

Instructions for Use

Fasciola hepatica (Bovine / Sheep) ELISA

VET

REF EIA-5075



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
 Utilize apenas a versão válida das Instruções de Utilização fornecidas com o kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente : Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:	
10 VALIDATION OF RESULTS:	Correction of the validation of results

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	PRESENTATION	2
2	COMPOSITION OF THE KIT	2
3	INTRODUCTION.....	2
4	TEST PRINCIPLE	3
5	ADDITIONAL MATERIAL AND REQUIRED EQUIPMENT (NOT PROVIDED).....	3
6	PRECAUTIONS FOR USE	4
7	PREPARATION OF SOLUTIONS.....	4
8	PREPARATION OF SAMPLES.....	4
9	PROCEDURE	5
10	VALIDATION OF RESULTS	5
11	INTERPRETATION OF RESULTS.....	6
12	SUMMARY *	7
1	VERSION	8
2	BESTANDTEILE DES TESTKITS	8
3	EINLEITUNG.....	8
4	TESTPRINZIP	9
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄT (NICHT ENTHALTEN).....	9
6	HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
7	VORBEREITUNG VON LÖSUNGEN	10
8	VORBEREITUNG DER PROBEN	10
9	TESTDURCHFÜHRUNG	11
10	AUSWERTUNG DER RESULTATE	11
11	INTERPRETATION DER RESULTATE	12
12	ZUSAMMENFASSUNG *	13
	SYMBOLS USED	14

ELISA kit for serodiagnosis of fasciolosis

Biwell, indirect test

In vitro and strictly veterinary use.

Sample	Individual analysis	Pool analysis*, possible up to
Bovine serum	✓	10
Ovine serum	✓	10
Bovine milk (skimmed** and non-skimmed)	✓	Tank

* This is done in accordance with the legislation in force in your country, the certifying body or the recommendations made by the NRL when they exist. Mixtures must be made volume to volume, i.e., by taking the same volume of each of the sera making up the mixture.

** centrifugate 20 minutes at 4000 g

1 PRESENTATION

Format	2 plates, strips of 16 wells
Reactions	96 tests

2 COMPOSITION OF THE KIT

Provided material	EIA-5075
Microplates	2
Washing solution (20 X)	1 x 100 mL
Colored dilution solution (1X)	2 x 100 mL
Conjugate (50 X)	1 x 0.6 mL
Positive control	1 x 0.5 mL
Negative control	1 x 0.5 mL
Tracer (1 X)	1 x 0.5 mL
Single component TMB (1 X)	1 x 25 mL
Stop solution (1 X)	1 x 15 mL

3 INTRODUCTION

Bovine fasciolosis caused by the digenic trematode *Fasciola hepatica* is a worldwide parasitic disease common in ruminants. This two-host life cycle parasite is classically found in farms where all conditions for the survival and the multiplication of the snail intermediate host (*Galba truncatula*) are fulfilled. This snail is mainly found in damp meadows (watering-places, brooks, springs).

Fasciola egg shedding occurs with faeces. Hatching follows in water and gives rise to the miracidium which infests the snail. After multiplication in this host, cercariae are eliminated and give rise to infectious metacercariae fixed on a plant holder.

Once ingested by a ruminant, young flukes migrate through the liver to reach bile ducts. The prepatent period is 8 to 10 weeks. Adults appear in the bile ducts and start to lay eggs.

Liver damage and acute disease (especially in sheep) are caused by migrating immature parasites. Chronic disease occurs in cattle during the biliary phase.

Zootechnical characteristics are hampered by the disease. Decrease in milk yield (- 10%), weight loss, intermittent diarrhoea, anemia, and fertility problems.

Diagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle can only be made after 8 to 10 weeks by coprological examination of faecal material. However, sometimes even repeated fecal examination cannot identify any *Fasciola hepatica* infection due to the lack of sensitivity of this method.

Acute distomatosis of the sheep is characterized by anemia and sometimes sudden mortality and chronic distomatosis by anemia, reduction of the dairy production, reduction of the average daily profit and oedemas.

4 TEST PRINCIPLE

The test uses 96-well microtitration plates sensitised by a monoclonal antibody specific to one protein of *Fasciola hepatica*. This antibody is used to trap the protein as well as to purify it from lysate of the parasite.

The plate's odd columns (1, 3, 5, 7, 9 and 11) contain the specific protein, whereas the even columns (2, 4, 6, 8, 10 and 12) contain only the monoclonal antibody.

This is a genuine negative control to differentiate specific anti-*Fasciola hepatica* antibodies from non-specific ones.

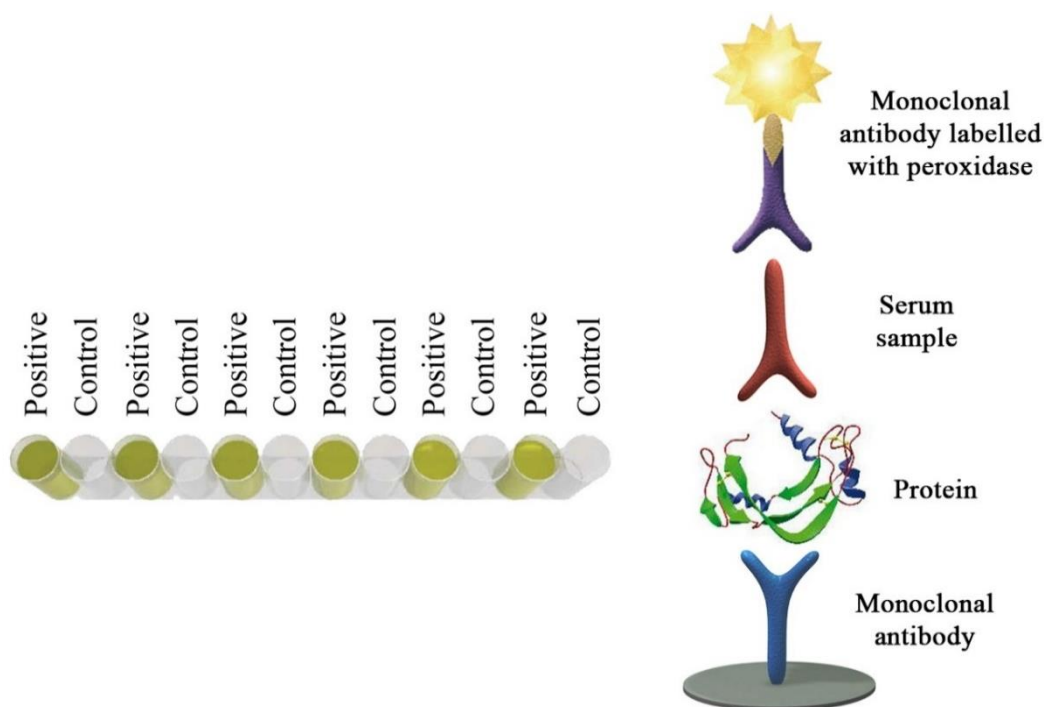
The test blood sera, plasma or milks are diluted in the dilution buffer.

The plate is incubated and washed, then the conjugate, a peroxidase-labelled anti-ruminant IgG1 monoclonal antibody, is added to the wells.

The plate is then incubated a second time at $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed again and the chromogen tetramethylbenzidine (TMB) is added. This chromogen has the advantages of being more sensitive than the other peroxidase chromogens and not being carcinogenic. If specific *Fasciola hepatica* immunoglobulins are present in the test sera or in milk, the conjugate remains bound to the microwell that contains the antigen, and the enzyme catalyses the transformation of the colorless chromogen into a pigmented compound. The intensity of the resulting blue colour is proportionate to the titer of specific antibody in the sample.

The signal read off the negative control microwell is subtracted from that of the positive microwell sensitised by the antigen. The interpretation of the results is done by comparing the signals of the samples (serum, plasma, or milk) with those of the positive controls.

Kit allows the analysis of pool of 10 individual sera or plasma. It allows too an analysis of bulk tank milk.



5 ADDITIONAL MATERIAL AND REQUIRED EQUIPMENT (NOT PROVIDED)

- Distilled/demineralized water
- Graduated mono- or multichannel pipettes (2-20 μL , 20-200 μL and 100-1000 μL range) and single-use tips
- Microplate reader (450 nm filter)
- Microplate washer
- Incubator at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Standard laboratory equipment: graduated cylinder, tube rack, lid, ...

6 PRECAUTIONS FOR USE

- The reagents must be kept between +2 °C to +8 °C.
- Unused strips must be stored with the desiccant in the hermetically sealed aluminum envelope.
- Do not use reagents beyond shelf-life date.
- Do not use reagents from other kits.
- Make sure to use distilled/demineralized water.
- The stopping solution contains 1 M phosphoric acid. Handle it carefully.
- Used material must be disposed of in compliance with the legislation in force regarding environmental protection and biological waste management.
- Keep the TMB solution away from light.

7 PREPARATION OF SOLUTIONS

- The solutions are to be prepared extemporaneously.
- The **washing solution** must be **diluted 20-fold** in distilled/demineralized water.
The cold solution crystallizes spontaneously.
Bring the vial to 21 °C ±3 °C to make sure that all crystals have disappeared; mix the solution well and withdraw the necessary volume.
- The dilution solution is ready to use. The dilution solution is colored in yellow.
- The **conjugate** must be **diluted 50-fold** in the dilution solution.
- The stopping solution is ready to use.
- The TMB solution is ready to use. It must be perfectly colorless.

8 PREPARATION OF SAMPLES

- **Serum samples** and **kit controls** (positive, negative serum and tracer) must be diluted **100-fold** in the dilution solution and homogenized.
Avoid using haemolysed samples or containing coagulum.

Recommended dilution:

10 µL of sample + 990 µL of dilution solution.

- **Milk** samples must be diluted **4-fold** in the dilution solution and homogenized.

Recommended dilution:

25 µL of sample + 75 µL of dilution solution.

9 PROCEDURE

- Bring all the reagents to 21 °C ±3 °C before use.
- Carefully read through the previous points.

Serum protocol (1/100 dilution)

1. Distribute **100 µL** per well of **diluted serum samples and kit controls**.
Cover and incubate the plate at 21 °C ± 3 °C during **60 ± 5 min**.

Milk protocol (1/4 dilution)

1. Distribute **100 µL** per well of **diluted milk samples** and **diluted kit controls**.
Cover and incubate the plate at 21 °C ± 3°C during **60 ± 5 min**.

OR

Direct preparation in the kit's microplate

Distribute 75 µL per well of dilution solution.

Add 25 µL of **pure milk samples** per well. Homogenize by pipetting up and down.

Distribute 100 µL of **diluted kit controls** per well.

Cover and incubate the plate at 21 °C ± 3°C during 60 ± 5 min.

N.B. : To avoid differences in incubation time between samples of a large series, sample dilutions and reference dilutions can be prepared in a dilution microplate before transfer (100 µL) into the test microplate using a multi-channel pipette.

Joint protocol

2. Remove the content of the microplate. Wash the microplate **3 times with 300 µL of washing solution** per well. Avoid the formation of bubbles in the wells between each wash.
3. Distribute **100 µL of diluted conjugate** per well.
Cover with a lid and incubate the plate at 21 °C ± 3 °C during **60 ± 5 min**.
4. Remove the content of the microplate. Wash the microplate **3 times with 300 µL of washing solution** per well. Avoid the formation of bubbles in the well between each wash.
5. Distribute **100 µL of TMB solution** per well.
Incubate at 21 °C ± 3 °C during **10 ± 1 min** away from the light, without covering.
6. Distribute the **stopping solution** at rate of **50 µL** per well.
The color changes from blue to yellow.
7. Record the optical densities using a plate spectrophotometer with a 450 nm filter within 5 minutes after adding the stopping solution.

10 VALIDATION OF RESULTS

The test can only be validated if:

- the difference between the optical density (OD) readings of the odd and even wells of the positive serum is greater than 0.800.

$$\text{Positive serum: } OD_{\text{odd well}} - OD_{\text{even well}} > 0.800$$

- the difference between the optical density (OD) readings of the odd and even wells of the negative serum is less than 0.300.

$$\text{Negative serum: } OD_{\text{odd well}} - OD_{\text{even well}} < 0.300$$

11 INTERPRETATION OF RESULTS

1. Calculate for each sample its « *delta OD* » by subtracting the optical density of the even well from the odd wells.
Example: $\Delta OD_{\text{sample}} = \text{Sample A1 well} - \text{Sample A2 well}$

2. Calculate for each sample its coefficient (S/P %) using the following formula:

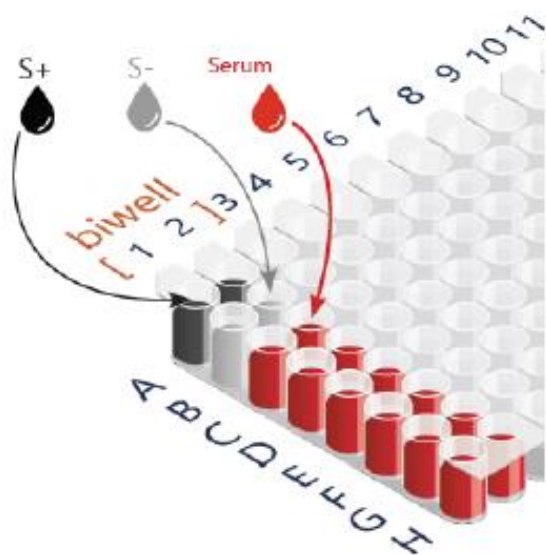
$$\text{S/P \%} = \frac{\Delta OD_{\text{sample}}}{\Delta OD_{\text{positive serum}}} \times 100$$

	Results		Status
Individual sample	S/P % < 10%	0	No infestation
	10% ≤ S/P % < 15%	±	Equivocal
	15% ≤ S/P % < 45%	+	Weak infestation
	45% ≤ S/P % < 75%	++	Medium infestation
	S/P % > 75%	+++	Strong infestation
Pool sample	S/P % < 5%	0	No infestation
	5% ≤ S/P % < 15%	±	Equivocal
	15% ≤ S/P % < 45%	+	Weak infestation
	45% ≤ S/P % < 75%	++	Medium infestation
	S/P % < 75%	+++	Strong infestation

12 SUMMARY *

Serum protocol

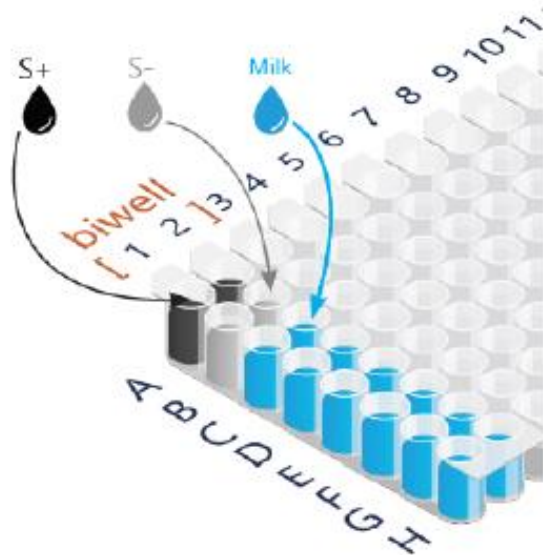
- 1 Dilution of samples 1/100
Dilution of the kit controls (positive and negative serum) 1/100



Kit microplate

Milk protocol

- 1 Dilution of samples 1/4
Dilution of the kit controls (positive and negative serum) 1/100



Kit microplate

Joint protocol

- 2 Add 100 μ L of conjugate



- 3 Add 100 μ L of TMB



- 4 Add 50 μ L of stop solution

- 5 Record the optical densities



* Summary does not replace the instructions for use of which it is a synthesis.

ELISA Kit für die Serodiagnostik der Fasziole
 Biwell, indirekt
In vitro und zur tierärztlichen Verwendung.

Probe	Einzelanalyse	Poolanalyse*, möglich bis zu
Rinderserum	✓	10
Schafserum	✓	10
Kuhmilch (entrahmt** und nicht entrahmt)	✓	Tank

* Die Mischung muss gemäß den geltenden Gesetzen Ihres Landes, der Zertifizierungsstelle oder den Empfehlungen des NRL erfolgen, sofern diese existieren. Die Mischungen müssen von Volumen zu Volumen hergestellt werden, d.h. von jedem der Seren, aus denen die Mischung besteht, muss das gleiche Volumen genommen werden.

** 20 Minuten bei 4000 g zentrifugieren

1 VERSION

Format	2 Platten, Streifen mit 16 Vertiefungen
Reaktionen	96 Tests

2 BESTANDTEILE DES TESTKITS

Etikett	Bereitgestelltes Material	EIA-5075
Microplate	Mikroplatten	2
Washing solution	Waschlösung (20X)	1 x 100 mL
Dilution Buffer	Gefärbte Verdünnungslösung (1X)	2 x 100 mL
Monoclonal Ab anti-Bovine IgG1 perox. conj	Konjugat (50X)	1 x 0,6 mL
Positive reference serum	Positive Kontrolle	1 x 0,5 mL
Negative reference serum	Negative Kontrolle	1 x 0,5 mL
Tracer	Tracer (1 X)	1 x 0,5 mL
TMB single component	Entwicklerlösung (TMB) (1X)	1 x 25 mL
Stop solution	Stopplösung (1X)	1 x 15 mL

3 EINLEITUNG

Die weltweit verbreitete Fasziole oder Leberegelkrankheit der Wiederkäuer wird durch *Fasciola hepatica*, einen Parasiten der Familie der Trematoden, hervorgerufen. Sie wird vor allem in Betrieben angetroffen, bei denen die Umweltbedingungen das Überleben und die Vermehrung des Zwischenwirts, erlauben. Die

ser Zwischenwirt bevölkert bevorzugt feuchte Wiesen (Umgebung von Tränken, Bächen, natürlichen Wasserquellen). Die Eier von *Fasciola hepatica* werden mit dem Kot der Tiere ausgeschieden und entwickeln sich im Wasser zu Wimpernlarven, dem *Miracidium*, welche die Zwergschlamm Schnecke infizieren und sich in ihr vermehren. Dies führt zur Freisetzung von mobilen Schwanzlarven, den Zerkarien, welche sich an Pflanzen festheften, um sich zu ansteckungsfähigen Larven, den Metazerkarien, zu entwickeln.

Die Tiere nehmen die Metazerkarien mit der Nahrung auf, der junge Egel wandert dann durch die Leber, setzt sich in den Gallengängen fest und beginnt mit der Eiablage.

Während der Migrationsphase verursachen die Egel schwere Leberschäden (akute Fasziole, besonders beim Schaf); während der Besiedlung der Gallenwege nimmt die Krankheit einen schleichenden Verlauf (chronische Fasziole, besonders beim Rind).

Bei den Tieren äußert sich der Befall vor allem durch eine Verringerung der Produktivität (Verminderung der Milchproduktion um 10%, Gewichtsverlust), wiederholten Durchfall, Blutarmut und Fruchtbarkeitsstörungen.

Die klinische Diagnose kann bei Rindern erst nach 8-10 Wochen erfolgen, und zwar durch eine koprologische Untersuchung. Diese Untersuchung ist jedoch schwierig; der Nachweis der Eier im Kot ist aufwendig und hat eine geringe Sensitivität.

Beim Schaf äußert sich die akute Fasziole durch Blutarmut und manchmal auch durch plötzliche Todesfälle, während die chronische Fasziole von Blutarmut, Wachstumsstörungen und Ödemen begleitet wird.

4 TESTPRINZIP

Für den Test werden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet, die mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet sind, der ein Protein von *Fasciola hepatica* spezifisch erkennt. Dieser Antikörper dient der Bindung und Aufreinigung des Proteins aus dem Lysat des Parasiten.

Die ungeraden Spalten 1, 3, 5, 7, 9 und 11 der Mikrotiterplatten enthalten das spezifische *Fasciola hepatica* Protein, während die geraden Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 nur den monoklonalen Antikörper enthalten und damit Leerproben darstellen.

Jede Probe wird zwei Mal aufgetragen, und zwar auf zwei in einer Reihe nebeneinander liegenden Vertiefungen. Auf diese Weise erhält man für jede Probe eine echte negative Kontrolle, mit der man spezifisch an *Fasciola hepatica* bindende Antikörper von nicht spezifisch bindenden unterscheiden kann.

Der Einsatz einer solchen Kontrolle reduziert die Zahl falsch Positiver deutlich.

Die Blutseren-, Plasma- oder Milchproben werden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

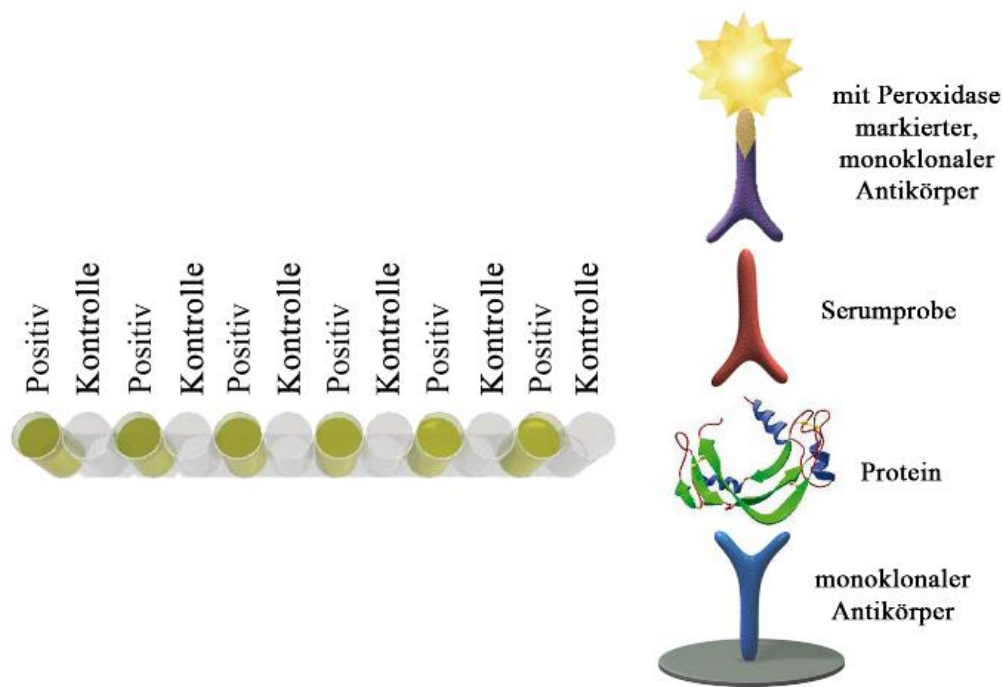
Die Proben werden auf die Platte gegeben, diese wird anschließend inkubiert und gewaschen. Das Konjugat, ein Peroxidase-markierter, monoklonaler anti-Rinder-IgG1-Antikörper, wird in die Vertiefungen gegeben.

Die Platte wird danach ein zweites Mal bei $21\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ inkubiert, dann gewaschen, anschließend wird das Chromogen Tetramethylbenzidine (TMB) zugefügt. Dieses Chromogen TMB bietet die Vorteile, dass es empfindlicher als andere mit der Peroxidase reagierende Farbstoffe reagiert und gleichzeitig nicht kanzerogen ist.

Enthält eine Probe (Serum, Plasma oder Milch) spezifische anti-*Fasciola hepatica*-Antikörper, bleibt das Konjugat in der das *Fasciola hepatica*-Protein enthaltenen Vertiefung gebunden und das Enzym katalysiert die Verwandlung des farblosen Chromogens in ein gefärbtes Produkt, während es bei der entsprechenden Leerprobe zu keiner Farbreaktion kommt.

Die Intensität der blauen Farbe ist proportional zum spezifischen Antikörpergehalt der Probe. Die gemessene, optische Dichte der Kontroll-Vertiefung (Leerprobe) wird von derjenigen abgezogen, die man auf der entsprechenden Vertiefung mit Leberegel-Antigen abgelesen hat.

Das Kit ermöglicht die Untersuchung von Poolproben, die aus bis zu 10 Einzelproben zusammengesetzt sind.



5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄT (NICHT ENTHALTEN)

- Destilliertes/demineralisiertes Wasser
- Graduierte Ein- oder Mehrkanalpipetten (2-20 μL , 20-200 μL und 100-1000 μL) und Einwegspitzen
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm-Filter)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Inkubator bei $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- Standard-Laboraüstung: Messzylinder, Röhrchenständer, Deckel für Mikrotiterplatten, ...

6 HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Die Reagenzien müssen zwischen +2 °C bis +8 °C aufbewahrt werden.
- Nicht verwendete Teststreifen müssen mit dem Trockenmittel in der hermetisch verschlossenen Aluminiumverpackung aufbewahrt werden.
- Die Funktionstüchtigkeit der Reagenzien über das Verfallsdatum hinaus kann nicht garantiert werden.
- Keine Reagenzien von anderen Testkits verwenden.
- Achten Sie darauf, dass Sie destilliertes/demineralisiertes Wasser verwenden.
- Die Stopplösung enthält 1M Phosphorsäure (ätzend). Vorsichtig handhaben.
- Gebrauchtes Material muss unter Einhaltung der geltenden Rechtsvorschriften für Umweltschutz und biologische Abfallwirtschaft entsorgt werden.
- Halten Sie die Entwicklerlösung (TMB) von Licht fern.

7 VORBEREITUNG VON LÖSUNGEN

- Die Lösungen müssen unmittelbar vor dem Gebrauch vorbereitet werden.
- Die **Waschlösung** muss **1:20** in destilliertem/demineralisiertem Wasser verdünnt werden.
Bei Kälte kristallisiert die Lösung spontan.
Die Flasche muss erst auf 21 °C ±3 °C erwärmt werden, bis alle Kristalle wieder in Lösung gegangen sind; dann Inhalt der Flasche gründlich mischen, bevor das benötigte Volumen entnommen wird.
- Die Verdünnungslösung ist gebrauchsfertig. Die Verdünnungslösung ist gelb eingefärbt.
- Das **Konjugat** ist in der Verdünnungslösung **1:50** zu verdünnen.
- Die Stopplösung ist gebrauchsfertig.
- Die Entwicklerlösung ist gebrauchsfertig. Sie muss vollkommen farblos sein.

8 VORBEREITUNG DER PROBEN

- **Serumproben** und **Kit-Kontrollen** (positives, negatives Serum und Tracer) müssen **1:100** mit der Verdünnungslösung verdünnt und homogenisiert werden.
Es muss vermieden werden, hämolysierte Proben, oder solche, die Koagulum enthalten, zu verwenden.

Empfohlene Verdünnung:

10 µL Probe + 990 µL Verdünnungslösung.

- **Milchproben** müssen **1:4** mit der Verdünnungslösung verdünnt und homogenisiert werden.

Empfohlene Verdünnung :

25 µL Probe + 75 µL Verdünnungslösung.

9 TESTDURCHFÜHRUNG

- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf 21 °C ±3 °C bringen.
- Lesen Sie die vorangegangenen Punkte sorgfältig durch.

Serumprotokoll (Verdünnung 1:100)

1. Pro Vertiefung **100 µL** der **verdünnten Serumproben und der verdünnten Kit-Kontrollen** verteilen. Die Platte mit einem Deckel verschließen und bei 21 °C ± 3 °C für **60 ± 5 Minuten** inkubieren.

Milchprotokoll (Verdünnung 1:4)

1. Pro Vertiefung **100 µL** der **verdünnten Milchproben und der verdünnten Kitkontrollen** verteilen. Die Platte mit einem Deckel verschließen und bei 21 °C ± 3 °C für **60 ± 5 Minuten** inkubieren.

ODER

Direkte Vorbereitung in der Mikroplatte des Kits

Pro Vertiefung 75 µL Verdünnungslösung verteilen.

25 µL der reinen Milchproben pro Vertiefung hinzufügen. Homogenisieren durch Ein- und Absaugen.

Pro Vertiefung 100 µL der **verdünnten Kit-Kontrollen** verteilen.

Die Platte mit einem Deckel verschließen und bei 21 °C ± 3 °C während 60 ± 5 Minuten inkubieren.

N.B.: Um Unterschiede in der Inkubationszeit zwischen den Proben zu vermeiden, können Probenverdünnungen und Referenzverdünnungen in einer Verdünnungsmikroplatte vorbereitet werden, bevor sie mit einer Mehrkanalpipette in die Testmikroplatte übertragen werden (100 µL).

Gemeinsames Protokoll

2. Den Inhalt der Mikroplatte entleeren. Die Mikroplatte **3-mal** mit **300 µL Waschlösung pro Vertiefung** waschen. Die Bildung von Blasen in den Vertiefungen sowie das Austrocknen der Mikroplatte zwischen den einzelnen Waschvorgängen müssen vermieden werden.
3. **100 µL des verdünnten Konjugats** pro Vertiefung hinzufügen. Die Platte mit einem Deckel verschließen und bei 21 °C ± 3 °C für **60 ± 5 Minuten** inkubieren.
4. Den Inhalt der Mikroplatte entleeren. **Die Mikroplatte 3-mal** mit **300 µL Waschlösung pro Vertiefung** waschen. Die Bildung von Blasen in den Vertiefungen sowie das Austrocknen der Mikroplatte zwischen den einzelnen Waschvorgängen müssen vermieden werden.
5. **100 µL der Entwicklerlösung (TMB)** pro Vertiefung verteilen. Bei 21 °C ± 3 °C für **10 ± 1 Minuten** vor Licht geschützt und ohne Abdeckung inkubieren.
6. Die Stopplösung mit **50 µL pro Vertiefung** verteilen. Die blaue Farbe wird in eine gelbe Farbe umschlagen.
7. Messung der optischen Dichte (OD-Werte) mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät und einem 450 nm-Filter. Innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung messen.

10 AUSWERTUNG DER RESULTATE

Der Test kann nur als valide gewertet werden, wenn:

- der Unterschied zwischen den Messwerten der optischen Dichte (OD) von ungeraden Vertiefungen und von geraden Vertiefungen des positiven Serums ist größer als 0.800.

$$\text{Positives Serum: OD}_{\text{ungerade Vertiefung}} - \text{OD}_{\text{gerade Vertiefung}} > 0.800$$

- der Unterschied zwischen den Messwerten der optischen Dichte (OD) von ungeraden Vertiefungen und von geraden Vertiefungen des negativen Serums weniger als 0.300 beträgt.

$$\text{Negatives Serum: OD}_{\text{ungerade Vertiefung}} - \text{OD}_{\text{gerade Vertiefung}} < 0.300$$

11 INTERPRETATION DER RESULTATE

1. Die « *Delta OD* » jeder Probe berechnen durch Subtraktion der optischen Dichte (OD) der geraden Vertiefungen von der OD der ungeraden Vertiefungen.

Beispiel: $\Delta DO_{\text{Probe}} = \text{Probe Vertiefung A1} - \text{Probe Vertiefung A2}$

2. Den Koeffizienten jeder Probe (S/P %) mit folgender Formel berechnen:

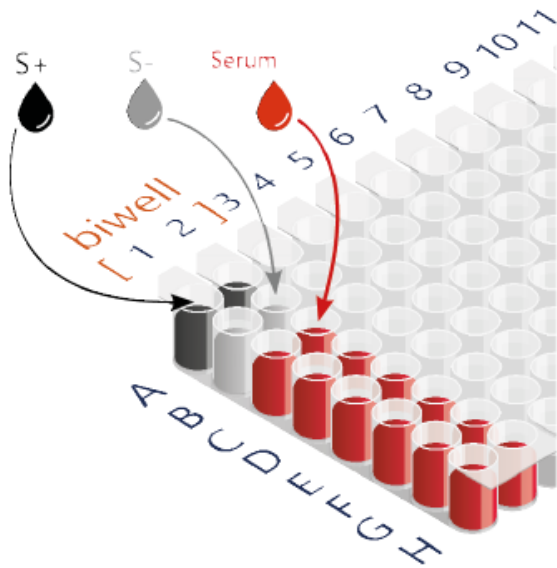
$$\text{S/P \%} = \frac{\Delta OD_{\text{Probe}}}{\Delta OD_{\text{positives Serum}}} \times 100$$

	Ergebnisse		Status
Einzelanalyse	S/P % < 10%	0	Kein Befall
	10% ≤ S/P % < 15%	±	Zweifelhaft
	15% ≤ S/P % < 45%	+	Niedriger Befall
	45% ≤ S/P % < 75%	++	Mittlerer Befall
	S/P % > 75%	+++	Starker Befall
Poolanalyse	S/P % < 5%	0	Kein Befall
	5% ≤ S/P % < 15%	±	Zweifelhaft
	15% ≤ S/P % < 45%	+	Niedriger Befall
	45% ≤ S/P % < 75%	++	Mittlerer Befall
	S/P % < 75%	+++	Starker Befall

12 ZUSAMMENFASSUNG *

Serumprotokoll

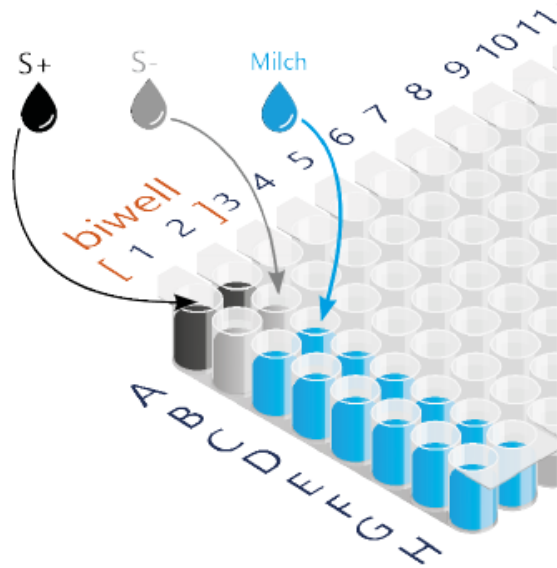
- 1 Verdünnung von Proben 1:100
Verdünnung von Kit-Kontrollen (positives und negatives Serum) 1:100



Kit Mikropatte

Milchprotokoll

- 1 Verdünnung von Proben 1:4
Verdünnung von Kit-Kontrollen (positives und negatives Serum) 1:100



Kit Mikropatte

Gemeinsames Protokoll

- 2 100 µL des verdünnten Konjugats hinzufügen



- 3 100 µL der Entwicklerlösung hinzufügen



- 4 50 µL der Stopplösung hinzufügen



- 5 Die optischen Dichte messen

450 nm



* Die Zusammenfassung ersetzt nicht die Gebrauchsanweisung, von der sie eine Kurzfassung ist.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
LOT	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
VET	For veterinary use only				
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité