



IDEXX

ELISA - Technisches Handbuch

Inhaltsverzeichnis

Einführung	3
ELISA-Technologie	4
ELISA-Komponenten	6
ELISA-Geräte	7
Wartung und Kalibrierung der Geräte.....	8
Handhabung und Vorbereitung der Reagenzien.....	9
Handhabung und Vorbereitung der Testkomponenten.....	10
Qualitätskontrolle	11
Handhabung von Proben	12
Pipettiermethoden	14
Zeitmanagement für ELISA-Platten.....	16
Waschen der ELISA-Platten	17
Ablesen der Platte und Datenmanagement.....	19
ELISA-Fehlerbehebung	20
Anhang A: Gravimetrische Methode zur Pipettenkalibrierung	24
Anhang B: Lagerkontrollblatt	25
Anhang C: Laborkontrollblatt.....	26
Anhang D: Wartungs- und Kalibrierungsplan.....	27
Anhang E: Qualitätskontrolle Quick Check	28
Hinweise	29

Einführung

IDEXX stellt diagnostische Tests für die Erkennung von Erkrankungen bei Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Geflügel her.

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine der sensitivsten und am besten reproduzierbaren Technologien. Diese Tests sind schnell, einfach durchzuführen und leicht automatisierbar. IDEXX hat den ersten kommerziellen ELISA-Test für Geflügel für infektiöse Bursitis (infectious bursal disease, IBD) im Jahr 1985 und den ersten kommerziellen ELISA-Test für Nutztiere für die Aujeszky-Krankheit/Pseudorabies im Jahr 1986 eingeführt, wodurch die Laboruntersuchungen von Nutztieren verbessert werden konnten.

Wie bei jedem Test hängt die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der ELISA-Tests von der richtigen Technik und der Detailgenauigkeit ab. Dieses technische Handbuch wird Ihr Bewusstsein für ELISA-Techniken erhöhen und Ihnen helfen, Ihre Kenntnisse dieser Methodik auf dem aktuellen Stand zu halten.

Überprüfen Sie Ihre Packungsbeilage für spezifische Anweisungen zu jedem Test, den Sie durchführen. In regelmäßigen Abständen werden Verbesserungen und Überarbeitungen an Packungsbeilagen vorgenommen. Daher ist es wichtig, das Protokoll regelmäßig zu überprüfen.

Wenn Sie Fragen zu den folgenden Informationen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen IDEXX-Vertreter.

ELISA-Technologie

Ein ELISA-Test besteht aus einer Reihe von standardisierten Reagenzien und Mikrotiter-Platten, die für einen bestimmten Test hergestellt werden. Ein IDEXX-ELISA kann einige oder alle der folgenden Komponenten enthalten: beschichtete Platten (feste und/oder Streifenplatten), Probenverdünner, Kontrollen, Waschkonzentrat, Konjugat, Substrat und Stopplösung. Die Tests werden in Chargen hergestellt. Jede Komponente von jeder Testcharge ist optimiert und dazu hergestellt, um als Einheit zu funktionieren. Die Tests durchlaufen viele Qualitätskontrollverfahren, die von IDEXX, zahlreichen Referenzlaboren und Behörden weltweit und/oder dem US-Landwirtschaftsministerium (United States Department of Agriculture, USDA) durchgeführt werden, bevor sie zugelassen und für den Verkauf freigegeben werden.

Der ELISA ist ein schneller Test zur Erkennung und Quantifizierung von Antikörpern oder Antigenen gegen Viren, Bakterien und andere Materialien. Diese Methode kann zur Erkennung vieler Infektionserreger bei Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Geflügel eingesetzt werden.

In der ELISA-Technologie kann die Festphase aus einer Polystyrol-Platte mit 96 Vertiefungen bestehen. Die Funktion der Festphase besteht darin, entweder Antigene oder Antikörper in der Probe zu immobilisieren, da sie sich an die Festphase binden. Nach der Inkubation werden die Platten gewaschen, um jegliches ungebundene Material zu entfernen. Bei einigen Tests erfolgt anschließend die Zugabe des Konjugats zur Platte und dessen Inkubation.

Das Konjugat besteht entweder aus einem enzymmarkierten Antigen oder Antikörper. Abhängig vom Testformat bindet der immunologisch reaktive Teil des Konjugats entweder mit der Festphase oder der Probe. Der Enzymanteil des Konjugats ermöglicht die Erkennung.

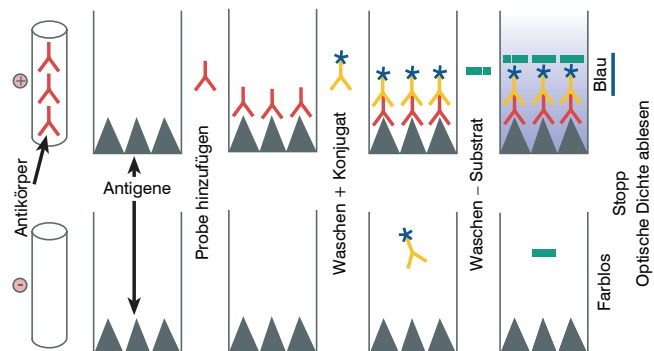
Die Platten werden erneut gewaschen und ein Enzymsubstrat (Wasserstoffperoxid und ein Chromogen) wird zur Inkubation hinzugefügt. Die Färbung entwickelt sich in Gegenwart des gebundenen Enzyms und die optische Dichte wird mit einem ELISA-Plattenleser abgelesen.

Hinweis: Die verwendeten Schritte und Reagenzien können in einem ELISA-Test variieren. Siehe Packungsbeilage für weitere Informationen.

ELISA-Formate

Indirektes Format

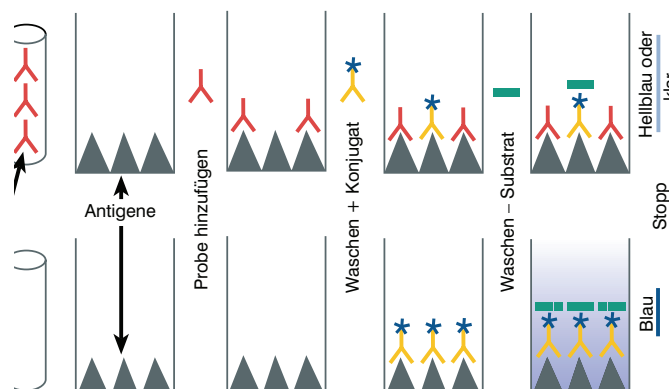
Beim indirekten Format hat die Platte eine Antigenbeschichtung. Der Proben-Antikörper, falls vorhanden, wird zwischen der Antigenbeschichtung auf der Platte und einem enzymmarkierten Anti-Speziesglobulinkonjugat gebunden. Die Zugabe des Substrats (Enzymsubstrat-Chromogenreagenz) führt zu einer Farbentwicklung in den Vertiefungen, in welchen der Antikörper vorhanden ist. Diese Färbung ist direkt proportional zur Menge an gebundenem Probenantikörper. Je mehr Antikörper in der Probe vorhanden sind, desto stärker ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen. Dieses Format ist für die Bestimmung der Gesamtantikörperkonzentration in Proben geeignet.



Schritte zur Durchführung eines indirekten ELISA-Tests

Blocking-Format

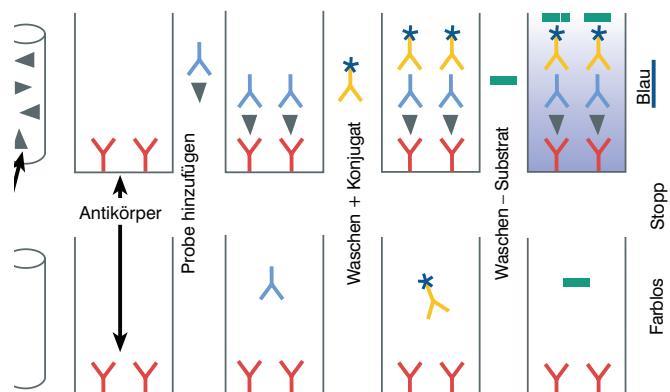
Bei diesem Format blockieren die spezifischen Probenantikörper den enzymmarkierten spezifischen Antikörper im Konjugat. Wie in der Grafik dargestellt, binden die Antikörper sowohl in der Probe als auch im Konjugat an die Antigenbeschichtung auf der Platte. Das Hinzufügen eines Enzymsubstrat-Chromogenreagenz führt zu einer Farbentwicklung. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Menge an gebundenem Probenantikörper. Je mehr Antikörper in der Probe vorhanden sind, desto weniger intensiv ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen.



Schritte zur Durchführung eines Blocking-ELISA-Tests

Indirekter Antigen-Capture (Sandwich) ELISA:

Bei dem indirekten Antigen-Capture ELISA wird das Antigen in der Probe durch den auf der Platte beschichteten Antikörper und durch den in der hinzugefügten Detektorlösung enthaltenen Detektorantikörper gebunden. Die Detektorantikörper sind nicht enzymmarkiert. Das im nächsten Schritt hinzugefügte Konjugat kann sich an den Antikörper der Detektorlösung binden. Wenn das Konjugat an die Detektorlösung bindet, findet eine Farbreaktion statt. Das Antigen wird so indirekt nachgewiesen.



Schritte zur Durchführung eines indirekten Antigen-Capture ELISA-Tests

ELISA-Tests bieten folgende Möglichkeiten:

- Testen einer großen Anzahl von Proben gleichzeitig.
- Automatisierung des Verfahrens unter Verwendung von Robotersystemen oder anderen Arten automatisierter Geräte.
- Computergesteuerte Berechnung und Meldung der Ergebnisse.

ELISA-Komponenten

Beschichtete Platten

Die Platten mit 96 Vertiefungen bestehen aus Polystyrol und sind mit inaktiviertem Antigen oder Antikörper beschichtet. Diese Beschichtung ist die Bindungsstelle für Antikörper oder Antigene in der Probe. Nicht gebundene Antikörper oder Antigene in der Probe werden nach der Inkubation abgewaschen.

Probenverdünner

Die meisten Tests erfordern eine spezifische Verdünnung der Probe. Die Proben werden dem Probenverdünner hinzugefügt und damit vermischt, bevor sie auf die beschichteten Platten aufgebracht werden.

Kontrollen

Die Positivkontrolle ist eine Lösung, die Antikörper oder Antigene enthält. Die Negativkontrolle ist eine Lösung ohne Antikörper oder Antigene. Die Kontrollen helfen, jede Platte zu normalisieren oder zu standardisieren. Kontrollen werden auch verwendet, um den Test zu validieren und die Probenergebnisse zu berechnen. Bei einigen Tests sind die Kontrollen bereits vorab verdünnt und gebrauchsfertig. Bei anderen Tests müssen die Kontrollen ebenso wie die Proben verdünnt werden. Achten Sie darauf, die Anweisungen in der Packungsbeilage zu befolgen.

Konjugat

ELISA-Konjugate sind enzymmarkierte Antikörper oder Antigene, die spezifisch mit den plattengebundenen Probenanalyten reagieren. Ungebundenes Konjugat wird nach der Inkubation und vor der Zugabe von Substrat durch Waschen entfernt. Die optische Dichte des kolorimetrischen Substrats ist direkt proportional zur Menge an gebundenem, vorhandenem Enzym.

Substrat

Für Peroxidasekonjugate besteht das Substrat aus einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und einem Chromogen, das mit dem Enzymteil des Konjugats reagiert, um einen Farbumschlag zu erzeugen.

Waschkonzentrat

Das Waschkonzentrat ist eine gepufferte Lösung mit Detergens, die verwendet wird, um ungebundene Materialien aus den Platten zu waschen. Achten Sie darauf, die Anweisungen in der Packungsbeilage zur Verdünnung der Waschlösung vor dem Gebrauch zu befolgen.

Stopplösung

Die Stopplösung stoppt die Enzym-Substrat-Reaktion und somit die Farbentwicklung.

Hinweis: Je nach Test können andere Reagenzien eingeschlossen werden. Dazu können Konjugat-Verdünnungsmittel, Detektor usw. gehören.

IDEXX-Tests werden gemäß strengen Qualitätsstandards in Chargen hergestellt. Jede Komponente bzw. jedes Reagenz in einer Testcharge ist so optimiert, dass es mit den anderen Reagenzien im Test zusammenarbeitet. Dies umfasst Messungen der Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit. Deshalb ist es sehr wichtig, keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen zu mischen. Typischerweise werden Platten, Konjugat und Testkontrollen zusammen aufbewahrt.



Alle Komponenten haben ein Verfallsdatum.

ELISA-Geräte

Die Geräte für ELISA-Tests sind weithin verfügbar. Plattenleser, Waschgeräte und Pipetten sind als manuelle oder automatisierte Systeme erhältlich. Zu den Faktoren, die die Auswahl von Geräten beeinflussen, gehören die Anzahl und Arten von Tests und Proben, technische Schulungen des Personals und finanzielle Erwägungen. Nachfolgend finden Sie eine kurze Darstellung von Geräten, die für die Durchführung der ELISA-Tests zur Verfügung stehen.

Pipetten

- Einkanal, Festvolumen und variables Volumen (1–20 μl , 10–100 μl , 20–200 μl usw.)
- Mehrkanal, 8- und 12-Kanal
- Halbautomatisierte Abgabeeinheiten
- Vollautomatisierte Systeme, die mehrere Platten abarbeiten können

Verdünner

- Einkanal
- Mehrkanal
- Automatisierte Abgabeeinheiten

Waschsysteme

- Manuelle Systeme, die jeweils eine Reihe oder Spalte waschen
- Halbautomatisierte Systeme, die jeweils einen Streifen oder eine Platte bearbeiten
- Vollautomatisierte Systeme, die mehrere Platten abarbeiten können

ELISA-Plattenleser

- Manuelle Plattenleser, die jeweils eine Reihe oder Vertiefung lesen
- Halbautomatisierte Plattenleser, die jeweils eine Platte lesen
- Vollautomatisierte Systeme, die mehrere Platten gleichzeitig abarbeiten können

Sonstiges

- Feuchtigkeitskammer (nicht für alle ELISA-Tests erforderlich)
- Selbsthaftende Plattenabdeckung für Tests mit langen Inkubationszeiten, um Verdunstung zu verhindern (nicht für alle ELISA-Tests erforderlich)
- Inkubator oder Platten-Schüttler-Inkubator (nicht für alle ELISA-Tests erforderlich)

Es gibt eine große Auswahl an Geräten. Beim Kauf eines Plattenlesers rufen Sie den Technischen Dienst von IDEXX an, um sicherzustellen, dass der Plattenleser mit der aktuellen IDEXX-Software kommunizieren kann.



Mehrkanal-Pipette und Einkanal-Pipette



Halbautomatisiertes Waschsystem



Plattenleser

Wartung und Kalibrierung der Geräte

Die Wartung und Kalibrierung Ihrer Laborausüstung ist äußerst wichtig, um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Der **Wartungs- und Kalibrierungsplan (Anhang D)** kann als Richtlinie verwendet werden. Passen Sie die Wartungsmaßnahme an die Anzahl der täglich durchgeführten Tests in Ihrem Labor an. Nehmen Sie stets die Bedienungsanleitung für Empfehlungen zu Ihren Geräten zur Hand.

Kalibrierungsprotokolle

Die Geräte müssen stets richtig kalibriert sein. Geräte, die nicht kalibriert sind, können falsche oder ungenaue Ergebnisse zur Folge haben. Befolgen Sie das Kalibrierungsprotokoll und die Kalibrierungsintervalle im **Wartungs- und Kalibrierungsplan (Anhang D)** und den Anweisungen Ihres Herstellers als Richtlinie.

Optionen für die Kalibrierung der Pipetten

- Führen Sie das in **Anhang A** dargestellte gravimetrische Verfahren durch.
- Verwenden Sie ein kommerzielles automatisiertes Kalibrierungssystem in Ihrem Labor.
- Senden Sie die Pipette an den Hersteller; siehe Benutzerhandbuch für Anweisungen.
- Senden Sie die Pipette an einen Pipettenkalibrierungsservice.

Die Pipetten zum Service zu senden ist dann nützlich, wenn eine Reparatur oder Wartung notwendig ist. Dies bietet jedoch nur eine begrenzte Qualitätskontrolle, die erhöht werden kann, wenn die Pipetten intern kalibriert werden.

Die verwendete Pipettiertechnik und die Laborumgebung sind zwei wichtige Variablen, die bestimmen, wie sich eine Pipette bei Verwendung im Labor verhält. Eine vollständige Qualitätskontrolle muss diese Effekte quantitativ berücksichtigen. Nützlich ist eine Methode, die eine regelmäßige, routinemäßige Prüfung Ihrer Pipettenleistung ermöglicht. Hierdurch können außerhalb der Toleranz arbeitende Pipetten identifiziert werden. Driftet eine Pipette aus dem Toleranzbereich, dann sollte diese zur Wartung bzw. Reparatur an einen qualifizierten Dienstleister geschickt werden, da ansonsten Ihre Laborergebnisse und Ihre Produktivität gefährdet werden.

Optionen zur Überprüfung von Plattenlesern

- Für den Überprüfungsprozess nehmen Sie bitte das Benutzerhandbuch des Herstellers zur Hand.
- Wenden Sie sich an IDEXX, wenn Sie Fragen zur Verwendung einer Kalibrierungs-/Überprüfungsplatte haben.

Beschriften Sie Ihre Pipetten mit dem Kalibrierungsdatum und führen Sie Protokoll über die Kalibrierung und Wartung all Ihrer Geräte.



Pipette mit Kalibrierungsaufkleber

Es wird empfohlen, dass das Labor Spezifikationen für die Leistung von Mikropipetten auf Grundlage der eigenen internen oder Akkreditierungsstandards festlegt. Als Richtlinie: Mikropipetten und Mehrfach-Mikropipetten mit einer Präzision von $\pm 10\%$ für Volumina $< 10\text{l}$ und $\pm 5\%$ für größere Volumina können verwendet werden.

Handhabung und Vorbereitung der Reagenzien

Eingang von Tests

Wenn Sie Ihren ELISA-Kit erhalten, empfehlen wir, das Eingangsdatum auf dem Lagerkontrollblatt (siehe **Anhang B**) und auf den Paketen festzuhalten. Prüfen Sie den Kit auf Beschädigungen und bewahren Sie ihn bei Temperaturen laut Packungsbeilage auf. Wenn Sie Tests aus Ihrem Lagerbestand verwenden, sollten Sie die sogenannte FIFO-Methode (first in – first out) verwenden, d. h. nehmen Sie zuerst die Tests, die zuerst verfallen. Die einzelnen Komponenten verfallen möglicherweise später als auf dem Etikett der äußeren Verpackung angegeben. **Halten Sie sich jedoch an das Verfallsdatum auf der äußeren Verpackung.** Wenn Sie nur Teile des Tests verwenden, halten Sie das Datum fest, an dem sie ihn angebrochen haben, sowie jedes weitere Mal, wenn sie ihn verwenden.

Hinweis: Ein Test sollte nicht nach seinem Verfallsdatum verwendet werden, da die Ergebnisse ungültig wären und nicht von IDEXX unterstützt werden würden.

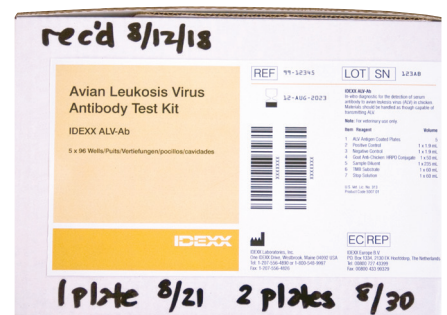
Allgemeine Handhabung von Reagenzien

Lesen Sie die Packungsbeilage für Richtlinien zur Handhabung und Vorbereitung von Reagenzien. Für einige Tests wird empfohlen, alle Reagenzien und Platten vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18 °C bis 26 °C) zu bringen; bei anderen müssen nur bestimmte Reagenzien Raumtemperatur besitzen müssen. Wenn Sie einen Test auf Raumtemperatur (18 °C bis 26 °C) bringen müssen, nehmen Sie ihn aus dem Kühlschrank und nehmen Sie die Komponenten mindestens 2–3 Stunden bevor Sie den Test starten aus der Schachtel.

Ist die Raumtemperatur erreicht, sollten die Reagenzflaschen vor der Verwendung durchgemischt werden. Verwenden Sie für das Abmessen sämtlicher Reagenzien ausschließlich sterile bzw. saubere Laborgeräte. Messen Sie nur so viel Reagenz ab, wie für die Anzahl der für den Test verwendeten Platten notwendig ist. Dadurch wird die Integrität der Reagenzien sichergestellt.

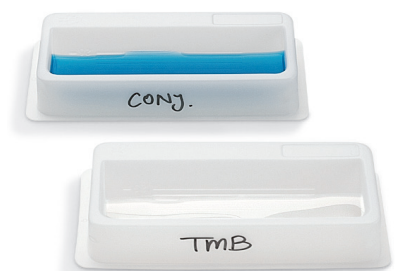
Füllen Sie keine Reagenzien in das Original-Reagenzfläschchen zurück.

Wir empfehlen dringend, Einweg-Pipetten und -Gefäße bei der Handhabung von Reagenzien zu verwenden, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Wenn Sie sich jedoch entscheiden, ein Einweg-Gefäß erneut zu verwenden, verwenden Sie für jedes Reagenz ein separates Gefäß und kennzeichnen Sie dieses. Waschen Sie das Einweg-Gefäß außerdem nach jeder Verwendung sorgfältig mit deionisiertem oder destilliertem Wasser. Wechseln und entsorgen Sie die Einweg-Gefäße so oft wie möglich. Verwenden Sie nie dasselbe Gefäß für Konjugat und Substrat, selbst wenn dieses gewaschen wurde.



Beschriften Sie Ihren Kit mit dem Datum, an dem Sie ihn erhalten haben.

Die Kontamination von Reagenzien kann Ihre Testergebnisse beeinträchtigen. Wenn Sie Ihre Reagenzgefäße beschriften und ein separates für jedes Reagenz verwenden, minimieren Sie das Risiko.



Beschriftete Gefäße

Handhabung und Vorbereitung der Testkomponenten

Die meisten Testplatten werden einzeln mit einem Trockenmittel verpackt. Wird nur ein Teil einer festen Platte verwendet, aspirieren Sie bitte sämtliche in den benutzten Testvertiefungen befindliche Flüssigkeit und decken Sie die benutzten Vertiefungen mit Versiegelungsfolie ab. Bewahren Sie nicht verwendete Teile von Platten mit mehreren Trockenmitteln in einem neuen wiederverschließbaren Beutel auf. Wenn eine Streifenplatte verwendet wird, bringen Sie die ganze Platte auf Raumtemperatur und verwenden Sie dann nur die benötigten Streifen. Bewahren Sie den Rest in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel auf.

ELISA-Tests können sensitiv auf extreme Temperaturen reagieren. Versuchen Sie, eine Temperatur von 18 °C bis 26 °C beizubehalten. Vermeiden Sie Tests unter oder in der Nähe von Belüftungen durchzuführen, da dies zu übermäßiger Kühlung, Erwärmung und/oder Verdunstung führen kann. Führen Sie keine Tests in direktem Sonnenlicht durch, da dies zu übermäßiger Hitze und Verdunstung führen kann. Kalte Arbeitsflächen können sich auf Ihren Test auswirken; vermeiden Sie dieses Problem, indem Sie während der Inkubationsphase mehrere Papiertücher oder anderes Isoliermaterial unter den Testplatten platzieren.

Vergewissern Sie sich, dass der Probenverdünner und das Waschkonzentrat vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–26 °C) sind. Dies sind in der Regel die größten Flaschen bei einem Test und erfordern die meiste Zeit, um Raumtemperatur zu erreichen. Wenn das Waschkonzentrat nach Erreichen der Raumtemperatur immer noch Kristallbildung zeigt, mischen Sie es durch, indem Sie es mehrmals schwenken.

Die meisten Tests werden mit vorverdünnten Kontrollen formuliert und sind rekonstituiert. Manche müssen jedoch genauso verdünnt werden wie Ihre Probe. Die Kontrollen sollten der Platte mit derselben Methode und zur gleichen Zeit hinzugefügt werden wie die Proben.

Wenn es der Test erfordert, dass Sie eine „aktive“ Konjugatlösung vorbereiten, befolgen Sie unbedingt genau die Anweisungen. Bereiten Sie nur das vor, was Sie unmittelbar benötigen, und lagern Sie Reste der Lösung nicht für eine zukünftige Verwendung. Wenn Konjugate kontaminiert oder unangemessen gelagert werden, können sie ihre enzymatische Aktivität verlieren oder eine verstärkte Hintergrundfärbung verursachen. Bei den meisten Tests wird ein gebrauchsfertiges Konjugat mitgeliefert.

Unsere ELISA-Tests beinhalten ein gebrauchsfertiges Substrat. Die chemische Aktivität des Substrats wird durch Lichteinwirkung oder Kontakt mit Metall beeinträchtigt. Schützen Sie diese Lösung, indem Sie sie bis zur Verwendung in einem dunklen Gefäß aufbewahren.

Verwenden Sie nur die Stopplösung, die mit dem Test geliefert wird. Befolgen Sie alle Sicherheitsanweisungen in der Packungsbeilage. Die Stopplösung sollte vor der Verwendung Raumtemperatur haben. Wenn die Stopplösung nach Erreichen der Raumtemperatur immer noch Kristallbildung zeigt, mischen Sie sie durch, indem Sie sie mehrmals schwenken. Die Stopplösung kann bei niedrigeren Temperaturen kristallisieren. Vergewissern Sie sich, dass sie vor der Verwendung vollständig gelöst und klar ist.

Spezifische Details zum Test, den Sie verwenden, finden Sie in der Packungsbeilage.

Mischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen Chargen, auch wenn es sich um ähnliche Tests handelt. Dies könnte Ihre Testergebnisse nachhaltig verfälschen.



Verschließen, beschriften und lagern Sie teilweise verwendete Platten in einem Beutel mit Trockenmittel.

Qualitätskontrolle

Interne Kontrollen

Wir empfehlen interne Testkontrollen zur Überwachung Ihrer ELISA-Techniken und der Leistung der Tests im Laufe der Zeit.

Da Serumproben im Allgemeinen in kleinen Mengen eintreffen, müssen die Kontrollen durch Poolen von Proben hergestellt werden.

Befolgen Sie diese allgemeinen Schritte:

1. Sammeln Sie negative und positive Proben separat. Sobald ausreichende Mengen vorhanden sind, werden ähnliche Proben gepoolt. Mischen Sie die gepoolten Proben gründlich.
2. Führen Sie die serielle Verdünnung in kleinen Mengen positiver Serumproben in negativem Serum durch.
3. Testen Sie jede Verdünnungsstufe gemäß dem Standardtestprotokoll (dieselbe Probenverdünnung wie in der Packungsbeilage beschrieben). Wählen Sie diejenige Verdünnungsstufe aus, die den von Ihnen für das Monitoring vorgesehenen Probe-zu-Positivkontrolle (P/PK) oder Probe-zu-Negativkontrolle (P/NK) Werten am nächsten kommt. Stellen Sie von dieser Verdünnungsstufe große Mengen her.
4. Filtern Sie die vorbereiteten Kontrollen unter Verwendung einer 0,45-micron Filtermembran; Sie können anschließend (optional) eine weitere Filterung mit einer 0,20-micron Filtermembran vornehmen.
5. Aliquotieren Sie die frisch hergestellte interne Kontrolle in luftdichten Röhrchen, beschriften Sie sie und notieren Sie das Datum und lagern Sie die Röhrchen gefroren bei -20 °C bis -80 °C, falls möglich.
6. Notieren Sie alle Informationen.

Zur Verwendung dieser Kontrolle, tauen Sie die Probe auf, mischen und verdünnen Sie sie genauso wie eine normale Probe. Lassen Sie die Kontrolle auf jeder Platte neben den Testkontrollen mitlaufen. Frieren Sie Ihre interne Kontrolle nicht wieder ein. Sie können sie bis zu 5 Tage bei 4 °C aufbewahren.

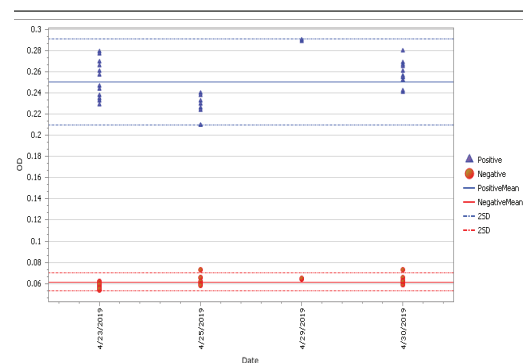
Tragen Sie Ihre Ergebnisse in einem Kontrollsystem, in der IDEXX-Software oder im Laborkontrollblatt (**Anhang C**) ein und halten Sie sie graphisch fest oder benutzen Sie den internen Bericht zum Kontrollverlauf in der IDEXX-Software. Jede Variation und jeder Trend sollte Sie dazu veranlassen, Ihre Technik und Ihre Maßnahmen zur Qualitätskontrolle einer Prüfung zu unterziehen.

Temperaturüberwachung

Protokollieren und kontrollieren Sie die Temperatur während jedes Tests. Wenn die Raumtemperatur in Ihrem Labor von morgens bis nachmittags schwankt, dann dokumentieren Sie dies bitte auf Ihrem Kontrollblatt. Wenn die Umweltbedingungen schwer kontrollierbar sind, ist die Verwendung einer Temperaturkontrollkammer für die Inkubation Ihrer Platten zu empfehlen. Durch die Verwendung von ELISA Plattendeckeln lassen sich Verdunstungen und versehentliche Verschüttungen vermeiden.

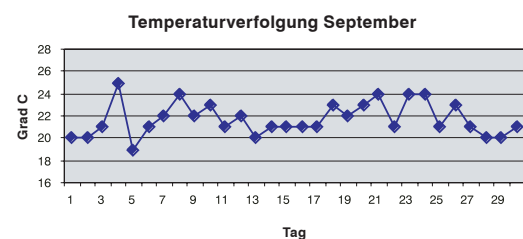
Qualitätskontroll-Check

Verwenden Sie den Qualitätskontrolle Quick Check (**Anhang E**) zur Identifizierung und Behebung von Problemen.



Überwachungsblatt für Kontrollen

Um die Identifizierung und Behebung fragwürdiger Ergebnisse zu erleichtern, dokumentieren Sie die Labortemperatur und halten Sie sie graphisch fest.



Labortemperaturkontrollblatt

Handhabung von Proben

Qualität eingesandter Proben

Die Qualität der Probe kann einen signifikanten Einfluss auf die endgültigen Testergebnisse haben. Die meisten Labore können sich die Qualität eingesandter Proben nicht aussuchen. Vielfach kompensiert die Probenverdünnung Variationen in der Probenqualität.

Eine starke Kontamination mit Pilzen oder Bakterien kann die in der Probe enthaltenen Antikörper oder andere Proteine negativ beeinflussen und eine unerwünschte Auswirkung auf die Testergebnisse haben. Wenn die Probenqualität zu schlecht ist, ist die Anforderung einer frischen Probe sehr zu empfehlen, sofern dies möglich ist.

Serum-/Plasmaproben

Serumproben mit geringgradiger Hämolyse (hellrote Farbe) und mittelgradiger Lipämie (milchig erscheinendes Aussehen) können wenig oder gar keine Auswirkung auf den ELISA-Test haben. Vermeiden Sie die Verwendung von stark hämolytischen (dunkelroten) oder stark lipämischen Proben. Lesen Sie in Ihrer Packungsbeilage nach. Bei geronnenem Serum muss darauf geachtet werden, dass kein geronnenes Material oder Blutzellen aspiriert werden.

Milchproben

Bitte beachten Sie die Packungsbeilage, um zu überprüfen, ob Vollmilch und/oder entrahmte Milch als Proben verwendet werden können oder nicht. Im Allgemeinen können Vollmilch-Proben nach der Zentrifugation für 15 Minuten bei 2.000 x g oder nach einer Nacht im Kühlschrank bei 2 °C–8 °C verwendet werden. Die verwendete Probe sollte aus dem Bereich unterhalb der Rahmschicht entnommen werden. Diese Probenentnahmep Praxis kann weltweit variieren. In einigen Regionen wird die Vollmilchprobe zuerst gründlich gemischt, bevor die Probe gezogen wird. Beachten Sie die Packungsbeilage, um festzustellen, ob der Test bei der Verwendung von Vollmilchproben Einschränkungen hat.

Speichelflüssigkeiten

Pipettieren Sie nicht das Sediment von diesen Proben, da dies schwierig zu pipettieren sein kann und zu unerwarteten Ergebnissen führen kann.

Ohrstanzen

Beachten Sie die Packungsbeilage hinsichtlich Einweichlösung und -zeiten. Pipettieren Sie keine Ablagerungen oder Haare, da diese zu unerwarteten Ergebnissen führen können.

Andere Probentypen

In der Packungsbeilage finden Sie Instruktionen für die Handhabung, Vorbereitung und Lagerung anderer Probenarten (z. B. Albumin, Kloakentupfer, Vollblut, andere Gewebe).

Hinweis: Zum Poolen oder Erkennen einer positiven Probe in einer bestimmten Stichprobengröße (z. B. 1 von 250), siehe die spezifische Packungsbeilage.

Blutprobe
Entnehmen Sie die Probe aus dem angegebenen Bereich.



Handhabung von Proben (Fortsetzung)

Lagerung von Proben

Stellen Sie sicher, dass die Proben korrekt gelagert werden. Im Allgemeinen sollten Serumproben im Kühlschrank bei 2–8 °C und nicht länger als 5 Tage gelagert werden. Ist eine Lagerung der Proben über einen längeren Zeitraum erforderlich, sollten geronnene Proben abpipettiert und bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Alle gelagerten Proben müssen korrekt beschriftet und versiegelt sein, um Verdunstungen zu vermeiden. Eine Kristallisation ist Anzeichen einer Lyophilisation (Konzentration der Probe). Sie kommt häufig bei Gefrierschränken mit Abtauautomatik vor. Eine Lyophilisation sollte vermieden werden, da sie die Probenintegrität mit hoher Wahrscheinlichkeit gefährdet. Es wird empfohlen, wiederholtes Auftauen/Einfrieren zu vermeiden, damit die Leistung nicht beeinträchtigt wird. Milchproben werden am besten mit einem Konservierungsmittel wie Bronopol gekühlt gelagert. Ohrstanzen oder ganze Ohren können für die Langzeitverwendung bei -20 °C eingefroren und erneut verwendet werden.

Verwendung gefrorener Proben

Gefrorene Proben können bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufgetaut werden. Alle aufgetauten Proben müssen vor der Verdünnung gründlich durchmischt werden, um sicherzustellen, dass die Proteine gleichmäßig in der gesamten Probe verteilt sind. Durchmischen Sie die Probe vorsichtig durch mindestens fünfmaliges Vortexen oder Invertieren. Schaumbildung oder ein zu starkes Mischen von Proben führt zu einer Denaturierung der Serumproteine.

Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren, da die in der Probe enthaltenen Antikörper oder Antigene hierdurch geschädigt werden können. Wir empfehlen nicht mehr als 3–5 Zyklen.

Leichte Hämolyse



Starke Hämolyse



Nicht durchmischte, aufgetaute Probe. Die Proteine setzen sich unten im Röhrchen ab; die Probe muss vor der Entnahme durchmischt werden.



Pipettiermethoden

Die beiden für den ELISA-Test verwendeten Pipettiermethoden sind das Standardpipettieren (Vorwärtspipettieren) und das reverse Pipettieren (Rückwärtspipettieren). Nicht alle Pipetten sind jedoch für das reverse Pipettieren geeignet. Entsprechende Einzelheiten finden Sie in der Bedienungsanleitung der von Ihnen verwendeten Pipette.

Es wird empfohlen, Standard- (Vorwärts-)Pipettieren für die Vorbereitung von Probenverdünnungen und das reverse Pipettieren für die Zugabe von Reagenzien zu verwenden.

Ein sorgfältiges Pipettieren ist für genaue Testergebnisse entscheidend. Machen Sie sich mit der Pipette und mit den beiden Pipettiermethoden vor der Testdurchführung vertraut. Stellen Sie sicher, dass Sie die richtige Pipette und Pipettenspitze (Volumenkapazität) für das zu transferierende Volumen verwenden.

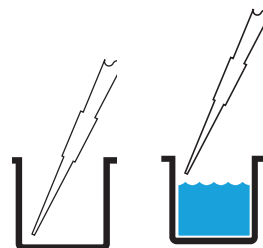
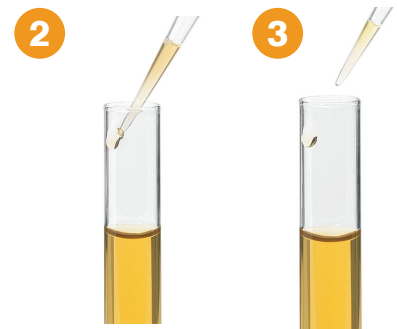
Pipettiertechnik

1. Ziehen Sie das kalibrierte Probenvolumen in die Pipettenspitze auf. Streifen Sie überschüssige Flüssigkeit (Tropfen) an der Pipettenspitze ab.
2. Berühren Sie dazu das Reagenzglas seitlich mit der Pipettenspitze.
3. Prüfen Sie, ob Sie das korrekte Probenvolumen in die Pipettenspitze aspiriert haben.

Wenn Sie eine Mehrkanal-Pipette verwenden und die Vertiefungen auf Ihrer Platte leer sind, positionieren Sie die Spitzen in die untere Ecke jeder Vertiefung. Wenn die Vertiefungen auf Ihrer Platte Flüssigkeit enthalten, positionieren Sie die Spitzen über der Flüssigkeit.

Korrektes Pipettieren

- Korrekte Position zum Aufpipettieren von Reagenzien in leere Vertiefungen mit einer Mehrkanalpipette: am unteren Rand jeder Vertiefung
- Korrekte Position zum Aufpipettieren von Reagenzien in mit Flüssigkeit gefüllte Vertiefungen mit einer Mehrkanalpipette: oberhalb der Flüssigkeit



Pipettiermethoden (Fortsetzung)

Standard- (Vorwärts-)Pipettieren und Probenvorbereitung

1. Setzen Sie eine neue Pipettenspitze auf eine Einkanalpipette und vergewissern Sie sich, dass die Spitze fest aufsitzt.
2. Drücken Sie den Kolben bis zum ersten Anschlag.
3. Einige Hersteller empfehlen, die Pipettenspitze zunächst durch Aspiration und Abpipettieren eines Probenvolumens anzufeuchten. Schauen Sie daher in der Bedienungsanleitung Ihrer Pipette nach.
4. Ziehen Sie das kalibrierte Probenvolumen in die Pipettenspitze auf und warten Sie eine Sekunde, wobei Sie die Pipettenspitze noch in der Probe belassen. Achten Sie jedoch darauf, dass die Pipettenspitze nicht zu tief in die Probe eintaucht.
5. Berühren Sie das Probengefäß seitlich mit der Pipette, um überschüssige, außen an der Pipette haftende Probenflüssigkeit abzustreifen.
6. Pipettieren Sie die Probe in den zuvor abgemessenen Probenverdünner, indem Sie den Kolben über den ersten Anschlag hinaus bis zum zweiten Anschlag drücken. Achten Sie dabei darauf, dass Sie die Pipettenspitze nicht zu tief in den Probenverdünner eintauchen.
Bei Proben mit einem Volumen von 10 μl oder weniger: Spülen Sie die Pipettenspitze nach dem Pipettieren der Probe in den Probenverdünner vor Abwerfen der Pipettenspitze durch 2-3-maliges Herunterdrücken des Kolbens.
7. Mischen Sie die Proben vor dem Aufpipettieren auf die Platte mithilfe einer Mehrkanalpipette, indem Sie den Kolben 3-6-mal herunterdrücken.
8. Werfen Sie die Pipettenspitze in einen Abfallbehälter ab.

Reverses Pipettieren mit einer Mehrkanalpipette

1. Setzen Sie neue Pipettenspitzen auf die Pipette auf. Vergewissern Sie sich, dass die Spitzen fest und gerade aufsitzen.
2. Drücken Sie den Kolben über den ersten Anschlag hinaus bis halbwegs zum zweiten Anschlag.
3. Ziehen Sie die Flüssigkeit langsam auf. Achten Sie dabei darauf, dass sich in den Pipettenspitzen keine Luftblasen bilden. Prüfen Sie, ob in allen Pipettenspitzen gleiche Volumina vorhanden sind.
4. Berühren Sie das Reagenzgefäß seitlich mit den Pipettenspitzen, um außen an den Pipettenspitzen haftende, überschüssige Flüssigkeit zu entfernen.
 - a. Wenn die Vertiefungen auf Ihrer Platte leer sind, positionieren Sie die Spitzen an den unteren Rand jeder Vertiefung.
 - b. Wenn die Vertiefungen auf Ihrer Platte Flüssigkeit enthalten, positionieren Sie die Spitzen oberhalb der Flüssigkeit.
5. Pipettieren Sie die Flüssigkeit langsam in die Vertiefungen, indem Sie den Kolben bis zum ersten Anschlag herunterdrücken. Achten Sie dabei darauf, dass die Flüssigkeit nicht aus der Vertiefung herausspritzt, und dass keine Tropfen an den Pipettenspitzen verbleiben.
6. Für eine Wiederholung des Vorganges halten Sie den Kolben am ersten Anschlag gedrückt und fahren Sie mit Schritt 3 fort.
7. Werfen Sie die Pipettenspitze in einen Abfallbehälter ab.

Hinweis: Beim reversen Pipettieren wird mehr Reagenz/Volumen verbraucht (= „Totvolumen“).

Automatisierte Verdünnungssysteme und kompetitive Tests

Bei automatisierten Systemen und Tests, die mit unverdünnten Proben oder niedrigen Verdünnungsfaktoren arbeiten, kann die Probe direkt in die Vertiefungen der beschichteten Platten gegeben werden.

Gehen Sie wie folgt vor:

1. Geben Sie den Probenverdünner auf die Platte.
2. Fügen Sie die Probe hinzu.
3. Mischen Sie beides durch leichtes Beklopfen der Platte oder wiederholtes Pipettieren.

Automatisierte Geräte benötigen mehr Reagenz/Volumen als halbautomatisierte. Beachten Sie die Herstellerempfehlungen für die Reinigung und Vorbereitung Ihres Systems. Das „Totvolumen“ kann mit Hilfe des Herstellers optimiert werden.

Zeitplan von ELISA-Platten

Proben und Kontrollen hinzufügen

Die Inkubationen für die Testplatten sollten so genau wie möglich geplant sein. Normalerweise erfordert der Vorgang, Proben zu der Platte hinzuzufügen, die meiste Zeit. Wenn Sie Proben auf die Platte aufpipettieren ist es wichtig, dass die Zeit zwischen dem Aufpipettieren der ersten bis zur letzten Probe minimiert wird, damit die Ergebnisse nicht durch Unterschiede in der Inkubationszeit beeinträchtigt werden.

Zur Minimierung der Zeitunterschiede zwischen Kontrollen und Proben können Sie Ihre Kontrollen in ein Reagenzglas geben und den Reagenzglasständer neben Ihre Proben stellen. Verwenden Sie zum Aufpipettieren eine Mehrkanalpipette und geben Sie die Kontrollen gleichzeitig mit den Proben auf die Platte.

Test mit mehreren Platten

Für die Zeitsteuerung mehrerer Platten ist es wichtig, das Zeitintervall zwischen der ersten und der letzten Platte im Auge zu behalten. Halten Sie die Chargengrößen klein genug, damit sich die Prozesse nicht überschneiden. Es ist nicht sinnvoll, dass Sie eine Platte bereits waschen, wenn gleichzeitig auf eine andere Platte Konjugat aufpipettiert werden muss. Verwenden Sie möglichst für jede Platte einen separaten Timer.

Stellen Sie die Kontrollen neben die Proben und verwenden Sie zum gleichzeitigen Aufpipettieren eine Mehrkanalpipette, um die Zeitdifferenzen für die Inkubation zwischen Kontrollen und Proben zu minimieren.



Bei Inkubation mehrerer Platten mehrere Timer verwenden.

Waschen der ELISA-Platten

Automatisierte oder halbautomatisierte Systeme

Im Allgemeinen ist der durch ein automatisiertes oder halbautomatisiertes, gut funktionierendes System durchgeführte Waschvorgang gleichmäßiger als das manuelle Waschen. Vergewissern Sie sich, dass alle Dispensiernadeln die Waschlösung in einem runden, gleichmäßigen Strahl abgeben und dass alle Ansaugstutzen die Flüssigkeit einheitlich aspirieren.

Sorgen Sie dafür, dass Ihr Waschsystem korrekt gereinigt und gewartet wird. Beziehen Sie sich auf den Abschnitt **Wartung und Kalibrierung der Geräte** in diesem Leitfaden (**Seite 8**) und Ihr Benutzerhandbuch für eine ordnungsgemäße Wartung. Die Waschtechnik sollte für alle Platten und innerhalb einer Platte von Reihe zu Reihe immer gleich sein. Vermeiden Sie längere Einweichzeiten, außer wenn eine solche längere Einwirkzeit in der Packungsbeilage speziell empfohlen wird.

Bereiten Sie die Waschlösung wie in der Packungsbeilage angegeben vor. Verwenden Sie ausschließlich die im Test enthaltene Waschlösung.

Vor Aufbringen der Waschlösung auf die Platte müssen vorhandene Reagenzien von der Platte abpipettiert werden.

Folgen Sie den spezifischen Empfehlungen in der Packungsbeilage hinsichtlich der Anzahl von Waschvorgängen bei jedem Schritt des Tests. Die meisten Tests benötigen ungefähr 300–350 μl pro Vertiefung und Waschvorgang. Achten Sie darauf, dass die Flüssigkeit nicht über den Rand der Vertiefung überläuft. Sollte dies dennoch passieren, kann der Test ungültige Ergebnisse liefern.

Die Platte darf zwischen den Waschvorgängen und unmittelbar vor Zugabe des nächsten Reagenzes auf keinen Fall austrocknen.

Nach der abschließenden Aspiration werden verbleibende Flüssigkeitsreste auf mehreren Lagen von absorbierendem Material ausgetupft.

Bei der Untersuchung von Milch, Albumin oder Vollblut müssen die Vertiefungen besonders sorgfältig inspiziert werden. Die genannten Probenotypen enthalten Proteine oder Fett und sind daher manchmal schwieriger aus den Vertiefungen auszuwaschen. Es ist dann die als Maximum angegebene Anzahl an Waschvorgängen notwendig. Wenn sie nicht gut ausgewaschen wurden, könnte dies zu einem erhöhten Hintergrund und/oder falsch positiven Ergebnissen führen.

Prüfen Sie die Papiertücher nach dem Ausklopfen der Platten auf Farbreste. Farbreste können ein Hinweis darauf sein, dass der Waschvorgang nicht korrekt durchgeführt wurde und sich in und um die Vertiefungen noch Reste von Reagenzien befinden.



Mikrobielles Wachstum im Schlauch des Waschsystems könnte das Waschen der Platte beeinträchtigen und einen erhöhten Hintergrund und/oder ein falsch positives Ergebnis hervorrufen.

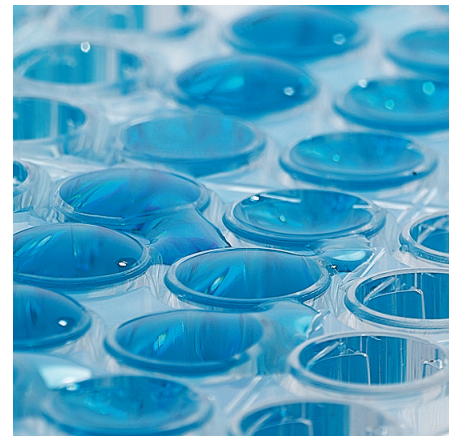
Waschen der ELISA-Platten (Fortsetzung)

Manuelle oder halbmanuelle Systeme

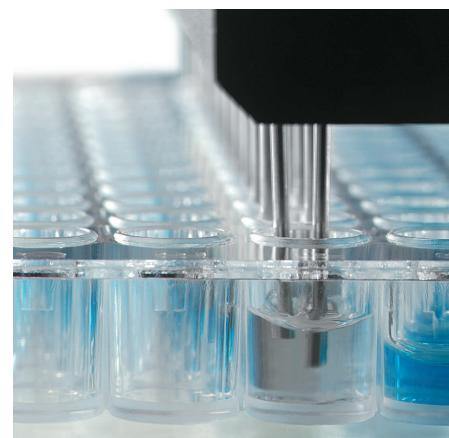
Arbeiten Sie schnell, damit die Zeit zwischen dem Waschen der ersten Vertiefung/Reihe bis zum Waschen der letzten Vertiefung/Reihe möglichst kurz ist. Bei zu langen Zeitintervallen können die leeren Vertiefungen austrocknen und die letzten Vertiefungen inkubieren länger als die ersten Vertiefungen.

Vergewissern Sie sich, dass sämtliche Flüssigkeit aus den Vertiefungen abgezogen wird, indem Sie die Aspirationsnadeln 1 mm über dem Boden der Platte positionieren. Das Ankratzen der Plattenoberfläche muss dabei vermieden werden, da sonst die an die Plattenoberfläche gebundenen Antigene/Antikörper entfernt werden und der Test dann ungleichmäßige bzw. ungenaue Ergebnisse liefert. Im Anschluss an die Aspiration dürfen die Vertiefungen bis zur Zugabe des nächsten Reagenzes nicht austrocknen.

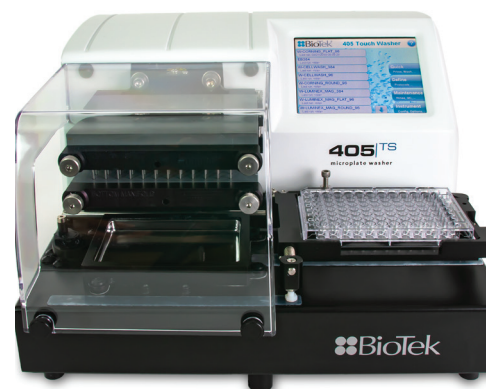
Nach dem Ausklopfen der Platten werden die Papiertücher auf Farbbreite geprüft. Farbbreite können ein Hinweis darauf sein, dass der Waschvorgang nicht korrekt durchgeführt wurde und sich in und um die Vertiefungen noch Reste von Reagenzien befinden.



Überflutete Platte; die Kontamination anderer Vertiefungen kann die Folge sein.



Richtige Positionierung der Nadeln des manuellen Waschgerätes zur Abgabe von Waschlösung.



Ablezen der Platte und Datenmanagement

Ablezen der Platten

Der letzte Schritt in einem ELISA-Test ist es, die Ergebnisse zu lesen und zu interpretieren. Bei den meisten Tests wird die optische Dichte (Menge der Färbung) der Lösung auf der Platte mit einem Spektralphotometer abgelesen, häufig als „Plattenleser“ bezeichnet. Plattenleser gibt es in vielen Modellvarianten von verschiedenen Herstellern; Einzelheiten finden Sie in der Bedienungsanleitung des Herstellers.

Die Packungsbeilage gibt an, welche Wellenlänge für den Test benötigt wird. Bei den meisten Tests wird die Absorption bei 450 nm oder 650 nm bestimmt. In der Regel sind die Tests unter Verwendung eines Plattenlesers mit einem 650-nm-Filter optimiert. Die Verwendung von 630-nm- oder 620-nm-Filtern senkt die optischen Dichte (OD) sowohl der Kontrollen als auch der Proben, jedoch auf der gesamten Platte. Die Verwendung dieser alternativen Filter hat keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

Die Platten sollten so bald wie möglich nach der Zugabe der Stopplösung abgelesen werden. Bei zu großen Zeitintervallen zwischen der Beendigung der Reaktion mittels Stopplösung und dem Ablesen können die Absorptionswerte eine Abweichung anzeigen.

Datenmanagement

IDEXX bietet Ihnen eine Software, die Sie bei der Sammlung und Verwaltung der Daten Ihrer ELISA-Tests unterstützt. Die Software ist mit den meisten Plattenleser kompatibel, um die optische Dichte an den Computer zu senden und die Ergebnisse zu berechnen. Ein Vertreter des technischen Serviceteams von IDEXX kann Ihnen dabei helfen, mehr über diese Software und zugelassene Plattenleser zu erfahren.



ELISA-Fehlerbehebung

Die folgenden Informationen sollen Ihnen dabei helfen, Fehler bei der Durchführung Ihres ELISA-Tests zu identifizieren und zu beheben. Wenn Sie Hilfe benötigen, kontaktieren Sie bitte Ihre Kontaktperson beim IDEXX Technischen Kundendienst.

Hinweis: Die hier beschriebenen Probleme treffen möglicherweise nicht auf alle ELISA-Tests zu, da die Leistungsanforderungen je nach Test variieren. Lesen Sie daher unbedingt die Packungsbeilage.

Starke Hintergrundfärbung oder übermäßige Farbentwicklung (hohe optische Dichtewerte [OD])

Mögliche Ursachen	Empfohlene Maßnahmen
Schlechte Wasserqualität des für das Waschen oder für die Vorbereitung der Waschlösung verwendeten Wassers.	Überprüfen Sie die Wasserqualität. Wenn diese fraglich ist, ersetzen Sie das für das Waschen der Platte oder die Vorbereitung der Waschlösung verwendete Wasser durch ein anderes, z. B. durch destilliertes Wasser in Flaschen.
Die Substratlösung ist verfallen.	Vergewissern Sie sich, dass das Substrat farblos ist, bevor Sie es auf die Platte hinzufügen.
Das Waschen war unzureichend oder der Waschautomat wies eine schlechte Leistung auf.	Versuchen Sie, die höchste Anzahl an empfohlenen Waschvorgängen für den Test zu verwenden. Stellen Sie sicher, dass mindestens 350 μl der Waschlösung pro Vertiefung pro Waschvorgang abgegeben werden. Überprüfen Sie die Funktion des Waschsystems. Geben Sie das Waschsystem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen oder die Abgabe und Aspiration nicht korrekt funktioniert.
Das Waschsystem ist mikrobiell kontaminiert.	Entfernen Sie die mikrobielle Kontamination. Spülen Sie das System dazu zunächst mit einer Tergezyme-Lösung und anschließend mit großen Mengen destilliertem oder deionisiertem Wasser. Bereiten Sie das System vor dem Gebrauch mit der entsprechenden Waschlösung vor. Der Schlauch muss möglicherweise getauscht werden, wenn die Kontamination stark ist.
Das Waschsystem war mit einer anderen Waschlösung gefüllt.	Vergewissern Sie sich, dass jede einzelne Waschlösung korrekt beschriftet ist. Spülen Sie das System gründlich, bevor Sie eine andere Waschlösung auffüllen.
Der Plattenleser hatte eine Fehlfunktion oder war nicht korrekt eingestellt; dies ist eine mögliche Ursache für hohe OD-Werte bei gleichzeitig schwacher Farbreaktion.	Prüfen Sie die Funktion des Plattenlesers mithilfe einer Kalibrierungsplatte und prüfen Sie die Ausrichtung der Lampe. Prüfen Sie falls notwendig den Einblendevorgang, und wiederholen Sie das Einblenden.
Die Laborraumtemperatur war zu hoch.	Halten Sie die Raumtemperatur zwischen 18 °C–26 °C. Vermeiden Sie die Durchführung von Tests in der Nähe von Wärmequellen, in direktem Sonnenlicht oder unter Belüftungen.
Reagenzien wurden mit anderen Tests gemischt, kontaminiert oder falsch vorbereitet.	Stellen Sie sicher, dass die richtigen Reagenzien verwendet wurden, alle Lösungen korrekt vorbereitet wurden und keine Kontamination vorliegt.

ELISA-Fehlerbehebung (Fortsetzung)

Unzureichende Farbentwicklung (niedrige optische Dichtewerte [OD])

Mögliche Ursachen	Empfohlene Maßnahmen
Die Laborraumtemperatur war zu niedrig.	Halten Sie die Raumtemperatur zwischen 18 °C–26 °C. Vermeiden Sie die Durchführung von Tests unter Lüftungsschlitzen von Klimaanlage oder in der Nähe von kalten Fenstern.
Die Waschlösung wurde falsch vorbereitet oder es wurde die falsche Waschlösung verwendet.	Achten Sie darauf, die für das Kit empfohlene Lösung zu verwenden und dass sie korrekt vorbereitet ist. Beschriften Sie jede einzelne Lösung, um eine falsche Verwendung zu vermeiden.
Das Waschsystem war mikrobiell kontaminiert oder hat eine andere Waschlösung enthalten.	Entfernen Sie die mikrobielle Kontamination. Spülen Sie das System dazu zunächst mit einer Tergezyme-Lösung und anschließend mit großen Mengen destilliertem oder deionisiertem Wasser. Bereiten Sie dann das System mit der entsprechenden Waschlösung vor. Vergewissern Sie sich, dass jede einzelne Waschlösung korrekt beschriftet ist. Spülen Sie das System gründlich, bevor Sie eine andere Waschlösung auffüllen.
Es wurden zu viele Waschzyklen durchgeführt.	Bleiben Sie im empfohlenen Bereich für die Anzahl der Waschzyklen. Versuchen Sie, die niedrigste Anzahl an empfohlenen Waschvorgängen für den Test zu verwenden.
Die Inkubationszeiten waren zu kurz.	Befolgen Sie das Protokoll hinsichtlich Inkubationszeiten. Überwachen Sie die Zeiten für jede Platte individuell, damit die Inkubationszeiten genau eingehalten werden.
Reagenzien und Platten waren zu kalt.	Stellen Sie sicher, dass die Platten und Reagenzien Raumtemperatur haben, indem Sie sie mindestens 2–3 Stunden vor Beginn des Tests aus dem Kühlschrank nehmen und die Testkomponenten aus dem Karton.
Reagenzien waren abgelaufen oder mit anderen Chargennummer durchmischt.	Überprüfen Sie die Verfallsdaten und Chargennummern auf den Reagenzien.
Ein falsches Konjugat wurde verwendet oder ein Konjugat wurde falsch vorbereitet oder ist abgelaufen.	Prüfen Sie, ob das mit dem Test mitgelieferte Konjugat verwendet wurde. Alle Konjugate sind test- und chargenspezifisch. Wenn die Vorbereitung einer Konjugatlösung erforderlich ist, stellen Sie sicher, dass korrekte Volumina von Konzentrat und Verdünner verwendet werden. Bereiten Sie die Lösung nicht zu früh vor, und bewahren Sie keine Lösungsreste für eine eventuelle spätere Verwendung auf. Bei gebrauchsfertigem Konjugat ist darauf zu achten, dass lediglich die aktuell benötigte Menge entnommen wird. Nicht benötigte Volumina dürfen nicht in die Vorratsflasche zurückgegossen werden.
Die Testplatte wurde bei der falschen Wellenlänge abgelesen, oder der Plattenleser funktionierte nicht korrekt.	Überprüfen Sie die richtige Wellenlänge für den Test und lesen Sie die Platte noch einmal ab. Prüfen Sie die Kalibrierung des Plattenlesers und die Ausrichtung der Lampe.
Die Positivkontrolle wurde verdünnt (nur für das indirekte Format).	Verdünnen Sie die Kontrollen nur dann, wenn dies in der Packungsbeilage ausdrücklich vorgeschrieben wird.
Übermäßige Testbelastung trat auf.	Überprüfen Sie, wie oft der Test aus dem Kühlschrank entnommen und wieder zurückgestellt wurde. Finden Sie heraus, ob der Test zu lange auf der Lagerrampe oder in einem anderen Bereich gestanden hat oder ob er extremen Temperaturen ausgesetzt war.

ELISA-Fehlerbehebung (Fortsetzung)

Replikate innerhalb einer Platte zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit

Mögliche Ursachen	Empfohlene Maßnahmen
Das Hinzufügen von Proben, Kontrollen oder Reagenzien auf die Testplatte hat zu lange gedauert.	Stellen Sie sicher, dass alle Materialien fertig sind und bereitstehen, um schnell verwendet zu werden. Verwenden Sie eine Mehrkanal-Pipette, um Reagenzien gleichzeitig zu mehreren Vertiefungen hinzuzufügen. Stellen Sie Kontrollen im Gestell auf und tragen Sie sie zur gleichen Zeit wie die Proben auf die Platte auf.
Die Mehrkanal-Pipette funktionierte nicht ordnungsgemäß.	Überprüfen Sie die Kalibrierung der Pipette und prüfen Sie den festen Sitz der Pipettenspitzen. Vergewissern Sie sich, dass alle Pipettenkanäle gleiche Volumina aufziehen und abgeben.
Der Waschvorgang war ungleichmäßig oder das Waschsysteem hatte eine Fehlfunktion.	Überprüfen Sie die Funktion des Waschsystems. Geben Sie das Waschsysteem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen, oder die Abgabe und Aspiration nicht korrekt funktioniert.
Die Verteilung von Antikörpern in der Probe war schlecht.	Wenn die Probe aufgetaut oder gekühlt war, vergewissern Sie sich, dass sie vor der Verdünnung durchgemischt wurde. Verdünnte Proben müssen ebenfalls durchgemischt werden, bevor sie auf die Platte aufpipettiert werden.

Keine Farbentwicklung

Mögliche Ursachen	Empfohlene Maßnahmen
Reagenzien wurden in der falschen Reihenfolge verwendet oder ein Testschritt wurde ausgelassen.	Lesen Sie das Testprotokoll in der Packungsbeilage und wiederholen Sie den Test.
Die Proben wurden nicht zum Probenverdünner hinzugefügt (nur für das indirekte Format).	Vergewissern Sie sich, dass die Proben dem Verdünner hinzugefügt wurden.
Ein falsches Konjugat wurde verwendet oder ein Konjugat wurde falsch vorbereitet oder ist abgelaufen.	Prüfen Sie, ob das mit dem Test mitgelieferte Konjugat verwendet wurde. Alle Konjugate sind test- und chargenspezifisch. Wenn die Vorbereitung einer Konjugatlösung erforderlich ist, stellen Sie sicher, dass korrekte Volumina von Konzentrat und Verdünner verwendet werden. Bereiten Sie die Lösung nicht zu früh vor, und bewahren Sie keine Lösungsreste für eine eventuelle spätere Verwendung auf. Bei gebrauchsfertigem Konjugat ist darauf zu achten, dass lediglich die aktuell benötigte Menge entnommen wird. Nicht benötigte Volumina dürfen nicht in die Vorratsflasche zurückgegossen werden.

ELISA-Fehlerbehebung (Fortsetzung)

Schlechte Reproduzierbarkeit von Platte zu Platte

Mögliche Ursachen	Empfohlene Maßnahmen
Uneinheitliche Inkubationszeiten von Platte zu Platte.	Planen Sie jede Platte zeitlich separat, um sicherzustellen, dass die Platten gleichmäßig inkubiert werden.
Ein uneinheitliches Waschverhalten trat auf der Platte auf.	Verwenden Sie für jede Platte dieselbe Anzahl von Waschvorgängen. Überprüfen Sie die Funktion des Waschsystems. Geben Sie das Waschsystem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen, oder die Abgabe oder Aspiration nicht korrekt funktioniert.
Die Pipette funktioniert nicht korrekt.	Überprüfen Sie die Pipettenkalibrierung. Vergewissern Sie sich, dass die Pipettenspitzen fest aufsitzen, und dass alle Kanäle gleiche Volumina aufziehen und abgeben.
Kontrollen und Proben hatten unterschiedliche Temperaturen.	Planen Sie ausreichend Zeit für das Erwärmen des Probenverdünners, der Proben und der Kontrollen auf Raumtemperatur ein, indem Sie sie aus der Schachtel nehmen. Größere Volumina erfordern eine längere Ausgleichszeit. Falls Sie zur Beschleunigung der Aufwärmung ein Wasserbad benutzen, muss dieses Raumtemperatur haben; verwenden Sie keine warmen Wasserbäder für Kontrollen, Proben oder Verdünner.
Es wurden Reagenzien aus verschiedenen Chargen verwendet.	Falls Sie zwei verschiedene Chargen gleichzeitig benutzen, müssen alle Reagenzienstände etc. eindeutig beschriftet werden, damit die für die einzelnen Platten verwendeten Reagenzien alle aus einer Charge stammen.
Probenidentifikationsfehler oder -verwechslung.	Die Proben erneut testen oder neue Proben entnehmen.

Anhang A: Gravimetrische Methode zur Pipettenkalibrierung

Material

- Pipette
- Analysenwaage
- Becherglas
- Deionisiertes Wasser
- Wiegegefäß
- Thermometer

Verfahren

1. Um fehlerhafte Ergebnisse aufgrund einer Verdunstung zu vermeiden, empfehlen wir, die analytische Wägekammer mindestens 2 Stunden vor der Kalibrierung zu befeuchten. Dies kann durch Platzierung eines kleinen, zur Hälfte mit Wasser gefüllten Becherglases in der Kammer und nachfolgendem Verschluss aller Kammertüren erfolgen.
2. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Reinigung der Pipetten vor der Kalibrierung.
3. Die Raumtemperatur sollte konstant bleiben, vorzugsweise 18 °C bis 26 °C, ± 0.5 °C.
4. Bringen Sie ein ausreichend großes Volumen an deionisiertem oder destilliertem Wasser auf Raumtemperatur und messen Sie anschließend die Temperatur.
5. Notieren Sie das Anfangsgewicht des Wiegegefäßes oder stellen Sie die Waage auf null.
6. Pipettieren Sie Wasser in das Wiegegefäß und notieren Sie das Gewicht. Benutzen Sie für jedes Pipettieren eine neue Pipettenspitze. Wiederholen Sie diesen Schritt 10-mal.
7. Berechnen Sie das bei jedem Vorgang abgegebene Volumen.

Berechnungen

1. Berechnen Sie das tatsächliche abgegebene Volumen wie folgt:

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Gewicht des Wassers}}{\text{Wasserdichte}}$$

Wasserdichte bei 16 °C–21 °C = 0,998 mg/ μ l

Wasserdichte bei 22 °C–25 °C = 0,997 mg/ μ l

2. Berechnen Sie Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (CV) der 10 Volumina zur Bestimmung der Präzision der Pipette.
3. Berechnen Sie die Genauigkeit der Pipette wie folgt:

$(1 - [\text{Differenz zwischen angegebenem und tatsächlichem Volumen} / \text{angegebenes Volumen}]) \times 100 = \% \text{ Genauigkeit}$

Empfohlene Spezifikationen

1. Präzision: CV \leq 5,0 %
2. Genauigkeit: \geq 95 %

Beschriftung

Beschriften Sie die Pipette mit dem Datum der Kalibrierung, dem Kürzel der kalibrierenden Person, der Präzision und der Genauigkeit. Notieren Sie diese Angaben für die längerfristige Lagerung zusätzlich in einem Notiz- oder Labortagebuch.

Anhang B: Lagerkontrollblatt

Anmerkungen															
Verfallsdatum															
Eingangsdatum															
Anzahl der erhaltenen Tests															
Chargennummer															
Test-Art															

Anhang C: Laborkontrollblatt

Anmerkungen																
Raumtemperatur																
Interne Kontrolle																
Interne Kontrolle																
Interne Kontrolle																
Interne Kontrolle																
Positivkontrolle																
Negativkontrolle																
Plattennummern																
Chargennummer des Tests																
Techniker																
Datum																

Anhang D: Wartungs- und Kalibrierungsplan

Verfahren	Täglich	Wöchentlich	Monatlich	Vierteljährlich	Jährlich
Pipetten					
Reinigung der Außenseite	●				
Kalibrierung überprüfen					●
Reinigung Innenseite und O-Ringe				●	
Verdünner					
System mit deionisiertem Wasser spülen	●				
System entleeren	●				
Kalibrierung überprüfen [†]		●			
Spritzen einweichen		●			
Überprüfen/Austauschen der Schläuche				Überprüfen	Austauschen
Waschsystem					
System mit deionisiertem Wasser spülen, wenn andere Waschlösungen als deionisiertes Wasser verwendet werden oder als nächstes eine andere Waschlösung verwendet werden soll					
Klappen, Filter und Schaumbildung prüfen	●				
Aspirations- und Abgabennadeln auf Tropfen und Verschmutzungen prüfen					
Schläuche und Flaschen auf mikrobielles Wachstum prüfen	●	●			
Dekontamination—System mit Bleich- oder Alkohollösung oder Tergezyme spülen [†]			●		
Kalibrierung prüfen—System entleeren			●		
Reinigung der Außenseite	●				
Überprüfen/Austauschen des Schlauchs	●			Überprüfen	Austauschen
Plattenleser					
Kalibrierungs-/Überprüfungsplatte [†]					●
Einblenden der Lampe	Nach Austausch der Birne				
Optik säubern				●	
Reinigung der Außenseite		●			

[†]Beachten Sie die spezifischen Instruktionen für Ihr Gerät und Modell in der Bedienungsanleitung.

[†]Bitte rufen Sie den IDEXX Technischen Kundendienst oder den Hersteller Ihres Plattenleser an, um Empfehlungen zu der Kalibrierungs-/Überprüfungsplatte zu erhalten.

Anhang E: Qualitätskontrolle Quick Check

Die Überwachung und Kontrolle der Leistung des Tests mithilfe von Qualitätskontrollblättern liefert Informationen darüber, wann eine Fehlersuche/Fehlerbehebung notwendig ist. Unten sehen Sie eine Checkliste, die Sie bei Problemen mit Ihrem ELISA überprüfen können. Wenn Sie alle nachfolgenden Schritte befolgt haben und immer noch Probleme mit Ihrem Test haben, wenden Sie sich an den Vertreter des Technischen Kundendienstes von IDEXX vor Ort.

Geräte

- Lassen Sie die Geräte regelmäßig warten.
- Kalibrieren und reinigen Sie die Pipetten.
- Kalibrieren Sie den Plattenleser.
- Reinigen und warten Sie das Waschsystem.

Reagenzien

- Kontrollieren Sie Ihre Lagerbestände—FIFO.
- Überprüfen Sie die Komponenten.
- Bringen Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur.
- Vermeiden Sie Kontaminationen.
- Überprüfen Sie die richtige Lagerung.

Technik

- Überwachen Sie die Qualität und Handhabung der Proben.
- Überprüfen Sie die Vorbereitung der Reagenzien.
- Überprüfen Sie, ob die Proben ausreichend durchmischt werden.
- Überprüfen Sie, ob korrekt pipettiert wird.
- Überprüfen Sie die Zeitplanung—gleichzeitige Tests mit mehreren Platten.
- Überprüfen Sie das Waschen der Testplatten.
- Verwenden Sie interne Kontrollen—dokumentieren Sie die Ergebnisse.

Sonstiges

- Überwachen Sie die Labortemperatur.
- Verwenden Sie sterile Einweg-Artikel und Gefäße.
- Überwachen Sie die Leistung des Tests.

IDEXX Laboratories, Inc.

Weltweiter Hauptsitz
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Tel.: +1 207 556 4890 oder
+1 800 548 9997
Fax: +1 207 556 4826 oder
+1 800 328 5461

IDEXX Europe B.V.

Hauptsitz Europa
Scorpius 60 Building F
2132 LR Hoofddorp
Niederlande

Tel: +31 23 558 70 00 oder
+800 727 43399
Fax: +31 23 558 72 33

IDEXX Laboratories, Inc.

Hauptsitz Asien
3F-5 No. 88, Rei Hu Street
Nei Hu District
11494 Taipei
Taiwan

Tel: +886 2 6603 9728
Fax: +886 2 2658 8242

IDEXX Brasil

Hauptsitz in Brasilien
1478 Av. Brig. Faria Lima
São Paulo, SP
Brasilien

Tel.: +55 11 3095-5632
Fax: +55 11 3095-5641

Test with Confidence™

