

**bioelisa CHAGAS**3000-1236  
3000-123796 tests  
480 tests**ELISA-Test zur Bestimmung von Antikörpern gegen *Trypanosoma cruzi* in Humanserum oder -plasma.****Zusammenfassung**

Die Chagas-Krankheit ist eine chronische vom flagellaten Protozoen *Trypanosoma cruzi* verursachte parasitäre Infektionskrankheit. Dieser Parasit wird normalerweise von Raubwanzen der Reduviidae-Familie auf Menschen und andere Säugetiere übertragen. *T. cruzi* können auch von der erkrankten Mutter auf ihr Kind oder durch Bluttransfusionen oder die Transplantation von Organen bereits Erkrankter übertragen werden. Der Lebenszyklus des Parasiten ist lang und komplex mit mehreren Entwicklungsstadien sowohl beim Überträger als auch bei dem befallenen Wirbeltier. Bei der Chagas-Krankheit werden drei Stadien unterschieden: eine kurze akute Phase und eine lang andauernde chronische Phase, zwischen denen eine lange klinisch symptomfreie Phase liegt, die als Latenzphase bezeichnet wird. In der ersten und dritten Phase können jederzeit verschiedene Organe befallen werden und die Krankheit kann in beiden tödlich verlaufen. Es wird geschätzt, dass bis zu 30% der Personen in der latenten Form der Infektion 10-20 Jahre nach der Erkrankung Herz, Verdauungs- oder neurologische Schädigungen aufweisen. Die Antikörper entstehen kurz nach der Infektion und erreichen hohe Niveaus und können mit der Erkrankung viele Jahre weiterbestehen. **bioelisa CHAGAS** ermöglicht dank der Verwendung rekombinanter Antigene einen sehr sensiblen und spezifischen Nachweis der Antikörper gegen *T. cruzi* im akuten und chronischen Stadium der Infektion mit der ELISA-Technik. Es ist eine kostengünstige Methode und sie kann vollkommen automatisiert werden, um große Serumbestände in Blutbanken oder klinischen Labors zu prüfen.

**Prinzip**

**bioelisa CHAGAS** ist eine immunenzymatische Methode, bei der die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit rekombinanten Antigenen beschichtet werden, welche vier immunodominante Epitope von *T. cruzi* unter der Lizenz von Corixa Corporation (US-Patent) darstellen. Serum- oder Plasmaproben werden auf diese Vertiefungen gegeben. Wenn spezifische *T. cruzi*-Antikörper in der Probe vorhanden sind, werden diese stabile Komplexe mit den in den Vertiefungen vorhandenen Antigenen bilden. Nach dem Auswaschen zur Entfernung des nicht gebundenen Materials wird Peroxidase konjugiertes Kaninchen IgG humanes anti-IgG und anti-IgM hinzugefügt und, wenn der Antigen/Antikörper-Komplex vorhanden ist, wird sich das Konjugat an den Komplex anbinden. Nach einem zweiten Auswaschen wird eine farbstoffhaltige Enzymsubstratlösung hinzugegeben. Wenn die Probe positiv ist, wird sich diese Lösung blau färben. Die blaue Farbe wird gelb, nachdem die Reaktion mit Schwefelsäure blockiert wurde. Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration der *T. cruzi*-Antikörper in der Probe. Vertiefungen mit negativen Proben bleiben farblos.

**Bestandteile**

- MCPL** MIKROTITERPLATTE:  
12 x 8 Vertiefungen, beschichtet mit *T. cruzi*-Antigenen.
- CONJ51x** KONZENTRIERTES KONJUGAT:  
Peroxidase konjugiertes anti-humanes IgG und IgM. Enthält roten Farbstoff, 0,02% Thimerosal und Proteinstabilisatoren. Vor Gebrauch mit dem Konjugatverdünnungsmittel auf 1/51 verdünnen.
- DIL CONJ** KONJUGATVERDÜNNUNGSMITTEL:  
Tris-Puffer mit gelbem Farbstoff, Zusatzmittel und 0,02% Thimerosal. Zur Verdünnung des konzentrierten Konjugats.
- DIL SAMP** PROBENVERDÜNNUNGSMITTEL:  
Tris-Puffer mit Proteinstabilisatoren, < 0,1% Natriumazid, < 1,0% Triton X-100 als Konservierungsmittel und 8% Ethylenglykol. Gebrauchsfertig.
- WASH SOLN 10x** KONZENTRIERTE WASCHLÖSUNG:  
Konzentrierter Phosphatpuffer (10x) mit 1% Tween 20 und 0,01% Thimerosal. Vor Gebrauch mit destilliertem oder deionisiertem Wasser 1/10 verdünnen.
- SUBS BUF** SUBSTRATPUFFER:  
Zitrat/Azetat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.
- SOLN TMB** CHROMOGEN:  
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO).

8. **CONTROL+** POSITIVE KONTROLLE:  
Hitzeinaktiviertes, verdünntes Humanserum mit Antikörpern gegen *T. cruzi*. Enthält grünen Farbstoff und < 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
9. **CONTROL-** NEGATIVE KONTROLLE:  
Verdünntes Humanserum, das frei von Anti-*T. cruzi* ist. Enthält gelben Farbstoff und < 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
10. **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N** STOPPLÖSUNG (nur in dem Kit mit 1 Platte):  
1N Schwefelsäure. Gebrauchsfertig.
11. **SEALS** HAFTFOLIE:  
Zum Abdecken der Mikrotiterplatte während der Inkubationsphasen.
12. **BAG** FOLIENBEUTEL:  
Zur Aufbewahrung der nicht verwendeten Streifen.

### Vorsichtsmassnahmen

**bioelisa CHAGAS** ist ausschliesslich für die IN VITRO-Diagnostik bestimmt.  
Für den ausschließlichen Gebrauch durch Fachpersonal.

Das **Probenverdünnungsmittel** enthält < 0,1% Natriumazid und < 1,0% Triton X-100. Im Anschluss erscheinen die entsprechenden Risiko- (R) und Sicherheitssätze (S):

- R22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- S46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

### ACHTUNG: BIOLOGISCH GEFÄHRLICHES MATERIAL.

Die positive Kontrolle wurde hitzeinaktiviert. Das gesamte zur Herstellung dieses Produktes verwendete Humanmaterial ist unter Verwendung eines zugelassenen kommerziellen Verfahrens auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen die Viren HIV-1/HIV-2 und HCV sowie auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und für negativ befunden. Da kein Nachweisverfahren die Abwesenheit von infektiösen Agenzien garantieren kann, ist dieses Produkt mit entsprechenden Vorsichtsmassnahmen zu handhaben:

- Eine Berührung der Reagenzien mit Haut oder Augen vermeiden, bei Berührung mit reichlich Wasser auswaschen.
- Handschuhe verwenden.
- Die Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht rauchen.
- Alle benutzten Materialien sind separat in Behältern für biologische Abfälle zu entsorgen. Die Reste von Proben, Kontrollen, Puffern, aspirierten Reagenzien und Pipettenspitzen müssen in einem dafür vorgesehenen Behälter gesammelt werden und vor dem Entsorgen eine Stunde bei 121°C autoklaviert werden oder mit Natriumhypochlorit in einer Endkonzentration von 10% 30 Minuten lang behandelt werden (Säure enthaltende Reste müssen vor Zugabe des Natriumhypochlorits neutralisiert werden).
- Verschiedene Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Natriumazid kann auf Blei- oder Kupfer-Rohrleitungen und -Abflüsse reagieren und zu hoch explosiven Metallaziden führen. Beim Entfernen der Reagenzreste muss genügend Wasser nachgespült werden.

### Hinweise für die Handhabung:

- Für sachgemässes Auswaschen den Wascher auf den Mikrotiterplattentyp einstellen (flacher Grund).
- Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht mischen.
- Die Reagenzien nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn Sie an irgendeinem zu dem Kit gehörenden Bestandteil irgendeine Änderung des Erscheinungsbilds beobachten.
- Es ist besondere Sorgfalt aufzuwenden, um eine Kontamination mit Bakterien und eine Kreuzkontamination zwischen den Reagenzien zu vermeiden.
- Zur Pipettierung jeder Probe und jedes Reagenz ist eine neue Einweg-Pipettenspitze zu verwenden.
- Es ist sehr wichtig, die TMB-Substratlösung erst 5-10 Minuten vor Gebrauch zuzubereiten. Die Lösung ist in einem gut verschlossenen Gefäss lichtgeschützt aufzubewahren.
- Reste von Seifen und/oder Oxidationsmitteln, die in den zur Herstellung der TMB-Substratlösung verwendeten Gefässe zurückgeblieben sind, können die Reaktion beeinflussen. Bei Verwendung von Glasgefässen sollten diese darum mit 1N Schwefelsäure oder Salzsäure ausgewaschen und mit reichlich destilliertem Wasser ausgespült werden. Vorzugsweise sind Einweggefässe aus Kunststoff zu verwenden.

### Lagerung und Stabilität

Bei einer Lagerungstemperatur von 2-8°C bleiben die Bestandteile bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Der Beutel mit der Mikrotiterplatte muss vor dem Öffnen auf Raumtemperatur gebracht werden, um eine Kondensationsbildung in den Vertiefungen zu vermeiden. Nach dem Öffnen des Beutels ist die Mikrotiterplatte bei Lagerung zwischen 2 und 8°C im gut verschlossenen Kunststoffbeutel mit dem Silicagelbeutel 3 Monate haltbar. Die Waschlösung bleibt nach Verdünnung zwei Wochen haltbar, wenn sie bei 2-8°C gelagert wird. Nach Verdünnung muss der Konjugat im gleichen Tag benutzt werden. Das Chromogen vor direktem Licht schützen. Die TMB-Substratlösung ist nach Zubereitung nicht stabil, deshalb sind die Gebrauchsanweisungen sorgfältig zu befolgen.

### Packungsinhalt

- Kit mit 1 Platte (96 Tests), **REF** 3000-1236.  
Enthält: 1 Platte, 1 x 0,35 ml konzentriertes Konjugat, 1 x 15 ml Konjugatverdünnungsmittel, 1 x 30 ml Probenverdünnungsmittel, 2 x 50 ml konzentrierte Waschlösung, 1 x 14 ml Substratpuffer, 1 x 1,5 ml Chromogen, 1 x 2 ml positive Kontrolle, 1 x 3 ml negative Kontrolle, 1 x 12 ml Stopplösung, 1 Folienbeutel und Haftfolien.
- Kit mit 5 Platten (5 x 96 Tests), **REF** 3000-1237.  
Enthält: 5 Platten, 1 x 1,3 ml konzentriertes Konjugat, 1 x 70 ml Konjugatverdünnungsmittel, 1 x 120 ml Probenverdünnungsmittel, 3 x 100 ml konzentrierte Waschlösung, 5 x 14 ml Substratpuffer, 1 x 1,5 ml Chromogen, 1 x 5 ml positive Kontrolle, 1 x 7 ml negative Kontrolle, 1 Folienbeutel und Haftfolien.

### Erforderliches, nicht mitgeliefertes Material

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Mehrkanalpipetten und Mikropipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl) und Einwegspitzen.
- Inkubator mit 37°C ± 1°C.
- Stoppuhr.
- Mikrotiterplattenmessgerät mit Filter 450 nm. Empfohlen wird ein Referenzfilter 620 bis 630 nm.
- Manuelles oder automatisiertes Waschsystem.
- Stopplösung (Kit mit 5 Platten): 1N Schwefelsäure. Es kann auch 2N oder 4N Schwefelsäure verwendet werden.

### Probenmaterial

Frisches Serum oder Plasma (EDTA) benutzen. Andere Antikoagulantien müssen zuvor evaluiert werden. Die Proben können 3 Tage lang bei 2-8°C gelagert werden. Bei längerer Lagerung müssen die Proben eingefroren werden (-20°C). Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Sichtbare suspendierte Partikel sind durch Zentrifugieren zu entfernen. Die Seren oder Plasmen dürfen nicht hitzeinaktiviert werden, da es sonst zu falschen Ergebnissen kommen kann.

### Automatische Verarbeitung

Dieser Test kann in seiner automatischen oder halbautomatischen Modalität in unterschiedlichen Instrumenten eingesetzt werden. Beim Einsatz automatischer Systeme muss jedoch unbedingt geprüft werden, ob die erhaltenen Probenergebnisse mit den Ergebnissen des manuellen Tests übereinstimmen. Der Anwender sollte das Instrument in regelmäßigen Abständen validieren. Falls Sie Probleme bei der Programmierung und Einstellung der automatischen Prozessoren von Biokit feststellen sollten, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Händler in Verbindung.

### DURCHFÜHRUNG (Siehe schematischer Ablauf)

#### Vorbereitung

Alle Reagenzien müssen vor Beginn des Tests auf Raumtemperatur gebracht worden sein (20-25°C).

Flüssige Reagenzien müssen vor Gebrauch vorsichtig gemischt werden.

Die konzentrierte Waschlösung ist mit destilliertem oder deionisiertem Wasser auf 1/10 zu verdünnen. Für eine Platte 50 ml konzentrierte Waschlösung mit 450 ml Wasser mischen. Wird nicht die ganze Platte gebraucht, dann eine proportional entsprechende Menge der Lösung herstellen.

Das konzentrierte Konjugat mit dem Konjugatverdünnungsmittel gemäss Tabelle 1 1/51 verdünnen. Für das Kit mit 1 Platte bei Verwendung der gesamten Platte 300 µl des konzentrierten Konjugats direkt in eine Reagenzflasche mit 15 ml des Konjugatverdünnungsmittel geben. **Vorsichtig mischen.**

TABELLE 1

Verwendete Streifen	1	2	4	6	8	10	12
Verdünnungsmittel Konjugat ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Konzentriertes Konjugat µl	20	40	80	120	160	200	240

**Versuchsprotokoll**

1. Es ist nur die für den Test erforderliche Anzahl von Streifen zu verwenden. 6 Vertiefungen sind für Leerwertsprobe und Kontrollen vorzusehen. 200 µl des Verdünnungsmittels für die Proben in die restlichen Vertiefungen einpipettieren. Dann 10 µl jeder Probe in die zuvor bezeichneten Vertiefungen geben.
2. 200 µl der negativen Kontrolle in 3 Vertiefungen und 200 µl der positiven Kontrolle in 2 Vertiefungen pipettieren. **DIE KONTROLLEN NICHT VERDÜNNEN. SIE SIND GEBRAUCHSFERTIG.** Eine Vertiefung für die Leerwertsprobe mit Substrat frei lassen.
3. Die Platte mit einer Haftfolie abdecken, **vorsichtig mischen** und 1 Stunde lang bei 37°C inkubieren.
4. Die Haftfolie abnehmen und entsorgen. Den Inhalt aus den Vertiefungen herauspipettieren und diese vollständig (ca. 350 µl) mit verdünnter Waschlösung befüllen. Den Vorgang aus Aspirieren und Auswaschen weitere 3 Mal wiederholen. Stellen Sie sicher, dass jede Vertiefungsreihe mindestens 15 Sekunden einweicht, bevor ein neuer Aspirationszyklus einsetzt. Nach dem letzten Waschen die umgekehrte Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um überschüssige Flüssigkeitstropfen aus den Vertiefungen zu entfernen.
5. 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen der Platte zugeben, mit Ausnahme der Vertiefung für die Leerwertsprobe mit Substrat.
6. Die Platte mit Haftfolie abdecken und 30 Minuten lang bei 37°C inkubieren.
7. Während der letzten 5-10 Minuten dieser Inkubation die Substrat-Chromogen-Lösung zubereiten. Bei Verwendung der ganzen Platte 280 µl der TMB-Chromogen-Lösung in die Reagenzflasche mit Substratpuffer (14 ml) einfüllen und **gut mischen**. Wird nicht die ganze Platte benötigt, dann die erforderliche Menge gemäß Tabelle 2 zubereiten. Die endgültige Lösung muss farblos sein; bei Blaufärbung nicht mehr verwenden.

TABELLE 2

Erforderliche Streifen	1	2	4	6	8	10	12
Substratpuffer ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Chromogen (TMB) µl	20	40	80	120	160	200	240

**HINWEIS:** Das TMB ist in DMSO gelöst. Da die Schmelzpunkt von DMSO bei 18°C liegt muss das Chromogen vor Gebrauch auf eine Temperatur von 20-25°C gebracht und **gut gemischt** werden. Eine Gelbfärbung der Chromogenlösung ist normal.

8. Die Haftfolie abnehmen und entsorgen. Die Platte wie unter Punkt 4 beschrieben aspirieren und waschen.
9. 100 µl TMB-Substrat in alle Vertiefungen pipettieren.
10. Unbedeckt 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
11. 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung einfüllen, dabei die gleiche Reihenfolge und die gleichen Zeitabstände einhalten wie bei der Zugabe des TMB-Substrats.
12. Das Messgerät anhand der Vertiefung mit der Leerwertsprobe bei 450 nm auf Null stellen und die Extinktion jeder einzelnen Vertiefung innerhalb einer Zeitspanne von maximal 30 Minuten ablesen. Empfohlen wird eine biochromatische Messung mit einem Referenzfilter von 620 - 630 nm.

**Qualitätskontrolle**

Die Ergebnisse einer Serie sind gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Substrat-Leerwertsprobe.  
Der Extinktionswert muss kleiner oder gleich 0,100 sein.
2. Mittel negative Kontrolle (NKx).  
Die Extinktion jeder einzelnen negativen Kontrolle muss nach Abzug der Leerwertsprobe kleiner oder gleich 0,200 sein. Wenn einer der Werte nicht innerhalb dieses Rahmens liegt, dann ist die Messung zu verwerfen und das Mittel neu zu berechnen. Liegen zwei Werte ausserhalb dieser Vorgaben, dann muss der Test wiederholt werden.

Beispiel:

Negative Kontrolle	Extinktion
1	0,045
2	0,043
3	0,041
Gesamt	0,129

$$NKx = 0,129/3 = 0,043$$

In diesem Beispiel muss kein Wert verworfen werden.

3. Mittel der positiven Kontrolle (PKx).

Die mittlere Extinktion der positiven Kontrollen muss nach Abzug der Leerwertsprobe gleich oder grösser als 0,600 sein. Liegt das Mittel unter diesem Wert, dann muss die Analyse wiederholt werden.

Beispiel:

Positive Kontrolle	Extinktion
1	1,536
2	1,551
Gesamt	3,087

$$PKx = 3,087/2 = 1,544$$

**Ergebnisse**

1. Zur Berechnung des Grenzwerts, 0,300 zur Mittelextinktion der negativen Kontrolle hinzurechnen.

**Grenzwert = NKx + 0,300**

Beispiel: NKx = 0,043      Grenzwert = 0,043 + 0,300 = 0,343

2. Die Extinktion der Probe durch den Grenzwert teilen.

Positiv:      Verhältnis Extinktion/Grenzwert  $\geq 1,0$   
 Negativ:      Verhältnis Extinktion/Grenzwert  $< 0,9$   
 Zweifelhafte: Verhältnis Extinktion/Grenzwert  $\geq 0,9 < 1,0$

**Auswertung der Ergebnisse**

Ein positives Ergebnis zeigt eine Infektion mit *T. cruzi* an. Für die Interpretation ist die Krankengeschichte des Patienten zu berücksichtigen.

**Begrenzung der Methode**

Alle Proben mit positivem oder zweifelhaftem Ergebnis müssen erneut doppelt analysiert werden. Fällt das Ergebnis wiederholt positiv oder zweifelhaft aus, dann ist die Probe mit weiteren Methoden zu analysieren. Für eine optimale Leistung des Kits sind die beschriebenen Anweisungen genauestens zu befolgen. Irgendeine Abweichung kann zu abwegigen Ergebnissen führen. Wie bei allen sehr empfindlichen Immuntests besteht die Möglichkeit positiver Resultate, die sich nicht wiederholen. Ein negatives Resultat schliesst die Möglichkeit einer Aussetzung oder einer Infektion mit *T. cruzi* nicht aus.

**Charakteristika des Tests**

**Auswertungen**

Das Funktionieren des Kits **bioelisa CHAGAS** ist in verschiedenen Studien im Vergleich mit anderen auf dem Markt vorhandenen Tests getestet worden, wobei Proben von Blutspendern und im Vorfeld als gegen *T. cruzi* negative oder positive Antikörper eingeteilte Proben analysiert wurden.

- Bei einer in einer Blutbank durchgeführten Analyse wurden parallel mit den routinemässigen Methoden zur Antikörpersichtung gegen Chagas (EIA, HA und IFA) 3024 Proben von Spendern getestet. Von diesen waren 21 mit **bioelisa CHAGAS** reaktiv. Sieben (7) wurden als positiv bestätigt. Daher betrug die erzielte Sensibilität 100% und die Spezifität 99,5%, wenn alle anfangs als reaktiv angesehenen Proben berücksichtigt werden.

- Bei einer anderen Analyse in einer Blutbank wurden parallel mit den routinemäßigen Methoden zur Antiköpersichtung gegen Chagas (EIA, HA und IFA) 2723 Proben getestet. Von der Gesamtheit waren 72 mit **bioelisa CHAGAS** reaktiv. Zwei (2) wurden davon als tatsächlich positiv bestätigt. Daher betrug die erzielte Sensibilität 100% und die Spezifität bei der Sichtung 97,4%.
- In einer dritten Blutbank wurden parallel mit den routinemäßigen Methoden zur Antiköpersichtung gegen Chagas (EIA; HA und IFA) 2655 Proben getestet. Von diesen waren 57 Proben mit **bioelisa CHAGAS** reaktiv. Zehn (10) wurden als positiv bestätigt. Bei dieser Analyse betrug die Sensibilität 100% und die Spezifität bei der Sichtung betrug 98,2%.
- Es wurde ein Panel mit 498 vorher in positiv (18) oder negativ (480) eingeteilten Proben analysiert. Die erreichte Sensibilität betrug 100% und die Spezifität 98,3%.
- Es wurde ein Panel mit 115 vorher als tatsächlich positiv eingestuften Proben untersucht. Die Resultate aller Test waren positiv, wobei eine Sensibilität von 100% erreicht wurde.
- Es wurden 796 als negativ bezeichnete Proben analysiert, von denen 4 ein positives Resultat mit **bioelisa CHAGAS** aufwiesen. In dieser Studie wurde eine Spezifität von 99,5% erreicht.

### **Präzision**

Intra-Assay-Reproduzierbarkeit:

Die erhaltenen Variationskoeffizienten für die Extinktionswerte einer positiven Probe, die 24 Mal repliziert wurde, lagen bei 2,5%, 4,2% und 3,1% bei drei untersuchten Posten.

Inter-Assay-Reproduzierbarkeit:

Drei positive Proben von drei verschiedene Konzentrationen wurden in drei unterschiedlichen Tests geprüft. Die erhaltenen Variationskoeffizienten für das Verhältnis Extinktion/Grenzwert der drei Proben lagen bei 4,6%, 3,5% und 8,7%.

## bioelisa: Leitfaden zur Problemlösung

<b>Problem</b>	<b>Mögliche Ursachen</b>	<b>Lösung</b>
<b>1. Kontrollen ausserhalb der Validierung.</b>	1a. Temperatur, Zeitspannen oder Pipettieren falsch.	<i>Methode überprüfen. Test wiederholen.</i>
	1b. Unsachgemässe Vorbereitung der Reagenzien, falsche Verdünnung. Reagenzien nicht richtig durchgemischt.	<i>Methode überprüfen. Test wiederholen.</i>
	1c. Kreuzkontamination zwischen Kontrollen.	<i>Sorgfältig pipettieren. Die Reagenzflascherverschlüsse nicht vertauschen. Den Test wiederholen.</i>
	1d. Falscher Lesefilter.	<i>Überprüfen, ob ein Lesefilter der Wellenlänge 450 nm eingesetzt ist. Wird kein Referenzfilter mit 620-630 nm eingesetzt, dann erhöht sich die Extinktion um ca. 0,050.</i>
	1e. Interferenz in der Optik.	<i>Das Messgerät überprüfen. Den Grund der Vertiefungen reinigen oder trocknen. Prüfen, ob Luftblasen eingeschlossen sind. Die Ablesung wiederholen.</i>
	1f. Es wurden Komponenten aus unterschiedlichen Chargen verwendet.	<i>Keine Komponenten aus unterschiedlichen Chargen mischen, da diese spezifisch für jeden Chargen zusammengestellt sind.</i>
	1g. Reagenzien abgelaufen.	<i>Verfallsdatum des Kits und der dazugehörigen Komponenten prüfen. Ein abgelaufenes Kit nicht mehr verwenden.</i>
<b>2. Keine oder nur schwache Färbung am Ende des Tests.</b>	2a. Ein Reagenz oder mehrere nicht oder in der falschen Reihenfolge hinzugefügt.	<i>Methode überprüfen. Den Test wiederholen.</i>
	2b. Konjugat inaktiv: unsachgemässe Konservierung.	<i>Prüfen, ob es zu einer Kontamination gekommen ist, und Methode überprüfen. Den Test wiederholen.</i>
	2c. Mikrotiterplatte inaktiv: unsachgemässe Konservierung.	<i>Die nicht verwendeten Streifen sind immer im verschliessbaren Folienbeutel zusammen mit dem Trockenmittel aufzubewahren. Den Test wiederholen.</i>
	2d. Substrat inaktiv: unsachgemässe Konservierung oder Verdünnung. Kreuzkontamination mit der Stopplösung.	<i>Immer eine neu zubereitete TMB- und Substratpuffer-Lösung verwenden. Die Methode überprüfen. Den Test wiederholen.</i>

## bioelisa: Leitfaden zur Problemlösung

Problem	Mögliche Ursachen	Lösung
3. Zu starke Färbung in allen Vertiefungen der Mikrotiterplatte.	3a. Substrat kontaminiert, oxidiert oder unsachgemäss vorbereitet.	<i>Prüfen, ob das vorbereitete Substrat farblos ist; bei Blaufärbung nicht mehr verwenden. Vor Verwendung das TMB prüfen und sicherstellen, dass es vollkommen flüssig ist. Für eine vollständige Durchmischung des TMB im Substratpuffer sorgen. Einweg-Reagenzgläser oder -Behälter verwenden oder diese mit Säure auswaschen. Den Test wiederholen.</i>
	3b. Reagenzien kontaminiert oder unsachgemäss zubereitet.	<i>Auf Kontamination prüfen (Trübung). Verdünnungen prüfen. Den Test wiederholen.</i>
	3c. Waschlösung (1x) kontaminiert.	<i>Die Qualität des destillierten/deionisierten Wassers zur Herstellung der Verdünnung prüfen. Den Test wiederholen.</i>
	3d. Waschen ungenügend oder nicht konsistent: Füllmenge und/oder Aspirieren ungenügend oder nicht einheitlich, Anzahl der Waschzyklen ungenügend. Wascher kontaminiert.	<i>Wascher prüfen. Die Vertiefungen bis zum Rand befüllen und vollständig aspirieren. <b>Die Anzahl der Waschvorgänge erhöhen.</b> Die umgekehrte Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen. Den Test wiederholen.</i>
	3e. Es wurde Waschlösung von einem anderen Hersteller verwendet.	<i>Nur die Waschlösung von <b>biokit</b> verwenden.</i>
	3f. Unsachgemässe Verdünnung der Proben.	<i>Methode überprüfen. Den Test wiederholen.</i>
4. Schlechte Reproduzierbarkeit oder erhöhte Anzahl reaktiver Proben, die sich nicht wiederholen.	4a. Probleme beim Waschen.	<i>Siehe Abschnitte 3c, 3d, 3e.</i>
	4b. Pipetten schlecht kalibriert oder Pipettenspitzen nicht richtig eingesetzt. Unsachgemässe Pipettiertechnik.	<i>Nur kalibrierte Pipetten mit richtig eingesetzten Pipettenspitzen verwenden. Sorgfältig und ohne Blasen und Spritzer pipettieren. Den Test wiederholen.</i>
	4c. Reagenzien zu kalt oder vor Gebrauch nicht richtig gemischt.	<i>Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut mischen.</i>
	4d. Mikrotiterplatten während der Inkubationen der Zugluft ausgesetzt.	<i>Die Mikrotiterplatte vor Zugluft geschützt lagern.</i>
	4e. Zuviel Zeit bei der Zugabe von Proben und/oder Reagenzien. Inkonsistente Zeitintervalle. Luftblasen.	<i>Eine einheitliche und konsistente Technik entwickeln.</i>
	4f. Interferenzen in der Optik.	<i>Siehe 1e.</i>