

VetLine Bovine Haptoglobin

ELISA

Only for veterinary in-vitro diagnostic use.

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

Instructions for use / Gebrauchsanweisung

English	2
Deutsch.....	7
Abbreviations / Abkürzungen.....	14
Packaging Materials / Verpackungsmaterialien.....	14
Symbols Key / Symbolschlüssel	15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung	16

Product Number: BHAPV4040 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

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

2. 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.

3. MATERIALS

3.1. 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; $\leq 0.0015\%$ (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; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **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 11.1

3.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. 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 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. 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.

5. 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!

5.1. 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.

5.2. 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.

5.3. 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.

6. 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.

6.1. 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 µL sample and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions 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 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. 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 ± 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 ± 5 min at 37 ± 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.

7.1. 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.

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

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

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Standard A:** Absorbance value > **0.800**
- **Standard B:** Absorbance value > **Standard C**
- **Standard C:** Absorbance value > **Standard D**
- **Standard D:** Absorbance value > **Standard E**
- **Standard E:** Absorbance value > **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.

8.2. 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).

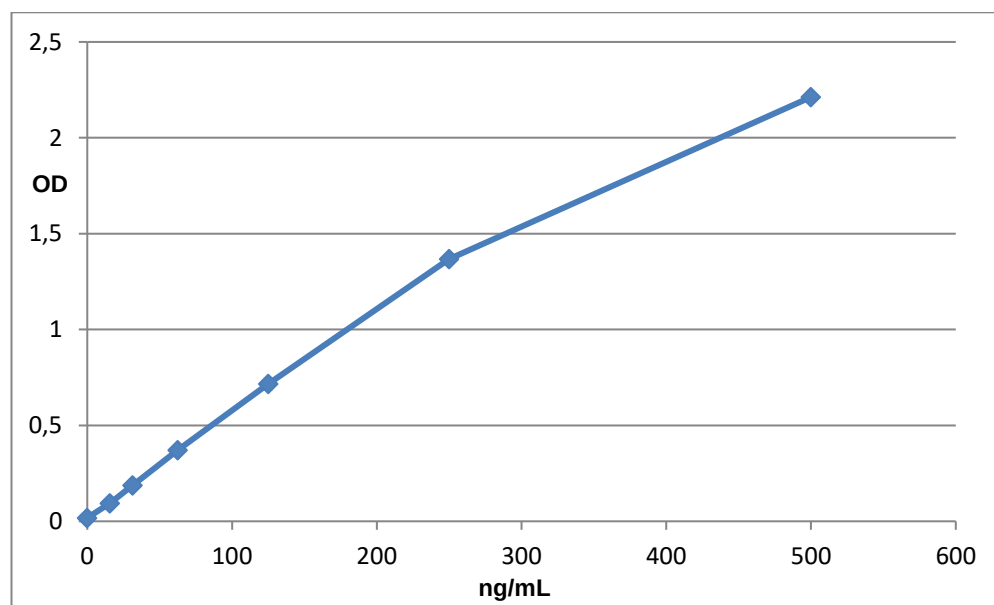
Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each bovine sample.

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**.

8.3. Typical Standard Curve



8.4. 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		

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

For further information about the specific performance characteristics please contact Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH.

9.1. Precision

9.2. Diagnostic Specificity

9.3. Diagnostic Sensitivity

9.4. Analytical Sensitivity

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

9.5. Interferences

9.6. Cross Reactivity

9.7. Measurement range

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the samples.
- 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.
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
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 clothing and Wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1)
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. 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.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

12. ORDERING INFORMATION

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

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. 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 Waschschriff 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.

3. MATERIALIEN

3.1. 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 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 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 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **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; ≤ 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 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

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

4. 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.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

5.1. 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.

5.2. 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.

5.3. 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.

6. 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.

6.1. 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).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung 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 Waschschrte von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn 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 ± 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.

7.1. 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 notieren.

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

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

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **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.

8.2. 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).

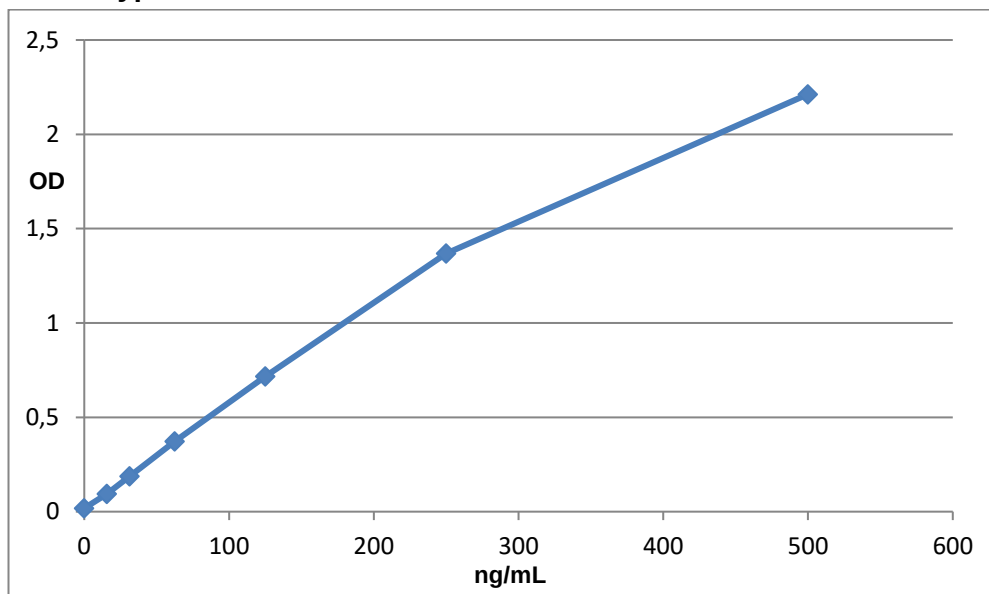
Anhand dieser Standardkurve lassen sich die Ergebnisse der gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen bovinen Probe ablesen.

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**.

8.3. Typische Standardkurve



8.4. 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		

9. TESTMERKMALE

Für weitere Informationen zu den spezifischen Leistungsmerkmalen wenden Sie sich bitte an die Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH.

9.1. Präzision

9.2. Diagnostische Spezifität

9.3. Diagnostische Sensitivität

9.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Empfindlichkeit ist definiert als die scheinbare Konzentration des Analyten, die vom Nullkalibrator unterschieden werden kann.

9.5. Interferenzen

9.6. Kreuzreaktivität

9.7. Messbereich

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- 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.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1)

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

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

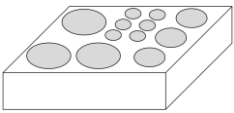
12. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: BHAPV4040 VetLine Bovine Haptoglobin ELISA (96 Bestimmungen)

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	 PAP 22
SOLN STOP	WASH BUF 20x CONJ CAL	SUB TMB DIL	MTP
 HDPE 2	 PP 5	 PET / ALU / LDPE 90	

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL

	Manufactured by / Hergestellt von
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung
	Expiration Date / Verfallsdatum
	Storage Temperature / Lagertemperatur
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte
CONJ	Conjugate / Konjugat
CAL	Standard or Calibrator A-F / Standard oder Kalibrator A-F
DIL	Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung
WASH BUF 20x	"Washing Buffer (20x concentrated)"; REF W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests

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.
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 Incubate for 1 h at 37±1°C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer			
Conjugate	-	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) 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
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)			



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: Info.Frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.comWebsite: clinical.goldstandarddiagnostics.com

BHAPV4040 engl,dt-20231026-DH