

IVD solutions through partnership



Infektions- und Autoimmundiagnostik

Troubleshooting
ELISA

Keine Farbreaktionen

Konjugat

Reagenzbedingt

- Konjugat kontaminiert oder verunreinigt, z.B. mit Substrat durch direkten Kontakt mit Natriumazid oder durch Verunreinigung mit Natriumazid-stabilisierten Kontrollseren
Folge: keine Enzymaktivität
- Spaltung der Konjugation zwischen Enzym und Antikörper durch chemische Reaktionen, z.B. pH-Verschiebung

Das Konjugat wird herstellerseits mit einem rot bzw. orange angefärbten Verdünnungspuffer auf die jeweilige Arbeitskonzentration eingestellt. Die Rotfärbung kann chargenabhängig leicht variieren. Ein Farbumschlag des Konjugats erfolgt durch eine geringe pH-Verschiebung in den sauren Bereich, aber auch durch eine Kontamination mit Chloridionen, die möglicherweise durch eine Pipettenspitze verursacht wurde (z.B. beim vorherigen Pipettieren von NaCl-Lösung).

Handhabungsbedingt

- Vertauschen des Konjugats z. B. mit Reagenz aus einem anderen Kit
- Falsches Reagenz pipettiert (z.B. Stopplösung anstelle von Substrat)

Substrat, TMB

Reagenzbedingt

Substrat blaugrün verfärbt, Kontamination mit HCl bzw. H_2SO_4 wahrscheinlich.

Folge:

keine Farbreaktion, da das Substrat enzymatisch nicht umgesetzt werden kann.

Gebrauchsfertiges TMB sollte stets eine klare, nahezu farblose Flüssigkeit sein. Falls das Substrat grünlich verfärbt ist, wurde das Reagenz zu kühl gelagert. Die Aktivität dieses verfärbten Reagenzes ist etwas geringer. Im Zweifelsfall sollte es verworfen werden, da eine ähnliche Grünfärbung auch bei einer Kontamination auftritt, die einen Aktivitätsverlust zur Folge hat.

Bei Erwärmung verfärbt sich TMB-Substrat gelb. Das Reagenz behält aber seine Aktivität.

Handhabungsbedingt

- Waschschrift nach der Substratreaktion eingefügt
- Falsches Reagenz pipettiert (z.B. Stopplösung anstelle von Substrat)

Waschpuffer

Das Konzentrat des Waschpuffers muss immer verdünnt werden (bei MASTAZYME™ Autoimmun ELISA 1:10).

Die Verwendung kontaminierten oder ungeeigneten Wassers kann die enzymatische Aktivität des Konjugats blockieren. Laborwasser aus Ionenaustauschanlagen kann im Einzelfall zu Störreaktionen führen: es werden z.B. mit derartigen Anlagen keine aliphatischen und / oder aromatischen Verbindungen aus dem Wasser entfernt.

Empfehlung: Aqua bidest., Aqua iniectionabilia

Handhabungsbedingt

- Waschschrift nach der Substratreaktion eingefügt
- Falsches Reagenz pipettiert (z.B. Stopplösung anstelle von Substrat)
- Bei Automatikwashern liegt der Waschkamm auf dem Boden der Mikrotiterplatte auf und löst das Antigen ab

Zweifelhafte Farbreaktionen

- schwache Farbreaktionen

Reagenzbedingt

- Die Reagenzien sind kontaminiert, es ist aber noch eine Restaktivität vorhanden
- Die Verpackung der Mikrotiterstreifen ist beschädigt, das Antigen denaturiert teilweise oder vollständig
- Die Temperatur des Waschpuffers liegt deutlich über 24 °C; dadurch wird die Wascheffektivität des Puffers (Stringenz) erhöht

Handhabungsbedingt

- Die Mikrotiterstreifen wurden aus dem Kühlschrank entnommen und sofort geöffnet, ohne vorher Raumtemperatur erreicht zu haben
- Verwendung kalter, nicht auf Raumtemperatur äquilibrierter Reagenzien
- Das Konjugat wurde nicht aus dem Originalkit verwendet
- Der Waschpuffer wurde zu lange in den Wells inkubiert
- Inkorrekte Höhenjustierung des Waschkamms bei Automatikwaschern
- Inkorrekte Inkubationszeiten

- zu starke Farbreaktionen

Reagenzbedingt

- Konjugat zu konzentriert*
- Fehlerhaftes Beschichtungsverfahren*
- Stopplösung zu schwach konzentriert*

(*) Diese Produktmängel werden in aller Regel in der Qualitätskontrolle erkannt, auffällige Reagenzien gelangen nicht in den Verkauf!

Handhabungsbedingt

- Das Konjugat wurde nicht aus dem Originalkit verwendet
- Der Waschpuffer wurde zu kurz in den Wells inkubiert
- Es wurde mit zu geringem Waschdruck gewaschen
- Nach der Konjugatinkubation wurde nicht sorgfältig genug gewaschen
- Inkubationszeiten überzogen (insbesondere die Substratreaktion)
- Die Inkubationstemperatur lag über 24 °C (z. B. Sonneneinstrahlung)

Probenbedingt

- Proben mit Anti-BSA-Antikörpern können stark positive Reaktionen in den entsprechenden Wells zur Folge haben
- Einige Festphasenantigene haben noch eine enzymatische (Rest-) Aktivität; das Substrat wird teilweise auch in Abwesenheit spezifischer Antikörper metabolisiert (Beispiele: u.a. Myeloperoxidase MPO, Schilddrüsenperoxidase TPO)

Falsch-positive, falsch-negative Proben

Reagenzbedingt

- Kontaminierter Serumverdünnungspuffer
- hämolytische, ikterische oder lipämische Proben
- Standards / Kalibratoren oder Cut-off-Kontrollen sind instabil und fallen in der Extinktion ab

Handhabungsbedingt

- Falscher Probenverdünnungspuffer
- Falsche oder keine Probenverdünnung
- Fehlerhaftes Waschen
- Falsche Filterwahl im Photometer

Probenbedingt

- Proben sind auf dem Transportweg aufgetaut und Antikörper dadurch denaturiert worden
- Proben sind kontaminiert und Antikörper dadurch abgebaut worden

Leerwert (Blank) zu hoch

Reagenzbedingt

- Kontaminierte Reagenzien
- Ungeeignetes Laborwasser (Aqua bidest. oder „HPLC-Wasser“ verwenden)

Handhabungsbedingt

- Fehlerhaftes Waschen
- Boden der ELISA-Platte verschmiert

Präzisionsprobleme

Stark variierende Ergebnisse innerhalb einer Serie (Intra-assay Varianz)

Reagenzbedingt

- Ungleiche Beschichtung der Mikrotiterstreifen
- Beschädigung an der Verpackung der Mikrotiterstreifen
- Kontaminierte Reagenzien

Handhabungsbedingt

- Reagenzien (v.a. Mikrotiterstreifen) und Proben wurden nicht vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur äquilibriert
- Proben wurden nach der Verdünnung nicht sorgfältig gemischt
- Kleine Luftblasen in den Wells
- Pipettenspitzen passen nicht exakt auf die Pipette („wackeln“)
- Kontaminierte Pipettenspitzen
- Die Kanäle des Washers sind teilweise verstopft
- Die Mikrotiterplatte trocknet während der Inkubation oder nach den Waschschritten aus
- Die Mikrotiterstreifen sitzen nicht exakt auf dem Streifenhalter (bedingt unmittelbar ungleichmäßiges Waschen)

Stark variierende Ergebnisse innerhalb einer Serie (Intra-assay Varianz)

Reagenzbedingt

- Ungleiche Beschichtung der Mikrotiterstreifen
- Beschädigung an der Verpackung der Mikrotiterstreifen
- Kontaminierte Reagenzien

Handhabungsbedingt

- Inkubationsbedingungen nicht vergleichbar (Temperatur, Zeit, etc.)
- Verwendung nicht kalibrierter Pipetten bzw. ungeeigneter Pipettenspitzen

Anmerkungen

Bei Interassay-Varianzen ist zu klären, ob sich diese nur auf die Extinktionen (OD 450nm) beziehen oder auf die quantitativen Ergebnisse. Die Messwerte der Extinktionen werden unmittelbar von Faktoren wie Temperatur, Inkubationszeit, Luftfeuchtigkeit etc. beeinflusst. Da in der Regel davon Standards, Kontrollen und Proben gleichermaßen betroffen sind, ist das ermittelte Ergebnis meist korrekt. Bei großen Schwankungen der quantitativen Ergebnisse im Interassay-Vergleich liegen häufig gravierende Fehler im Reagenzsystem oder in der Abarbeitung vor.

V. 2019-02-11

United Kingdom
Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road, Bootle
Merseyside L20 1EA

Tel: +44 (0)151 933 7277
Fax: +44 (0)151 944 1332
e-mail: sales@mastgrp.com

Germany
Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DE-23858 Reinfeld

Tel: +49 (0)4533 2007 0
Fax: +49 (0)4533 2007 68
e-mail: mast@mast-diagnostics.de

France
Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1

Tél: +33 (0)322 80 80 67
Fax: +33 (0)322 80 99 22
e-mail: info@mast-diagnostic.fr