

# VetLine Bovine Haptoglobin

**ELISA**

**RUO**

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Haptoglobin in bovine serum or milk.

Enzymimmunoassay zur quantitativen immunenzymatischen Bestimmung von Haptoglobin in bovinem Serum oder Milch.

English .....	2
Deutsch .....	7
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia .....	14
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas .....	14
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos .....	15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste .....	16

---

Product Number:      BHAPV4040 (96 Determinations)

---

## ENGLISH

### 1. INTRODUCTION

---

Haptoglobin (Hp) is the most studied acute phase protein in cattle. Numerous studies have shown that the concentration of protein in the serum during infectious and inflammatory diseases increases sharply. During mastitis, the Hp concentration in milk is also greatly increased. In the course of peripartum immunosuppression and early lactation, dairy cows are also particularly susceptible to infectious diseases such as uterine, claw or respiratory infections. Not infrequently, a relocation of the abomasum occurs. It could be shown that even during these diseases the haptoglobin concentration in the milk is increased.

The determination of Hp as a health parameter in the milk or in the plasma / serum of the animals makes it possible to assess the general state of health. The proof could be implemented as an instrument of an animal welfare-oriented inventory management in the operational diagnostics. In the long run, this should make animal health management more organized and easier to carry out. Health data collected electronically in herd management programs and data and information platforms should be quickly and easily accessible. This could open up new possibilities for the objective comparison of farm animal health. For the Hp determination, there are several possibilities for sampling scenarios. The sampling and measurement can take place on an occasion-related basis or as a regular check.

Occasional measurements take place once or over a short period of a few days. The health markers should be recorded during differentiated, operational situations. Depending on the occasion of the measurement, different conclusions can be drawn from the results.

- Screening of the stock: Sampling of all animals once a month to determine overall health and well-being for a stock
  - serves as a basis for farm comparisons: stocks could be assessed due to variations in the baseline concentration of parameters and the proportion of animals outside the normal range.
  - Measurement in milk yield test samples is recommended.
- Screening of individual animals: occasion-related sampling of selected individual animals to determine the current state of health
  - Purchase / sale of cows: If an animal should leave the farm or be taken into the business, a health check can be carried out quickly and purposefully by measuring the health parameter in the milk.
  - Drying: Only udder-healthy cows may be kept dry. Undiscovered clinical mastitis or subclinical mastitis should be excluded.

For detected diseases, the measurements outside the milking routine could be continued on an ad hoc basis to monitor the therapy. In support of the puerperal control, the sensitive phase of early lactation could be monitored in the first few weeks, as the cows are particularly susceptible to disease due to the metabolic changes at the onset of lactation and the burden of calving.

### 2. INTENDED USE

---

The NovaTec VetLine Bovine Haptoglobin ELISA is intended for the quantitative determination of Haptoglobin in bovine serum or milk.

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

---

The quantitative immunoenzymatic determination of bovine Haptoglobin is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antibodies to bind corresponding Haptoglobin of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured Haptoglobin. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of Haptoglobin in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

### 4. MATERIALS

---

#### 4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with anti-bovine Haptoglobin antibodies; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1). Can also be used as a negative control.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 15 mL of peroxidase labelled anti-bovine Haptoglobin antibodies; coloured red; ready to use; white cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.

- **Standards:** 6 vials, each containing 2 mL standard (bovine Haptoglobin); coloured yellow; ready to use;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
 

Standard A:	500	ng/mL; yellow cap
Standard B:	250	ng/mL; yellow cap
Standard C:	125	ng/mL; yellow cap
Standard D:	62.5	ng/mL; yellow cap
Standard E:	31.25	ng/mL; yellow cap
Standard F:	15.63	ng/mL; yellow cap

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

## 4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000  $\mu\text{L}$
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

### 6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with anti-bovine Haptoglobin antibodies. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

### 6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

### 6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

## 7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

---

Use bovine serum or milk samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

### 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted with Sample Dilution Buffer. Different dilutions have to be tested to obtain absorbance values within the calibration curve.

For serum samples we recommend to start with the following dilution: 1+50, 1+100, 1+1000, 1+10,000.

For milk samples we recommend to start with the following dilutions: 1+5, 1+10, 1+50, 1+100

For example: Dispense 10  $\mu\text{L}$  sample and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to  $37 \pm 1$  °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37 \pm 1$  °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be  $> 5$  sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.1. Measurement

Adjust the ELISA microwell plate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microwell plate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value  $< 0.100$
- **Standard A:** Absorbance value  $> 0.800$
- **Standard B:** Absorbance value  $> \text{Standard C}$
- **Standard C:** Absorbance value  $> \text{Standard D}$
- **Standard D:** Absorbance value  $> \text{Standard E}$
- **Standard E:** Absorbance value  $> \text{Standard F}$
- **Standard F:** Absorbance value  $< 0.200$

**Standard A  $>$  Standard B  $>$  Standard C  $>$  Standard D  $>$  Standard E  $>$  Standard F**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 9.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results** plot the (mean) absorbance values of the 6 Standards A - F in a system of coordinates against their corresponding concentrations, starting with the lowest concentration (Standard F) (15,63 / 31,25 / 62,5 / 125 / 250 and 500 ng/mL) and draw a standard curve (absorbance values on the y-axis, concentrations on the x-axis).

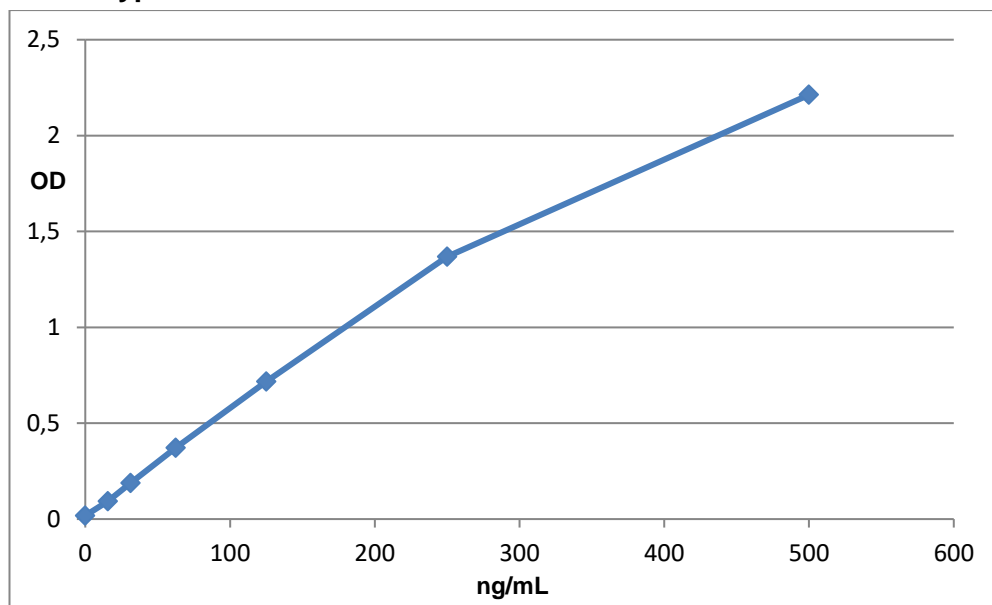
Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each bovine sample.

For the calculation of the standard-curve mathematical Point to Point function should be used.

In order to calculate the final concentration, the values from the calibration line have to be corrected by the sample dilution.

**Example:** The sample was diluted 1+100 in Sample Dilution Buffer. The sample resulted in an OD of 0.579. According to the calibration line the concentration is e.g. 69.44 ng/mL. Now you have to multiply this with your dilution factor. In this example the factor is 100. For this reason the final concentration in the sample is 6944 ng/mL respectively **6.94 µg/mL**.

### 9.3. Typical Standard Curve



### 9.4. Interpretation of Results and Recommendations - Preliminary-

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own sample populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

Bovine milk samples - Preliminary-		
Reference range [µg/mL]	Rating	Clinical status
< 0.5	low	healthy
1.0-4.5	critical	notable value
10-50	medium	subclinical mastitis
> 300	high	clinical mastitis
Bovine serum samples - Preliminary-		
10-50	low	healthy
600-700	medium	Physiological (5.-7.dpp*)
>1,000-2,000	high	sick
Diagnosis of a disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. * dpp- day post partum		

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

### 10.1. Precision

-to be determined-

### 10.2. Diagnostic Specificity

-to be determined-

### 10.3. Diagnostic Sensitivity

-to be determined-

### 10.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator.

-to be determined-

### 10.5. Interferences

-to be determined-

### 10.6. Cross Reactivity

-to be determined-

### 10.7. Measurement range

-to be determined-

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- **For research use only!**
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

### 12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

#### Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray
P280	Wear protective gloves/protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

### 12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.:           BHAPV4040           VetLine Bovine Haptoglobin ELISA (96 Determinations)

# DEUTSCH

## 1. EINLEITUNG

---

Haptoglobin (Hp) ist das meistuntersuchte Akut-Phase-Protein im Rind. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die Konzentration des Proteins im Serum während infektiöser und entzündlicher Erkrankungen stark ansteigt. Während einer Mastitis ist auch in der Milch die Hp-Konzentration stark erhöht. Im Verlauf der peripartalen Immunsuppression und in der frühen Laktation sind Milchkühe auch besonders anfällig für Infektionserkrankungen wie Uterus-, Klauen- oder Atemwegsinfektionen. Nicht selten tritt auch eine Labmagenverlagerung (LMV) auf. Es konnte gezeigt werden, dass auch während dieser Erkrankungen die Haptoglobinkonzentration in der Milch erhöht ist.

Die Bestimmung von Hp als Gesundheitsparameter in der Milch oder im Plasma / Serum der Tiere ermöglicht die Einschätzung des allgemeinen Gesundheitszustands. Der Nachweis könnte als Instrument einer tierwohlorientierten Bestandsführung in die betriebliche Diagnostik implementiert werden. Langfristig soll dadurch das Tiergesundheitsmanagement organisierter ablaufen und einfacher durchführbar sein. Die elektronisch in Herdenmanagementprogrammen und Daten- und Informationsplattformen erfassten Gesundheitsdaten sollen schnell und einfach zugänglich sein. Das könnte neue Möglichkeiten für den objektiven Betriebsvergleich auf Ebene der Tiergesundheit erschließen.

Für die Hp-Bestimmung stellen sich mehrere Möglichkeiten für Beprobungsszenarien dar. Die Probenahme und Messung kann anlassbezogen oder als regelmäßige Kontrolle stattfinden.

Anlassbezogene Messungen erfolgen einmalig oder über einen kurzen Zeitraum von wenigen Tagen. Die Gesundheitsmarker sollen während differenzierten, betrieblichen Situationen erfasst werden. Je nach Anlass der Messung können den Ergebnissen verschiedene Aussagen entnommen werden.

- Screening des Bestands: Beprobung aller Tiere einmal im Monat zur Bestimmung des allgemeinen Gesundheitszustandes und des Wohlbefindens für einen Bestand
  - dient als Grundlage für Betriebsvergleiche: Bestände könnten aufgrund von Schwankungen der Basis-Konzentration der Parameter und dem Anteil der Tiere außerhalb des Normbereiches beurteilt werden.
  - Messung in Proben der Milchleistungsprüfung bietet sich an.
- Screening von Einzeltieren: anlassbezogene Beprobung ausgewählter Einzeltiere zur Bestimmung des momentanen Gesundheitszustandes
  - Einkauf/Verkauf von Kühen: Soll ein Tier den Betrieb verlassen oder in den Betrieb aufgenommen werden, kann eine Gesundheitskontrolle gezielt und schnell durch Messung des Gesundheitsparameters in der Milch erfolgen.
  - Trockenstellen: Ausschließlich eutergesunde Kühe dürfen trocken gestellt werden. Eine unentdeckte klinische Mastitis oder subklinische Mastitis muss ausgeschlossen sein.

Bei detektierten Erkrankungen könnten anlassbezogen die Messungen außerhalb der Melkroutine fortgeführt werden, um die Therapie zu überwachen.

Unterstützend zur Puerperalkontrolle könnte die empfindliche Phase der Früh-laktation in den ersten Wochen überwacht werden, da die Kühe hier durch die Stoffwechsellumstellungen bei der einsetzenden Laktation und die Belastungen durch die Kalbung besonders krankheitsanfällig sind.

## 2. VERWENDUNGSZWECK

---

Der NovaTec VetLine Bovine Haptoglobin ELISA ist für den quantitativen Nachweis von Haptoglobin in bovinem Serum oder Milch bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

---

Die quantitative immunenzymatische Bestimmung von bovinem Haptoglobin beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern beschichtet, an welche korrespondierendes Haptoglobin aus der Probe bindet. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an das an der Mikrotiterplatte gebundene Haptoglobin. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge des Haptoglobins in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-bovinen Haptoglobin Antikörpern; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe;  $\leq 0,0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1). Kann auch als Negativkontrolle verwendet werden.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 15 mL Peroxidase-konjugierten anti-bovinen Haptoglobin Antikörpern; rot gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB),  $< 0,1\%$ ; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Standards:** 6 Fläschchen mit je 2 mL Standard (bovines Haptoglobin); gelb gefärbt; gebrauchsfertig;  $\leq 0,02\%$  (v/v) MIT.

Standard A:	500	ng/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard B:	250	ng/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard C:	125	ng/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard D:	62,5	ng/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard E:	31,25	ng/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard F:	15,63	ng/mL; gelbe Verschlusskappe

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

### 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten (10 - 1000  $\mu$ L)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

### 6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit anti-bovinen Haptoglobin Antikörpern beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

### 6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

### 6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.



## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Es sollten bovine Serum- oder Milchproben verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

### 7.1. Probenverdünnung

Vor dem Test sollten alle Proben mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt werden. Es müssen verschiedene Verdünnungen getestet werden, um Absorptionswerte innerhalb der Kalibrierungskurve zu erhalten.

Für Serumproben empfehlen wir, mit der folgenden Verdünnung zu beginnen: 1 + 50, 1 + 100, 1 + 1000, 1 + 10.000.

Für Milchproben empfehlen wir, mit folgenden Verdünnungen zu beginnen: 1 + 5, 1 + 10, 1 + 50, 1 + 100

Bsp.: Geben Sie 10 µL Probe und 1 mL Probenverdünnungspuffer in Röhrchen, um eine 1 + 100-Verdünnung zu erhalten, gut mischen (Vortex).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf  $37 \pm 1$  °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.  
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

### 8.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Standard A:** Extinktionswert > **0,800**
- **Standard B:** Extinktionswert > **Standard C**
- **Standard C:** Extinktionswert > **Standard D**
- **Standard D:** Extinktionswert > **Standard E**
- **Standard E:** Extinktionswert > **Standard F**
- **Standard F:** Extinktionswert < **0,200**

**Standard A > Standard B > Standard C > Standard D > Standard E > Standard F**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

### 9.2. Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse zu erhalten, werden die Extinktionswerte der 6 Standards A - F in einem Koordinatensystem gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen, beginnend mit der kleinsten Konzentration (Standard F) (15,63 / 31,25 / 62,5 / 125 / 250 und 500 ng/mL) um eine Standardkurve zu erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

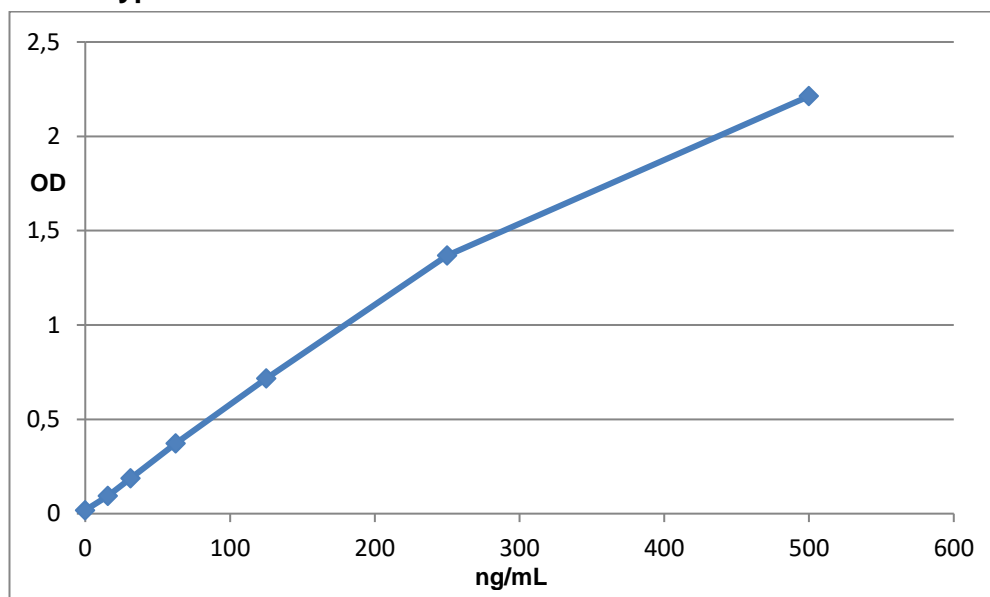
Anhand dieser Standardkurve lassen sich die Ergebnisse der gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen bovinen Probe ablesen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollte die mathematische „Punkt zu Punkt“ Funktion gewählt werden.

Um die Endkonzentration der Probe zu berechnen, müssen die Werte aus der Kalibrierungslinie um die Probenverdünnung korrigiert werden.

**Beispiel:** Eine Probe wurde in Probenverdünnungspuffer 1 + 100 verdünnt. Die Messung ergab eine Extinktion von 0,579. Gemäß der Kalibrierungslinie beträgt die Konzentration z.B. 69,44 ng/mL. Diese muss nun mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. In diesem Beispiel ist der Faktor 100. So berechnet beträgt die Endkonzentration in der Probe 6944 ng/mL bzw. **6,94 µg/mL**.

### 9.3. Typische Standardkurve



## 9.4. Interpretation der Ergebnisse und Empfehlung -Vorläufig-

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Probenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

Bovine Milchproben -vorläufig-		
Referenzbereich [µg/mL]	Bewertung	Klinischer Status
< 0,5	gering	gesund
1,0-4,5	kritisch	auffallender Wert
10-50	mittel	Subklinische Mastitis
> 300	hoch	Klinische Mastitis
Bovine Serumproben -vorläufig-		
10-50	gering	gesund
600-700	mittel	Physiologisch (5.-7.dpp*)
>1.000-2.000	hoch	krank

Die Diagnose einer Erkrankung darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.  
\* dpp- day post partum

## 10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

### 10.1. Präzision

-in Bearbeitung-

### 10.2. Diagnostische Spezifität

-in Bearbeitung-

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

-in Bearbeitung-

### 10.4. Analytische Sensitivität

-in Bearbeitung-

### 10.5. Interferenzen

-in Bearbeitung-

### 10.6. Kreuzreaktivität

-in Bearbeitung-

### 10.7. Messbereich

-in Bearbeitung-

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

---

- **Nur für Forschungszwecke!**
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

### 12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)  
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

#### Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

### 12.2. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

---

Produktnummer:      BHAPV4040      VetLine Bovine Haptoglobin ELISA (96 Bestimmungen)



## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA/ BLIBIOGRAFIA**

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia

Alsemgeest, S.P.M., Kalsbeek, H.C., Wensing, T., Koeman, J.P., van Ederen, A.M., Gruys, E., 1994. Concentrations of serum Amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *Veterinary Quarterly* 16, 21-23.

Eckersall, P.D., Connor, J.G., 1990. Plasma haptoglobin in cattle (*Bos taurus*) exists as polymers in association with albumin. *Comp. Biochem. Physiol. B* 96, 309-314.

Haghkhah, M., Nazifi, S., Jahromi, A., 2010. Evaluation of milk haptoglobin and amyloid A in high producing dairy cattle with clinical and subclinical mastitis in Shiraz. *Comparative Clinical Pathology* 19, 547-552.

Horadagoda, N.U., Knox, K.M., Gibbs, H.A., Reid, S.W., Horadagoda, A., Edwards, S.E., Eckersall, P.D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437-441.

Huzzey, J.M., Duffield, T.F., LeBlanc, S.J., Veira, D.M., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A., 2009. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science* 92, 621-625.

Nazifi, S., Rezakhani, A., Koohimoghadam, M., Ansari-Lari, M., Esmailnezhad, Z., 2008. Evaluation of serum haptoglobin in clinically healthy cattle and cattle with inflammatory diseases in Shiraz, a tropical area in sothern Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11, 95-101.

Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.

Wenz, J.R., Fox, L.K., Muller, F.J., Rinaldi, M., Zeng, R., Bannerman, D.D., 2010. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 93, 2458-2470.

## **ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS**

<b>CMIT</b>	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
<b>MIT</b>	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS**

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
<b>LOT</b>	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
<b>RUO</b>	For research use only/ Nur für Forschungszwecke / Destiné à la recherche uniquement/ Solo per scopi di ricerca/ Uso exclusivo en investigación / Apenas para fins de pesquisa
<b>REF</b>	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
<b>MTP</b>	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulación / Placa de Microtitulação
<b>CONJ</b>	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
<b>CAL</b>	Standard or Calibrator A-F / Standard oder Kalibrator A-F / Standard o Etalon A-F / Standard o Calibratore A-F / Estándar o Calibrador A-F/ Standard ou Calibrador A-F
<b>DIL</b>	Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon / Tampone di Diluizione del Campione / Tampón de Dilución de Muestras / Tampão de Diluição de Amostra
<b>SOLN STOP</b>	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio
<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução Substrato TMB
<b>WASH BUF 20x</b>	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

# SCHEME OF THE ASSAY

VetLine Bovine Haptoglobin ELISA

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Standard A - F	Sample (dilution: refer to point 7.1)
Standard A - F	-	100 µL	-
Sample (dilution: refer to point 7.1)	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37±1°C</b> Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer			
Conjugate	-	100 µL	100 µL
<b>Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C)</b> Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer			
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark</b>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)			



## NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6  
 63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760

Fax: +49 (0) 6074-487629

Email: info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

BHAPV4040-engl,dt-29042020-TL-RUO