

flocktype[®] Salmonella Ab

Manual de uso

Para la detección de anticuerpos contra la
Salmonella Enteritidis y *Salmonella*
Typhimurium

Certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal, n.º MA: BGVV-B 322



2 placas (n.º de catálogo FT275702)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit	3
Uso previsto	3
Símbolos	4
Control de calidad	5
Almacenamiento	5
Información de seguridad	5
Introducción	7
Principio	8
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	9
Notas importantes.....	10
Precauciones generales	10
Protocolo: procedimiento de prueba ELISA	11
Cuestiones importantes antes de comenzar	11
Antes de comenzar	11
Protocolo: ELISA.....	13
Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma	13
Procedimiento de prueba para muestras de yema de huevo	15
Interpretación de los datos	17
Criterios de validación	17
Cálculo	17
Interpretación de los resultados	18
Infección de campo.....	18
Vacunación	19
Índice de cambios.....	23
Guía rápida para el flocktype Salmonella Ab	24

Contenido del kit

flocktype Salmonella Ab	(2)
N.º de catálogo	FT275702
Número de placas	2
Test Plate (placa de prueba): placa de microvaloración con 96 pocillos, recubierta de antígeno LPS Salmonella no infeccioso	2
Sample Diluent (diluyente de muestras), listo para utilizar	1 × 125 ml
Negative Control (control negativo), listo para utilizar	1 × 3,5 ml
Positive Control (control positivo), listo para utilizar	1 × 3,5 ml
Wash Buffer (tampón de lavado), concentrado 10×	1 × 125 ml
Conjugate (conjugado), listo para utilizar	1 × 24 ml
TMB Substrate (sustrato TMB), listo para utilizar	1 × 24 ml
Stop Solution (solución de parada), lista para utilizar	1 × 24 ml
Manual de uso	1

Uso previsto

El flocktype Salmonella Ab es un ensayo ELISA específico y sensible para detectar anticuerpos contra la *Salmonella* Enteritidis y la *Salmonella* Typhimurium en muestras de suero, plasma y yema de huevo procedentes del pollo y el pavo.

Este kit está autorizado por el Friedrich-Loeffler-Institut y ha sido certificado conforme al artículo 11 (2) de la ley alemana de sanidad animal (BGVV-B 322) para su uso en Alemania en procedimientos de diagnóstico veterinario.

Para uso exclusivo en el ámbito veterinario.

Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual de uso



Número de catálogo



Número de material



Para muestras procedentes de pollo y pavo

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote del flocktype Salmonella Ab se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Almacenamiento

Los componentes del kit para ensayo ELISA flocktype Salmonella Ab deben almacenarse a una temperatura comprendida entre 2-8 °C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El Wash Buffer (10x) y la Stop Solution pueden almacenarse a temperatura ambiente (18-25 °C) para evitar la cristalización de sales. Si el kit se suministra con tiras reactivas, almacene las que sobren en la bolsa de aluminio con cierre junto con secante a una temperatura de 2-8 °C hasta el próximo uso. Las tiras reactivas pueden almacenarse durante 6 semanas como mínimo después de abrir la bolsita de las placas.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a compliance@indical.com.



PRECAUCIÓN: La Stop Solution contiene ácido sulfúrico de 0,5 M.

Todos los residuos de muestras y los objetos que han estado en contacto con las mismas deben descontaminarse o eliminarse como material potencialmente infeccioso.

Introducción

El flocktype Salmonella Ab es una solución específica altamente sensible que sirve para detectar anticuerpos contra la *Salmonella* Enteritidis y la *Salmonella* Typhimurium. Se detectan anticuerpos contra los antígenos O 1, 4, 5, 9 y 12. El flocktype Salmonella Ab es apto para muestras de suero, plasma y yema de huevo procedentes de pollo y pavo.

Las infecciones por *Salmonella* están presentes en todo el mundo y son habituales en todas las especies aviares de corral. El principal peligro que entrañan las infecciones por *Salmonella* en aves de corral es la transmisión de algunos serotipos al ser humano. La excreción intermitente de la bacteria enteritis dificulta el reconocimiento bacteriológico. Por ello, el inmunoensayo enzimático para detectar anticuerpos contra la *Salmonella* es el método de análisis más eficiente. Las pruebas diagnósticas para detectar anticuerpos con el flocktype Salmonella Ab es el método de cribado preferido para detectar infecciones por *Salmonella* o respuestas humorales a las vacunas en aves de corral. No es posible diferenciar entre los anticuerpos presentes en muestras como consecuencia de la inmunización por la acción de la vacuna contra la *Salmonella* o por infección de cepas de campo de *Salmonella*.

Es importante analizar una cantidad de animales confirmada de forma estadística con respecto al tamaño del averío y el estado inmunitario esperado. En este kit de pruebas se detectan los anticuerpos anti-*Salmonella* mediante el antígeno O y pueden obtenerse resultados positivos tras el contacto con distintos serotipos. Por lo tanto, se recomienda confirmar serológicamente los resultados positivos con métodos bacteriológicos.

Principio

La placa de prueba de microvaloración está recubierta de una mezcla de antígeno LPS de la *Salmonella*. Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos específicos de *Salmonella* se unen al antígeno inmovilizado. El material sin unir se elimina mediante aclarado. El conjugado detecta anticuerpos del suero unidos al antígeno. El conjugado sin unir se elimina mediante aclarado. Al añadir Substrate Solution se inicia una reacción colorimétrica que se detiene trascurridos 15 minutos. La densidad óptica (DO) se mide utilizando un espectrofotómetro. Los valores de DO se correlacionan con la concentración de anticuerpos anti-*Salmonella* de la muestra.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Vasos de precipitados
- Cilindros de medición
- Pipetas (ajustables)
- Pipetas multicanal (ajustables)
- Aluminio o lámina adhesiva para cubrir la Test Plate
- Opcional: dispositivo para el suministro y la aspiración de Wash Buffer
- Lector de absorbancia de placa de microvaloración
- Tubos o placas para diluir las muestras
- Agua destilada

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe proceder siempre de acuerdo a las siguientes recomendaciones:

- No exponga la TMB Substrate Solution a luz intensa o a la luz solar durante la realización de la prueba.
- Evite que los componentes del kit para la prueba se contaminen.
- No utilice los componentes del kit para la prueba si están caducados.
- El agua procedente de sistemas de intercambio iónico utilizada para diluir el Wash Buffer (10×) puede interferir con el ensayo si no es lo suficientemente pura. Utilice agua doblemente destilada o agua de alta pureza (p. ej., Milli-Q®).
- A fin de obtener resultados exactos de la prueba, es imprescindible utilizar material de cristal limpio y pipetear y aclarar con atención, así como respetar de forma estricta los tiempos de incubación indicados durante la prueba.

Protocolo: procedimiento de prueba ELISA

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Lea el apartado “Notas importantes”, en la página 10 antes de comenzar.

Antes de comenzar

- Permita que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (18-25 °C) inmediatamente antes de utilizarlos. Si se han precipitado cristales de sal en el Wash Buffer (10x), disuélvalos agitando suavemente y aplicando calor.
- Diluya el Wash Buffer (10x) con agua destilada en una proporción de 1:10. Por ejemplo, para una sola Test Plate, diluya 25 ml de Wash Buffer (10x) en 225 ml de agua destilada y mezcle.
- Muestras de suero/plasma: antes de proceder a su análisis, diluya las muestras de suero/plasma con Sample Diluent en una proporción de 1:500 (p. ej., diluya 1 µl de muestra en 499 µl de Sample Diluent) y mezcle bien. Utilice tubos de plástico o placas de microvaloración sin recubrimiento para la dilución. Cambie las puntas de las pipetas para cada muestra.

También es posible diluir muestras de suero/plasma a partir de una predilución (1:50 en Sample Diluent) directamente en la Test Plate (consulte el paso 1a del procedimiento).

- Yema de huevo: antes de proceder a su análisis, diluya las muestras de yema de huevo con Sample Diluent en una proporción de 1:500. Debido a la viscosidad de la yema de huevo, se recomienda diluirla en dos fases (consulte los pasos 1 y 4 en la página 13).

Atempere la yema de huevo. Separe las yemas de huevo de las claras o rompa los huevos sin causar la dispersión de la yema.

- Los controles se suministran listos para utilizar y no requieren de una dilución.

Protocolo: ELISA

Consulte “Antes de comenzar” en la página 11.

Procedimiento de prueba para muestras de suero y plasma

1. Pipetee 100 μ l de cada uno de los controles listos para utilizar, Negative Control y Positive Control (por duplicado), y las muestras diluidas en una proporción 1:500, en los pocillos de la Test Plate.
- 1a. Pipetee 90 μ l de Sample Diluent en cada pocillo de muestra y añada luego 10 μ l de la muestra prediluida en una proporción de 1:50. Mezcle bien.

Nota: Registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la transferencia de muestras. Cubra la Test Plate.

2. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
3. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
4. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
5. Pipetee 100 μ l de Conjugate listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
6. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
8. Pipetee 100 μ l de TMB Substrate Solution en cada pocillo.

9. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
10. Detenga la reacción añadiendo 100 μ l de Stop Solution a cada pocillo. Añada la Stop Solution en el mismo orden en que se añadió la Substrate Solution.
11. Mida la DO en el lector de placas a 450 nm en un periodo de 20 minutos tras la parada de la reacción.

La medición a una longitud de onda de referencia (620-650 nm) es opcional.

Procedimiento de prueba para muestras de yema de huevo

1. Pipetee 490 μl de Wash Buffer en un tubo para microcentrífuga adecuado (p. ej., tubo para microcentrífuga Eppendorf®) y añada 10 μl de yema de huevo.

Nota: Se recomienda utilizar una pipeta de desplazamiento positivo para el pipeteado de la yema de huevo cruda.

2. Mezcle con una agitadora vorticial 3 veces durante 10 segundos.

Si la yema de huevo no se ha disuelto por completo, quizás sea necesario mezclar con agitadora vorticial durante más tiempo.

3. Pipetee 100 μl de cada uno de los controles listos para utilizar, Negative Control y Positive Control (por duplicado), en los pocillos de la Test Plate.
4. Pipetee 90 μl de Sample Diluent en cada pocillo de muestra y añada luego 10 μl de la muestra prediluida en una proporción de 1:50. Mezcle bien.

Nota: Registre las posiciones de los controles y las muestras en un protocolo de prueba. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal para la transferencia de muestras. Cubra la Test Plate.

5. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
6. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.
7. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μl de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
8. Pipetee 100 μl de Conjugate listo para utilizar en cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
9. Retire la solución de los pocillos mediante aspiración o golpecitos suaves.

10. Aclare cada pocillo 3 veces con 300 μ l de Wash Buffer preparado (1x). Retire el tampón después de cada aclarado mediante aspiración o golpecitos suaves.
11. Pipetee 100 μ l de TMB Substrate Solution en cada pocillo.
12. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Comience a medir el tiempo después de llenar el primer pocillo.
13. Detenga la reacción añadiendo 100 μ l de Stop Solution a cada pocillo. Añada la Stop Solution en el mismo orden en que se añadió la Substrate Solution.
14. Mida la DO en el lector de placas a 450 nm en un periodo de 20 minutos tras la parada de la reacción.

La medición a una longitud de onda de referencia (620-650 nm) es opcional.

Interpretación de los datos

Criterios de validación

Los resultados serán válidos si se cumplen los criterios siguientes:

- El valor medio (VM) de la DO medida para el Positive Control (PC) debe ser $\geq 0,7$.
- El valor medio (VM) de la DO medida para el Negative Control (NC) debe ser $\leq 0,2$.

En el caso de obtener ensayos no válidos, repita la prueba después de leer detenidamente las instrucciones de uso.

Cálculo

Calcule el VM de la DO medida para el Negative Control (NC) y el Positive Control (PC).

El cociente (M/P) de la DO de la muestra con respecto a la DO media del Positive Control se calcula de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$M/P = \frac{DO_{\text{muestra}} - VM_{DO_{NC}}}{VM_{DO_{PC}} - VM_{DO_{NC}}}$$

Los títulos del criterio de valoración se calculan a partir del cociente M/P diluido a una concentración de 1:500 utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_{10} \text{ Título} = 1,54 (\text{Log}_{10} M/P) + 3,77$$

Interpretación de los resultados

Infección de campo

- **Las muestras con el cociente M/P $<0,2$ se consideran negativas.**
No se han podido detectar anticuerpos contra la *Salmonella* Enteritidis, la *Salmonella* Typhimurium ni otros serotipos con antígenos O 1, 4, 5, 9 y 12.
- **Las muestras con un cociente M/P $\geq 0,2$ y $<0,3$ se consideran sospechosas.**
Los resultados sospechosos deben agruparse con la mayoría de resultados positivos o negativos. Se recomienda volver a analizar los resultados sospechosos al cabo de unas semanas. La obtención de resultados sospechosos con animales vacunados recientemente puede ser indicio de un aumento en la formación de anticuerpos específicos. En el caso de animales que se han vacunado varias veces, los resultados sospechosos pueden ser indicio de una formación insuficiente de anticuerpos específicos o de una disminución de los mismos.
- **Las muestras con el cociente M/P $\geq 0,3$ se consideran positivas.**
Se han detectado anticuerpos específicos de *Salmonella* Enteritidis, de *Salmonella* Typhimurium o de otros serotipos con antígeno O 1, 4, 5, 9 y 12.

Vacunación

Para valorar el estado inmunitario, deben compararse los resultados de las pruebas con los obtenidos de animales cuyo estado inmunitario o de vacunación es conocido. El estado inmunitario específico es alto cuando el cociente M/P es elevado. No se pueden proporcionar valores de referencia debido a la existencia de vacunas diferentes, a los diferentes procedimientos de vacunación y a otros factores que influyen en el ganado. La inmunización con vacunas elaboradas con microbios vivos precisa de dos inoculaciones como mínimo para detectar muestras evaluadas como sospechosas o positivas. Recomendamos establecer los valores de referencia del ganado tras los primeros análisis.

INDICAL ofrece una amplia gama de kits para ELISA así como kits para PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real para la detección de patógenos de animales.

Visite **www.indical.com** para obtener más información sobre los productos afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o el manual del usuario del kit de INDICAL correspondiente.

Notas

Notas

Acuerdo de licencia limitada para el flocktype Salmonella Ab

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales los han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.indical.com.

Marcas comerciales: afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH); Milli-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-1657-EN-005 © 2018-2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual de uso	Versión	Cambio
HB-1657-EN-005	Diciembre 2022	Cambios editoriales
HB-1657-EN-004	Junio 2022	Cambio del tiempo de incubación de TMB a 15 min
HB-1657-EN-003	Agosto 2018	Diseño de INDICAL

Guía rápida para el flocktype Salmonella Ab

Dilución de la muestra:

Suero, plasma, yema de huevo 1:500, mezclar bien

Paso	Protocolo
1. Muestra	100 µl/pocillo
2. Incubación	30 min a temp. ambiente
3. Lavado	3 x 300 µl
4. Conjugado	100 µl/pocillo
5. Incubación	30 min a temp. ambiente
6. Lavado	3 x 300 µl
7. TMB	100 µl/pocillo
8. Incubación	15 min a temp. ambiente
9. Parada	100 µl/pocillo
10. Lectura	450 nm

Interpretación de los datos

	Negativa	Existe sospecha	Positiva
Suero, plasma, yema de huevo	M/P <0,2	M/P ≥0,2 y <0,3	M/P ≥0,3