

# Testkit

## Haptoglobin - Pferd

### Entzündungsmarker --- Akute-Phase-Protein

### Testkit zur allgemeinen Gesundheitskontrolle

#### Kurzbeschreibung der Test-Durchführung

1. Testbestandteile und Lösungen auf Raumtemperatur bringen
2. Testpufferkonzentrat verdünnen
3. Standards, Kontrollen, Antiserum, Tracer und Enzymkonjugat mit Testpuffer lösen
4. Proben mit Testpuffer verdünnen (z.B. 1:10.000)
5. Eine ausreichende Zahl an beschichteten Streifen in den Rahmen platzieren und beschriften
  
6. 50 µl Standards, Kontrollen oder (vorverdünnte!) Proben pipettieren
7. 50 µl Tracerlösung hinzufügen
8. 50 µl Antiserumlösung hinzufügen
9. 2 Stunden ± 10 Minuten auf dem Plattenschüttler bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren
  
10. Waschpuffer-Konzentrat verdünnen
11. Platte 2mal mit Waschpuffer waschen
12. 100 µl Enzymkonjugat pipettieren
13. 30 ± 5 Minuten auf dem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubieren
  
14. 4mal mit Waschpuffer waschen
15. 100 µl Substrat pipettieren
16. 45 ± 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
  
17. 100 µl Stoplösung hinzufügen und die Extinktion bei 450 nm bestimmen (595-650 nm als Referenz-Wellenlänge)
18. Testauswertung und Berechnung der Probenwerte (Werte müssen mit der Vorverdünnung multipliziert werden)

#### Verwendungszweck des Haptoglobintests

Der Messparameter Haptoglobin hat sich als besonders guter Indikator für subklinische Erkrankungen erwiesen.

Bei **Pferden** ist Haptoglobin ein guter Parameter zur Diagnose entzündlicher Erkrankungen [1][2]. Neben experimentellen und natürlichen Infektionen, lassen sich postoperative Infektionen z.B. nach Kastration nachweisen [3]. Insbesondere der Behandlungserfolg lässt sich anhand wiederholter Haptoglobinmessungen sehr gut dokumentieren [1]. Als nicht-spezifischer Gesundheitsmarker ist Haptoglobin somit ein objektiver Parameter für den Gesundheitsstatus eines einzelnen Tieres oder einer ganzen Herde.

## Erläuterungen zum Haptoglobin

Haptoglobin ist ein bei Entzündungen und bakteriellen Infektionen stark erhöhter Blutparameter. Die Funktion dieses sog. Akute-Phase-Proteins besteht hierbei in der Bindung von Hämoglobin aus zerstörten Erythrozyten. Es schützt somit den Körper vor einem krankheitsbedingten Eisenverlust.

Unter normalen Bedingungen tritt Haptoglobin speziesabhängig in geringen Mengen im Blut auf. Die Konzentration steigt als Reaktion auf eine akute Infektion, Entzündung oder Verletzung stark an. Die Messung des Verlaufs von Haptoglobin im Serum gibt somit dem Kliniker auch wertvolle Informationen über Krankheitsverlauf und Behandlungserfolg.

Durch die relativ lange Halbwertszeit des Haptoglobins von ca. vier Tagen können Veränderungen auch noch einige Tage später erkannt werden. Kurzzeitige Stimuli, wie z.B. Blutentnahme oder Transport, haben keinen Einfluss auf die Haptoglobinkonzentration.

Da Haptoglobin ein unspezifischer Infektionsmarker ist, können durch seine Messung insbesondere entzündliche Prozesse und bakterielle Infektionen festgestellt werden. Dabei hat der Test einen ganz großen Vorteil gegenüber hämatologischen Untersuchungen:

- Die Untersuchung ist sensitiver, spezifischer und effizienter.
- Die Gefahr von falsch positiven und negativen Ergebnissen ist geringer.
- Subklinische Erkrankungen lassen sich sicher identifizieren.
- Haptoglobin ist der ideale Parameter zur Verfolgung und Dokumentation eines Behandlungserfolgs.

## Der Labortest

Der ELISA ist ein spezifischer Test zur Bestimmung von Haptoglobin in fast allen Körperflüssigkeiten. Da es sich bei Haptoglobin um ein Blutprotein handelt, ist die Messung des Proteins normalerweise in Blutplasma- oder Blutserumproben am sinnvollsten [4].

Der Test ist sehr robust. Es werden an die Proben nur geringe Ansprüche gestellt: eine Hämolyse der Proben verändert die Messergebnisse nicht.

Haptoglobin ist relativ stabil. Ein sofortiger Versand der Proben mit der Post ist möglich. Das Aufbewahren der Proben über Tage bei hohen Temperaturen sollte aber vermieden werden.

### Normalbereiche beim Pferd (Serum oder Plasma)

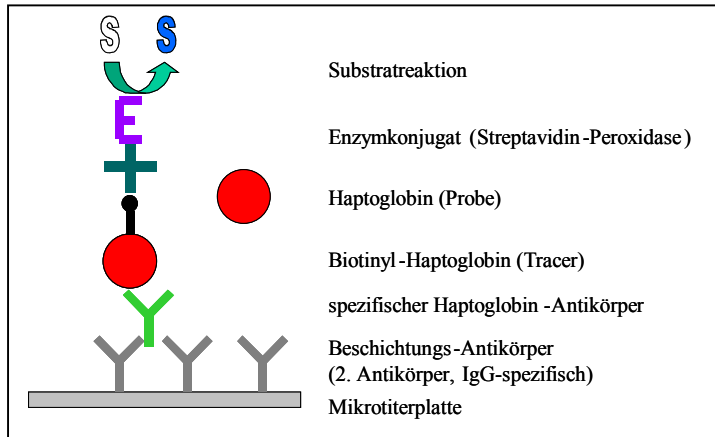
Normaler Bereich: bis 1,5 mg/ml

Akuter Bereich: ab 2,5 mg/ml

Vollblutwerte liegen ca. 40% niedriger als Serumwerte

Eine Impfung der Tiere sollte mindestens 7 Tage zurückliegen.

## Testprinzip



Bei diesem Test handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, bei dem equines Haptoglobin aus der Probe mit Biotin-markiertem Haptoglobin (Tracer) um eine begrenzte Zahl an Antigen-Bindungsstellen konkurriert. An das markierte Haptoglobin bindet das Enzymkonjugat, welches durch eine Farbreaktion fotometrisch bestimmt werden kann.

## Testbestandteile

1. **Mikrotiterplatte** (12x8-Well Streifenplatte)
2. **Haptoglobin Standards**
  - A 3000 ng/ml
  - B 1000 ng/ml
  - C 333 ng/ml
  - D 111 ng/ml
  - E 37 ng/ml
  - F 12,4 ng/ml
  - G 4,1 ng/ml
  - H 0 ng/ml
3. **Niedrig-Kontrolle**  
**Hoch-Kontrolle**
4. **50x Waschpuffer-Konzentrat**  
 Enthält 0,01% Thimerosal als Präservativ
5. **5x Testpuffer-Konzentrat**  
 Gelatine in einer gepufferten Kochsalzlösung mit Farbstoff und 0,01% Thimerosal als Präservativ
6. **Tracer** (Biotinyl-Haptoglobin)  
 Enthält 0,01% Thimerosal als Präservativ
7. **Antiserum**  
 Enthält 0,01% Thimerosal als Präservativ
8. **Enzymkonjugat** (Streptavidin-Peroxidase)  
 Enthält 0,01% Thimerosal als Präservativ
9. **Substratlösung**  
 One-step TMB-Substrat
10. **Stopplösung**  
 1 M HCl

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zu Forschungszwecken. Nicht für die Diagnose.
- Proben müssen als potentiell infektiöses Material betrachtet werden. Ein Befolgen der allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen bei Verwendung dieses Tests und der Proben ist essentiell.
- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
- Lagerung der Testreagenzien wie angegeben.
- Bestimmung der Proben im Doppelansatz.
- Die Benutzung von Mehrkanalpipetten oder Multipipetten wird dringend empfohlen um Zeitverzögerungen bei der Reagenzzugabe zu minimieren.
- Genaues Pipettieren und die Verwendung von kalibrierten Geräten ist essentiell.
- Alle anerkannten Waschmethoden sind erlaubt; der Gebrauch eines automatischen Platten-Waschgerätes ist manuellen Methoden vorzuziehen.
- In jedem Assay muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Ausreichendes Mischen der Standards, Kontrollen, Proben und der Gebrauch eines Mikrotiterplatten-Schüttlers sind notwendig für eine akzeptable Testqualität.

## Vorbereitung der Reagenzien/Lagerung

Die Reagenzien und Mikrotiterplatten müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Mögliche Präzipitate in den Pufferkonzentraten müssen vor Verdünnung vollständig gelöst werden.

**Lagerung der ungebrauchten Kit-Bestandteile bei 2 bis 8°C bis zum Verfallsdatum.**

### Beschichtete Teststreifen

Entnehmen des Plattenrahmens und der notwendige Anzahl von Teststreifen aus dem Beutel. Danach ist sicherzustellen, dass der Beutel mit nichtgebrauchten Streifen vollständig verschlossen (verklebt) wird und das Trockenmittel enthält.

**Lagerung:** bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum.

### Waschpuffer

Vorbereitung der benötigten Menge von Waschpuffer durch Verdünnung von 50x Waschpuffer-Konzentrat 1:50 mit entionisiertem Wasser.

Beispiel: 10 ml 50x Waschpuffer-Konzentrate werden mit 490 ml entionisiertem Wasser versetzt.

**Lagerung** des Waschpuffers bei 2-8°C nach der Herstellung ist für 2 Wochen möglich.

### Testpuffer

Vorbereitung der benötigten Menge von Testpuffer durch Verdünnung von 5x Testpuffer-Konzentrat 1:5 mit entionisiertem Wasser.

Beispiel: 10 ml 5x Testpuffer-Konzentrat werden mit 40 ml entionisiertem Wasser versetzt.

**Lagerung** des Testpuffers bei 2-8°C nach der Herstellung ist für 2 Monate möglich.

### Standards, Kontrollen, Antiserum, Tracer, Enzymlösung

Die auf den Gefäßen angegebene Menge an Testpuffer hinzufügen. 10 Minuten stehen lassen, dann kurz schütteln (Vortex).

**Lagerung:**

1 Monat bei 2 bis 8°C.

6 Monate bei -20°C. Diese Bestandteile dürfen nicht häufiger als 3mal eingefroren/aufgetaut werden.

## Testdurchführung

**Die gesamte Anleitung muss vor der Testdurchführung gelesen werden.**

Peroxidase und das TMB-Substrat sind lichtempfindlich. **Direktes Sonnenlicht ist zu vermeiden.**

Mikrotiterplatte/Teststreifenrahmen sollten während der Inkubationen in Aluminiumfolie eingeschlagen werden.

### Probeninkubation

1. Beschichtete Streifen/Mikrotiterplatte vor Öffnen des Beutels auf Raumtemperatur bringen. Den Rahmen und die benötigte Anzahl an Streifen entnehmen. Beutel mit ungebrauchten Streifen müssen das Trocknungsmittel enthalten und sorgfältig verschlossen werden.
2. Die benötigte Anzahl an Streifen im Rahmen platzieren und die Streifen beschriften um ein Verwechseln bei versehentlichen Herauslösen der Streifen zu vermeiden. Bedecken der Platte/Streifen während allen Inkubationsschritten.
3. Vorverdünnung der Proben nach Bedarf mit Testpuffer (z.B. 1:10.000 in zwei 1:100er Schritten).
4. 50 µl Standards, Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
5. 50 µl Tracerlösung in jede Vertiefung mittels Mehrkanalpipette hinzufügen.
6. 50 µl Antiserumlösung in jede Vertiefung mittels Mehrkanalpipette hinzufügen.
7. Inhalt der Platte auf einem Mikrotiter-Plattenschüttler für 2 Stunden  $\pm$  10 Minuten inkubieren.

### Enzymkonjugat

8. Platte 2mal mit Waschpuffer waschen.  
Streifen/Platte ausleeren. Mindestens 250µl Waschpuffer in jede Vertiefung füllen.  
Einmal diesen Vorgang wiederholen.  
Ein automatisches Mikrotiter-Waschgerät ist einem manuellen Waschen vorzuziehen.  
Nach dem letzten Waschschrift die Streifen/Platte ausleeren und auf einer saugenden Unterlage (z.B. Papierhandtuch) trocken klopfen.
9. 100 µl Enzymkonjugat pipettieren (Mehrkanalpipette).
10. 30  $\pm$  5 Minuten auf dem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.

### Substratinkubation

11. Platte 4-mal waschen.
12. Sofort 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren (Mehrkanalpipette).
13. Inkubation für 45  $\pm$  10 Minuten bei Raumtemperatur.

### Stoppen/Messen

14. 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung hinzufügen. Die Stopplösung im gleichen Muster und Zeitintervall wie die Substratlösung pipettieren.
15. Extinktion bei 450 nm bestimmen (wenn möglich, eine Wellenlänge zwischen 595-650 nm als Referenz benutzen). Wichtig ist, dass sich keine großen Blasen in den Vertiefungen befinden (dieses lässt sich vollständig durch reverses Pipettieren vermeiden) und dass der Boden der Streifen/Platte sauber ist. Die Messung sollte sofort (innerhalb 5 min) nach dem Abstoppen erfolgen.
16. Der Gebrauch einer entsprechenden Computersoftware für die Erstellung der Standardkurve und zur Probenberechnung ist essentiell (z.B. 4-Parameter Methode).
17. Bestimmung der Probenkonzentration anhand der Standardkurve. Die verwendete Probenvorverdünnung ist in die Berechnung mit einzubeziehen und die gemessenen Werte sind entsprechend zu multiplizieren.
18. Kontrollwerte sollten innerhalb des angegebenen Bereichs liegen.

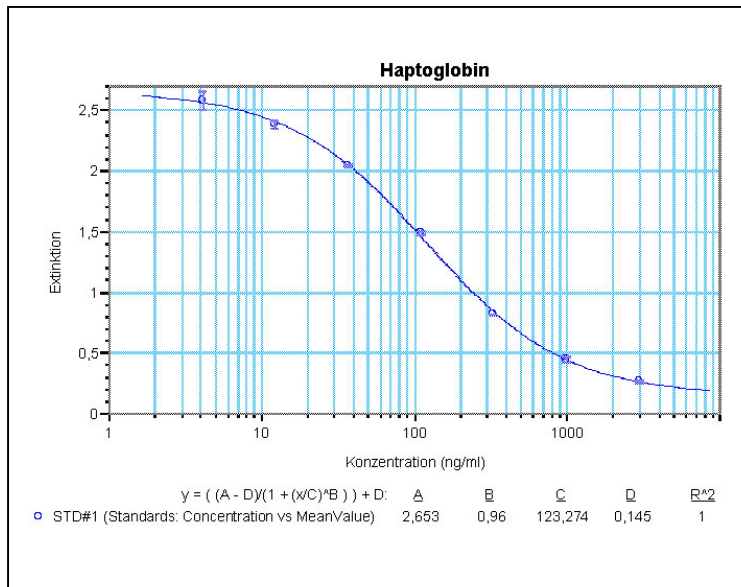
Die Kontrollwerte sollen die Validität der Standardkurve und der Probenergebnisse sicherstellen. Jedes Labor sollte eigene Parameter für akzeptable Testgrenzen ermitteln. Wenn die Kontrollwerte nicht in diesen Grenzen liegen, sollte das Ergebnis als fraglich deklariert und die Bestimmung der Proben wiederholt werden.

## Testcharakterisierung

### Benötigtes Probenmaterial

Für eine Bestimmung werden 100µl Blutserum, Blutplasma oder Vollblut gebraucht.  
 Die Messung in weiteren Körperflüssigkeiten wie Milch oder Speichel ist möglich (nach Rücksprache).

### Typischer Verlauf einer Standardkurve im Haptoglobin-Test für das Pferd



### Testcharakteristika

Testdauer	ca. 4 Stunden
Untere Nachweisgrenze	< 10 ng/ml
Üblicher Messbereich (Serum)	0,1 – 10 mg/ml
Intraassay-CV	< 10%
Interassay-CV	< 15%
Kreuzreaktionen	Nicht bekannt

## Literatur

- [1] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35, 163-187.
- [2] Mills PC, Auer DE, Kramer H, Barry D, Ng JC (1998) Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse. *Aust Vet J* 76, 187-194.
- [3] Kent JE, Goodall J (1991) Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Vet J* 23, 59-66.
- [4] Hiss S, Knura-Deszczka S, Regula G, Hennies M, Gymnich S, Petersen B, Sauerwein H (2003) Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 73-82.