

## Flu DETECT™ BE

### ELISA-KIT ZUM NACHWEIS VON SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN GEGEN DAS AVIÄRE INFLUENZA-VIRUS IN SERUM UND PLASMA (EINZELPROBEN)

#### MONOPHASISCHER BLOCKING ELISA

480 Einzelreaktionen

In-vitro Diagnostikum für Pute, Huhn, Ente und Gans  
Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17c TierSG amtlich zugelassen.  
Zul.-nr.: FLI-B 488

#### I. EINLEITUNG

Das Influenza Typ A Virus kann aviäre, porcine, equine und andere Arten, wie auch den Menschen infizieren.  
Sechzehn serologisch unterschiedliche Neuramidase-Subtypen und neun Hämagglutinin-Subtypen dieses Virus wurden von aviären Spezies isoliert.  
Die Subtypen H5 und H7 werden in Verbindung gebracht mit signifikanten Verlusten. Anzeichen einer Erkrankung beim Geflügel reichen von leicht verminderter Legeleistung in der Eiproduktion bis hin zu schweren Infektionen mit hoher Mortalität. Infektionssymptome umfassen Probleme der respiratorischen Organe, Ödeme im Bereich des Kopfes oder Diarrhöe.

#### II. ANWENDUNGSGEBIET

Flu DETECT™ BE ist ein in-vitro Immunoassay zum qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen alle 16 Subtypen des aviären Influenza-Virus (AIV).  
Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass keine Antikörper gegen das AIV in der Probe vorhanden sind.  
Proben mit einem positiven Testergebnis sollten zur Bestätigung und zur genauen Bestimmung des Subtyps an das zuständige Referenzlabor übermittelt werden.

#### III. TESTPRINZIP

Flu DETECT™ BE Kit ist eine immunenzymatische Methode, mit der Antikörper gegen das aviäre Influenza A Virus detektiert werden können. Der Test verläuft in drei Schritten:

- Die jeweiligen Serum- bzw. Plasmaproben werden in die Testpalatte gegeben, deren Kavitäten mit viralem Nucleoprotein-Antigen (NP) beschichtet sind. In der Probe vorhandene Antikörper binden an das Antigen der Beschichtung.
- Nachdem die Flüssigkeit aus den Kavitäten der Testplatte entfernt wurde, wird ein anti-AIV-Antikörper zugegeben, der mit einem HRP-Peroxidaseenzym konjugiert ist.  
Dieser monoklonale Antikörper bindet an drei antigene Epitope des viralen Nucleoproteins und bildet den Komplex:  
(Ag) - (anti- NP-mAk / Peroxidase).
- Überschüssiges Konjugat wird durch Waschen entfernt.  
Durch die Zugabe von Peroxidase-Substrat erhält man eine grünliche Färbung der Proben in den Kavitäten. Die entsprechenden Absorptionswerte werden bei einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm bestimmt.  
- Sind in der Probe keine Antikörper vorhanden, kommt es zu einer Farb-reaktion, hervorgerufen durch das konjugierte Enzym, das an das Antigen der beschichteten Kavität gebunden ist.  
- Bei Präsenz von anti-AIV-Antikörpern in der Probe kann weniger konjugiertes Enzym gebunden werden, wodurch die Farbentwicklung vermindert wird.

#### IV. ZUSAMMENSETZUNG UND AUFBEWAHRUNG

ZUSAMMENSETZUNG	REKONSTITUTION UND AUFBEWAHRUNG
5 Mikrotiterplatten mit 12 Streifen a 8 Kavitäten, beschichtet mit viralem Nucleoprotein-Antigen (NP)	Innerhalb von vier Wochen nach Öffnen des Beutels verbrauchen. Nach Gebrauch Beutel wieder verschließen.
Konjugat: NP-spezifische mAk - Peroxidase (CJ), 700 µl (100 X konzentriert)	Mit Verdünnungspuffer (DB) 1:100 verdünnen. Nach Verdünnung innerhalb von zwei Stunden verwenden.
gepuffertes Peroxidase-Substrat (ABTS), 60 ml	gebrauchsfertig
Negative Kontrolle (NC), 2500 µl	gebrauchsfertig
Positive Kontrolle (PC), 2500 µl	gebrauchsfertig
Waschlösung (W) (20X konzentriert), 200 ml	Mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser 1:20 verdünnen. Verdünnte Lösung innerhalb von 48 Stunden verbrauchen.
Verdünnungslösung (DB) für Proben- und Konjugatverdünnung, 150 ml	gebrauchsfertig
Stopplösung (S) (5X konzentriert), 25 ml	Mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser 1:5 verdünnen. Verdünnte Lösung innerhalb von 48 Stunden verbrauchen.
15 Folien	zum Abdecken der Platten

**Hinweis:** Den Kit und verdünnte Reagenzien bei +5 ± 3°C lagern und wie oben beschrieben verwenden.

#### V. ZUSÄTZLICH NOTWENDIGES MATERIAL

- Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser
- Präzisionspipetten (Bereich 0-1000 µl)
- Einmalpipettenspitzen
- Messzylinder (100 und 1000 ml)
- Manuelle, halbautomatische oder automatische Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten
- Photometer für Mikrotiterplatten monochromatisch, Filter 405 oder 410 nm

#### VI. VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Qualität der Ergebnisse hängt von der Beachtung der guten Laborpraxis und der Testdurchführungsvorschriften ab (s. VI).

- Die Reagenzien aus Kits verschiedener Chargen nicht mischen!
- Reagenzien nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien mindestens eine Stunde vor Gebrauch der Raumtemperatur aussetzen.  
**Hinweis:** Nur die in den folgenden Schritten verwendeten Reagenzien sind betroffen.
- Alle Reagenzien und Proben wie infektiöses Material behandeln.
- Alle Reagenzien von Haut und Augen fern halten. Bei Kontakt sofort mit kaltem Wasser abwaschen.
- Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Vermeiden Sie eine Kontamination zwischen den Proben während der Entnahme, der Lagerung oder des Transportes. Verwenden Sie neue Einweg-Pipettenspitzen für jede Probe.
- Die Kontamination des Substrats mit metallischen Ionen, Oxidanzien oder Detergenzien ist zu vermeiden. Vergewissern Sie sich, dass alle Behältnisse sauber sind. Nicht dasselbe Behältnis oder dieselbe Pipettenspitze für das Konjugat und Substrat verwenden.
- Es wird empfohlen, Reagenzien und kontaminiertes Material gemäß den üblichen Vorschriften zu entsorgen. Das Sicherheitsdatenblatt für dieses Produkt ist auf Anfrage erhältlich.

#### Gefahren (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze):

- R23/25: Giftig beim Einatmen und Verschlucken  
R35: Verursacht schwere Verätzungen  
R36/37/38: Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut  
R41: Gefahr ernster Augenschäden  
R42/43: Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich  
S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)  
S7: Behälter dicht geschlossen halten  
S24: Berührung mit der Haut vermeiden  
S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und den Arzt konsultieren  
S30: Niemals Wasser hinzugießen

## VII. PROBEN

Zur serologischen Routineüberwachung der Herden wird empfohlen, mindestens 30 Serumproben pro Herde nach dem Zufallsprinzip in festgelegten Zeitintervallen zu nehmen.

**Zur Erzielung optimaler Spezifität und somit Minimierung falsch-positiver Reaktionen sollten sehr fetthaltige oder mit Bakterien kontaminierte Proben nicht verwendet werden.**

Die Reaktion wird durchgeführt mit Einzelproben von Serum oder Plasma in einer Verdünnung von 1:4.

Hinweise zur Probenlagerung:

Probe	gekühlt (+5°C)	gefroren (-20°C)	Raumtemperatur (+23°C)
Serum oder Plasma	max. 4 Tage	ja	nein

## VIII. ANWENDUNG DES TESTS

Bitte befolgen Sie die folgenden Hinweise genau. Verwenden Sie die Negativ- und Positivkontrolle jeweils doppelt für jeden Ansatz oder Platte.

### A. VORBEREITUNG

Die Position und Verteilung der Kontrollen und Proben ist genau zu notieren.

#### 1. Präparation der Proben:

Bei größerer Probenmenge:

- Pipettieren Sie mindestens 100 µl der jeweiligen Proben in eine leere unbeschichtete Mikrotiterplatte.
- Kavitäten A1 bis A4 sind leer zu lassen.
- Gefrorene Proben müssen vollständig aufgetaut sein und vor der Verwendung gründlich gemischt werden.

#### 2. Herstellen der Konjugatlösung

HRP-konjugierter anti-NP Antikörper wird als Stammlösung mitgeliefert. Diese wird mit dem Verdünnungspuffer (DB) 1:100 verdünnt.

**Sorgfältig mischen!** Für eine komplette ELISA-Platte mit 96 Kavitäten werden 10 ml verdünnte Konjugatlösung benötigt.

#### 3. Herstellen der Waschlösung

Das Konzentrat der Waschlösung ist mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser 1:20 zu verdünnen. **Sorgfältig mischen!**

Für eine komplette ELISA-Platte mit 96 Kavitäten werden 500 ml benötigt.

#### 4. Substrat

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Für eine komplette ELISA-Platte mit 96 Kavitäten werden 10 ml benötigt

#### 5. Verdünnung der Stopplösung

Das Konzentrat der Stopplösung ist mit destilliertem oder entmineralisiertem Wasser 1:5 zu verdünnen. **Sorgfältig mischen!**

Für eine komplette ELISA-Platte mit 96 Kavitäten werden 12,5 ml benötigt.

**Hinweis: In gekühltem Zustand kann es bei dem Konzentrat der Stopplösung zu weißen Ausfällungen kommen. Diese haben keinen Einfluss auf den Ablauf des Tests. Zur Auflösung ist die Stopplösung vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur oder 37°C zu erwärmen.**

### B. DURCHFÜHRUNG

#### I - VERTEILUNG DER PROBEN UND KONTROLLEN

##### 1. Verteilung der Proben:

Gefrorene Serumproben müssen vollständig aufgetaut sein und sorgfältig gemischt werden.

- Legen Sie 75 µl des Verdünnungspuffers in den Kavitäten der Testplatte vor. Die Kavitäten A1 bis A4 sind frei zu lassen!
- Geben Sie je 25 µl der Serumproben (Verdünnung 1:4) in die Kavitäten A5 bis H12. Das Pipettieren der Proben sollte so schnell wie möglich erfolgen!
- Testplatte vorsichtig schütteln.

##### 2. Verteilung der Kontrollen:

Reference : ASFLU5P1.ND version n°1 – 20/02/2011

Pipettieren Sie 100 µl der negativen Kontrolle (NC) in die Kavitäten A1 und A2 und 100 µl der positiven Kontrolle (PC) in die Kavitäten A3 und A4.

- Die Teststreifen sollten so in dem Rahmen angeordnet sein, dass ein automatischer Washer, sowie ein ELISA-Reader benutzt werden kann.
- Verschließen der Kavitäten mit den beiliegenden Folienstreifen.
- Testplatte vorsichtig schütteln!

#### 3. Inkubation der Testplatte

Inkubieren Sie die Testplatte 1h bei Raumtemperatur (+23 ±3°C).

Entfernen Sie die Flüssigkeit vollständig aus den Kavitäten der Platte.

**CAVE: DIE PLATTE NICHT WASCHEN!**

### II - ZUGABE DES KONJUGATS

#### 1. Verteilung des Konjugats:

Pipettieren Sie 100 µl des verdünnten Konjugats in sämtliche Kavitäten und verschließen Sie die Platte mit einem neuen Folienstreifen.

#### 2. Inkubation des Konjugat:

Inkubieren Sie 30 min bei Raumtemperatur (+23 ±3°C).

#### WASCHEN:

Nach dem vollständigen Entfernen der Flüssigkeit aus allen Kavitäten wird die Platte 5mal gewaschen.

**Die sorgfältige Durchführung der Waschschriffe hat entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Testergebnisse. Der Einsatz eines automatischen Waschgerätes wird dringend empfohlen!**

### III - SUBSTRATZUGABE UND MESSUNG DER ABSORPTION

#### 1. Substratzugabe:

Pipettieren Sie 100 µl des Peroxidase-Substrates (PS) in jede Kavität. Die Platte dieses mal **nicht** verschließen!

Testplatte vorsichtig schütteln.

#### 2. Inkubation des Substrats:

15 min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur (+23 ±3°C) inkubieren.

#### 3. Stopplösung:

Pipettieren Sie je 100 µl der verdünnten Stopplösung in jede Kavität.

Testplatte vorsichtig schütteln, die Bildung von Luftblasen ist zu vermeiden.

#### 4. Absorptionsmessung:

Messen Sie die Absorption bei 405 oder 410 nm.

## IX. VALIDIERUNG DES TESTS

Die Ergebnisse des *Flu* DETECT™ BE sind gültig wenn:

- der mittlere Absorptionwert der negativen Kontrollen (OD) (A1, A2) 0,500 +/- 0,15 ist.
- Das P/N Verhältnis der mittleren Absorptionwertes (OD) der positiven Kontrollen (A3, A4) unter 0,6 liegt.

Das P/N Verhältnis ergibt sich aus:

$$P / N = \frac{\overline{OD}(P)}{\overline{OD}(N)}$$

$\overline{OD}$  = Mittlere Absorptionswerte der negativen und positiven Kontrollen.

$\overline{OD}$  (N) = Mittelwert der Absorptionswerte der negativen Kontrollen

$\overline{OD}$  (P) = Mittelwert der Absorptionswerte der positiven Kontrollen

## X. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

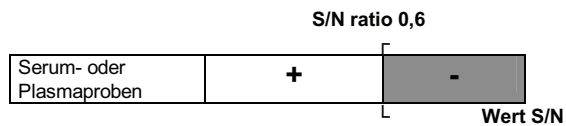
- Die jeweiligen Absorptionswerte der Proben sind durch den mittleren Absorptionswert der Kontrollen zu dividieren, dadurch erhält man das S/N.
- Für ein S/N-Verhältnis über oder 0,6 gleich gilt als negativ, unter 0,6 als positiv.

Das S/N-Verhältnis ergibt sich aus:

$$S / N = \frac{OD(S)}{\overline{OD(N)}}$$

OD (S) = Absorptionswerte der Proben

$\overline{OD}$  (N) = Mittelwert der Absorptionswerte der negativen Kontrollen



Für weitere Fragen wenden Sie sich bitte an uns:

SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming  
69367 LYON Cedex 07 – France  
Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10  
www.synbiotics.com techsupport@synbiotics.fr

NUR IN DER VETERINÄRMEDIZIN ZU VERWENDEN/  
GEBRAUCH NUR IN VITRO

Ausgewiesene Stellen für den Umweltschutz