

FLOCKTYPE® *Salmonella*

ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Salmonella Enteritidis* und *Salmonella Typhimurium* in Huhn und Pute



Gebrauchsinformation

in vitro-Diagnostikum für Tiere

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 17 c TierSG zugelassen.

Zulassungs-Nr.: BGW-B 322

Verwendungszweck

FLOCKTYPE® *Salmonella* ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von Antikörpern gegen Salmonellen in Serum- oder Plasmaproben von Huhn und Pute. Es werden Antikörper gegen die O-Antigene 1, 4, 5, 9 und 12 (z. B. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) nachgewiesen.

Allgemeine Informationen

Salmonella-Infektionen sind weltweit verbreitet und kommen bei allen Geflügelarten vor. Die besondere Bedeutung der *Salmonella*-Infektionen beim Wirtschaftsgeflügel besteht in der Gefahr der Übertragung der Bakterien auf den Menschen. Da die bakteriologische Identifizierung von Salmonellen in Geflügelbeständen wegen deren intermittierenden Ausscheidung schwierig ist, kann effektiv der Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen Salmonellen als Untersuchungsmethode verwendet werden. Die Antikörperdiagnostik mittels FLOCKTYPE® *Salmonella* ist als Screeningmethode für Geflügelbestände prädestiniert, um Salmonelleninfektionen, frühere Expositionen oder humorale Impfreaktionen nachzuweisen. Eine Differenzierung zwischen Antikörpern bzw. Antikörpertitern nach einer Immunisierung mit *Salmonella*-Impfstoffen oder nach einer Infektion mit *Salmonella*-Feldstämmen ist nicht möglich.

Der FLOCKTYPE® *Salmonella* ELISA ist in Kombination mit der FlockSoft™-Auswertungssoftware geeignet, die durch Impfung oder natürliche Infektion induzierten Antikörpertiter in Huhn und Pute zu erkennen und quantitativ darzustellen.

Beim Screening ist je nach Herdengröße und dem erwarteten Immunstatus auf eine statistisch abgesicherte Stichprobengröße zu achten. Da die Detektion der anti-Salmonellen-Antikörper über die eingesetzten O-Antigene erfolgt, können positive Ergebnisse nach Exposition mit verschiedenen Serovaren auftreten. Daher sollten die serologisch positiven Ergebnisse stets durch bakteriologische Untersuchungsverfahren bestätigt werden.

Beschreibung des Testprinzips

Die Mikrotiterplatte ist mit einem *Salmonella*-Lipopolysaccharid-Antigenmix beschichtet. Während der Probeninkubation binden *Salmonella*-spezifische Antikörper an das immobilisierte Antigen, nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Die anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt durch ein anti-IgY-Peroxidase-Konjugat. Ungebundenes Konjugat wird herausgewaschen 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-*Salmonella*-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 inaktiviertem <i>Salmonella</i> -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, <i>Salmonella</i> -reaktives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1x 2,5 ml	1x 2,5 ml
5. Negativkontrolle, <i>Salmonella</i> -negatives Serum vom Huhn, in Puffer mit Proteinstabilisatoren, gebrauchsfertig	1x 2,5 ml	1x 2,5 ml
6. Anti-IgY-HRP, Kaninchen-anti-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 Einhaltung konstanter Zeiten bei der Farbreaktion sind unabdingbare Voraussetzungen, um die Genauigkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Die Stopplösung enthält Schwefelsäure! Alle Reste von Proben und mit Proben in Berührung gekommene Gegenstände sind als potenziell infektiöse Materialien zu dekontaminieren bzw. zu entsorgen.

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 und die Testplatte abdecken.

Vorlage für FLOCKTYPE® *Salmonella* 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 sollen die OD-Werte der Positivkontrollen einen Wert von $\geq 0,7$ ergeben. Die OD-Werte der Negativkontrollen sollen $\leq 0,2$ 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:

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

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, 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

A) Feldinfektion

- **Proben mit einem S/P-Quotienten $< 0,2$ werden als negativ befundet.** Spezifische Antikörper gegen *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium oder andere Serovaren mit den O-Antigenen 1, 4, 5, 9 und 12 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 Testergebnisse zugeordnet. Zur Abklärung fraglicher Ergebnisse werden Wiederholungsuntersuchungen im Abstand von einigen Wochen empfohlen. Bei erstmalig bzw. frisch geimpften oder infizierten 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 *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium oder andere Serovaren mit den O-Antigenen 1, 4, 5, 9 und 12 nachgewiesen.

B) Impfung

Wegen den unterschiedlichen Impfverfahren (Adsorbatvakzinen, Lebendimpfstoffe) und bestandsspezifischen Faktoren lassen sich keine Grenzwerte angeben. Eine Immunisierung mit *Salmonella*-Lebendimpfstoffen führt erst nach einer mindestens zweimalig durchgeführten Impfung zu fraglich bzw. positiv zu beurteilenden Antikörperbefunden. Die Cut-Off-Werte für die Feldinfektionen können lediglich als Orientierungshilfen dienen. Jedes Labor sollte zur Überwachung von Impfbeständen eigene Parameter festlegen.