



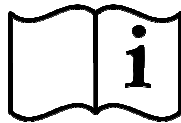
SensioScreen

Haptoglobin (Rind) ELISA

Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Haptoglobin in bovinen Milchproben

REF H102.096

96 Tests



*For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.*



Sension

Biologische Detektions- und
Schnelltestsyste

Sension GmbH
Provinenstr. 52 / B14
86153 Augsburg
GERMANY

Tel.: +49 (0)821 / 455 799 - 0
Fax: +49 (0)821 / 455 799 - 22

sensioscreen@sension.eu
www.sension.eu

Inhaltsverzeichnis

Testprinzip	3
Einführung	3
Anwendungsgebiete	3
Material	4
Enthaltene Materialien.....	4
Weitere benötigte Materialien	4
Vorbereitung der Reagenzien	4
Warnungen und Hinweise	4
Probenvorbereitung	5
Milch.....	5
Probenverdünnung.....	5
Testdurchführung.....	5
Allgemeine Anmerkungen	5
Testablauf	5
Ergebnisse	6
Testcharakteristika	6
Messbereich und Standardkurve	6
Präzision	6
Wiederfindung.....	7
Linearität	7
Literatur	7
Plattenlayout	8

Der SensioScreen Haptoglobin ELISA ist ein Immunoassay zur Bestimmung des Entzündungsmarkers Haptoglobin in bovinen Milchproben.

Testprinzip

Der Test basiert auf einer spezifischen Erkennung von Haptoglobin mittels polyklonalen Antikörpern, die auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert sind. Das in der Probe oder Standardlösung enthaltene Haptoglobin (Hp) bindet spezifisch an den immobilisierten Antikörper. Der anschließend zugegebene Detektionsantikörper bildet einen Komplex mit dem zuvor gebundenen Haptoglobin. Je höher die Haptoglobinkonzentration in einer Probe ist, desto mehr Detektionsantikörper binden und desto intensiver verläuft die anschließende Farbreaktion.

Einführung

Durch die Bestimmung des Akute-Phase Proteins Haptoglobin bietet sich die Möglichkeit, auf der Grundlage einer einfachen Milchuntersuchung mit hoher Sicherheit festzustellen, ob eine Kuh unter einer Entzündung, auch im kaum erkennbaren Frühstadium leidet. Der Haptoglobinwert steigt schon in sehr frühen Entzündungsphasen an, so dass diese häufig auch bei Tieren festgestellt werden, die äußerlich einen noch unauffälligen Eindruck machen.

In einem Bestand werden häufig, für den Tierhalter meist überraschend, einige Tiere als haptoglobinpositiv diagnostiziert. Deshalb bietet sich die Haptoglobinbestimmung in Milch ganz besonders für die Gesundheitsüberwachung im Rahmen einer Bestandsbetreuung an.

Anwendungsgebiete

Durch entsprechende gezielte Maßnahmen nach positiven Haptoglobinmessungen, bietet sich die Möglichkeit, die Herdengesundheit zu überwachen und zu optimieren, insbesondere durch frühzeitige Therapieansätze akute Entzündungen zu vermeiden, die Wirtschaftlichkeit zu steigern und Ansteckungen innerhalb des Bestands vorzubeugen. Tiere mit subklinischen Entzündungen weisen in aller Regel eine geringere Milchleistung und eine geringere Fruchtbarkeit auf. Die frühzeitige Erkennung subklinischer Erkrankungen trägt auch dazu bei, klinischen Erkrankungen vorzubeugen und Antibiotika gezielter und damit reduzierter einzusetzen. Häufige Entzündungen bei Milchkühen stellen Euterentzündungen, Gebärmutterentzündungen und Entzündungen der Hufe dar. Bei der Geburt steigt der Haptoglobinwert ebenfalls an, um sich im Normalfall post partum wieder zu normalisieren. Im Falle von sich bildenden Entzündungen bleibt der Haptoglobinwert erhöht.

Material

Enthaltene Materialien

1. **MTP** **Mikrotiterplatte mit Deckel:** 12x8 (teilbare) Streifen
Mit einem polyklonalen Anti-Haptoglobin-Antikörper beschichtete Kavitäten
2. **STD** **Standard (1-6):** 6 Fläschchen, 1,5 mL
Konzentrationen 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 ng/mL
3. **CONJ** **Enzymkonjugat:** 1 Fläschchen, 11 mL
An Peroxidase gekoppelte Anti-Haptoglobin-Antikörper
4. **TMB** **TMB-Substrat:** 1 Fläschchen, 11 mL
5. **STOP** **Stopplösung:** 1 Fläschchen, 6 mL
9.9 % H₃PO₄. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden!
6. **15x WASH** **Waschlösung (15x Konzentrat):** 1 Fläschchen, 33 mL
Vor Benutzung bitte verdünnen. Inhalt ist ausreichend zur Herstellung von 500 ml 1x Waschlösung.
7. **DIL** **Probenverdünnungslösung:** 1 Fläschchen, 10 mL
8. **Testanleitung**

Weitere benötigte Materialien

1. Entionisiertes oder destilliertes Wasser
2. Mikroliterpipetten für die Volumina 20-200 µl und 100-1000 µl
3. Bechergläser für die Verdünnung von Puffern
4. Ein Mikrotiterplattenwascher (alternative: waschen mit einer Mehrkanalpipette)
5. Ein Mikrotiterplatten-Photometer zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm (idealerweise mit Referenzmessung bei Wellenlänge 620 nm)

Vorbereitung der Reagenzien

- Alle Reagenzien vor Benutzung auf Raumtemperatur bringen
- Unmittelbar nach Benutzung alle Reagenzien wieder bei 2-8 °C lagern

Waschlösung (15x Konzentrat):

Das 15x Waschlösungskonzentrat (33 mL) mit 467 ml entionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur zwei Wochen stabil.

Warnungen und Hinweise

- Vermeiden Sie den Kontakt mit der Stopplösung. Es könnte zu Hautirritationen führen.
- Benutzen Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Vermischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Kits.
- Lagern Sie die Reagenzien kühl (2-8 °C). **Nicht einfrieren!**
- Entsorgen Sie die Kit-Bestandteile entsprechend den in Ihrem Land geltenden Vorschriften.

Probenvorbereitung

Milch

Es können Proben aus der Vollmilch oder aus dem Vorgemelk gemessen werden. Die Proben sind bei 2-8°C für mindestens 24 h stabil. Für längere Aufbewahrung sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden. Durchmischen Sie die Probe jeweils unmittelbar vor der Analyse durch 2-3 maliges Schütteln, um eine homogene Emulsion zu erhalten.

Probenverdünnung

Alle Milchproben müssen vor der Messung im ELISA **1:10** mit der im Kit enthaltenen Probenverdünnungslösung verdünnt werden.

Bsp.: 25 µl Probe + 225 µl Probenverdünnungslösung

Testdurchführung

Allgemeine Anmerkungen

- Alle Reagenzien vor Benutzung auf Raumtemperatur bringen
- Alle Proben und Reagenzien, insbesondere die Standardlösungen sollten vor Verwendung gut durchmischt werden.
- Benutzen Sie jeweils eine frische Pipettenspitze für jeden Standard, Kontrolle oder Probe um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Pipettieren Sie den ELISA möglichst ohne Unterbrechung.

Testablauf

1. Entfernen Sie die nicht benötigten Kavitäten aus dem Plattenrahmen und lagern Sie diese im verschlossenen Aluminiumbeutel bis zur nächsten Verwendung.
2. Es werden jeweils **100 µl** der **Standards (unmittelbar vor Nutzung sehr gut durchmischen!)** und **Proben** im Doppelansatz in die Kavitäten pipettiert.
3. Decken Sie die Platte mit dem beiliegenden Deckel ab
4. Inkubieren Sie die Platte für **30 min** bei Raumtemperatur
5. Waschen Sie die Kavitäten **3 mal** mit je **300 µl** verdünnter **Waschlösung**
6. Entfernen Sie Flüssigkeitsreste durch vorsichtiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papier
7. Geben Sie in jede Kavität **100 µl** des **Enzymkonjugats**
8. Decken Sie die Platte mit dem beiliegendem Deckel ab
9. Inkubieren Sie die Platte für **30 min** bei Raumtemperatur
10. Waschen Sie die Kavitäten **3 mal** mit je **300 µl** verdünnter **Waschlösung**
11. Entfernen Sie Flüssigkeitsreste durch vorsichtiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papier
12. Geben Sie **100 µl TMB-Substrat** in jede Kavität
13. Inkubieren Sie die Platte für **10 min bei Raumtemperatur**.
14. Stoppen Sie die Farbreaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung**
15. Messen Sie die Extinktion bei **450 nm** innerhalb von 30 min (idealerweise mit einer Referenzmessung bei 620 nm)

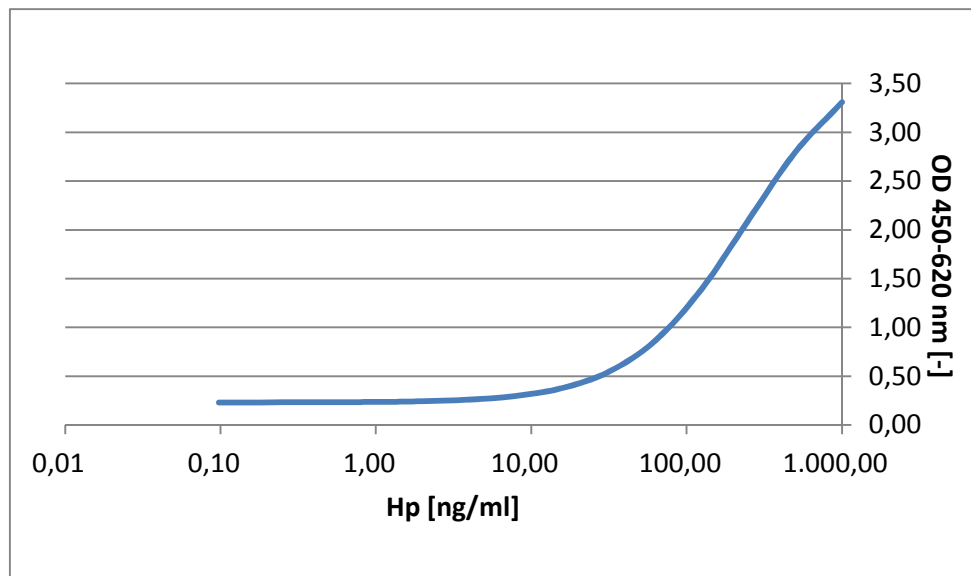
Ergebnisse

Ermitteln Sie die OD-Werte der Kavitäten mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm (mit einer Referenzmessung bei 620 nm) und errechnen Sie die Mittelwerte der Doppelansätze. Die Auswertung des ELISA kann mittels kommerzieller ELISA-Software erfolgen. Für eine manuelle Auswertung tragen Sie die ermittelten OD-Werte auf halblogarithmisches Papier auf und lesen Sie die Haptoglobinkonzentration der Proben aus dem Diagramm ab.

Testcharakteristika

Messbereich und Standardkurve

Der Messbereich des ELISA liegt zwischen 0-150 ng/ml. Eine typische Standardkurve welche mit diesem Kit erzielt werden kann ist unten abgebildet. Die abgebildete Kurve darf nicht für die Auswertung der Proben verwendet werden, sondern muss bei jedem Lauf des Protokolls neu erstellt werden.



Präzision

Die Intra- und Inter-Assay-Varianzen wurden ermittelt, indem verschiedene Milchproben analysiert wurden.

Intra-Assay	Probe 1	Probe 2	Probe 3
n	16	16	16
Mittelwert [ng/ml]	127,05	48,65	19,55
SD	6,82	5,77	3,19
VK	5%	12%	16%

Inter-Assay	Probe 1	Probe 2	Probe 4
n	8	8	8
Mittelwert [ng/ml]	131,74	60,85	42,67
SD	9,84	4,68	5,45
VK	7%	8%	13%

Wiederfindung

Zu verschiedenen Milchproben wurden Standardlösungen mit definierten Haptoglobinkonzentrationen gegeben. Die Wiederfindung des zugesetzten Haptoglobins wurde aus dem Verhältnis von gemessenem und erwartetem Haptoglobingehalt errechnet.

Erwartete Hp-Konzentration [ng/ml]	Gemessene Hp-Konzentration [ng/ml]	Wiederfindung
100,32	92,14	92%
44,07	39,32	89%
30,01	32,21	107%

Linearität

Drei verschiedene Milchproben wurden mit der Probenverdünnungslösung seriell verdünnt. Die Linearitäten in % wurden aus dem Verhältnis von gemessenem und erwartetem Haptoglobingehalt errechnet.

	Verdünnung	Erwartete Hp-Konzentration [ng/ml]	Gemessene Hp-Konzentration [ng/ml]	Linearität
Probe 1	1:10		149,01	
	1:20	74,70	73,66	99%
	1:40	37,35	36,86	99%
	1:80	18,68	19,02	102%
	1:160	9,34	9,29	99%
Probe 2	1:10		54,93	
	1:20	26,31	27,46	96%
	1:40	13,58	13,73	99%
	1:80	7,50	6,87	109%
Probe 3	1:10		26,01	
	1:20	12,77	13,01	98%
	1:40	6,77	6,50	104%

Literatur

- [1] Dr. Peter Zieger, "Was der Landwirt nicht sieht - Vorbeugemaßnahmen zur Erhaltung und Verbesserung des Gesundheitsstatus von Rindern," 34. Viehwirtschaftliche Fachtagung, Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein, A-8952 Irdning, 19-Apr-2007.
- [2] H. H. Petersen, J. P. Nielsen, and P. M. H. Heegaard, "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry," *Vet. Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 163–187, Apr. 2004.
- [3] B. H. Nielsen, S. Jacobsen, P. H. Andersen, T. A. Niewold, and P. M. H. Heegaard, "Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions," *Vet. Rec.*, vol. 154, no. 12, pp. 361–365, Mar. 2004.
- [4] U. Grönlund, C. Hallén Sandgren, and K. Persson Waller, "Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis," *Vet. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 191–198, Apr. 2005.
- [5] H. Murata, N. Shimada, and M. Yoshioka, "Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview," *Vet. J. Lond. Engl.* 1997, vol. 168, no. 1, pp. 28–40, Jul. 2004.
- [6] T. E. Wittum, C. R. Young, L. H. Stanker, D. D. Griffin, L. J. Perino, and E. T. Littledike, "Haptoglobin response to clinical respiratory tract disease in feedlot cattle," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 57, no. 5, pp. 646–649, May 1996.
- [7] Gračner, Damjan, "Hematološki pokazatelji i razina haptoglobina u krvi i mlijeku krava s mastitisom : disertacija / Damjan Gračner," 2005.
- [8] Dr. Reinhard Tschischkale and Dr. Thomas Peters, "Tiergesundheit und mehr," no. 03/06, pp. 9–11, 2006

Plattenlayout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												