

# Gute ELISA Praxis

Handbuch





## Einführung

Das „Gute ELISA Praxis“ (GEP)-Handbuch bietet einen umfassenden Überblick für Einsteiger und erfahrene Analytiker zur Verbesserung der Handhabung und Beurteilungsqualität von durchgeführten ELISA-Analysen.

**Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine antikörperbasierte Testmethode. Diese weit verbreitete Technologie ist benutzerfreundlich, sensitiv, schnell und zuverlässig. Zudem sind ELISA robust und werden meist für quantitative Bestimmungen eingesetzt.**

Mit mehr als 30 Jahren Erfahrung in der Entwicklung von ELISA-Testkits setzt R-Biopharm

auf eine bewährte Analysemethode, die den Anforderungen moderner Labore gerecht wird.

Die RIDASCREEN® Tests weisen eine hohe Sensitivität auf und sind zudem robust. Diese Testsysteme werden von Lebensmittelherstellern zur Prüfung von Rohstoffen oder Fertigprodukten eingesetzt.

Darüber hinaus erfordert das ELISA-Verfahren nur eine grundlegende Laborausstattung und ist im Vergleich zu HPLC und/oder LC-MS/MS sehr benutzerfreundlich.

Dieses Handbuch gliedert sich in drei Kapitel, die dem Ablauf einer ELISA-Analyse folgen:

### **Kapitel 1:**

Vermittelt Grundkenntnisse über das Testprinzip, ELISA-Komponenten und erforderliche Laborgeräte.

### **Kapitel 2:**

Beschreibt die Durchführung der Analyse, die aus Probenvorbereitung und ELISA-Durchführung besteht.

### **Kapitel 3:**

Erklärt den Prozess der Datenauswertung, von der Messung bis zur Interpretation.

Für Kommentare oder Feedback wenden Sie sich bitte an Ihren Vertriebspartner vor Ort.

[trainer@r-biopharm.de](mailto:trainer@r-biopharm.de)

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Grundlagen von ELISA</b>	6
	1.1 Antikörper-Antigen-Nachweis	6
	1.3 ELISA-Formate	7
	1.3.1 Sandwich-ELISA	7
	1.3.2 Kompetitiver ELISA (Formate)	8
	1.4 ELISA-Komponenten	10
	1.4.1 Mikrotiterplatte (MTP)	10
	1.4.2 Konjugat und Substrat	10
	1.4.3 Standards (Kalibrator)	11
	1.4.4 Puffer	11
	1.4.5 Stopp-Lösung	11
	1.4.6 Zusätzliche Komponenten	12
	1.5 Laborgeräte und ihre Wartung	12
	1.5.1 Pipetten	13
	1.5.2 ELISA-Plattenwaschanlage – automatische Systeme	13
	1.5.3 Mikrotiterplatten (MTP)-Reader für ELISA	14
	1.5.4 Automatisierung	14
	1.5.5 Zusätzliche Geräte	15
	1.6 Gute Laborpraxis (GLP)	15
	1.7 Kennzeichnung der Testkits	15
<b>2</b>	<b>Probenvorbereitung und Testdurchführung</b>	16
	2.1 Pipettiertechnik	16
	2.1.1 Allgemeine Pipettieranweisungen	16
	2.1.2 Vorwärtspipettieren mit Laborpipetten	17
	2.1.3 Rückwärtspipettieren mit Laborpipetten	17
	2.1.4 Pipettieren von organischen Lösungsmitteln	18
	2.1.5 Gute Pipettiertechniken zur Verbesserung der Pipettierleistung	19

<b>2.2 Handhabung der Proben</b>	20
2.2.1 Lagerung der Proben	20
2.2.2 Probennahme	20
2.2.3 Probenvorbereitung	20
2.2.4 pH-Wert	21
2.2.5 Verwendung von eingefrorenen Proben	21
<b>2.3 Vorbereitung und Handhabung der Komponenten</b>	23
2.3.1 Lagerung der Kits	23
2.3.2 First in – first out (FIFO)	23
2.3.3 Vorwärmung	24
2.3.4 Temperaturkontrolle	24
2.3.5 Vermeidung von Kontamination und Verwechslung der Proben	25
2.3.6 Allgemeine Testhandhabung	25
2.3.8 Richtiges Waschen	28
2.3.10 Austausch von Reagenzien zwischen Tests und Chargen	29
2.3.11 Sicherheitshinweise	30
<b>2.4 Stoppen und Messen des ELISAs</b>	30
<b>2.5 Parallele Durchführung von Tests</b>	31
<b>3 Datenauswertung und Interpretation der Ergebnisse</b>	32
3.1 Bestimmung von unbekanntem Proben durch Standardkurven	32
3.2 Auswertung der ELISAs mittels Standardkurven	32
3.3 Standardkurven von Sandwich- und kompetitiven ELISAs	33
3.5 Bestimmung der Analytkonzentration	34
3.6 Messbereich und Verdünnungsfaktor	35
3.7 Einheiten und Dimensionen	35
3.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	36
3.9 Richtigkeit und Wiederfindung	37
3.10 Spezifität und Kreuzreaktivität	39
3.11 Interferenzen und Matrixeffekte	41

# 1 Grundlagen von ELISA

## 1.1 Antikörper-Antigen-Nachweis

Antikörper sind Proteine, die in Plasmazellen von Wirbeltieren als Teil des adaptiven Immunsystems gegen Strukturen (Antigene), die als körperfremd erkannt werden, produziert werden.

Antikörper binden über ein bestimmtes Muster von ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften an ihre Antigene. Die Wechselwirkung zwischen Antikörper und seinem Antigen ist selektiv, hochspezifisch und folgt dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) beruht auf dieser selektiven und spezifischen Antikörper-Antigenerkennung. Es wurden viele qualitative oder quantitative ELISA-Testformate eingeführt.

Eine Auswahl davon wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

Die Durchführung eines ELISA umfasst mindestens einen spezifischen Antikörper für ein bestimmtes Antigen. Ein Grundprinzip besteht darin, dass eine dieser immunologischen Komponenten in einer festen Phase, den Kavitäten einer Mikrotiterplatte, immobilisiert wird. Der Analyt (Antigen) aus der Probe tritt in Wechselwirkung mit dem Antikörper. Diese Wechselwirkung kann durch Enzyme visualisiert werden. Sie zeigen an, ob eine Antikörper-Antigen-Bindung stattgefunden hat. Ein zugegebenes Substrat wird durch das gekoppelte Enzym umgewandelt. Dies führt zu einer Farbänderung, die mit einem Spektralphotometer gemessen werden kann.

---

## 1.2 Analyt

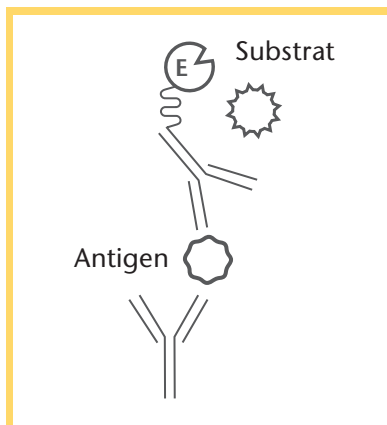
Der beanspruchte Analyt (Antigen) eines ELISA könnte sein:

- 1 Eine definierte chemische Substanz, z. B. Aflatoxin B1
- 2 Eine Gruppe von definierten chemischen Substanzen, z. B. Aflatoxine B1, B2, G1 und G2
- 3 Ein spezifisches Protein, z. B. Staphylococcus-Enterotoxin A
- 4 Eine Gruppe von spezifischen Proteinen, z. B. Staphylococcus-Enterotoxine A, B, C, D und E
- 5 Eine mehr oder weniger definierte Gruppe von Proteinen eines Nahrungsmittelrohstoffs, z. B. Caseine (als Teil der Milchproteine)
- 6 Ein Nahrungsmittelrohstoff, z. B. Erdnussprotein

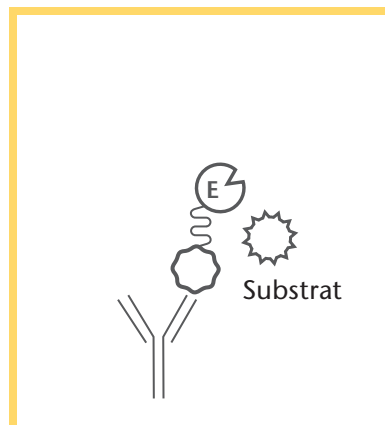
## 1.3 ELISA-Formate

Derzeit gibt es die folgenden drei verschiedenen Systeme (Abbildung 1 - 3): Sandwich-ELISA, kompetitiver und indirekt kompetitiver ELISA.

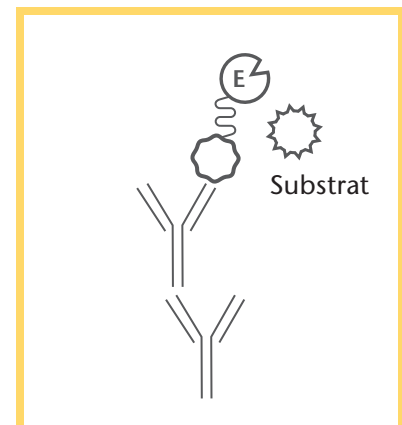
Bei jedem dieser Systeme erfolgt die Messung der optischen Dichte als indirektes Maß für die Menge eines Analyten.



**Abbildung 1:** Schematischer Aufbau des Sandwich-ELISA



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau des kompetitiven ELISA



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau des indirekten kompetitiven ELISA

### 1.3.1 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISAs werden häufig in der Proteinanalyse, z. B. bei Lebensmittelallergenen, eingesetzt. Der Analyt (Antigen) muss groß genug sein, um zwei Bindungsstellen (Epitope) aufzuweisen. Bei diesem Verfahren bindet ein spezifisches Antigen (Analyt) in der Probe an die Antikörper, die an die feste Phase einer Mikrotiterplatte (MTP) gebunden sind. Nach einem Waschschrift wird ein konjugierter Antikörper zugegeben, der an eine zweite Bindungsstelle (Epitop) des Antigens (Analyt) bindet.

Nach einem zweiten Waschschrift werden das Substrat und nach definierter Zeit die Stopp-Lösung zugegeben. Schließlich wird die optische Dichte (OD) gemessen. Die OD ist die Abschwächung bzw. der Intensitätsverlust von Licht beim Durchgang durch die (optisch aktive) Messlösung. Es wird als Vereinfachung häufig der Begriff „Absorption“ verwendet. Das Signal ist beim Sandwich-ELISA proportional zur Menge des Antigens (Analyt) (siehe Abbildung 1, Schritt 6, zweites Bild).

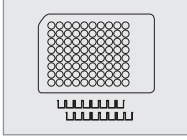
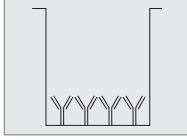
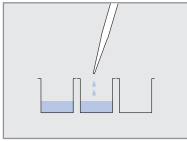
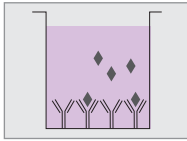

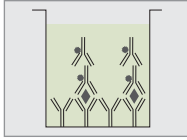
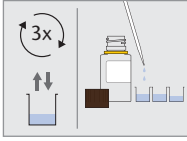
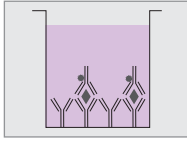
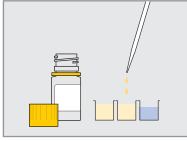
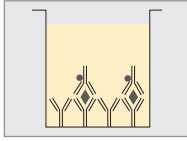
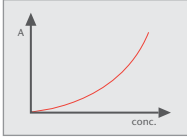
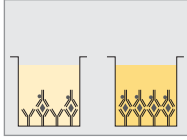
Testdurchführung		Testprinzip	
1	 <p>Setzen Sie die erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Rahmen ein.</p>	 <p>Die Mikrovertiefungen sind mit Antikörpern gegen das Zielprotein beschichtet.</p>	
2	 <p>100 µl des Standards oder der Probe zugeben.</p>	 <p>Standard und Proben werden in die jeweiligen Vertiefungen gegeben.</p>	
10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur.			
3	 <p>3-maliges Waschen mit Waschpuffer. 100 µl Antikörper-Enzym-Konjugat zugeben.</p>	 <p>Ungebundene Moleküle des Standards oder der Probe werden gewaschen. Es wird ein Konjugat zugegeben, das an das bereits gebundene Zielprotein bindet.</p>	
10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur.			
4	 <p>3-maliges Waschen mit Waschpuffer. 100 µl Red Chromogen Pro (Substrat/Chromogen) zugeben.</p>	 <p>Ungebundenes Konjugat wird gewaschen. Red Chromogen Pro (Substrat/Chromogen) wird zugegeben und ein Farbwechsel von Rot nach Blau erfolgt.</p>	
10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.			
5	 <p>100 µl Stopp-Lösung zugeben.</p>	 <p>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppt die Substrat/Chromogen-Reaktion und führt zu einem Farbwechsel zu Gelb.</p>	
6	 <p>Die Ergebnisse werden auf einem MTP-Reader bei 450 nm abgelesen.</p>	 <p>Je mehr Gelbfärbung, desto mehr Zielallergen ist in der Probe vorhanden.</p>	

Abbildung 4: Beispiel für Testdurchführung/-prinzip von RIDASCREEN® Allergen Sandwich-ELISA

### 1.3.2 Kompetitiver ELISA (Formate)

Für einen kompetitiven ELISA existieren verschiedene Formate.

Die Grundlage eines kompetitiven ELISAs (Abbildung 5) bildet ein Antikörper, der an die Oberfläche der Vertiefung einer Mikrotiterplatte gebunden ist. Der Analyt aus der Probe und

das Enzym-Analyt-Konjugat konkurrieren in der Vertiefung um die Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift wird das Substrat zugegeben. Der gemessene OD-Wert ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Je höher die Konzentration des Analyten, d. h. je mehr Analyt vorhanden,



desto kleiner ist der OD-Wert. Dieses Verfahren ist zur Messung von Proben mit nur einem Epitop, sowie von kleinen Analyten wie Mykotoxinen oder Antibiotika geeignet.

Es gibt auch kompetitive ELISA, bei denen das Antigen an die MTP-Vertiefung gebunden ist. Dies ist bei dem Testkit RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) der Fall.

Der Unterschied des direkten zum indirekten kompetitiven ELISA (Abbildung 3) besteht darin, dass ein zusätzlicher Fänger-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden ist.

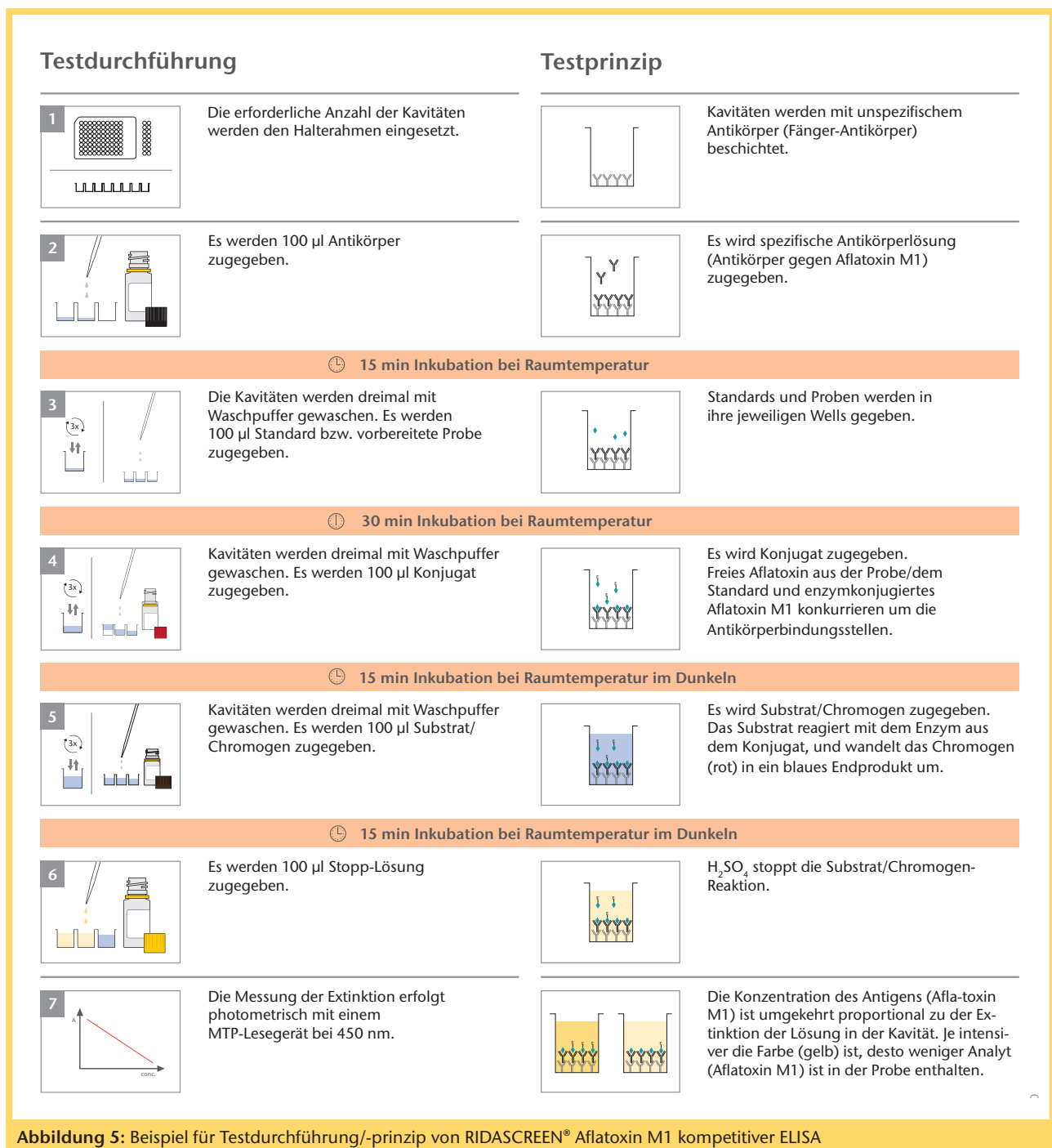


Abbildung 5: Beispiel für Testdurchführung/-prinzip von RIDASCREEN® Aflatoxin M1 kompetitiver ELISA

## 1.4 ELISA-Komponenten

Für ein ELISA-Testsystem werden verschiedene Komponenten benötigt: zumeist Mikrotiterplatten, (MTP), Konjugat und Substrat, Standards (Kalibratoren), Puffer und Stopp-Lösung. Auch zu pipettierender Antikörper und Extraktoren können enthalten sein. Darüber hinaus ist es wichtig, Kontrollen einzusetzen, um zu gewährleisten, dass die Testdurchführung korrekt durchgeführt wurde.

---

### 1.4.1 Mikrotiterplatte (MTP)

Die MTP (96 oder 48 Kavitäten) ist die Basis für die Analyse. In jeder Kavität sind Antikörper oder Antigen (je nach Format) an die Oberfläche gebunden.

Ein häufig verwendetes Plattenmaterial ist Polystyrol, obwohl auch andere Materialien verwendet werden können. Das Material wird durch  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Strahlung vom Hersteller dieser Platten aktiviert.

Ohne diese Aktivierung tritt keine oder nur eine geringe Bindung von Antikörpern oder Antigenen auf. (MTP-Vorplatten (z. B. zur Verwendung bei Allergenen) sind in der Regel nicht aktiviert.)

In jeder Kavität findet die Antigen-Antikörper-Reaktion und die Konjugat-Substrat-Reaktion statt. Schließlich wird die Reaktion mit einer spezifischen Stopp-Lösung beendet und die optische Dichte gemessen.

---

### 1.4.2 Konjugat und Substrat

Antikörper oder Analyte, die an ein Enzym gekoppelt sind, werden als Konjugate bezeichnet. Das gekoppelte Enzym (häufig Phosphatase) wandelt sein spezifisches Substrat in ein bläulich gefärbtes Produkt um.

Das Substrat ist zumeist eine Wasserstoffperoxid/Chromogen-Mischung, die mit dem Konjugat-Enzym reagiert. Das Ergebnis ist eine farbige Lösung, deren optische Dichte gemessen werden kann.

### 1.4.3 Standards (Kalibrator)

Alle quantitativen ELISA-Systeme werden mit Standards kalibriert. Daher werden mit unbekanntem Konzentrationen sowie eine Reihe von Standards mit bekannten Konzentrationen parallel auf einer Platte analysiert. Das Ergebnis ist eine Kalibrationskurve (mit der zugehörigen mathematischen Formel), die aus den gemessenen OD-Werten und den Konzentrationen der Standards (Abbildung 6; Abbildung 22) aufgebaut ist. Auf dieser Basis kann die Konzentration des Analyten in der Probe berechnet werden.

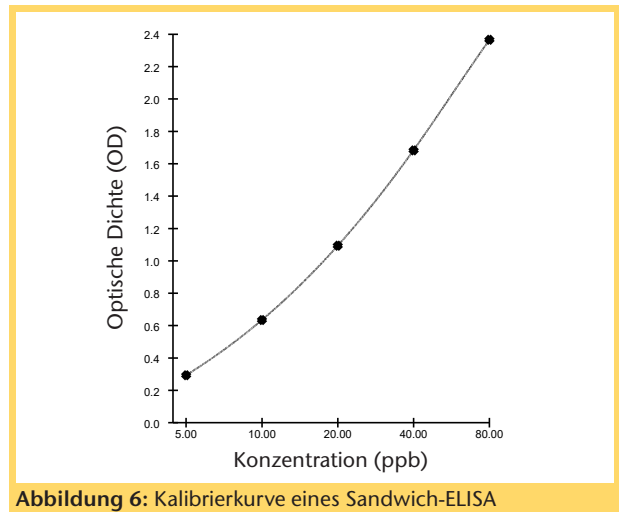


Abbildung 6: Kalibrierkurve eines Sandwich-ELISA

### 1.4.4 Puffer

Alle ELISA-Systeme enthalten Komponenten biologischen Ursprungs. Zur Langzeitlagerung dieser Komponenten und für eine ordnungsgemäße Funktion während des Testverfahrens müssen der pH-Wert und die Ionenstärke konstant sein. Oft hat auch die Art der Pufferkomponente einen Einfluss auf die Leistung des Testkits.

Der Einfachheit halber sind diese Puffer gebrauchsfertig oder als Konzentrate in den Testkits enthalten. Sie werden auch zur Probenvorbereitung und für Waschverfahren der Mikrotiterplatten verwendet.

### 1.4.5 Stopp-Lösung

Die Stopp-Lösung beendet die Enzym-Konjugat-Reaktion. In den meisten Fällen wird Schwefelsäure niedriger Konzentrationen verwendet.

Durch das Stoppen der Reaktion ändert sich die Farbe von Blau nach Gelb und bleibt bis zur OD-Messung innerhalb von 10 Minuten stabil.

### 1.4.6 Zusätzliche Komponenten

Für die meisten Systeme wird eine Positiv- und eine Negativkontrolle empfohlen. Positivkontrollen können mit einer geeigneten Dotierlösung hergestellt werden.

Diese und weitere zusätzliche Komponenten sind regulär nicht in R-Biopharm ELISA-Testkits enthalten. Ausnahmen stellen Test-spezifische Extraktoren und ungebundener Antikörper dar.

---

## 1.5 Laborgeräte und ihre Wartung

Je nach Anforderungen des Testsystems werden unterschiedliche spezialisierte Laborgeräte für die verschiedenen Schritte benötigt, wie z. B. Pipetten, Geräte zum Waschen der Platten, Inkubatoren für eine konstante Temperatur, ELISA-Reader und eine Software zur Berechnung und Auswertung von Konzentrationen. Allerdings werden nicht alle der hier erwähnten Geräte für jedes Testsystem

benötigt. In jedem Fall ist eine regelmäßige Wartung und Kalibrierung der eingesetzten Maschinen und Laborgeräte erforderlich, um eine hohe Präzision der Ergebnisse zu gewährleisten. Bitten Sie den Hersteller um das Kalibrierintervall und nehmen Sie dieses in Ihre Qualitätsprüfpläne auf.

### 1.5.1 Pipetten

Pipetten werden verwendet, um ein genau definiertes Volumen einer Lösung (z. B. in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte) zu übertragen. Pipetten und deren Anwendung sind von entscheidender Bedeutung für Ergebnisse hoher Genauigkeit. Daher sind eine richtige Pipettier-technik, sowie eine regelmäßige Kalibrierung der Pipetten wichtig. Es gibt verschiedene Arten von Pipetten:

- Einkanalpipetten mit festem Volumen, z. B. 50 µl.
- Einkanalpipetten (z. B. mit variablen Volumina zwischen 10 und 100 µl), die normalerweise für Proben und Standards verwendet werden.
- Multistepper-Pipetten (mit der Möglichkeit, ein bestimmtes Volumen mehrmals zu pipettieren), die normalerweise für die Zugabe von Antikörper- oder Konjugatlösungen verwendet werden.
- Mehrkanalpipetten (mit der Möglichkeit, die Lösung gleichzeitig in 8 oder 12 Kavitäten zu pipettieren), die normalerweise für Waschschriffe oder die Zugabe von Antikörper- oder Konjugatlösungen verwendet werden.
- Flaschenaufsatz-Dispenser (werden gewöhnlich für Waschschriffe verwendet).
- Vollautomaten (alle Pipettier- und Inkubationsschritte werden automatisch durchgeführt).

### 1.5.2 ELISA-Plattenwaschanlage – automatische Systeme

Nach jedem Inkubationsschritt (außer der Inkubation mit dem Substrat) muss die ELISA-Platte mit Waschpuffer gewaschen werden. Waschen ist ein entscheidender Schritt bei der Durchführung eines ELISAs, um Ergebnisse mit hoher Genauigkeit zu erhalten.

Das Waschen kann manuell mit einer 8-Kanal-Pipette oder einer 8-Kanal-Pipettiereinheit durchgeführt werden (siehe Abbildung 18, Kapitel 2.3.6 Allgemeine Testhandhabung).

Manchmal werden automatische ELISA-Plattenwaschanlagen verwendet.

Die Waschanlagen dispensieren, weichen ein und saugen dann in Sekundenschnelle Waschpuffer von der Platte ab. Bei der Verwendung solcher Geräte ist eine gründliche Reinigung der Waschanlage wichtig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers bezüglich der Reinigung zwischen verschiedenen Läufen.

Der Waschvorgang ist ein wichtiger Schritt und muss validiert werden, wenn er von der beschriebenen Produktinformation abweicht.

### 1.5.3 Mikrotiterplatten (MTP)-Reader für ELISA

Der ELISA-Reader ist ein Spektralphotometer, mit dem die optische Dichte (OD) gemessen wird. Um die Konzentration einer Probe zu berechnen, wird eine Kalibrierkurve ermittelt.

Die regelmäßige Überprüfung und Kalibrierung (durch Fachpersonal) ist wichtig für genaue Ergebnisse. Der RIDA® ABSORBANCE 96 (Art. Nr. ZRA96FF) ist ideal für die R-Biopharm Testkits (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: RIDA® ABSORBANCE 96, Art. Nr. ZRA96FF

### 1.5.4 Automatisierung

Eine Möglichkeit für die Arbeit mit einem ELISA ist die Verwendung eines automatisierten Systems, mit dem Sie Ihre Probenextrakte ohne manuelle Schritte testen können. Daher muss das automatisierte System für Ihr Testsystem

verifiziert und kalibriert werden. Beispiele für die Automatisierung sind der ThunderBolt® und Bolt™. Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).



Abbildung 8: Bolt™, Art. Nr. ZBOLT



Abbildung 9: ThunderBolt®, Art. Nr. ZTB

### 1.5.5 Zusätzliche Geräte

Bei einigen Tests wird ein Inkubator benötigt, um eine stabile Temperatur während des Testlaufs zu gewährleisten. In manchen Fällen sind eine Versiegelung oder eine Schutzplattenabdeckung notwendig, um Verdampfung oder Kontamination zu vermeiden.

## 1.6 Gute Laborpraxis (GLP)

Je nach Toxizität und Infektiosität der verwendeten Materialien sind verschiedene Grade von Schutzmaßnahmen erforderlich, um die Gesundheit und Sicherheit des Benutzers zu gewährleisten. Allerdings wird bereits eine elementare Schutzkleidung benötigt, um Kontaminationen zu vermeiden, die zu falschen Ergebnissen führen würden. Die folgende Ausrüstung ist eine Mindestanforderung für jedes Labor:

- Laborkittel
- Handschuhe
- Augenschutz
- Abzug (empfohlen)

Dennoch ist es notwendig, die Sicherheitsdatenblätter (SDS) für alle verwendeten Chemikalien und Substanzen sorgfältig zu lesen. Das Sicherheitsdatenblatt enthält Informationen über die Gefahren bei der Arbeit mit einer bestimmten Substanz, erforderliche Schutzmaßnahmen, sowie erforderliche Maßnahmen in Notfällen.

Die Sicherheitsdatenblätter sind auf unserer Homepage [www.food.r-biopharm.com/de](http://www.food.r-biopharm.com/de) bei den Produktseiten geführt und auf Anfrage ([info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)) für jedes Produkt erhältlich.

## 1.7 Kennzeichnung der Testkits

Um die korrekte Handhabung und Lagerung Ihrer Komponenten zu gewährleisten, lesen Sie bitte die Durchführungsanweisungen des jeweiligen Testkits. Folgende Informationen sind auf allen Komponenten angegeben (falls zutreffend):

- Produktname
- Chargen-Nummer
- Artikel-Nummer
- Lagertemperatur
- Name der Komponente
- Konzentration

Die Beachtung des Verfallsdatums ist besonders wichtig, dieses befindet sich auf dem Außenetikett angegeben. Nach Ablauf des Verfallsdatums darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

## 2 Probenvorbereitung und Testdurchführung

### 2.1 Pipettiertechnik

Genaueres und präziseres Pipettieren ist von entscheidender Bedeutung bei der ELISA-Analytik. Ein kleiner Fehler beim Pipettieren kann bei kleinen Volumina große Unterschiede bei den endgültigen Testergebnissen zur Folge haben. Gehen Sie beim Pipettieren gleichmäßig vor und ändern Sie während des Pipettierens eines Assays nicht die Technik. Bereiten Sie das Pipettieren vor. Legen Sie z. B. sämtliche Standards in eine Reihe und ordnen Sie alle Proben gleichmäßig an, um einheitlich pipettieren zu können. Sorgen Sie dafür, dass genug Pipettenspitzen vorbereitet sind und ein Abfallbehälter bereitsteht.

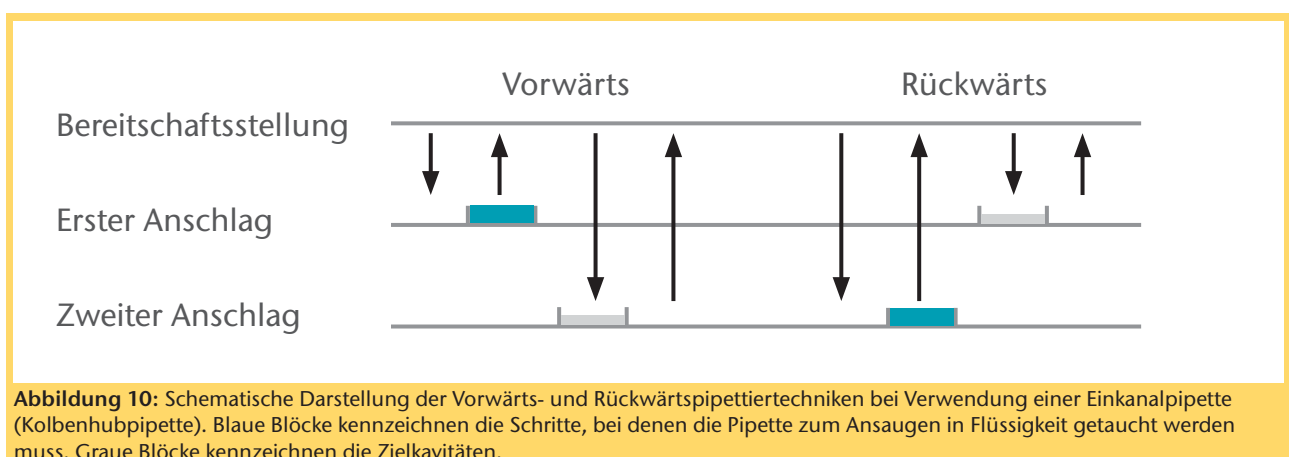
Die beiden für ELISA verwendeten Pipettieretechniken sind Vorwärtspipettieren (Standardpipettieren) und Rückwärtspipettieren. Die Vorwärtspipettiertechnik wird für wässrige Lösungen empfohlen. Bei dieser Technik können einige Flüssigkeiten beim Pipettieren Blasen oder Schaum bilden. Als Alternative verringert Rückwärtspipettieren dieses Risiko und wird für Flüssigkeiten mit höherer Viskosität empfohlen. Es erfordert jedoch ein größeres Flüssigkeitsvolumen als benötigt (Totvolumen) und ist fehleranfälliger bei hohem Volumentransfer.

#### 2.1.1 Allgemeine Pipettieranweisungen

Das Vorwärtspipettieren ist eine Technik zum Dispensieren einer abgemessenen Flüssigkeitsmenge mithilfe einer Luftverdrängungspipette. Diese Technik wird hauptsächlich für wässrige Lösungen wie Puffer oder verdünnte Säuren oder Laugen empfohlen. Bei Lösungen mit hoher Viskosität oder Neigung zur Schaumbildung ist das Rückwärtspipettieren besser geeignet.

Bevor Sie mit dem Pipettieren mit einer einstellbaren Pipette beginnen:

1. Auf das gewünschte Volumen einstellen
2. Eingestelltes Volumen prüfen





### 2.1.2 Vorwärtspipettieren mit Laborpipetten

- 1 Stecken Sie eine neue Spitze auf Ihre Pipette und überprüfen diese auf festen Sitz.
- 2 Drücken Sie den Bedienknopf bis zum **ersten** Anschlag.
- 3 Spülen Sie die Pipettenspitzen vor dem Gebrauch. Pipettenspitzen einiger Hersteller müssen vor der Aufnahme und Abgabe der entsprechenden Flüssigkeit gespült werden. Bitte lesen Sie das zugehörige Handbuch. Spülen Sie im Zweifelsfall die Spitze vor dem Pipettieren.
- 4 Halten Sie die Pipettenspitze ca. 1 cm tief in die Flüssigkeit. Führen Sie den Bedienknopf langsam in die Bereitschaftsstellung und warten Sie, bis das gewünschte Flüssigkeitsvolumen angesaugt worden ist. Achten Sie darauf, dass weder Blasen noch Schaum in der Pipette auftreten.
- 5 Entfernen Sie überschüssige Flüssigkeit von der Außenseite der Spitze, indem Sie das Teströhrchen mit der Spitze berühren.
- 6 Dispensieren Sie die Flüssigkeit in die gewünschte Kavität, indem Sie den Bedienknopf bis zum **zweiten** Anschlag drücken.
- 7 Entsorgen Sie die Spitze im Abfall.

### 2.1.3 Rückwärtspipettieren mit Laborpipetten

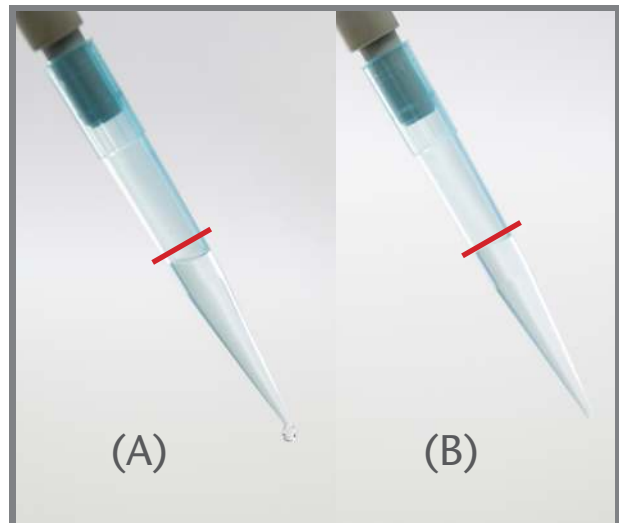
- 1 Stecken Sie eine neue Spitze auf Ihre Pipette und überprüfen Sie diese auf festen Sitz.
- 2 Spülen Sie die Pipettenspitzen vor dem Gebrauch. Drücken Sie den Bedienknopf bis zum **zweiten** Anschlag.
- 3 Tauchen Sie die Pipette in die Flüssigkeit ein. Führen Sie den Bedienknopf langsam in die Bereitschaftsstellung und warten Sie, bis das gewünschte Flüssigkeitsvolumen angesaugt worden ist. Achten Sie darauf, dass weder Blasen noch Schaum in der Pipette auftreten.
- 4 Entfernen Sie überschüssige Flüssigkeit von der Außenseite der Spitze.
- 5 Dispensieren Sie die Flüssigkeit in die gewünschte Kavität, indem Sie den Bedienknopf bis zum ersten Anschlag drücken. Achten Sie darauf, dass keine Flüssigkeit an der Außenseite der Spitze zurückbleibt.
- 6 Für wiederholtes Pipettieren von Flüssigkeit drücken Sie den Bedienknopf bis zum **ersten** Anschlag und wiederholen Sie die Schritte 3 bis 5.
- 7 Entsorgen Sie die Spitze im Abfall.

## 2.1.4 Pipettieren von organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel zeigen hohe Dampfdrücke, die ein präzises Pipettieren beeinflussen können. Die Verwendung von Pipetten mit der Luftverdrängungstechnik für den Transfer von organischen Lösungsmitteln kann zur Verdampfung des Lösungsmittels oder zu einem Austreten aus der Spitze führen (Abbildung 11). Wir empfehlen für das Pipettieren von organischen Lösungsmitteln:

- 1 Multistep-Pipetten, welche die positive Verdrängungstechnik verwenden.
- 2 Serologische Pipetten für größere Proben volumina, da die Teilung das Pipettieren genauer Volumina ermöglicht.
- 3 Flaschenaufsatz-Dispenser.
- 4 Speziell für die Handhabung von organischen Lösungsmitteln konzipierte Pipetten.

Wenn Einkanalpipetten für den Transfer von organischen Lösungsmitteln verwendet werden, müssen Pipettenspitze und Luft im Inneren der Pipette vor dem Pipettieren des gewünschten Volumens mit organischem Lösungsmitteldampf gesättigt sein.



**Abbildung 11:** Pipettieren von organischen Lösungsmitteln mit Pipetten mit der Luftverdrängungstechnik. Besondere Vorsicht ist geboten, um Verdampfen in die Spitze und Austreten aus der Spitze (A) zu verhindern. Spülen der Pipette vor dem Flüssigkeitstransfer hilft, um das richtige Volumen (B) zu transferieren.

Saugen Sie daher das organische Lösungsmittel mindestens 3 Mal an und lassen es wieder ab, bevor Sie das gewünschte Volumen transferieren. Verwenden Sie geeignete Qualitätskontrollverfahren, um die Richtigkeit dieser Art der Pipettierschritte zu überwachen.

## 2.1.5 Gute Pipettiertechniken zur Verbesserung der Pipettierleistung

### Eintauchtiefe

Nur das obere Ende der Pipettenspitze wird in die Standard- oder Probenlösung eingetaucht (siehe Abbildung 12a). Bei zu tiefem Eintauchen wird zu viel Flüssigkeit angesaugt und es können Flüssigkeitstropfen auf der Außenseite der Pipettenspitze zurückbleiben. Wenn sich die Pipettenspitze zu nah an der Oberfläche befindet, kann Luft angesaugt werden.

### Rhythmus und Geschwindigkeit

Ein gleichmäßiger Pipettier-Rhythmus trägt dazu bei, ruckartiges Ansaugen von Luft zu vermeiden (siehe Abbildung 12b). Drücken Sie den Bedienknopf und führen Sie ihn dann langsam zurück. Dadurch wird vermieden, dass ruckartig Luft angesaugt wird, Flüssigkeit nach oben schießt und so das Innere der Pipette kontaminiert.

### Vorspülen

Das Vorspülen gleicht die Lufttemperatur und den Druck im Inneren der Spitze an die Temperatur der Probe an. Während des Vorspülens wird der Kolben 2 bis 3 Mal gedrückt und wieder losgelassen (Abbildung 12c).

### Eintauchwinkel

Am besten ist es, die Pipette fast senkrecht zu halten. Alles, was mehr als  $20^\circ$  von der Senkrechten entfernt ist, beeinträchtigt die Genauigkeit beim Pipettieren (siehe Abbildung 12d).

### Dispensieren

Zum Freigeben von Proben- oder Standardlösung halten Sie die Pipettenspitze nah an die Wand der Vertiefung (siehe Abbildung 12e).

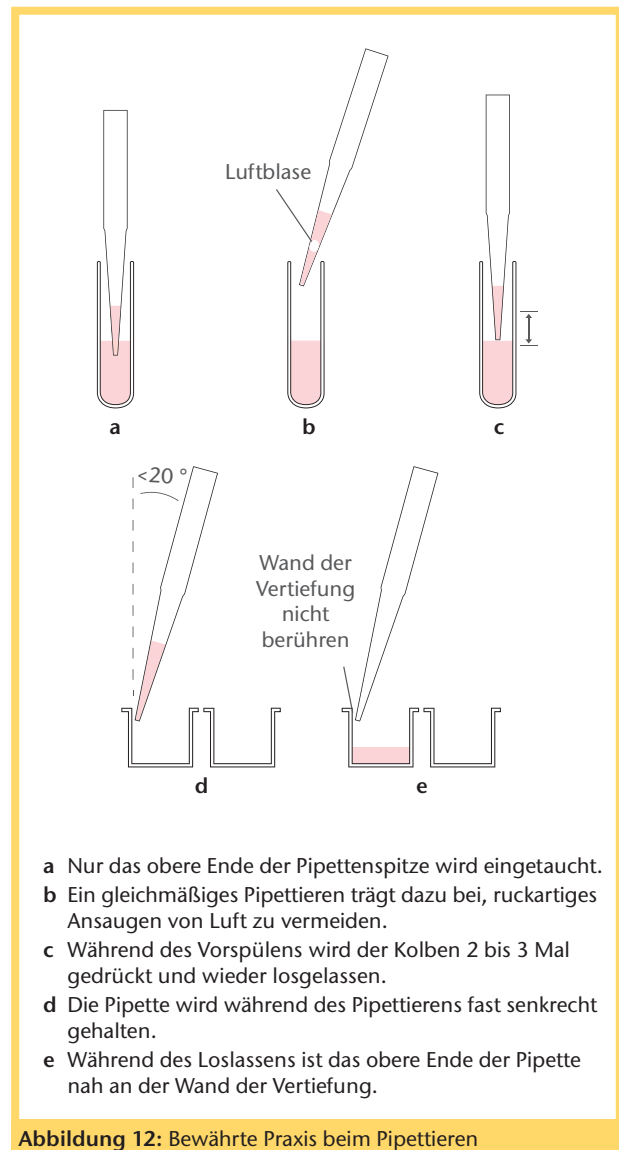


Abbildung 12: Bewährte Praxis beim Pipettieren

## 2.2 Handhabung der Proben

### 2.2.1 Lagerung der Proben

Eine unerwünschte Kontamination von Proben kann die Testergebnisse signifikant beeinflussen. Verwenden Sie die Probe bei Anzeichen von unerwünschter Kontamination oder Verderb nicht und fordern Sie eine neue Probe an. Lagern Sie die Probe gemäß Herstellerangaben oder nach besten wissenschaftlichen Erkenntnissen. Generell sollten Proben, wann immer möglich, vorbereitet und sofort getestet werden. Wenn eine Lagerung

nicht vermieden werden kann, achten Sie auf optimale Lagerungsbedingungen und analysieren Sie die Proben so schnell wie möglich. Alle Proben sollten ordnungsgemäß gekennzeichnet und versiegelt werden, um Verdampfen oder Austrocknen zu vermeiden. Unsachgemäße Lagerungsbedingungen können eine spätere Analyse beeinflussen und Testergebnisse verändern.

---

### 2.2.2 Probennahme

Eine repräsentative Probe ist von besonderer Wichtigkeit und das Ziehen / Nehmen dieser ein entscheidender Schritt. Bei einigen Parametern gelten Rechtsvorschriften, die beschreiben wie die repräsentative Probennahme zu erfolgen ist (z. B. bei Mykotoxinen). Bitte halten Sie diese Vorschriften genau ein.

Wenn keine Vorschriften gelten, sollten die Proben weitestgehend homogenisiert werden. Informieren Sie einen Kunden im Vorfeld über eine Mindestprobenmenge. Erklären Sie außerdem im Testbericht, dass sich das Ergebnis nur auf die Probe bezieht, die eingeschickt worden ist.

---

### 2.2.3 Probenvorbereitung

Befolgen Sie genau die in der Durchführungsanweisung beschriebene Probenvorbereitung, die mit dem Testkit mitgeliefert wird. Die Probenvorbereitung umfasst normalerweise die Homogenisierung und Extraktion des Analyten. Änderungen oder Abweichungen können zu falschen Testergebnissen führen. Verwenden Sie nur geeignete und gewartete Geräte zur Probenvorbereitung.

Wenden Sie sich für Fragen bitte an R-Biopharm ([info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)).

Je nach zu testendem Parameter kann die Durchführungsanweisung Informationen darüber enthalten wie vorbereitete Proben zur späteren Analyse gelagert werden können. Bitte befolgen Sie sorgfältig diese Anweisung oder bereiten Sie Proben direkt vor der Analyse vor.

## 2.2.4 pH-Wert

Eine repräsentative Probe ist von besonderer Wichtigkeit und das Ziehen / Nehmen dieser ein entscheidender Schritt. Bei einigen Parametern gelten Rechtsvorschriften, die beschreiben wie die repräsentative Probennahme zu erfolgen ist (z. B. bei Mykotoxinen). Bitte halten Sie diese Vorschriften genau ein.

Wenn keine Vorschriften gelten, sollten die Proben weitestgehend homogenisiert werden. Informieren Sie einen Kunden im Vorfeld über eine Mindestprobenmenge. Erklären Sie außerdem im Testbericht, dass sich das Ergebnis nur auf die Probe bezieht, die eingeschickt worden ist

## 2.2.5 Verwendung von eingefrorenen Proben

Vor der weiteren Verwendung sind eingefrorene Proben vollständig aufzutauen. Das Auftauen von eingefrorenen Proben sollte, je nach Stabilität des Analyten, bei 4 °C oder bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Im Falle von unvorbereiteten, nicht-flüssigen Proben lesen Sie die Durchführungsanweisung für die weitere Probenvorbereitung und Homogenisierung.

Flüssige Proben sind gründlich zu durchmischen und zu homogenisieren, bevor sie zur Analyse verwendet werden können. Um eine homogene Probe zu erreichen, vortexen oder invertieren Sie die Probe vorsichtig. Schaumbildung oder

intensives Mischen sollten vermieden werden, da dies die Proteine denaturieren könnte.

Vor der Analyse kann eine weitere Probenvorbereitung von flüssigen Proben (z. B. im Fall von Milch) erforderlich sein. Bitte lesen Sie die Durchführungsanweisung für weitere Informationen.

Je nach Probe kann das Einfrieren und Auftauen zu Kristallbildung oder Koagulation führen. Vermeiden Sie möglichst Einfrier-/Auftauzyklen, da diese die Integrität der Probe und Testergebnisse verändern können. Wenn möglich, aliquotieren Sie flüssige Proben vor der Lagerung bei -20 °C, um unnötige Einfrier-/ Auftauzyklen zu vermeiden.

## 2.2.6 Zertifiziertes Referenzmaterial

Zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM oder CRM) sind natürlich kontaminierte, homogene Matrices, deren Analytgehalt exakt und zuverlässig mittels Referenzmethodik bestimmt wurde (Abbildung 13). Die regelmäßige Verwendung von ZRM wird für die Qualitätssicherung zur Sicherstellung der Rückverfolgbarkeit empfohlen. Dies ermöglicht die Überprüfung der Richtigkeit und Präzision der experimentellen Verfahren und die Prüfung des Handhabungsgeschicks. Wenn kein Referenzmaterial zur Verfügung steht, wird die Verwendung von Kontrollproben oder Matrices, die mit definierten Analytkonzentrationen versetzt sind (Dotierung), empfohlen.

Trilogy® Analytical Laboratory ist einer der wenigen Hersteller von zertifizierten, natürlich kontaminierten Referenzmaterialien und zertifizierten Mykotoxin-Standards. Zusätzlich stehen natürlich kontaminierte



Abbildung 13: R-Biopharm bietet eine große Auswahl an ZRM für die Mykotoxinanalyse an.

Qualitätskontrollmaterialien und analytische Standards für die tägliche Qualitätssicherung zur Verfügung.

Auch für den Bereich der Allergene bietet Trilogy® Analytical Laboratory zertifiziertes Referenzmaterial an.

## 2.3 Vorbereitung und Handhabung der Komponenten

### 2.3.1 Lagerung der Kits

Das Verfallsdatum auf dem äußeren Etikett gilt für alle im Kit enthaltenen Reagenzien. Um die Haltbarkeit zu erhalten, lagern Sie das Kit bei den auf dem Außenetikett vermerkten Bedingungen (Abbildung 14).

Die meisten Kits sind an einem trockenen Ort bei 2 bis 8 °C zu lagern. Ein Einfrieren der Komponenten sollte vermieden werden. Wenn Sie einen Kühlschrank für die Lagerung verwenden, achten Sie darauf, die Kits nicht in der Nähe der Rückwand zu lagern, um ein Einfrieren zu verhindern. Unsachgemäße Lagerung von Kits oder Komponenten kann zu Schäden führen. Das Einfrieren von Testkomponenten kann die Testleistung verringern und zu ungültigen Testergebnissen oder – im Extremfall – zu nicht funktionierenden Testkits führen. Indikatoren für die falsche Lagerung sind eine verringerte oder nicht nachweisbare optische Dichte und eine Veränderung der Testergebnisse.

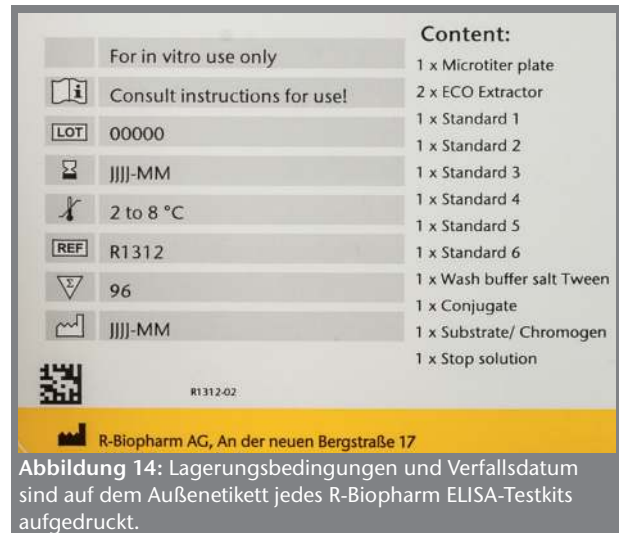


Abbildung 14: Lagerungsbedingungen und Verfallsdatum sind auf dem Außenetikett jedes R-Biopharm ELISA-Testkits aufgedruckt.

### 2.3.2 First in – first out (FIFO)

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Außenetikett der Testpackung aufgedruckt. Mindestens bis zu diesem Datum funktioniert das Kit innerhalb der Spezifikationen. Darüber hinaus verfügt jede Kitkomponente über ihr eigenes Verfallsdatum, das mit dem Verfallsdatum des Testkits identisch ist oder dieses sogar überschreitet.

Wenn mehr als ein Kit vorhanden ist, wird empfohlen, nach dem FIFO-Prinzip vorzugehen. Das heißt, das Kit mit dem kürzesten Verfallsdatum auf dem Außenetikett sollte zuerst verwendet werden. Wir empfehlen, das Datum der ersten Verwendung auf dem Außenetikett der Kit-

schachtel anzugeben, um eine Verwechslung zu vermeiden. Außerdem ist ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern nicht zulässig.

Das ELISA-Kit sollte möglichst wenig Kalt-/Warm-Zyklen ausgesetzt werden. Wir empfehlen daher, Proben zu sammeln. Das Testen von größeren Probenzahlen auf einmal reduziert den Zeitaufwand pro Probe. Testen Sie lieber größere Probenzahlen auf einmal, anstatt nur wenige Proben nacheinander zu testen. Bitte lesen Sie die Durchführungsanweisung für die entsprechenden Einschränkungen.

### 2.3.3 Vorwärmung

Alle Reagenzien sollen auf Raumtemperatur gebracht werden, bevor sie im Test verwendet werden. Nehmen Sie alle Komponenten vor dem Gebrauch aus der Testpackung und lassen Sie sie Raumtemperatur (20 - 25 °C) annehmen (Abbildung 15). Größere Flaschen und Volumina benötigen evtl. mehr Zeit, um Raumtemperatur zu erreichen. Überprüfen Sie im Zweifelsfall die Temperatur der Komponenten.

Nach Gebrauch wird empfohlen, alle Komponenten wieder in die Kitschachtel zu geben, um das unbeabsichtigte Vermischen von Komponenten mit denen anderer Kits oder Chargen zu vermeiden. Bringen Sie das Kit so schnell wie möglich wieder auf die empfohlenen Lagerungsbedingungen (siehe Außenetikett des Kits für Lagerungsbedingungen).



Abbildung 15: Bringen Sie alle Komponenten des Testkits vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur und führen Sie den Test bei 20 bis 25 °C durch.

### 2.3.4 Temperaturkontrolle

ELISA-Tests sind sensitiv gegenüber Temperaturschwankungen. Versuchen Sie daher, die Laborbedingungen zu stabilisieren und zu kontrollieren. Dies schließt die Temperatur bei der photometrischen Analyse ein. Führen Sie ELISA-Tests zwischen 20 und 25 °C durch und vermeiden Sie Bedingungen, die die Temperatur stark verändern oder die Verdunstung verstärken können.

ELISA-Tests sollten vor direkter Sonneneinstrahlung und Belüftung geschützt werden. Kalte Labormaterialien und kalte Labortische können auch die Temperatur beeinflussen. Es ist hilfreich, die Mikrotiterplatte von der Labortischoberfläche zu isolieren, indem der Test auf einer geeigneten Unterlage durchgeführt wird. Eine kostengünstige und einfache Lösung ist die Verwendung von Papierhandtüchern.



### 2.3.5 Vermeidung von Kontamination und Verwechslung der Proben

Eine saubere und reproduzierbare Arbeitsweise ist für optimale Ergebnisse in der Lebens- und Futtermittelanalyse von entscheidender Bedeutung. Eine sehr häufige Quelle für Kontaminationen sind unzureichend saubere und wiederverwendbare Labormaterialien. Um dies zu vermeiden, wird dringend empfohlen, lösungsmittelbeständige Einmal-Labormaterialien zu verwenden. Ist dies nicht möglich, sollten wiederverwendbare Labormaterialien laborsteril und frei von Verunreinigungen sein. Wir empfehlen die Verwendung einer Laborspülmaschine oder eines gleichwertigen Geräts. Benutzen Sie Qualitätskontroll-Blindproben, um auf Kontaminationen zu überprüfen.

Reagenzien sollten mit kalibrierten Geräten, sauberen Pipetten und Behältern gehandhabt werden. Entnehmen Sie nur die benötigte Menge Reagenz und geben Sie keine Reagenzien zurück in den Behälter, nachdem sie entnommen wurden.



Abbildung 16: Kennzeichnen Sie alle verwendeten Behälter sorgfältig und dokumentieren Sie Ihre Beschriftung.

Verwenden Sie separate Behälter und Pipettenspitzen für jedes Reagenz, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

Achten Sie darauf, dass Sie alle Behälter richtig kennzeichnen (Abbildung 16). Tauschen Sie die Einmal-Labormaterialien so oft wie nötig aus.

### 2.3.6 Allgemeine Testhandhabung

Bevor Sie beginnen, lesen Sie die dem Testkit beigelegte Durchführungsanweisung. Bereiten Sie alle Extraktionslösungen und Puffer gemäß dieser Anweisung vor und halten Sie die beschriebenen Verfahren ein, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Um eine ungehinderte Testdurchführung zu ermöglichen, ist es hilfreich, ein Pipettierschema zu erstellen, bevor Sie mit Ihrem Experiment beginnen.

Je nach ELISA sind die Antikörper- und Konjugatlösungen vor der Verwendung zu verdünnen.

Diese Verdünnungen sind direkt vor der Verwendung herzustellen und sind nicht zur weiteren Verwendung geeignet. Verunreinigte oder falsch gelagerte Konjugatlösungen können eine verringerte Enzymaktivität aufweisen oder ein Hintergrundsignal verursachen.

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten Testproben und Kontrollproben (Standards, Referenzproben) im gleichen Verdünnungsmittel zur Verfügung stehen. Dies wird durch eine strenge Einhaltung des Probenvorbereitungsprotokolls

gewährleistet. Das Pipettieren auf die Platte ist bei jedem Schritt des Testverfahrens schnell und ohne Unterbrechungen durchzuführen.

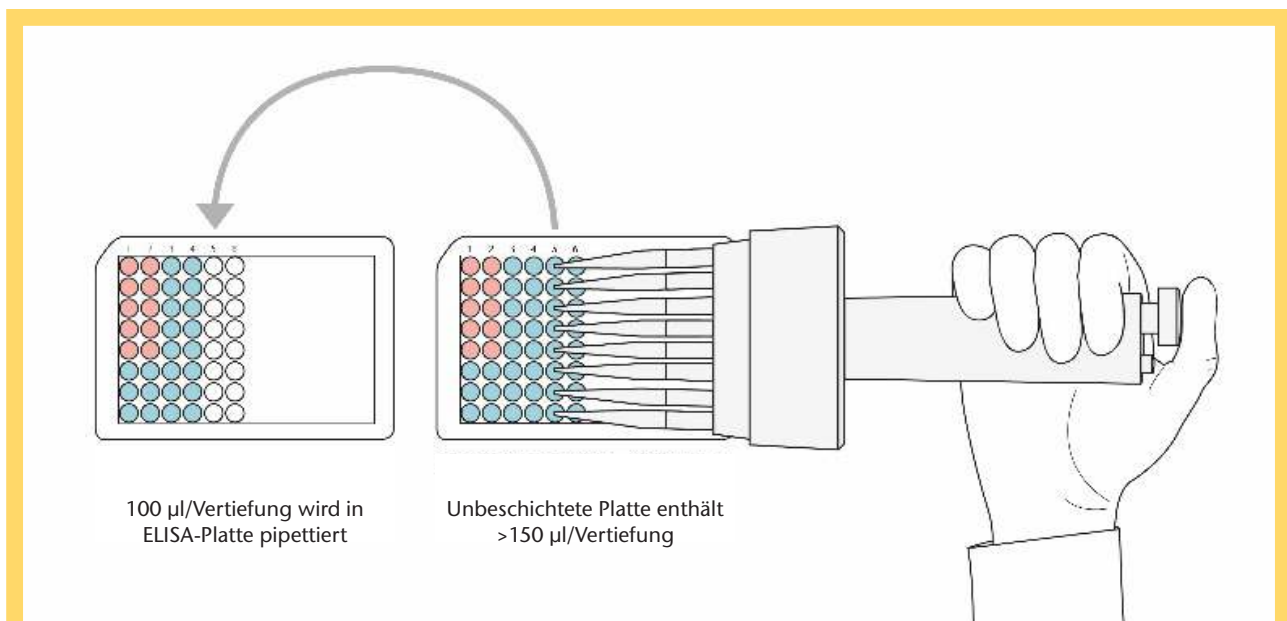
Wir empfehlen für den Probentransfer Einkanalpipetten oder bei Verwendung einer Vorverdünnungsplatte eine Mehrkanalpipette. Vorverdünnungsplatten kommen insbesondere bei Allergen-Proben zum Einsatz. Zum Pipettieren von Antikörper- und Enzymlösungen sind Multistepper-Pipetten die beste Wahl.

Ein Austrocknen der Kavitäten muss zwischen den einzelnen Handhabungsschritten verhindert werden.

Verwendung der Vorplatte: Verwenden Sie z. B. bei den RIDASCREEN®FAST Allergen Testkits nicht

mehr als drei Streifen (24 Vertiefungen) auf einmal. Werden mehr als drei Streifen benötigt, sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z. B. Low Binding von Greiner Bio-One, Art. Nr. 655101) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverschiebung über die Mikrotiterplatte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden in die unbeschichtete Platte pipettiert (mindestens 150 µl pro Vertiefung) und dann schnell mit einer 8-Kanal-Pipette auf die beschichtete Mikrotiterplatte übertragen (Abbildung 17). Denken Sie daran: die Reaktion beginnt, sobald die erste Lösung in die beschichtete Platte gegeben wird.

Lesen Sie zur Einschätzung der Geschwindigkeit eines ELISA-Testkits und zu der Anzahl zu verwendender Streifen bitte die Durchführungsanweisung sorgfältig.



100 µl/Vertiefung wird in ELISA-Platte pipettiert

Unbeschichtete Platte enthält >150 µl/Vertiefung

**Abbildung 17:** Die „Vorplatte“ enthält mindestens 150 µl Standard oder Probe pro Vertiefung. Zu den 6 Streifen der Vorplatte wurden 5 Standards und 19 Proben in doppelter Ausführung hinzugefügt (d. h. insgesamt 48 Vertiefungen).

Mit einer 8-Kanal-Multipipette werden genau 100 µl der Standards oder Proben schnell auf die beschichtete Platte übertragen. Die Pipettenspitzen werden mit der Standard- oder Probenlösung vorgespült, jede Spitze wird nur einmal verwendet.

### 2.3.7 Zeitmanagement für das Pipettieren

Im Allgemeinen ist es ratsam, die Pipettiertechnik möglichst konstant und die absolute Pipettierzeit so gering wie möglich zu halten. Das Pipettieren von Standards und Proben ist allgemein der zeitintensivste und arbeitsaufwendigste Schritt bei der Durchführung eines ELISAs. Als Beispiel soll hier der Sandwich-ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001) dienen. Standards und Proben, insgesamt 6 Streifen (6 x 8 Vertiefungen), werden in 6 Minuten pipettiert. Danach wird die Platte für 30 Minuten inkubiert. Bitte beachten:

- Vertiefung A1 wird für 6 + 30 Minuten inkubiert, da sie zuerst pipettiert wurde.
- Vertiefung H6 wird nur 30 Minuten lang inkubiert, da sie zuletzt pipettiert wurde (daher können die Ergebnisse niedriger ausfallen).
- Es ist wichtig, das zugrundeliegende ELISA-Prinzip zu verstehen, um „zeitkritische“ Pipettierschritte zu erkennen.
- Im Sandwich-ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001) beginnt die „Antigen-Antikörper-Reaktion“, sobald die Probe in die Vertiefungen gegeben wird. Somit ist der „zeitkritische“ Schritt das Pipettieren der Probe.
- Beim kompetitiven ELISA RIDASCREEN® Ochratoxin A (Art. Nr. R1312) ist die Platte bereits mit dem spezifischen Antikörper beschichtet und die Reaktion beginnt mit der Zugabe der Probe. Somit ist der „zeitkritische“ Schritt auch hier das Pipettieren der Probe.
- Beim kompetitiven ELISA RIDASCREEN®FAST Fumonisin (Art. Nr. R5602) beginnt die Reaktion hingegen bereits mit der Zugabe des Enzymkonjugats. Um eine „Verschiebung der optischen Dichte (OD)“ von der ersten zur letzten Vertiefung zu vermeiden, wird die Verwendung einer Stepper-Pipette empfohlen.

Allerdings ist es nicht empfehlenswert, in Eile zu pipettieren. Das kann dazu führen, dass z. B. in die falsche Kavität pipettiert wird oder die falschen Lösungen verwendet werden.

Es ist sehr wichtig, dass alle Proben vergleichbar gehandhabt werden. Halten Sie die in der Durchführungsanweisung angegebene Pipettierreihenfolge und Inkubationszeit strikt ein. Um vergleichbare Ergebnisse in allen Kavitäten zu erhalten, sollte die Inkubationszeit jeder einzelnen Kavität identisch sein.

Starten Sie hierzu die Uhr, nachdem Sie eine Komponente, die eine Reaktion auslöst (Standards oder Proben, Antikörperlösung, Konjugatlösung), in die letzte Vertiefung pipettiert haben. Starten Sie im Falle einer Substrat-/Chromogenlösung die Uhr, bevor Sie die Lösung in die erste Vertiefung pipettieren. Stoppen Sie durch Zugabe der Stopp-Lösung die Substrat-/Chromogenreaktion nach der definierten Zeit in der gleichen Reihenfolge, in der Sie die Substrat-/Chromogenlösung zugegeben haben. Es ist sehr wichtig, die in der Durchführungsanweisung angegebenen Inkubationszeiten einzuhalten.

Die Aktivität des Chromogens kann durch Licht beeinflusst werden. Decken Sie die Platte ab, um das licht-sensitive Chromogen vor Licht zu schützen, und lagern Sie es in dem braunen Fläschchen, der Primärverpackung, in dem es geliefert wird. Um die Reaktion zu stoppen, verwenden Sie die mit dem Kit gelieferte Stopp-Lösung.

### 2.3.8 Richtiges Waschen

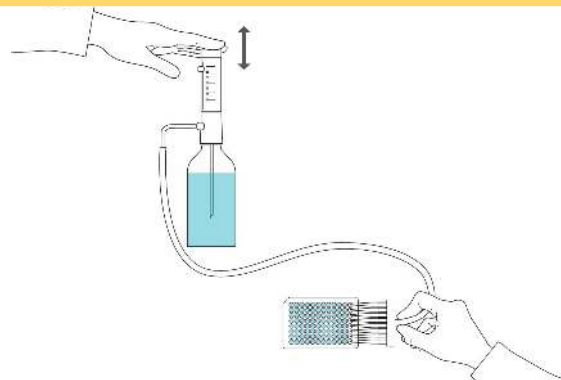
Waschen ist ein entscheidender Schritt, um alle nicht gebundenen Komponenten zu entfernen, die die Reaktionen beeinflussen oder zu falschen Ergebnissen führen könnten. Verwenden Sie zum Waschen nur die in der Durchführungsanweisung empfohlenen Waschpuffer. Viele Kits enthalten Salze oder Lösungen von Waschpuffern, die zur Herstellung von gebrauchsfertigen Waschpuffern verwendet werden können. Dadurch müssen keine Reagenzien abgewogen werden, um eigene/separate Puffer herzustellen. Stabilitäts- und Lagerungsinformationen zu den mit den Kits gelieferten einzelnen Waschpuffern finden Sie in der entsprechenden Durchführungsanweisung. Wie alle anderen Komponenten sollten Waschpuffer vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Folgen Sie den spezifischen Empfehlungen der Durchführungsanweisung bezüglich der Anzahl an Waschschritten. Gießen Sie am Ende der Inkubationsschritte die Flüssigkeit aus den Kavitäten und klopfen den Mikrotiterplattenhalter kräftig kopfüber auf saugfähiges Papier, um zu gewährleisten, dass die Flüssigkeit vollständig aus der Kavität entfernt ist. Sämtliche Flüssigkeit wurde erfolgreich entfernt, wenn keine Anzeichen für eine Flüssigkeit auf dem Papierhandtuch zu sehen sind. Die meisten ELISA-Tests erfordern 250 bis 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Waschschriff und Vertiefung. Geben Sie den Waschpuffer hinzu und entfernen Sie die Flüssigkeit durch Ausgießen und Klopfen. Wiederholen Sie den Waschschriff 3 bis 5 Mal (siehe Durchführungsanweisung).

Automatisierte Waschsysteme sind nicht an allen Teststandorten verfügbar, daher empfehlen wir für die Waschschriffe die Verwendung eines Flaschenaufsatz-Dispensers (z. B. Brand, 4720420), der an eine 8-Kanal-Pipettiereinheit (z. B. Brand, 704526) angeschlossen ist (Abbildung 18). Auch eine 12-Kanal-Pipettiereinheit kann verwendet werden. Bei anderen Handwaschtechniken, wie Waschflaschen, werden evtl. nicht alle Kavitäten gleichbehandelt. Daher sollten sie nicht zum Einsatz kommen.

Puffer, Schläuche, Pipettiereinheiten und Waschnadeln müssen frei von Verunreinigungen durch Mikroorganismen und anderweitigen Kontaminationen sein. Halten Sie das Gerät sauber und entfernen Sie ggf. kontaminierte Teile. Verwenden Sie im Zweifelsfall das Handwaschverfahren oder kontaktieren Sie den Hersteller des Wäschers.

Waschschriffe sollten schnell, aber effizient und präzise durchgeführt werden. Achten Sie darauf, dass die Zeit zwischen der Zugabe von Waschpuffer zur ersten und zur letzten Kavität so kurz wie möglich ist. Das dient dazu, dass Kavitäten nicht austrocknen und minimiert Abweichungen der Inkubationszeiten. Achten Sie trotz schneller Arbeitsgeschwindigkeit auf Genauigkeit. Ein Überlaufen von Flüssigkeit von einer Kavität in eine andere muss vermieden werden. Fügen Sie im Zweifelsfall einen zusätzlichen Waschschriff ein.

**Abbildung 18:** Waschen der ELISA-Platte mit einem Flaschenaufsatz-Dispenser, der an eine 8-Kanal-Pipettiereinheit angeschlossen ist.



### 2.3.9 Lagerung von nicht verwendeten Komponenten für weitere Experimente

Die Mikrotiterplatten werden in einem wiederverschließbaren Beutel mit einem Tütchen Trocknungsmittel (Abbildung 19) geliefert. Wenn nicht alle Kavitätenstreifen (je 8 Kavitäten) der Platte benötigt werden, bewahren Sie die restlichen Streifen in diesem Beutel auf. Geben Sie die Kavitäten und die Mikrotiterplatte zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel und verschließen ihn. Schließen Sie alle Fläschchen und achten Sie darauf, die Deckel fest zu verschrauben.

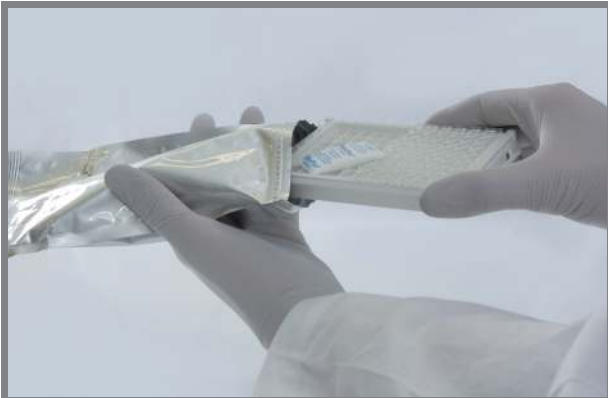


Abbildung 19: Nicht benötigte Plattenstreifen sollten zusammen mit dem Trockenmittel in dem wiederverschließbaren Beutel aufbewahrt werden, in dem sie geliefert wurden.

Dies ist besonders wichtig für Komponenten wie Standardlösungen, die organische Lösungsmittel mit hohem Dampfdruck enthalten können. Wir empfehlen, alle Komponenten zur Lagerung wieder in die Testpackung zu geben. Lagern Sie alle Komponenten aufrecht und unter den angegebenen Bedingungen.

### 2.3.10 Austausch von Reagenzien zwischen Tests und Chargen

Die Komponenten der einzelnen Chargen sind gründlich eingestellt, um ELISA-Kits mit optimaler Leistung zu liefern. Der Austausch einer oder mehrerer dieser Komponenten zwischen verschiedenen Chargen verändert die Leistung des Tests und ist somit nicht zu empfehlen.

Ein Austausch von Komponenten von Kits mit derselben Produktnummer ist möglich, wenn die Chargennummer des Kits identisch ist. Wir empfehlen jedoch, nur die mit dem jeweiligen Kit gelieferten Komponenten zu verwenden.

### 2.3.11 Sicherheitshinweise

ELISA-Testkits können gefährliche Substanzen enthalten. Für Informationen über die mit den Substanzen verbundenen Gefahren beachten Sie die Warnhinweise auf den Etiketten der Komponenten und lesen Sie die entsprechenden Sicherheitsdatenblätter (SDS). Die Tests sind nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Durchführungsanweisung zur Anwendung des Tests ist strikt einzuhalten. Handhaben Sie grundsätzlich alle Komponenten

mit Sorgfalt und treffen Sie alle üblichen Labor-sicherheitsvorkehrungen. Benutzen Sie bei der Testdurchführung Laborhandschuhe, tragen Sie einen Laborkittel, essen, trinken, rauchen Sie nicht und halten Sie alle Komponenten fern von Zündquellen. Die Entsorgung von Abfällen kann von Land zu Land unterschiedlich sein.

Bitte beachten Sie die örtlichen Entsorgungsvorschriften.

## 2.4 Stoppen und Messen des ELISAs

Die meisten ELISAs werden bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die richtige Wellenlänge für die Messung finden Sie in der Durchführungsanweisung unter Punkt 3. Testprinzip. Am Ende der Testdurchführung wird die Stopp-Lösung, die Schwefelsäure enthält, in jede Kavität der Mikrotiterplatte gegeben. Die Säure denaturiert alle Proteinstrukturen, wie z. B. Antikörper, und stoppt somit die Reaktion (Abbildung 20).

Dennoch ist es empfehlenswert, die Ergebnisse direkt nach Zugabe der Stopp-Lösung, oder zumindest innerhalb der in der Durchführungsanweisung angegebenen Zeit, zu messen. Eine große Verzögerung kann eine Verschiebung der Absolutmesswerte verursachen.



Abbildung 20: Die Zugabe der Stopp-Lösung bewirkt eine Farbänderung von Blau nach Gelb.

## 2.5 Parallele Durchführung von Tests

Wenn mehrere ELISA-Tests parallel durchgeführt werden, sollte äußerst vorsichtig vorgegangen werden. Kennzeichnen Sie Mikrotiterplatten und Reagenzien richtig, um Fehler und eine Vermischung von Reagenzien zwischen Assays zu vermeiden. Verwenden Sie eine separate Labor-Stoppuhr für jede Mikrotiterplatte (Abbildung 21). Achten Sie darauf, dass sich Verfahrensschritte von verschiedenen Assays nicht überschneiden, z. B. Waschen einer Mikrotiterplatte, wenn eine zweite

gestoppt werden muss. Planen Sie die Pipettier-, Wasch- und Messvorgänge, bevor Sie verschiedene ELISAs starten.

Die Automatisierung der Analyse ist durch den Einsatz von Automaten wie dem ThunderBolt® oder Bolt™ möglich. Bitte kontaktieren Sie uns für eine Liste mit Tests, die bereits auf biochemischen Analysatoren verifiziert wurden.



Abbildung 21: Die parallele Durchführung mehrerer ELISA-Tests muss sorgfältig geplant und organisiert werden.



# 3 Datenauswertung und Interpretation der Ergebnisse

## 3.1 Bestimmung von unbekanntem Proben durch Standardkurven

Die Konzentration des Analyten in einer „unbekanntem“ Probe kann durch den Vergleich des gemessenen Signals der Probe mit dem Signal von Standards, die bekannte Konzentrationen des Analyten enthalten, bestimmt werden. Bei ELISAs werden in der Regel 5 bis 7 Standards verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen,

die den betreffenden Konzentrationsbereich abdeckt. Es gibt auch ELISAs, die eine Einzelkalibrierungstechnologie (SC) verwenden, bei der ein einzelner Standard eingesetzt wird, um die im Zertifikat hinterlegte Standardkurve an den jeweiligen Lauf anzupassen.

## 3.2 Auswertung der ELISAs mittels Standardkurven

Je nach Testeinheit wird die Standardkurve durch unterschiedliche Kurvenanpassungen berechnet, wie beispielsweise die lineare Regression,

Logit-log, kubischer Spline und 4 Parameter (Abbildung 22).

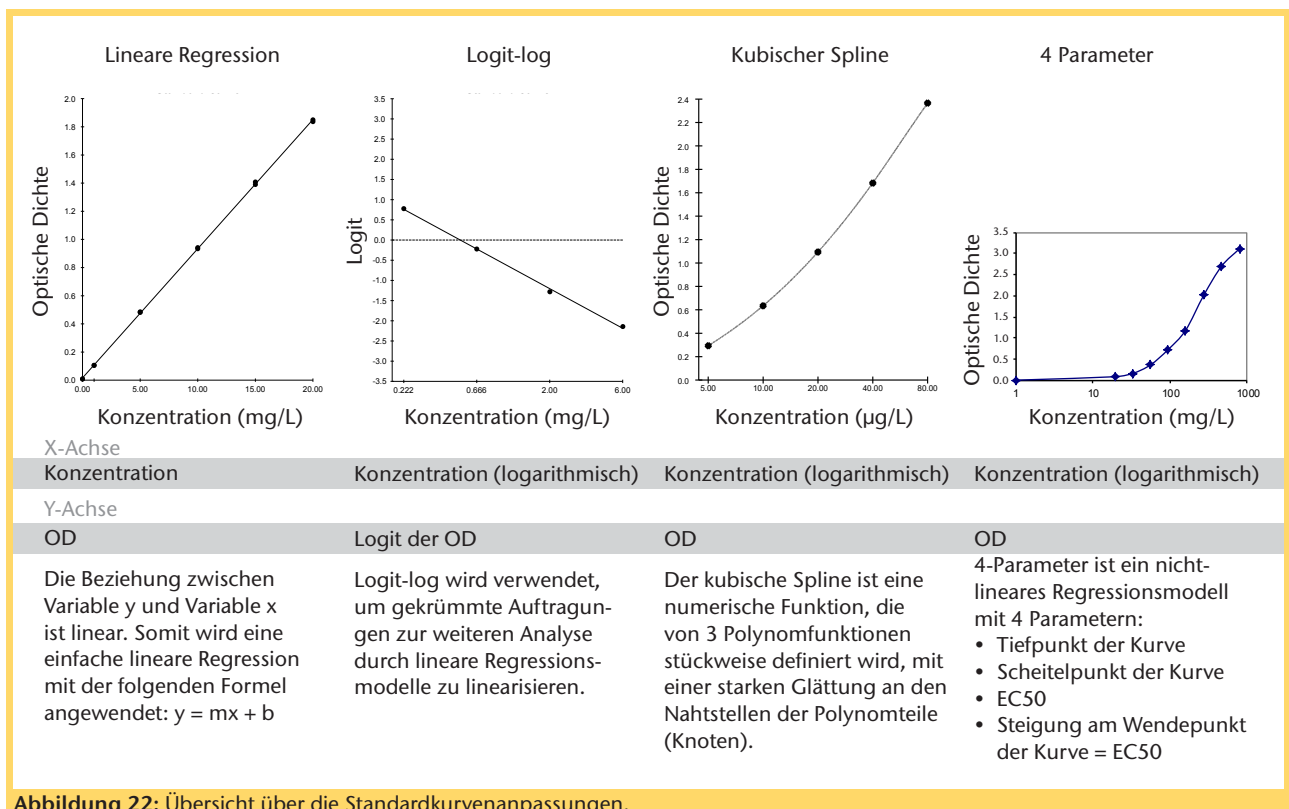


Abbildung 22: Übersicht über die Standardkurvenanpassungen.



### 3.3 Standardkurven von Sandwich- und kompetitiven ELISAs

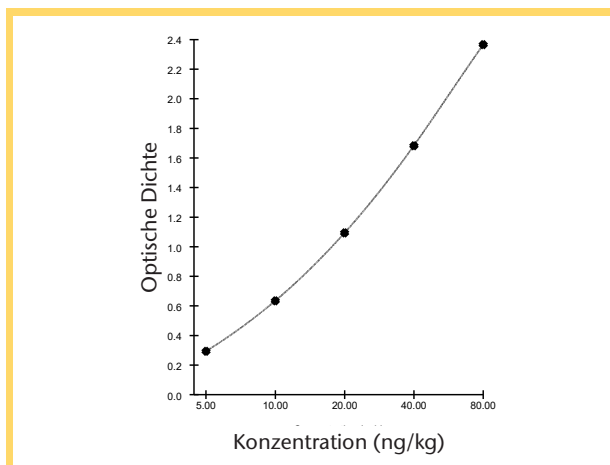
Der korrekte Algorithmus für den jeweiligen ELISA ist auf dem Analysenzertifikat (*Certificate of Analysis, CoA*) angegeben und wird in der RIDASOFT®Win.NET Software (Art. Nr. Z9996FF) nach der Auswahl der Methode voreingestellt. Je nach Format des Testeinsatzes (Sandwich oder kompetitiv) wird die Standardkurve unterschiedlich berechnet.

Bei Sandwich-ELISAs wird die Konzentration der Standards auf der horizontalen x-Achse aufgetragen, während die OD auf der vertikalen y-Achse aufgetragen wird (Abbildung 23).

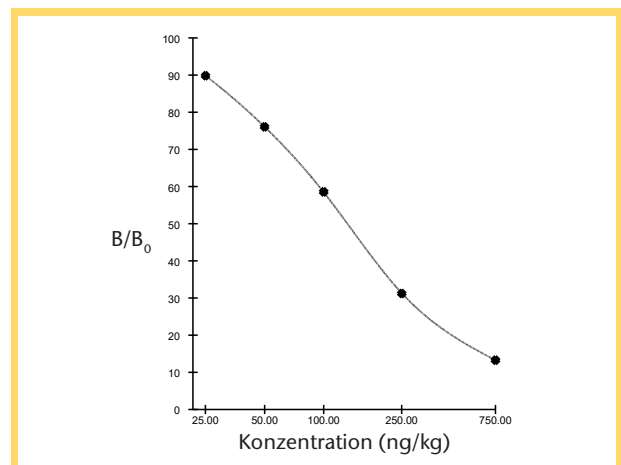
Der kompetitive ELISA unterscheidet sich vom Sandwich-ELISA dadurch, dass der OD-Wert umso niedriger ausfällt, je höher die Konzentration des Analyten (Antigens) in der Probe ist. Die maximale OD wird erreicht, wenn kein Antigen in der

Probe vorhanden ist. Um diesen Maximalwert in einem kompetitiven ELISA zu ermitteln, wird der Nullstandard, welcher keinen Analyten (Antigen) enthält, als  $B_0$  bezeichnet ( $B_0$  ist ursprünglich die Bindung bei Nullniveau).

Bei kompetitiven ELISAs wird die Konzentration der Standards auf der horizontalen x-Achse aufgetragen, während  $B/B_0$ , ein Prozentwert, auf der vertikalen y-Achse aufgetragen wird. Es wird der Standard 1, der keinen Analyten enthält, auf 100 % gesetzt. Als nächstes wird  $B/B_0$  berechnet.  $B$  ist die OD einer Standardvertiefung und  $B_0$  ist die maximale OD vom Nullstandard. Das Ergebnis wird mit 100 multipliziert, um Prozenteinheiten zu erhalten (Abbildung 24). Schließlich werden die  $B/B_0$  für die Proben mit der Standardkurve verglichen und eine Quantifizierung vorgenommen.



**Abbildung 23:** Standardkurve eines ELISAs im Sandwich-Format, wobei die Absorption gegen die Konzentration aufgetragen ist.



**Abbildung 24:** Standardkurve eines kompetitiven ELISAs, wobei  $B/B_0$  gegen die Konzentration aufgetragen ist.

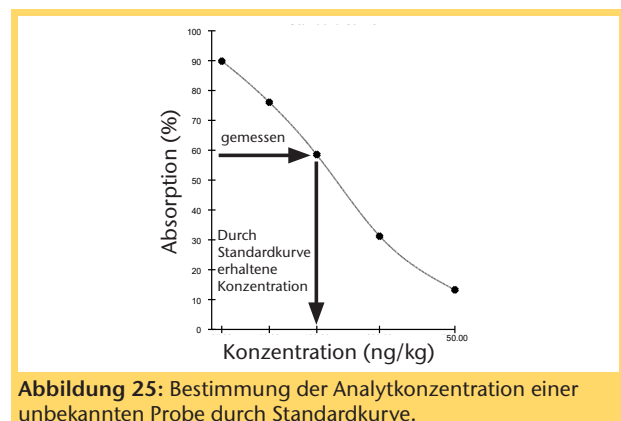
### 3.4 Spektralphotometer und Software

Die optische Dichte wird mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Es sind viele verschiedene Spektralphotometer von verschiedenen Herstellern erhältlich. R-Biopharm bietet Spektralphotometer und eine Software namens RIDASOFT®Win.NET (Art. Nr. Z9996FF) an, die speziell auf die Auswertung von R-Biopharm ELISAs zugeschnitten ist.

Für die Bedienung der Software ist ein Handbuch auf Anfrage erhältlich. Wenn bereits ein Spektralphotometer vorhanden ist, zögern Sie bitte nicht, uns zu kontaktieren, um zu prüfen, ob Ihr Spektralphotometer mit der Software und den Tests von R-Biopharm verwendet werden kann ([info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)).

### 3.5 Bestimmung der Analytkonzentration

Die Software erstellt die Standardkurve und berechnet die Konzentration eines Analyten in einer unbekannt Probe, wie in Abbildung 25 dargestellt. Außerhalb des Messbereichs berechnet die Software keine Werte.



**Abbildung 25:** Bestimmung der Analytkonzentration einer unbekannt Probe durch Standardkurve.

### 3.6 Messbereich und Verdünnungsfaktor

Wenn eine Absorption oder ein  $B/B_0$ -Wert ermittelt werden, die unterhalb oder oberhalb der Standardkurve liegen, gibt die RIDASOFT®Win.NET Software für Lebens-/Futtermittel (Food and Feed, FF) ein Ergebnis “<” (unterhalb) oder “>” (oberhalb) des Standardbereichs aus. Mit der Software kann der Konzentrationswert extrapoliert werden. In der Regel sind diese extrapolierten Werte lediglich Abschätzungen und nicht zuverlässig. Je weiter die Probe unterhalb des niedrigsten oder oberhalb des höchsten Standards liegt, desto größer ist die Unsicherheit der berechneten Konzentration. Es wird empfohlen, die oberhalb des größten Standards liegenden Proben zu verdünnen und die Analyse zu wiederholen bis das Ergebnis im Konzentrationsbereich der Standardkurve liegt.

Der Messbereich des ELISAs wird durch die Konzentration der Standards und durch den Verdünnungsfaktor der Probenvorbereitungsmethode bestimmt. Wenn Milch beispielsweise vor dem Aufbringen auf die Mikrotiterplatte 1:4 (1 + 3) verdünnt wird, ist der Verdünnungsfaktor 4. Dies bedeutet, dass die aus der Standardkurve abgelesenen Ergebnisse mit 4 multipliziert werden müssen, um die richtige Konzentration des Analyten in der Probe zu erhalten (Tabelle 1). Wenn der Analyt in einer Probe bei der Probenvorbereitung um den Faktor 2 ankonzentriert wird, z. B. durch Verdampfung oder Säulenaufreinigung, ist der Verdünnungsfaktor 0,5. Dies bedeutet, dass die aus der Standardkurve abgelesenen Ergebnisse mit 0,5 multipliziert werden müssen, um die richtige Konzentration des Analyten in der Probe zu erhalten.

**Tabelle 1:** Zwei Fallbeispiele zur Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

Fall 1	Fall 2
Eine Milchprobe wurde vor der Übertragung in die Mikrotiterkavität 1:4 verdünnt. Die Ergebnisse müssen mit 4 multipliziert werden, um die richtige Konzentration zu erhalten. Die Konzentration des Analyten in der Probe ist: <b>100 ng/kg x 4 = 400 ng/kg</b>	Eine Fleischprobe wurde um den Faktor 2 bei der Probenvorbereitung konzentriert. Das Ergebnis muss mit 0,5 multipliziert werden, um die richtige Konzentration zu erhalten. Die Konzentration des Analyten in der Probe ist: <b>100 ng/kg x 0,5 = 50 ng/kg</b>

### 3.7 Einheiten und Dimensionen

Konzentrationen sollten in SI-Einheiten ausgedrückt werden (siehe Tabelle 2). Andere dimensionslose Einheiten und Größenangaben wie „ppm“ sind nicht SI konform.

**Tabelle 2:** Übersicht über die SI-Einheit und die verschiedenen dimensionslosen „Anteil pro“-Größenangaben.

SI-Einheiten	dezimal	parts per	Symbol
g/kg	$10^{-3}$	parts per mille	‰
mg/kg	$10^{-6}$	parts per million	ppm
µg/kg	$10^{-9}$	parts per billion	ppb
ng/kg	$10^{-12}$	parts per trillion	ppt
pg/kg	$10^{-15}$	parts per quadrillion	ppq

### 3.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LoD) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, die sich eindeutig von Messwerten einer Blindprobe unterscheiden lässt. Die LoD wird experimentell durch Messen der Konzentration von z. B. 10 oder 20 Blind-Matrixproben bestimmt und dann mit folgender Formel berechnet:

Durchschnittskonzentration der Blindproben + 3-fache Standardabweichung der Konzentrationen der Blindproben.

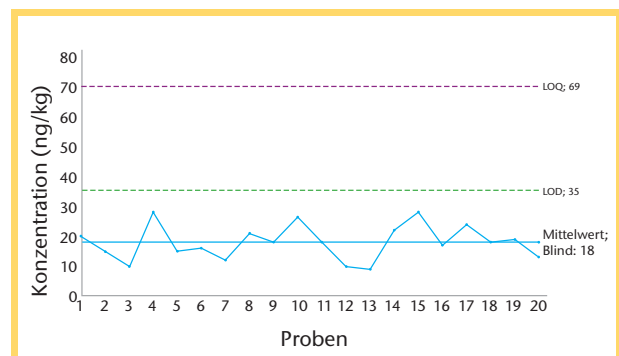
Ergebnisse unterhalb der LoD zeigen, dass eine Probe negativ ist oder, dass die Konzentration des/der Analyte(n) unterhalb der LoD liegt.

Die Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LoQ) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, die quantitativ bestimmt werden kann. Die LoQ wird experimentell durch Messen der Konzentration von 20 Blind-Matrixproben bestimmt und dann mit folgender Formel berechnet:

Durchschnittskonzentration der Blindproben + (meist, aber nicht unbedingt) 9-fache Standardabweichung der Konzentrationen der Blindproben (Abbildung 26).

Ergebnisse, die oberhalb der LoD und unterhalb der LoQ liegen, sind nur qualitative (positive) Ergebnisse. Das bedeutet, dass die Probe den Analyten enthält, die genaue Menge jedoch nicht quantifiziert werden kann, da der Wert unterhalb der LoQ liegt.

Es wird empfohlen, diese Werte durch Dotierexperimente mit der Probenmatrix und Laborausrüstung zu überprüfen.



**Abbildung 26:** 20 Blindproben wurden analysiert. Mittelwert der Blindproben = 18 ng/kg mit einer Standardabweichung von 5,7 ng/kg

$$\text{LOD} = 18 \text{ ng/kg} + 3 \times 5,7 \text{ ng/kg} = 35 \text{ ng/kg}$$

$$\text{LOQ} = 18 \text{ ng/kg} + 9 \times 5,7 \text{ ng/kg} = 69 \text{ ng/kg}$$

### 3.9 Richtigkeit und Wiederfindung

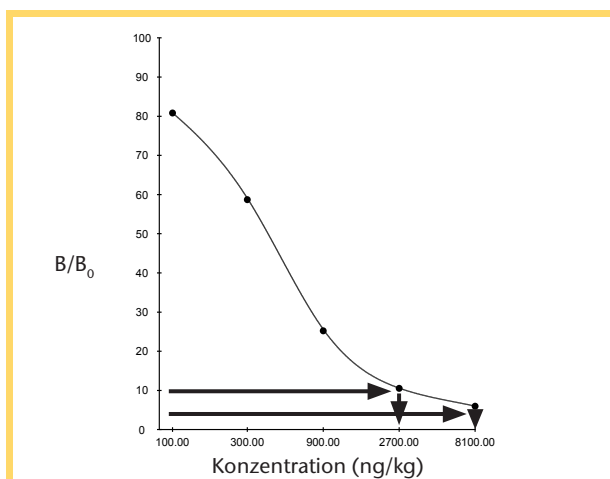
Die Richtigkeit ist der Grad der Übereinstimmung zwischen dem aus einer großen Serie von Testergebnissen erhaltenen Mittelwert und einem akzeptierten Referenzwert. Die Richtigkeit kann nur mit Hilfe von zertifiziertem Referenzmaterial (ZRM) festgestellt werden. Die Richtigkeit wird durch Dividieren der gemessenen Konzentration des ZRM durch die zugeordnete Konzentration des ZRM berechnet. Das Ergebnis wird mit 100 multipliziert, um eine Prozenteinheit zu erhalten. Die absolute Differenz zwischen den beiden Werten wird „Bias“ genannt.

Wenn kein ZRM zur Verfügung steht, beispielsweise für Antibiotika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs oder für einige Allergene, kann anstelle der Richtigkeit die Wiederfindung bestimmt werden. Doch auch hier empfehlen wir, wenn möglich, die Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial.

Die Wiederfindung für einen ELISA bei manueller Anwendung liegt in der Regel bei über 70 %, bei komplexen und/oder prozessierten Matrices kann die Wiederfindung jedoch reduziert sein. Bei Allergen-ELISAs kann die Wiederfindung auch aufgrund der Denaturierung und des Abbaus hitzeempfindlicher Allergenproteine während der Prozessierung geringer ausfallen.

Die Wiederfindung wird experimentell durch die Messung von Proben bestimmt, die in der Regel vor der Probenvorbereitung dotiert wurden. Durch Division der gemessenen Konzentration der dotierten Probe durch die Dotierungskonzentration wird sie dann berechnet.

Das Ergebnis wird mit 100 multipliziert, um die Wiederfindung in Prozent angeben zu können. Bitte beachten Sie, dass Dotieren auf der Oberfläche einer Matrix in der Regel höhere Wiederfindungen als bei natürlich bzw. künstlich kontaminiert entstandenen Proben ergibt.



**Abbildung 27:** In flachen Bereichen der Standardkurve verursachen kleine Unterschiede in der OD große Unterschiede in der Konzentration: 5 % B/B<sub>0</sub> ergibt ein 3-mal höheres Ergebnis als 10 % B/B<sub>0</sub>.

Falls kein ZRM für Allergene zur Verfügung steht, verwenden Sie am besten eine künstlich kontaminierte und dann prozessierte Probe, die eine definierte Menge des Analyten enthält (*incurred sample*). Insbesondere im Allergenbereich fehlt es häufig an Referenzmaterial und es wird auf diese künstlich geschaffenen Kontrollproben zurückgegriffen.

Die Wiederfindung von Einzelproben kann aus den folgenden Gründen variieren:

- Inhomogenes Probenmaterial
- Unvollständige Suspension der Probe bei Extraktion
- Pipettierfähigkeiten des Technikers
- Präzision des Testeinsatzes

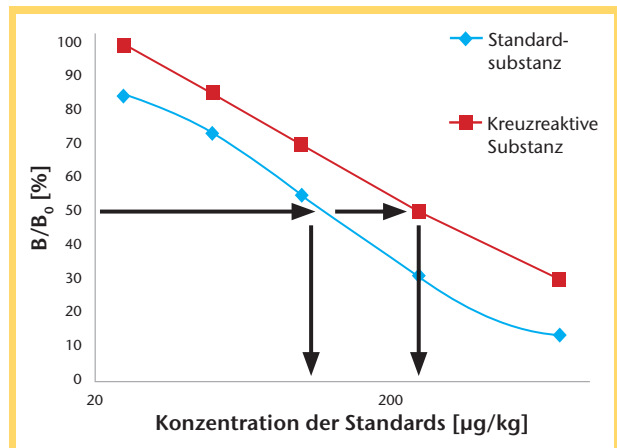
*Incurred sample*: durch Zugabe einer bestimmten Menge einer allergenen Zutat zu einer relevanten Matrix hergestelltes Material, das anschließend durch Lebensmittelherstellungstechniken verarbeitet wird; hierdurch wird erreicht, dass das Material den zu untersuchenden Proben möglichst gut hinsichtlich Kontaminationsgrad und Verarbeitungsprozess entspricht. Ein Beispiel: Zugabe einer definierten Menge an Erdnussbutter (Erdnuss als Allergen) zu Beginn einer Keksteigherstellung; anschließende Prozessierung in Form von Kneten und Backen.

Wenn Proben in Bereichen gemessen wurden, bei denen die Standardkurve relativ flach ist, kann die Genauigkeit der Ergebnisse niedrig sein, insbesondere bei hohen Konzentrationen, da kleine Unterschiede in der OD oder  $B/B_0$  große Unterschiede in der Konzentration verursachen können (Abbildung 27). Bitte beachten Sie, dass jedes Labor das Testkit für seine spezifischen Matrices selbst validiert.

### 3.10 Spezifität und Kreuzreaktivität

Antikörper sind hoch spezifisch für einen Analyten, können aber auch andere Moleküle mit unterschiedlichen Affinitäten binden.

Die Spezifität oder Kreuzreaktivität wird durch die Messung einer Standardkurve bestimmt, die aus dem Analyten oder einer kreuzreaktiven Substanz in einer geeigneten Konzentrationsreihe besteht (Abbildung 28). Nach der Berechnung der 50 %-Dosis des Analyten oder der kreuzreaktiven Substanz, wird die Spezifität oder Kreuzreaktivität wie folgt berechnet:



**Abbildung 28:** Die 50 %-Dosis der Standardkurve der Standardsubstanz (blau) ist empfindlicher (170 µg/kg), als die 50 %-Dosis der Standardkurve der kreuzreaktiven Substanz (210 µg/kg).

Die Kreuzreaktivität der kreuzreaktiven Substanz ist also:  $(170 \mu\text{g/kg} / 210 \mu\text{g/kg}) \times 100 \% = 81 \%$

$$\text{Spezifität oder Kreuzreaktivität} = \left( \frac{50 \% - \text{Dosis der Standardsubstanz}}{50 \% - \text{Dosis des Analyten oder der kreuzreaktiven Substanz}} \right) \times 100 \%$$

Wenn sich die Bindung des Antikörpers auf eine Substanz auswirkt, die in den Anwendungsbereich der Methode fällt, wird dies als Spezifität des Verfahrens bezeichnet. Wenn sich diese Bindung auf unerwünschte Substanzen bezieht, die nicht in den Anwendungsbereich der Methode fallen, wird dies Kreuzreaktivität genannt.

**1. Beispiel:** Der Anwendungsbereich eines ELISAs beschreibt, dass das System entwickelt wurde, um z. B. den Gehalt an Aflatoxin M1 in Milch zu bestimmen. Daher ist die Spezifität für Aflatoxin M1 100 %. Darüber hinaus wird festgestellt, dass eine Kreuzreaktivität von 10 % für Aflatoxin M2 vorhanden ist.

Aufgrund des Prinzips eines ELISA-Systems kann der Antikörper nicht zwischen der Spezifität zu Aflatoxin M1 und der Kreuzreaktivität zu Aflatoxin M2 unterscheiden. Wenn beide in einer unbekannt Probe vorhanden sind, ist das Ergebnis die Summe beider Substanzen. Aber

wegen der geringen Kreuzreaktivität von 10 % ist eine 10-fach höhere Konzentration von Aflatoxin M2 (im Vergleich zu M1) notwendig, um ein mit Aflatoxin M1 vergleichbares Signal zu erhalten. Eine genaue Quantifizierung ist nur möglich, wenn nur ein Analyt oder eine kreuzreagierende Substanz in der Probe vorhanden ist.

**2. Beispiel:** Der Anwendungsbereich eines Tetracyclin-ELISAs ist die Bestimmung von Tetracyclin und seinen Derivaten wie Chlortetracyclin, Rolitetracyclin und Demeclocyclin in verschiedenen Matrices bis zu einem bestimmten Grad. Das Kalibratormaterial ist Tetracyclin mit einer Spezifität von 100 %. Die Spezifität der Derivate ist unterschiedlich, z. B. liegt die Spezifität von Chlortetracyclin in diesem System bei 70 %. Angenommen, der Test einer Milchprobe, die mit Chlortetracyclin dotiert ist, ergibt eine gemessene Konzentration von 10 µg/L. Die tatsächliche Konzentration wird mit 14 µg Chlortetracyclin pro 1 Liter Milch berechnet, da die Spezifität von

Chlortetracyclin lediglich 70 % beträgt. (Hilfe: 10 µg/L werden bei einer Spezifität von 70 % erhalten; 14 mg/L werden für eine theoretische Spezifität von 100 % errechnet.)

Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss der Benutzer die Nachweisgrenze und die Wiederfindung für die Substanz in der jeweiligen Probenmatrix bestimmen. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen unterscheiden.

Deshalb werden ELISA-Tests häufig als Screeningverfahren eingesetzt. Positive Ergebnisse oder eine höhere Konzentration als der festgelegte Schwellenwert sollten durch ein Bestätigungsverfahren, wie z. B. LC-MS/MS oder PCR (bei Allergenen), überprüft werden.

Bei einer unbekanntenen Matrix und/oder einem anderen spezifischen Analyten, die nicht in den Anwendungsbereich der Methode fallen, muss der Benutzer die Nachweisgrenze und die Wiederfindung des spezifischen Analyten in der jeweiligen Probenmatrix bestimmen. Bitte beachten Sie, dass die Spezifitäten und Kreuzreaktivitäten nur experimentell im Puffersystem bestimmt wurden, da es sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, jede Spezifität oder Kreuzreaktivität aller Analyten oder kreuzreaktiven Substanzen in jeder Matrix zu bestimmen.

Anmerkung: bei Lebensmittelallergenen wird die Kreuzreaktivität in Lebensmittelproben (wie z. B. Linsen oder Quinoa) als reiner Nahrungsmittelrohstoff bewertet (100 %-Niveau). Wenn die Messergebnisse für eine Matrix (Probe) unterhalb der LOQ liegen, kann eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden.

---

## 3.11 Interferenzen und Matrixeffekte

In der Regel gelten Lebens- und Futtermittel aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung als „sehr schwierige“ Probenmatrices. Die Wiederfindung einer einzelnen Probe variiert je nach Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix. Die Zusammensetzung (z. B. Inhaltsstoffe, Konservierungsmittel, Farbstoffe), die Verarbeitung und die physikalischen Eigenschaften des Matrixmaterials, das den Analyten umgibt, haben den größten Einfluss auf die Wiederfindung. Inhaltsstoffe wie fett- oder zuckerreiche Lebensmittel können im Vergleich zu fett- oder zuckerarmen Lebensmitteln andere Arten von Interferenzen verursachen.

Verarbeitungsprozesse wie Wärmebehandlung oder Hydrolyse können den Analyten so verändern, dass er vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Daher hat die Komplexität der Lebensmittelmatrix den größten Einfluss auf die Wiederfindung, was auch als „Matrix-Effekt“ bezeichnet wird.

Der jeweilige Prozessierungsgrad der untersuchten Matrices ist dem Validierungsbericht zu entnehmen. Eine Anleitung zur Fehlersuche für Allergene und Validierungsberichte sind auf Anfrage bei R-Biopharm erhältlich ([info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)).





## Haftungsausschluss

Das Handbuch „Gute ELISA Praxis (GEP)“ enthält Empfehlungen für die Gestaltung von guten Rahmenbedingungen für die Nutzung von ELISA-Testsystemen und die Durchführung von ELISA-Analysen. Die Empfehlungen sind rechtlich unverbindlich.

Vor der Nutzung eines ELISA-Testsystems ist es unerlässlich, dass der Nutzer die entsprechende Durchführungsanweisung (TKB) studiert und die darin enthaltenen Anweisungen befolgt. Die Durchführungsanweisung enthält alle Informationen über das jeweilige ELISA-Testsystem (Informationen über alle mit dem Produkt verbundenen Risiken und Gefahren, Verwendung, Inbetriebnahme, Handhabung, Instandhaltung, Instandsetzung, Sicherheits- und Warnhinweise etc.).

Das ELISA-Handbuch gibt einen guten Überblick über Mindeststandards, ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Die Einhaltung der beschriebenen Mindeststandards bietet keine Gewähr für das Erreichen korrekter Analyseergebnisse, kann aber erheblich dazu beitragen, die Beurteilungsqualität bei ELISA-Analysen zu erhöhen.

Das ELISA-Handbuch wird regelmäßig aktualisiert. Bitte vergewissern Sie sich, dass Sie die neueste Version des Handbuchs haben. Das Handbuch kann hier abgerufen, gedruckt und heruntergeladen werden:

<https://food.r-biopharm.com/technologies/elisa/>



Die Inhalte des ELISA-Handbuchs sind marken- und urheberrechtlich geschützt. Eine Nutzung ist lediglich für interne Forschungs- und Entwicklungszwecke gestattet. Zu diesem Zweck darf das ELISA-Handbuch heruntergeladen, gespeichert und ausgedruckt werden. Jede darüberhinausgehende Nutzung bedarf der vorherigen Zustimmung der R-Biopharm AG in Textform.

Das ELISA-Handbuch wurde mit größtmöglicher Sorgfalt erstellt. Die R-Biopharm AG haftet nicht für die Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität der Inhalte. Wenn die R-Biopharm AG feststellt oder von anderen darauf hingewiesen wird, dass Inhalte eine zivil- oder strafrechtliche Verantwortlichkeit auslösen, wird sie dies unverzüglich prüfen und die Inhalte gegebenenfalls entfernen.

R-Biopharm AG haftet unbeschränkt für alle Schäden aus vorsätzlicher oder grob fahrlässiger Pflichtverletzung, der Verletzung von Leben, Körper oder Gesundheit, Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf), im Falle des Verzuges, soweit ein fixierter Liefertermin vereinbart wurde, im Falle der Übernahme einer Garantie für die Beschaffenheit oder Vorhandensein eines Leistungserfolges oder Übernahme eines Beschaffungsrisikos sowie gesetzlich zwingender Haftungstatbestände, insbesondere dem Produkthaftungsgesetz und Arglist. In allen anderen Fällen ist die Haftung für leichte Fahrlässigkeit auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt. Vorstehende Haftungsregelungen gelten auch für die Haftung der gesetzlichen Vertreter, Angestellte und Erfüllungsgehilfen der R-Biopharm AG



**R-Biopharm**  
An der neuen Bergstraße 17  
64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: 0 61 51 - 81 02-0  
Fax: 0 61 51 - 81 02-40  
E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)