

MegaELISA® EHRlichIA canis ad us. vet.

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis
von IgG-Antikörpern gegen *Ehrlichia canis*
im Plasma oder Serum des Hundes

In vitro Diagnostikum

GEBRAUCHSINFORMATION

Enzyme immunoassay for the qualitative detection
of IgG antibodies against *Ehrlichia canis*
in plasma or serum of the dog

In vitro diagnosticum

INSTRUCTIONS FOR USE

Art. No. 991048EK1 (48's)
991096EK1 (96's)

Hersteller/Manufacturer:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📄 (+43) 5573 85400-4
✉ info@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® EHRlichia canis ad us. vet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
2. Verwendungszweck	3
3. Testprinzip	3
4. Testkitkomponenten	4
5. Haltbarkeit und Lagerung	5
6. Informationen zum Probenmaterial	5
7. Testvorbereitung	6
8. Testdurchführung	7
9. Testauswertung	9
10. Leistungsmerkmale	10
11. Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise	10
12. Haftung	11
13. Kurz-Protokoll MegaELISA® EHRlichia canis	12
Abkürzungen	24

Contents	Page
1. Introduction	13
2. Intended use	13
3. Test principle	13
4. Test-kit components	14
5. Stability and Storage	15
6. Information on the sample material	15
7. Test preparation	16
8. Test procedure	17
9. Test evaluation	18
10. Features of performance	19
11. Safety measures and precautions	19
12. Liability	20
13. Short protocol MegaELISA® EHRlichia canis	21
Abbreviations	24

1. EINLEITUNG

Die canine monozytäre Ehrlichiose (CME) wird durch Rickettsien der Gattung *Ehrlichia canis* verursacht, die v. a. durch die Braune Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) übertragen werden. Hauptgebiete der CME sind der gesamte Mittelmeerraum, aber auch die Schweiz und z. T. Deutschland. Die Ehrlichiose kommt v. a. beim Hund, selten beim Menschen vor.

2–3 Wochen post infectionem kommt es zu einem Anstieg von spezifischen Antikörpern. Ein 4-facher Titeranstieg im Abstand von 2 Wochen (Serokonversion) ist hinweisend auf eine akute Infektion. Akut treten Apathie, Anorexie, Fieber und Lymphknotenvergrößerung auf. In der subklinischen Ehrlichiose fehlen klinische, nicht aber die für Ehrlichiose typischen labordiagnostischen Befunde, wie z. B. Hyperglobulinämie und Thrombozytopenie. Chronisch an Ehrlichiose erkrankte Tiere zeigen leichte bis lebensbedrohliche Symptome: spontane Blutungen, neurologische Symptome, Anämie, starker Gewichtsverlust sowie Hepato- und Splenomegalie. Der Nachweis der CME mittels indirektem Antikörpernachweis zählt neben der klinischen Symptomatik, dem Vorbericht (Auslandsaufenthalt) und dem direkten Erregernachweis zu den wichtigsten Diagnostikbausteinen der CME.

MegaELISA® EHRlichIA canis basiert auf hoch-spezifischen *E. canis*-Antigenen für den schnellen und zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen *Ehrlichia canis* im Plasma oder Serum infizierter Hunde.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **MegaELISA® EHRlichIA canis** ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Ehrlichia canis* im Plasma oder Serum des Hundes.

3. TESTPRINZIP

Der **MegaELISA® EHRlichIA canis** ist ein qualitativer Immunoassay-Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Ehrlichia canis* im Sandwich-Prinzip.

An der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind spezifische *Ehrlichia canis*-Antigene gebunden. Eine Verdünnung des zu untersuchenden Hundeplasmas oder -serums bzw. die Kontrollen werden zur Inkubation bei Raumtemperatur (20–25°C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Anti-Hund IgG-Konjugat, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), dazugegeben und bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz (Schwefelsäure) erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Ehrlichien-spezifischen IgG-Antikörper.

4. TESTKITKOMPONENTEN

4.1. MITGELIEFERTE TESTKITKOMPONENTEN / REAGENZIEN

Die Reagenzien einer Packung reichen für 48 bzw. 96 Bestimmungen.

Inhalt	48er Kit	96er Kit
1. Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen im Halterahmen mit je 8 Bestimmungen, beschichtet mit <i>Ehrlichia canis</i> -Antigenen	6 teilbare Streifen	12 teilbare Streifen
2. Probenverdünnungspuffer (PVP, pH 7,2 ± 0,2, enthält 0,045 % Proclin® 300), gebrauchsfertig, blaue Kappe	25 ml	50 ml
3. Waschpuffer (10× TRIS-Puffer, pH 7,2 ± 0,2, enthält Tween® 20, 0,045 % Proclin® 300), weiße Kappe	25 ml	50 ml
4. Positivkontrolle (enthält 0,045 % Proclin® 300), gebrauchsfertig, rote Kappe	0,5 ml	1 ml
5. Negativkontrolle , (enthält 0,045 % Proclin® 300), gebrauchsfertig, blaue Kappe	0,5 ml	1 ml
6. Konjugat (Peroxidase-konjugierte Anti-Hund IgG-Antikörper, pH 7,2 ± 0,2, enthält 0,045 % Proclin® 300), gebrauchsfertig, weiße Kappe	6 ml	12 ml
7. Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB]/H ₂ O ₂), gebrauchsfertig, gelbe Kappe . Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!	6 ml	12 ml
8. Stopp-Reagenz (0,2 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig, rote Kappe	8 ml	15 ml
9. Folie zum Abdecken	1	1
10. Evaluationsblatt	1	1
11. Gebrauchsinformation	1	1

4.2. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN / ZUBEHÖR

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Einmal-Probenröhrchen
- Laborpipette (5–100 µl, 1 ml)
- Vortex-Mixer
- Filterpapier/Labortücher
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 nm)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

5. HALTBARKEIT UND LAGERUNG



Lagerung
2–8 °C



Verwendbar bis
– siehe Etikett



Für den tierärztlichen
Gebrauch



Chargen-Bezeichnung



For research only



Keine Reagenzien
verschiedener Testkits,
Chargennummern oder
mit abgelaufenem Ver-
fallsdatum verwenden.



Gebrauchsinformation
genau beachten

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Bei Öffnung des verschweißten Aluminiumbeutels der Mikrotiterplatte ist darauf zu achten, dass der wiederverschließbare Klippverschluss nicht beschädigt oder gar abgetrennt wird! Die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen, die restlichen sofort wieder in den Beutel geben, verschließen und bei 2–8 °C lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das leicht hellblaue Substrat ist unbedingt zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden (Funktionsunfähigkeit)!

6. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

- Nur Hunde-Plasma oder Serum verwenden!
- Das Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Ungekühlt (20–25 °C) sollte das Plasma oder Serum innerhalb von 4 Stunden getestet werden! Bei 2–8 °C kann das Plasma oder Serum bis max. 5 Tage gelagert werden. Plasma- oder Serumproben können aliquotiert und dauerhaft bei mindestens –20 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Nicht hitze-inaktivieren.
- Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben sollte.
- **ACHTUNG:** Unvollständig gefüllte und/oder unzureichend durchmischte EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen können Störeffekte verursachen, die zu unterschiedlichen Testergebnissen führen können.

7. TESTVORBEREITUNG



Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsinformation genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

7.1. ALLGEMEINES

- Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Aluminiumbeutel zu entnehmen. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten empfiehlt es sich, diese abzudecken oder abzukleben.
- Die Reagenzien sind unmittelbar vor ihrer Verwendung gut zu vermischen.
- Nach Gebrauch sind sowohl die nicht verwendeten Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Aluminiumbeutel) als auch die Reagenzien wieder bei 2–8°C zu lagern.
- Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Beschädigte Testkitkomponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Ein direkter Kontakt von Proben mit den Testkitkomponenten ist zu vermeiden (Kreuzkontamination).
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung vermeiden.

7.2. HERSTELLUNG DES WASCHPUFFERS 1:10

1 Teil des Waschpufferkonzentrates wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Sollten im Waschpufferkonzentrat Kristalle zu sehen sein, lösen Sie diese durch Erwärmen des Waschpufferkonzentrates im Wasserbad bei 37°C auf. Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20–25°C) 5 Tage haltbar.

7.3. PROBENVORBEREITUNG / PROBENVERDÜNNUNG 1:101

- Plasma und Serum muss zur Testung 1:101 mit PVP verdünnt werden, z.B. 5 µl Probe + 500 µl PVP.
- Homogenisieren Sie die Proben-Puffer-Mischung (PPM) gut (mehrmaliges Mischen mit der Pipette oder auf einem Vortex-Mixer).
- **ACHTUNG:** Bei Verwendung eines ELISA-Waschautomaten muss die PPM partikel-frei sein! Um dies zu gewährleisten, zentrifugieren Sie bitte die PPM bei 5000 Upm für 5 Minuten.
- Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Position der Patientenproben und der Standards/Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. **Es wird empfohlen, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung zu testen.**
- Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

8.1. PROBENAUFTRAG UND ERSTE INKUBATION

- Stecken Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Halterahmen.
- Geben Sie jeweils **50 µl**
 - **Positivkontrolle**
 - **Negativkontrolle**
 - **verdünnte Proben (PPM)**

in der gewünschten Reihenfolge in die jeweilige Vertiefung des Mikrotiterstreifens. **Lassen Sie eine Vertiefung übrig für die Substrat-Leerwertbestimmung.**

- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.2. WASCHEN – SORGFÄLTIG und STRIKT NACH ANLEITUNG!

WASCHEN PER HAND

- Entsorgen Sie das Inkubat durch Ausleeren in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit. Gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgen!
- Klopfen Sie die Mikrotiterplatte mehrmals auf einem saugfähigen Papier/Labortuch aus.
- Waschen Sie 4× mit jeweils 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung. Platte mit Waschlösung leicht schwenken, dann ausklopfen.
- **Zwischen jedem Waschgang komplett entleeren und dann sorgfältig mehrmals auf einer trockenen, unbenutzten Stelle ausklopfen!**
- Vor dem letzten Ausklopfen darauf achten, dass das Reagenz für den nächsten Pipettierschritt bereit steht.

WASCHEN PER WASCHAUTOMAT

- **ACHTUNG:** PPM mit Partikeln sollten vor dem ersten Waschschrift manuell durch Ausklopfen aus den Vertiefungen entfernt werden (Verstopfungsfahrer der Waschnadeln).
- Korrekte Einstellung des Automaten beachten!
- Zur Erzielung optimaler Waschergebnisse mindestens 300 µl Waschpuffer pro Kavität und Waschschrift.
- Komplettes Absaugen der Flüssigkeit nach jedem Waschschrift.
- Nach letztem Waschschrift Platte gründlich auf saugfähigem Papier/Labortuch ausschlagen! Es sollte keine Restfeuchtigkeit in den Kavitäten zurückbleiben!

8.3. ZWEITE INKUBATION

- Geben Sie je **100 µl Konjugat** in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte außer der Substrat-Leerwertbestimmung.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **45 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.4. WASCHEN

Waschen wie in Punkt 8.2.

8.5. DRITTE INKUBATION

- Geben Sie **100 µl Substrat (TMB)** in jede Vertiefung.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für genau **10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** und **im Dunkeln**.
- Geben Sie **100 µl Stopp-Reagenz** in alle Vertiefungen, in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie für die TMB-Substratlösung.

8.6. MESSUNG

- Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Antippen an den Plattenrand) wird die Extinktion innerhalb 30 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenz bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung in der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.
- Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen die Substrat-Leerwertbestimmung erfolgen. Sollte dies aus technischen Gründen nicht möglich sein, ziehen Sie bei der Auswertung die Extinktion dieser Vertiefung von allen anderen Extinktionswerten ab, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.
- **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.
- **ACHTUNG:** Stark positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate der Substratlösung verursachen. Vorverdünnung der Probe mit physiologischer NaCl-Lösung, z.B. 1+1, wird empfohlen. Dann die Probe 1+100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnen und die Ergebnisse in MU mit 2 multiplizieren.

9. TESTAUSWERTUNG

9.1. REAGENZSTABILITÄT – INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testung sollten Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Stabilität der Reagenzien sowie die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Der Test war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht wurden:

- **Substrat-Leerwertbestimmung** Extinktion < 0,1
- **Negativkontrolle** Extinktion < 0,1
- **Positivkontrolle** 0,6 < Extinktion < 2,0

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Vertiefungen ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegeben Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (Kalibrierung)
- Visuelle Kontrolle der Testkitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

9.2. BERECHNUNG DER TESTERGEBNISSE

Der Cut-off-Wert ist 0,180.

9.3. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Positives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem Cut-off liegt.

Grenzwertiges Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Cut-offs liegt. Ist eine Wiederholungsuntersuchung nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Probe ebenfalls grenzwertig, ist diese als negativ zu bewerten!

Negatives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswerte mehr als 10 % unter dem Cut-off liegt.

Ergebnisse in MEGACOR Units

$$\frac{\text{Patient (Mittelwert) Extinktionswert} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{MEGACOR Units} = \text{MU}]$$

$$\text{Beispiel: } \frac{0,956 \times 10}{0,18} = 53,1 \text{ MU}$$

Cut-off:	10 MU	Negativ:	< 9 MU
Grenzwertig:	9–11 MU	Positiv:	> 11 MU

10. LEISTUNGSMERKMALE

10.1. EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Bakterielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe können die Extinktionswerte beeinflussen.
- Die Diagnose einer Infektionserkrankung sollte nicht aufgrund eines einzelnen Tests gestellt werden. Eine konkrete Diagnose sollte sowohl Klinik, Symptomatik als auch serologische Daten berücksichtigen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Tragen von Schutzkleidung (Einmal-Handschuhe) und Händewaschen nach Ende der Testdurchführung.
 - Essen und Trinken während der Testdurchführung verboten.
 - Das Probenmaterial und die Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.
 - Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
 - Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen zusammen verwenden.
 - Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
 - Flaschen nach Gebrauch sofort fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
 - Nach dem ersten Öffnen Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
 - Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, Kontrollen und Konjugat enthalten 0,045 % Proclin® 300 als Konservierungsmittel.
 - Stopp-Reagenz enthält 0.2 M Schwefelsäure. Schwefelsäure irritiert Augen und Haut. Bei Kontakt mit Augen intensiv mit Wasser spülen und den Arzt aufsuchen! Außer Reichweite von Kindern halten.
 - Substratlösung enthält Wasserstoffperoxid.
- Eine Berührung mit Augen, Haut oder Schleimhaut ist unbedingt zu vermeiden!**
- **ACHTUNG:** Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, muss zuerst neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird!
 - Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
 - Niemals mit dem Mund pipettieren!
 - Beschriften Sie Probenmaterial und zugehöriges Probenröhrchen, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
 - Für jede Probe ein neues Probenröhrchen verwenden.
 - Während der Inkubations- und Waschschriffe müssen die Vertiefungen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

- Die Wells der Mikrotiterplatte sollten nicht länger leer bleiben als unbedingt notwendig.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Testergebnissen Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Vertiefungen pipettieren.
- Der **MegaELISA® EHRlichia** canis ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, das die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

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 nicht für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse, die mit diesen Gründen in Zusammenhang stehen. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

12. HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

13. KURZ-PROTOKOLL MegaELISA® EHRlichia canis

TESTVORBEREITUNG

Benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien auf **Raumtemperatur (20–25°C)** bringen.

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser **verdünnen**.

Proben 1:101 mit Verdünnungspuffer **verdünnen** (z. B. 5 µl Probe + 500 µl PVP)

TESTDURCHFÜHRUNG

Je **50 µl Positiv- und Negativkontrolle**
bzw. **1:101 verdünnte Plasma- oder Serumproben**
in je eine Vertiefung pipettieren.

Zugedeckt **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

4× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Konjugat**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **45 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

4× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Substrat (TMB)**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **genau 10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln inkubieren.

Je **100 µl Stopp-Reagenz**
in jede Vertiefung pipettieren.

Photometrische Auswertung der Vertiefungen bei 450 nm.

1. INTRODUCTION

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is caused by the rickettsia *Ehrlichia canis*, which are mainly transmitted by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *Ehrlichia canis* is found in many parts of the world, especially in the Mediterranean area, but also in Switzerland and partly Germany. Ehrlichiosis is common in the dog, but seldom in humans.

The concentration of specific antibodies increases sharply 14 to 21 days post infection. A four-fold titre increase of antibodies in an interval of two weeks (seroconversion) is indicative for an acute infection. In the acute stage, the dog shows apathy, anorexia, fever and lymphadenitis. In the subclinical phase, clinical symptoms are missing, but not the typical ehrlichiosis laboratory results like hyperglobulinaemia and thrombocytopenia. Chronic phase animals show slight up to life-threatening symptoms: spontaneous bleedings, neurological disorders, anaemia, severe loss of weight as well as spleno- and hepatomegaly. Indirect antibody detection is known to be an important diagnostic tool diagnosing CME beside clinical symptoms, case history (travel abroad) and direct antigen detection.

MegaELISA® EHRlichIA canis is based on highly specific antigens for the fast and reliable detection of antibodies against *Ehrlichia canis* in plasma or serum of infected dogs.

2. INTENDED USE

MegaELISA® EHRlichIA canis is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgG antibodies against *Ehrlichia canis* in plasma or serum of the dog.

3. TEST PRINCIPLE

The **MegaELISA® EHRlichIA canis** is a qualitative immunoassay to detect IgG antibodies against *Ehrlichia canis* using a sandwich principle.

Specific *Ehrlichia canis* antigens are bound to the surface of the well in the ELISA plate. A dilution of the dog plasma or serum to be tested as well as controls are incubated in a first step at room temperature (20–25°C) in the wells of the ELISA plate. After a wash step, anti-dog IgG conjugate labelled with horse radish peroxidase (HRP) is added and incubated at room temperature (20–25°C). Non-bound conjugate is removed in another wash step. After addition of Substrate (Tetramethylbenzidine [TMB]), with positive samples, the bound enzyme changes the colourless solution in the wells of the ELISA plate into a blue solution. By addition of Stop solution (Sulfuric acid), the colour changes from blue to yellow. The extinction is proportional to the concentration of *Ehrlichia*-specific IgG antibodies present in the sample.

4. TEST-KIT COMPONENTS

4.1. COMPONENTS / REAGENTS PROVIDED WITH THE TEST-KIT

The reagents of one package are sufficient for 48 or 96 determinations.

Content	48's kit	96's kit
1. ELISA plate with separable test strips in holding frame with 8 determinations each, coated with <i>Ehrlichia canis</i> antigens	6 separable strips	12 separable strips
2. Sample dilution buffer (SDB, pH 7.2 ± 0.2, contains 0.045 % Proclin® 300), ready to use, blue cap	25 ml	50 ml
3. Wash buffer (10× TRIS buffer, pH 7.2 ± 0.2, contains Tween® 20, 0.045 % Proclin® 300), white cap	25 ml	50 ml
4. Positive Control (contains 0.045 % Proclin® 300), ready to use, red cap	0.5 ml	1 ml
5. Negative Control (contains 0.045 % Proclin® 300), ready to use, blue cap	0.5 ml	1 ml
6. Conjugate (peroxidase-conjugated anti-dog IgG antibodies, pH 7.2 ± 0.2, contains 0.045 % Proclin® 300), ready to use, white cap	6 ml	12 ml
7. Substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB]/ H ₂ O ₂), ready to use, yellow cap. Do not expose to sun light!	6 ml	12 ml
8. Stop solution (0.2 M Sulfuric acid), ready to use, red cap	8 ml	15 ml
9. Cover foil	1	1
10. Evaluation sheet	1	1
11. Instructions for use	1	1

4.2. REQUIRED, NON-PROVIDED REAGENTS / DEVICES

- Distilled or deionised water
- Disposable sample tubes
- Laboratory pipettes (5–100 µl, 1 ml)
- Vortex mixer
- Filter paper/laboratory cloths
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop watch
- Washing station for ELISA plates or multichannel pipette (300 µl)
- Photometer for ELISA plates (450 nm, reference filter 620 nm)
- Waste bin with a 0.5 % hypochlorite solution

5. STABILITY AND STORAGE



Store at
2–8°C



Expiry date
– see label



For veterinary use
only



Lot number



For research only



Do not use test-kit
components from
different kits, lot
numbers or beyond
stated expiry date.



Follow instructions for
use precisely

Microbial contamination must be avoided. After the expiration date, the guarantee of quality is not provided.

When opening the sealed aluminium pouch with the ELISA plate, care must be taken that the reclosable clip closure is not damaged or even separated! Remove the required amount of ELISA strips, leave the remaining strips in the bag, close the bag and store it at 2–8°C.

A direct influence of light onto the colourless Substrate must be absolutely avoided to prevent degradation/autooxidation/colour change to blue. If the Substrate colour has changed to blue, it cannot be used any more (functional incapacity).

6. INFORMATION ON THE SAMPLE MATERIAL

- Use only dog plasma or serum samples!
- Mix the sample material well before use!
- Non-cooled (20–25°C), plasma or serum should be tested within 4 hours! At 2–8°C, the plasma or serum can be stored up to 5 days. Plasma or serum samples can be aliquoted and permanently stored at minimum –20°C. Avoid repeated freezing and thawing.
- Do not heat inactivate!
- Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.
- **ATTENTION:** Partially filled and/or insufficient mixed EDTA, Citrate or Heparin tubes could create interference effects resulting in varying test results.

7. TEST PREPARATION

! Read instructions for use carefully before starting the test. For the reliability of the results, it is important to follow the instructions for use exactly as described. Carry out the test in the given order and without delay. Use clean disposable tips for each pipetting step.

7.1. GENERAL

- Remove the test strips from the pouches after they have reached room temperature. To avoid loss by evaporation, it is advisable to cover or mask them.
- Mix the reagents well immediately before their use.
- After use, both non-used test strips (in closed aluminium pouch) and reagents should be stored at 2–8°C again.
- Test strips that were once used cannot be used again.
- Damaged test-kit components must not be used.
- Direct contact of samples with the test-kit components has to be avoided (cross-contamination).
- Direct solar radiation during testing must be avoided.

7.2. PREPARATION OF WASH BUFFER 1:10

Mix 1 part of the Wash buffer concentrate with 9 parts of distilled water. When crystals are visible in the Wash buffer concentrate, dissolve these by warming the Wash buffer concentrate up to 37°C in a water bath. The diluted buffer will be stable for 5 days if stored at room temperature (20–25°C).

7.3. SAMPLE PREPARATION / SAMPLE DILUTION 1:101

- Plasma and serum has to be diluted for testing 1:101 with SDB, e. g. 5 µl sample + 500 µl SDB.
- Homogenise the sample-buffer mixture (SBM) well (repeated mixture with pipette or vortex mixer).
- **ATTENTION:** During the use of an ELISA washing station, the SBM must be free of particles! To guarantee this, please centrifuge the SBM with 5000 rpm for 5 minutes.
- Controls are ready for use and need not to be diluted.

8. TEST PROCEDURE

- Mix sample material well before application!
- Before beginning, the position of the patient samples and the standards/controls in the microtitre plate must be determined on the result sheet supplied with the kit. **It is recommended to test Controls and samples in duplicates.**
- Use clean disposable pipette tips for every pipetting step.

8.1. SAMPLING AND FIRST INCUBATION

- Place the required amount of test strips into the holding frame.
- Add **50 µl** each of
 - **Positive Control**
 - **Negative Control**
 - **diluted samples (SBM)**in the desired order into the particular cavity of the test strip. **Leave one well empty for the Substrate Blank.**
- Cover the ELISA plate and incubate for **60 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.2. WASHING – CAREFULLY and STRICTLY FOLLOWING THE INSTRUCTIONS!

MANUAL WASHING

- Remove the incubation solution by emptying into a waste bin with hypochlorite. Disposal must be made according to official regulations!
- Beat the ELISA plate carefully several times onto filter paper/laboratory cloth.
- Wash 4× with 300 µl Wash buffer per cavity. Shake plate with Wash buffer lightly, then beat it.
- **Drain completely between each wash step, then beat carefully several times on a dry unused spot!**
- Before the last beating take care that the reagent for the next pipetting step is prepared.

AUTOMATIC WASHING

- **ATTENTION:** SBM still containing any particles should be manually removed from the cavities by shaking off (danger of blockage of the washing needles).
- Observe correct setting of the washing station!
- To reach optimal washing results use at least 300 µl Wash buffer per cavity and wash step.
- Aspire liquid completely after each wash step.
- After the final wash step, beat the plate carefully but thoroughly on filter paper/laboratory cloth! There should not be any residual moisture in the cavities!

8.3. SECOND INCUBATION

- Add **100 µl Conjugate** into each cavity of the test strip except for the Substrate Blank well.
- Cover the ELISA plate and incubate for **45 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.4. WASHING

Wash as described in issue 8.2.

8.5. THIRD INCUBATION

- Add **100 µl Substrate (TMB)** into each cavity.
- Cover the ELISA plate and incubate for exactly **10 minutes at room temperature (20–25 °C) and in the dark.**
- Add **100 µl Stop solution** into each cavity, in the same order and at the same rate as for the TMB substrate solution.

8.6. MEASUREMENT

- After careful mixing (tipping softly at the plate rim), the extinction can be measured at 450 nm within 30 minutes after addition of the Stop solution. An additional measurement at the reference wavelength 620 nm is recommended.
- Adjust the ELISA Plate Reader to zero using the Substrate Blank. If – due to technical reasons – the ELISA Plate Reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank well, subtract the extinction value of this well from all other extinction values measured in order to obtain reliable results!
- If duplicates or multiple determinations were done, calculate the **mean absorbance values.**
- **ATTENTION:** Strongly positive samples can cause blackish precipitates of the Substrate solution. Pre-dilution of the sample with physiological NaCl solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with Sample dilution buffer and multiply the results in MU by 2.

9. TEST EVALUATION

9.1. REAGENT STABILITY – INTERNAL QUALITY CONTROL

During each testing, Positive and Negative Controls should be performed to ensure the stability of reagents as well as the correct test procedure.

The test was correct, when following reference values were reached:

- **Substrate Blank** Extinction < 0.1
- **Negative Control** Extinction < 0.1
- **Positive Control** 0.6 < Extinction < 2.0

A variation of the required values as well as any clouding or blue staining of the colourless Substrate before addition into the cavities can be a hint on expiry of reagents. If the prescribed values are not fulfilled, following should be ensured before test repetition:

- Stability of the used reagents
- Functionality of the used machines (calibration)
- Visual control of the test-kit components for contamination or leakage; a blueish stained Substrate solution should not be used.

9.2. CALCULATION OF TEST RESULTS

The Cut-off value is 0.180.

9.3. EVALUATION OF TEST RESULTS

Positive test result

Sample with an extinction more than 10 % above the Cut-off.

Marginal test result

Sample with an extinction in the field of 10 % above and below the Cut-off. A repetitive test after 2–4 weeks with a new sample being marginal, too, should be evaluated as negative!

Negative test result

Sample with an extinction more than 10 % below the Cut-off.

Results in MEGACOR Units (MU)

$$\frac{\text{Patient (mean) extinction value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{MEGACOR Units} = \text{MU}]$$

$$\text{Example: } \frac{0.956 \times 10}{0.18} = 53.1 \text{ MU}$$

<i>Cut-off:</i>	<i>10 MU</i>	<i>Negative:</i>	<i>< 9 MU</i>
<i>Grey zone:</i>	<i>9–11 MU</i>	<i>Positive:</i>	<i>> 11 MU</i>

10. FEATURES OF PERFORMANCE

10.1. LIMITATIONS OF THE TEST PROCEDURE

- Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the extinction values.
- 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.

11. SAFETY MEASURES AND PRECAUTIONS

- Wear safety clothes (disposable gloves) and wash the hands after finishing the test procedure.
- No eating and drinking during test procedure.
- The sample material and Controls must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly, together with the used test-kit components, after the test procedure.
- Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this test-kit.
- Do not mix reagents of different Lot numbers.

- Do not change the caps of the individual reagents among each other.
- Close bottles immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening, the reagent bottles must be checked for microbial contamination before reusing.
- – Sample dilution buffer, Wash buffer, Controls and Substrate contain 0.045 % Proclin® 300 as preservative.
- – Stop solution contains 0.2 M Sulfuric acid. Sulfuric acid irritates eyes and skin. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor! Keep out of the reach of children.
- – Substrate solution contains hydrogen peroxide.
Absolutely avoid eye, skin or mucosa contact!
- **ATTENTION:** Liquid waste containing Stop solution must be neutralised prior to addition to a hypochlorite solution!
- Only use clean pipette tips, dispenser and laboratory material.
- Never pipet with your mouth!
- Label sample material and associated sample tube to ensure a precise assignment.
- Use a new sample tube for each sample.
- During the incubation and wash steps, the cavities must be completely covered with liquid.
- The cavities of the ELISA plate must not stay empty longer as necessarily required.
- To avoid cross contamination and falsely elevated test results, pipet the patient samples and conjugate carefully into the cavities of the ELISA plate.
- **MegaELISA® EHRlichia** canis is only provided for the use of qualified staff that knows the work technique objectionable.

The test procedure, the information, the safety measures and warnings in the Instructions for use are to be followed strictly. For use of the test-kit in diagnostical instruments, the test method has to be validated. Each change in appearance, composition and the application as well as each use in combination with other products not authorised by the manufacturer is not permitted. The manufacturer is not liable for false results and incidents being associated herewith. The user himself is responsible for such changes. No liability is accepted for false test results due to visual evaluation.

12. LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

13. SHORT PROTOCOL MegaELISA® EHRlichia canis

TEST PREPARATION

Warm needed test strips and reagents to **room temperature (20–25°C)**.

Dilute Wash buffer 1:10 with distilled water.

Dilute samples 1:101 with Sample dilution buffer (e.g. 5 µl sample + 500 µl SDB)

TEST PROCEDURE

Add **50 µl of Positive and Negative Controls**
or **1:101 diluted plasma or serum samples**
each in a cavity.

Cover and incubate **60 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 4× with soft shaking with **300 µl Wash buffer each**.

Add **100 µl of Conjugate**
into each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **45 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 4× with soft shaking with **300 µl 1× Wash buffer each**.

Add **100 µl of Substrate (TMB)**
in each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **exactly 10 minutes at room temperature (20–25°C)**
in the dark.

Add **100 µl of Stop solution**
in each cavity.

Photometric evaluation of the cavities at 450 nm.

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES**Abkürzungen / Abbreviations**

- CME Canine monozytäre Ehrlichiose/Canine monocytic ehrlichiosis
- H₂O₂ Wasserstoffperoxid/Hydrogen peroxide
- MU MEGACOR Units
- PPM Proben-Puffer-Mischung (DE)
- PVP Probenverdünnungspuffer (DE)
- SBM Sample buffer mixture (EN)
- SDB Sample dilution buffer (EN)