Antigen (A) und Probe (S3) ausgebildet. An der Stelle der Probenvertiefung (S3) ist die Präzipitatlinie der Positivkontrolle (R) leicht in Richtung Antigenvertiefung (A) und weg von der Vertiefung der Positivkontrolle (R) abgelenkt. Diese Reaktionen erfordern eine sehr gründliche Ablesung, da sie leicht übersehen werden können. Alle schwach positiven Proben sollten zur Absicherung nachuntersucht werden, (Abb. 2).

Schwach positive Reaktionen können 3 mögliche Ursachen haben:

- a) Maternale Antikörper: Fohlen infizierter Stuten können bis zum 5. Lebensmonat schwache bis mittelstarke Reaktionen zeigen. In solchen Fällen sollte das Fohlen ab 6. Lebensmonat noch einmal nachgetestet werden.
- b) Probennahme während der Inkubationszeit: In solchen Fällen sollte eine nach 2-3 Wochen eingesandte Probe deutlich stärker reagieren.
- c) Klinisch inapparente infizierte Tiere: Solche Tiere zeigen häufig auch bei Nachuntersuchungen nur schwach positive Reaktionen.

#### **4. Stark positiv:**

Die Präzipitatlinie der Probe (S1) erscheint als breite, diffuse Bande und liegt sehr nah an der Antigenvertiefung (A), besonders wenn die Platte nach 24 Stunden ausgewertet wird. Die Präzipitatlinie der Positivkontrolle geht mit deutlichem Abstand vor der Probenvertiefung (S1) und nahe der Antigenvertiefung in die Präzipitatbande der Probe (S1) über (Abb. 3). Solche Proben können in 2er-Schritten seriell verdünnt wiederholt getestet werden.

#### **5. Unspezifische Linien:**

Solche Linien können zwischen der Antigen- und der Testserumvertiefung auftreten. Es können auch unspezifische Linien zwischen der Positivkontrolle und der Testserumvertiefung auftreten.

Die Präzipitatlinien der Positivkontrolle verlaufen jedoch durch diese unspezifischen Linien hindurch bis in die Testserumvertiefung (ohne Abb.). Unspezifische Linien verbinden sich nicht mit den Präzipitatlinien der Positivkontrollen zu einer durchgehenden Linie. Die Positivkontrolllinien bilden mit einer unspezifischen Linie auch spitzere Winkel als mit einer EIAV-spezifischen Linie. Unspezifische Banden entstehen durch Reaktionen der Proben-Antikörper mit anderen Antigenen als dem p26 des EIAV. Die spezifische EIAV-Linie einer Probe kann jedoch auch mit einer unspezifischen Linie überlagert sein (Abb. 3, S2). Man sollte darauf achten, dass eine spezifische Linie nicht aufgrund einer Überlagerung mit einer unspezifischen Linie übersehen wird. Die Nachuntersuchung solcher Proben zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten hilft, den Probenstatus abzuklären.

#### **6. Schleier um die Vertiefung:**

Durch Fett oder anderes in der Probe vorhandenes Material kann sich um die Probenvertiefungen herum ein Schleier bilden, wodurch die Präzipitatlinien der Probe bzw. der Positivkontrollen dort schwierig zu erkennen sind (Abb. 3, S3). Wenn der Test nach 24 und 48 Stunden abgelesen wird, kann mitunter das Ergebnis bestimmt werden, bevor der Schleier die Reaktionen verdeckt. Wenn jedoch keine Auswertung möglich ist, sollte eine andere Probe angefordert werden.

Alle Proben mit zweifelhaften Reaktionen sollten in Doppelbestimmung wiederholt werden.

### **Interpretation der Testergebnisse**

EIAV-infizierte Pferde sind lebenslang Virusausscheider, auch wenn solche Tiere über Monate oder Jahre keine klinischen Symptome zeigen. Deshalb muss jedes adulte Pferd mit positivem Testergebnis als EIAV-infiziert betrachtet werden.

