

Test With Confidence™

# ELISA Technisches Handbuch





---

## Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung
- 2 ELISA Technologie
- 3 ELISA Komponenten
- 5 Ausrüstung für den ELISA
- 6 Wartung und Kalibrierung der Geräte
- 7 Handhabung und Vorbereitung der Reagenzien
- 8 Handhabung und Vorbereitung der Kit Komponenten
- 9 Qualitätskontrolle
- 10 Handhabung der Proben
- 12 Pipettiermethoden
- 15 Zeitmanagement
- 16 Waschen der ELISA Mikrotiterplatten
- 18 Ablesen der Platten und Datenmanagement
- 19 ELISA Fehlerbehebung
- Anhänge**
- 23 **A** Gravimetrische Methode zur Pipettenkalibrierung
- 24 **B** Lagerkontrollblatt
- 25 **C** Laborkontrollblatt
- 26 **D** Wartungs- und Kalibrierungsplan
- 27 **E** Qualitätskontrolle Quick Check



---

## Einleitung

IDEXX stellt diagnostische Tests für den Nachweis von Krankheiten bei Wiederkäuern, Pferden, Schweinen und Geflügel her.

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine der sensitivsten und reproduzierbarsten diagnostischen Methoden. Die Assays sind schnell, einfach durchführbar und leicht automatisierbar. IDEXX führte den ersten kommerziellen Geflügel-ELISA zum Nachweis der infektiösen Bursitis (IBD) 1985 ein, und 1986 den ersten kommerziellen Nutztier-ELISA zum Nachweis der Aujeszky'schen Krankheit/Pseudowut. IDEXX ermöglicht den Labors damit die Etablierung einer qualitativ hochstehenden Diagnostik im Bereich der Nutztiermedizin.

Wie bei jedem Assay hängt die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit eines ELISA von der richtigen Technik und der detailgenauen Testdurchführung ab. Dieses technische Handbuch zum ELISA informiert Sie über die Grundlagen der ELISA Techniken und hilft Ihnen dabei, Ihre Kenntnisse der Methodik auf dem aktuellen Stand zu halten.

Spezifische Instruktionen für die einzelnen von Ihnen durchgeführten Assays finden Sie in der Packungsbeilage. Die Kits und die Packungsbeilagen werden immer wieder verbessert oder verändert. Daher ist es wichtig, das Testprotokoll regelmässig zu überprüfen. Bei Fragen zu den nun folgenden Informationen wenden Sie sich bitte an den IDEXX Technischen Service (Tel: 00800 727 43399, Fax: 00800 433 99329) oder besuchen Sie uns auf unserer Website [idexx.de/NutztierundGeflügel](http://idexx.de/NutztierundGeflügel).

## ELISA Technologie

### Der ELISA ermöglicht:

- Die gleichzeitige Untersuchung einer grossen Probenzahl
- Eine Automatisierung durch Roboter oder andere automatisierte Geräte
- Den Einsatz von Computern für die Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

Der ELISA ist ein schnelles Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen. Die Methode kann zum Nachweis einer Vielzahl von Infektionserregern bei Geflügel und landwirtschaftlichen Nutztieren eingesetzt werden.

Bei der ELISA Technologie besteht die feste Phase, die sog. „solid phase“ aus einer mit 96 Vertiefungen („wells“) ausgestatteten Polystyrolplatte, jedoch können auch andere Materialien für die Platte verwendet werden. Die Funktion der „solid phase“ ist die Bindung von Antigenen oder Antikörpern in der Probe an die Platte. Nach der Inkubation der Proben werden die Platten gewaschen, um alles ungebundene Material zu entfernen. Bei vielen Assays erfolgt anschliessend direkt die Zugabe des Konjugats und dessen Inkubation.

Das Konjugat besteht aus einem mit einem Enzym gekoppelten (enzymmarkierten) Antigen oder Antikörper. Je nach Art des Assays bindet der immunologisch reaktive Teil des Konjugats entweder an die „solid phase“ oder aber an die Probe. Die Enzymkomponente des Konjugates ermöglicht den Nachweis.

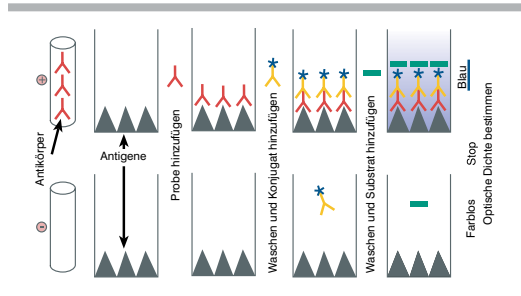
Die Platten werden erneut gewaschen und es wird ein Enzymsubstrat (Wasserstoffperoxid und ein Chromogen) hinzugegeben. Anschliessend folgt eine erneute Inkubation. Bei Vorhandensein eines gebundenen Enzyms zeigt sich in den Vertiefungen der Platte eine Farbentwicklung. Die optische Dichte der Färbung wird mithilfe eines ELISA Reader abgelesen.

### ELISA-Formate

Es gibt drei verschiedenen ELISA-Formaten - direkt, indirekt und Antigen-Capture (Sandwich) ELISA. Mit jedem Format können auch kompetitive ELISA's entwickelt werden.

Im nächsten Abschnitt werden die folgenden Formate etwas genauer vorgestellt: indirekter ELISA, indirekter Sandwich ELISA und ein indirekter kompetitiver (blocking) ELISA.

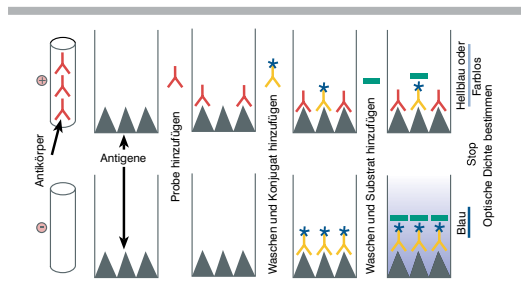
### Verfahrensschritte des Indirekten ELISA



### Indirekter ELISA

Beim indirekten ELISA wird der in der Probe enthaltene Antikörper zwischen einem an die Platte gebundenen Antigen und einem enzymmarkierten, anti-Speziesglobulinkonjugat gebunden. Durch Hinzufügen eines Enzymsubstrat-Chromogenreagenz entsteht eine Färbung. Diese Färbung ist proportional zur Menge der aus der Probe gebundenen Antikörper. Je mehr Antikörper die Probe enthält, desto intensiver ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen. Diese Art des ELISA ist geeignet für die Bestimmung von Antikörpertitern in Proben (NDV Ak, B. abortus Ak, etc.).

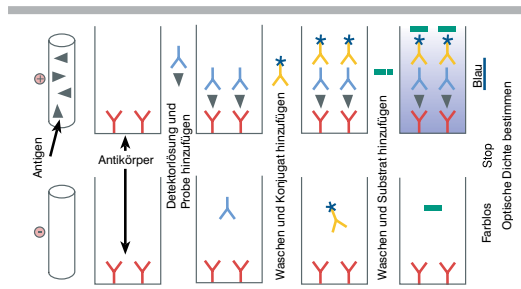
### Verfahrensschritte des Kompetitiven ELISA



### Kompetitiver (blocking) ELISA

Bei dieser Art des ELISA konkurrieren die spezifischen Antikörper in der Probe mit dem enzymmarkierten, spezifischen Antikörper im Konjugat bzw. blockieren diesen. In der Grafik wird als Beispiel ein indirekter kompetitiver ELISA gezeigt. Wie man sehen kann bindet der Antikörper in der Probe, sowie auch das Konjugat an das an die Platte gebundene Antigen. Durch Hinzufügen eines Enzymsubstrat-Chromogenreagenz entwickelt sich eine Färbung. Diese Färbung ist umgekehrt proportional zu der Menge der gebundenen Antikörper in der Probe. Je mehr Antikörper in der Probe vorhanden sind, desto weniger intensiv ist die Farbentwicklung in den Testvertiefungen.

### Verfahrensschritte des Indirekten Antigen-Capture ELISA



### Indirekter Antigen-Capture (Sandwich) ELISA

Beim indirekten Antigen-Capture ELISA wird das Antigen in der Probe von dem an die Platte gebundenen Antikörper und dem Detektor-Antikörper, der sich in der zugegebenen Detektorlösung befindet, gebunden. Die Detektor-Antikörper sind nicht Enzym-markiert. Das im nächsten Schritt zugegebene Konjugat kann an den Antikörper der Detektorlösung binden. Falls Konjugat an die Detektorlösung binden konnte, wird eine Farbreaktion stattfinden. Das Antigen wird somit indirekt detektiert.

## ELISA Komponenten

Ein ELISA ist ein speziell für einen spezifischen Test hergestellter, standardisierter Satz aus Reagenzien und Mikrotiterplatten. Ein IDEXX ELISA kann einige oder alle der folgenden Komponenten enthalten: beschichtete Mikrotiterplatten, Probenverdünner, Kontrollen, Waschkonzentrat, Konjugat, Substrat und Stopplösung. Die Tests werden in Chargen hergestellt. Die Komponenten jeder einzelnen Charge werden optimiert und in der Herstellung so aufeinander abgestimmt, dass die Funktion des Tests als Einheit optimal ist. Bevor die Tests zugelassen und für den Verkauf freigegeben werden, durchlaufen sie eine Vielzahl an Qualitätskontrollen, die durch IDEXX, verschiedene Referenzlaboratorien und/oder die USDA (US Department of Agriculture) durchgeführt werden.

**ANMERKUNG:** Verwenden Sie keine Komponenten aus unterschiedlichen Chargen.

IDEXX Tests werden in Chargen nach strengen Qualitätsstandards hergestellt. Jede Komponente und jedes Reagenz in einer einzelnen Testcharge ist so optimiert, dass es mit den übrigen im Test enthaltenen Reagenzien optimal reagiert. Die Qualitätskontrollen beinhalten die Bestimmung von Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit. Deshalb ist es sehr wichtig, Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht untereinander zu mischen.



Alle Komponenten haben ein Haltbarkeitsdatum

## ELISA Komponenten (Fortsetzung)

### Beschichtete Platten

Die 96er Mikrotiterplatten aus Polystyrol werden entweder mit inaktiviertem Antigen oder mit Antikörpern beschichtet. Die beschichteten Antigene bzw. Antikörper sind Bindungsort für die Antikörper bzw. Antigene in der Probe. Nicht gebundene Antikörper oder Antigene in der Probe werden durch den auf die Inkubation folgenden Waschvorgang entfernt.

### Probenverdünner

Für die meisten ELISA Test Kits ist eine spezifische Verdünnung der Probe notwendig. Die Proben werden mit einem Probenverdünner verdünnt und durchmischt, bevor sie auf die Platten pipettiert werden.

### Kontrollen

Als Positivkontrolle dient eine Lösung, die Antikörper oder Antigen enthält. Eine Lösung ohne Antikörper oder Antigen dient als Negativkontrolle. Die Kontrollen werden für die Normalisierung bzw. Standardisierung jeder Mikrotiterplatte eingesetzt. Kontrollen werden ausserdem dazu verwendet, den Assay zu validieren und die Testergebnisse zu berechnen. Die meisten Kits enthalten fertig vorverdünnte Kontrollen. Stellen Sie sicher, dass Sie die Instruktionen in der Packungsbeilage befolgen.

### Konjugat

ELISA Konjugate sind enzymmarkierte Antikörper oder Antigene, die spezifisch mit den plattengebundenen Probenanalyten reagieren. Ungebundenes Konjugat wird nach der Inkubation, d.h. vor der Zugabe von Substrat, durch Waschen entfernt.

### Substrat

Das Substrat ist eine Mischung aus Wasserstoffperoxid und einem mit dem Enzymanteil des Konjugats reagierenden Chromogen. Aus dieser Reaktion resultiert die Farbbildung.

### Waschkonzentrat

Das Waschkonzentrat ist eine Pufferlösung mit einem Detergens zur Entfernung (Auswaschung) ungebundener Materialien von den Platten.

### Stopplösung

Die Stopplösung beendet die Enzym-Substrat-Reaktion und damit auch die Entwicklung der Farbveränderung.



## Ausrüstung für den ELISA

Es ist eine grosse Auswahl an Laborgeräten verfügbar. Vor dem Kauf eines Readers kontaktieren Sie bitte den Technischen Kundendienst von IDEXX damit sichergestellt ist, dass die xChekPlus\* Software über das richtige Benutzeroberfläche verfügt.



Mehrkanalpipette und Einkanalpipette



Halbautomatisches Waschsysteem



Reader

Laborgeräte zur Durchführung von ELISAs sind von mehreren Hersteller erhältlich. Plattenleser (sogenannte Reader), Waschautomaten und Pipetten gibt es sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Testdurchführung. Die Auswahl von Gerätschaften beeinflussende Faktoren sind beispielsweise die Anzahl und die Art der durchzuführenden Tests, Art und Anzahl der Proben, der Ausbildungsstand von Mitarbeitern und finanzielle Überlegungen. Im folgenden finden Sie eine kurze Darstellung der für ELISA Tests verfügbaren Ausrüstung.

### Pipetten

- Einkanalpipetten mit festem oder einstellbarem Volumen (1–20  $\mu$ l, 10–100  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l, etc.)
- Mehr-/Multikanalpipetten, 8- und 12-Kanalpipetten
- Halbautomatisierte Dispenser
- Vollautomatische Systeme für das gleichzeitige Pipettieren auf mehrere Platten

### Verdünner

- Einkanal
- Mehrkanal
- Automatisierte Dispenser

### Waschsysteme

- Manuelle Systeme, die jeweils eine Reihe oder Spalte waschen
- Halbautomatisierte Systeme, die jeweils einen Mikrotiterstreifen oder eine Mikrotiterplatte waschen
- Vollautomatische Systeme für das gleichzeitige Waschen mehrerer Platten

### ELISA Reader

- Manuelle Plattenleser, die jeweils eine Reihe oder Testvertiefung ablesen
- Halbautomatische Systeme, die jeweils eine Platte ablesen
- Vollautomatische Systeme für das gleichzeitige Ablesen mehrerer Platten

### Andere

- Feuchtigkeitskammer (nicht für alle ELISA notwendig)
- Versiegelungen für Assays mit langen Inkubationszeiten (zur Vermeidung von Verdunstung)
- Inkubatoren oder Plattenschüttler (nicht für alle ELISAs nötig)

Stellen Sie sicher, dass ihre Pipetten mit dem Datum der Kalibrierung gekennzeichnet werden und führen Sie Buch über die Kalibrierung und die Wartung Ihrer gesamten Ausrüstung.



Pipette mit Kalibrierungsaufkleber

## Wartung und Kalibrierung der Geräte

Die Wartung und Kalibrierung Ihrer Laborgeräte ist im Hinblick auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von grösster Wichtigkeit.

Der Wartungs- und Kalibrierungsplan (Anhang D) sollte als Richtlinie verwendet werden. Passen Sie die Wartungsmassnahmen jedoch an die Anzahl der täglich in Ihrem Labor durchgeführten Tests an. Befolgen Sie stets die Anweisungen der jeweiligen Hersteller.

### Kalibrierungsprotokolle

Alle Laborgeräte müssen zu jedem Zeitpunkt korrekt kalibriert sein. Nicht kalibrierte Geräte können falsche oder ungenaue Testergebnisse zur Folge haben. Befolgen Sie die im Wartungs- und Kalibrierungsplan (Anhang D) und die durch den jeweiligen Hersteller angegebenen Kalibrierungsprotokolle und -intervalle.

### Optionen für das Kalibrieren von Pipetten

- Führen Sie die in Anhang A beschriebene gravimetrische Methode durch.
- Verwenden Sie ein kommerzielles, automatisches Kalibrierungssystem wie z.B. das durch die Firma Artel hergestellte PCS®. Weitere Informationen finden Sie in Anhang A, Gravimetrische Methode zur Pipettenkalibrierung.
- Schicken Sie die Pipette an den Hersteller ein; beachten Sie die Angaben in der Bedienungsanleitung.
- Schicken Sie die Pipette an einen Pipettenkalibrierungsservice.

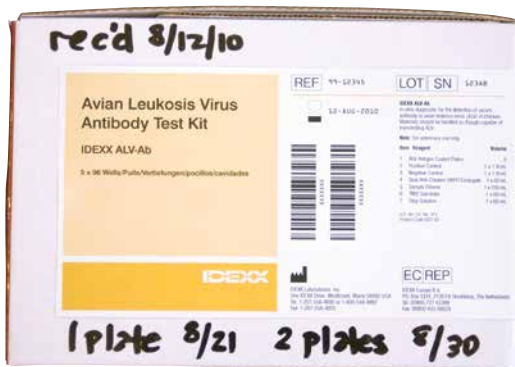
Das Einsenden von Pipetten ist dann nützlich, wenn eine Reparatur oder Wartung erforderlich ist, ermöglicht aber nur eine begrenzte Qualitätskontrolle. Letztere kann verbessert werden, wenn Sie die Pipetten selbst kalibrieren.

Die verwendete Pipettiertechnik und die Laborumgebung sind zwei kritische, die tatsächliche Leistung einer Pipette beeinflussende Variablen. 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.

## Handhabung und Vorbereitung der Reagenzien

### Eingang von Kits

Wenn Sie Ihre ELISA Tests bestellt haben und diese geliefert werden, sollten Sie das Eingangsdatum auf dem Lagerkontrollblatt (Anhang B) und auf den Paketen dokumentieren. Prüfen Sie die Tests auf Transportschäden und lagern Sie sie bei 2–8°C. Wenn Sie Tests aus Ihrem Lagerbestand verwenden, sollten Sie die sogenannte FIFO-Methode (first in – first out) verwenden. Bei dieser Methode werden die ältesten (oder bald ablaufenden) Tests zuerst verwendet. Die einzelnen Testkomponenten haben eventuell eine längere Haltbarkeit als aussen auf der Box angegeben. Orientieren Sie sich trotzdem immer an der aussen angegebenen Haltbarkeitsdauer. Wenn Sie nur Teile des Tests verwenden, sollten Sie auf dem äusseren Aufkleber das Datum des Anbruchs eintragen, und danach alle weiteren Daten, an denen der Test erneut geöffnet wurde. Auf diese Weise können Sie nachverfolgen, wie oft der Test aus dem Kühlschrank in einen Raum mit normaler Raumtemperatur verbracht wurde. Halten Sie die Anzahl solcher Entnahmen aus der Kühlung wo immer möglich in Grenzen, indem Sie grössere Mengen an Proben untersuchen (oder aber die Proben sammeln).



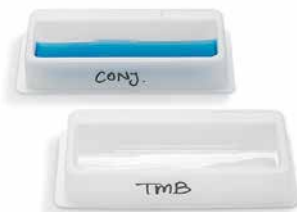
Kennzeichnen Sie Ihren Kit mit dem Eingangsdatum.

### Allgemeine Handhabung von Reagenzien

Informieren Sie sich mithilfe der Packungsbeilage über die Richtlinien zur Handhabung und Vorbereitung der Reagenzien. Für einige Tests wird empfohlen, alle Reagenzien und Platten vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (18–26°C) zu bringen; bei anderen müssen nur bestimmte Reagenzien bei Beginn der Durchführung Raumtemperatur besitzen. Nehmen Sie die auf Raumtemperatur (18–26°C) zu bringenden Tests aus dem Kühlschrank und nehmen Sie alle Testkomponenten aus der Box. Lassen Sie die Testkomponenten vor der Durchführung für mindestens 2–3 Stunden bei Raumtemperatur stehen.

Verwenden Sie für das Abmessen sämtlicher Reagenzien ausschliesslich sterile bzw. saubere Gefässe. Messen Sie nur soviel Reagenz ab, wie für die Anzahl der für den Test verwendeten Mikrotiterplatten notwendig ist. Hierdurch sichern Sie die Integrität der Reagenzien. Giessen Sie Reagenzien niemals in die Vorratsflaschen zurück. Zur Minimierung des Risikos einer Kontamination empfehlen wir Ihnen für die Handhabung der Reagenzien ausdrücklich die Verwendung von Einmalpipetten und Einmalgefässen. Sollten Sie sich für wiederverwendbares Material entscheiden, benutzen Sie bitte separate Gefässe und Pipettenspitzen für jedes Reagenz und stellen Sie sicher, dass eine entsprechende Beschriftung erfolgt. Nach jedem Gebrauch sollten ausserdem die Vertiefungen mit entionisiertem oder destilliertem Wasser gewaschen und gründlich gespült werden. Wechseln und entsorgen Sie Einmalartikel so häufig wie möglich. Verwenden Sie niemals dieselben Gefässe für Konjugat und Substrat, auch wenn diese gewaschen wurden.

Eine Kontamination von Reagenzien kann Ihre Testergebnisse gefährden. Die Kennzeichnung Ihrer für die Handhabung von Reagenzien verwendeten Geräte und die Verwendung separater Geräte für die verschiedenen Reagenzien vermindert das Kontaminationsrisiko.



Gekennzeichnete Gefässe

Spezifische Angaben zu dem jeweiligen von Ihnen verwendeten Tests 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.



Teilweise verwendete Platten müssen gekennzeichnet, versiegelt und in einem separaten, mit Trockenmittel bestückten Beutel aufbewahrt werden.

## Handhabung und Vorbereitung der Kitkomponenten

### Mikrotiterplatten

Die meisten Mikrotiterplatten werden in wiederverschliessbaren Beuteln geliefert, denen ein Trockenmittel beige packt ist. Wird nur ein Teil einer Platte verwendet, aspirieren Sie bitte sämtliche in den benutzten Testvertiefungen befindliche Flüssigkeit und decken Sie die benutzten Vertiefungen mit Versiegelungsklebeband ab. Lagern Sie diese Platte mit mehreren Trockenmittelpäckchen in einem wiederverschliessbaren Beutel.

### Probenverdünner und Waschkonzentrat

Stellen Sie sicher, dass der Probenverdünner und das Waschkonzentrat vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18–26°C) gebracht wurden. Probenverdünner und Waschkonzentrat stellen meist die grössten Flaschen im Kit dar und brauchen daher am längsten für die Erwärmung auf Raumtemperatur. Zeigt das Waschkonzentrat auch nach Erreichen der Raumtemperatur noch eine Kristallbildung, dann mischen Sie es einige Male durch Inversion.

### Kontrollen

Die meisten Kits enthalten vorverdünnte Kontrollen. Einige müssen jedoch in gleicher Weise wie die Probe verdünnt werden. Kontrollen sollten mit derselben Methode zeitgleich mit den Proben auf die Platte pipettiert werden.

### Konjugat

In Fällen, in denen der Kit die Herstellung einer „aktiven“ Konjugatlösung erfordert, folgen Sie bitte genau der Anleitung. Bereiten Sie nur soviel Konjugat vor wie unmittelbar notwendig, und lagern Sie keine Konjugatreste für eine zukünftige Verwendung. Kontaminierte oder unsachgemäss gelagerte Konjugatlösungen können ihre enzymatische Aktivität verlieren oder eine Hintergrundfärbung verursachen. Die meisten Kits enthalten jedoch gebrauchsfertiges Konjugat.

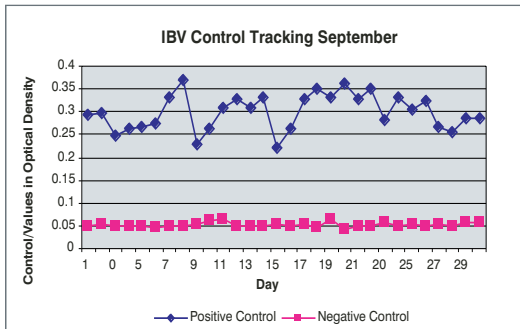
### Substrat

Unsere ELISA Testkits enthalten gebrauchsfertiges Substrat. Die chemische Aktivität des Substrats wird durch Lichteinwirkung oder Kontakt mit Metall gefährdet. Schützen Sie die Lösung durch Aufbewahrung in einem dunklen Behälter.

### Stopplösung

Verwenden Sie ausschliesslich die im Kit enthaltene Stopplösung. Befolgen Sie alle Sicherheitsanweisungen in der Packungsbeilage. Vor Verwendung der Stopplösung muss diese auf Raumtemperatur erwärmt werden. Sollte die Stopplösung nach dem Erreichen der Raumtemperatur eine Kristallbildung zeigen, mischen Sie sie einige Male durch Inversion. Bei niedrigeren Temperaturen kann die Stopplösung auskristallisieren. Stellen Sie vor der Verwendung sicher, dass die Stopplösung vollständig gelöst und klar ist.

## Qualitätskontrolle



Laborkontrollblatt für Kontrollen

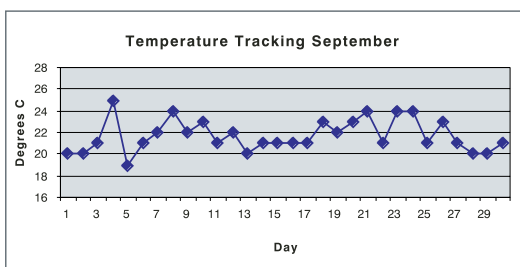
### Laborinterne Kontrollen

Für das Monitoring der Durchführung der ELISAs in Ihrem Labor und der Kontrolle der von Ihnen verwendeten Tests empfehlen wir Ihnen eine laborinterne Kontrolle.

Da Serumproben im allgemeinen in kleinen Mengen eintreffen, müssen die Kontrollen mit gepoolten Proben durchgeführt werden. Sammeln Sie negative und positive Proben getrennt. Sobald ausreichende Mengen vorhanden sind, werden ähnliche Proben gepoolt. Mischen Sie die gepoolten Proben gründlich. Mit kleinen Mengen sollte die serielle Verdünnung positiver Serumproben mit negativem Serum erfolgen. Testen Sie jede Verdünnungsstufe nach der Standardtestanweisung (selbe Verdünnung wie in der Packungsbeilage des Tests). Wählen Sie diejenige Verdünnung 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 grosse Mengen dieser Verdünnungsstufe her. 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. Aliquotieren Sie eine kleine Menge der frisch angesetzten laborinternen Kontrolle (ausreichendes Volumen für 1–2 Tests) in luftdichte Gefässe, beschriften und datieren Sie diese und lagern Sie sie möglichst tiefgefroren bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dokumentieren Sie den Ansatz in einem Laborbuch.

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 Mikrotiterplatte neben den Testkontrollen mitlaufen. Frieren Sie Ihre laborinterne Kontrolle nicht wieder ein. Eine Lagerung über 3–5 Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  ist möglich.

Zur Beurteilung fraglicher Resultate sollten Sie die im Labor herrschende Temperatur messen und in ein Temperaturkontrollblatt eintragen.



Labortemperaturkontrollkarte

Dokumentieren Sie Ihre Ergebnisse auf dem Laborkontrollblatt (Anhang C) und zeichnen Sie den Verlauf auf oder benutzen Sie den Bericht zum Kontrollverlauf in der xChekPlus\* Software. Jede Variation und jeder Trend sollte Sie dazu veranlassen, Ihre Technik und Ihre Massnahmen zur Qualitätskontrolle einer Prüfung zu unterziehen.

### Temperaturüberwachung

ELISA Tests reagieren empfindlich auf Temperaturschwankungen. Versuchen Sie daher, die Temperatur im Labor zwischen  $18^{\circ}$  und  $26^{\circ}\text{C}$  zu halten. Vermeiden Sie die Durchführung von ELISAs unter oder in Nähe von Ventilatoren, da dies eine starke Abkühlung, Aufwärmung und/oder Verdunstung zur Folge haben kann. Führen Sie ferner keine Tests in direktem Sonnenlicht durch, da sich die Tests erhitzen können und ausserdem eine starke Verdunstung eintritt. Kalte Arbeitsflächen können Ihren ELISA Testkit ebenfalls beeinträchtigen, eine gute Massnahme stellt in solchen Fällen das Unterlegen mehrerer Schichten von Papiertüchern oder aber eines anderen isolierenden Materials unter die Platten während der Inkubationsphase dar.

Protokollieren und kontrollieren Sie die Temperatur während der Arbeit im Labor. 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 Mikrotiterplatten zu empfehlen. Durch Einsatz von ELISA Mikrotiterplattendeckeln lassen sich Verdunstungen und versehentliche Verschüttungen vermeiden.

### Qualitätskontroll-Check

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

#### Fleischsaftprobe

Entnehmen Sie die Probe im gekennzeichneten Bereich.



#### Blutprobe

Entnehmen Sie die Probe im gekennzeichneten Bereich.



#### Milchprobe

Entnehmen Sie die Probe im gekennzeichneten Bereich.



## Handhabung von Proben

### Qualität eingesandter Proben

Die Qualität der Probe kann einen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse haben. Die meisten Labs 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 anderen Proteine negativ beeinflussen und ist deshalb unerwünscht. Wenn die Probenqualität zu schlecht ist, ist die Anforderung einer frischen Probe sehr zu empfehlen, sofern dies möglich ist.

### Serum-/Plasmaproben

Bei Serumproben hat eine geringgradige Hämolyse (hellrote Farbe) oder mittelgradige Lipämie (milchiges Aussehen) in der Regel nur wenig oder gar keinen Einfluss auf die Ergebnisse des ELISA. Vermeiden Sie jedoch die Testung von stark hämolytischen (dunkelroten) oder stark lipämischen Proben. Lesen Sie die entsprechenden Angaben in der Packungsbeilage. Bei geronnenem Serum muss darauf geachtet werden, dass kein geronnenes Material oder Blutzellen aspiriert werden.

### Fleischsaftproben

Fleischsaftproben sollten so sauber wie möglich sein. Entfernen Sie vor dem Pipettieren Gewebeteile und Fette.

### Milchproben

Bitte beachten Sie die Packungsbeilage um zu überprüfen, ob Vollmilchproben für den Test verwendet werden können oder nicht. Falls keine Vollmilchproben zugelassen sind, können Vollmilchproben erst nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2000x g verwendet werden. Alternativ können die Proben über Nacht auch im Kühlschrank (2–8°C) abstehen. Die für den ELISA verwendete Probe sollte aus dem Bereich unterhalb der Rahmschicht entnommen werden. Die Probeentnahme kann je nach Region sehr unterschiedlich erfolgen. In einigen Regionen wird die Vollmilchprobe zuerst gemischt, bevor die Probe gezogen wird.

### Eigelproben

Die Proben sollten mit einer sauberen Tuberkulinspritze entnommen und die verdünnten Proben durch Vortexen gründlich durchmischt werden.

### Andere Probenarten

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

## Handhabung von Proben (Fortsetzung)

Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren, da die in der Probe enthaltenen Antikörper oder Antigene hierdurch geschädigt werden können. Wir empfehlen ein maximal 3-5maliges Auftauen/Wiedereinfrieren.

Leichte Hämolyse



Starke Hämolyse



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



### 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 3–5 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, letzteres 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 nahezu immer gefährdet.

### Verwendung tiefgefrorener Proben

Tiefgefrorene Proben können bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufgetaut werden. Alle tiefgefrorenen Proben müssen nach dem Auftauen vor der Verdünnung gründlich durchmischt werden um sicherzustellen, dass alle Proteine gleichmäßig in der Probe verteilt sind. Mischen Sie die Probe vorsichtig durch Vortexen oder Invertieren für mindestens 5 Minuten. Schaumbildung oder ein zu starkes Mischen von Proben führt zu einer Denaturierung der Serumproteine.

## Pipettiermethoden

Verwenden Sie das Vorwärtspipettieren für die Vorbereitung der Probenverdünnungen, und das reverse Pipettieren für die Zugabe von verdünnten Proben, Kontrollen und Reagenzien.

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

Verwenden Sie das Vorwärtspipettieren für die Vorbereitung der Probenverdünnungen, und das reverse Pipettieren für die Zugabe von verdünnten Proben, Kontrollen und Reagenzien.

Ein sorgfältiges Pipettieren ist entscheidend für die Genauigkeit der Testergebnisse. 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.

### Pipettieren einer Probe



Ziehen Sie das kalibrierte Probenvolumen in die Pipettenspitze auf.



Der Tropfen an der Pipettenspitze muss entfernt werden.



Streifen Sie überschüssige Flüssigkeit am Reagenzglas ab, indem Sie das Reagenzglas seitlich mit der Pipettenspitze berühren.



Prüfen Sie, ob Sie das korrekte Probenvolumen in die Pipettenspitze aspiriert haben.

### Korrektes Pipettieren



Korrekte Position zum Aufpipettieren von Reagenzien am unteren Rand der leeren Vertiefungen mit einer Multikanalpipette



Korrekte Position zum Aufpipettieren von Reagenzien in mit Flüssigkeit gefüllte Vertiefungen oberhalb des Flüssigkeitsspiegels mit einer Multikanalpipette



## Pipettiermethoden (Fortsetzung)

### Pipettiertechnik

1. Ziehen Sie das kalibrierte Probenvolumen in die Pipettenspitze auf.
2. Streifen Sie überschüssige Flüssigkeit am Reagenzglas ab, indem Sie das Reagenzglas seitlich mit der Pipettenspitze berühren.
3. Prüfen Sie, ob Sie das korrekte Probenvolumen in die Pipettenspitze aspiriert haben.

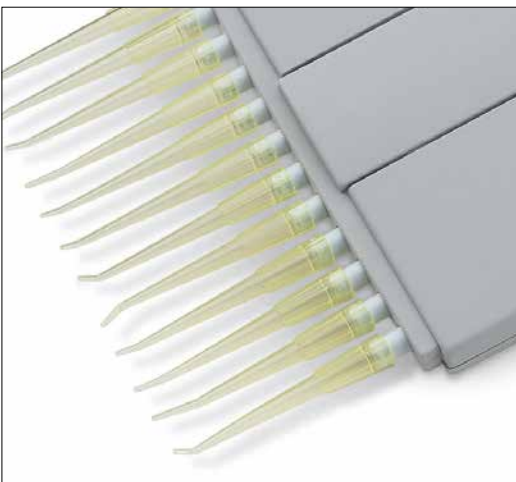
Positionieren Sie die Pipettenspitzen so am unteren Rand jeder Vertiefung, dass die Pipettenspitze Kontakt zum Plastik hat. Wenn die Vertiefungen auf der Mikrotiterplatte Flüssigkeit enthalten, wird die Pipettenspitze oberhalb des Flüssigkeitsspiegels so positioniert, dass sie ebenfalls Kontakt mit dem Plastik hat.

### Standardpipettieren (Vorwärtspipettieren) 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  $10 \mu\text{l}$  oder weniger: spülen Sie die Pipette nach dem Pipettieren der Probe in den Probenverdünner und vor Abwerfen der Pipettenspitze durch 2-3maliges Herunterdrücken des Kolbens.

7. Mischen Sie die Proben vor dem Aufpipettieren auf die Mikrotiterplatte mithilfe einer Multikanalpipette, indem Sie den Kolben 3-6mal herunterdrücken.
8. Werfen Sie die Pipettenspitze in einen Abfallbehälter ab.



Verbogene Pipettenspitzen: die Spitzen müssen ersetzt werden

## Pipettiermethoden (*Fortsetzung*)

Automatisierte Systeme verbrauchen mehr Reagenz/Volumen als halbautomatisierte. Beachten Sie die Herstellerempfehlungen für die Reinigung/Spülung und Vorbereitung Ihres Systems.

### Reverses Pipettieren (Rückwärtspipettieren) mit einer Multikanalpipette

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 etwa halbwegs zum zweiten Anschlag.
3. Ziehen Sie die Flüssigkeit langsam auf. Achten Sie dabei darauf, dass sich in der Pipettenspitze 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. Bei leeren Vertiefungen werden die Pipettenspitzen am unteren Rand der Vertiefungen so positioniert, dass sie Kontakt mit dem Plastik haben.
  - b. Bei bereits mit Flüssigkeit gefüllten Vertiefungen positionieren Sie die Pipettenspitzen oberhalb des Flüssigkeitsspiegels, wobei die Pipettenspitzen ebenfalls Kontakt zum Plastik haben.
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 Pipettenspitzen in einen Abfallbehälter ab.  
 ACHTUNG: Beim reversen Pipettieren wird mehr Reagenz/Volumen verbraucht (= „Totvolumen“).

### Automatisierte Verdünnungssysteme

Bei automatisierten Systemen und ELISAs, die mit unverdünnten Proben oder niedrigen Verdünnungsfaktoren arbeiten, kann die Probe direkt in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte 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.

## Zeitmanagement

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

### Zugabe von Proben und Kontrollen

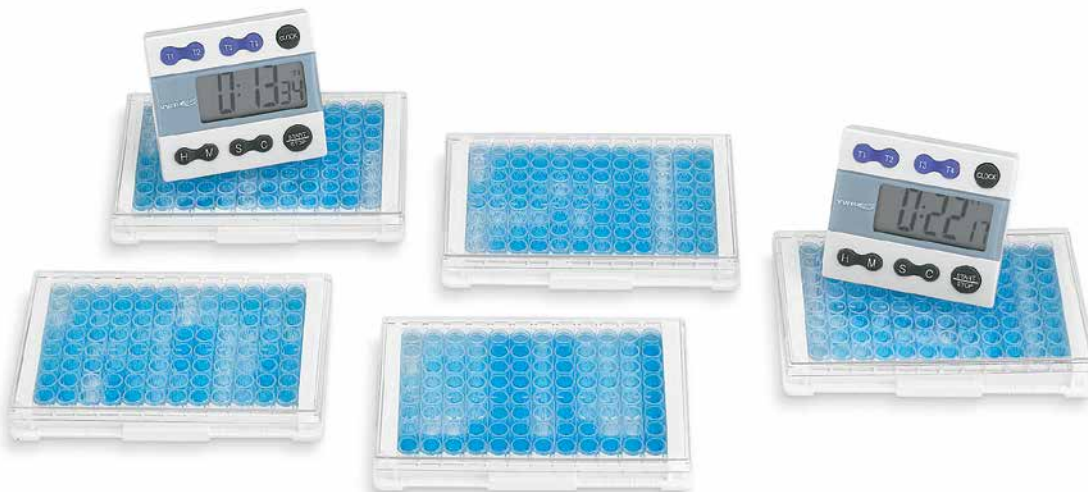
Die Inkubationszeiten für Mikrotiterplatten sollten so genau wie möglich eingehalten werden. Für gewöhnlich wird für das Aufpipettieren von Proben auf die Platte die meiste Zeit benötigt. Wenn Sie Proben auf die Platte aufpipettieren ist Schnelligkeit, d.h. die Minimierung der Zeit zwischen dem Aufpipettieren der ersten bis zur letzten Probe, ein kritischer Faktor.

Verwenden Sie möglichst eine Multikanalpipette, um die Zeitspanne des Aufpipettierens möglichst kurz zu halten. Falls das Zeitintervall zwischen dem Aufpipettieren der ersten bis zur letzten Probe zu lang wird, oder Sie während des Pipettierens unterbrochen werden, platzieren Sie eine positive Kontrolle und/oder eine laborinterne Kontrolle in die letzten Vertiefungen und vergleichen Sie die Ergebnisse mit den zu Beginn aufpipettierten Kontrollen.

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 Multikanalpipette und geben Sie die Kontrollen gleichzeitig mit den Proben auf die Platte.

### Gleichzeitiger Assay mit mehreren Mikrotiterplatten

Für die Zeitsteuerung mehrerer Platten ist es wichtig, das Zeitintervall zwischen der ersten und der letzten Platte im Auge zu behalten. Halten Sie die Anzahl von Platten klein genug, damit sich die Prozesse nicht überschneiden. Es ist nicht sinnvoll, dass Sie eine Platte bereits waschen (ausser Sie haben einen Automaten dafür), wenn gleichzeitig auf eine andere Platte Konjugat aufpipettiert werden muss. Verwenden Sie möglichst für jede Platte einen separaten Kurzzeit-/Laborwecker.



Bei gleichzeitiger Inkubation mehrerer Platten sollten Sie mehrere Kurzzeit-/Laborwecker verwenden.

## Waschen der ELISA Mikrotiterplatten

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; der Schlauch muss ausgetauscht werden



### 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. Anleitungen für die richtige Wartung finden Sie im Kapitel Wartung und Kalibrierung der Geräte dieser Anleitung (Seite 6) sowie in der Bedienungsanleitung Ihres Systems. 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 oder alternativ eine für diesen Test ausdrücklich empfohlene Waschlösung.

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

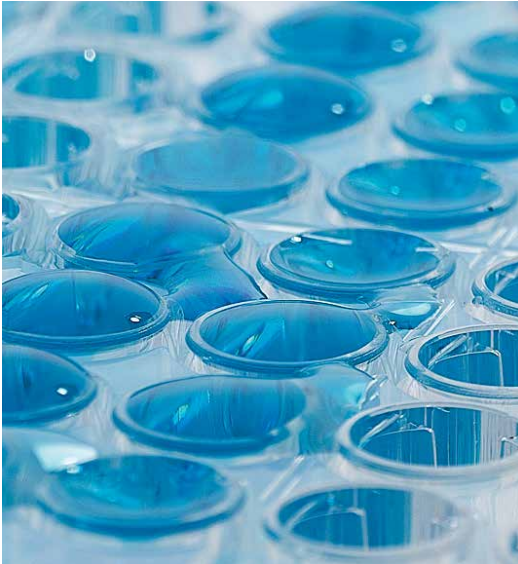
Folgen Sie den spezifischen Empfehlungen in der Packungsbeilage hinsichtlich der Anzahl von Waschvorgängen bei jedem Schritt des Assays. Die meisten ELISA Tests benötigen ungefähr 300–350  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung und Waschvorgang. Besondere Aufmerksamkeit ist bei der Befüllung von Vertiefungen oberhalb der Reagenzienspiegel geboten. Achten Sie darauf, dass die Flüssigkeit nicht über den Rand der Vertiefung überläuft. Sollte dies dennoch passieren, kann der Test ungültige Ergebnisse liefern.

Die Mikrotiterplatte darf zwischen den Waschvorgängen und unmittelbar vor Zugabe von Reagenzien auf keinen Fall austrocknen.

Nach der abschliessenden Aspiration werden verbleibende Flüssigkeitsreste auf mehreren Lagen Papiertüchern ausgeklopft.

Bei der Untersuchung von Milch, Albumin, Vollblut oder Eigelb müssen die Vertiefungen besonders sorgfältig inspiziert werden. Die genannten Proben enthalten Proteine oder Fett und sind daher manchmal schwieriger aus den Vertiefungen auszuwaschen. Es ist dann die als Maximum angegebene Anzahl an Waschvorgängen notwendig.

## Waschen der ELISA Mikrotiterplatten (Fortsetzung)



Überflutete Platte; die Kontamination anderer Vertiefungen kann die Folge sein

### 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 ausserdem länger als die ersten Vertiefungen.

Das Waschen mit einer Multikanalpipette oder einer Waschflasche sollte möglichst vermieden werden, da ein solcher Waschvorgang unzureichend ist und daher in einer starken und ungleichmässigen Hintergrundfärbung resultiert.

Vergewissern Sie sich, dass sämtliche Flüssigkeit aus den Vertiefungen abgezogen wird, indem Sie die Aspirationsnadeln tief am Rand der Vertiefungen 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 Reagenz nicht austrocknen.

Nach dem Ausklopfen der Platten werden die Papiertücher auf Farbstreife geprüft. Das Vorhandensein von Farbstreifen ist ein Hinweis auf einen nicht korrekt abgelaufenen Waschvorgang und auf Reagenzienreste in oder um die Vertiefungen.



Richtige Positionierung der Nadeln des manuellen Waschgerätes zur Abgabe von Waschlösung



Richtige Positionierung der Nadeln des manuellen Waschgerätes für die Aspiration von Flüssigkeit

## Ablezen der Platten und Datenmanagement

### Ablezen der Platten

Der letzte Schritt beim ELISA ist das Ablezen und die Interpretation der Ergebnisse. Bei den meisten ELISA Tests wird die optische Dichte (Farbintensität) mithilfe eines Spektrophotometers, das allgemein auch als Reader bezeichnet wird, bestimmt. Reader 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. Die meisten bestimmen die Absorption bei 450 nm oder 650 nm. In der Regel sind die Tests unter Verwendung eines Readers mit einem 650-nm-Filter optimiert. Es können auch andere Filter verwendet werden. Dabei ergeben sich jedoch niedrigere Werte für die Optische Dichte (OD). Die Verwendung von 630-nm- oder 620-nm-Filtern reduziert die OD-Werte für die Kontrollen und Proben, dies jedoch auf der gesamten Platte. Die Verwendung solcher alternativer Filter wird daher die Testergebnisse nicht beeinflussen.

Die Platten sollten nach Zugabe der Stopplösung so schnell wie möglich abgelesen werden. Bei zu grossen Zeitintervallen zwischen der Beendigung der Reaktion mittels Stopplösung und dem Ablezen können die Absorptionswerte eine sog. Drift (Nullpunktfehler, Nullpunktverschiebung) zeigen.

### Datenmanagement

IDEXX liefert Ihnen die xChekPlus\* Software, die Sie bei der Dokumentation und dem Management der Ergebnisse und Daten aus Ihren ELISA Tests unterstützt. Die xChekPlus\* Software ist mit den Benutzeroberflächen der meisten Reader für das Ablezen der Platten, das Senden der optischen Dichten an den Computer und zur Berechnung der Ergebnisse kompatibel. Ein Mitarbeiter des IDEXX Technischen Kundendienstes informiert Sie gern über weitere Einzelheiten dieser Software.



Die xChekPlus\* Software besitzt eine Benutzeroberfläche für den ELISA Reader

## 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 bei IDEXX oder den IDEXX Technischen Service für die Nutztier-, Geflügel- und Milchdiagnostik, Tel: 000800 727 43399, Fax: 00800 433 99329.

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

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

#### Mögliche Ursachen

Schlechte Wasserqualität des für das Waschen oder für die Vorbereitung der Waschlösung verwendeten Wassers.

Die Substratlösung ist verfallen.

Das Waschen war unzureichend oder der Waschautomat hatte eine Fehlfunktion.

Das Waschsystem ist mikrobiell kontaminiert.

Das Waschsystem war mit der falschen Waschlösung gefüllt.

Der Reader hatte eine Fehlfunktion oder war nicht korrekt eingblendet; dies ist eine mögliche Ursache für hohe OD-Werte bei gleichzeitig schwacher Farbreaktion.

Die Raumtemperatur im Labor war zu hoch oder zu niedrig.

#### Empfohlenes Vorgehen

Prüfen 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.

Vergewissern Sie sich, dass das Substrat farblos ist, bevor Sie es auf die Platte aufpipettieren.

Führen Sie versuchsweise die höchste Anzahl der für den jeweiligen Test empfohlenen Waschvorgänge durch. Stellen Sie sicher, dass mindestens 350 µl Waschlösung pro Vertiefung und Waschvorgang abgegeben werden. Prüfen Sie die Funktion des Waschsystems. Geben Sie das Waschsystem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen, oder aber die Abgabe und Aspiration von Flüssigkeit nicht korrekt funktioniert.

Entfernen Sie die mikrobielle Kontamination. Spülen Sie das System dazu zunächst mit einer verdünnten Bleichlösung (10%ig) und anschliessend mit grossen Mengen destillierten oder entionisierten Wassers. Führen Sie zuletzt einen weiteren Spülvorgang mit der für den nächsten Test zu verwendenden Waschlösung durch. Bei hochgradiger Kontamination kann ein Austausch der Schläuche notwendig sein.

Vergewissern Sie sich, dass jede Waschlösung korrekt beschriftet ist. Spülen Sie das System gründlich, bevor Sie eine andere Waschlösung auffüllen.

Prüfen Sie die Funktion des Readers mithilfe einer Kalibrierungsplatte und prüfen Sie die Ausrichtung der Lampe. Prüfen Sie falls notwendig den Einblendevorgang, und wiederholen Sie das Einblenden.

Halten Sie die Raumtemperatur konstant zwischen 18° und 26 °C. Vermeiden Sie die Durchführung von ELISA Tests in der Nähe von Wärmequellen, in direktem Sonnenlicht oder unter Ventilatoren.

## ELISA Fehlerbehebung (Fortsetzung)

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

#### Mögliche Ursachen

#### Empfohlenes Vorgehen

Die Reagenzien wurden miteinander vermischt, kontaminiert oder nicht korrekt vorbereitet.

Stellen Sie sicher, dass die richtigen Reagenzien verwendet wurden, alle Lösungen korrekt vorbereitet wurden und keine Kontamination vorliegt.

### Unzureichende Farbentwicklung (niedrige optische Dichtewerte [OD])

#### Mögliche Ursachen

#### Empfohlenes Vorgehen

Die Raumtemperatur im Labor war zu niedrig.

Halten Sie die Raumtemperatur konstant zwischen 18 und 26°C. Vermeiden Sie die Durchführung von ELISA Tests unter Lüftungsschlitzen von Klimaanlage oder in der Nähe von kalten Fenstern.

Die Waschlösung wurde nicht korrekt vorbereitet oder es wurde die falsche Waschlösung verwendet.

Stellen Sie sicher, dass die für den jeweiligen Kit empfohlene Waschlösung verwendet wird und dass die Waschlösung korrekt vorbereitet wird. Beschriften Sie alle Waschlösungen zur Vermeidung von Verwechslungen.

Das Waschsystem ist mikrobiell kontaminiert.

Entfernen Sie die mikrobielle Kontamination. Spülen Sie das System dazu zunächst mit einer verdünnten Bleichlösung (10%ig) und anschliessend mit grossen Mengen destillierten oder entionisierten Wassers. Führen Sie zuletzt einen weiteren Spülvorgang mit der für den nächsten Test zu verwendenden Waschlösung durch. Vergewissern Sie sich, dass jede Waschlösung korrekt beschriftet ist. Spülen Sie das System gründlich, bevor Sie eine andere Waschlösung auffüllen.

Es wurden zu viele Waschzyklen durchgeführt.

Führen Sie nicht mehr Waschvorgänge durch als empfohlen. Führen Sie versuchsweise das für den Assay empfohlene Minimum an Waschzyklen durch.

Die Inkubationszeiten waren zu kurz.

Beachten Sie die empfohlenen Inkubationszeiten. Überwachen Sie die Zeiten für jede Platte individuell, damit die Inkubationszeiten genau eingehalten werden.

Die Reagenzien und die Mikrotiterplatten waren zu kalt.

Vergewissern Sie sich, dass Platten und Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden, indem Sie den Test mindestens 2-3 Stunden vor Beginn der Testdurchführung aus dem Kühlschrank nehmen und die Kitkomponenten auspacken.

Die Reagenzien waren abgelaufen oder wurden aus Packungen mit einer anderen Chargennummer entnommen.

Prüfen Sie die Haltbarkeitsdaten und die Chargennummern der Reagenzien.

Es wurde das falsche Konjugat verwendet, die Konjugatlösung wurde falsch vorbereitet oder ist verfallen.

Prüfen Sie, ob das mit dem Test mitgelieferte Konjugat verwendet wurde. Alle Konjugate sind test- und chargenspezifisch. Wenn die Vorbereitung einer aktiven Konjugatlösung erforderlich ist, stellen Sie sicher, dass korrekte Volumina von Konzentrat und Verdünner verwendet werden. Bereiten Sie die aktive Konjugatlösung 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 niemals in die Vorratsflasche zurückgegossen werden.



## ELISA Fehlerbehebung (Fortsetzung)

### Unzureichende Farbentwicklung (niedrige optische Dichtewerte [OD])

#### Mögliche Ursachen

Die Mikrotiterplatte wurde bei der falschen Wellenlänge abgelesen, oder der Reader funktionierte nicht korrekt.

Die positive Kontrolle wurde fälschlicherweise verdünnt. (nur indirekter ELISA).

Der Test funktioniert nicht mehr richtig.

Die Mikrotiterplatten waren nicht einwandfrei oder wurden schon einmal benutzt.

#### Empfohlenes Vorgehen

Prüfen Sie, ob die korrekte Wellenlänge für den jeweiligen Test eingestellt ist und lesen Sie die Platte erneut ab. Prüfen Sie die Kalibrierung des Readers und die Ausrichtung der Lampe.

Verdünnen Sie die Kontrollen nur dann, wenn dies in der Packungsbeilage ausdrücklich vorgeschrieben wird.

Prüfen Sie anhand der Unterlagen, wie oft das Test aus der Kühlung entnommen wurde. Finden Sie heraus, ob das Test zu lange auf der Lagerrampe oder in einem anderen Bereich gestanden hat oder ob er extremen Temperaturen ausgesetzt war.

Stellen Sie sicher, dass die Mikrotiterplatten zwecks Stabilisierung in mit einem Trockenmittel versehenen, versiegelten Beuteln gelagert werden. Verhindern Sie Kondensation, indem Sie die verpackten Platten auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Bei Verwendung von Teilen einer Platte sollten die benutzten Vertiefungen beschriftet werden, um eine versehentliche Wiederbenutzung zu verhindern; verschliessen Sie die Vertiefungen mit Versiegelungsklebeband und verwenden Sie den Rest der Vertiefungen baldmöglichst. Teilbenutzte Platten dürfen nicht zusammen mit anderen Platten gelagert werden. Fügen Sie dem Lagerbeutel Trockenmittel bei.

### Wiederholungen innerhalb einer Platte zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit

#### Mögliche Ursache

Das Aufpipettieren von Proben, Kontrollen oder Reagenzien auf die Mikrotiterplatte hat zu lange gedauert.

Die Multikanalpipette hatte eine Fehlfunktion.

Der Waschvorgang war ungleichmässig oder das Waschsysteem hatte eine Fehlfunktion.

Die Verteilung von Antikörpern in der Probe war ungleichmässig.

#### Empfohlenes Vorgehen

Alle Materialien sollten für einen schnellen Gebrauch bereitgestellt werden. Verwenden Sie für das simultane Pipettieren von Reagenzien in multiple Vertiefungen eine Multikanalpipette. Stellen Sie die Proben neben die Kontrollen und pipettieren Sie die Kontrollen und Proben gleichzeitig auf die Platte auf.

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.

Überprüfen Sie die Funktionalität des Waschsystems. Geben Sie das Waschsysteem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen, oder aber die Abgabe und Aspiration von Flüssigkeit nicht korrekt funktioniert.

Aufgetaute oder gekühlte Proben müssen vor der Verdünnung durchmischt werden. Verdünnte Proben müssen ebenfalls durchmischt werden, bevor sie auf die Platte aufpipettiert werden.

## ELISA Fehlerbehebung (Fortsetzung)

### Fehlende Farbentwicklung

#### Mögliche Ursachen

Die Reagenzien wurden in der falschen Reihenfolge verwendet oder ein Verfahrensschritt wurde ausgelassen.

Die Proben wurden nicht zum Probenverdünner gegeben.

Es wurde das falsche Konjugat verwendet, das Konjugat wurde falsch vorbereitet oder ist verfallen.

#### Empfohlenes Vorgehen

Lesen Sie die einzelnen Schritte der Testdurchführung in der Packungsbeilage nach und wiederholen Sie den Test.

Prüfen Sie, ob die Proben zu dem Probenverdünner gegeben wurden.

Prüfen Sie, ob das mit dem Test mitgelieferte Konjugat verwendet wurde. Alle Konjugate sind test- und chargenspezifisch. Wenn die Vorbereitung einer aktiven Konjugatlösung erforderlich ist, stellen Sie sicher, dass korrekte Volumina von Konzentrat und Verdünner verwendet werden. Bereiten Sie die aktive Konjugatlösung 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 niemals in die Vorratsflasche zurückgegossen werden.

### Schlechte Reproduzierbarkeit von Platte zu Platte

#### Mögliche Ursachen

Die Inkubationszeiten schwanken von Platte zu Platte.

Ungleichmässiges Waschen der Platten.

Die Pipette hatte eine Fehlfunktion.

Testkontrollen und Proben hatten unterschiedliche Temperaturen.

Es wurden Reagenzien aus verschiedenen Chargen verwendet.

#### Empfohlenes Vorgehen

Überwachen Sie die Zeitsteuerung für jede Platte einzeln, damit keine Unterschiede bei der Inkubationszeit auftreten.

Führen Sie bei jeder Platte dieselbe Anzahl an Waschzyklen durch. Überprüfen Sie die Funktionalität des Waschsystems. Geben Sie das Waschsysteem zur Reparatur, falls Anschlussstutzen tropfen, oder aber die Abgabe und Aspiration von Flüssigkeit nicht korrekt funktioniert.

Überprüfen Sie die Pipettenkalibrierung. Vergewissern Sie sich, dass die Pipettenspitzen fest aufsitzen, und dass alle Kanäle gleiche Volumina aufziehen und abgeben.

Sehen Sie ausreichend Zeit für das Akklimatisieren/Erwärmen des Probenverdünners, der Proben und der Kontrollen an die Raumtemperatur vor. Nehmen Sie die Komponenten dazu aus der Box heraus. Grössere Volumina benötigen längere Erwärmungszeiten. Falls Sie zur Beschleunigung der Akklimatisierung ein Wasserbad benutzen, muss dieses Raumtemperatur haben; verwenden Sie keine warmen Wasserbäder für Kontrollen, Proben oder Verdünner.

Falls Sie zwei verschiedene Testchargen gleichzeitig benutzen, müssen alle Reagenzienstände etc. eindeutig beschriftet werden, damit die für die einzelnen Platten verwendeten Reagenzien alle aus einer Charge stammen.

## Anhang A: Gravimetrische Methode zur Pipettenkalibrierung

Bei Pipetten mit einstellbarem Volumen sollten die Kalibrierungen für mindestens zwei Einstellungen erfolgen – einmal bei einem häufig verwendeten niedrigem Volumen, und einmal bei einem häufig verwendeten grossen Volumen.

### Automatisiertes Kalibrierungssystem

Das ARTEL PCS\* Pipetten Kalibrierungssystem ist ein automatisiertes Instrumenten-/Reagenziensystem zur regelmässigen und häufigen Verifizierung der Pipettenleistung und der Pipettiertechnik.

Weitergehende Informationen erhalten Sie bei ARTEL unter den Telefonnummern

+1 888 406 3463 oder

+1 207 854 0860

[www.artel-usa.com](http://www.artel-usa.com).

### Empfohlene Eigenschaften

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

### Kennzeichnung/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 Dokumentation zusätzlich in einem Notiz- oder Labortagebuch.

### Materialien

- Pipette
- Analysenwaage
- Becherglas
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Wiegegefäss
- Thermometer

### Methodik

1. Um falsche Ergebnisse als Folge von Verdunstung zu vermeiden, empfehlen wir vor der Kalibrierung eine Humidifizierung der Wägekammer für mindestens zwei Stunden. 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 für die der Kalibrierung vorangehende Reinigung und Schmierung der Pipetten.
3. Die Raumtemperatur sollte um höchstens  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  schwanken und vorzugsweise zwischen  $18^{\circ}$  und  $25^{\circ}\text{C}$  liegen.
4. Bringen Sie ein ausreichend grosses Volumen an entionisiertem oder destilliertem Wasser auf Raumtemperatur und messen Sie anschliessend die Temperatur.
5. Notieren Sie das Gewicht 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 zehnmal.
7. Berechnen Sie das bei jedem Pipettiervorgang abgegebene Volumen.

### Berechnungen

1. Berechnen Sie das tatsächlich beim Pipettiervorgang abgegebene Volumen wie folgt:

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

Dichte von Wasser bei  $16\text{--}21^{\circ}\text{C} = 0,998 \text{ mg}/\mu\text{l}$

Dichte von Wasser bei  $22\text{--}25^{\circ}\text{C} = 0,997 \text{ mg}/\mu\text{l}$

2. Berechnen Sie den Mittelwert (M), die Standardabweichung (SD) und den Varianzkoeffizienten (CV) der 10 Volumina, um die Präzision der Pipette zu bestimmen.
3. Berechnen Sie die Genauigkeit der Pipette wie folgt:  
 $(1 - [\text{Differenz zwischen angegebenem und tatsächlichem Volumen} / \text{angegebenes Volumen}]) \times 100 = \% \text{ Genauigkeit}$

## Anhang B: Lagerkontrollblatt

Bemerkungen																				
Haltbarkeitsdatum																				
Eingangsdatum																				
Anzahl von gelieferten Kits																				
Chargennummer																				
Kittyp																				

Anhang C: Laborkontrollblatt Name des Tests:

Bemerkungen																				
Raumtemperatur																				
Interne Kontrolle																				
Interne Kontrolle																				
Interne Kontrolle																				
Interne Kontrolle																				
Positive Kontrolle																				
Negative Kontrolle																				
Plattennummern																				
Chargennummer des Kits																				
Laborant/-in																				
Datum																				

## Anhang D: Wartungs- und Kalibrierungsplan

Vorgehensweise	Täglich	Wöchentlich	Monatlich	Vierteljährlich	Jährlich
<b>Pipetten</b>					
Äussere Reinigung	●				
Kalibrierung prüfen				●	
Reinigung des Pipetteninnenraums und der O-Ringe				●	
<b>Verdüner</b>					
System mit entionisiertem Wasser spülen	●				
System entleeren	●				
Kalibrierung prüfen†		●			
Spritzen einweichen		●			
Überprüfen/Austauschen der Schläuche				Prüfen	Austauschen
<b>Waschsystem</b>					
System mit entionisiertem Wasser spülen, wenn andere Waschlösungen als entionisiertes Wasser verwendet werden oder als nächstes eine andere Waschlösung verwendet werden soll					
Klappen, Filter und Schaumbildung prüfen	●				
Aspirations- und Abgabenaedeln auf Tropfen und Verschmutzungen prüfen					
Schläuche und Flaschen auf mikrobielles Wachstum prüfen	●	●			
Dekontamination—System mit Bleich- oder Alkohollösung spülen†		●			
Kalibrierung prüfen—System entleeren	●				
Äussere Reinigung	●				
„Reinigungsdurchlauf“ mit entionisiertem Wasser durchführen†					
Prüfen/Austauschen der Schläuche	●			Prüfen	Austauschen
<b>Plattenleser</b>					
Kalibrierungsplatte‡			●		
Einblenden der Lampe	Nach Austausch der Birne				
Optik säubern				●	
Reinigung des Gehäuses		●			

†Beachten Sie die spezifischen Instruktionen des Herstellers Ihres Gerätes/Modells in der Bedienungsanleitung.

‡Informationen bzw. Empfehlungen hinsichtlich der Kalibrierungsplatten erhalten Sie telefonisch über den IDEXX Technischen Kundendienst oder über den Hersteller Ihres Reader. Bitte rufen Sie den IDEXX Technischen Kundendienst oder den Hersteller Ihres Reader an, um Empfehlungen zu der Kalibrierungsplatte zu erhalten.

## Anhang E: Qualitätskontrolle Quick Check

Die Überwachung und Kontrolle der Leistung des Assays mithilfe von Qualitätskontrollblättern liefert Informationen darüber, wann eine Fehlersuche/ Fehlerbehebung notwendig ist. Im Folgenden finden Sie eine Checkliste für den Fall, dass mit Ihrem ELISA Probleme auftreten. Wenn Sie alle unten angeführten Schritte durchgeführt haben und trotzdem weiterhin Probleme mit Ihrem ELISA Test bestehen, kontaktieren Sie bitte den IDEXX Technischen Kundendienst für die Nutztier-, Geflügel- und Milchdiagnostik, Tel: 00800 727 43399, Fax: 00800 433 99329.

### Geräte

- Lassen Sie die Geräte regelmässig warten
- Kalibrieren und reinigen Sie die Pipetten
- Kalibrieren Sie den Plattenleser
- Desinfizieren und warten Sie das Waschsystem

### Reagenzien

- Kontrollieren Sie Ihre Lagerbestände—FIFO
- Prüfen Sie die Komponenten
- Lassen Sie Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen
- Vermeiden Sie Kontaminationen
- Überprüfen Sie, ob die richtigen Lagerbedingungen gegeben sind

### Technik

- Überwachen Sie die Probenqualität
- 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 Mikrotiterplatten
- Verwenden Sie laborinterne Kontrollen—dokumentieren Sie die Ergebnisse

### Andere

- Überwachen Sie die Raumtemperatur im Labor
- Verwenden Sie sterile Einmalartikel und Gefässe
- Überwachen Sie die Leistung des ELISA Tests, protokollieren Sie diese in einem Labortagebuch











**Hauptsitz des Unternehmens  
IDEXX Laboratories, Inc.**

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

**Hauptsitz in Europa  
IDEXX Europe B.V.**

Scorpius 60 Building F  
2132 LR Hoofddorp  
Niederlande

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

Fax: +31 23 558 72 33

**Hauptsitz in Asien  
IDEXX Laboratories, Inc.**

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

Tel.: +886 2 6603 9728

Fax: +886 2 2658 8242