

Gebrauchsinformation

SARCOPTES-ELISA 2001[®] PIG

Test zum Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger der Schweineräude, *Sarcoptes scabiei var. suis*

In-vitro Diagnostikum für Schweine

Bestandteile des Kits:

- 1 Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten
(mit *Sarcoptes*-Antigen beschichtet)
- 50 ml Probenverdünnungspuffer
- 50 ml Waschpuffer (10-fach konzentriert)
- 12 ml Konjugatlösung
- 12 ml Substratlösung
- 12 ml Stopplösung
- 1,2 ml Positiv-Kontrollserum
- 1,2 ml Negativ-Kontrollserum

REF SEP-Kit


LOT

Chargenbezeichnung
siehe Etikett



Verwendbar bis
siehe Etikett

Zul.-Nr.: BGVV-B 335

 2...8°C



AFOSA GmbH • Ludwig-Erhard-Ring 3 • D-15827 Blankenfelde-Mahlow • Germany
Tel.: 033708-9381 85 • Fax: 033708-9381 86 • info@afosa.com • www.afosa.de

- **Schnelle und einfache Testdurchführung**
- **Gebrauchsfertige Reagenzien**

PRODUKTBESCHREIBUNG

Der SARCOPTES-ELISA 2001® Pig ist ein In-vitro-Diagnostikum zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Sarcoptes scabiei var. suis*, dem Erreger der Schweineräude, in Serumproben von Schweinen.

ALLGEMEINE INFORMATIONEN

Die Räudemilbe *Sarcoptes scabiei var. suis* ist der wichtigste Ektoparasit bei Schweinen. *Sarcoptes*-Milbeninfektionen verlaufen häufig subklinisch-chronisch und sind mit herkömmlichen Diagnosemethoden (Direktnachweis der Räudemilben) meist nicht nachweisbar. Insbesondere bei optimalen Haltungs- und Fütterungsbedingungen sowie hohem Gesundheitsstatus der Schweineherde ist der SARCOPTES-ELISA 2001® Pig das Mittel der Wahl zum Erkennen subklinischer *Sarcoptes*-Infektionen sowie zum Überwachen des Freiseins der Bestände von *Sarcoptes*-Milben. Da in solchen Herden nur ein Teil der Tiere mit Räudemilben befallen ist bzw. Anti-*Sarcoptes*-Antikörper aufweist, ist stets eine größere Anzahl von Tieren zu beproben. Nach Wendt (2004) wird für Sauenherden folgende Probenanzahl vorgeschlagen:

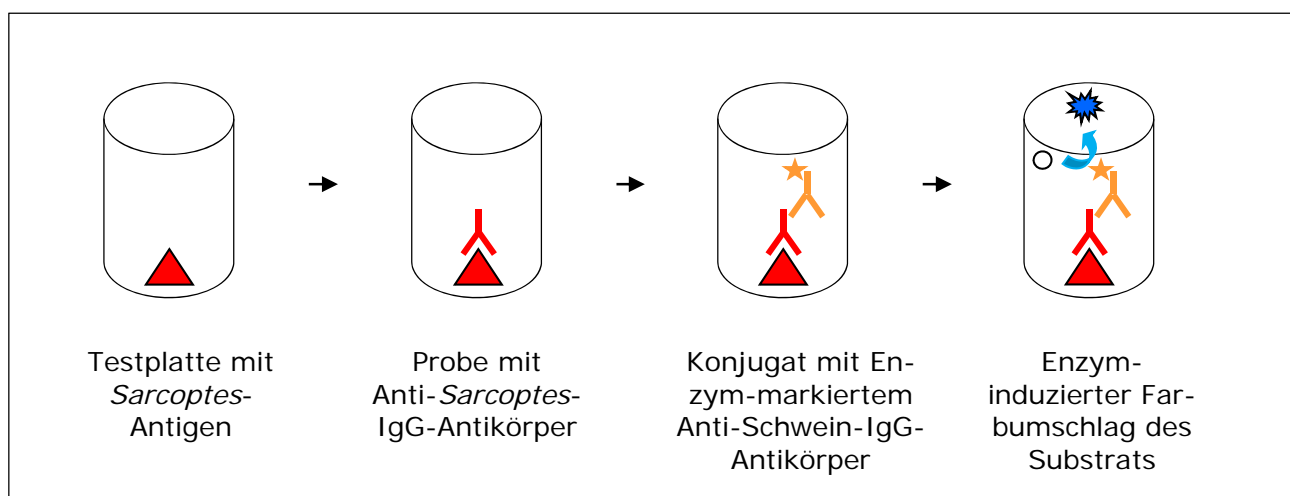
Herde (produktive Sauen gesamt)	Anzahl zu beprobende Sauen
bis 15	15
16 bis 30	15 bis 20
ab 30	20
ab 50	25
ab 100	30

Es sind zuerst klinisch verdächtige Tiere zu beproben. Liegt ein klinischer Verdacht nicht vor (z.B. bei Bestandsüberwachung), wird die Untersuchung von Sauen am Ende der Trächtigkeitsperiode empfohlen. Jüngere Tiere sind weniger geeignet, da bei einzelnen Jungschweinen trotz Hautkontakt mit Milbenträgern Anti-*Sarcoptes*-Antikörper erst nach dem 150. Lebensstag gefunden wurden. Serum von drei bis fünf Tage alten Ferkeln ist als Ersatz für Sauenserumproben möglich, kann bei Einzelproben aber zur Fehlbeurteilung führen. Bei klinischem Verdacht auf Räude (differentialdiagnostisch abzugrenzende Hautveränderungen, Auftreten von Juckreiz) wird die Beprobung von Schweinen jeden Alters empfohlen. Nach erfolgreicher medikamentöser Tilgung von *Sarcoptes*-Milben wurden persistierende Antikörper bei Sauen bis zu 12 Monate lang nachgewiesen, wobei nach erfolgreicher Therapie geborene Tiere eigene Anti-*Sarcoptes*-Antikörper nicht mehr aufweisen. Auf Freisein von *Sarcoptes*-Milbenbefall zu überwachende Zuchtschweinebestände werden in der Regel zweimal jährlich serodiagnostisch untersucht.

Sensitivität bzw. Spezifität des Tests wurden bei Einbeziehung von insgesamt 134 *Sarcoptes*-Milben freier bzw. befallener Schweine mit 94% bzw. 97% bestimmt.

BESCHREIBUNG DES TESTPRINZIPIES

Das Testsystem dient zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Sarcoptes scabiei var. suis* in Serumproben von Schweinen. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer *Sarcoptes*-Antigen-Präparation beschichtet. Antikörper gegen *Sarcoptes scabiei var. suis* bilden während der Inkubation der Serumprobe in der beschichteten Vertiefung einen Komplex mit dem Antigen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Enzym-Konjugat bindet sich an die antigengebundenen IgG-Antikörper. Ungebundenes Enzym-Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Substratlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch antikörpergebundenes Enzym. Die Farbreaktion steht in Korrelation zur Menge von Anti-*Sarcoptes*-Antikörpern in der Probe. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch Vergleich der Extinktionswerte von Proben und Kontrollen.



INHALT DES TESTKITS

- Die Reagenzien eines Testkits sind ausreichend für bis zu 91 Bestimmungen.
- Mikrotiterplatte (eine Platte) mit *Sarcoptes spp.*-Antigen (inaktiviert) beschichtet, 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen = 96 Vertiefungen pro Platte
- Probenverdünnungspuffer (eine Flasche, 50 ml) Puffer mit Proteinzusatz, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig
- Waschpufferkonzentrat (eine Flasche, 50 ml) phosphatgepuffert, 10fach konzentriert, konserviert mit ProClin 300
- Kontrollserum, Positivkontrolle (eine Flasche, 1,2 ml) **Verschlusskappe ROT** von klinisch manifest mit *Sarcoptes scabiei var. suis* infizierten Schweinen gewonnenes Serum (Feldserum von drei Schweinen, gepoolt), konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig
- Kontrollserum, Negativkontrolle (eine Flasche, 1,2 ml) **Verschlusskappe GRÜN** von SPF-Schweinen gewonnenes Serum (Poolserum von mehreren Sauen einer anerkannt spezifisch pathogenfreien Herde), konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig

- Konjugatlösung (eine Flasche, 12 ml) **Verschlusskappe ROT**
Anti-Schwein-IgG-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, konserviert mit ProClin 300, gebrauchsfertig
- Substratlösung (eine Flasche, 12 ml) **Verschlusskappe BLAU**
Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, gebrauchsfertig
- Stopplösung (eine Flasche, 12 ml) **Verschlusskappe GELB**
1 N Schwefelsäure, gebrauchsfertig, **Vorsicht ätzend**
- Gebrauchsinformation

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Behälter für Herstellung von 1x Waschpuffer
- destilliertes- bzw. Reinstwasser
- Präzisionspipetten
- Einwegpipettenspitzen
- Einmal-Gefäße für die Verdünnung der Proben
- Pipettierreservoirs
- saugfähige Unterlage wie z. B. Papierhandtücher (zum Ausschlagen der Platte/ der Strips nach den Waschvorgängen empfohlen)
- ggf. Leerrahmen für benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen
- Abdeckplatten oder -folie für die Mikrotiterplatte
- Gefäße für benötigte Teilmenge der Konjugatlösung und Substratlösung
- Vortex-Mixer
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanal-Pipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten Filter 450 nm

ART DER ANWENDUNG

1. Verwendung der Mikrotiterplatten

Mit einer Mikrotiterplatte können maximal 91 Proben untersucht werden.

Die Mikrotiterplatte wird in einem Folienbeutel mit Wiederverschluss geliefert. In der Verpackung befindet sich außerdem ein Trockenbeutel mit Indikator.

Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 Streifen mit je 8 Reaktionsvertiefungen. Es sollten nur so viele Streifen entnommen und in einem separaten gut verschlossenen Beutel auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) gebracht werden, wie für die Untersuchung der entsprechenden Anzahl der Proben notwendig sind (z.B. für 10 Proben 2 Streifen). Die nicht benötigten Streifen sollten ständig bei 2 bis 8°C lagern und keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Folienbeutel nach jedem Öffnen wieder ordnungsgemäß verschlossen wird. Dabei ist die Funktionalität des Verschlusses zu überprüfen. Ein Farbumschlag des Trockenbeutel-Inhalts von blau nach hellrot deutet auf eine hohe relative Luftfeuchte im Folienbeutel hin; der Trockenbeutel ist bei Bedarf zu erneuern.

Einmal verwendete Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden!

2. Vorbereitung der Testreagenzien

Die benötigten Testreagenzien sind vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) zu bringen und vor der Verwendung durch Schwenken der Flasche bzw. Vortexen des Plastikröhrchens gründlich zu durchmischen.

Aus dem Behältnis mit der Konjugatlösung und Substratlösung entnehmen Sie die benötigte Menge, überführen sie in ein separates Gefäß und bringen diese auf Raumtemperatur. Nicht benötigte Konjugatlösung bzw. Substratlösung soll ständig bei 2 bis 8°C lagern und darf keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden.

Substrat- und Konjugatlösung dürfen starken Lichteinfall nicht ausgesetzt werden. Nach längerer Kühlung kann sich die Substratlösung durch spontane Umsetzung schwach bläulich färben. Diese leichte Färbung verschwindet nach Erwärmung auf Raumtemperatur.

Stellen Sie die benötigte Menge an Waschpuffer her, indem Sie die entsprechende Menge des 10-fach Konzentrats 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen (1 Teil Konzentrat + 9 Teile Wasser). Sollten sich Kristalle im Waschpufferkonzentrat befinden, so lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen des Waschpufferkonzentrats auf; sollten Sie die gesamte Menge an Waschpuffer mit einem Mal auflösen, stellen Sie sicher, dass eventuell auskristallisierte Salze nicht im Originalbehältnis verbleiben. Für einen Streifen der Mikrotiterplatte mischen Sie 27 ml destilliertes Wasser mit 3 ml Waschpufferkonzentrat (ergibt 30 ml Waschpuffer, gebrauchsfertig). Für die gesamte Mikrotiterplatte mischen Sie 324 ml destilliertes Wasser mit 36 ml Waschpufferkonzentrat.

Nach dem Gebrauch sind alle nicht verwendeten Reagenzien wieder bei 2-8°C zu lagern.

Während der Testdurchführung ist eine direkte Sonneneinstrahlung zu vermeiden.

3. *Probenvorbereitung*

Es kann frisches, kühl aufbewahrtes oder gefroren gelagertes und aufgetautes Blutserum oder Blutplasma verwendet werden. Aufgetaute Proben sind vor der Verwendung gründlich zu durchmischen.

Geben Sie 5 µl der Probe in 495 µl Probenverdünnungspuffer (1:100). Mischen Sie die Verdünnung gründlich.

Um Kreuzkontaminationen zu verhindern ist ein Kontakt der Proben mit den Testkitkomponenten zu verhindern.

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

Bei jedem Test ist es notwendig, Positiv- und Negativkontrolle sowie eine Leerwertkontrolle (nur Probenverdünnungspuffer) mitzuführen, um die korrekte Testdurchführung und die Stabilität der Reagenzien überprüfen zu können.

4. *Durchführung des Tests*

Der Test ist in der angegebenen Reihenfolge und ohne Zeitverzögerung durchzuführen! Bitte verwenden Sie für jeden Pipettierschritt neue, saubere Einwegpipettenspitzen!

- Sämtliche Reagenzien sollen bei Anwendung auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) gebracht sein.
- Geben Sie je 100 µl der Kontrollseren (Positivkontrolle und Negativkontrolle) in die dafür vorgesehenen Vertiefungen (Doppelbestimmung wird empfohlen, insbesondere bei einer größeren Probenanzahl).
- Als Leerwert geben Sie 100 µl Probenverdünnungspuffer in die dafür vorgesehene Vertiefung (Einzelbestimmung).
- Geben Sie 100 µl der vorverdünnten Proben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen (Einzelbestimmung).
- Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 60 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- *Erstes Mal Waschen*: Entleeren Sie die Vertiefungen und spülen Sie diese 5-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer (1:10 hergestellte Verdünnung des 10-fach Waschpuffers). Wenn Sie mit einer Mehrkanal-Pipette waschen, so schlagen Sie die Platte nach jedem einzelnen Waschgang auf einer sauberen saugfähigen Unterlage (z.B. Papierhandtuch) aus; bei Verwendung eines Waschautomaten entfällt das Ausschlagen nach jedem einzelnen Waschschrift. Entfernen Sie am Ende der 5 Waschvorgänge gründlich die Restflüssigkeit durch Ausschlagen der Platte auf einer sauberen saugfähigen Unterlage.
- Geben Sie in jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 60 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).

- *Zweites Mal Waschen*: Entleeren Sie die Vertiefungen und verfahren weiter wie beim Ersten Mal Waschen (siehe oben)
- Geben Sie in jede Vertiefung 100 µl Substratlösung. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 15 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C). Beginnen Sie mit der Zeitmessung nach Füllen der ersten Vertiefung.
- Geben Sie 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung, und zwar in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der Sie die Substratlösung zugegeben hatten.
- Schütteln Sie die Platte vorsichtig, aber gründlich bzw. stellen Sie die Schüttelfunktion im verwendeten Plattenfotometer ein. Messen Sie die Extinktionswerte (OD) innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Richtwerte zur Überprüfung der korrekten Testdurchführung

- Berechnen Sie die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrollen (PK) und Negativkontrollen (NK) (OD_{PK} , OD_{NK}).
- Berechnen Sie den Prozentsatz (P) der optischen Dichte des Negativkontrollserums nach folgender Formel:

$$P = \frac{OD_{NK} \times 100}{OD_{PK}}$$

- Die Testdurchführung war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht wurden:

Positivkontrollserum PK:	$OD_{PK} > 0,8 < 2,8$
Negativkontrollserum NK:	$P < 20$
Leerwert (Probenverdünnungspuffer):	$OD < 0,1$

- Wenn die geforderten Werte nicht erreicht werden oder das Substrat bereits vor der Zugabe in die Vertiefungen eine starke Blaufärbung aufweisen sollte, so kann dies ein Hinweis auf eine nicht korrekte Testdurchführung, auf Kontamination oder auf Reagenzienverfall sein. Prüfen Sie daher vor einer erneuten Testdurchführung die verwendeten Geräte und Materialien, die Möglichkeit einer Kontamination sowie die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien.

2. Berechnung der Testergebnisse

- Berechnen Sie die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrollen (PK) und Negativkontrollen (NK), (OD_{PK} , OD_{NK}).
- Ziehen Sie vom Mittelwert des Positivkontrollserums und von der optischen Dichte der Proben (OD_{Probe}) den Mittelwert des Negativkontrollserums ab.

$$OD_{PK, \text{ korr}} = OD_{PK} - OD_{NK}$$

$$OD_{Probe, \text{ korr}} = OD_{Probe} - OD_{NK}$$

- Berechnen Sie das Testergebnis = TE der Proben nach folgender Formel:

$$TE = \frac{OD_{Probe, \text{ korr}} \times 100}{OD_{PK, \text{ korr}}}$$

3. Bewertung der Testergebnisse

TE	< 16	negativ
TE	16 - 24	fraglich
TE	> 24	positiv

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Die Interpretation der Testergebnisse und abzuleitende Konsequenzen sollten vom behandelnden Tierarzt im veterinärmedizinischen Kontext erfolgen, vor allem unter Berücksichtigung von Anamnese, klinischer Symptomatik, Titerdynamik (serodiagnostische Verfolgsuntersuchungen) und differentialdiagnostischer Abgrenzung anderer Krankheitsursachen. Der Test ist zur Bestandsüberwachung und Herdendiagnostik konzipiert. Daher sollte der oben empfohlene Stichprobenumfang (siehe Allgemeine Hinweise) unbedingt Beachtung finden.

ART DER AUFBEWAHRUNG

Lagern Sie sämtliche Testkit-Bestandteile bei 2 bis 8 °C. Bringen Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterplatten-Streifen und die Reagenzien vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18 bis 25 °C). Setzen Sie die Substratlösung auf keinen Fall Sonnen- oder anderem starkem Licht aus! Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen oder anderen Testkits vermischt werden.

VORSICHTSMABNAHMEN UND ALLGEMEINE WARNHINWEISE











Die für ELISA-Tests übliche Umsichtigkeit wie Verwendung sorgfältig gereinigter Gefäße, sorgfältiges Pipettieren und Abarbeiten der einzelnen Testschritte sind Voraussetzung, um korrekte Testergebnisse zu erzielen.

- Einige Bestandteile des Testkits enthalten gefährliche Stoffe (Natriumazid, ProClin 300). Bei der Beseitigung der Abfälle sind die jeweils gültigen gesetzlichen Bestimmungen einzuhalten.
- Dieses Testbesteck ist zum in-vitro-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal unter strikter Einhaltung der Gebrauchsinformation angewandt werden.
- Sämtliche Komponenten des Testbestecks sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- Das Mischen von Komponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- Die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen an Natriumazid oder ProClin 300 als Konservierungsmittel. Die Konzentrationen dieser gefährlichen Inhaltsstoffe nach (EG) 1272/2008 liegen unterhalb der gesetzlichen Konzentrationsgrenzwerte. Kontakt mit Schleimhäuten und orale Aufnahme sind zu verhindern.
- Nach Entnahme von Reagenzien sind die Behältnisse unverzüglich wieder zu verschließen und bei 2...8 °C zu lagern. Beachten Sie, dass das Vertauschen von Verschlusskappen, insbesondere der Kontrollseren, zu Kreuzkontaminationen der Testkomponenten und zu ihrer Unbrauchbarkeit führen kann.
- Das Untersuchungsmaterial ist als potentiell infektiös zu betrachten und insofern die gesetzlichen Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.
- In dem Zusammenhang und darüber hinaus sind bei der Testvorbereitung und Durchführung folgende Regeln und allgemeine Hinweise zu befolgen:
 - Nicht essen, trinken oder rauchen!
 - Niemals mit dem Mund pipettieren!
 - Stets Laborkittel und Schutzhandschuhe tragen!
 - Sicherheitshinweise zu den entsprechenden Testkomponenten beachten!
 - Gebrauchsanweisung strikt befolgen!
 - Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise zur Kenntnis nehmen und befolgen!
 - Bei der Ausführung des Testkits in (halb)automatisierter Form, z. B. bei Verwendung von Pipettierautomaten oder Laborrobotern, ist die Methode zu validieren.
 - Eine Kombination dieses Testkits mit Produkten oder Komponenten anderer Hersteller ist nicht zulässig und kann zu falschen Testergebnissen führen.

HAFTUNG

Das Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produkts liegt vollständig beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für Schäden jedweder Art, die aus der Verwendung des Testkits, aus der Testdurchführung oder aus der Auswertung und Interpretation der mit dem Produkt ermittelten Testergebnisse resultieren.

Nur für den tierärztlichen Gebrauch.

	Bestellnummer		Haltbarkeit
	Chargennummer		Lagertemperatur
	Hersteller		<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsinformation beachten		Vor Sonnenlicht schützen
	Nicht zur Wiederverwendung		Vor Feuchtigkeit schützen