



## Instructions for Use

# Ehrlichia Ab (canine) vet ELISA

VET

REF EIA-6106



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](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto: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, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

### Table of Contents

|    |  |   |
|----|--|---|
| 1  | INTENDED USE.....                          | 2 |
| 2  | PRINCIPLE OF THE ASSAY .....               | 2 |
| 3  | MATERIALS .....                            | 2 |
| 4  | STABILITY AND STORAGE .....                | 3 |
| 5  | REAGENT PREPARATION .....                  | 3 |
| 6  | SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....     | 3 |
| 7  | ASSAY PROCEDURE .....                      | 4 |
| 8  | RESULTS.....                               | 4 |
| 9  | SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS ..... | 5 |
| 10 | LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....          | 5 |
| 11 | PRECAUTIONS AND WARNINGS .....             | 6 |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1  | USO PREVISTO .....                         | 7  |
| 2  | PRINCIPIO DEL TEST .....                   | 7  |
| 3  | MATERIALI .....                            | 7  |
| 4  | MODALITÀ DI CONSERVAZIONE .....            | 8  |
| 5  | PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....             | 8  |
| 6  | PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ..... | 8  |
| 7  | PROCEDIMENTO .....                         | 9  |
| 8  | RISULTATI.....                             | 10 |
| 9  | CARATTERISTICHE DEL TEST.....              | 11 |
| 10 | LIMITAZIONI .....                          | 11 |
| 11 | PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....              | 11 |

|   |    |
|---|----|
| ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS ....  | 13 |
| PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE | 13 |
| SCHEME OF THE ASSAY .....   | 14 |
| SYMBOLS USED.....   | 15 |

## 1 INTENDED USE

The Ehrlichia Ab (canine) vet ELISA is intended for the qualitative determination of antibodies against Ehrlichia in veterinary serum. Due to the use of a multispecies conjugate, it should also be useable for other mammalian species.

## 2 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies 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 antibodies. 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 specific antibodies 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 Microtiterplate reader.

## 3 MATERIALS

### 3.1 Reagents supplied

- **Microtiter Plate:**  
12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Ehrlichia antigens; 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).
- **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 20 mL of peroxidase labelled Protein A/G; coloured yellow, ready to use; white cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **TMB Substrate Solution:**  
1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:**  
1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:**  
1 vial containing 3 mL; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:**  
1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; blue cap; 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

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 Microtiterplate 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 °C - 8 °C.

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

#### 5 REAGENT PREPARATION

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

##### 5.1 Microtiter Plate

The break-apart snap-off strips are coated with Ehrlichia antigens.

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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 **canine serum samples** with this assay.

If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2 °C - 8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 °C to -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 **1+100** with Sample Dilution Buffer.

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 °C ± 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 °C ± 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 °C - 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 °C - 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 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.

## 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**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

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

### 8.2 Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off Control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43  
Cut-off = 0.43

### 8.2.1 Results in Units [DU]

Sample (mean) absorbance value x 10 = [DRG Units = DU]  
Cut-off

Example:  $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ DU}$

### 8.3 Interpretation of Results

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:

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| Cut-off   | 10 DU     | -   |
| Positive  | > 11 DU   | Antibodies against the pathogen are present.<br>There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).                         |
| Equivocal   | 9 – 11 DU | Antibodies against the pathogen could not be detected clearly.<br>It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. |
| Negative  | < 9 DU    | The sample contains no antibodies against the pathogen.<br>A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.        |
| Diagnosis of an infectious 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. |           |   |

## 9 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

The performance data have been established with canine samples. Due to the nature of the Protein A/G conjugate this ELISA should react with other mammalian species also. More detailed information is available on request.

### 9.1 Precision

| Intra-assay | n  | Mean (E) | CV (%) |
|-------------|----|----------|--------|
| #1          | 24 | 1.554    | 1.95   |
| #2          | 24 | 0.107    | 3.84   |
| #3          | 24 | 0.481    | 4.17   |

| Intra-assay | n  | Mean (DU) | CV (%) |
|-------------|----|-----------|--------|
| #1          | 12 | 36.56     | 4.32   |
| #2          | 12 | 18.49     | 5.51   |
| #3          | 12 | 5.56      | 6.83   |

### 9.2 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. Diagnostic Specificity canine: 98.92 % (95 % confidence interval: 94.15 % - 99.97 %)

### 9.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. Diagnostic Sensitivity canine: 92.00 % (95 % confidence interval: 73.97 % - 99.02 %)

### 9.4 Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

### 9.5 Cross Reactivity

Cross reactions cannot be excluded.

## 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
- **Only for veterinary in-vitro diagnostic use.**
- 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 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

### 11.1.1 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 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.

### 11.1.2 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.

## 1 USO PREVISTO

Il Ehrlichia Ab (canine) vet ELISA è destinato alla rilevazione qualitativa di anticorpi specifici contro Ehrlichia nel siero veterinario. Grazie all'uso di un coniugato multispecie, il test dovrebbe essere utilizzabile anche per altre specie di mammiferi..

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di Microtitolazione sono rivestiti con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm è letto utilizzando un Fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

## 3 MATERIALI

### 3.1 Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:**  
12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigeni della Ehrlichia; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione:**  
1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:**  
1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di Lavaggio (20x conc.):**  
1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Coniugato:**  
1 flacone contenente 20 mL di proteina A/G, coniugata con perossidasi; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Soluzione Substrato TMB:**  
1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo Positivo:**  
1 flacone da 2 mL; controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:**  
1 flacone da 3 mL; controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:**  
1 flacone da 2 mL; controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

### 3.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

### 3.3 Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso



#### 4 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2 °C - 8 °C.

#### 5 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

##### 5.1 Micropiastre rivestita

Le strisce divisibili sono rivestiti con l'antigeni della Ehrlichia. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessarie, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2 °C - 8 °C.

##### 5.2 Tampone di lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di lavaggio 1+19; per esempio: 10 mL del Tampone di lavaggio + 190 mL di acqua distillata.

Il campione di tampone diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

##### 5.3 Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

#### 6 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero canino.

Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70 °C a -20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

##### 6.1 Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni **1 + 100** con Tampone di Diluizione del Campione.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di Tampone di Diluizione del Campione e mescolare bene (Vortex).

## 7 PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi de 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 µL a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eeguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere  $> 5$  sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.  
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente ( $20\text{ °C} - 25\text{ °C}$ ).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20\text{ °C} - 25\text{ °C}$ ) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

### 7.1 Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA a **zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

## 8 RISULTATI

### 8.1 Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti Istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza < **0,200 e < Cut-off**
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 - 1,300**
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### 8.2 Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42  
= 0,86/2 = 0,43

Cut-off = 0,43

#### 8.2.1 Risultati in unità [DU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità DRG} = \text{DU}]$

Esempio:  $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

### 8.3 Interpretazione dei risultati

Gli intervalli di valori standard per questo test ELISA dovrebbero essere creati individualmente da ciascun laboratorio sulla base del corrispondente gruppo di campioni nel rispettivo bacino di utenza.

Le seguenti informazioni sono una linea guida:

|  |           |  |
|--|-----------|--|
| Cut-off  | 10 DU     | -  |
| Positivo   | > 11 DU   | Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).   |
| Zona grigia  | 9 - 11 DU | Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente.<br>Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. |
| Negativo   | < 9 DU    | Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.                 |
| La diagnosi di una malattia infettiva non può essere fatta unicamente sulla base del risultato di una determinazione. Oltre ai risultati sierologici devono essere presi in considerazione i dati anamnestici e la sintomatologia. |           |  |

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

I dati sulle prestazioni sono stati stabiliti con campioni canini. A causa della natura del coniugato proteina A/G, questo test ELISA dovrebbe reagire anche con altre specie di mammiferi. Informazioni più dettagliate sono disponibili su richiesta.

### 9.1 Precisione

| Intra dosaggio | n  | Media (DO) | CV (%) |
|----------------|----|------------|--------|
| #1             | 24 | 1.554      | 1.95   |
| #2             | 24 | 0.107      | 3.84   |
| #3             | 24 | 0.481      | 4.17   |

| Inter dosaggio | n  | Media (DU) | CV (%) |
|----------------|----|------------|--------|
| #1             | 12 | 36.56      | 4.32   |
| #2             | 12 | 18.49      | 5.51   |
| #3             | 12 | 5.56       | 6.83   |

### 9.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici.

Specificità diagnostica canina: 98,92 % (95% intervallo di confidenza: 94,15 % - 99,97 %)

### 9.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici.

Sensibilità diagnostica canina: 92,0 % (95% intervallo di confidenza: 73,97 % - 99,02 %).

### 9.4 Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici et itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,5 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

### 9.5 Reattività crociata

Non si escludono reazioni incrociate.

## 10 LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

## 11 PRECAUZIONI E AVVERTENZE


- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso veterinario diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

– Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

### 11.1.1 Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose


I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1)

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

|   |                   |           |  |
|---|-------------------|-----------|--|
|  | <b>Attenzione</b> | H317      | Può provocare una reazione allergica cutanea.                                      |
|   |                   | P261      | Evitare di respirare gli aerosol.  |
|   |                   | P280      | Indossare guanti/ indumenti protettivi.  |
|   |                   | P302+P352 | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.         |
|   |                   | P333+P313 | In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.               |
|   |                   | P362+P364 | Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. |

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo 3.1)

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

|   |                   |                |  |
|---|-------------------|----------------|--|
|  | <b>Attenzione</b> | H315           | Provoca irritazione cutanea.   |
|   |                   | H319           | Provoca grave irritazione oculare  |
|   |                   | P280           | Indossare guanti/ indumenti protettivi.  |
|   |                   | P302+P352      | IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.   |
|   |                   | P305+P351+P338 | IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. |
|   |                   | P337+P313      | Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico.   |

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

### 11.1.2 Smaltimento

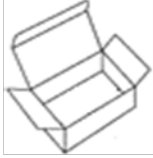
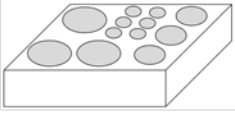





I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

**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           |

**PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE**

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
|  <p><b>PAP 21</b></p>   |  <p><b>PAP 21</b></p> |  <p><b>PAP 22</b></p>                                  |  <p><b>PAP 22</b></p> |
| <p><b>SOLN STOP</b>   <b>WASH BUF 20x</b>   <b>SUB TMB</b>   <b>DIL</b><br/> <b>CONJL</b>   <b>CONTROL +</b>   <b>CONTROL -</b>   <b>CUT OFF</b></p>  <p><b>HDPE 2</b></p> |  | <p><b>MTP</b></p>  <p><b>PET / ALU / LDPE 90</b></p> |  |
|  <p><b>PP 5</b></p>  |  |   |  |

## SCHEME OF THE ASSAY













## Test Preparation

|  |
|--|
| <p>Prepare reagents and samples as described.</p> <p>Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.</p> <p>Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.</p> |
|--|

## Assay Procedure

|  | Substrate Blank (A1) | Negative Control | Cut-off Control | Positive Control | Sample (diluted 1+100) |
|--|----------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------------|
| Negative Control   | -                    | 100 µL           | -               | -                | -                      |
| Cut-off Control  | -                    | -                | 100 µL          | -                | -                      |
| Positive Control   | -                    | -                | -               | 100 µL           | -                      |
| Sample (diluted 1+100)   | -                    | -                | -               | -                | 100 µL                 |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 1 h at 37 °C ± 1 °C</b><br>Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer               |                      |                  |                 |                  |                        |
| Conjugate  | -                    | 100 µL           | 100 µL          | 100 µL           | 100 µL                 |
| <b>Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C)</b><br>Do not expose to direct sunlight<br>Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer |                      |                  |                 |                  |                        |
| TMB Substrate Solution   | 100 µL               | 100 µL           | 100 µL          | 100 µL           | 100 µL                 |
| <b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark</b>   |                      |                  |                 |                  |                        |
| Stop Solution  | 100 µL               | 100 µL           | 100 µL          | 100 µL           | 100 µL                 |
| Photometric measurement at 450 nm<br>(reference wavelength: 620 nm)  |                      |                  |                 |                  |                        |

## SYMBOLS USED

| Symbol  | English                                     | Deutsch                         | Italiano                                | Español                                      | Français                                  |
|---|---|---------------------------------|---|--|---|
|  | European Conformity                         | CE-Konformitäts-kennzeichnung   | 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  |
|  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device * | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum * | Dispositivo medico-diagnostico in vitro | Producto sanitario para diagnóstico In vitro | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | Catalogue number *                          | Artikelnummer *                 | Numero di Catalogo                      | Número de catálogo                           | Référence de catalogue                    |
|  | Batch code *                                | Chargencode *                   | Codice del lotto                        | Código de lote                               | Numéro 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 *                | Utilizzare prima del                    | Establa hasta                                | Utiliser jusque                           |
|  | Manufacturer *                              | Hersteller *                    | Fabbricante                             | Fabricante                                   | Fabricant                                 |
|  | Caution *                                   | Achtung *                       |   |  |   |
|   |   |                                 |   |  |   |
|  | For research use only                       | Nur für Forschungszwecke        | Solo a scopo di ricerca                 | Sólo para uso en investigación               | Seulement dans le cadre de recherches     |
|  | Distributed by                              | Vertreiber                      | Distributore                            | Distribuidor                                 | Distributeur                              |
| <i>Content</i>  | Content                                     | Inhalt                          | Contenuto                               | Contenido                                    | Contenu                                   |
| <i>Volume/No.</i>   | Volume / No.                                | Volumen/Anzahl                  | Volume/Quantità                         | Volumen/Número                               | Volume/Quantité                           |
|   |   |                                 |   |  |   |
| <b>MTP</b>  | Microplate                                  | Mikrotiterplatte                | Micropiastra                            | Microplaca                                   | Microplaque                               |
| <b>CONJL</b>  | Conjugate                                   | Konjugat                        | Coniugato                               | Conjugado                                    | Conjugué                                  |
| <b>CONTROL -</b>  | Negative Control                            | Negativkontrolle                | Controllo negativo                      | Control positivo                             | Contrôle négatif                          |
| <b>CONTROL +</b>  | Positive Control                            | Positivkontrolle                | Controllo positivo                      | Control positivo                             | Contrôle positif                          |
| <b>CUT OFF</b>  | Cut off control                             | Cut off-Kontrolle               | Controllo cut-off                       | Control cut-off                              | Contrôle cut-off                          |
| <b>CAL</b>  | Standard or Calibrator                      | Standard oder Kalibrator        | Standard o Calibratore                  | Estándar o Calibrador                        | Standard o Etalon                         |
| <b>DIL</b>  | Sample Diluent                              | Probenverdünnungspuffer         | Tampone diluente                        | Diluyente de la muestra                      | Diluant pour échantillon                  |
| <b>SOLN STOP</b>  | Stop solution                               | Stopplösung                     | Soluzione bloccante                     | Solución de parada                           | Solution d'arrêt                          |
| <b>SUB TMB</b>  | TMB Substrate solution                      | TMB-Substratlösung              | Soluzione substrato TMB                 | Solución de sustrato de TMB                  | Solution de substrat TMB                  |
| <b>WASH BUF 20x</b>   | Washing Buffer 20x concentrated             | Waschpuffer 20x konzentriert    | Tampone di lavaggio concentrazione x20  | Tampón de lavado concentrado x20             | Tampon de lavage concentré 20 x           |