

Eindrapportage project

"Ontwikkeling Biacore-test Salmonella antilichamen t.b.v. monitoring voedselveiligheid in de Pluimveevleesketen"

Onderdeel van LNV-thema BO-08-003 (Zoönosen)

Auteurs:

M. Swanenburg

R. Achterberg

K. Maassen

R. Bloemraad

Animal Sciences Group (ASG)

Februari 2006

Inleiding, doel van het project

In de afgelopen jaren is in programma 389 (Zoönosen) onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheden van snelle testen voor de monitoring van de voedselveiligheid in de pluimveevleesketen, waarbij meerdere, verschillende tests kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde monster in dezelfde test-run. Hierbij werd gebruik gemaakt van biosensortechnologie (Biacore). Een test voor het aantonen van antilichamen tegen salmonella (ASG) en een test voor het aantonen van residuen van sulfonamiden (Rikilt) in serum van vleeskuikens werden ontwikkeld; van beide testen is een prototype beschikbaar, waarover begin 2005 werd gerapporteerd (rapport). De salmonella-antilichaamttest is geschikt voor het aantonen van antilichamen tegen salmonellatypen uit de serogroepen B en D. De mogelijkheid om ook salmonellatypen uit serogroep C te kunnen aantonen, was nog beperkt. Tevens diende de test dient nog te worden gevalideerd voor gebruik in de praktijk.

De doelstelling van dit project was dan ook de verdergaande ontwikkeling, inclusief het inbouwen van serogroep C, en validatie van een snelle test voor het aantonen van antilichamen tegen salmonella in het serum van vleeskuikens, waarbij gebruik wordt gemaakt van een Biacore biosensor.

Voor details over het werkingsprincipe van biosensoren (Biacore) wordt verwezen naar het eindrapport van het thema “Ketengerichte monitoring” van programma 389.

Uitvoering

Er werden een aantal activiteiten uitgevoerd, namelijk:

- verdergaande verzameling van veldmonsters
- uitvoeren van een dierproef ter verkrijging van bekend positieve monsters
- inbouwen van C₂-antigeen in de test
- aanpassen en afstellen van de test
- vergelijking met ELISA-resultaten

Verzameling veldmonsters:

Evenals in vorige jaren werden bloedmonsters verkregen van een slachterij. Hierbij werden steeds ongeveer 150 kuikens per koppel bemonsterd (individuele diermonsters). Op basis van de bacteriologische uitslagen (genomen volgens het Plan van Aanpak) werd bepaald of een koppel salmonella-positief of salmonella-negatief was. Aangezien niet zo veel salmonella-positieve koppels meer werden geleverd, was het lastig om monsters van koppels, besmet met verschillende serotypen, te verzamelen.

Dierproef 2005 (immunisatieproef):

De dierproef had als voornaamste doel om specifieke referentiesera te verkrijgen, dat wil zeggen sera waarvan bekend is dat er antistoffen tegen salmonella inzitten en tegen welke salmonella-serogroep (B, C₁, C₂, D) deze antistoffen zijn gericht. Deze specifieke referentiesera waren bedoeld om de werkzaamheid van de geproduceerde chip te testen. Met name voor serogroep C bestond namelijk de vraag of de chip niet goed werkte of dat geïnfecteerde dieren geen antistoffen hadden aangemaakt. Voor het aantonen van antilichamen tegen serogroep C is namelijk geen alternatieve test beschikbaar. Bestaande ELISA's zijn alleen beschikbaar voor serogroep B en D, en dus niet geschikt voor het aantonen van serogroep C.

Omdat een proef, waarbij de kuikens oraal waren geïnfecteerd (zie dierproef 2004), nogal teleurstellende resultaten had opgeleverd (weinig seropositieve dieren), werd deze keer op een andere wijze getracht om seropositieve dieren te produceren.

De proef werd uitgevoerd met 240 kuikens van een vleesras. De kuikens werden als eendagskuiken aangevoerd en verdeeld over 6 groepen. De controle groep bevatte 25 dieren, de overige groepen bevatten 44 of 45 dieren. Deze 6 groepen waren gehuisvest in dezelfde ruimte, maar fysiek gescheiden door middel van gaas of gangpad. De kuikens werden gedurende de gehele periode gevoerd met welzijnsvoer (voor biologische kuikens) om een iets lagere groei te creëren dan normaal. Op deze wijze konden de kuikens 2 weken langer worden aangehouden. De inlegvellen van de dozen waarin de kuikens werden aangevoerd, werden getest op de aanwezigheid van salmonella.

Op een leeftijd van 17 dagen werden de kuikens subcutaan in de nek ingespoten met 1 ml $5 \cdot 10^9$ in formaline afgedode salmonella, volgens het volgende schema:

Groep 1: *S. enteritidis* (D)

Groep 2: *S. typhimurium* (B)

Groep 3: *S. virchow* (C₁)

Groep 4: controlegroep

Groep 5: *S. java* (B)

Groep 6: *S. infantis* (C₁)

De controlegroep werd subcutaan ingespoten met fysiologisch zout. Op een leeftijd van 35 dagen (dus 17 dagen na de eerste infectie) werden de kippen opnieuw ingespoten met afgedode salmonella (booster). Hierbij werd de enteritidis-groep per ongeluk geïnoculeerd met *S. infantis*. Om toch het booster-effect van *S. enteritidis* te behouden voor deze groep, werd óók nog *S. enteritidis* ingespoten.

Er werden bloedmonsters genomen op de volgende tijdstippen gedurende de proef:
Op dag 17, direct voorafgaande aan het inspuiten met salmonella (nul-monsters)
Op dag 35, direct voorafgaande aan het inspuiten met salmonella
Op dag 42 (1 week na booster)
Op dag 49 (2 weken na booster)
Op dag 56 (3 weken na booster) werden de kippen volledig verbloed, waarbij zo veel mogelijk bloed werd opgevangen.

Aangezien afgedode salmonella's werden ingespoten, was het mogelijk om kuikens, die met verschillende types salmonella waren ingespoten, in dezelfde ruimte te huisvesten, want salmonella-uitscheiding was niet te verwachten. Om te controleren of daadwerkelijk geen salmonella werd uitgescheiden, werd twee maal van 10 kuikens per hok een cloacaswab genomen.

Swabmomenten:

- op dag 28 (tussen 1e en 2e inoculatie)
- op dag 56, bij verbloeden

Dierproef 2004:

In het kader van het project "Ketengerichte monitoring en surveillance in de pluimveevleesketen" werd in 2004 ook een dierproef uitgevoerd. Deze proef is beschreven in het eindrapport van dit project (Swanenburg et al., 2005). Omdat de verkregen sera van deze proef ook in het huidige project werden gebruikt, wordt hier in het kort de opzet van die proef weergegeven.

Er werden 5 groepen kuikens van 30 dieren ingezet. Elke groep werd gehuisvest in een aparte ruimte, zodat geen contact tussen de groepen mogelijk was. De kuikens werden op een leeftijd van 5 dagen oraal geïnoculeerd met salmonella:

Groep 1: *S. typhimurium* (serogroep B)

Groep 2: *S. livingstone* (serogroep C₁)

Groep 3: *S. goldcoast* (serogroep C₂)

Groep 4: *S. enteritidis* (serogroep D)

Groep 5: Controle-groep (geen infectie)

Van de dieren werd wekelijks een bloedmonster en een cloacaswab afgenomen, voor respectievelijk serologisch en bacteriologisch onderzoek, tot zij 42 dagen oud waren.

Tevens werd per serogroep een 2^e groep van 30 dieren ingezet die werden geïnfecteerd op een leeftijd van 26. Ook deze dieren werden serologisch en bacteriologisch gevolgd tot ze 42 dagen oud waren.

Chip-ontwikkeling en testen:

Bij de ontwikkeling van sensorchips is uitgegaan van de test die ontwikkeld is voor de detectie van Salmonella antilichamen in varkensserum. Bij deze test is LPS van de

serogroepen B, C₁ en D geïmmobiliseerd op een CM5 sensorchip (Biacore). Dit is beschreven in het artikel in bijlage 2.

Gebruikte chips

- Single chips, waarop LPS van slechts één van de serogroepen is geïmmobiliseerd. Deze chips zijn niet volledig uit-ontwikkeld, omdat het doel van de ontwikkeling een mix-chip was, maar werden gebruikt om na te gaan of geen kruisreacties tussen verschillende serogroepen optraden (dus bijvoorbeeld reactie van B-antilichamen op C-LPS).
- BC₁D mix-chip, waarop LPS van de serogroepen B, C₁ en D is geïmmobiliseerd.
- BC₁C₂D mix-chip, waarop naast het LPS van de serogroepen B, C₁ en D, ook LPS van serogroep C₂ is geïmmobiliseerd.

Het toevoegen van C₂-LPS was nieuw, en was voor de ontwikkeling van de varkens-test nog niet uitgevoerd. Het C₂-LPS werd in 4 verschillende verdunningen op de chip aangebracht, waarbij de verhoudingen en verdunningen van de overige 3 soorten LPS constant werd gehouden, om na te gaan welke verdunning de beste resultaten zou geven.

Sera

Voor de verdere ontwikkeling zijn verschillende serumsets gebruikt.

- Veldsera van verschillende negatieve en positieve koppels. Van deze koppels werden van ongeveer 150 individuele dieren serummonsters genomen (in het slachthuis).
- Sera van de infectieproef uit 2004.
- Sera van de infectieproef uit 2005.

Testen

Een deel van de sera uit de beide infectieproeven zijn, behalve op de genoemde Biacore-chips, ook getest in 3 tegen Salmonella gerichte ELISA's (inhouse test, CIDC)

- ELISA 1, gericht tegen serogroep B
- ELISA 2, gericht tegen serogroep D
- ELISA 3, die gericht is tegen serogroep B en D

Werkzaamheden

Van de sera, verkregen tijdens de infectieproef 2004, werden sera van 16 kuikens per groep (afgenomen op dag 42 tijdens verbloeden) getest op de BC₁D-chip. Deze sera werden ook getest in de ELISA's, zodat resultaten konden worden vergeleken.

De sera van de infectieproef 2005 werden getest op zowel de single chips als de beide mix-chips (BC₁D en BC₁C₂D). Tevens werden de sera, afgenomen op dag 56 (dag van verbloeden) getest in ELISA 1 en 2.

De afkapwaarde (gemeten waarde waarboven een resultaat als positief wordt beschouwd) voor de SPR-testruns werd berekend met behulp van de volgende formule:

Afkapwaarde = gemiddelde + 3 x SD (standaarddeviatie) van de responses van de sera uit de controlegroep.

De veldsera die werden verzameld op de slachterij, werden getest op de BC₁D-chip. Voor het testen van deze sera werd nog geen definitieve afkapwaarde vastgesteld. Deze moet nog worden berekend.

Resultaten

Er werd salmonella aangetoond in de swabs van alle groepen, behalve de controle-groep, die waren genomen op een leeftijd van 28 dagen (dierproef 2005). Tevens werd salmonella aangetoond in de swabs van de typhimurium-groep, die genomen werden op een leeftijd van 56 dagen. Hieruit bleek dat een aantal dieren salmonella was gaan uitscheiden. Uit serotypering van de gevonden salmonella-stammen bleek dat de dieren *S. enteritidis* uitscheidde.

In tabel 1 worden de resultaten weergegeven van de vergelijking van de uitslagen van de SPR-test en de ELISA's van de sera van de infectieproef 2004. Uit deze vergelijking blijkt dat de SPR-test meer en soms andere sera positief scoorde dan de ELISA. Dit suggereert dat de SPR-test gevoeliger is dan de ELISA's.

Omdat er geen ELISA's zijn gericht tegen serogroep C₁ en C₂, kon de vergelijking voor de groepen die waren geïnfecteerd met *S. livingstone* en *S. goldcoast* niet worden gemaakt. De sera van de *S. goldcoast*-groep scoorden allen negatief in de SPR-test.

Tabel 1: Resultaten SPR-test en ELISA, sera 42 dagen leeftijd, infectieproef 2004

	S. typhimurium						S livingstone		S goldcoast		S. enteritidis					
	gr. 1			gr. 2			gr. 1	gr. 2	gr. 1	gr. 2	gr. 1			gr. 2		
	SPR BC ₁ D	ELISA 1	ELISA 3	SPR BC ₁ D	ELISA 1	ELISA 3	SPR BC ₁ D	SPR BC ₁ D	SPR BC ₁ D	SPR BC ₁ D	SPR BC ₁ D	ELISA 2	ELISA 3	SPR BC ₁ D	ELISA 2	ELISA 3
1	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	POS	POS	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	POS	neg	POS	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	POS	neg	neg	POS	POS	neg	neg	POS	POS	neg	POS	neg	neg
7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg
8	neg	neg	neg	POS	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10	POS	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg
11	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg	neg	neg	POS	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
14	POS	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	neg	neg	neg
16	POS	neg	neg	neg	neg	neg	neg	POS	neg	neg	POS	neg	POS	neg	neg	neg
n	3	0	0	6	0	3	3	4	0	0	6	2	3	1	1	0

gr. 1: oraal geïnfecteerd op een leeftijd van 5 dagen; gr. 2: oraal geïnfecteerd op een leeftijd van 26 dagen
 ELISA 1: toont antilichamen aan tegen serogroep B; ELISA 2: toont antilichamen aan tegen serogroep D;
 ELISA 3: toont antilichamen aan tegen serogroep B en D

Figuur 1 (zie bijlage) geeft de resultaten van het testen van de sera van de infectieproef 2005 op de single chips. Op alle 4 de verschillende single chips werden wel enkele of meerdere monsters per groep positief bevonden. Dit is verklaarbaar, aangezien een infectie met *S. enteritidis* over alle groepen was verspreid. Alle groepen mogen dus een reactie geven op zowel D als B (vanwege gezamenlijk O-antigeen 1 en 12). Tevens is het verklaarbaar dat de enteritidis-groep op een C-chip positief werd, vanwege het foutief inspuiten van de groep met *S. infantis*. Omdat groep C₁ en groep C₂ beiden O-antigeen 6 bevatten, is kruisreactie tussen groep C₁ en C₂ ook verklaarbaar. Het enige wat niet verklaarbaar is, is de reactie van enkele sera uit de typhimurium- en de java-groep op de C-chips. Echter, hierbij werden steeds waarden gemeten, die net boven de gestelde afkapwaarde lagen. Waarschijnlijk zullen deze

sera, nadat een definitieve (op statistische berekeningen gebaseerde) afkapwaarde is vastgesteld, niet meer positief scoren.

De sera van de controlegroep reageerden op alle 4 de chips nagenoeg allemaal negatief. Het feit dat toch enkele positieve monsters werden geregistreerd, heeft te maken met het feit dat de afkapwaarde van de test werd berekend op basis van de resultaten van deze controlegroep (als hiervoor gemiddelde + 3 x SD wordt genomen, worden per definitie één of enkele van de monsters als positief benoemd).

Uit de resultaten bleek dat het 1 keer inspuiten van afgedode salmonella nog geen immuunrespons gaf na 17 dagen, aangezien op leeftijd 35 dagen nagenoeg alle monsters nog negatief scoorden. Het booster (voor de 2^e keer inspuiten) gaf wel een duidelijke immuunrespons bij een groot deel van de dieren. Verder lijkt het erop dat vorming van antilichamen tegen LPS B en C iets eerder is opgetreden dan vorming van antilichamen tegen LPS D.

Van de kuikens uit de typhimurium- en enteritidis-groep scoorde de meerderheid positief op de B- en/of D-chip. De kuikens uit de virchow-, infantis-groep en java-groep scoorden iets minder hoog op B en D. De sera uit de infantis-groep scoorden vrij goed op de C₁-chip.

In tabel 2 worden de resultaten weergegeven van het testen van de sera van de infectieproef 2005 op de beide mix-chips. Uit deze resultaten bleek dat met beide chips hoge percentages positieve resultaten werden gevonden. Ook op de mix-chips scoorden de dieren uit de controlegroep nagenoeg allemaal negatief.

In de twee ELISA's scoorden de sera van leeftijd 56 dagen van de enteritidis- en typhimurium-groep positief; alle andere groepen werden negatief gescoord (ELISA 1 scoorde 3 sera positief in de java-groep).

Tabel 2: Percentage positieve monsters, infectieproef 2005, getest op BC₁D chip en BC₁C₂D chip

Groep	Aantal monsters	Serotype	Percentage positief		Percentage monsters met positief resultaat op beide chips
			BC ₁ D-chip	BC ₁ C ₂ D-chip	
Groep 1	33	enteritidis	64%	82%	52%
Groep 2	37	typhimurium	62%	81%	54%
Groep 3	34	virchow	68%	71%	47%
Groep 4	23	blanco	4%	0%	0%
Groep 5	34	java	35%	59%	32%
Groep 6	38	infantis	62%	57%	49%

Tabel 3 laat de resultaten zien van het testen van veldsera op de BC₁D-chip. Bij de interpretatie van deze resultaten werd een fictieve afkapwaarde voor de test gebruikt van 5%PP, en een afkapwaarde voor een koppel van 10% positieve monsters (d.w.z. een koppel werd beschouwd als positief, indien 10% of meer van de sera een positieve uitslag gaven in de test). Met deze aannames scoorden alle bacteriologisch negatieve koppels inderdaad negatief. Vier van de 6 bacteriologisch positieve koppels scoorden positief. Omdat nog geen definitieve afkapwaarde voor zowel testresultaat als voor het positief zijn van een koppel werd gesteld, moeten deze resultaten niet als definitief worden beschouwd, maar worden gezien als een aanduiding van de richting waarin de resultaten zullen liggen.

Tabel 3: Resultaten veldkoppels op BC1D chip

Koppel	B.O. status	n	n pos	% POS	Koppel
1	negatief	147	6	4.1%	Neg
2	negatief	149	1	0.7%	Neg
3	negatief	150	0	0.0%	Neg
4	negatief	147	1	0.7%	Neg
5	negatief	147	10	6.8%	Neg
6	negatief	149	0	0.0%	Neg
7	negatief	150	0	0.0%	Neg
8	negatief	147	3	2.0%	Neg
9	infantis	147	30	20.4%	Pos
10	livingstone	146	6	4.1%	Neg
11	schwarzengrund	147	15	10.2%	Pos
12	paratyphi java	150	5	3.3%	Neg
13	paratyphi java	150	92	61.3%	Pos
14	infantis	142	30	21.1%	Pos

Discussie

Uit de resultaten blijkt dat de ontwikkelde SPR-chip (of eigenlijk chips) werkzaam zijn voor het aantonen van antilichamen tegen salmonella in serum van vleeskuikens: van groepen oraal geïnfecteerde en geïmmuniseerde kuikens reageerde een groot deel van de kuikens positief in de testen. Het bleek dat met deze nieuw ontwikkelde chips ook positieve reacties waren te vinden bij de monsters van de infectieproef, uitgevoerd in 2004, waarbij zeer weinig dieren antilichamen leken te hebben gemaakt (zie eindrapport 389). Omdat de uitgevoerde ELISA's bij deze monsters ook nauwelijks positieve reacties gaven, werd voorheen geconcludeerd dat de dieren nauwelijks antistoffen hadden gevormd. Bij hertesten met de nieuwe chips bleken toch meerdere dieren (in de typhimurium-, enteritidis- en livingstone-groep) positief te reageren. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de SPR-test meer positieven scoort dan de ELISA. Kruisreacties, zoals eerder vastgesteld, werden niet meer geconstateerd, en negatieve controlemonsters gaven een negatieve reactie. Dit betekent dat de chip specifieke reacties aantoonde op de verschillende serogroepen van salmonella.

Helaas waren er twee dingen mis gegaan tijdens de immunisatieproef. Ten eerste werden de dieren uit de enteritidis-groep bij de 2e inspuiting per ongeluk geïnoculeerd met *S. infantis*, en ten tweede werd bij alle groepen, behalve de controle-groep uitscheiding gevonden van *S. enteritidis*. Dit betekent concreet dat het mogelijk is dat dieren uit de enteritidis-groep ook antistoffen tegen *S. infantis* (dus groep C) hebben aangemaakt, én dat dieren uit alle 4 groepen antistoffen tegen *S. enteritidis* (groep D) hebben aangemaakt. Helaas kon met deze sera dus niet worden gecontroleerd of geen kruisreacties werden gemeten.

Het feit dat de dieren *S. enteritidis* zijn gaan uitscheiden, is lastig te verklaren. De eerste mogelijkheid is dat toch niet alle salmonella's in het inoculum waren afgedood. Er was echter vóór inspuiten gecontroleerd of geen levensvatbare salmonella in het inoculum aanwezig was. Een tweede mogelijkheid is dat *S. enteritidis* in de stal aanwezig was, en zo de kuikens heeft geïnfecteerd. Ook deze mogelijkheid lijkt niet zo waarschijnlijk, aangezien na de reiniging van de stallen swabs waren genomen om na te gaan of de ruimte echt salmonella-vrij was.

Opvallend was dat de dieren uit de controle-groep gedurende de gehele periode zowel bacteriologisch als serologisch negatief zijn gebleven. Kennelijk zijn ze niet geïnfecteerd geraakt met *S. enteritidis*, die in alle andere groepen wel werd aangetoond, terwijl ze toch in contact stonden (via lucht en gaas) met de andere groepen. De serummonsters van deze groep dieren zijn dus geschikt om als negatieve controlemonsters te fungeren.

Het immuniseren (twee maal subcutaan inspuiten met afgedode salmonella) van kuikens bleek meer positieve dieren op te leveren dan orale inoculatie. Deze methode was eerder wel gebruikt om leghennen aan te zetten tot antilichaam-productie, maar is dus ook bruikbaar gebleken voor vleeskuikens. Wél moet hierbij worden vermeld dat de kuikens 2 weken langer dan de normale slachtleeftijd zijn aangehouden, om het immuunsysteem wat meer tijd te geven om antistoffen te produceren. Deze methode kan dus goed worden gebruikt als men referentiesera wil produceren voor serologische salmonella-testen.

Geen van de sera van de kuikens, geïnfecteerd met *S. goldcoast* (dierproef 2004) reageerde positief op de BC1D-chip. *S. goldcoast* behoort tot serogroep C2 (O-antigenen 6 en 8). Omdat voor kippen geen ELISA beschikbaar is voor het aantonen van antilichamen tegen salmonella serogroep C (zowel C1 als C2), kon dus niet met een andere test worden nagegaan of deze kuikens überhaupt geen antilichamen hadden gevormd, of dat de test niet geschikt zou zijn voor het aantonen van dit serotype salmonella. Aangezien antilichamen tegen C1 wel door de test werden aangetoond, kunnen we er redelijkerwijs vanuit gaan dat de kuikens geen antilichamen hebben gevormd.

De gevonden resultaten wijzen erop dat de ontwikkelde test zeer bruikbaar kan zijn voor het aantonen van salmonella-infecties in vleeskuikens. De test lijkt gevoeliger te zijn dan bestaande serologische tests (ELISA). Er werden geen kruisreacties meer gevonden, en wat nog belangrijker is, de negatieve controle-sera gaven een negatief testresultaat. De gevoeligheid van de test voor gebruik in de praktijk (in het veld) zal nog worden nagegaan door het testen van veldmonsters en data-analyse. Uit de eerste resultaten lijkt de bruikbaarheid redelijk tot goed te zijn. Ook kan het interessant zijn om na te gaan of de test bruikbaar is bij leghennen.

Conclusies

- Er is aangetoond dat de ontwikkelde mix-chip (sero-groep B, C, D) doet wat de bedoeling is. Antistoffen in vleeskuiken-serum tegen deze serogroepen worden aangetoond.
- Bij het testen van geïnfecteerde vleeskuikens worden met de SPR-test meer positieve dieren aangetoond dan met een ELISA.
- De bestaande ELISA's zijn niet geschikt om antistoffen tegen serogroep C (C₁ en C₂) aan te tonen. De SPR-test heeft als voordeel t.o.v. deze ELISA's dat antistoffen tegen serogroep C wel kunnen worden aangetoond.
- Kuikens, geïnfecteerd met salmonella uit de C1-groep, blijken hiertegen antistoffen te kunnen maken.
- De gevoeligheid van de test "in het veld" voor het aantonen van positieve koppels vleeskuikens moet nog nader worden bepaald. Aan de hand van de huidige gegevens lijken de meeste positieve koppels wel te kunnen worden aangetoond.

Literatuur

M. Swanenburg, V.M.C. Rijsman, A.H.A.M. van Hoek, H.J.M. Aarts, M. Bienenmann-Ploum, W. Haasnoot, P. van Horne, L. Puister, H. Drost. Eindrapportage project "Ketengerichte monitoring en surveillance in de pluimveevleesketen". ASG rapport nr. ASG05/I00443

Swanenburg, M., Bloemraad, R., Achterberg, R., Maassen, K., 2005. Validation of a surface plasmon resonance based assay to detect *Salmonella* antibodies in serum of pigs. Sixth International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork, 6-9 September 2005, Rohnert park, California, USA.

R. Achterberg, J. Maneschijn-Bonsing, R. Bloemraad, M Swanenburg, C. Maassen. Using a Biacore assay for the detection of antibodies against Salmonella in a monitoring program for pigs. Biacore Journal, vol 5, nr 1, 2005, p16-18

R. Achterberg, J. Maneschijn-Bonsing, R. Bloemraad, M Swanenburg, C. Maassen. Detecting Salmonella antibodies in pork. New Food, nr 4, 2005, p56-57

Presentaties en communicatie

- 21 april 2005: Presentatie getiteld "Serologische salmonella-testen" t.b.v. Stuurgroep Salmonella van de PVE. M. Swanenburg, K. Maassen.
- 28 april 2005: Mini-symposium over resultaten van thema 3-Zoönosenprogramma (389, Ketengerichte monitoring) t.b.v. betrokkenen en beleid. Sprekers: W. Haasnoot (Rikilt), H. Aarts (Rikilt). L. Puister (LEI), P. van Horne (LEI), F. van der Wal (ASG) en M. Swanenburg (ASG)
- Validation of a surface plasmon resonance based assay to detect Salmonella antibodies in serum of pigs. M. Swanenburg, R. Bloemraad, R. Achterberg, K. Maassen. Presentatie op "6th International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork". 6-9 sept. 2005, USA.
- 13 oktober 2005: Presentatie (Snelle detectiemethoden voor monitoring in vleesketens: Ontwikkeling Biacore assays) gehouden op bijeenkomst voor erkende PVE-laboratoria. M. Swanenburg

Bijlage 1

VALIDATION OF A SURFACE PLASMON RESONANCE BASED ASSAY TO DETECT *SALMONELLA* ANTIBODIES IN SERUM OF PIGS

Manon Swanenburg^{1*}, Rinus Bloemraad¹, René Achterberg¹, Kitty Maassen¹

¹Animal Sciences Group, Department of Infectious Diseases, P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands. Ph: 0031-320-238960, Email: Manon.swanenburg@wur.nl;

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate a novel serological test employing surface plasmon resonance (SPR), that was designed for use on the Biacore Q apparatus to detect antibodies against *Salmonella Spp* in pig sera. *Salmonella Spp* antigens (sero-groups B and D) were immobilized onto CM-5 sensor chips (Biacore). Test conditions and apparatus adjustments were optimized. Subsequently, validation was done using positive and negative (“in house”) reference sera as well as 990 field sera collected at slaughter. A set of 990 sera originating from finishing pigs were tested in the SPR assay and ELISA. Overall agreement between the two tests amounted to 92%. From these results it is concluded that the SPR assay in conjunction with the Biacore Q apparatus is suitable for screening slaughter pigs against *Salmonella* in a surveillance program.

INTRODUCTION

Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy is a label free technology for monitoring biomolecular interactions in real time (Turbadar, 1959, Kretschmann and Raether, 1968). SPR occurs at the surface of a gold film that is adhered to a glass plate (the sensor chip). When incident light is directed to the gold film it causes electrons on the surface of the gold film to move in waves (surface plasmons). A prerequisite for this to occur is that the incident light reaches the gold film at a certain angle (the resonance or SPR angle). The angle of the reflected light changes when the refractive index at the sensor surface changes. Since the relation between the two is linear, the change in resonance angle can be used to measure changes in refractive index caused by binding of analyte to a covalently immobilized ligand on the sensor chip surface. Hence the angle value of the reflected light is changed and measured in relative resonance units (rRU). Events are displayed in real time by a sensorgram on the screen of the computer that instructs the Biacore Q apparatus.

In Europe a number of countries have started serological surveillance programs for *Salmonella* infections in slaughter pigs. Serum or meat drip samples of slaughtered pigs are generally tested by ELISA of which several are commercially available. The Netherlands initiated a sero-surveillance program for finishing pigs as of January 2005. This can be done by testing pig sera by ELISA for the presence of antibodies against *Salmonella Spp* in sera and/or meat drip (Nielsen et al, 1995, Van der Heijden et al, 1995, Gabert et al, 1999, Proux et al, 2000). In this paper we describe the validation of a novel test, based on SPR that detects porcine *Salmonella* antibodies directed to sero-groups B and D. Validation of the *Salmonella* SPR assay has been focused on test characteristics that determine the validity (specificity and sensitivity). In addition, precision (repeatability and reproducibility) is discussed. Validation tests have been performed using the Biacore Q apparatus.

MATERIALS AND METHODS

A set of 990 field sera was collected (during 2003/4) from finishing pigs brought at slaughter. The sera originated from 57 pig holdings with a sample size ranging from 14 to 22. All sera were tested in a 1/5 dilution made in HBS-EP (Biacore).

With each test run two reference sera were included (Wright et al, 1993). Reference serum 1 is a strong positive serum expected to display approximately 800 rRUs (relative response units). Reference serum 2 is a negative serum that is expected to result in approximately 100 rRUs (background signal). The reference sera were tested at the start, middle and end of each test run. The mean results of the references were used to calculate test results to compensate for wear and tear of the sensor surface.

Sensor chips were made according to a standard protocol. Briefly, lipopolysaccharides (LPS) originating from cultures of *Salmonella typhimurium* (sero-group B) and *S. enteritidis* (sero-group D) were extracted and purified. Subsequently, a mixture of LPS-B and D, with predetermined concentrations of the individual constituents, was immobilized onto carboxy-methylated dextran (CM)-5 chips using a standard aldehyd coupling as described in the manual of Biacore (anonymous, 2003). A sensor chip consists of 4 flow cells and in each flow cell approximately 500 sera can be tested.

The testing of a serum sample in the Biacore Q apparatus was a cycle consisting of: (i) injection of run buffer in the flow system (base line determination), (ii) sample injection (2'), (iii) injection of run buffer, (iiii) regeneration (removal of bound analyte with a flow rate of 100µl per minute for 20'') of the sensor surface.

The rRUs are considered to be absolute measurements (raw data), which have to be converted to normalized data (Jacobson, 1996). To account for variability of test conditions, results are expressed as a function of the reactivity of one or more reference samples that are included in each test run (1). For this reason test results of the *Salmonella* SPR assay are converted to percentage positivity (PP) values calculated according to the formula:

$$PP = (rRU \text{ sample minus } rRU \text{ ref. serum 2} / rRU \text{ ref. serum 1 minus } rRU \text{ reference 2}) \times 100$$

The PP value at which sera are considered negative or positive in the SPR assay (cut off value) was determined using the test results of the set of 990 sera by placing the cut off value at the point of maximal overall agreement with the ELISA.

In the absence of a well defined reference serum panel for *Salmonella* (allowing the calculation of the absolute SE and SP) the relative SE (sensitivity) and SP (specificity) of the SPR assay were determined using a commercially available ELISA (Idexx), according to the manufacturer's instructions. The manual of the ELISA gives several cut off values that can be used. We selected the cut off value (OD% 40) that was recommended for testing field sera. The 990 sera originating from finishing pigs were tested in the *Salmonella* SPR assay and the ELISA.

Repeatability and reproducibility of the SPR assay was determined by testing the 2 SPR reference sera and a weak positive (WP) and a strong positive (StP) serum. To determine repeatability, each of the sera were tested 24 times in one flow cell of a routinely produced sensor chip in one test run of 96 samples. The CV% (coefficient of variation) was calculated using the raw data (relative resonance units –rRU-) and the normalized raw data (percentage positivity –PP-). To determine reproducibility test results have been gathered that were produced in a one month period (10-09-04/13-10-04). Tests were executed on 4 different Biacore Q apparatuses which were operated by two technicians. In total all flow cells of 5 chips (BD01, 02, 04, 05 and 06) were used to their maximum capacity (approximately 500 sera per flow cell). Reference sera were tested in triplicate per routine test run that consisted of approximately 130 sera.

RESULTS

Results of the SPR assay and ELISA are summarized in table 1. In addition, the optimal cut off for the SPR assay was determined at a value of 30 PP resulting in the highest possible overall agreement of 92% and Cohen's kappa of 0,74.

DISCUSSION

Preferably, newly developed tests are validated using well defined serum panels. Validation of tests for the detection of antibodies directed against *Salmonella Spp* is hampered by the absence of such a panel. For this reason, we chose to compare the *Salmonella* SPR assay performance with a commercially available ELISA. The overall agreement of the *Salmonella* SPR assay compared to the Idexx ELISA (92%) can be considered more than sufficient to guarantee reliable test results. Moreover, the comparison has been made with sera originating from individuals while the intended use of the *Salmonella* SPR assay is at herd level. When the sera originating from individual herds are grouped together, then the results of both tests do not differ in the sense that e.g. one herd is completely negative and another test classifies many sera of that herd as positive. In addition, the relative sensitivity (SE) of the *Salmonella* SPR assay with both ELISA's is 83% coupled to a specificity (SP) of ~93%. Again, these figures have been calculated on an individual basis. Considering the results displayed in table 2 it may be expected that calculated on herd level the relative SE and SP of the both tests is highly comparable. Unfortunately, we were not able to calculate the SE and SP on herd level since we did not have a sufficient number of sera per pig farm for a valid calculation.

It must be noted that the ELISA manufacturer claims detection of *Salmonella* sero-types B, C, and D. Since the *Salmonella* SPR is based on sensor chips with immobilized sero-type B and D antigen it may add to slight differences between the ELISA and the *Salmonella* SPR assay. However, we found that the serological prevalence of *Salmonella Spp* is predominantly determined by sero-type B (data not shown). The determination of the precision of the *Salmonella* SPR assay as portrayed by repeatability and reproducibility resulted in highly sufficient coefficient of variation (CV) percentages. This means that the short- and long term test performance (that is, reliable test results!) is warranted despite the fact that conditions (newly produced chips, different batches of active components etc.) vary.

CONCLUSIONS

The developed SPR assay to detect *Salmonella* antibodies in serum of slaughter pigs was highly comparable with a commercially available ELISA (Idexx). Therefore it can be concluded that the developed SPR assay is suitable for use in serological surveillance programs for *Salmonella* in slaughter pigs.

REFERENCES

- Turbadar, T., 1959. Proc. Phys. Soc. (London), 73: 40.
- Kretschmann, E., Raether, H., 1968. Z. Naturf. 230: 2135.
- Gabert, J., Schalch, B., Greil, B., Sperner, B., Stolle, A., Weber, C., Kramer, T., 1999. The use of a commercial test system (Salmotype[®] - ELISA) for tracing antibodies to *Salmonella* in the serum of pigs. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington: 37-41.
- Nielsen, B.D., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., Lind, P., 1995. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed by an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47: 205-218.
- Proux, K., Houdayer, C., Humbert, F., Cariolet, R., Rose, V., Eveno, E., Madec, F., 2000. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Vet. Res.* 31: 481-490.
- Van der Heijden, H.M.J.F., 1995. The development and application of LPS-ELISAs to detect *Salmonella* infections in swine. Proceedings of the Symposium on the diagnosis of *Salmonella* infections, Reno: 88-95.
- Wright, P.F., Nilsson, E., van Rooij, E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.*, 12 (2): 435-450.
- Anonymous, 2003. Biacore sensor surface handbook. Edition October 2003, version AA.
- Jacobson, R.H., 1996. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. OIE manual p. 8-15.

Bijlage 2

Figuur 1: Percentage positieve monster van infectieproef 2005, getest op de single chips.

Monsters genomen op leeftijd van 35, 42, 49 en 56 dagen.

