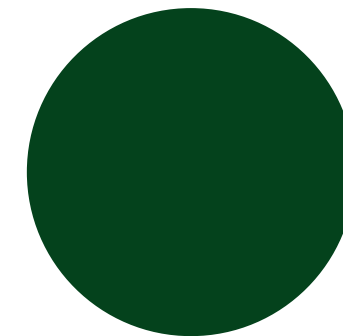
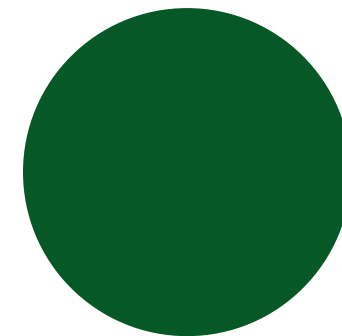
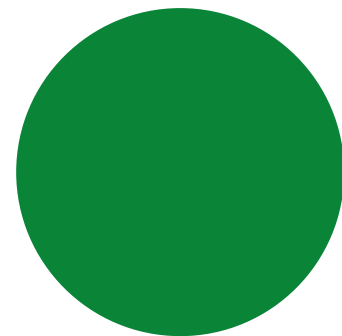
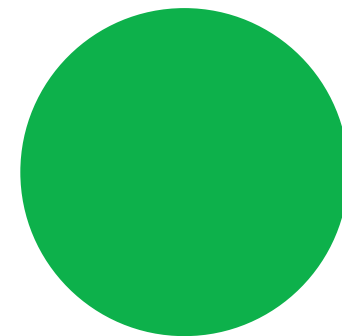


WITAMY

Na prezentacji EUROIMMUN



Właściwe przygotowywanie i rozwiązywanie ewentualnych problemów związanych z testami ELISA

Imię i nazwisko prelegenta

EUROIMMUN Polska

Plan prezentacji

1 Zalecenia ogólne dotyczące testów ELISA

2 Co jeśli...? Prawdopodobne przyczyny błędów

Przechowywanie a stabilność odczynników

Zestaw testowy

- Przechowywać w temp. +2°C do +8°C. Nie zamrażać!
- Reagenty są stabilne przez rok od daty produkcji
- Po otwarciu torebki ochronnej opłaszczone antygenem studzienki są trwałe co najmniej przez cztery miesiące, przy przechowywaniu w temp. +2°C do +8°C w suchym miejscu. Nie usuwać torebki pochłaniającej wilgoć!
- Otwarte reagenty i bufor do próbek, jeżeli są przechowywane zgodnie z zaleceniami, można używać do wygaśnięcia daty ważności
- Rozcieńczony bufor płuczący jest stabilny przez 4 tygodnie, jeśli jest przechowywany w temp. +2°C do +8°C



Przechowywanie a stabilność odczynników

Próbki surowicy

- Przez krótki okres czasu (<2 tygodnie) można przechowywać w temp. +2°C do +8°C
- Przechowywanie próbek przez okres dłuższy niż 14 dni powinno odbywać się w temp. -20°C
- Częste zamrażanie i rozmrażanie prowadzi do utraty aktywności przeciwciał!

Przechowywanie a stabilność odczynników

Wyjątek !!

- Kalibratory i kontrola pozytywna do testu Anty - Kardiolipina ELISA w klasie IgM muszą być porcjowane i przechowywane w temperaturze - 20°C!!!

Przygotowanie zestawu testowego

Zalecenia ogólne

- Przed otwarciem zestawu testowego należy sprawdzić datę ważności. Nie należy używać testów po dacie ważności.
- Wszystkie reagenty muszą osiągnąć temperaturę pokojową (+18°C do +25°C) – pamiętaj, aby po wyjęciu testu z lodówki wyciągnąć wszystkie odczynniki i płytkę poza opakowanie
- Zamykaną torebkę ochronną płyty mikrotitracyjnej należy rozerwać w miejscu nacięcia ponad zamknięciem
- Otwarcie torebki z mikropłytką przed osiągnięciem przez nią temp. pokojowej podnosi ryzyko zanieczyszczenia



Przygotowanie zestawu testowego

Odczynniki

- Jeśli w buforze płuczącym widoczne są kryształy soli, należy ogrzać go do temp. 37°C i dobrze wymieszać
- Do rozcieńczania buforu płuczącego należy używać tylko wody destylowanej (**nigdy nie używaj wody z kranu!**)



Zalecenia ogólne

- Pamiętaj o regularnym kalibrowaniu pipet
- Używaj pipet o odpowiedniej objętości (np.: nie używaj pipety 1 ml do pobierania 10 μ l!)
- Nie należy pobierać objętości mniejszych niż 5 μ l (lepiej 10 μ l)
- Używaj odpowiednich końcówek
- Nie używaj tej samej końcówki do pobierania różnych odczynników czy próbek (zanieczyszczenie)
- Pamiętaj, że końcówki są jednorazowe!
- Kończówki należy dotykać jedynie w rękawiczkach

Technika pipetowania

Kiedy napełniasz studzienki

- Nie dotykaj dna studzienki końcówką pipety
- Staraj się nie robić bąbelków
- Ostrożnie napełniaj studzienki, tak, aby nie dopuścić do wymieszania się zawartości sąsiadujących studzienek

Pobieraj reagenty i napełniaj studzienki po kolei i w takim samym tempie (nie więcej niż 10 minut na płytkę)

- Jeśli to możliwe używaj steppera lub pipety wielokanałowej
- Przed pobraniem rozcieńcz próbki i reagenty



Próbki osocza pacjentów

Rozcieńczenia próbek

- Dokładnie mieszaj próbki i bufor do próbek przed rozpoczęciem rozcieńczania
- Używaj odpowiedniego buforu do próbek (niebieski dla przeciwciał IgA i IgG, a zielony dla IgM w przypadku infekcyjnego testu ELISA)
- Nigdy nie używaj wody do rozcieńczania próbek!
- Po dodaniu próbki do buforu mieszaj na Vortexie przez około 5 sekund
- Przed użyciem ponownie zamieszaj rozcieńczoną próbkę
- Próbki kontrolne i kalibratory EUROIMMUN:
- **Kontrolne pozytywna i negatywna, a także kalibratory są gotowe do użycia i nie należy ich rozcieńczać!**

Etapy inkubacji

Czasy inkubacji

- Upewnij się, że czasy inkubacji wynoszą
 - 30 min inkubacja z próbką pacjenta
 - 30 min inkubacja z koniugatem
 - 15 min inkubacja z substratem
- Rozpocznij pomiar czasu w momencie napełnienia pierwszej studzienki

Temperatura inkubacji

- Upewnij się, że temperatura inkubacji wynosi $+18^{\circ}\text{C}$ do $+25^{\circ}\text{C}$, chyba że instrukcja mówi inaczej
 - temperatura za wysoka \rightarrow wzrost aktywności enzymatycznej
 - temperatura za niska \rightarrow spadek aktywności enzymatycznej



Płukanie

Płukanie ręczne

- 300 μ l buforu do każdej studzienki
- Pozostaw na około 30-60 sekund
- Powtórz ten cykl 3 razy

- **Płukanie automatyczne**

Sprawdź czy płuczka ma ustawiony odpowiedni program (450 μ l buforu, 30-60 sekund oczekiwania, 3 cykle)

- Upewnij się, czy bufor nie przelewa się przez studzienkę
- Regularnie czyść płuczkę

Nie dopuść do wysuszenia studzienek

Po każdym płukaniu usuń resztki buforu mocno uderzając płytką w absorbujący papier

Pomiary

Zalecenia ogólne

- Płytkę należy wstrząsnąć przed pomiarem, aby zapewnić homogenność roztworu
- Należy używać odpowiednich filtrów ($\lambda = 450 \text{ nm}$, ref $\lambda = 650 \text{ nm}$)
- Sprawdzaj działanie czytnika (uszkodzenia, kalibracja, odpowiednie oprogramowanie)



Zalecenia ogólne

- Porównaj otrzymane wartości kalibratorów z wartościami zawartymi w „Quality Control Certificate” załączonym do testu:
 - niewielkie różnice są akceptowalne
 - wartości poza granicą tolerancji wskazują na popełnienie błędów proceduralnych
- Sprawdź wartości otrzymane dla kontroli negatywnej i pozytywnej
- Do każdego pomiaru wykonaj nową krzywą kalibracyjną

Tylko prawidłowe przeprowadzenie testu pozwala na wydanie wyniku

Co jeśli....?

...wartość ekstynkcji próbki ślepej lub kalibratora 3 jest większa niż 0,150

Prawdopodobne przyczyny:

- Niewystarczająco dokładne płukanie (za mała liczba cykli, za krótki czas płukania)
- Brak usunięcia resztek buforu płuczącego ze studzienek po płukaniu
- Użycie zbyt rozcieńczonego buforu płuczącego
- Zanieczyszczenie chromogenu/substratu (niebieskie zabarwienie jeszcze przed inkubacją)
- Zanieczyszczenie między studzienkami

Co jeśli....?

...wartości ekstynkcji kalibratorów są dużo większe niż wartości docelowe

Prawdopodobne przyczyny

- Za wysoka temperatura inkubacji ($> +25^{\circ}\text{C}$)
- Za długi czas inkubacji
- Zanieczyszczenie chromogenu/substratu (niebieskie zabarwienie jeszcze przed inkubacją)

Co jeśli....?

... wartości ekstynkcji kalibratorów są dużo mniejsze niż wartości docelowe

Prawdopodobne przyczyny

- Za niska temperatura inkubacji ($< +18^{\circ}\text{C}$)
- Za krótki czas inkubacji
- Kalibratory nie osiągnęły temp. pokojowej
- Zamrożenie koniugatu lub chromogenu/substratu (utrata aktywności)
- Zanieczyszczenie koniugatu lub kalibratorów (utrata aktywności)
- Kondensacja w studzienkach (utrata aktywności antygenu)
- Ocena fotometryczna przy długości fali innej niż 450 nm
- Brak rozcieńczenia buforu płuczającego przed użyciem
- Rozcieńczenie buforu płuczającego wodą z kranu

Co jeśli....?

... obserwujemy brak reakcji barwnej

Prawdopodobne przyczyny

- Jeden z etapów inkubacji został pominięty
- Zanieczyszczenie buforem hamującym reakcję końcówek pipet używanych do substratu
- Wykonanie płukania po inkubacji z substratem

Co jeśli....?

...powtórzenia tych samych próbek dają słabą powtarzalność (różnica >10%)

Prawdopodobne przyczyny

- Błędy w pipetowaniu
- Zanieczyszczenia między studzienkami

Co jeśli....?

...krzywa kalibracyjna nie jest liniowa

Prawdopodobne przyczyny

- Błędy w pipetowaniu
- Jeden z kalibratorów jest zanieczyszczony

Co jeśli....?

Wpływ temperatury - klasa IgG

- W każdym przypadku temperatura odczynnika jest za niska (+4°C)
- Pozostałe odczynniki osiągnęły temperaturę pokojową

EI IgG Reagent	Cal. 2	Cal. 1-3 (MW)	PC	Pos. samples	Neg. samples
	OD %	OD %	OD %	OD %	OD %
Sample buffer	-2,0	-5,5	-2,5	-7,5	-25,0
Enzyme conj.	-4,5	-14,5	-3,5	-17,5	4,0
Substrate	-8,5	-22,0	-5,5	-6,0	12,0
Washing buffer	-7,5	-21,0	-5,0	-4,5	60,5



Co jeśli....?

Wpływ temperatury - klasa IgM

- W każdym przypadku temperatura odczynnika jest za niska (+4°C)
- Pozostałe odczynniki osiągnęły temperaturę pokojową

EI IgM Reagent	Cal. 2	PC	Pos. Samples	Neg. Samples
	OD %	OD %	OD %	OD %
Sample buffer	-7,0	-1,5	-22,5	39,0
Enzyme conj.	-10,0	-6,0	-14,5	17,0
Substrate	-15,0	-12,0	-4,5	-17,0
Washing buffer	-8,0	-3,5	18,0	108,5



Wysoka jakość testów ELISA firmy EUROIMMUN

- Wszystkie testy EUROIMMUN ELISA są poddawane intensywnym badaniom kontroli jakości:
 - powtarzalność wyników między różnymi zestawami testowymi
 - powtarzalność wyników między różnymi studzienkami
 - liniowość
 - stabilność
- W badaniach używa się próbek potwierdzonych klinicznie oraz pochodzących od zdrowych dawców krwi, aby wiarygodnie zbadać czułość, specyficzność czy wartość cut-off
- Laboratorium Referencyjne dr Stöckera przeprowadza rutynową diagnostykę na testach EUROIMMUN każdego dnia



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ

Zapraszam do kontaktu

