

Allgemeine Informationen

Dieses Testkit dient dem Nachweis von Antikörpern gegen das Nukleinprotein des Influenza A Virus in Serum und Plasma von Geflügel und Schweinen. Der Test kann auch für Speichelproben von Schweinen angewandt werden.

Testprinzip

Die **Mikrotiterplatten** sind mit dem Nukleoprotein (NP) beschichtet.

Die zu untersuchenden Proben sowie die Kontrollproben werden in die Vertiefungen verteilt.

Wenn NP Antikörper vorhanden sind, formen diese einen Antigen-Antikörperkomplex, der die NP Epitope „maskiert“.

Ein **Anti-NP Konjugat**, gekoppelt an das Enzym Peroxydase (**Po**), wird in den Vertiefungen verteilt. Es bindet sich an die freigebliebenen NP Epitope und bildet mit diesen einen Antigen-Konjugat-Peroxydasekomplex.

Nach Beseitigung des überschüssigen Konjugats durch Waschen wird das **Substratlösung (TMB)** zugesetzt.

- Die daraus resultierende Färbung hängt von der Menge spezifischer Antikörper in der Probe ab.
- Sind keine Antikörper in der Probe vorhanden, erfolgt eine Blaufärbung, die sich nach dem Zusetzen der **Stopplösung** in eine Gelbfärbung umwandelt.

Sind Antikörper vorhanden, erfolgt keine Färbung.

Ablesbar bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Kitkomponenten

Reagenzien	2P	5P	10P
Beschichtete Mikrotiterplatten	2	5	10
Konjugat, 10-fach konzentriert	3 ml	3 ml	2 x 3 ml
Positivkontrolle (nicht infektiös)	1 ml	1 ml	1 ml
Negativkontrolle	1 ml	1 ml	1 ml
Verdünnungsmittel 3	60 ml	60 ml	60 ml
Verdünnungsmittel 2	60 ml	2 x 60 ml	4 x 60 ml
Waschlösung, 20-fach konzentriert	60 ml	2 x 60 ml	3 x 60 ml
Substratlösung (TMB)	60 ml	60 ml	60 ml
Stopplösung	60 ml	60 ml	60 ml

1. Das Konjugat, die Kontrollen und die Substratlösung müssen bei 5°C gelagert werden (+/- 3°C).
2. Die anderen Reagenzien können zwischen 2°C und 26°C gelagert werden.

Anmerkung: Wenn nötig, kann ID VET Ihnen zusätzliche Mengen der oben genannten Komponenten liefern.

Erforderliches, nicht im Kit mitgeliefertes Material

1. Präzisionspipetten oder Multikanalmikropipetten, anwendbar für folgende Volumina: 10 µl, 100 µl, 200 µl
2. Einmalansatzstücke für Pipetten
3. Photometer für Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen
4. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
5. Manuelles oder automatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten

Anmerkungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nicht mit dem Mund pipettieren!
2. Die Substratlösung kann Hautreizungen verursachen.
3. Die Stopplösung (0,5M) kann bei Verschlucken schädlich sein. Kann bei Hautkontakt Irritationen verursachen (**R22-43**). Hautkontakt vermeiden (**S24-37**).
4. Die Substratlösung darf weder direktem Licht noch oxidierenden Mitteln ausgesetzt werden.
5. Alle Reagenzien müssen vor ihrer fachgerechten Entsorgung neutralisiert bzw. gefahrlos gemacht werden.
6. Alle benutzten Einmalmaterialien müssen vor der Entsorgung entgiftet werden. Dies geschieht durch einstündiges Eintauchen in frisch zubereitetes 5-prozentiges Natriumhypochlorit oder in einem Autoklaven bei 120°C.

Vorbereitung der Proben

Um unterschiedliche Inkubationszeiten der Proben zu vermeiden, ist es möglich eine Vorplatte (96 Vertiefungen) mit den zu untersuchenden Proben sowie den Kontrollproben vorzubereiten und diese anschließend mit Hilfe einer Multikanal-mikropipette in die Elisa-Platte zu übertragen.

Vorbereitung der Waschlösung

Wenn nötig, die **20-fach konzentrierte Waschlösung** auf Raumtemperatur bringen (21°C +/- 5°C) und gut schütteln, um sicher zu stellen, dass die **konzentrierte Waschlösung** vollständig aufgelöst ist.

Die **Waschlösung** wird durch Verdünnung der **20-fach konzentrierten Waschlösung** mit destilliertem/deionisiertem Wasser erreicht.

Testausführung

Alle Reagenzien müssen vor der Durchführung des Tests Raumtemperatur erreicht haben sowie durch Umdrehen oder durch Vortex homogenisiert werden.

1. INKUBATION DER PROBEN

Beachten Sie die unterschiedlichen Verdünnungen für die verschiedenen Tierarten.

Anmerkung: Es sind Protokolle für die angegebenen Tierarten beschrieben. Kontaktieren Sie ID VET, wenn Sie andere Tierarten testen wollen.

Für Seren und Plasma von Hühnern und Truthähnen:

- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** in alle Vertiefungen pipettieren.
- 10 µl **Positivkontrolle** in die Vertiefungen A1 und B1 pipettieren.
- 10 µl **Negativkontrolle** in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
- 10 µl jeder zu testenden Probe in jeweils eine Vertiefung pipettieren.

Für Seren und Plasma von Enten, Gänsen und Straussen:

- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Positivkontrolle** in die Vertiefungen A1 und B1 pipettieren.
- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Negativkontrolle** in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
- 190 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl jeder zu testenden Probe in die restlichen Vertiefungen pipettieren.

Für Seren und Plasma von Schweinen:

- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Positivkontrolle** in die Vertiefungen A1 und B1 pipettieren.
- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Negativkontrolle** in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
- 200 µl **Verdünnungsmittel 2** und 5 µl jeder zu testenden Probe in die restlichen Vertiefungen pipettieren.

Für Speichelproben von Schweinen:

- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Positivkontrolle** in die Vertiefungen A1 und B1 pipettieren.
- 90 µl **Verdünnungsmittel 2** und 10 µl **Negativkontrolle** in die Vertiefungen C1 und D1 pipettieren.
- 50 µl **Verdünnungsmittel 2** und 50 µl jeder zu testenden Probe in die restlichen Vertiefungen pipettieren.

2. Die Platte abdecken und 1 Stunde +/- 5 min. inkubieren bei 37°C (+/-3°C).
3. **Fünfmaliges Waschen** jeder Vertiefung mit ca. 300 µl Waschlösung. Das Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschvorgängen ist zu vermeiden.
4. **Vorbereitung des Konjugats** durch Verdünnung des **zehnfach konzentrierten Konjugats** mit dem **Verdünnungsmittel 3**.
5. Jeweils **50 µl des Konjugats** in jede Vertiefung pipettieren.
6. **30 min +/- 2 min. inkubieren** bei 21°C (+/- 5°C).
7. **Dreimaliges Waschen** jeder Vertiefung mit ca. 300 µl Waschlösung. Das Austrocknen der Vertiefungen zwischen den einzelnen Waschvorgängen ist zu vermeiden.
8. Jeweils **50 µl der Substratlösung** in jede Vertiefung pipettieren. **10 min. +/- 1 min.** unter Lichtausschluß inkubieren.
9. Jeweils 50 µl der Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren, um die Reaktion zu beenden.
10. Messung und Auswertung der optischen Dichten bei 450 nm.

Auswertung

Ausrechnen des S/N Prozentsatzes für jede Probe.

$$S/N\% = OD_{\text{Probe}} / OD_{\text{NK}} \times 100$$

Für Proben von Hühnern und Truthähnen:

S/N%	Auswertung
≤ 55%	Positiv
> 55% und < 65%	Fraglich
≥ 65%	Negativ

Für Proben von Enten, Gänse, Straussen und Schweinen:

S/N%	Auswertung
≤ 45%	Positiv
> 45% und < 50%	Fraglich
≥ 50%	Negativ

Das IDSoft™ Programm zur Datenanalyse ist über die IDvet Homepage erhältlich: <http://www.id-vet.com/support/software/>

Diese Software kann die verschiedenen Parameter berechnen (Validationskriterien, S/P% Werte, Titer, Impfzeitpunktbestimmung, Gruppen) und beinhaltet eine graphische Auswertung der serologischen Profile der getesteten Tiere.

Validierung

Der Test ist gültig, wenn:

- ✓ Der Mittelwert der optischen Dichte der Negativkontrollen (OD_{NK}) größer als 0,7 ist.

$$OD_{\text{NK}} > 0,7$$

- ✓ Der Mittelwert der optischen Dichte der Positivkontrolle (OD_{PK}) kleiner als 30% der OD_{NK} ist.

$$OD_{\text{PK}} / OD_{\text{NK}} < 0,3$$

ID Screen®

Influenza A Antibody Competition



Gebrauchsinformation

Zul.-Nr. FLI-B 438

Kompetitions-ELISA Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Nukleoprotein des Influenza A Virus in Serum und Plasma von Geflügel und Schweinen sowie in Speichelproben von Schweinen

192 / 480 oder 960 Reaktionen

In-vitro Diagnostikum für Tiere

FLUAcA ver 1116 DE

007203