SAFIA

Handbuch zur SAFIA Mykotoxin Messung

Dieses Handbuch beschreibt die Durchführung eines Performance Checks mit SAFIA Check Partikeln sowie die Messung des SAFIA-Assays für Mykotoxine unter Verwendung des Durchflusszytometers **CyFlow™ RI-300 Flow Cytometer mit CyFlow™ AL-20 Autoloader**, sowie die Datenanalyse mit SAFIA Score.

Version 1

www.SAFIA.tech

Inhalt

1 Allgemeine Informationen zur Mykotoxinmessung mit SAFIA 4

1.1 Prinzip des SAFIA-Assay 4
1.2 Durchführung des SAFIA-Assay 5

2 Produkthinweise 6

2.1 Lagerung und Verwendung des Kits 6
2.2 Sicherheitshinweise 6
2.3 Kitinhalt 7
2.4 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien 8
2.5 Ablage der Daten 10

3 Starten des RI-300 10
4 Durchführung eines *Performance Checks* 13

4.1 Erläuterung des *Performance Checks* 13
4.2 Vorbereitung 14
4.3 Durchführung 14
4.4 Auswertung eines Performance Checks mit SAFIA Check 15
4.5 Anlegen einer neuen Messreihe mit neuer LOT-Nummer 16

5 Arbeiten mit SAFIA Score 17

5.1 Allgemeines zu SAFIA Score 17

5.1.1 Sprache ändern 17
5.1.2 Handbuch und Softwareversion 17
5.1.3 Speichern 17
5.1.4 Dateien öffnen 17
5.1.5 Kit-Bibliothek 17
5.1.6 Referenzbibliothek 18

5.2 Planen des SAFIA Assays in SAFIA Score 19

6 Probenvorbereitung 24

6.1 Puffervorbereitung 24
6.2 Anleitung der Probenvorbereitung 25

7 Durchführung des SAFIA Assays 28

7.1 Vorbereitung 28
7.2 Durchführung des Assays 29
7.3 Tipps und Hinweise zum Pipettieren 29

7.3.1 Wichtige Hinweise 29
7.3.2 Vorgeschlagene Pipettiertechnik 29
7.3.3 Pipettenwahl 30

7.4 Auslesen mit dem Cyflow® RI-300 Durchflusszytometer 32
7.5 Auswertung des Assays mithilfe von SAFIA Score 37

7.5.1 Hinweise zur Dateninterpretation 39

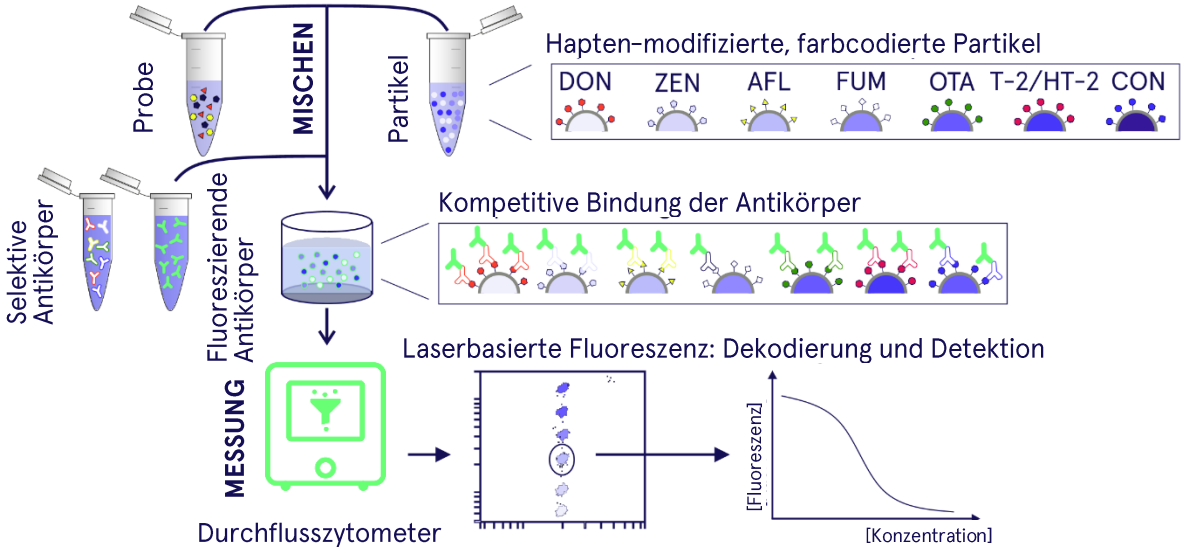
7.5.2 Datenansicht im FCS-Viewer 41
8 Reinigen und Herunterfahren des RI-300 43
9 Hinweise für besondere Matrices 45
10 Häufige Fehler und Trouble Shooting 46
10.1 Manuelle Reinigung 46
10.2 Beim Performance Check oder bei Messung werden keine Partikel gemessen 46
10.3 Bei einzelnen Wells werden keine Partikel gemessen 46
10.4 Partikelpopulationen liegen nicht in Gates 47
10.5 FCS-Prüfung „Einige FCS-Dateien sollten geprüft werden“ 47
10.6 FCS-Dateien ausgeschlossen „Einige FCS-Dateien wurden von der Berechnung ausgeschlossen 48
10.6.1 Beispiel 1 50
10.6.2 Beispiel 2 51
10.7 Automatisch gesetzte Gates umfassen nicht alle Ereignisse der Population 52
10.8 Die Kontrolle ist Positiv 52
10.9 Die Kalibrierkurve erfüllt nicht die Richtwerte 52
10.9.1 Relativer dynamischer Bereich, IC50, *p*-Werte 52
10.9.2 R Square <0.990 52
10.10 Keine Auswertung in SAFIA Score 52
10.11 Spracheinstellung in SAFIA Check 52
10.12 Internetverbindung 53
11 Glossar 54
12 Kontakt 56
SAFIA Technologies Support 56
Sysmex Support 56

1 Allgemeine Informationen zur Mykotoxinmessung mit SAFIA

1.1 Prinzip des SAFIA-Assay

Der **S**uspension**a**rray **F**luoreszenz**i**mmuno**a**ssay, kurz SAFIA, ist ein partikelbasierter Multiplexing-Schnelltest. Für das Multiplexing werden codierte Mikropartikel verwendet. Die Kodierung beruht auf unterschiedlichen Mengen eines rot fluoreszierenden Farbstoffs, der in die Mikropartikel eingebaut ist. Jeder Code, dargestellt durch eine bestimmte Farbstoffkonzentration, wird verwendet, um einen entsprechenden gemessenen Analyten zu codieren. Das gesamte Messprinzip für den Nachweis von Mykotoxinen basiert auf indirekt kompetitiven Immunoassays. Die Mykotoxine sind chemisch auf der Oberfläche der Partikel immobilisiert. Zu den Partikeln werden Probe oder Standard, eine Mischung Mykotoxin-spezifischer Antikörper und Fluorophor-markierte Antikörper gegeben. Die spezifischen Antikörper binden kompetitiv entweder das jeweilige immobilisierte Mykotoxin oder das in der Probe vorhandene Mykotoxin. Gebundene Antikörper werden mit Farbstoff (grün fluoreszierend) markierten Antikörpern gefärbt, um ein messbares Signal zu erzeugen. Aufgrund der kompetitiven Reaktion ist die Konzentration des Mykotoxins umgekehrt proportional zum Signal und kann über eine Kalibrierkurve bestimmt werden.

Das Auslesen der zur Kodierung verwendeten roten Fluoreszenz und der zur Quantifizierung verwendeten grünen Fluoreszenz erfolgt mithilfe eines Durchflusszytometers. Innerhalb des Durchflusszytometers werden die SAFIA-Mikropartikel hydrodynamisch separiert und die Fluoreszenz wird unabhängig für jeden Partikel mit einem blauen Laser/Detektor-System gemessen.



Im Vergleich zu klassischen Immunoassays wie ELISA ist SAFIA ein Mix-and-Read-Immunoassay. Waschschritte, die verwendet werden, um hohe Signalhintergründe, Matrixinterferenzen zu vermeiden oder Signalanstieg zu stoppen, sind nicht notwendig.

Zusätzlich zu den Mykotoxinen wird im SAFIA eine Kontrollmessung („Control“) mit durchgeführt. Diese zeigt an, ob Matrixeffekte den Test bei der Messung stören bzw., ob er richtig durchgeführt wurde. Die Interpretation findet dazu automatisch in SAFIA Score statt, siehe Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**.

1.2 Durchführung des SAFIA-Assay

Dieses Handbuch beschreibt die Durchführung von Messungen im Mikrotiterplatten (MTP)-Format mit dem *CyFlow™ RI-300 Flow Cytometer mit CyFlow™ AL-20 Autoloader* (im Nachfolgenden „RI-300“) genannt.

Ergänzende Hinweise zum Bedienen des RI-300 können den Anleitungen des Geräts entnommen werden. Die Benutzung ist ausschließlich durch eingewiesene und geschulte Personen vorzunehmen. **Bitte beachten Sie die Sicherheitshinweise.**

Die Durchführung des Assays untergliedert sich in folgende Schritte:

1. Probenvorbereitung (Extraktion, ggf. Entfärben, Verdünnen)
2. Durchführung des SAFIA Assays (Mischen der Reagenzien)
3. Auslesen mit dem *Cyflow® RI-300* Durchflusszytometer
4. Auswertung des Assays mithilfe von SAFIA Score



Abbildung 1. Analysenablauf

2 Produkthinweise

2.1 Lagerung und Verwendung des Kits

Das Kit ist im Kühlschrank bei 2–8 °C zu lagern und darf keinesfalls eingefroren werden. Vor der Verwendung sind alle Komponenten auf Raumtemperatur zu bringen, direkte Lichteinwirkung ist zu vermeiden. Nach Ablauf des Verfallsdatums kann keine Garantie übernommen werden. Einzelne Reagenzien des Kits dürfen nicht mit Reagenzien aus anderen Kits ausgetauscht werden, auch dann nicht, wenn die gleiche Chargennummer aufgedruckt ist. Die Verwendung des Kits ist ausschließlich durch geschultes Personal zulässig, wobei die Gebrauchsanweisung strikt einzuhalten ist. Nach Öffnung empfehlen wir das Kit innerhalb von einem Monat aufzubrauchen. Der verdünnte Probenpuffer ist bei Raumtemperatur zu lagern.

2.2 Sicherheitshinweise

Arbeitssicherheit

Die Kits enthalten gesundheitsgefährdende Substanzen. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS). Die Kitbestandteile *Calibration Standards* und *Fixation solution* enthalten Mykotoxine in geringen Mengen und sind entsprechend mit Vorsicht zu behandeln.

Entsorgung und Dekontamination

Alle Reagenzien, Reagenzienreste, kontaminierten Verbrauchsmaterialien und Probenrückstände sind nach Gebrauch entsprechend den geltenden lokalen und nationalen Vorschriften zu entsorgen. Die jeweils aktuellen Sicherheitsdatenblätter (SDS) sind dabei zu beachten. Reagenzien dürfen nicht über die Kanalisation oder zusammen mit dem Hausmüll entsorgt werden. Sie sind als chemischer Laborabfall zu sammeln und gemäß den geltenden Vorschriften einer fachgerechten Entsorgung zuzuführen. Die Zuordnung eines geeigneten Abfallschlüssels (z. B. nach AVV/EAK) erfolgt durch den Abfallerzeuger bzw. die zuständige Entsorgungsstelle.

Wir empfehlen die Dekontamination von Glas- oder anderen Geräten, die mit toxinhaltigen Lösungen in Kontakt gekommen sind, entweder mit alkalischem Schnellreiniger oder einer 10 %igen Hypochlorit-Lösung vorzunehmen.

2.3 Kitinhalt

Tabelle 1 Übersicht des Kitinhalts

Bestandteil	Anzahl und Inhalt	Status	Information
96-Well Mikrotiterplatte	1	Gebrauchsfertig	
Kalibrationsstandards (Calibration Standards)	8 x 0,5 mL	Gebrauchsfertig	Beschriftet mit „Kal-1“ bis „Kal-8“
Probenpuffer (Sample Buffer)	1 x 15 mL	Konzentrat	10-fach Konzentrat
Primäre Antikörper (Primary antibodies)	1 x 5 mL	Gebrauchsfertig	Beschriftet mit „AK 1“
Sekundäre Antikörper (Secondary antibodies)	2 x 5 mL	Gebrauchsfertig	Beschriftet mit „AK 2“
Partikel Stocklösung (Particle Stock solution)	1 x 45 µL	Konzentrat	Im Vial mit Insert
Partikel-Puffer (Particle Buffer)	1 x 1,5 mL	Gebrauchsfertig	
Fixierlösung (Fixation Solution)	1 x 10 mL	Gebrauchsfertig	
SAFIA PVPP-Adsorber		Gebrauchsfertig	Optional erhältlich Bestellnummer: SPVA-007
SAFIA PA-Adsorber		Gebrauchsfertig	Optional erhältlich. Bestellnummer: SPAA-008

Tabelle 2. Konzentrationen der einzelnen Kalibrationsstandards

Standard	c(OTA) µg L^{-1}	c(DON) µg L^{-1}	c(ZEN) µg L^{-1}	c(FUM) µg L^{-1}	c(AFL) µg L^{-1}	c(T-2/HT-2) µg L^{-1}	c(KON) µg L^{-1}
KAL-1	1.000	10.000	1250	10.000	1.500	5.000	1.000
KAL-2	100	1.000	125	1.000	150	500	100
KAL-3	10	100	12,5	100	15	50	10
KAL-4	1	10	1,25	10	1,5	5	1
KAL-5	0,3	3	0,375	3	0,45	1,5	0,3
KAL-6	0,1	1	0,125	1	0,15	0,5	0,1
KAL-7	0,01	0,1	0,0125	0,1	0,015	0,05	0,01
KAL-8	0,001	0,01	0,00125	0,01	0,0015	0,005	0,001

2.4 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Kontaktieren Sie uns für Empfehlungen und Angebote.

Tabelle 3 Übersicht der zusätzlich benötigten Reagenzien und Materialen mit Spezifikationen und Bespielen.

Ausstattung		Spezifikation	Beispiel/Empfehlungen
Arbeitsplatz			
Fläche		ca. 2 x 1 Meter	kein direktes Sonnenlicht
Tastatur, Maus			Über Symex: Bestellnummer: AV904041
PC-Bildschirm			Über Symex: Bestellnummer: BY046024
Geräte			
Zentrifugen		2 mL: 12,000 g	uniCFUGE 5 (LLG)
		50 mL: 1,000 g	5810 R (Eppendorf)
(Mikrotiter-)Platten-/Orbitalschüttler			Titramax 101 (Heidolph)
Rotator/ Überkopfschüttler			uniLOOPMIX 2 (LLG)
Analysewaage			Pioneer PC (Ohaus)
Mühle			Analysenmühle A11 basic (IKA)
Einkanalpipetten		10-100 µL	Transferpette®, 10-100 µl (Brand)
		100-1000 µL	Transferpette®, 10-100 µl (Brand)
		1000-10000 µL	Transferpette, 1000-10000 µL (Eppendorf)
VARIANTE A	8-Kanalpipette, manuell	10-100 µl	Transferpette® pro -8, 10-100 µl (Brand) Research® plus, 10-100 µl (Eppendorf)
	alternativ zur manuellen Pipette / optimal		
	8-Kanalpipette mit Dispensierfunktion	5-100 µL	Xplorer 8-Kanal-Pipette 5-100 µL (Eppendorf)
	optional		
	8-Kanalpipette mit Dispensierfunktion	15-300 µL	Xplorer 8-Kanal-Pipette 15-300 µL (Eppendorf)
		50-1200 µL	Xplorer 8-Kanal-Pipette 50-1200 µL (Eppendorf)
	Wannen für Mehrkanal-Pipetten	1er Kammer	
		8/12er Kammer	Reagenzreservoirs Trifill Mehrkanal (Carl ROTH)
VARIANTE B	Elektrische Multistep-Pipette	Spitzen 1 ml, 5 ml	Brand HandyStep
Messzylinder		150 mL, 500 mL	
Laborflasche		250 mL, 500 mL	
Ständer für Zentrifugenröhrchen		für 50 mL, 15 mL und 2 mL Röhrchen	
Cuttermesser			
Verbrauchsmaterial			
Pipettenspitzen für die jeweiligen Pipetten			
Zentrifugenröhrchen		2 mL	

	15 mL	
	50 mL	
96-Well-Platte, flachboden		
Tischmülltüten		
Reagenzien		
Ethanol 99 %	vergällt mit MEK, IPA und Bitrex® (min. 99,8 %), für Analyse auf 70 %(vol/vol) verdünnen	
deionisiertes Wasser		
Materialien für den Betrieb des Cube 6 (bestellbar bei Sysmex)		
Sheath Fluid		Bestellnummer: 04-4007_R
Cleaning Solution		Bestellnummer: 04-4009_R
Decontamination Solution		Bestellnummer: 04-4010_R
Hypochlorite Solution		Bestellnummer: 04-4012_R
Probenröhrchen (Tubes)		Bestellnummer: 04-2000
Tube-Ständer		Bestellnummer: 04-2000-02
Optional: Material für den SAFIA Performance Check		
SAFIA Check Particles		Bestellnummer: SCP-1L-010
SAFIA Check Software		Bestellnummer: SCSOW-009
Alternativ		
SAFIA Check Starter Kit (Partikel und Software)		Bestellnummer: SCSK-1L-011

2.5 Ablage der Daten

Bei der Installation des Systems werden einige Dateien und Ordner angelegt. Verändern Sie diese nicht, da sonst die automatische Verarbeitung der Daten gestört wird. In Tabelle 4 sehen Sie eine Übersicht über die Dateien und wo sie gespeichert sind. Heften Sie für ein komfortables Arbeiten die Unterordner *Meausrements* an den Schnellzugriff an.

Tabelle 4 Übersicht der Dateipfade und Datenablage des SAFIA Systems

C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube_18\config\Mycotoxins			
Datei(en)			**Datei-Namen**
Configuration-File zur Durchführung des Performance Checks und der Messungen			Mycotoxins-SCR_B_Autoloader_RI-300.cv85[1]
C:\Users\Public\Documents\Sysmex\Measurements			
Datei(en)			**Datei-Namen**
. fcs-Dateien der Messungen (werden hier **automatisch** abgespeichert mit Datum und ID), werden in einem Ordner mit der Session als Namen abgelegt			Datum_Uhrzeit_Tray-ID_ Well ID.fcs
C:\User\cyflow\Documents\			
Ordner	**Unterordner**	**Datei(en)**	**Datei-Format**
SAFIA-Check	Reports	Reports des Performance Checks (können in SAFIA Check exportiert werden und hier abgelegt werden)	.pdf
SAFIA-Mycotoxins	SAFIA-Files	SAFIA Score-Dateien	.sdf

3 Starten des RI-300

1. Vor dem Start sollte die große externe Flasche *Waste* vollständig entleert werden.
2. Die Flasche *Sheath* sollte ca. zu 80 % mit Sheath Fluid, Fläschchen 1 mit Cleaning Solution und Fläschchen 2 mit Decontamination Solution aufgefüllt werden.
3. Schalten Sie zuerst das Gerät am Kippschalter und anschließend den Computer des Geräts ein.
4. Öffnen Sie die Messoftware CyView Batch und loggen sich ein (User: Administrator, Passwort: service100417). Warten Sie, bis die Software komplett geladen ist und das Gerät einsatzbereit ist.



[1] Bitte beachten Sie, dass auf jedem Gerät einmal das originale Configuration-File („Mycotoxins-SCR_B_Autoloader_RI-300.cv85“) und ein auf Ihr Gerät angepasstes Configuration-File hinterlegt sind. Verwenden Sie zur Messung stets das angepasste Configuration-File, das dieses die korrekt eingestellten Gain-Werte der Detektoren ihres Geräts enthält.

5. Überprüfen Sie nun zunächst, ob die Einstellung unter Settings → Sessions mit denen in Abbildung 2 übereinstimmen. Wählen Sie ggf. den richtigen Standard-Speicherort sowie das Standard Mess-Configuration-File aus.

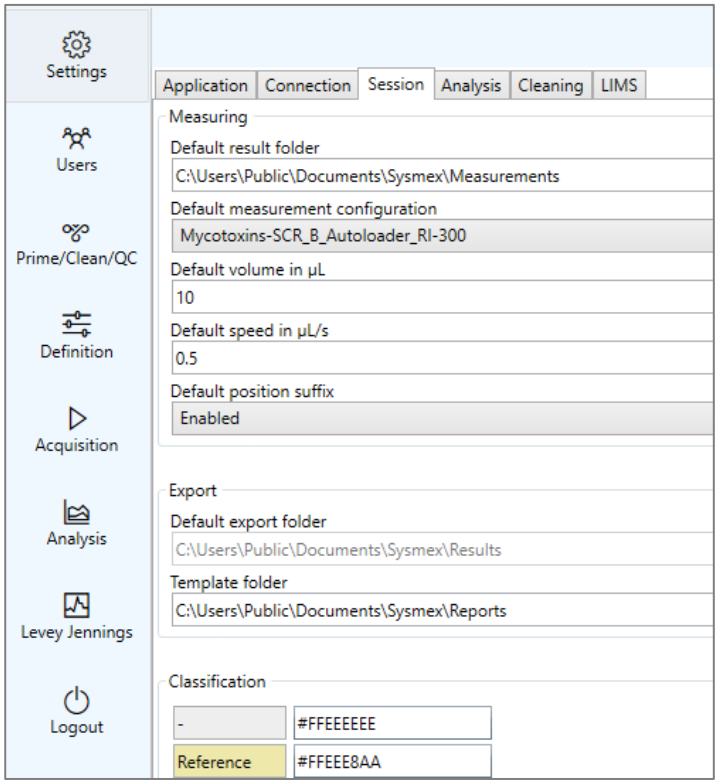
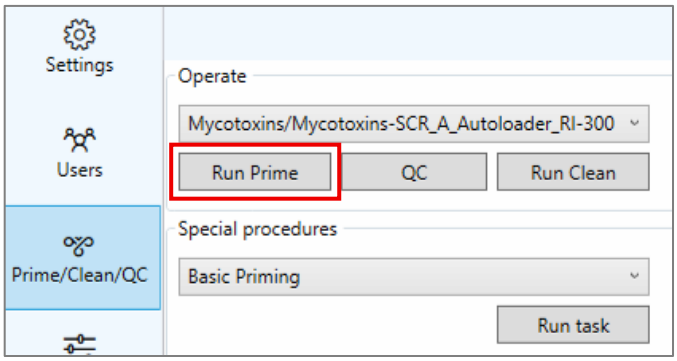


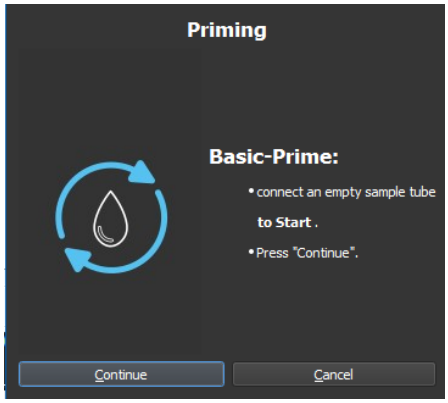
Abbildung 2 Standard-Einstellungen der Messung

6. Klicken Sie nun auf den Menüpunkt Prime/Clean/QC und klicken auf *Run Prime* .



! Achten Sie darauf, dass der Bereich vor dem Tray immer frei ist. Die Klappe öffnet sich automatisch.

7. Stecken Sie ein leeres Probenröhrchen an den Sample Port an und klicken auf *Continue*.



8. Nun beginnt das Priming. Nach ca. 3 min öffnet sich die Klappe und das Tray kommt heraus. Falls noch nicht geschehen, füllen Sie die beiden Fläschchen mit *Cleaning Solution* und *Decontamination Solution* (siehe Abbildung4).

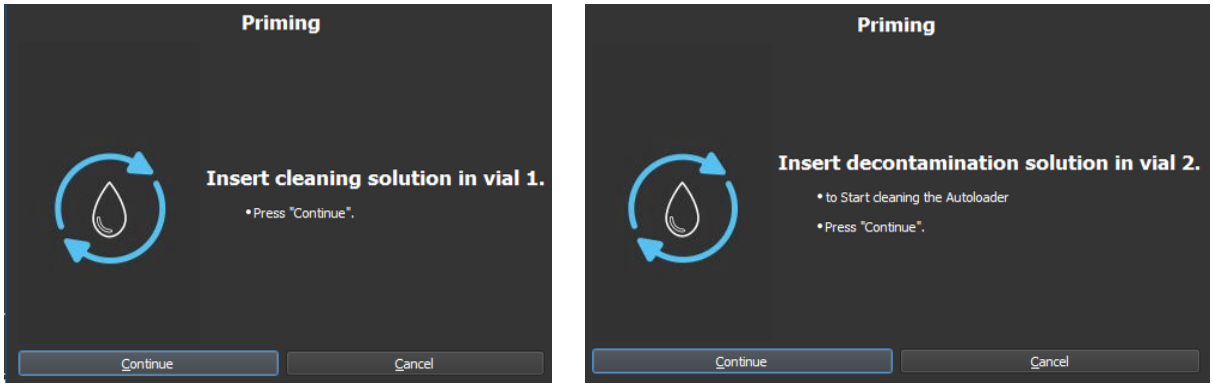


Abbildung 3 Vorbereitungen für das Priming des Autoloaders

9. Nun wird der Autoloader mit den Flüssigkeiten aus den Fläschchen (Vial 1 und 2) gespült. Dieser Prozess dauert ca. 2 min

10. Nach dem automatischen Priming des Autoloader folgen Sie den Anweisungen durch das Prime-Programm über den Sample Port (siehe Abbildung 5).

Schritt 1 Schritt 2 Schritt 3

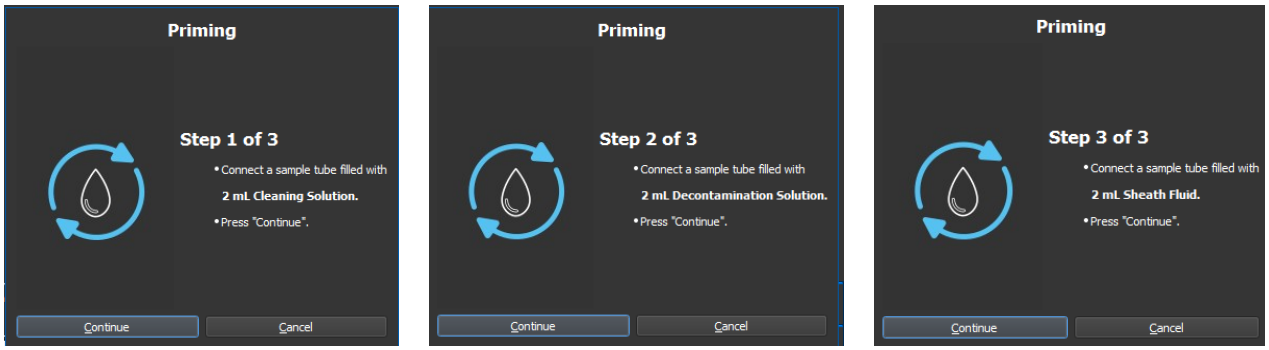


Abbildung 4. Schritte des Prime-Programms über den Sample Port

4 Durchführung eines *Performance Checks*

4.1 Erläuterung des *Performance Checks*

Wir empfehlen die messtägliche Überprüfung der Geräteperformance des RI-300 mit den *SAFIA Performance Check Partikeln* und die Auswertung mithilfe von *SAFIA Check*. Wurde der Performance Check am Tag bereits durchgeführt, fahren Sie mit Abschnitt 5 fort.

Mithilfe des *SAFIA Performance Checks* wird die korrekte Funktion des RI-300 für die Messung von SAFIA Assays überprüft. Dazu wird eine Mischung von *SAFIA Performance Check Partikeln* gemessen. Die Messung muss dabei vorher definierte Intensitäts-, Partikelzählraten (Count), Variationskoeffizienten (%CV) und Signal-zu-Rausch (S/N)-Verhältnisse in den entsprechende Detektoren FSC, SSC, FL-1 und FL-3 aufweisen, damit der *SAFIA Performance Check* bestanden wird. Bei einer erfolgreichen Messung werden 20.000 Partikel gemessen, welche im Streuplot FSC/SSC als Population in dem Gate „Partikel“ auftauchen (siehe Abbildung 5 A). In Streuplot FSC/FL-3 sind 5 Gates eingezeichnet, in denen jeweils 1 oder 2 Populationen sichtbar werden (siehe Abbildung 5 B). Die Populationen aus diesen 5 Gates sind in 5 Histogrammen in FL-1 aufgetrennt, sodass jeweils eindeutig zwei Peaks zwei Populationen abbilden (siehe Abbildung 5 C).

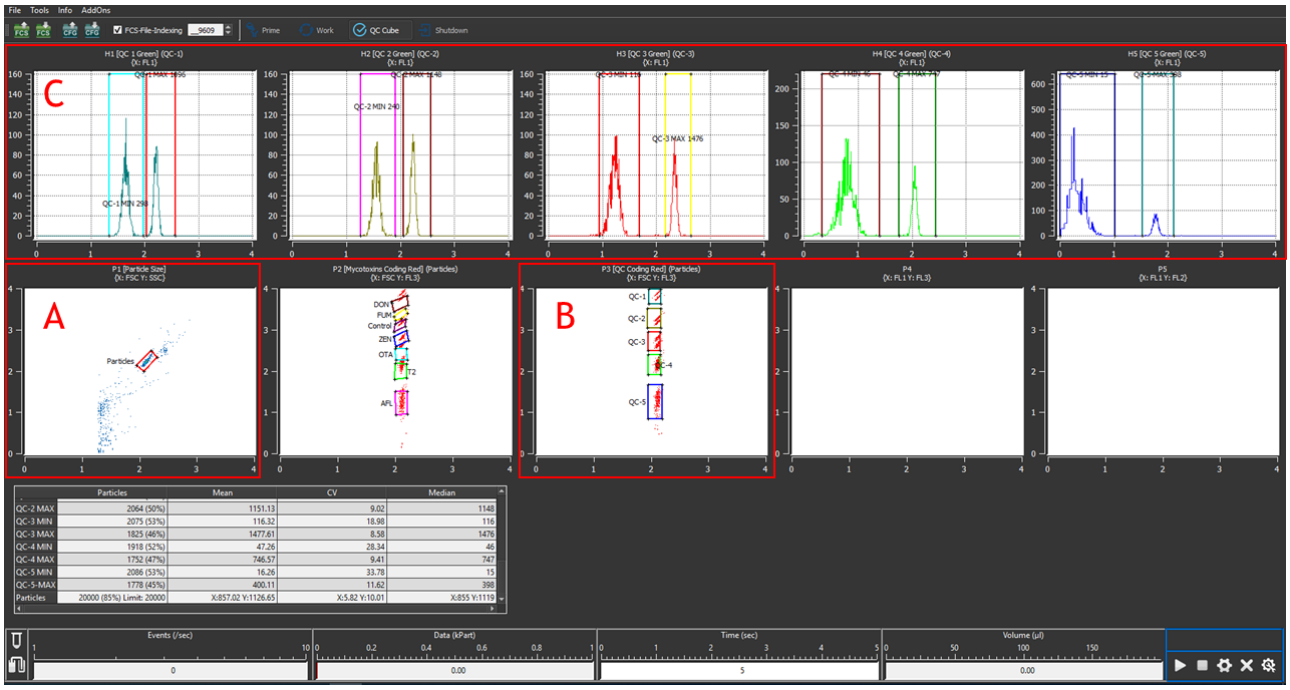


Abbildung 5. Übersicht SAFIA Check. FSC/SSC-Streuplot in A, FSC/FL-3-Streuplot in B sowie FL-1-Histogramm in C

Das S/N-Verhältnis wird in *SAFIA Check* errechnet aus dem Quotienten der Intensität im FL-1 (MAX) und FL-1 (MIN) für jede Population im FL-1. Mit dem *SAFIA Performance Check* können somit kontrolliert werden:

- die korrekte Funktionsweise des fluidischen Systems
- der Status des Lasers
- die korrekte Funktionsweise des FL-3 Detektors (Codierung der SAFIA Assay Partikel)
- die korrekte Funktionsweise des FL-1 Detektors (dynamischer Bereich der SAFIA Assays)

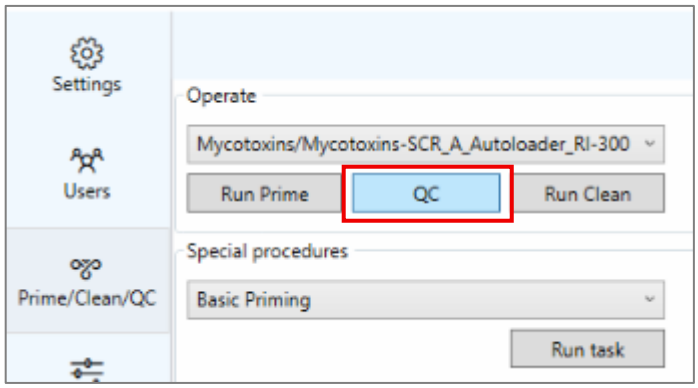
4.2 Vorbereitung

Die SAFIA Check Partikel müssen vor dem Durchführen der Messung verdünnt werden.

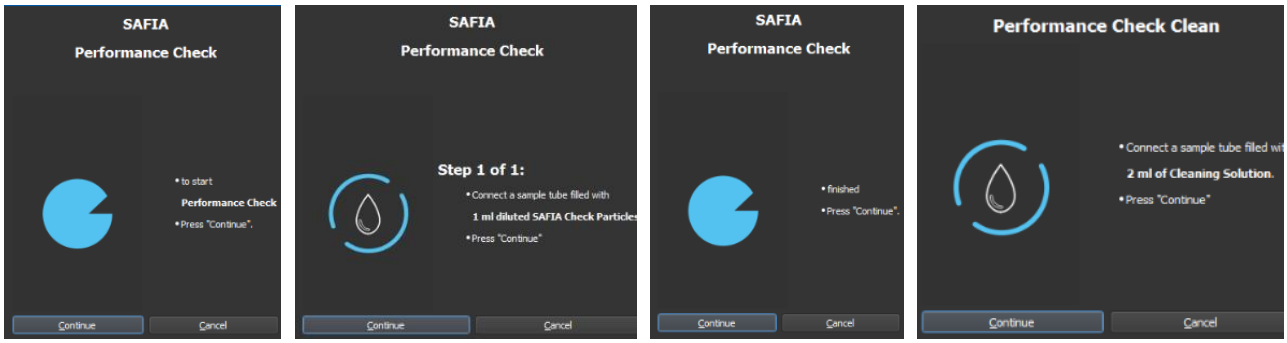
1. Schütteln Sie die Flasche mit den *SAFIA Check Partikeln* mindestens 15 Sekunden kräftig.
2. Entnehmen Sie 10 µL der Partikelsuspension und fügen Sie sie zu 10 mL *Sheath Fluid* hinzu.
3. Schütteln Sie Partikel nochmals für mindestens 15 Sekunden.
4. Die Partikel sind nun fertig zum Messen. Die fertige Lösung kann weitere 5 Tage verwendet werden, danach muss sie verworfen werden. **Sie ist im Kühlschrank bei 2-8 °C zu lagern.**

4.3 Durchführung

1. Klicken Sie in CyView Batch im Menüpunkt ***Prime/Clean/QC*** auf ***OC***.



2. Folgen Sie den Anweisungen durch das QC-Programm. Sollten keine Partikel erfasst werden, befolgen Sie die Hinweise in Abschnitt 10.2.



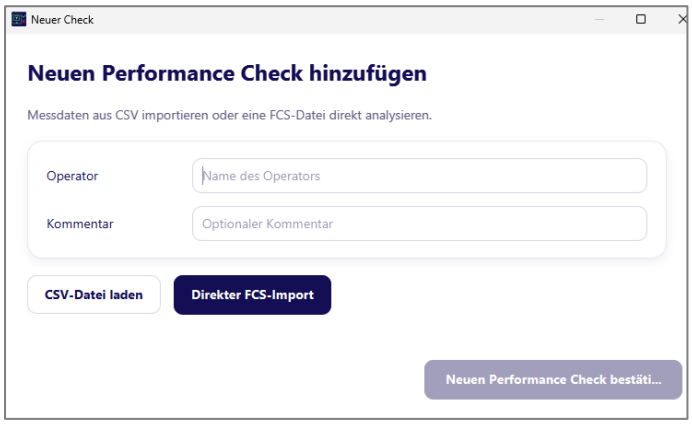
3. Die Messdatei des Performance Checks wird automatisch in dem Ordner „Measurements“ gespeichert mit Datum und Uhrzeit der Messung als Dateiname und einer fortlaufenden Zahl (z.B.: 2024_08_01_08_59_53__1957.fcs)

4.4 Auswertung eines Performance Checks mit SAFIA Check

1. Öffnen Sie *SAFIA Check* und klicken Sie oben links auf den Button:



2. Zum Hinzufügen der .fcs-Datei klicken Sie in dem sich öffnenden Fenster auf **Direkter FCS-Import**. Wählen Sie die entsprechende Datei aus dem Ordner *Measurements* aus.



3. Nach dem Öffnen des Fensters **„Autogating prüfen und Performance Check hinzufügen“** klicken Sie unten rechts auf die Schaltfläche **„Performance Check hinzufügen“**.

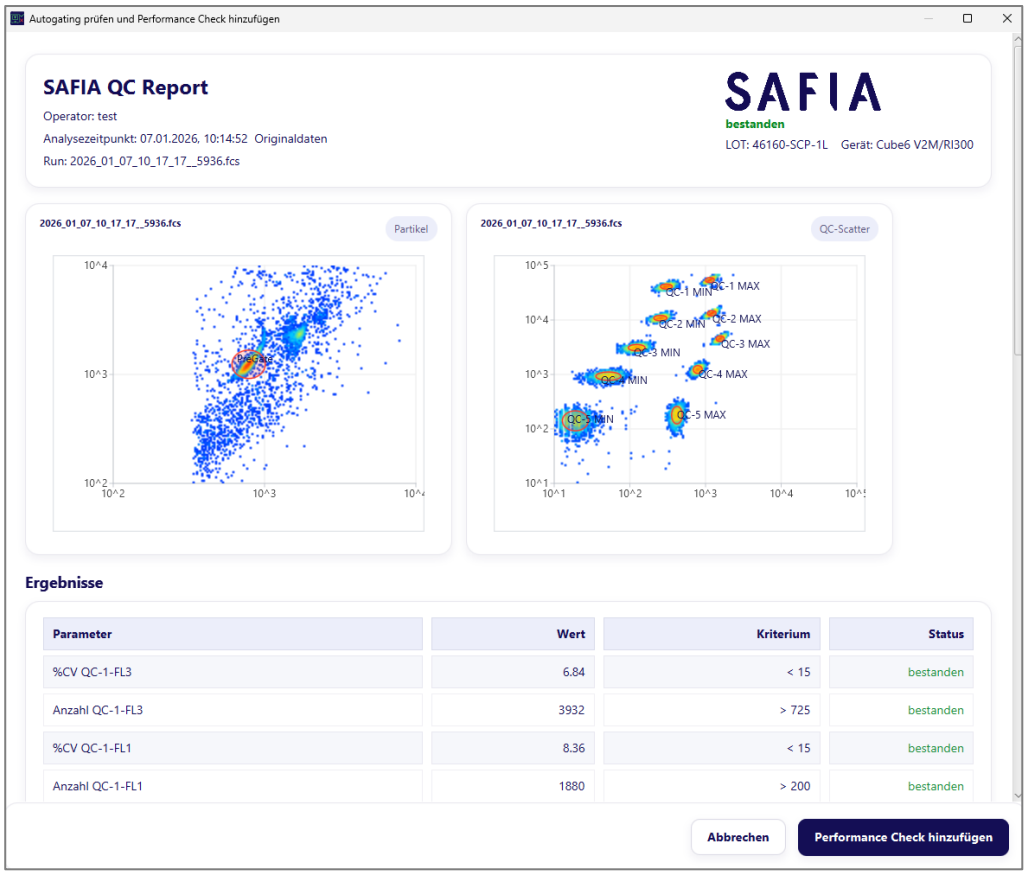
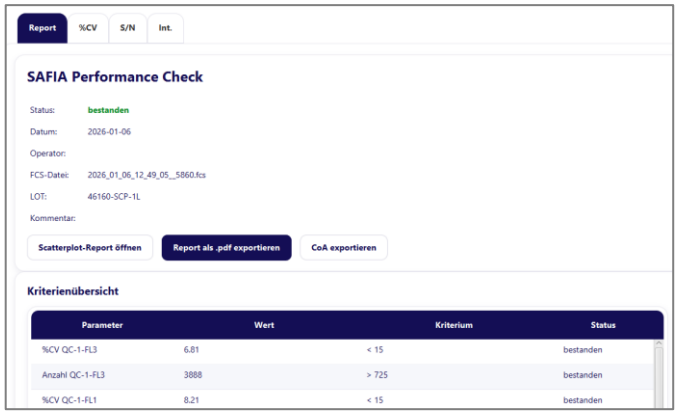


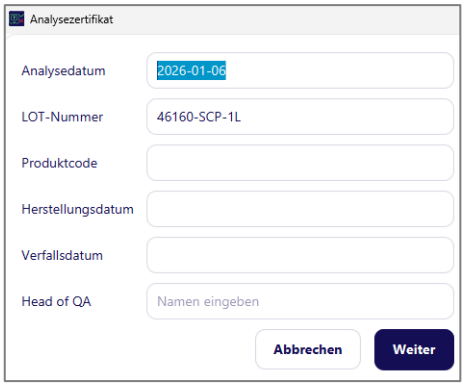
Abbildung 6 Darstellung der .fcs - Daten in *SAFIA Check*

Ein nachträgliches Ändern oder Löschen des Performance Checks ist dann nicht mehr möglich! Jede .fcs Datei kann nur einmal mit dem SAFIA Performance Check ausgewertet werden.

4. Der gespeicherte Performance Check erscheint nun auf der rechten Fensterseite. Das Ergebnis des Performance Checks wird automatisch gespeichert. Auf der linken Fensterseite sind die vorherigen Performance Checks aufgelistet und können aufgerufen werden. Über den Button Scatterplot-Report öffnen, kann das Fenster aus Abbildung 5 erneut geöffnet werden.



5. Sie können nun außerdem den Report als .pdf exportieren oder ein CoA (Analysezertifikat) exportieren. Dazu können Sie die entsprechenden Felder ausfüllen, welche auf dem CoA enthalten sein sollen.

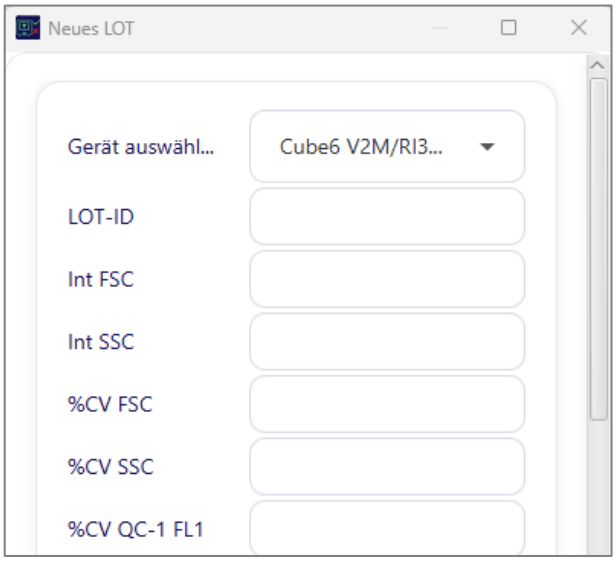


4.5 Anlegen einer neuen Messreihe mit neuer LOT-Nummer

Wenn Sie eine neue Charge *SAFIA Check Partikel* erhalten haben oder z. B. nach einer Wartung eine neue Messreihe starten wollen, müssen Sie ein neues *LOT-File* erzeugen.

1. Klicken Sie dazu auf den Button **Neues LOT** . Tragen Sie in das sich öffnende Fenster die *LOT-ID* und die aufgelisteten Parameter ein. Die Parameter werden mit den *SAFIA Check Partikeln* mitgeliefert. Sie dienen als Vergleichsgrößen (Benchmark) für jeden *Performance Check*.

2. Klicken Sie auf den Button **LOT-Datei hinzufüg...** .



Sollten bei der ersten Messung Ihrer SAFIA Check Partikel die gemessenen Werte von den Benchmarkwerten abweichen, kann es sein, dass die Gain-Werte der Detektoren nachjustiert werden müssen. Dies kann auch nach einer Gerätewartung der Fall sein. Kontaktieren Sie hierzu den Sysmex Support.

5 Arbeiten mit SAFIA Score

5.1 Allgemeines zu SAFIA Score

SAFIA Score ist standardmäßig auf dem Computer ihres Durchflusszytometers installiert. Die Software kann zusätzlich auf beliebig vielen weiteren Geräten installiert werden. Schreiben Sie dazu eine Anfrage an support@safia.tech.

Die Software gliedert sich in die Arbeitsbereiche *Start, Proben und Kalibrierung, Plattenlayout, Kalibrierkurven, Proben und Referenzen*. Diese Reiter können durch Anklicken erreicht werden. Die Arbeitsbereiche *Kalibrierkurven, Proben und Referenzen*sind erst nach Einlesen der Messdaten freigeschaltet.

5.1.1 Sprache ändern



Die Sprache der Benutzeroberfläche kann jederzeit über **Einstellungen** geändert werden. Zur Auswahl stehen Deutsch, Englisch und Französisch. Nach der Änderung der Sprache schließen Sie die Anwendung und starten sie anschließend erneut, damit die Änderung übernommen wird.

5.1.2 Handbuch und Softwareversion



Über den Menüpunkt **Hilfe** können Sie die aktuelle Version dieses Handbuchs aufrufen. Hierfür ist eine Internetverbindung erforderlich. Über den Menüpunkt **Über** können Sie die aktuell installierte Softwareversion einsehen.

5.1.3 Speichern



Beim Erstellen einer Auswertung müssen Sie eine Analyse-ID vergeben. Diese Analyse-ID wird standardmäßig auch als Dateiname verwendet. Wird die Funktion Speichern unter verwendet, werden Sie gefragt, ob die Analyse-ID ebenfalls geändert werden soll. Wenn Sie den Dateinamen später im Datei-Explorer ändern, bleibt die Analyse-ID der Auswertung unverändert.

5.1.4 Dateien öffnen

Sie können auch eine ältere Analyse öffnen. Klicken Sie dazu im Startbereich auf den blauen Button einer älteren Analyse. Sie sehen die Analysis-ID, das verwendete Kit sowie den Speicherort der letzten 20 Einträge. Alternativ können Sie eine SAFIA Data File (.sdf-Datei) über Datei → Öffnen oder direkt im Datei-Explorer durch Doppelklick öffnen.

5.1.5 Kit-Bibliothek



Im Menü **Bibliotheksmanager** befindet sich die **Kit-Bibliothek**, in der alle standardmäßig verfügbaren Kits voreingestellt hinterlegt sind. Diese Einträge dürfen nicht geändert werden.

5.1.6 Referenzbibliothek

Im Menü **Bibliotheksmanager** finden Sie auch die **Referenzbibliothek**, in der Sie die Referenzwerte Ihrer Referenzmaterialien verwalten und speichern können. Um einen neuen Referenzeintrag anzulegen, klicken Sie auf **Referenz hinzufügen**, geben die entsprechenden Werte ein und speichern den Eintrag. Die Referenzbibliothek kann exportiert und auf einem anderen Gerät wieder importiert werden. Dadurch lassen sich Referenzdaten einfach zwischen mehreren Geräten übertragen.

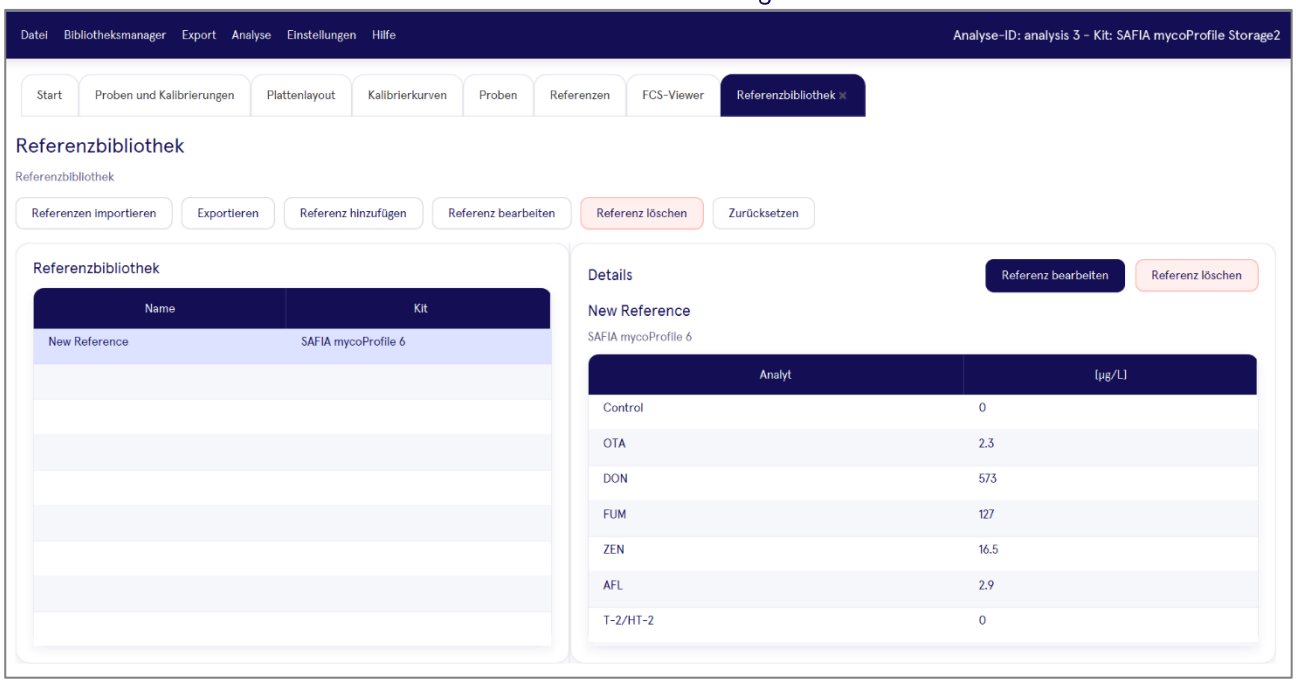


Abbildung 7 Ansicht der Referenzbibliothek

5.2 Planen des SAFIA Assays in SAFIA Score

1. Öffnen Sie *SAFIA Score*.
2. Starte Sie eine neue Analyse im Reiter *Start* über den grünen Button **+ Neue Analyse**.

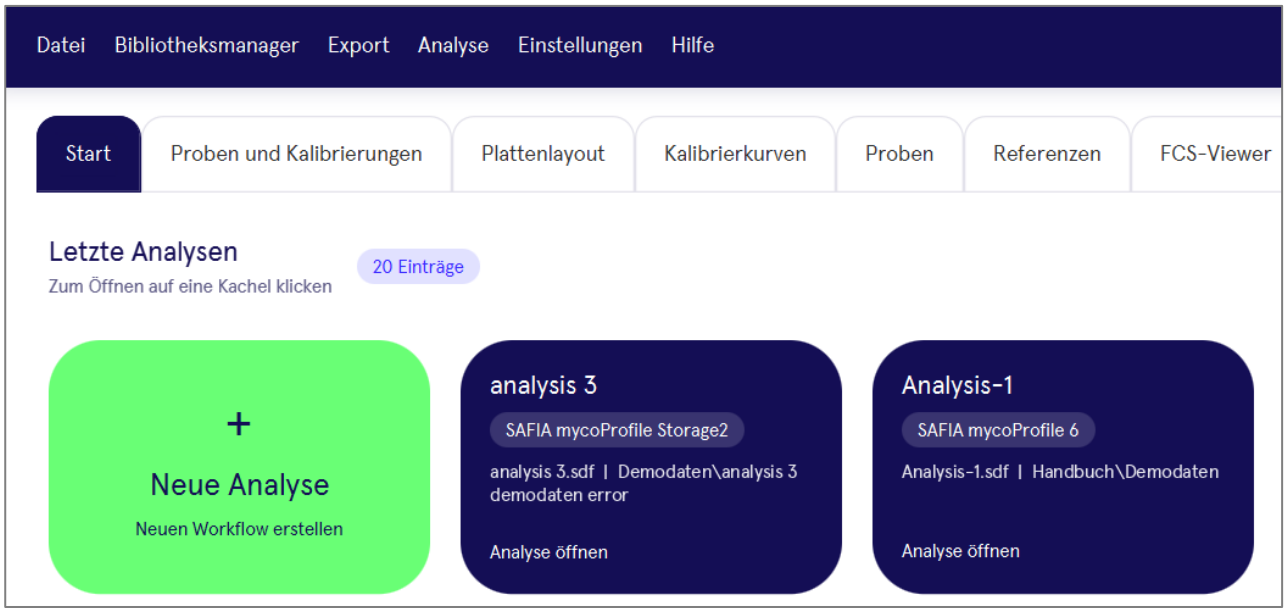
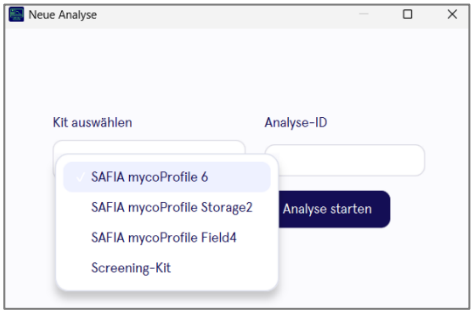
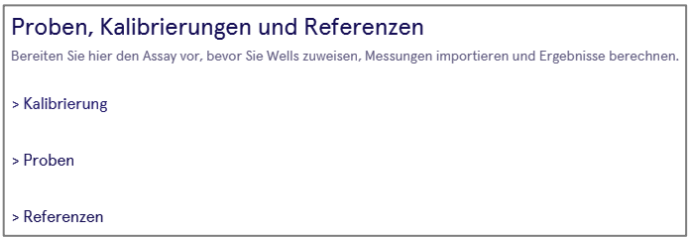


Abbildung 8 Ansicht des Startbereichs von SAFIA Score

3. Wählen Sie in dem sich öffnenden Fenster im Dropdown-Menü das entsprechende Kit aus. Geben Sie eine Analysis-ID ein und klicken Sie auf **Analyse starten**.



4. Im nächsten Schritt gelangen Sie zum Arbeitsbereich **Proben und Kalibrierung**. Hier befinden sich drei Tabellen untereinander, die sich über klicken der Überschrift ein- und ausblenden lassen.



5. In der Tabelle **Kalibrierung** finden Sie vorausgefüllt die Konzentration der einzelnen Standards, die mit dem Kit mitgeliefert werden. Legen Sie hier über die Spalte **Replikate** fest, wie oft ein Standard gemessen werden soll.

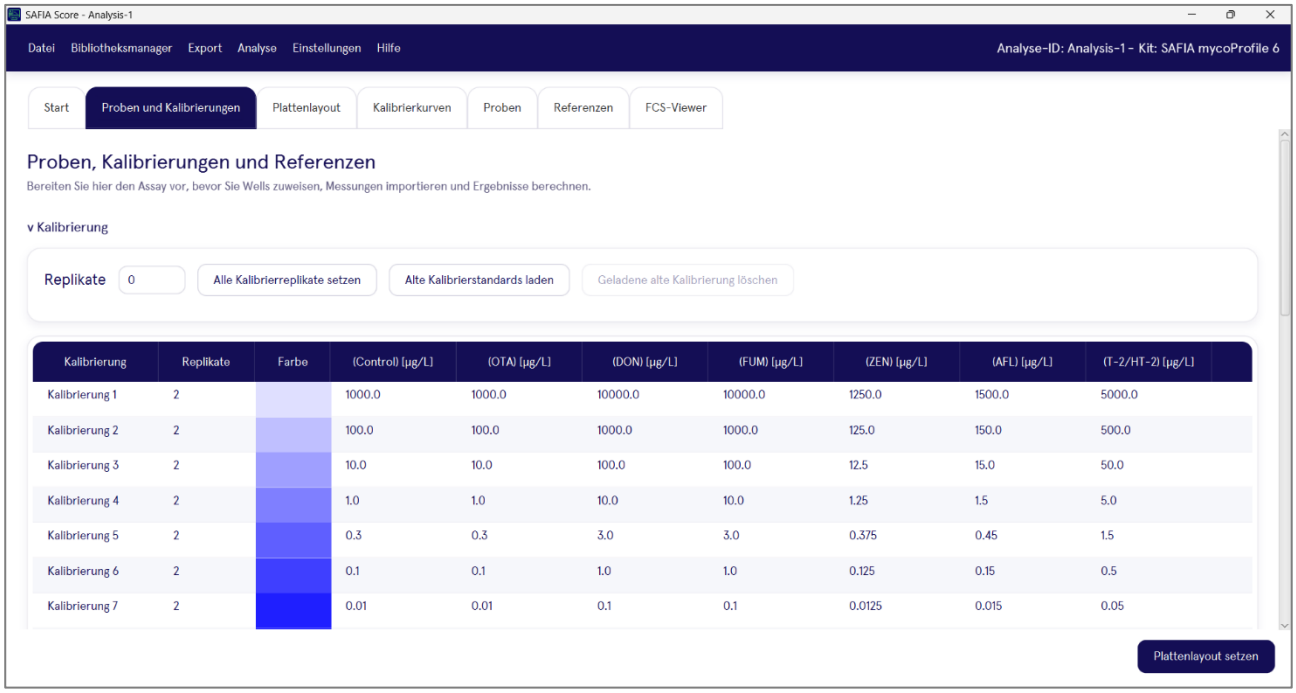


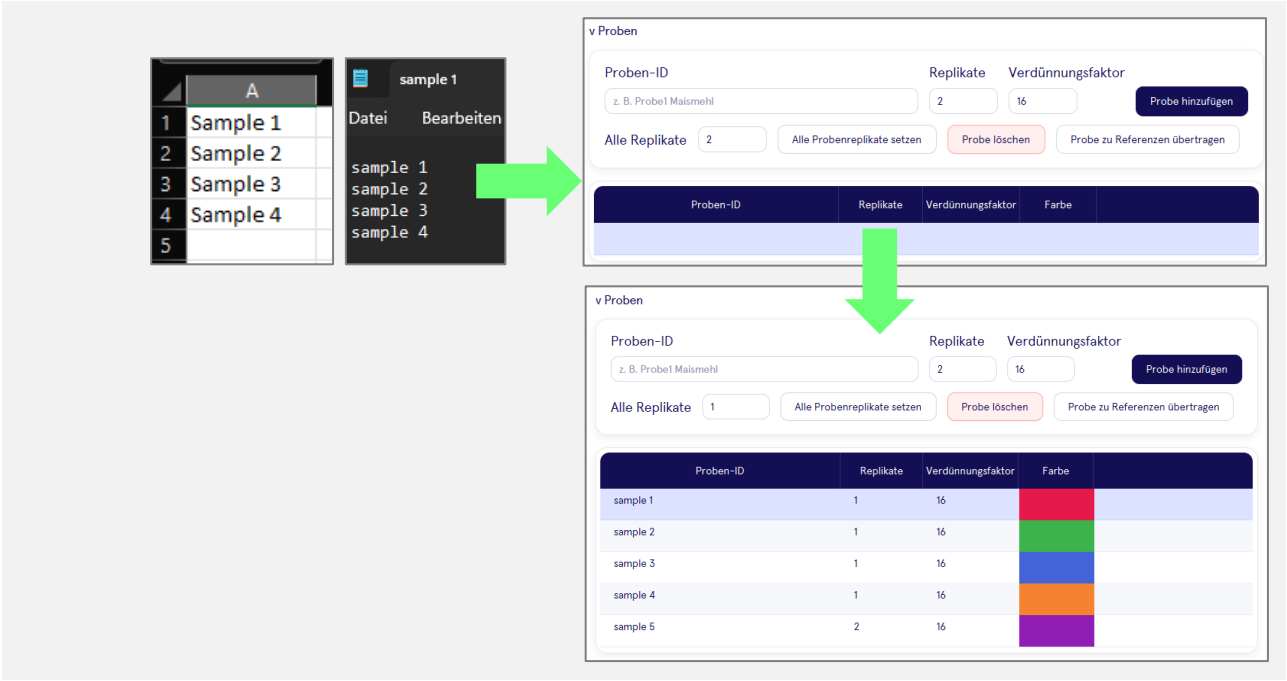
Abbildung 9 Übersicht der Funktionen des Arbeitsbereichs Proben und Kalibrierung

6. Tragen Sie nun Ihre Proben in die Tabelle **Proben** ein. Vergeben Sie für jede Probe eine eineindeutige Proben-ID (Probenbezeichnung) und legen die Anzahl der Replikate sowie den Verdünnungsfaktor fest. Verwenden Sie keine Sonderzeichen. Beides kann auch direkt in der Tabelle durch Anklicken editiert werden. Die Proben-ID kann durch Doppelklick in die entsprechende Zelle geändert, jedoch niemals doppelt vergeben werden.



Die Sample-ID kann direkt eingetippt werden oder mit einem Barcodescanner in die Zwischenablage übernommen und in SAFIA Score eingefügt oder aus einem Tabellenkalkulationsprogramm (z.B. Excel) herauskopiert und eingefügt werden. Durch einen Doppelklick auf eine Zelle der Spalte **Proben-ID** können Sie den Namen einer einzelnen Proben- eingeben oder ändern.

1. Probennamen in Excel oder einem Textprogramm als Liste erstellen und kopieren.
2. In der Probentabelle eine freie hellblaue Zeile auswählen und mit **Strg + V** einfügen.
3. Die Probennamen werden automatisch in die Probentabelle übernommen.



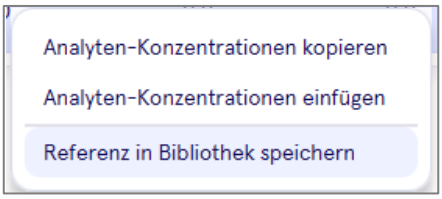
7. Die Werte in den Spalten **Replikate** und **Verdünnungsfaktor** können jederzeit nachträglich geändert werden. Per Rechtsklick auf einen Wert kann dieser für alle anderen Proben übernommen werden.



Den Verdünnungsfaktor finden Sie in Abschnitt 6. Im **High-Throughput-Protokoll** beträgt er **16**, im **High-Sensitive-Protokoll 8**. Soll dieselbe Probe in mehreren Verdünnungsstufen gemessen werden, muss für jede Verdünnungsstufe eine eigene **Sample ID** vergeben werden.

8. In die Tabelle **Referenzen** können Sie Proben mit Referenzkonzentration eintragen, analog zur Tabelle **Proben**. Nach dem Ende der Analyse ermittelt SAFIA Score automatisch die Wiederfindungsrate der Referenzproben. Mithilfe des Buttons Probe zu Referenzen übertragen können Sie auch Referenzproben, die versehentlich in die Proben-Tabelle eingetragen wurden, zur **Referenzen-Tabelle** verschieben

9. Über Rechtsklick können Sie die Analyten-Konzentrationen kopieren und einfügen (z.B. wenn Sie eine Referenzprobe in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen messen wollen. Außerdem können Sie die Referenzprobe in der Referenzbibliothek speichern.



10. Über den Button Aus Referenzbibliothek auswählen können Sie eine Referenzprobe aus Ihrer Bibliothek hinzufügen. Mehr Info zur Referenzbibliothek finden Sie in Abschnitt 5.1.6

11. Sobald Sie alle Proben eingetragen haben, gehen klicken Sie unten rechts auf den Button Plattenlayout setzen um eine Zuordnung der Proben und Standards zu den Kavitäten der Mikrotiterplatte vorzunehmen. Die Kavitäten haben einen alphanumerischen Code (A1, B1, C1 usw. bis H12) (siehe Abbildung 10**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Zuordnung kann automatisch über die Buttons **Block (V)** oder **Block (H)** erfolgen. Dabei werden die Replikate der Proben und Referenzproben entweder vertikal (V) oder horizontal (H) angeordnet. Die Replikate der Kalibrationsstandards werden grundsätzlich horizontal auf der Mikrotiterplatte platziert. Mithilfe des Buttons *Clear* können Sie alle Eingaben löschen.

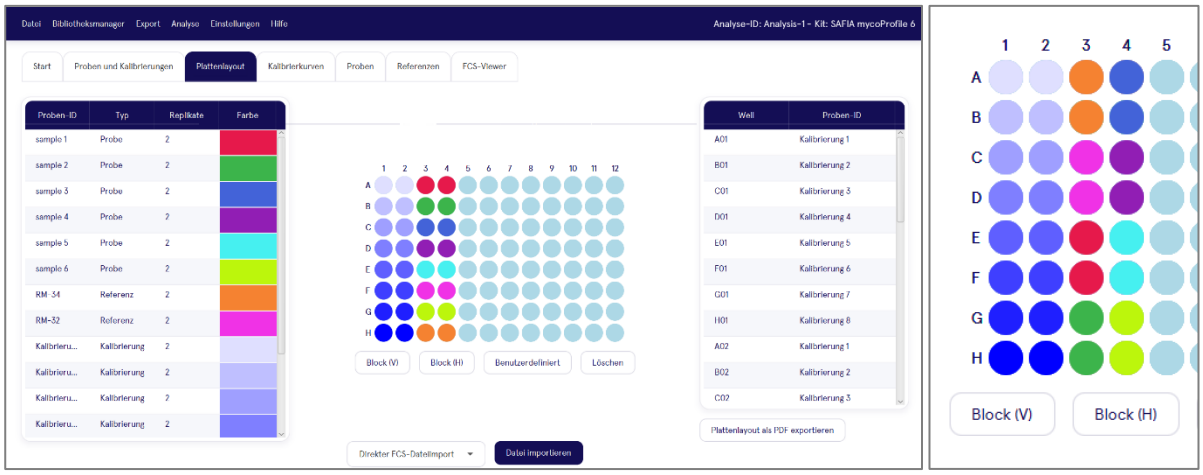
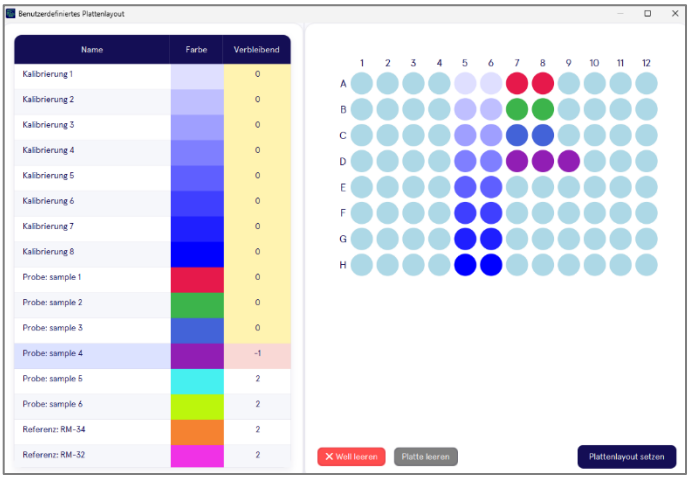


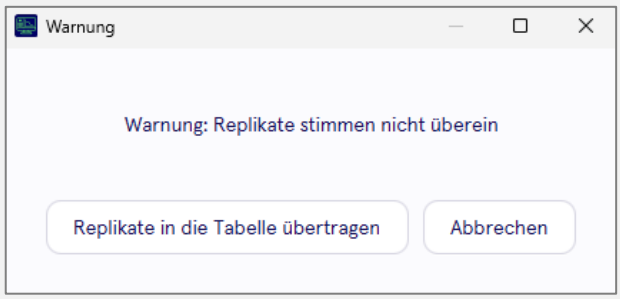
Abbildung 10 Übersicht der Funktionen im Arbeitsbereich Plattenlayout

12. Das Plattenlayout kann auch manuell mithilfe des Buttons **Benutzerdefiniert** erstellt werden. Dadurch öffnet sich ein separates Fenster

13. . In der Tabelle auf der linken Seite wählen Sie die gewünschte Probe aus und ordnen dieser durch Klicken ein einzelnes Well oder durch Klicken und Ziehen mehrere Wells zu. Falsch zugewiesene Proben können in gleicher Weise mit der Aktivierung des Buttons **Well leeren** in gleicher Weise wieder entfernt werden. Alternativ lassen sich alle Replikate einer Probe per Drag-and-Drop auf die Platte ziehen; diese werden dabei automatisch horizontal angeordnet. In der Spalte **Verbleibend** wird die Anzahl der Replikate angezeigt, die noch nicht auf der Platte platziert wurden. Werden einer Probe mehr Kavitäten zugeordnet als ursprünglich unter **Replikate** angegeben, erscheint dort eine negative Zahl.



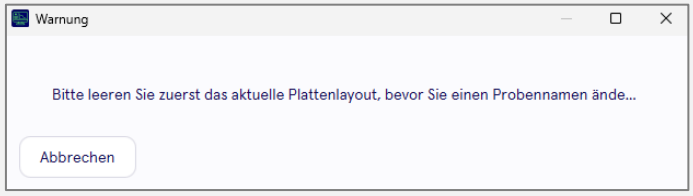
Es ist essenziell, dass die angegebenen Wiederholungsmessungen der Standards und Proben aus dem Arbeitsbereich **Proben und Kalibrierungen** mit den Replikaten im Arbeitsbereich **Plattenlayout** übereinstimmen. Sollte dies nach der Erstellung des Plattenlayouts mithilfe der Funktion „Benutzerdefiniert“ nicht der Fall sein wird automatisch eine Warnung angezeigt.



Sie haben nun die Möglichkeit entweder den Vorgang abzubrechen und das Plattenlayout entsprechend zu ändern (Button **Abbrechen**), oder die Wiederholungsmessungen gleich in die entsprechende Tabelle unter **Proben und Kalibrierungen** eintragen zu lassen (Button **Replikate in die Tabelle übertragen**).

Über den Button Plattenlayout als PDF exportieren können Sie das Plattenlayout als PDF exportieren.

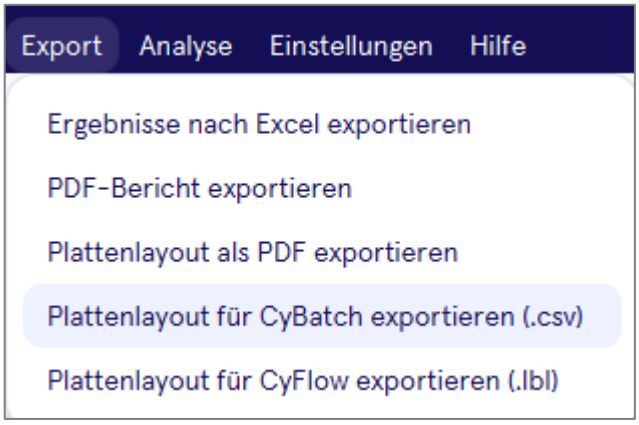
Wenn Sie nach der Erstellung des Plattenlayouts die Probennamen ändern möchten, müssen Sie zunächst das aktuelle Plattenlayout löschen.



14. Speichern Sie die *SAFIA Score* Datei (.sdf) ab, um die Analyse später fortzusetzen. Dies ist möglich unter dem Menü **Datei → Speichern unter**.

15. Exportieren Sie nun das Plattenlayout über Export → Export for CyView Batch und speichern Sie die Datei auf dem Gerätcomputer.

16. Die Vorbereitung des Assays in *SAFIA Score* ist nun abgeschlossen. Sie können das erstellte *Plate Layout* nun im Assay verwenden und die Messung im RI-300 durchführen.



6 Probenvorbereitung

Die zu wählende Probenvorbereitung ist abhängig von der Art des Lebensmittels (siehe Tabelle 5). Die Proben müssen vor der Extraktion homogenisiert vorliegen, z. B. durch Vermahlen des Probenmaterials mit einer Mühle. Hierbei ist auf einheitliche Korngrößen und auf die jeweils geltenden Vorschriften zu achten. Die angegebenen Probenmengen sollten nicht unterschritten werden, können bei Bedarf aber größer gewählt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Verhältnisse von Probenmaterial und Extraktionsmittel nicht geändert werden dürfen. Die Probenvorbereitung gliedert sich in folgende Schritte:

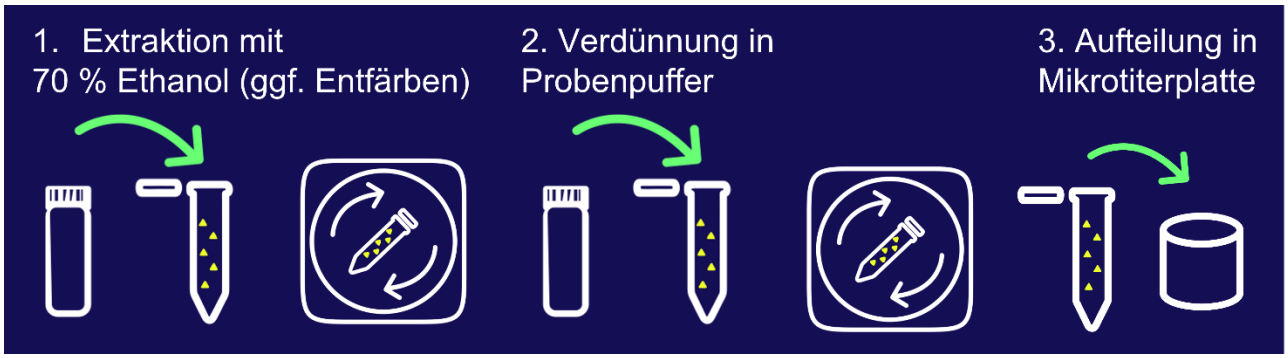


Abbildung 11 Übersicht über die Schritte der Probenvorbereitung

6.1 Puffervorbereitung

Vor dem Bearbeiten der Proben muss das Probenpufferkonzentrat **1:10** verdünnt werden:

- **15 mL** des Probenpufferkonzentrats in sauberes, verschließbares Glasgefäß füllen.
- **135 mL** deionisiertes Wasser hinzufügen.
- Verdünnten Probenpuffer im Kühlschrank bei 2-8 °C lagern.
- Bis zum Ablauf des Verfallsdatums des Kits verwendbar.
- Vor Verwendung muss der Probenpuffer auf Raumtemperatur gebracht werden.

Es kann vorkommen, dass bei Lagerung des Probenpufferkonzentrats bei 2 - 8 °C ein Stoff ausfällt. Dieser löst sich vollständig beim Verdünnen. **Bitte achten Sie darauf, dass der gesamte Inhalt der Flasche gelöst wird. Spülen Sie die Flasche ggf. mit dem verdünnten Probenpuffer nach.**

6.2 Anleitung der Probenvorbereitung

Folgen Sie zur Probenvorbereitung dem in Tabelle 5 angegebenen Protokoll für die jeweilige Matrix. Da die Probenvorbereitung matrixspezifisch ist, sind für einige Matrizes geringfügige Anpassungen des Standardprotokolls erforderlich (z. B. feste Lebensmittel mit hohem Proteingehalt). Beachten Sie hierzu auch die Hinweise zu besonderen Matrizes in Abschnitt 9.
Der Verdünnungsfaktor beträgt im High-Throughput-Protokoll 16, da eine größere Menge Extraktionsmittel verwendet wird. Im High-Sensitivity-Protokoll beträgt er 8, da die Extraktion mit einer geringeren Menge Extraktionsmittel erfolgt. Bei einigen Matrizes, wie beispielsweise Heu, Kräutern oder Gewürzen, ist eine Reduzierung des Extraktionsmittels jedoch nicht möglich, da die Probe sonst nicht mehr homogen extrahiert werden kann.
Weitere Protokolle für spezifische Matrizes und Anwendungen sowie Aktualisierungen bestehender Protokolle sind unter www.safia.tech verfügbar. Bitte prüfen Sie regelmäßig, ob neue Updates vorliegen.

Tabelle 5. Protokolle der Probenvorbereitung für unterschiedliche Matrices. Abweichungen vom Standardprotokoll sind grün hervorgehoben.

Probenart	Beispiele	Probenvorbereitung	Faktor
Feste Lebensmittel mit hohem Proteingehalt	Getreide, Mais, Hülsenfrüchte	1) **5 g** Probenmaterial einwiegen. 2) **20 mL (10 mL)** 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für 15 min schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren. 4) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z. B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 5) **10 min** bei **12.000 g** zentrifugieren.	16 (8)
Feste Lebensmittel mit hohem Zuckergehalt	Getrocknete Rosinen, Datteln, Feigen		
Lebensmittel mit hohem Fettgehalt	Haselnüsse, Erdnüsse, Mandeln, Pistazien, Öle	1) **5 g** Probenmaterial einwiegen. 2) **20 mL (10 mL)** 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für 15 min schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren. 4) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z. B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 5) **3 Messlöffel*** SAFIA PVPP-Adsorber pro 1 mL verdünnte Probe hinzugeben und **15 min** schütteln. 6) **10 min** bei **12.000 g** zentrifugieren.	16 (8)

* 3 gestrichene Messlöffel PA bzw. PVPP sind ca. 20 – 25 mg. Die Entfärbung wurde im Bereich zwischen 10 – 50 mg/mL PA/PVPP getestet, dabei wurden kein Einfluss bzgl. der Menge des Adsorbers auf die Analysenergebnisse festgestellt.

Probenart	Beispiele	Probenvorbereitung	Faktor
Spezialwaren	Heu	1) **5 g** Probenmaterial einwiegen. 2) **40 mL** 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für **15 min** schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren. 4) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z. B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 5) **3 Messlöffel*** SAFIA PA-Adsorber pro **1 mL** verdünnte Probe hinzugeben und **15 min** schütteln. 6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.	32
Produkte mit viel Anthocyanen und Polyphenolen	Cranberrys, Himbeeren	1) **5 g** Probenmaterial einwiegen. 2) **20 mL** 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für **15 min** schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren. 4) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z. B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 5) **3 Messlöffel*** SAFIA PVPP-Adsorber pro **1 mL** verdünnte Probe hinzugeben und **15 min** schütteln. 6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.	16
Flüssige Lebensmittel ohne viele Farbstoffe	Säfte, Getränke, Weißwein	1) **5 mL** Probe abmessen. 2) **5 mL** 100 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben kurz schütteln. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren, wenn viele Schwebstoffe vorhanden sind. 4) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z. B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 5) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.	8

* 3 gestrichene Messlöffel PA bzw. PVPP sind ca. 20 – 25 mg. Die Entfärbung wurde im Bereich zwischen 10 – 50 mg/mL PA/PVPP getestet, dabei wurden kein Einfluss bzgl. der Menge des Adsorbers auf die Analysenergebnisse festgestellt.

Flüssige Lebensmittel mit hoher Konzentration an roten Farbstoffen	Kirschsaft, Beerensaft, Roter Traubensaft, Rotwein	1) **5 mL** Probe abmessen. 2) **5 mL** 100 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben kurz schütteln. 3) **5 min** bei **1.000 g** zentrifugieren, wenn viele Schwebstoffe vorhanden sind. 4) 3 Messlöffel SAFIA PVPP-Adsorber pro 1 mL Extrakt hinzugeben und 15 min schütteln 5) 5 min bei 1.000 g zentrifugieren. 6) Überstand **1:4** in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln. 7) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.	8

* 3 gestrichene Messlöffel PA bzw. PVPP sind ca. 20 – 25 mg. Die Entfärbung wurde im Bereich zwischen 10 – 50 mg/mL PA/PVPP getestet, dabei wurden kein Einfluss bzgl. der Menge des Adsorbers auf die Analysenergebnisse festgestellt.

6.3 Weiterverdünnung einer Probe

Wenn bekannt ist, dass eine Probe sehr hoch belastet ist, oder wenn bei einer Messung ein Ergebnis oberhalb des IC80-Wertes liegt, sollte die Probe zusätzlich verdünnt werden. Ziel ist es, das Messergebnis in den linearen Bereich der Kalibrierkurve (zwischen IC20 und IC80) bzw. innerhalb des quantitativen Messbereiches zu bringen.
Die Weiterverdünnung erfolgt mit Blank. Dieser besteht aus 70 % Ethanol, das im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer verdünnt wird (z.B. 250 µl Ethanol + 750 µl Probenpuffer).
Für die Weiterverdünnung wird die bereits in Probenpuffer verdünnte Probe verwendet. Beispiel für eine zusätzliche 1:10-Verdünnung:

- 100 µl der in Probenpuffer verdünnten Probe
- 900 µl Blank

Der resultierende Gesamtverdünnungsfaktor ergibt sich aus der Multiplikation des bisherigen Verdünnungsfaktors mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung (z.B. bei dem High-Throughput-Protokoll beträgt der ursprüngliche Verdünnungsfaktor 16. Bei einer zusätzlichen 1:10-Verdünnung ergibt sich ein Gesamtverdünnungsfaktor von: 16 × 10 = 160).

7 Durchführung des SAFIA Assays

Der SAFIA Assay wird in den folgenden Arbeitsschritten durchgeführt.

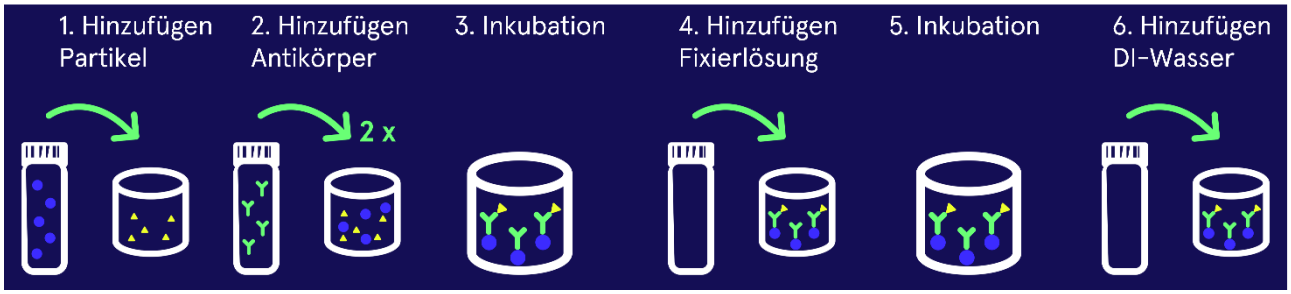


Abbildung 12 Durchführen des SAFIA Assays

7.1 Vorbereitung

1. Planen Sie, falls noch nicht geschehen, Ihr Plattenlayout (Zuweisung der Proben und Standards zu den Wells der Mikrotiterplatte). Dies kann mithilfe der Software SAFIA Score erfolgen (siehe Abschnitt 5.2).
2. Bringen Sie alle Kit-Reagenzien auf Raumtemperatur.
3. Schütteln Sie die Fixierlösung vor der Verwendung, da es bei Lagerung bei 2–8 °C zum Ausfallen einer Komponente kommen kann, die sich jedoch bei Raumtemperatur wieder vollständig löst.
4. Stellen Sie die benötigte Menge der Partikelarbeitslösung frisch her:
5. Partikelstocklösung mindestens 20 s kräftig schütteln.
6. Im Verhältnis 1:33 in Partikelpuffer verdünnen (siehe Tabelle 6 und 7).

Tabelle 6. Pipettierschema für 1, 3, 6, 9 und 12 Streifen einer MTP

	1 Streifen (8 Wells)	**3 Streifen (24 Wells)**	**6 Streifen (48 Wells)**	**9 Steifen (72 Wells)**	**1 ganze MTP (96 Wells)**	
Partikelstocklösung	3,3	10 µl	20 µl	30 µl	45 µl (alles)	
Partikelpuffer	106,7 µl	320 µl	640 µl	960 µl	1.500 µl (alles)	
Gesamtvolumen	110 µl	330 µl	660 µl	990 µl	1.545 µl	

Tabelle 7 Pipettierschema für bestimmte Anzahl an Wells einer MTP

	1 Well	**30 Wells**				
Partikelstocklösung	0,4 µl	12 µl				
Partikelpuffer	13,3 µl	399 µl				
Gesamtvolumen	13,7 µl	411 µl				

- Verdünnung ebenfalls mind. **20 s** gut schütteln

Die fertige Partikelarbeitslösung muss am Messtag aufgebraucht werden und ist nicht länger lagerfähig!

Alle anderen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfähig.

7.2 Durchführung des Assays

> ! Für jedes unterschiedliche Reagenz/ jeden Standard muss unbedingt eine neue Pipettenspitze benutzt werden.

> ! Bei Pipettieren sollten keine langen Intervalle zwischen den einzelnen Schritten entstehen & das Pipettieren sollte kontinuierlich erfolgen, sodass keine Verzögerung zwischen den einzelnen Streifen entsteht.

> ! Bei der Zugabe der Reagenzien in die einzelnen Wells ist zu beachten, dass die Pipettenspitzen auf keinen Fall die Flüssigkeit berühren, wenn die gleiche Pipettenspitze für mehrere Wells verwendet wird!

1. In jedem Well der Mikrotiterplatte werden 25 µL verdünnten Probe/ Standard vorgelegt, entsprechend dem gewählten Plattenlayout.
2. Dann werden hintereinander hinzugegeben:
   - 10 µL Partikelarbeitslösung, diese vor dem Einfüllen nochmals gut schütteln (mind. 20 s)
   - 25 µL Primärer Antikörper (AK 1)
   - 50 µL Sekundärer Antikörper (AK 2).
3. 20 min bei RT unter Schütteln inkubieren.
4. 50 µL Fixierlösung hinzugeben und 5 min bei RT unter Schütteln inkubierten.
5. 140 µL DI-Wasser hinzugegeben.
6. Die Messung im Durchflusszytometer kann nun gestartet werden, siehe Abschnitt 7.4.

7.3 Tipps und Hinweise zum Pipettieren

7.3.1 Wichtige Hinweise

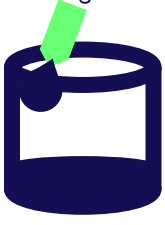
- Langsame Auf- und Abgabegeschwindigkeit wählen, da viele Reagenzien Tenside enthalten.
- Bei Verwendung von Pipetten ohne Dispensiermodus Spitze vor Aufnahme mit Flüssigkeit benetzen.
- Für jedes Reagenz/Standard/Probe eine neue Pipettenspitze verwenden
- Beim Pipettieren niemals die Flüssigkeit in der Kavität berühren!
- Da es keine Waschschritte gibt, ist besonders darauf zu achten, sauber zu arbeiten, um Kreuzkontamination zu vermeiden!
- Zur Stabilität der Hand ist es hilfreich im Sitzen zu arbeiten, um den Ellenbogen abstützen zu können

7.3.2 Vorgeschlagene Pipettiertechnik

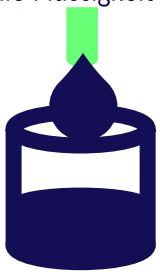
- **Probe/Standard** senkrecht einfüllen
- Boden leicht berühren



- **Partikel**- und **AK-1 Lösung** leicht schräg einfüllen
- Seitenwand berühren
- Nicht die Flüssigkeit berühren!



- **AK-2/Fixierlösung/Wasser** über Kavität einfüllen
- Nicht die Flüssigkeit berühren!



7.3.3 Pipettenwahl

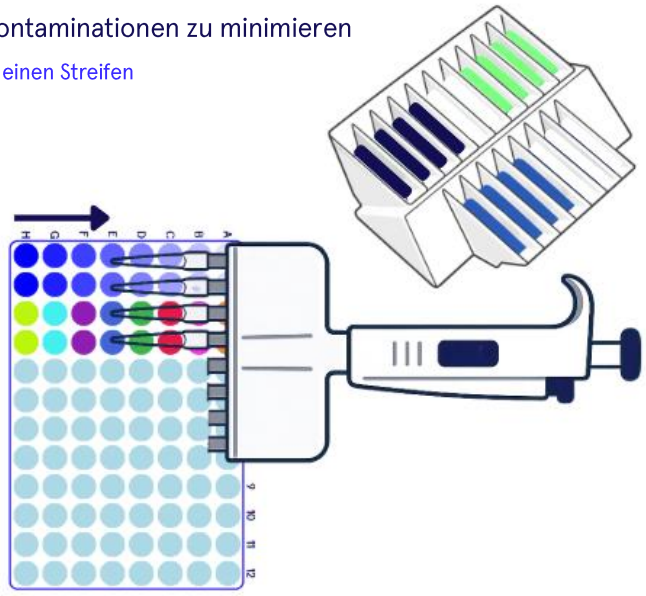
Zur Zugabe der Reagenzien kann einer Mehrkanalpipette optimal mit Dispersierfunktion oder ein elektrischer Mehrfachdispenser /Multistepper verwendet werden. Im Folgenden werden die optimalen Pipettierschritte mit der jeweiligen Pipette beschrieben.

Mehrkanalpipette:

- Besonders geeignet für eine hohe Probenanzahl und das Arbeiten in 8er-Streifen (bis zur gesamten Platte)
- Reagenzienmengen im Mehrkanal-Reservoir vorbereiten (z. B. bei 6 Streifen 6-mal die benötigte Menge pro Reagenz pro Streifen (siehe Tabelle 7) nebeneinander in Reservior vorlegen
- Mehrkanalpipette auf das Volumen eines Wells einstellen (z. B. 10 µl Partikellösung). Falls möglich, 8 Dispensierschritte einstellen. Entsprechend der Anzahl der Streifen die benötigten Pipettenkanäle mit Spitzen bestücken und Reagenzvolumen aus dem Reservoir aufnehmen
- Volumen 8-mal in die Wells pipettieren bzw. dispensieren, ohne Proben oder Standards zu berühren
- Von unten nach oben (H → A) arbeiten, um Kreuzkontaminationen zu minimieren

Tabelle 8. Benötigte Volumina der Assay-Reagenzien für 1 Well bzw. einen Streifen

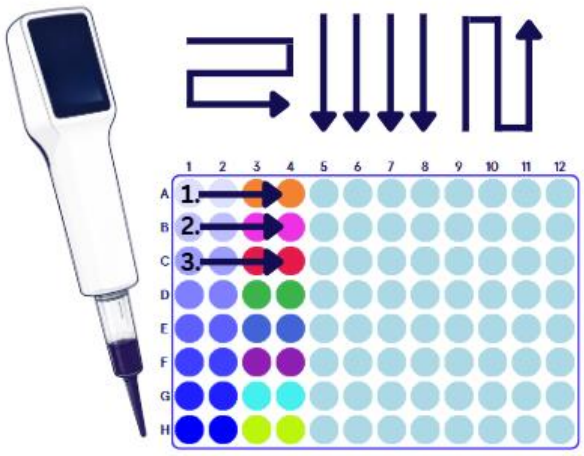
Reagenz	1 Well	1 Streifen
Partikellösung	10 µl	110 µl
AK 1	25 µl	350 µl
AK 2	50 µl	700 µl
Fixierlösung	50 µl	700 µl
DI-Wasser	140 µl	1.400 µl



- Wenn Sie mehr als 8 Streifen pipettieren möchten, führen Sie die oben beschriebenen Schritte zwei mal durch. Achten Sie dabei darauf, die Wells immer in der gleichen Reihenfolge zu befüllen.

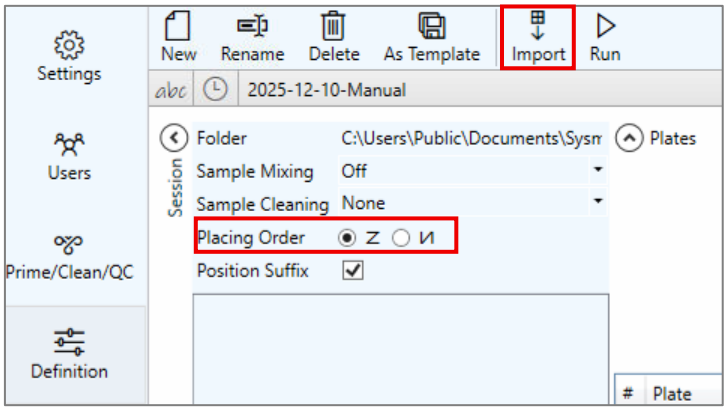
Mehrfachdispenser:

- Besonders geeignet für eine geringe Probenanzahl, da die Belegung nicht an komplette Streifen gebunden ist. Es können auch nur einzelne Wells (z. B. A–D) eines Streifens verwendet werden.
- Für 10 µl Partikellösung eine 1-ml-Spitze verwenden und die Anzahl der Steps entsprechend der Anzahl der zu befüllenden Wells einstellen.
- Für 25 µl kann ebenfalls eine 1-ml-Spitze verwendet werden. Dabei sind maximal 40 Steps pro Füllung möglich. Bei mehr als 40 Proben eine 2,5-ml-Spitze verwenden.
- Für 50 µl AK2 und Fixierlösung eine 5-ml-Spitze verwenden.
- Für 140 µl Wasser eine 5-ml-Spitze verwenden.
- Das Befüllungsmuster der Platte kann frei gewählt werden. Wichtig ist, für jedes Reagenz stets dasselbe Befüllungsmuster zu verwenden. Die Reihenfolge der Befüllung muss beibehalten werden, damit für alle Wells die gleichen Inkubationszeiten gewährleistet sind.

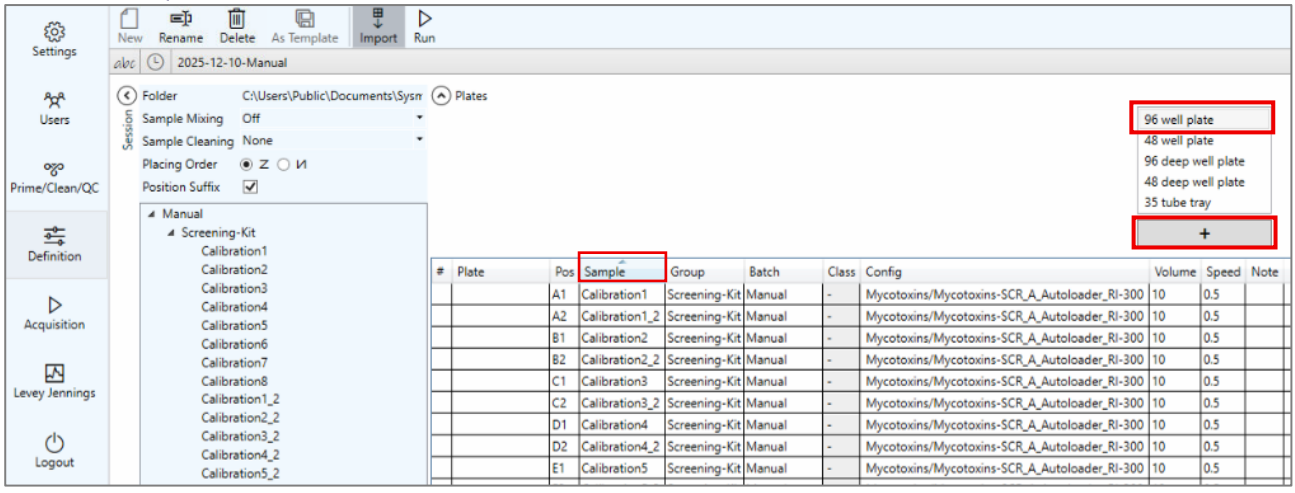


7.4 Auslesen mit dem Cyflow® RI-300 Durchflusszytometer

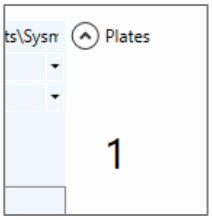
1. Wenn Sie am Messtag noch keine Performance Check durchgeführt haben, folgen Sie zunächst den Schritten in Abschnitt 4.
2. Wählen Sie in CyBatch den Menüpunkt ***Definition*** aus und starten über ***New*** eine neue Messung. Geben Sie Ihrer Messung einen Namen und Bestätigen diesen über die *Enter-Taste*.
3. Importieren Sie nun das zuvor in SAFIA Score erstellte Plattenlayout, indem Sie auf ***Import*** klicken und die entsprechende Datei auswählen.
4. Achten Sie darauf, dass die ***Placing Order*** von oben links nach unten rechts („Z“) ausgewählt ist.



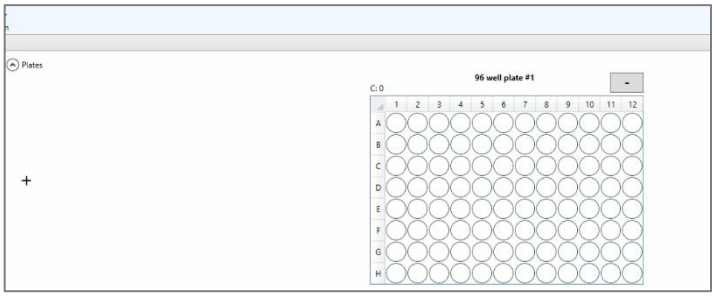
5. Wählen Sie die Option ***96 well plate*** aus und fügen Sie über den ***Plus Button*** die gewünschte Anzahl an Mikrotiterplatten hinzu.



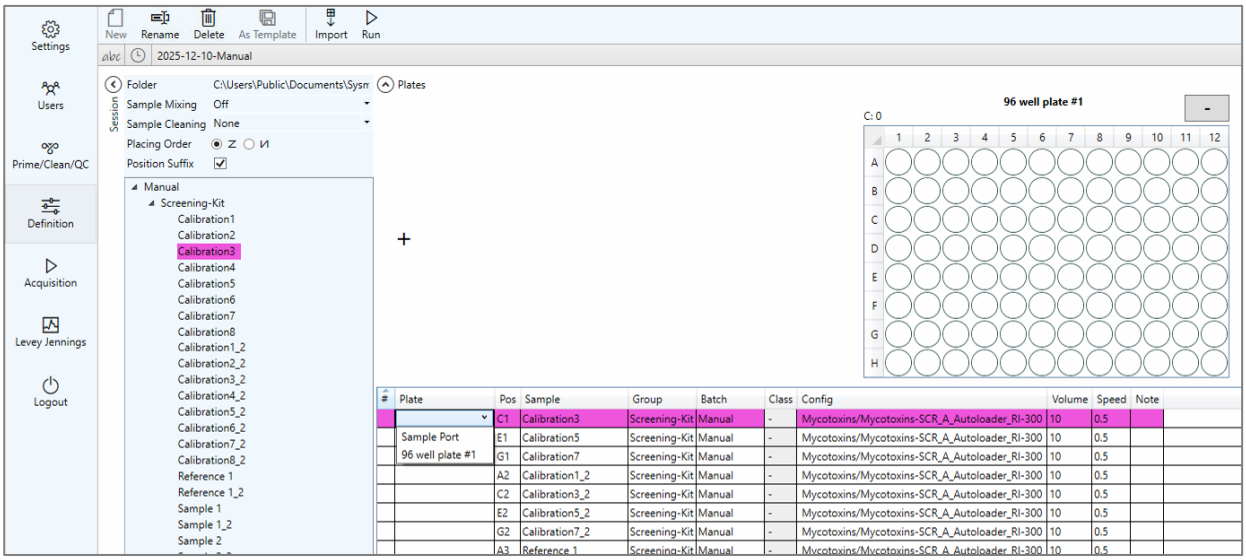
6. Die Anzahl Ihrer hinzugefügten Platten wird angezeigt.



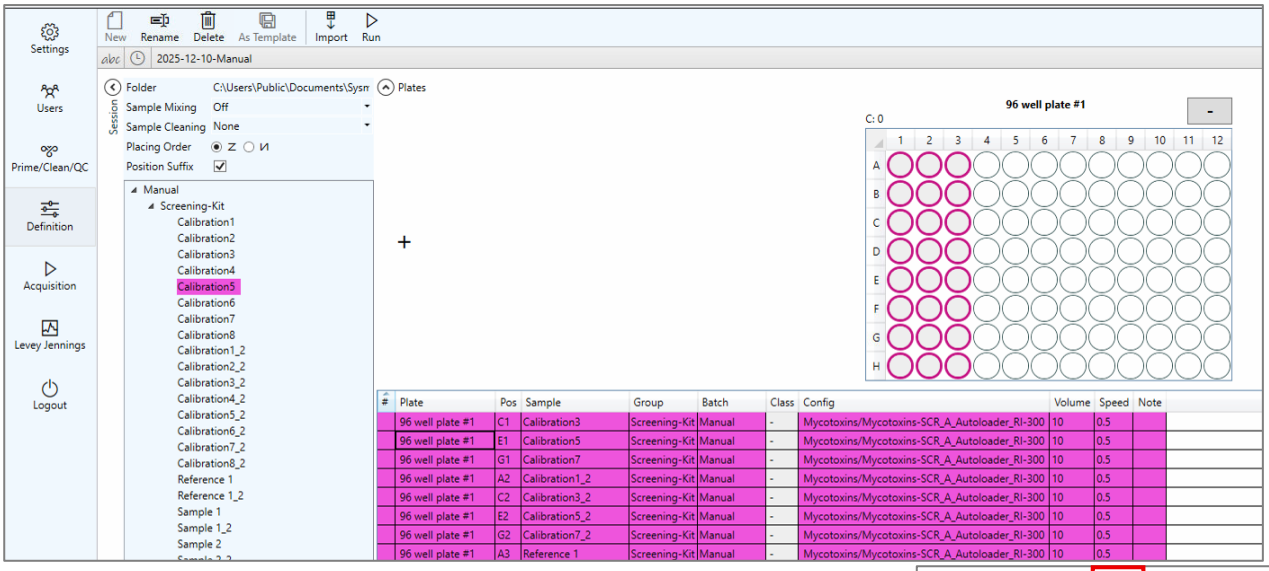
7. Durch Anklicken der Zahl wird die schematische Darstellung der Platte sichtbar.



8. Klicken Sie eine beliebe Probe an und wählen Sie 96 well plate # 1 (oder entsprechende Nummer, wenn Sie mehrere Platten hintereinander messen).



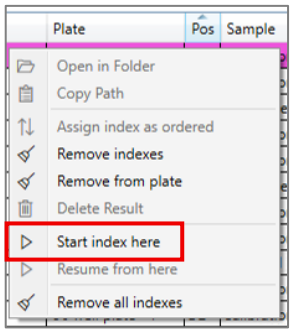
9. Kopieren Sie nun über die Tastenkombination strg+c die Einstellung der Probe. Wählen Sie über strg+a alle Proben aus und übertragen mit strg+v die Einstellung auf alle Proben.



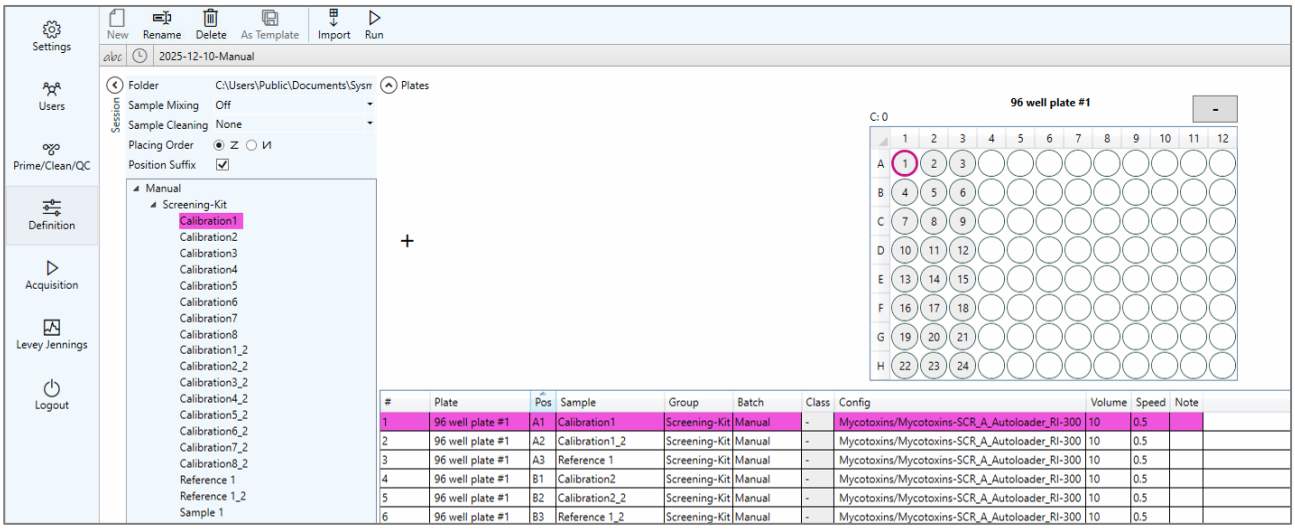
10. Sortieren Sie die Proben nun nach der Position, indem Sie auf Pos klicken (kleiner Pfeil nach oben erscheint).

Plate	Pos	Sample
96 well plate #1	A1	Calibration1
96 well plate #1	A2	Calibration1_2
96 well plate #1	A3	Blank

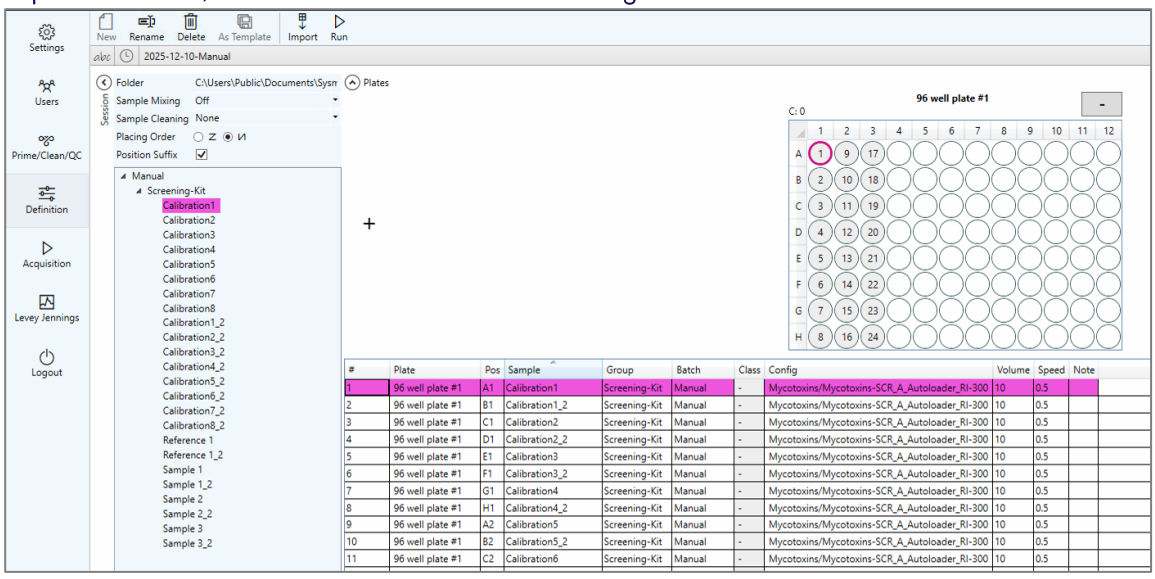
11. Wählen Sie die erste Probe aus. Machen Sie einen Rechtsklick und wählen *Start index here* aus.



12. Nun erscheint in der Platte als auch in der Tabelle die Indexierung.



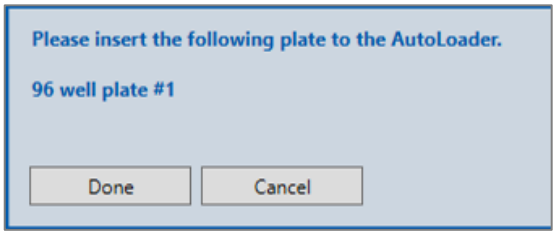
Wenn Sie bei dem Import einen Fehler machen (z.B. falsche Placing Order) werden die Probennamen falsch eingefügt, sodass Position und Sample Name in CyView Batch nicht mit dem Layout in SAFIA Score übereinstimmen. In dem Beispiel in Abbildung XY ist Sample „Calibration1_2“ in Pos B1, im Plate Layout in SAFIA Score jedoch in A2. Da für die Datenauswertung nur die Well ID/ Pos betrachtet wird und nicht die Sample (Probenname), ist die korrekte Auswertung bei diesem Fehler weiterhin gewährleistet. Für die Dokumentation der Daten ist es jedoch empfehlenswert auf den korrekten Import zu achten, damit die Daten immer eineindeutig zuzuordnen sind.



13. Klicken Sie nun auf ***Run*** um die Messung zu starten.

14. Nun öffnet sich der bewegliche Tray des *Autoloader* und fährt heraus. Stellen Sie die Mikrotiterplatte auf die dafür vorgesehene Plattform. Beachten Sie die richtige Orientierung der Platte.

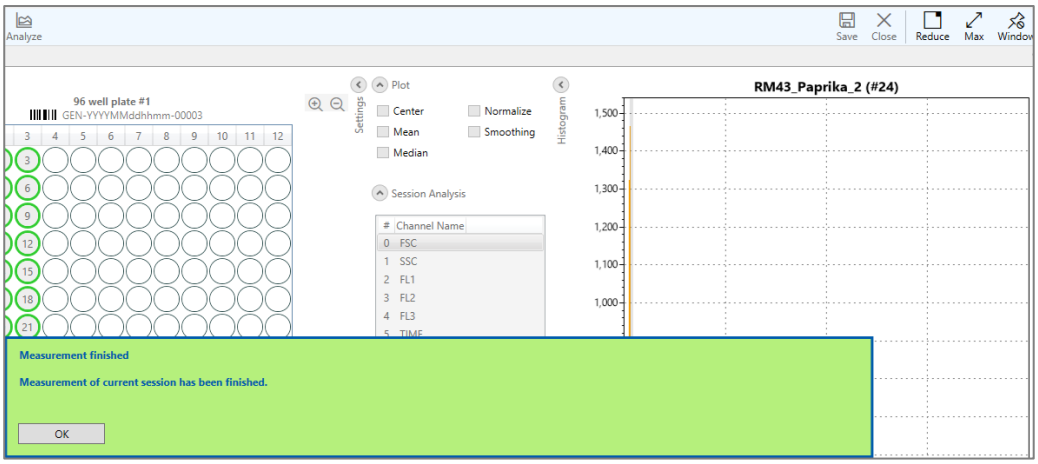
15. Klicken Sie auf *Done* um die Messung zu starten.



16. Achten Sie vor und während der Messung darauf, dass ausreichend *Sheath Fluid* vorhanden ist. Füllen Sie die Flasche nach, wenn eine Warnung erscheint.

17. Die Messung erfolgt nun vollautomatisch. Sie sollten dennoch die ersten 5 Messungen überwachen, ob z. B. im System befindliche Luftblasen die Messungen beeinflussen.

18. Nach Abschluss der Messung erscheint ein grünes Meldungsfenster. Alle Messdaten wurden automatisch im Ordner Measurements gespeichert und können nun in SAFIA Score ausgewertet werden. Klicken Sie auf ***Save*** und ***Close***, wenn Sie eine neue Messung starten möchten.



Bei einer erfolgreichen Messung sehen Sie im Streuplot FSC/SSC eine Population, die im Gate Partikel auftaucht. Ebenso bilden sich bis zu 7 Populationen im Streuplot FSC/FL-3, siehe Abbildung 13. Diese müssen für die Messung nicht in den richtigen Gates liegen, dies wird ggf. später in der Auswertung korrigiert. Je nach verwendetem Kit sind in diesem Plot unterschiedliche Populationen, die für die unterschiedlichen Mykotoxine stehen, zu erkennen.

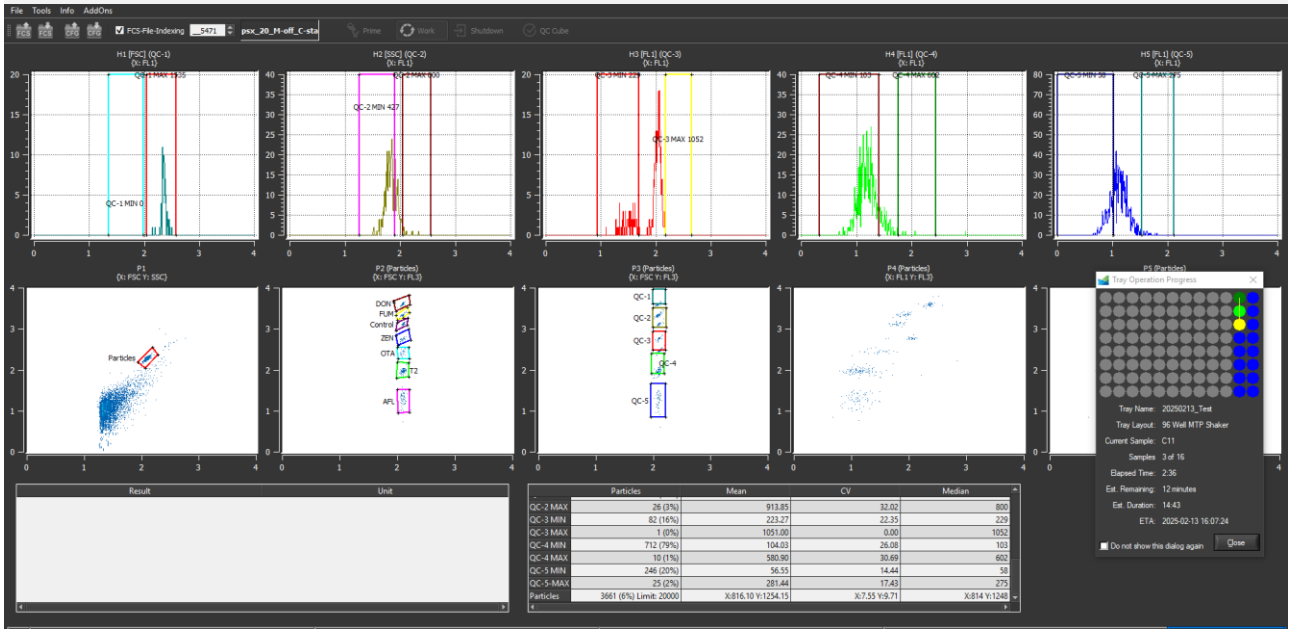
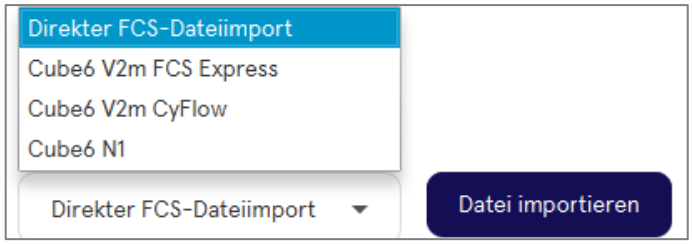


Abbildung 13. Typische Ansicht bei der Messung eines SAFIA Assays. Oben: Histogramm für die Intensität im FL-1 eines Analyten. Unten: Streuplot FSC/SSC und Streuplot FSC/FL-3

7.5 Auswertung des Assays mithilfe von SAFIA Score

1. Wenn Sie in SAFIA Score Ihren Assay noch nicht geplant haben, folgend Sie den Anweisungen in Abschnitt 5.2.



2. Wählen Sie im Arbeitsbereich **Plattenlayout** *Direkter FCS-Dateiimport* aus, klicken Sie anschließend auf *Datei importieren* und wählen alle zuvor generierten .fcs-Dateien aus, welche in dem Ordner mit Namen ihrer Tray-ID abgespeichert wurden:
   C:\Users\Public\Documents\Sysmex\Measurements

3. Anhand des Plattenlayouts und der Messdaten der Kalibrationsstandards werden nun sigmoide Kalibrierkurve erstellt (siehe Abbildung 14). Auf deren Grundlage erfolgt die automatische Berechnung der Mykotoxinkonzentrationen in den Proben.

4. Die Auswertung der Daten erfolgt automatisch. Treten bei den Messungen Abweichungen auf, erscheint entweder der Hinweis „FCS prüfen“ oder „FCS-Datei ausgeschlossen“. Bitte beachten Sie die entsprechenden Hinweise und führen Sie die empfohlenen Maßnahmen durch. Weitere Informationen hierzu finden Sie in Abschnitt 5.2. Wenn Sie die Messdaten im Detail betrachten möchten, klicken Sie auf den Reiter **FCS-Viewer**.

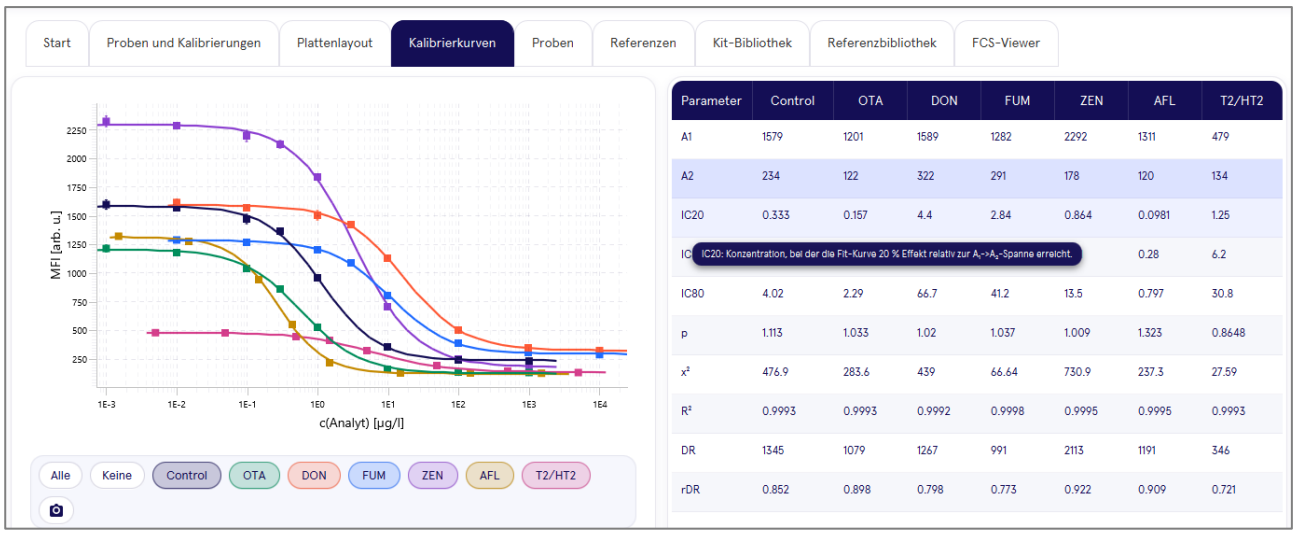


Abbildung 14. Übersicht über die Funktionen im Arbeitsbereich Kalibrierkurven

5. Rechts oben werden die durch den Fit berechneten Kurvenparameter angezeigt. Anhand dieser können Sie beurteilen, ob die Kalibration des Assays erfolgreich war. Bewegen Sie den Mauszeiger über einen Parameter, um eine kurze Erläuterung zu dessen Bedeutung und Funktion anzuzeigen. Eine gültige Kalibrierkurve sollte folgende Parameter aufweisen:
   - *relative Dynamic Range* (rDR): mindestens 0.60, optimal > 0.80
   - Bestimmtheitsmaß (R^2): mindestens 0.990
   - Steigungsparameter der Kurve am Testmittelpunkt (p):etwa 0.5-2.0, optimal um 1

IC-Parameter	Control	OTA	DON	FUM	ZEN	AFL	T-2
IC50 Min [µg/L]	0.250	0.180	4.35	3.00	1.10	0.0650	0.360
IC50 Max [µg/L]	2.40	1.28	90.0	26.0	7.00	0.600	9.20

   Erfüllt eine Kurve nicht die Richtwerte dieser Parameter, beachten Sie die Hinweise in Abschnitt 10.9.

Unten im Fenster sehen Sie tabellarisch die Ergebnisse der einzelnen Kalibrationsstandards zusammengefasst, geordnet nach Analyten. Die Berechnung der Kalibrierkurve erfolgt auf Basis der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI, in a. u.) der Replikatmessung jedes Standards. Diese und die entsprechende Standardabweichung werden in der Tabelle dargestellt.

Wenn mindestens 3 Replikate gemessen wurden, wird automatisch ein Ausreißertest nach Grubbs (Signifikanzlevel $\alpha = 0.95$) durchgeführt, der mögliche Ausreißermessungen anzeigt. Durch Doppelklick auf die einzelnen Zeilen der Tabelle öffnet sich eine Detailansicht. In der Spalte **n/N** sind die Messungen, die in die Auswertung einbezogen werden, mit „Ja" gekennzeichnet. Durch Klicken auf „Ja" wird der Eintrag auf „Nein" geändert und die entsprechende Messung von der Auswertung ausgeschlossen. Ein erneuter Klick schließt die Messung wieder in die Auswertung ein. Klicken Sie auf „Anwenden", um Ihre Auswahl zu bestätigen. Mit „Schließen" verwerfen Sie die vorgenommenen Änderungen.

Beachten Sie, dass der Grubbs-Test lediglich als Unterstützung zum Auffinden von extremen Messausreißern gedacht ist und gerade bei kleinem Stichprobenumfang unzuverlässige Aussagen generieren kann. Z. B., wenn bei drei Replikatmessungen 2 der Werte vollständig übereinstimmen, sollten der als „Ausreißer" gekennzeichnete Dritte Wert nicht ausgeschlossen werden.



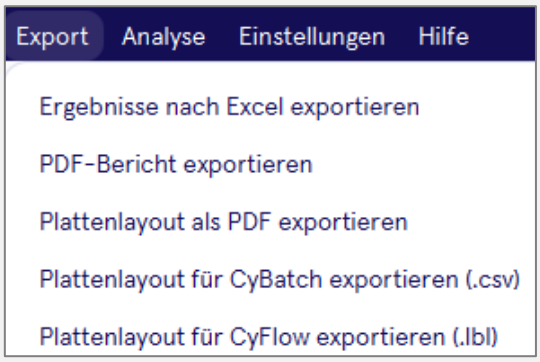
6. In den Arbeitsbereichen **Proben und Referenzen** sind die Ergebnisse der einzelnen Proben bzw. Referenzproben aufgelistet (siehe Abbildung 15). Klicken Sie auf Speichern, um Ihre Auswertung zu speichern.
7. Über den Button Ausreißer anzeigen bzw Interpretation anzeigen können Sie zwischen der Interpretationsansicht bzw. der Ausreißer-Ansicht hin und her schalten. Die Ausreißer-Ansicht ist analog zur Ausreißer-Ansicht der **Kalibrierkurve** gestaltet und zeigt Ihnen die Ergebnisse einen Grubbs-Ausreißer-Tests an.



Abbildung 15 Ausschnitt des Arbeitsbereichs Proben mit einer Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Proben. Dies ist identisch zu Ansicht im Arbeitsbereich Referenzen

Über Export haben Sie die Option Ihre Ergebnisse nach Excel oder als PDF-Bericht zu exportieren. In der Datei finden Sie in den entsprechenden Blättern die zusammengefasten Ergebnisse der Messungen der Proben und Referenzproben, sowie die Parameter der einzelnen Kalibrierkurven.

Über den Screenshot Button können Sie die Tabellen als Grafik exportieren.



7.5.1 Hinweise zur Dateninterpretation

Die Interpretationsansicht gibt Ihnen eine optische Hilfestellung, ob die Kontrollmessung bestanden wurde (Anzeige: bestanden/durchgefallen) bzw. ob der gemessene Wert für ein Toxin über oder unter dem IC-20-Wert liegt. Der IC-20 Wert kann für eine nicht validierte Matrix als ungefähre Bestimmungsgrenze angesehen werden. **Die Interpretation, ob ein Mykotoxin ober- oder unterhalb der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze liegt, ist abhängig von der getesteten Matrix und muss anhand der Kit-Daten oder eigener Validierungsdaten für nicht aufgeführte Matrices erfolgen. Die entsprechenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Messbereiche sind im Validierungsbericht des jeweiligen Kits aufgeführt. Dieser ist auf unserer Website unter Produkte → entsprechendes Produkt → Validierungsbericht verlinkt (am Ende der Produktseite).**

Farbkennzeichnung der Messergebnisse:

- **Grün:** Messergebnis unterhalb des IC-20-Werts
- **Gelb:** Messergebnis oberhalb des IC-20-Werts
- **Orange:** Messergebnis oberhalb des IC-80-Werts
- **Rot:** Die interne Kontrolle ist fehlgeschlagen



Analyt	[µg/l]	Interpretation	n/N
Control	7.01 ± 0	nicht bestanden (>3.31 µg/L)	1/1

Ist die gemessene MFI größer als A1-Wert (oberes Plateau der Kurve), liegt die Messung außerhalb der Kalibration und für diesen Fall eine Quantifizierung der Proben mathematisch nicht möglich ist. Daher wird angezeigt, dass das Ergebnis kleiner der Konzentration von A1 ist. Die Werte werden in der Berechnung automatisch ausgeschlossen. Analoges gilt für Werte, die kleiner sind als der A2-Wert (unteres Plateau der Kurve). Ein Unterschreiten des A2-Wertes bedeutet, dass die Konzentration des Analyten sehr hoch ist. Ergebnisse in diesem Bereich sollten besonders kritisch hinterfragt werden; die Wahrscheinlichkeit eines Messfehlers ist hoch. Ziehen Sie zur Interpretation auch die Control-Messung heran und messen Sie die Probe ggf. erneut nach starker Verdünnung (siehe Abschnitt 6.3).

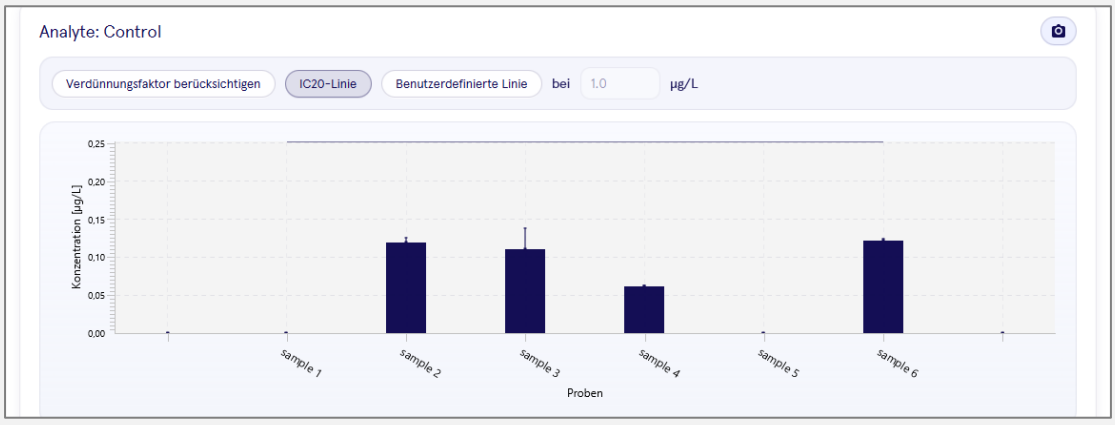
Per Klick kann der Verdünnungsfaktor für die Berechnung ein- oder ausgeschlossen werden.



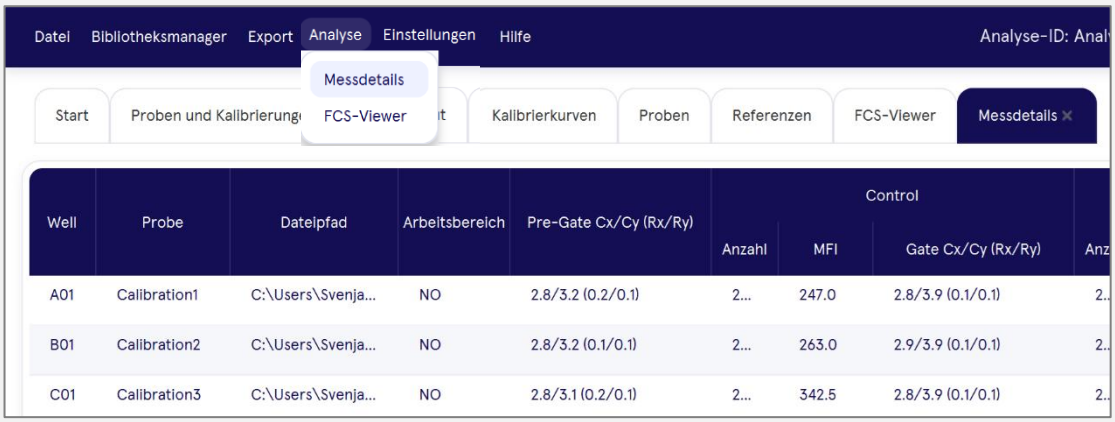
Analog zu den Tabellen im Arbeitsbereich **Kalibrierkurve** gelangen Sie durch Doppelklick auf eine Detailansicht. Hier können einzelne Messungen in die Berechnung ein- oder ausgeschlossen werden (n/N „Ja“ oder „Nein“).

Im unteren Bereich werden die ermittelten Konzentrationen in Form eines Säulendiagramms angezeigt, geordnet nach Analyten. Das Diagramm kann ebenfalls über den Screenshot-Button kopiert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit den Verdünnungsfaktor in jeder Grafik einzubeziehen, sowie Referenzlinien anzuzeigen. Wenn man grafisch beurteilen möchte, ob Proben unterhalb des IC20 liegen, sollte man die Ansicht ohne VF verwenden, da die IC20-Grenzlinie dort auf dem IC20 ohne VF basiert.

Beim Analyten Control handelt es sich um die Kontrollmessung. Die Kontrolle zeigt an, ob es sich um ein falsch positives Ergebnis einer Messung handeln könnte. Die Kontrolle gilt als bestanden, wenn der ermittelte Wert einer Probe kleiner als der IC20-Wert der zugehörigen Control-Kalibrierkurve ist. Dies kann leicht grafisch überprüft werden. Dazu muss das Feld **Verdünnungsfaktor berücksichtigen** deaktiviert und das Feld **IC-20 Linie** aktiviert sein.



Im Menü **Analyse** kann eine Tabelle der eingelesenen Messdaten angezeigt werden.



Dies kann bei der Bewertung einzelner Messungen hilfreich sein. Wenn bspw. keine oder nur sehr wenige Partikel erfasst wurden, lässt sich dies an der Spalte *Count* erkennen. Der Arbeitsbereich **Messdetails** ist nur aktiv, wenn im Menü **Analyse** die Option **Analysedetails** aktiviert wurde. Dieser Arbeitsbereich kann bei Bedarf auch wieder geschlossen werden.

7.5.2 Datenansicht im FCS-Viewer

- Im FCS-Viewer werden Messdaten analog zur CyFlow-Ansicht dargestellt.
- Links in der Tabelle stehen Well-ID, Probenname und die verwendete Messdatei. Unter Status ist ersichtlich, ob eine Messung in die Auswertung einbezogen oder ausgeschlossen wurde; der Ausschlussgrund ist ggf. in der Spalte Grund angegeben. Ereignisse zeigt die Gesamtzahl der Events, Gates die Anzahl der erkannten Gates.
- Rechts befinden sich zwei Scatterplots: Im FSC/SSC-Plot werden alle Events nach Größe und Granularität dargestellt; SAFIA-Partikel werden automatisch im Pre-Gate erfasst (inkl. Eventzahl. Im FCS/FL-3-Plot wird die Messung des FL-3-Detektors dargestellt, der den Farbcode der SAFIA-Partikel erfasst, wodurch die zuvor im Pre-Gate erfassten Partikel nach Analyten aufgetrennt werden. Je nach Kit werden bis zu sieben Populationen mit automatischen Gates und Eventzahlen erkannt. Unterhalb sind Histogramme pro Analyten dargestellt (FL1 vs. Ereignisse). Der Peak-Mittelpunkt entspricht dem MFI, aus dem über die Kalibrierkurve die Konzentration berechnet wird.

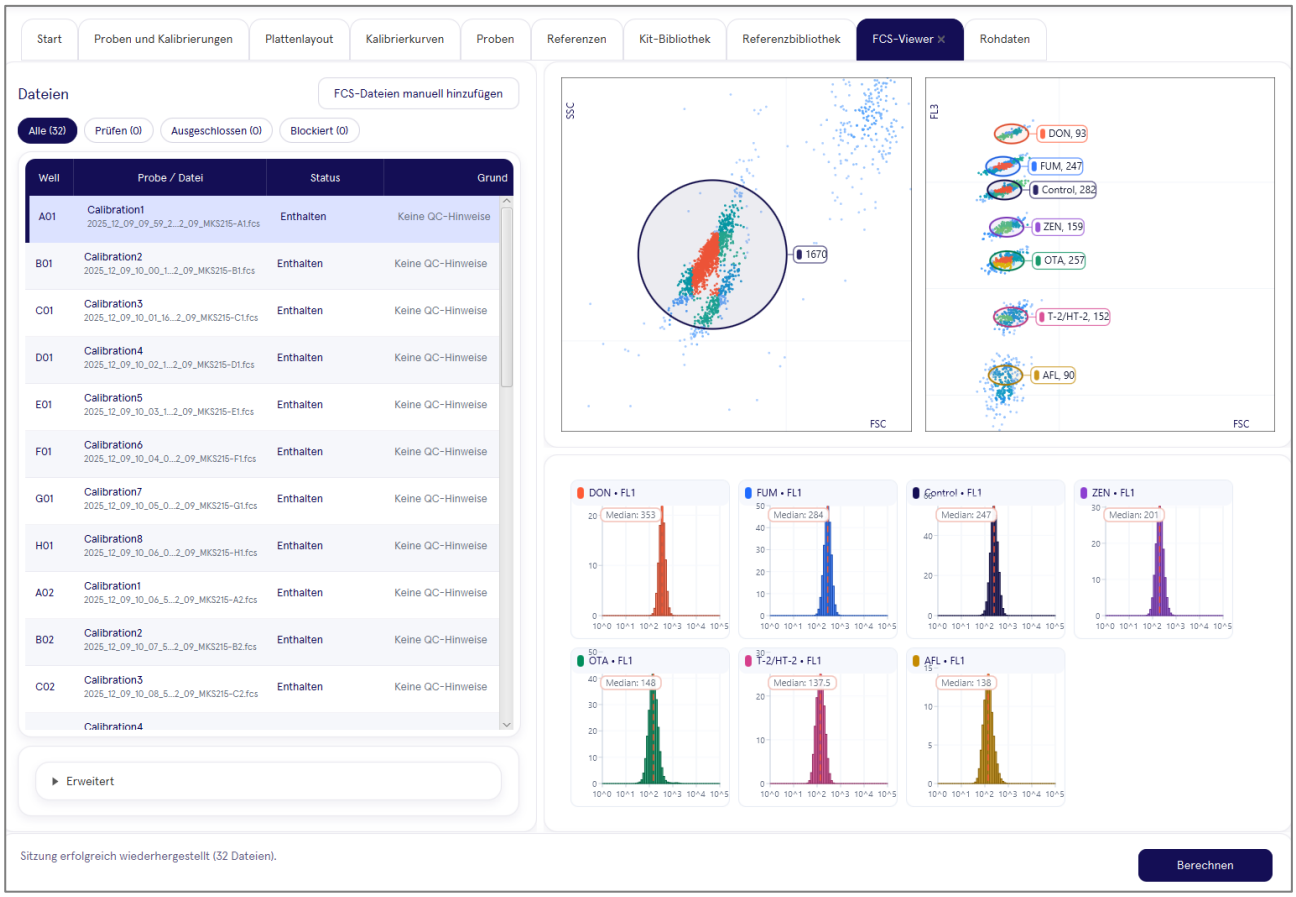


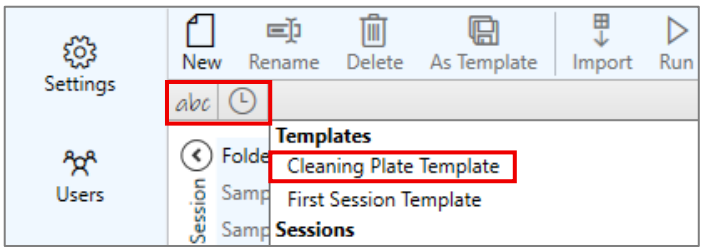
Abbildung 16 Ansicht der Messdaten im FCS-Viewer in SAFIA Score

8 Reinigen und Herunterfahren des RI-300

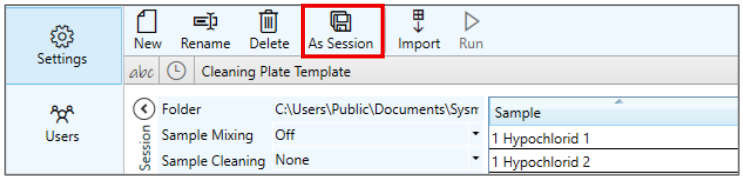
Um eine einwandfreie Funktion des RI-300 zu gewährleisten, empfehlen wir folgende Reinigung des Zytometers nach Abschluss der SAFIA Messungen durchzuführen.

1. Füllen Sie nacheinander jeweils einen Streifen (8 Kavitäten Reihe A→ H) einer Mikrotiterplatte, jeweils mit 4 Wells *Hypochlorite Solution (1. Spalte A→D)*, 4 Wells *Decontamination Solution (1. Spalte E→H)*, 4 Wells *Cleaning Solution (2. Spalte A→D)* und 4 Wells *Sheath Fluid (2. Spalte E→H)*.

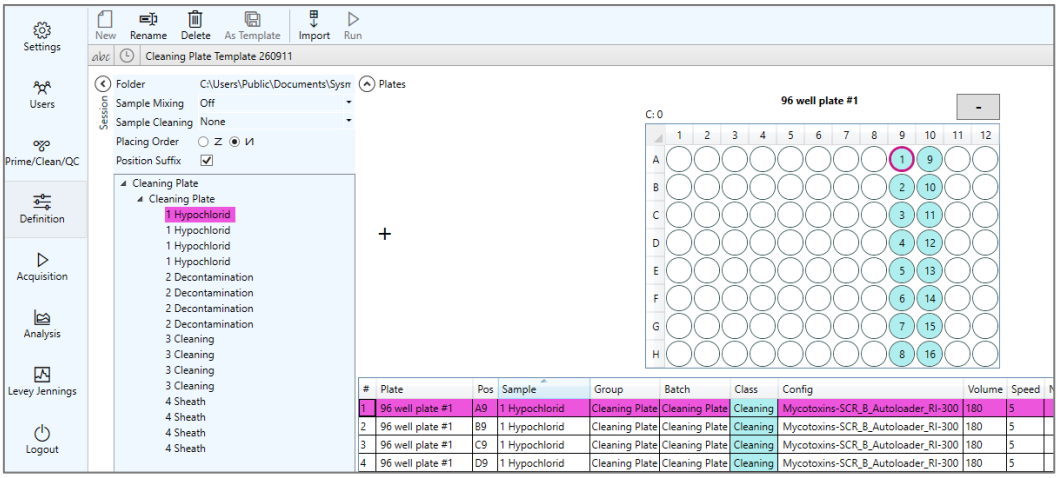
2. Klicken Sie in CyBatch bei Definition auf das ***abc-*** oder ***Uhr-Symbol*** und wählen ***Cleaning Plate Template*** aus.



3. Darauf hin öffnet sich eine Tabelle mit den voreingestellten Reinigungsproben. Klicken Sie nun auf ***As Session***, um aus dem Template eine neue Messung zu starten.

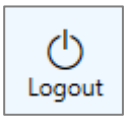


4. Fügen Sie analog wie bei einer normalen Messung eine 96-Well-Platte hinzu. Wählen Sie diese bei einer beliebigen Probe aus und fügen Sie sie über str+c, str+a str+v für alle Proben hinzu. Setzen Sie den Index bei der ersten Hypochlorid-Probe. Markieren Sie nun über str+a alle Proben und ziehen Sie sie auf die Platte.

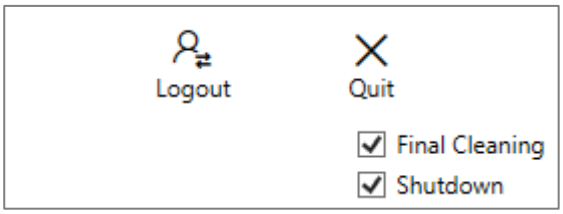


5. Das Messvolumen ist hier auf 180 µl und die Geschwindigkeit auf 5 µl/sec voreingestellt. Klicken Sie nun auf ***Run*** um die Reinigung zu starten.

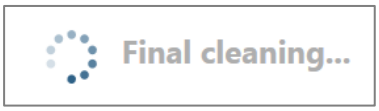
Die aus dem Reinigungsprogramm entstandenen *.fcs-Dateien* enthalten keine sinnvollen Daten, werden aber dennoch im Ordner C:\Users\Public\Documents\Sysmex\Measurements automatisch gespeichert. Zur besseren Übersicht können Sie diese Dateien löschen.

6. Um das Gerät herunterzufahren, klicken Sie in CyBatch auf Logout. 

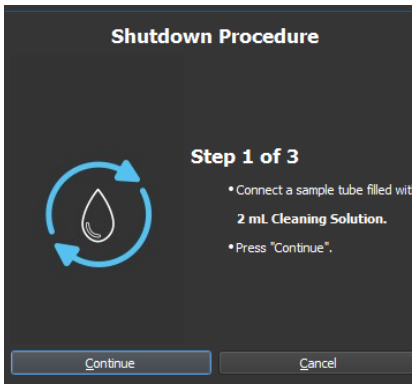
7. Setzen Sie ein Häkchen bei Final Cleaning und Shutdown und klicken auf Quit.



8. Folgen Sie den Anweisungen durch das Shutdown-Programm. Nach Abschluss des Geräts schließt sich die CyView™ Software automatisch.



Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3



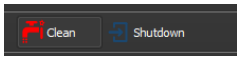
9 Hinweise für besondere Matrices

Matrix	Hinweis
Soja	Bei hohen Anteilen von Soja werden zu hohe OTA-Werte erhalten. Abhilfe: Soja-Produkte sollten etwas stärker verdünnt werden.
Zimt	Zimt kann mit SAFIA nicht analysiert werden.
Kaffee	Kaffee kann mit SAFIA nicht analysiert werden.
Mango	Bei einem Mango-Fruchtanteil ab ca. 30 % kann es zu einem Fehler der internen Kontrolle kommen. Die interne Kontrolle kann für mangohaltige Proben nicht verwendet werden. Die Ergebnisse der Mykotoxine sind davon nicht betroffen.

10 Häufige Fehler und Trouble Shooting

10.1 Manuelle Reinigung

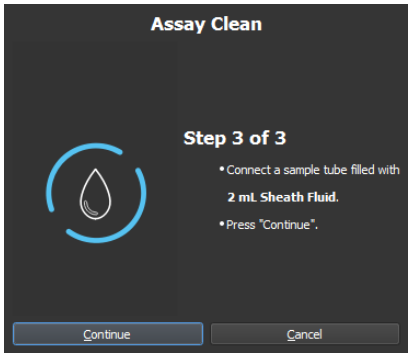
Bei manchen Gerätestörungen kann eine manuelle Reinigung helfen, dazu gibt es in dem Menüreiter ***Clean*** zwei Optionen:



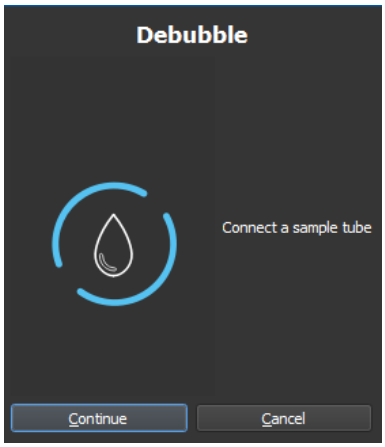
Assay Clean 







Debubble 



10.2 Beim Performance Check oder bei Messung werden keine Partikel gemessen

Falls keine Partikel detektiert werden, brechen Sie die Messung über den Button *Stopp*  ab. Starten Sie einen Reinigungszyklus über den *Clean* Button (siehe Abschnitt 10.1) oder führen Sie erneute das Prime-Programms durch (siehe Abschnitt 2.1). Wiederholen Sie anschließend die Messung.

10.3 Bei einzelnen Wells werden keine Partikel gemessen

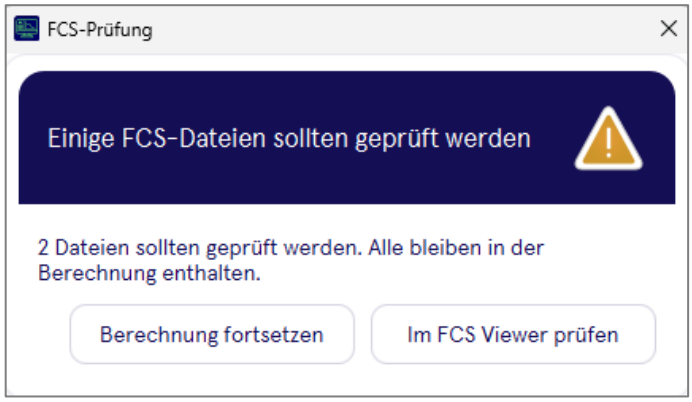
Wenn Sie nach einer Messung feststellen, dass in einzelnen Wells keine Partikel detektiert wurden, kann dies darauf hindeuten, dass eine Luftblase im Sysmex die Messung beeinträchtigt hat. Führen Sie in diesem Fall eine erneute Messung des entsprechenden Wells durch. Wählen Sie die Probe des jeweiligen Wells in CyBatch aus, klicken rechts und löschen Sie die bisherige Messung. Klicken Sie nun erneut auf Run, um das Well zu messen.

10.4 Partikelpopulationen liegen nicht in Gates

Die Partikelpopulationen erscheinen „langgestreckt“ und nicht im Gate (Daten sehen „merkwürdig“ aus): Das kann der Fall sein, wenn eine Luftblase in der Messküvette festhängt oder es ein Problem mit Gerät gibt. In solchen Fällen sollte zunächst ein Cleaning-Zyklus durchgeführt und anschließend das Prime-Programm erneut gestartet werden. Bleibt das Problem bestehen, ist der Sysmex-Kundenservice zu kontaktieren.

10.5 FCS-Prüfung „Einige FCS-Dateien sollten geprüft werden“

Erscheint nach dem Laden Ihrer Messergebnisse in SAFIA Score diese Meldung, sind eine oder mehrere Dateien technisch gültig, weisen jedoch fachliche Auffälligkeiten auf und sollten daher geprüft werden. Die betroffenen Daten werden grundsätzlich in die Auswertung einbezogen.
Klicken Sie auf **„Berechnung fortsetzen“**, um die Auswertung ohne weitere Prüfung fortzuführen. Klicken Sie auf „Im FCS Viewer prüfen“, um die betroffenen Dateien zu prüfen.



Typische Ursachen für diese Meldung sind:

Ursache	**Empfohlene Prüfung / Lösung**
Verschobene Populationen	Gates prüfen und gegebenenfalls nachgaten oder auf Durchschnittsgates zurücksetzen.
Geschätzte (nicht robuste) Gates	Prüfen, ob die verwendeten Durchschnittsgates für die Messung geeignet sind. Gegebenenfalls Gates anpassen.
Niedrige Eventzahlen	Sehr niedrige Eventzahlen erhöhen die Unsicherheit der Auswertung deutlich. Automatisch ausgeschlossen wird eine Messung jedoch erst, wenn erforderliche Gates fehlen oder mindestens ein erforderliches Partikel-Gate keine Events enthält. Ursachen können eine unzureichende Durchmischung der Partikel-Stocklösung oder Partikel-Arbeitslösung sowie Probleme am Durchflusszytometer sein.
Ungewöhnliche Verteilungen innerhalb der erwarteten Strukturen	Prüfen, ob die Gates korrekt gesetzt sind. Gegebenenfalls nachgaten und die Verteilungen erneut bewerten.

Wenn Sie auf **„FCS Viewer prüfen“** klicken, öffnet sich der Reiter **„FCS Viewer“**. In der Tabelle werden die Messungen gefiltert angezeigt, die mit dem Status **„Verwendet – Prüfen“** eingestuft wurden. Diese Messungen sind gelb markiert.

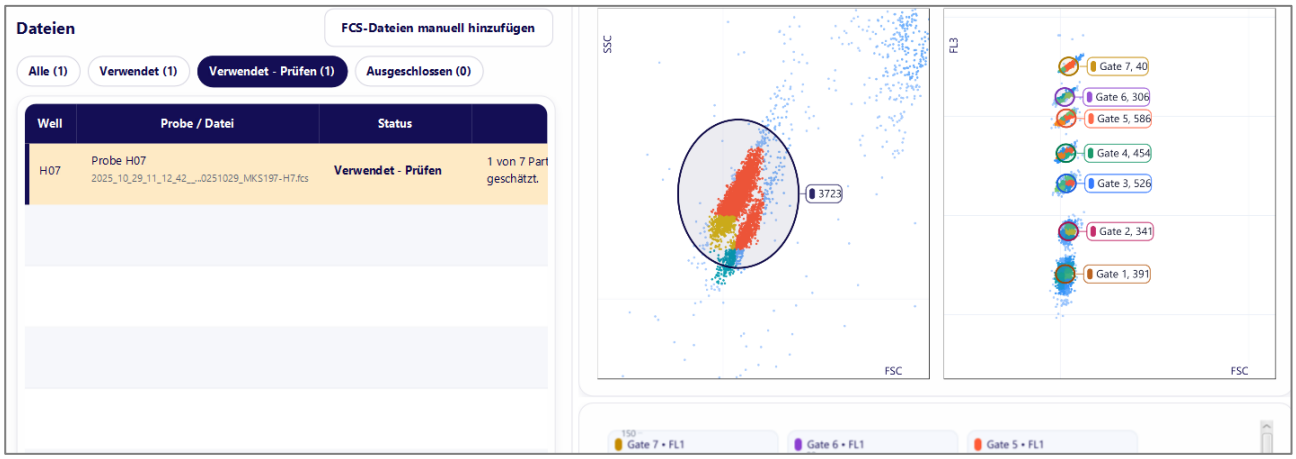


Abbildung 17 Übersichtsansicht „FCS Viewer prüfen“

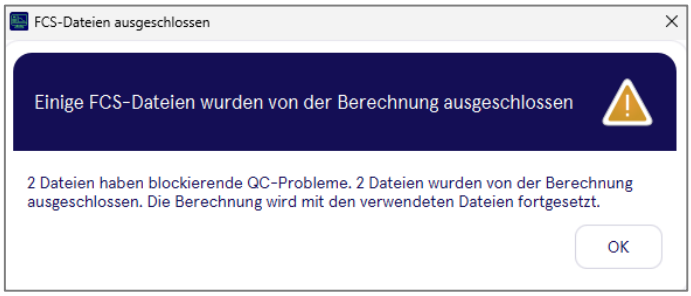
Wenn Sie auf eine markierte Messung klicken, öffnet sich ein Detailfenster. Unter „QC-Details“ wird der Grund für die Einstufung als „Verwendet – Prüfen“ angezeigt. Prüfen Sie die Daten und führen Sie bei Bedarf ein manuelles Nachgaten durch. Wenn die Daten nach der Prüfung als geeignet bewertet werden, klicken Sie auf **„Anwenden und neu berechnen“**. Soll die Messung nicht in die Auswertung einbezogen werden, klicken Sie auf **„Messung nicht verwenden“**.



Abbildung 18 Detailansicht einer „Verwendet-prüfen“-Datei

10.6 FCS-Dateien ausgeschlossen „Einige FCS-Dateien wurden von der Berechnung ausgeschlossen

Erscheint nach dem Laden Ihrer Messergebnisse in SAFIA Score diese Meldung, weisen eine oder mehrere Dateien blockierende technische oder gate-bezogene QC-Probleme auf. Die betroffenen Daten werden standardmäßig nicht in die Berechnung einbezogen.



Typische Ursachen für diese Meldung sind:

Ursache	Empfohlene Prüfung / Lösung
Fehlende oder defekte Dateien	Prüfen, ob das in SAFIA Score hinterlegte Plattenlayout mit dem tatsächlich gemessenen Plattenlayout übereinstimmt. Fehlende oder beschädigte FCS-Dateien gegebenenfalls erneut exportieren und importieren.
Unvollständige Gate-Strukturen	Im FCS Viewer prüfen, ob Pre-Gate und alle erwarteten Partikel-Gates vorhanden sind. Bei falsch erkannten Gates „Auf Durchschnitt setzen“ verwenden oder manuell nachgaten. Danach „Anwenden und neu berechnen“ klicken. Wenn die erwarteten Partikelpopulationen tatsächlich nicht vorhanden sind, bleibt die Messung ausgeschlossen.
Leere oder ungültige Messdaten	Prüfen, ob in den erforderlichen Partikel-Gates Events enthalten sind. Enthält ein erforderliches Partikel-Gate keine Events, ist für diese Messung keine belastbare Quantifizierung möglich. Ursachen können fehlende Partikel, unzureichende Durchmischung, Messprobleme am Durchflusszytometer oder starkes Hintergrundsignal sein. Falls das Gate nur falsch gesetzt wurde, Gate korrigieren und neu berechnen. Die Ursachen und Lösungsschritte sind in den Abschnitten 9.2 und 9.3 beschrieben. Die betroffenen Dateien auf Vollständigkeit und Gültigkeit prüfen.
Importfehler	Sicherstellen, dass beim Datenimport „Direkter FCS-Dateiimport“ ausgewählt wurde.

Im Reiter **„FCS-Viewer“** können Sie die ausgeschlossenen Dateien einsehen. Über den Filter „Ausgeschlossen“ in der Tabelle werden alle ausgeschlossenen Messungen gefiltert dargestellt. In der Spalte „Grund“ finden Sie den jeweiligen QC-Hinweis zur Ursache der Ausschließung. Klicken Sie darauf für die Detailansicht in einem extra Fenster.



Abbildung 19 Übersichtsansicht „FCS-Dateien ausgeschlossen“

10.6.1 Beispiel 1

Es wurden nur sehr wenige SAFIA-Partikel gemessen, sodass in einigen Gates keine Partikel detektiert werden konnten. Eine valide Quantifizierung ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Die Messung bleibt daher ausgeschlossen.

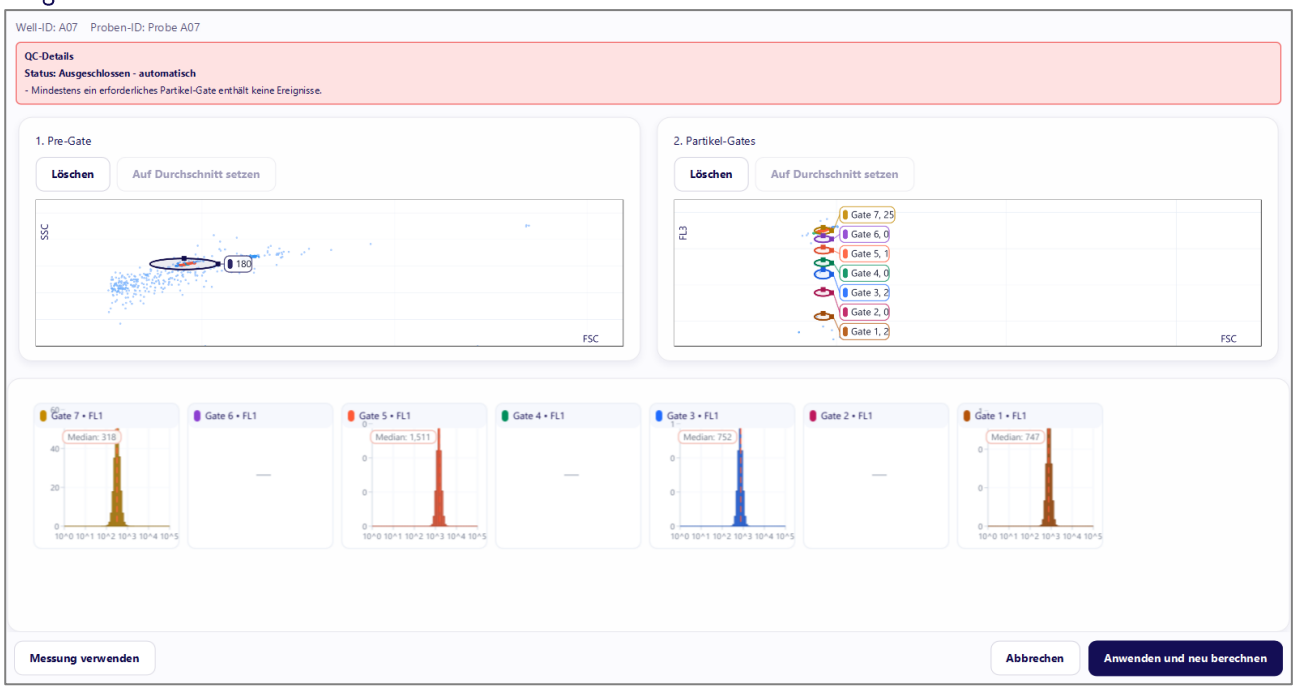


Abbildung 20 Detailansicht Beispiel 1

10.6.2 Beispiel 2

Aufgrund von starken Hintergrund-Ereignissen wurde dort ein lokales Maximum erkannt und fälschlicherweise nicht die Partikel. Klicken Sie hier auf „Auf Durschnitt setzten“, beim Pre-Gate und Partikel-Gate. Basierend auf den Durchschnitttlichen Gatepositionen ihrer anderen Messungen wir das Gate nun verschoben (siehe Abbildung 23). Durch Scrollen mit dem Mausrad im Plot können Sie weiter rein oder raus zoomen.



Abbildung 21 Detailansicht Beispiel 2

Nun sehen dass das durschnittliche Gate genau die SAFIA-Partikel umfasst. Klicken Sie nun auch bei den Partikel-Gates auf „Auf Durchschnitt setzten“.

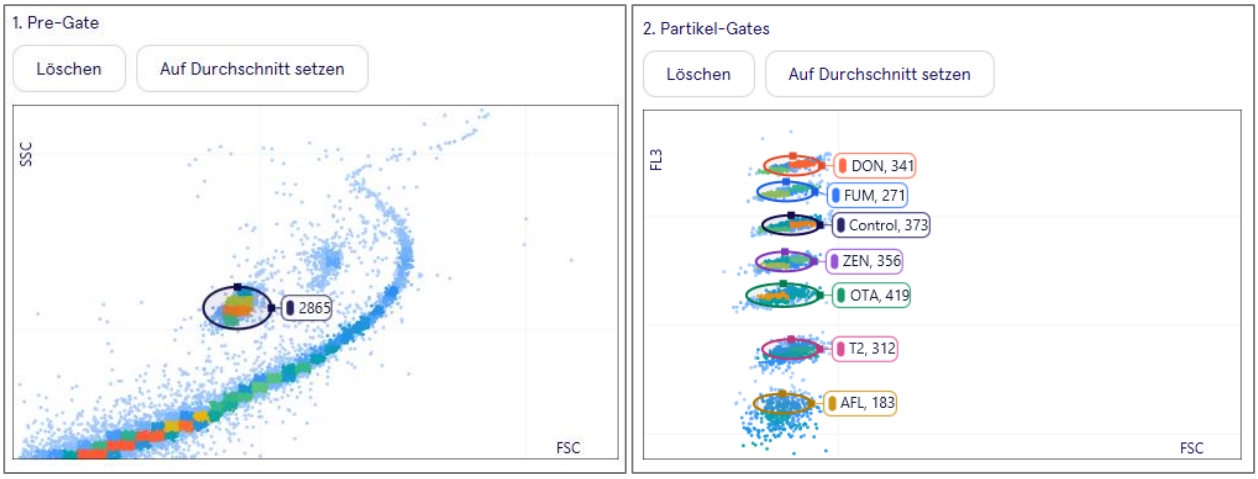


Abbildung 22 Detailansicht Beispiel 2, nachdem „Auf Durschnitt setzen“ angewendet wurde

Wenn Sie nun auf „Anwenden und neu Berechnen“ klicken werden diese Daten eingeschlossen, Sie tauchen nun auch nicht mehr unter Ausgeschlossen auf und sind nicht mehr rot markiert.

10.7 Automatisch gesetzte Gates umfassen nicht alle Ereignisse der Population

Beim automatischen Gating (Auto-Gating) sucht die Software nach lokalen Maxima. An dieser Stelle ist MFI von vielen Ereignissen gleich, es spielt keine Rolle, dass nicht alle Ereignisse inkludiert sind.

10.8 Die Kontrolle ist Positiv

Wenn die Kontrolle positiv ist, stört eine Substanz in der Matrix den Assay. Die restlichen Ergebnisse sind daher ggf. nicht korrekt. Führen Sie zur Abhilfe einen Aufreinigungsschritt mit PA- oder PVPP-Adsorber durch, um die störenden Substanzen zu entfernen, siehe Abschnitt 6. Beachten Sie außerdem die Hinweise für besondere Matrices.

10.9 Die Kalibrierkurve erfüllt nicht die Richtwerte

10.9.1 Relativer dynamischer Bereich, IC50, *p*-Werte

Ist die Kalibrierkurve zu flach, so ergibt der relative dynamische Bereich und/oder weitere Parameter der Kalibrierkurve wie die IC50 Werte und der Steigungsparameter der Kurve am Testmittelpunkt (*p*) nicht den Richtwerten (siehe Abschnitte 7.5). Die Proben können nicht korrekt quantifiziert werden. Prüfen Sie das Mindesthaltbarkeitsdatum des Kit und achten Sie immer auf die korrekte Lagerung des Kits (siehe Abschnitt 2.1). Wiederholen Sie die Messung mit einem neuen Kit, welches noch innerhalb des Haltbarkeitszeitraums liegt. Wenden Sie sich an den SAFIA Technologies Support, wenn bei einem Kit innerhalb des Haltbarkeitszeitraums die Kurven nicht die Richtwerte erfüllen.

10.9.2 R Square <0.990

Ist das Bestimmtheitsmaß (R^2/ R Square) kleiner als 0,990, überprüfen Sie die einzelnen Messwerte der Kalibrierkurve in SAFIA Score. Wenn mindestens 3 Replikate gemessen wurden, wird automatisch ein Ausreißertest nach Grubbs (Signifikanzlevel α = 0,95) durchgeführt, der mögliche Ausreißermessungen anzeigt. Wenn weniger als 3 Replikate gemessen wurden, können Sie augenscheinliche Ausreißer über die Abbildung der Kurve erkennen oder über eine große Standardabweichung (bei Duplikaten). Ausreißer können einfach ausgeschlossen werden, wodurch das Bestimmtheitsmaß steigt. Achten Sie beim Pipettieren der Kalibrationsstandards auf sauberes Pipettieren, damit das Bestimmtheitsmaß größer 0,990 ist.

10.10 Keine Auswertung in SAFIA Score

Häufige Ursache ist, dass das Plattenlayout in SAFIA Score stimmt nicht mit dem tatsächlichen Layout Ihrer Messplatte überein → Passen Sie das Layout in SAFIA Score an ihr tatsächliches Layout an und laden Sie Ihre Messdaten erneut hoch.
Wenden Sie sich an den SAFIA Technologies Support, wenn Sie Ihren Fehler nicht beheben können.

10.11Spracheinstellung in SAFIA Check

Unter About können Sie die Spache in SAFIA Check ändern



10.12 Internetverbindung

Das Gerät verfügt über keine WLAN-Funktion, kann jedoch vollständig ohne Internetverbindung betrieben werden. Für einzelne Funktionen, wie den Aufruf des aktuellen Handbuchs, sowie für Supportanfragen kann eine Internetverbindung dennoch sinnvoll sein. Für den Internetzugang kann das Gerät über ein LAN-Kabel, einen USB-WLAN-Adapter oder ein per USB-Kabel angeschlossenes Mobiltelefon mit aktivierter USB-Tethering-Funktion verbunden werden.

11 Glossar

Begriff	Erläuterung
.fcs-Datei	Ein Datenformat aus der Durchflusszytometrie. FCS steht für Flow Cytometry Standard (File). Eine .fcs-Datei ist eine von der Cyflow® Software erzeugte Messrohdatendatei.
.sdf-Datei	*SAFIA Data File*. Dies ist die Speicherdatei für sämtliche Informationen, die in SAFIA Score erzeugt werden, z. B. Plate Layouts, Kalibrationen und Ergebnisse aus Messungen. Sie kann in SAFIA Score geöffnet werden.
Ausreißertest nach Grubbs	Ein statistischer Test, der dazu verwendet wird, Ausreißer in einer gegebenen Stichprobe zu entdecken, zu eliminieren und durch Iteration die verbleibende Stichprobe zu verbessern. Er ist in SAFIA Score für die Kalibration und die Ergebnisse implementiert.
Assay Clean	Reinigungszyklus des Ri-300
Configuration file	Eine Datei die bestimmte Einstellungen für das Auslesen des Assays mit dem Ri-300 beinhaltet.
Batch	Ein Batch bezeichnet die gesammelten Messungen einer Platte eines Messdurchlaufes. Jede Messung gehört zu einem Batch.
Dilution (Factor)	Verdünnungsfaktor einer Probe.
Ereignis	Ein einzelner Messvorgang, der ausgelöst wird, wenn ein Objekt den Messbereich des Geräts durchläuft und detektiert wird. Für jedes Ereignis werden die Signale für Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Fluoreszenzintensitäten erfasst und gespeichert.
FL-1	Fluoreszenzdetektor 1 Detektionskanal für Fluoreszenz der sekundären Antikörper im SAFIA
FL-3	Fluoreszenzdetektor 3 Detektionskanal für Fluoreszenz der Partikelcodierung im SAFIA
FSC	*Forward Scatter*. Detektor zur Messung des gestreuten Lichts im kleinen Winkel. FSC und SSC werden verwendet, um SAFIA Partikel von übrigen Partikeln in der Probe zu unterscheiden.
Gate	Sortierfenster in der Durchflusszytometrie. Wird verwendet, um relevante Daten von nicht-relevanten Daten zu trennen, bspw. SAFIA-Partikel von sonstigen Partikeln. Nur Partikel, die sich in

	einem Gate befinden, werden in nachfolgenden Berechnungen eingeschlossen.
IC20-Wert	Der IC20-Wert gibt die Konzentration eines Analyten an, die im SAFIA für eine 20 %ige Verringerung des maximalen Signals (A1) sorgt. Sie kann als Orientierungswert für die Bestimmungsgrenze verwendet werden. Im SAFIA dient der IC20-Wert der Control-Messung als Kriterium einer falsch-positiven Probe.
MFI [a. u.]	Median Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten. Fluoreszenzintensität berechnet aus einem Histogramm, z. B. für den FL-1 Detektor.
Plate Layout	Zuordnung der alphanumerisch kodierten Wells (A1 bis H12) einer 96-Well Mikrotiterplatte zu einer Probe oder einem Standard.
Prime-Programm	Spülprogramm, das den Cube 6 in den Betriebszustand versetzt.
R Square (R^2)	Bestimmtheitsmaß
Recovery rate	Wiederfindungsrate. Prozentuales Verhältnis vom Soll-Wert einer Referenzprobe zum ermittelten Ist-Wert.
Relative Dynamic range (rDR)	Die Relative Dynamic Range ist ein Maß für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eines Immunoassay. Sie wird berechnet als Quotient der Differenz von oberer und unterer Asymptote (A1 und A2) und der unteren Asymptote (A2) einer Kalibrierkurve Ein Relative Dynamic Range von 0,80 entsprecht einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 5.
Replicates	Wiederholungsmessung
Proben ID	Eineindeutige Probenbezeichnung
Session-Name	Ein durch den Anwendenden zu vergebende eineindeutiger Session-Name. Er sollte für jede gemessene Mikrotiterplatte einmal vergeben werden.
Sheath Fluid	Flüssigkeit, die zum Betrieb eines Durchflusszytometers (hydrodynamischen Fokussierung) verwendet wird.
SSC	*Side Scatter*. Detektor zur Messung des gestreuten Lichts im 90 ° Winkel. FSC und SSC werden verwendet, um SAFIA Partikel von übrigen Partikeln in der Probe zu unterscheiden.
MTP-Format	Mikrotiterplatten-Format. Die Auslesung erfolgt in einer 96-Well Platte über die CyFlow® Robby Autoloading Station.

12 Kontakt

SAFIA Technologies
Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM)
Richard-Willstätter-Straße 11
12489 Berlin

T: +49 (0) 0162 7323405

M: info@safia.tech

SAFIA LinkedIn Profil

SAFIA YouTube Channel

SAFIA Technologies Support

T: +49 (0) 1556 3234634

M: support@safia.tech

Sysmex Support

T: +49 (0) 2534 8008 111

M: support@sysmex-partec.com