

Amtliche Methodensammlung

Tularämie

(Francisella tularensis)

- 1. Charakterisierung der Infektion**
- 2. Untersuchungsmaterial**
- 3. Untersuchungsgang**

Tularämie (*Francisella tularensis*)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Francisella (F.) tularensis ist ein kleines (0,2 - 0,5-µm x 0,7 - 1,0 µm), gramnegatives Stäbchen, das weder Sporen noch Flagellen bildet und fakultativ intrazellulär wachsen kann. In Deutschland kommt nur die Subspezies *F. tularensis holarctica* vor, die virulentere Subspezies *F. tularensis tularensis* ist ausschließlich in Nordamerika endemisch.

Viele Wildtiere können an Tularämie erkranken bzw. ein Reservoir sein, wobei Ausbrüche meist mit vermehrtem Auftreten von diversen Nagetieren assoziiert waren. Sehr empfänglich für eine Infektion sind Feldhasen und Wildkaninchen. In der Literatur wurden auch Einzelfälle von Infektionen bei Hunden und Katzen beschrieben, allerdings ist die Erkrankung für Haus- und Nutztiere kaum relevant.

1.2 Klinische Symptomatik

Bei Feldhasen und Kaninchen verläuft die Tularämie häufig als akute Sepsis und führt in wenigen Tagen zum Tod. Chronische Infektionen sind die Ausnahme, diese Tiere können aber die Erreger ausscheiden und eine Infektionsquelle sein. Kranke Hasen sind auffallend apathisch. Sie laufen schwankend und verlieren häufig die natürliche Scheu.

Typische pathologische Befunde sind eine deutliche Milzvergrößerung, ausgeprägte Lymphknotenschwellungen und Verkäsungen, sowie gelblich-graue miliare Abszesse, manchmal auch hämorrhagische Veränderungen in Leber, Lunge, Milz und Niere. Bei fulminanten Krankheitsverläufen können diese Herde jedoch fehlen.

1.3 Differentialdiagnostik

Das Krankheitsbild kann mit Pseudotuberkulose und Pasteurellose verwechselt werden.

1.4 Diagnostische Indikation

Verendete Feldhasen und Wildkaninchen sollten auf Tularämie untersucht werden.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Staatliche Veterinäruntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor für Tularämie, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Straße 96 a, 07743 Jena, Tel. 03641 804-2100.

1.6 Rechtsgrundlagen

Bei Tieren besteht gem. der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (in der aktuell gültigen Fassung) Meldepflicht bei Auftreten der Krankheit oder Nachweis des Erregers.

2. Untersuchungsmaterial

Für die Anzucht von *F. tularensis* eignen sich Gewebeproben von Tieren, die möglichst nicht mehrfach bedingt durch die Witterung, den Transport (Spätherbst) oder im Labor eingefroren bzw. aufgetaut wurden.

Untersuchungsmaterial Erregernachweis:

Die Anzucht kann aus Milz, Leber, Lunge, Niere oder anderen Organen erfolgen.

Untersuchungsmaterial Antikörpernachweis:

Serum (z. B. zum Nachweis der Serokonversion von Wildschweinen und Füchsen in Endemiegebieten).

Beförderung der Proben:

Das Gewebe ist einige Tage bei 2 bis 8 °C gekühlt haltbar, ansonsten soll die Lagerung möglichst bei -80 °C erfolgen.

3. Untersuchungsgang

3.1 Anzucht

Francisella tularensis ist ein anspruchsvolles Bakterium, das langsam wächst und leicht durch Begleitkeime überwuchert werden kann. Deshalb wird in der Regel ein Herz-Zystein-Agar mit Antibiotikazusätzen verwendet (siehe Anhang 1). Alternativ kann ein modifizierter Martin-Lewis Agar eingesetzt werden, der dem Thayer Martin Medium mit Antibiotikazusätzen entspricht (BD Biosciences Artikel Nr. 254029).

Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂ für mindestens 48 Stunden (bis 10 Tage). Die Kolonien sind klein, grau-weiß bis grünlich, 1 - 2 mm im Durchmesser, durchscheinend, flach, glatt begrenzt, glänzend und schnell konfluierend. Eine schwache Hämolyse kann sichtbar sein. Auf MacConkey Agar wächst *F. tularensis* nicht.

F. tularensis holarctica ist Oxidase negativ, Katalase schwach positiv, bildet Betalaktamasen und ist somit Cefinase positiv (BD Heidelberg, BD Cefinase Testblättchen Produkt Nr. 231650), ist Urease negativ und fermentiert Glucose und Maltose, aber weder Lactose noch Sucrose. In kommerziellen biochemischen Differenzierungssystemen muss mit Fehlidentifikationen gerechnet werden.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

3.2 PCR

Für den Nachweis von *F. tularensis* eignen sich real-time PCR-Systeme z. B. für die Zielgene *tul4*, *ISFtu2* und *23kDa* (Versage 2003, Splettstösser 2005, Matero 2010) (siehe Anhang 2). Eine Differenzierung zwischen *F. tularensis holarctica* und anderen Subspezies kann mit konventionellen PCR-Systemen in einem Duplex-Ansatz erfolgen und wird im Rahmen der weiterführenden Diagnostik routinemäßig am NRL durchgeführt (Johansson 2000) (siehe Anhang 2). Für den spezifischen Nachweis des potenziellen B-Agens *F. tularensis tularensis* steht eine spezifische LightCycler™ PCR zur Verfügung (Tomaso 2007).

Nach derzeitigem Kenntnisstand können alle in Deutschland vorkommenden *Francisella tularensis* subsp. *Holarctica*-Stämme zuverlässig nachgewiesen werden.

Dennoch sind - wie bei jeder PCR - die Primer und Sonden in regelmäßigen Abständen mittels geeigneter Datenbanken (z. B. NCBI BLAST) auf Spezifität zu prüfen.

3.3 Antikörpernachweis

Antikörper im Blutserum werden mittels Serumlangsamagglutination (SLA) im Mikroverfahren bestimmt (siehe Anhang 3). Die Spezifitätskontrolle der Ergebnisse sollte mit Brucella-Antigen erfolgen.

3.4 Agglutination

Eine rasche Identifikation von Kolonien kann mittels Agglutination erfolgen (BD, Heidelberg, *Francisella tularensis* Antiserum Produkt Nr. 240939).

3.5 Serologie

Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen *F. tularensis* spp. ist zehn bis 14 Tage nach der Infektion im Blutserum möglich. Titer von ≥ 160 oder ein vierfacher Titeranstieg sprechen für eine aktuelle Infektion und sind diagnostisch verwertbar, dagegen können Antikörper mit einem Titer von 20 bis 80 auch über längere Zeit persistieren.

3.6 Identifikation von Bakterienisolaten mit MALDI-TOF MS

Francisella tularensis subsp. *Holarctica*-Isolate können mit MALDI-TOF MS identifiziert werden, wenn entsprechende Referenzspektren in der Datenbank vorhanden sind.

3.7 Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender bioinformatischer Datenanalyse ist in vielen Ländern bereits Standard zu isolatbasierten Feintypisierung, Ausbruchsanalyse und phänotypischer Charakterisierung von *Francisellen*. Zur Sequenzierung bietet sich die Illumina Plattform an. DNA-Isolation und Erstellung von Libraries sollte nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Datenanalyse beginnt mit einer Qualitätskontrolle. Dabei sollten 70 % der Basen einer Probe einen Qualitätswert (Phred Score) von mindestens 30 aufweisen. Quantitativ sollte eine Coverage von mindestens 30 angestrebt werden, wobei mindestens 70 % der Reads taxonomisch dem Genus *Francisella* zugeordnet werden sollten. In der Datenanalyse folgt nun meist die Assemblierung der Reads zur Vorhersage von Contigs. Hier bieten sich Verfahren basierend auf der Software SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) an. Die assemblierten Genome sollten eine Größe von 1,7 - 1,9 mB und einen N50 Wert von 15 kB aufweisen. Die Feintypisierung auf Grundlage von assemblierten Genomen erfolgt mit dem Programm CanSNPer (Lärkeryd *et al.*, 2014) und basiert auf vordefinierten kanonischen Einzelnukleotidänderungen (SNPs). Außerdem haben sich Verfahren basierend auf Kerngenom-MLST etabliert. Hier bietet sich die kostenfreie Software ChewBBACA (Silva *et al.*, 2018) oder die lizenzierte Software Ridom SeqSphere+ (Jünemann *et al.*, 2013) an. Eine linuxbasierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten für *Francisellen* ist auf Anfrage (joerg.linde@fli.de) kostenfrei verfügbar.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Literatur

- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, and Pevzner PA. *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. *J. Comput. Biol.* 2012, 19: 455-77: 455-77.
- Burkhardt, F.: Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2. Auflage, 2002.
- Johansson, A., Ibrahim, A., Göransson, I., Eriksson, U., Gurycova, D., Clarridge, JE. 3rd, Sjöstedt, A.: Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4180-5.
- Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, and Harmsen D. *Updating benchtop sequencing performance comparison*. *Nat. Biotechnol.* 2013, 31: 294-6: 294-6.
- Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmeler M, Grunow R, Jacob D. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2632-40.
- Lärkeryd A, Myrtenäs K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, Johansson A, Sjödin A: CanS-NPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics* 2014.
- Matero, P., Hemmilä, H., Tomaso, H., Piiparinen, H., Rantakokko-Jalava, K., Nuotio, L., Nikkari, S.: Rapid Field Detection Assays for *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb 2. [Epub ahead of print]
- Sato, T., Fujita, H., Ohara, Y., Homma, M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2372-2374.
- Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies levels. *J ClinMicrobiol.* 2010 Apr;48(4):1061-9.
- Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, Ramirez M, Carriço JA. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom.* 2018 Mar 15;4(3):e000166.
- Splettstoesser, W.D., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Schuff-Werner, P.: Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J.Vet.Med.B.Infect.Dis.Vet.PublicHealth* 2005;52:249-261.
- Tomaso, H., Scholz, H.C., Neubauer, H., Al Dahouk, S., Seibold, E., Landt, O., Forsman, M., Splettstoesser, W.D.: Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Mol Cell Probes.* 2007;21:12-6.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

- Versage, J.L., Severin, D.D., Chu, M.C., Petersen, J.M.: Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. J Clin Microbiol. 2003;41:5492-9.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Anhang

Anhang 1

Cystein-Heart Agar

Substanzen:

Cystein Heart Agar (z. B. BD, Art-Nr 247100)

Deionisiertes Wasser

Aqua bidest

Defibriniertes Schafblut

Ampicillin ($C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, FW 371.39 (z. B. Sigma, Art-Nr A-9518)

Polymyxin B Sulfat ($C_{55}H_{96}N_{16}O_{13} \cdot 2H_2SO_4S$, FW 1385.61 (6000 Units/mg, z. B. Sigma, Art-Nr P-1004)

Herstellung:

Cystein-Heart Agar mit Ampicillin und Polymyxin B

51 g Cystein-Heart Agar in 1 l deionisiertem Wasser lösen und ca. 15 min quellen lassen.

15 min bei 121 °C autoklavieren. Dem abgekühlten Agar (45 - 50 °C) werden 100 ml Schafblut sowie 100 mg Ampicillin und Polymyxin B (600.000 Units), gelöst in 5 ml Aqua bidest mittels Einmalfilter beige-mengt. Gut mischen und zu je 20 ml in Petrischalen abfüllen.

Die fertig gegossenen Platten bei Raumtemperatur fest werden lassen und z. B. zu je 10 Stk. in Plastiksäckchen verschweißen.

Anhang 2

Nachweis von *Francisella tularensis* mittels Real-Time PCR nach Versage

1. Anwendungszweck

Schneller Nachweis von Mikroorganismen der Spezies *Francisella tularensis* aus Untersuchungsmaterial mit der Möglichkeit einer Quantifizierung

2. Arbeitsvorschrift

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Real-Time Cycler (z. B. LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim)), Vortex-Schüttler, Tischzentrifuge, Laborzentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten (z. B. Biofuge Stratos (Kendro Laboratory Products, Langenselbold), Automatische Pipetten (0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 2 - 20 µl; 10 - 100 µl; 20 - 200 µl und 100 - 1.000 µl), Mehrkanalpipette (z. B. 8-Kanalpipette 10 - 100 µl)

2.1.2 Reagenzien

Kit zur DNA-Extraktion aus klinischen Proben (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics))

Mastermix für RT-PCR (z. B. LightCycler FastStart DNA MasterPlus HybProbe (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) enthält *Taq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und Farbstoffe

Primer: Stammlösung 100 pmol/µl, Arbeitskonzentration 10 pmol/µl (Sequenzen und andere Angaben s. Tabelle 1)

Sonde: lösen in 1mM Tris-HCl pH 8.0/0,01 mM EDTA, so dass sich eine Konzentration von 5 pmol/µl bzw. 5 µM ergibt; in Portionen zu je 200 µl einfrieren (Sequenzen und andere Angaben s. Tabelle 1)

2.2. Durchführungsschritte

2.2.1. Probenaufarbeitung

KLINISCHES MATERIAL: Ein **Gewebestück** von ca. 25 mg wird in 200 µl Lysepuffer des High Pure PCR Template Preparation Kit suspendiert und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet, um ein Eluat von 200 µl zu erhalten.

2.2.2. Amplifikation

Die Amplifikation wird in geeigneten 96-Well-Platten in 20 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 21 angegeben.

Nach erfolgter Pipettierung werden die Platten an der Oberseite mit Plastikfolie versiegelt und 30 s bei 1.000 rpm zentrifugiert.

Die **Negativkontrollen** (NTC, no-template controls) enthalten 2 µl Wasser anstelle des DNA-Templates.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Als **Positivkontrolle** benutzt man DNA von z. B. *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS.

Die DNA-Konzentration der (internen) **Amplifikationskontrolle** soll so eingestellt sein, dass Ct-Werte um ca. 30 erzielt werden (etwa 1 pg DNA von Bakteriophage Lambda).

Temperatur-Zeit-Profil der real-time PCR:

Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	2 min bei 50 °C
	2 min bei 95 °C
Amplifikation (45 Zyklen)	30 s bei 95 °C
	30 s bei 60 °C.

2.3. Ergebnis und Kontrolle

Als **positiver** Befund gilt, wenn eine Probe einen Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) von unter 40 erreicht. Höhere Ct-Werte werden als negativ gewertet.

Bei positiven NTC-Kontrollen ist die Ursache der Kontamination möglichst abzuklären und der Versuch zu wiederholen.

Wenn eine als Francisellen-negativ beurteilte Probe keine Amplifikation oder einen deutlich erhöhten Ct-Wert für die Amplifikationskontrolle hat, ist die DNA Aufreinigung zu verbessern.

Tabelle 1: Mastermix Protokoll für eine real-time PCR für das Zielgen Tul4 (Amplikongröße: 91 bp) zum Nachweis von *Francisella tularensis* mit interner Amplifikationskontrolle (IAC*).

Mastermix		Stamm- lösung	End- konzentration	µl/1 rxn
Oligonukleotide	LightCycler™ 480 Probes Master (04 707 494 001), Roche	2x		10
Tul4F	5´-3´ Sequenz			
Tul4R	ATTACAATGGCAGGCTCCAGA	10 µM	0,6 µM	1,5
Tul4P	TGCCCAAGTTTTATCGTTCTTCT	10 µM	0,6 µM	1,5
Lambda-F	6FAM-TTCTAAGTGCCATGATAC AAGCTT- CCCAATTACTAAG-BHQ1	10 µM	0.2 µM	0,5
Lambda R	ATGCCACGTAAGCGAAACA	10 µM	0,6 µM	1,5
Lambda P	GCATAAACGAAGCAGTCGAGT	10 µM	0,6 µM	1,5
Bakteriophage λ	HEX-ACCTTACCGAAATCGGTACGGATACCGC- BBQ	10 µM	0.2 µM	0,5
Template		1 pg/µL		1
Gesamtvolumen µl				2
				20

PCR zur Subspeziesdifferenzierung von *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*

1. Anwendungszweck

Diese Duplex-PCR-Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis der Subspezies *holarctica* durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

2. Arbeitsvorschrift

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Siehe Real-Time-PCR, statt RT-PCR-Cycler wird ein konventioneller PCR-Cycler verwendet.

2.1.2 Reagenzien

Taq-DNA-Polymerase (z. B. Taq Pol PCR-202L (Jena Bioscience))

Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (z. B. dNTP Set 1 K039.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe))

Weitere siehe Real-Time-PCR und Tabelle 2

2.2. Durchführungsschritte

2.2.1. Probenaufarbeitung

Für die Analyse kann die für die Real-Time-PCR aufbereitete DNA verwendet werden

2.2.2. Amplifikation

Die Amplifikation wird in geeigneten Reaktionsgefäßen (z. B. 0,2 ml Reaktionsgefäße) in 25 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 2 angegeben.

Nach erfolgter Pipettierung werden die Gefäße geschlossen und 30 s bei 1.000 rpm zentrifugiert.

Die **Negativkontrollen** (NTC, no-template controls) enthalten 1 µl Wasser anstelle des DNA-Templates.

Als **Positivkontrolle** benutzt man DNA von z. B. *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS und *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* ATCC 6223^T.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Temperatur-Zeit-Profil der PCR:

Denaturierung der DNA	5 min	bei 94 °C
Amplifikation (35 Zyklen)	30 s	bei 94 °C
	60 s	bei 60 °C
	30 s	bei 72 °C
abschließende Elongation	5 min	bei 72 °C
Kühlung		bei 4 °C

2.3. Ergebnis und Kontrolle

Die Auswertung der PCR ist entsprechend dem folgenden Schema vorzunehmen:

TUL4-435/ TUL4-863	FtC1/FtC4	Ergebnis der PCR
428 bp	170 bp	<i>F. tularensis ssp. holarctica</i>
428 bp	200 bp	<i>F. tularensis</i>
negativ	negativ	negativ

Tabelle2: PCR Mastermix und Primer

		Stamm- lösung	End- konzentration	µl/1 rxn
10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂			1 : 10 verdünnt	2,5
Taq-DNA-Polymerase		5 U/µL	1 U/Reaktion	0,1
Desoxynukleosidtri- phosphat-Mix			je 80 µmol/l	1
Oligonukleotide	5´-3´ Sequenz			
TUL4-435	GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG		0,2 µmol/l	1
TUL4-863	TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT		0,2 µmol/l	1
FtC1	TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT		0,2 µmol/l	1
FtC4	GCGCGGATAATTTAAATTTCTCATA		0,2 µmol/l	1
Wasser				14,9
Template				2,5
Gesamtvolumen µl				25

Anhang 3

Serologische Untersuchung auf Tularämie mittels Serumlängsamagglutination (SLA) im Mikroverfahren

1. Geräte u. Materialien

Brutschrank o. Brutraum (37 °C +/- 1 °C)
Kühlschrank (5 °C +/- 3 °C)
Tiefkühlschrank (-21 °C +/- 3 °C)
Präzisionswaage
Pipetten, variabel (10 - 100, 100 - 1000 µL)
Mehrkanalpipette (50 - 200 µL)
Plattenschüttler
Thermoschüttler 56 °C
Feuchte Kammer
Mikrotiter-Platten (U-Profil, 8x12 Wells)
Messpipetten (1,5, 10 ml)
Reagenzgläser

2. Reagenzien und Lösungen

PBS, pH 7,4; +4 °C
Safranin
Brucella-Antigen (BrAg), +4 °C
Tularämie-Antigen (TuAg), +4 °C
Tularämie-Kontrollserum, positiv (PKS), -20 °C
Tularämie-Kontrollserum, negativ (NKS), -20 °C

Safranin-Lösung

0,5 g Safranin
100 ml Reinstwasser
Reinstwasser unter ständigem Schwenken dem Safranin zufügen und bis zur vollständigen Lösung rühren. Lagerung bei +4 °C

Tul-Antigen-Safranin-PBS-Lösung

9 ml PBS + 1 ml Tul-Antigen + 10 µl der 0,5%igen Safranin-Lösung
Verdünnung des Tul-Antigens ist zuvor in einem separaten Ansatz zu ermitteln
(1 : 10 oder 1 : 20 Verdünnung), Lagerung bei +4 °C
Nach längerer Lagerung ist das Antigen mittels Positiv- und Negativkontrolle zu testen.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Brucella-Antigen-Safranin-Lösung

10 ml Brucella-Antigen (unverdünnt) + 10 µl Safranin-Lösung

3. Durchführung:

3.1 Vorbereitung

Jede Serumprobe wird auf Tularämie-Antikörper und Brucellose-Antikörper untersucht (getrennte Ansätze).

Es ist, bei ausreichendem Probenmaterial, eine Doppelbestimmung je Serum durchzuführen.

Im Untersuchungsansatz zu Tularämie-Antikörpern ist ein positives (PKS) und ein negatives Kontrollserum (NKS) mitzuführen. Außerdem erfolgt bei jedem SLA-Ansatz die Kontrolle des Tularämie- und des Brucellose-Antigens.

Vorbereitung der Proben: Inaktivierung 30 min bei 56 °C im Thermoschüttler.

3.2 Durchführung des Agglutinationstestes

Ansatz für eine Serumprobe

Vorlegen des PBS-Safranin-Antigen-Gemisches

Ansatz zur Überprüfung auf Tularämie-Antikörper:

In die Wells A1 bis A4 werden je 90 µl des PBS-Safranin-Antigen-Gemisches pipettiert. 50 µl des Gemisches kommen in die Wells B1 - B4, C1 - C4,

D1 - D4 und A5 (Antigenkontrolle Tularämie).

Ansatz zur Überprüfung auf Brucellose-Antikörper:

90 µl des Brucellose-Safranin-Gemisches pipettiert man in die Wells E1 - E4.

50 µl des Gemisches kommen in die Wells A6 (Antigenkontrolle Brucellose), F1 - F4,

G1 - G4 und H1 - H4.

Anfertigen der Serumverdünnungen

10 µl der Serumprobe pipettiert man in die Positionen A1, A2, E1 und E2.

Bei A1 beginnend werden 50 µl des Ansatzes in B1 übertragen und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Gleiche Vorgehensweise bis D1. Aus D1 werden 50 µl des Ansatzes nach dem Mischen verworfen, so dass in jedem Well 50 µl vorliegen. Die Positionen A2, E1 und E2 werden nach gleicher Prozedur bearbeitet.

10 µl der Positivkontrolle pipettiert man in A3 und 10 µl Negativserum in A4 (Tularämie). Die Kontrollen werden analog der Serumverdünnung bearbeitet.

Für die Serumverdünnungen ist das Arbeiten mit einer Mehrkanalpipette von Vorteil.

Mikrotestplatte schütteln: 20 sec (z.B. IKA KS 130 basic, 480/min).

Platte mit Deckel versehen und in einer feuchten Kammer bei 37 °C 20 bis 24 Stunden inkubieren.

4. Kontrollsystem und Interpretation der Ergebnisse

Ablesen der Ergebnisse durch Beurteilung des Sedimentes

Ausbleibende Reaktion = negativ

- Eindeutige, glattrandige Knopfbildung des Antigens.

Positive Reaktion

- Kranzförmige, diffuse Ablagerung der Antigen-/AK-Partikel auf dem Boden ohne scharfe Begrenzung (Agglutination), mitunter an den Rändern leicht eingerollt. Der Agglutinationsgrad wird nach Intensitätsstufen abgeschätzt: 0, +, ++, +++, ++++ d. h. negativ, 25, 50, 75, 100 % Agglutination mit bzw. ohne Sedimentation des Antigens. Als Titer wird das letzte Well mit Agglutination abgelesen. Titer $\geq 1 : 20$ werden als positiv beurteilt.

Positivkontrolle (PKS)

- Muss dem angegebenen Titer (+/- eine Titerstufe) entsprechen.

Negativkontrolle (NKS)

- In jeder Serumverdünnung muss eine eindeutige Knopfbildung d. h. eine 100%ige Sedimentation des Antigens erkennbar sein.

Antigenkontrolle

- Eindeutige Knopfbildung d. h. 100%ige Sedimentation des Antigens.

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Datum/Uhrzeit: _____

Durchgeführt von: _____

Inaktivierung der Seren: 56 °C / 30 min: _____

Antigen und -Verdünnungen (AGK)_(Chargen-Nr./Gebrauchsverdünnung): _____

Kontrollserum, positiv_(PKS), Chargen-Nr./Verdünnung: _____

Kontrollserum, negativ_(NKS), Chargen-Nr./Verdünnung: _____

Bemerkungen: _____

	Brucella Antigen				Tularämie-Antigen				Platten-Nr.
	H	G	F	E	D	C	B	A	
AK-Titer	1:80	1:40	1:20	1:10	1:80	1:40	1:20	1:10	Probe:
									1
									2
									3
									4
									5
									6
									7
									8
									9
									10
									11
									12

	Datum	Uhrzeit	Bemerkung	Untersucher
Ablesung				

Tularämie (*Francisella tularensis*)

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de