

**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® Cube 6 V2m und der CyFlow® Robby Autoloading Station, sowie die Datenanalyse mit SAFIA Score.

Version 1

[www.SAFIA.tech](http://www.SAFIA.tech)

## Inhalt

1	Allgemeine Informationen	4
1.1	Mykotoxine	4
1.2	Verfügbare Kits	4
1.3	Prinzip des SAFIA-Assay	4
1.4	Durchführung des SAFIA-Assay	5
2	Generelle Hinweise	6
2.1	Kitinhalt	6
2.2	Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	7
2.2.1	Geräte	7
2.2.2	Reagenzien	7
2.2.3	Materialien für den Betrieb des Cube 6	7
2.3	Lagerung und Verwendung des Kits	8
2.4	Ablage der Daten	9
3	Starten des Cube 6	10
4	Durchführung eines <i>Performance Checks</i>	12
4.1	Erläuterung des <i>Performance Checks</i>	12
4.2	Vorbereitung	13
4.3	Durchführung	13
4.4	Auswertung eines <i>Performance Checks</i> mit SAFIA Check	14
4.5	Anlegen einer neuen Messreihe mit neuer LOT-Nummer	16
4.6	Manueller Reinigungszyklus	17
5	Planen des SAFIA Assays in SAFIA Score	18
6	Probenvorbereitung	22
6.1	Puffervorbereitung	22
6.2	Anleitung der Probenvorbereitung	23
7	Durchführung des SAFIA Assays	27
7.1	Vorbereitung	27
7.2	Durchführung des Assays	28
7.3	Auslesen mit dem Cyflow® Cube 6 Durchflusszytometer	30
7.4	Auswertung des Assays mithilfe von SAFIA Score	36
8	Reinigen und Herunterfahren des Cube 6	40
9	Hinweise für besondere Matrices	42
10	Häufige Fehler und Trouble Shooting	43
10.1	Beim <i>Performance Check</i> oder bei Messung werden keine Partikel gemessen	43
10.2	Partikelpopulationen liegen nicht in Gates	43
10.3	Nach Abschluss der Messung öffnet sich FCS Express nicht automatisch mit den richtigen Daten	43
10.4	FCS Express Fehlermeldung	44
10.5	Kontrolle ist Positiv	48
10.6	Kalibrationskurve erfüllt nicht die Richtwerte	48

10.6.1	Relativer dynamischer Bereich, IC50, <i>p</i> -Werte	48
10.6.2	R Square <0.990	48
10.7	SAFIA Score	48
11	Anhang	49
11.1	Checkliste	49
11.2	Glossar	51

# 1 Allgemeine Informationen

## 1.1 Mykotoxine

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen oder Mutterkornpilzen, die hauptsächlich zu den Arten *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* und *Claviceps* gehören. Sie können bei Verzehr akute Vergiftungen, chronische Krankheiten und sogar Krebs auslösen. Mykotoxine stellen eines der größten Kontaminationsrisiken für die Lebensmittelindustrie dar und werden daher von der EU stark reguliert (siehe Verordnung (EG) Nr. 915/2023). Die regulierten Mykotoxine, die mit den SAFIA Kits gemessen werden können, sind Ochratoxin A (OTA), Fumonisine (FUM, Isomere FB1, FB2), Deoxynivalenol (Vomitoxin, DON), Zearalenon (ZEN) und Aflatoxine (AFL, Isomere AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) und T2 Toxin (T2). Die zulässigen Höchstgehalte sind abhängig von der Art des Lebensmittels.

## 1.2 Verfügbare Kits

Tabelle 1. Übersicht der verfügbaren SAFIA Kits mit den darin enthaltenden Parametern

Bestellnummer	Kit	Parameter
FIE1L012	Feld Kit	FUM, DON, ZEN, T-2 + Control
STO1L001	Lager Kit	OTA, AFL + Control
SCR1L013	Screening Kit	OTA, AFL, FUM, DON, ZEN, T-2 + Control

## 1.3 Prinzip des SAFIA-Assay

Der **Suspensionarray Fluoreszenzimmunoassay**, 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 Kalibrationskurve 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 und einem roten 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 hierfür findet dazu automatisch in SAFIA Score statt, siehe *Anleitung zur SAFIA Mykotoxin Messung*.

## 1.4 Durchführung des SAFIA-Assay

Dieses Handbuch beschreibt die Durchführung von Messungen im Mikrotiterplatten (MTP)-Format mit dem *CyFlow® Cube 6 V2m* mit *CyFlow® Robby Autoloading Station* (im Nachfolgenden „Cube 6“) genannt.

Ergänzende Hinweise zum Bedienen des Cube 6 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® Cube 6 Durchflusszytometer
4. Auswertung des Assays mithilfe von SAFIA Score



Abbildung 1. Analysenablauf

## 2 Generelle Hinweise

### 2.1 Kitinhalt

Tabelle 2. Kitinhalt

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 3. Konzentrationen der einzelnen Kalibrationsstandards

Standard	c(OTA) µg L <sup>-1</sup>	c(DON) µg L <sup>-1</sup>	c(ZEN) µg L <sup>-1</sup>	c(FUM) µg L <sup>-1</sup>	c(AFL) µg L <sup>-1</sup>	c(T2) µg L <sup>-1</sup>	c(KON) µg L <sup>-1</sup>
KAL-1	1000	10000	1000	10000	1500	5000	1000
KAL-2	100	1000	100	1000	150	500	100
KAL-3	10	100	10	100	15	50	10
KAL-4	1	10	1	10	1,5	5	1
KAL-5	0,3	3	0,3	3	0,45	1,5	0,3
KAL-6	0,1	1	0,1	1	0,15	0,5	0,1
KAL-7	0,01	0,1	0,01	0,1	0,015	0,05	0,01
KAL-8	0,001	0,01	0,001	0,01	0,0015	0,005	0,001

## 2.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Spezifikationen zu den Materialien können Sie der [Checkliste](#) im Anhang entnehmen.

### 2.2.1 Geräte

- Analysenwaage
- Durchflusszytometer *CyFlow® Cube 6* in der Variante mit einem Laser (488 nm, blau) mit *CyFlow®*
- Ein- und Mehrkanalmikropipetten
- Glasgefäß, verschließbar
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multi-Kanal-Reservoir
- *Robby Autoloading Station*
- Röhrchen für Probeneinwaage und Extraktion
- Schüttler für Gefäße
- Zentrifuge

### 2.2.2 Reagenzien

- Ethanol 99 % vergällt mit MEK, IPA und Bitrex® (min. 99,8 %), für Analyse auf 70 %(vol/vol) verdünnen
- deionisiertes Wasser

### 2.2.3 Materialien für den Betrieb des Cube 6

z. B. bestellbar unter <https://de.sysmex-flowcytometry.com/>

- *Sheath Fluid*, Bestellnummer: 04-4007\_R
- *Cleaning Solution*, Bestellnummer: 04-4009\_R

- *Decontamination Solution*, Bestellnummer: 04-4010\_R
- *Hypochlorite Solution*, Bestellnummer: 04-4012\_R
- 96-Well Mikrotiterplatte, Bestellnummer 04-2020
- Probenröhrchen (Tubes) für Sysmex Cube 6 Durchflusszytometer, Bestellnummer: 04-2000
- *CyFlow* Software

Optional: Material für den SAFIA Performance Check:

- *SAFIA Check Particles*, Bestellnummer: SCP-1L-010
- *SAFIA Check Software*, Bestellnummer: SCSO-009  
Alternativ
- *SAFIA Check Starter Kit* (Partikel und Software), Bestellnummer: SCSK-1L-011

## 2.3 Lagerung und Verwendung des Kits

- Lagerung im Kühlschrank bei 2 – 8 °C.
- Niemals in einem Tiefkühler z. B. bei - 20 °C einfrieren!
- Vor Verwendung auf Raumtemperatur bringen.
- Direkte Lichteinwirkung vermeiden.
- Keine Garantie nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Einzelne Reagenzien aus dem Kit dürfen nicht mit anderen Reagenzien aus anderen Kits ausgetauscht werden, auch wenn die gleiche Chargennummer aufgedruckt ist.
- Die Verwendung des Kits ist nur durch geschultes Personal vorzunehmen. Die Gebrauchsanweisung ist strikt einzuhalten.

## 2.4 Sicherheitshinweise



Die Kitbestandteile *Calibration Standards* und *Fixation solution* enthalten Mykotoxine in geringen Mengen und sind entsprechend mit Vorsicht zu behandeln.

Die Kits enthalten gesundheitsgefährdende Substanzen. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS).



Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften und ziehen hier ggf. die Sicherheitsdatenblätter hinzu.

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

## 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. Nur die mit \*-markierten Dateien sind jene, die Sie manuell in CyView bzw. SAFIA Score auswählen müssen. Heften Sie für ein komfortables Arbeiten die Unterordner *Export-Files* an den Schnellzugriff an.

Tabelle 4 Übersicht der Dateipfade und Datenablage des SAFIA Systems

C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube_18\config\Mycotoxins			
<b>Datei(en)</b>		<b>Datei-Namen</b>	
Configuration-File zur Durchführung des Performance Checks und der Messungen		Mycotoxins-SCR_A_Robby.cv85*	
Configuration-File zur Durchführung einer Reinigung		Cleaning-MTP.cv85*	
C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube_18\templates\Quality Control			
<b>Datei(en)</b>		<b>Datei-Namen</b>	
FCS Express Layout Template (wird automatisch in FCS Express zur Datenverarbeitung geladen)		RP_Mycotoxin_A	
C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube_18\data\cyflow\			
<b>Datei(en)</b>		<b>Datei-Namen</b>	
.fcs-Dateien der Messungen (werden hier <b>automatisch</b> abgespeichert mit Datum und ID)		Datum_Uhrzeit_Tray-ID_Letzte Well ID.fcs	
C:\User\cyflow\Documents\			
<b>Ordner</b>	<b>Unterordner</b>	<b>Datei(en)</b>	<b>Datei-Format</b>
SAFIA-Check	Export-Files	Rohdaten für SAFIA Score (werden hier <b>automatisch</b> über FCS Express abgelegt)	.csv*
	Reports	Reports des Performance Checks (werden hier über SAFIA Check abgelegt)	.pdf
SAFIA-Mycotoxins	Export-Files	Rohdaten für SAFIA Score (werden hier <b>automatisch</b> über FCS Express abgelegt)	.csv*
	Optional:		
	SAFIA-Files	SAFIA Score-Dateien	.sdf
	FCS Express Layouts	Layouts einzelner Messungen	.xmlw

### 3 Starten des Cube 6

1. Vor dem Start sollte die Flasche *Waste* vollständig entleert werden.
2. Die Flasche *Sheath* sollte ca. zu 80 % mit Sheath Fluid aufgefüllt werden.
3. Schalten Sie das Gerät ein (Kleiner Schwarzer Knopf auf dem Gerät).
4. Die Software Messsoftware CyView™ Software öffnet sich automatisch. Warten Sie, bis diese komplett geladen ist und das Gerät einsatzbereit ist.
5. Loggen Sie sich mit Ihrem Account in der Software ein.
6. Öffnen Sie das Configuration File (Mycotoxins-SCR\_A\_Robby.cv85) für die Messung über CFG Upload .
7. Klicken Sie dazu auf Prime  in der Hauptleiste und dann auf Start  (s. Abbildung 3) und folgen Sie den Anweisungen durch das Prime-Programm (s. Abbildung 3).

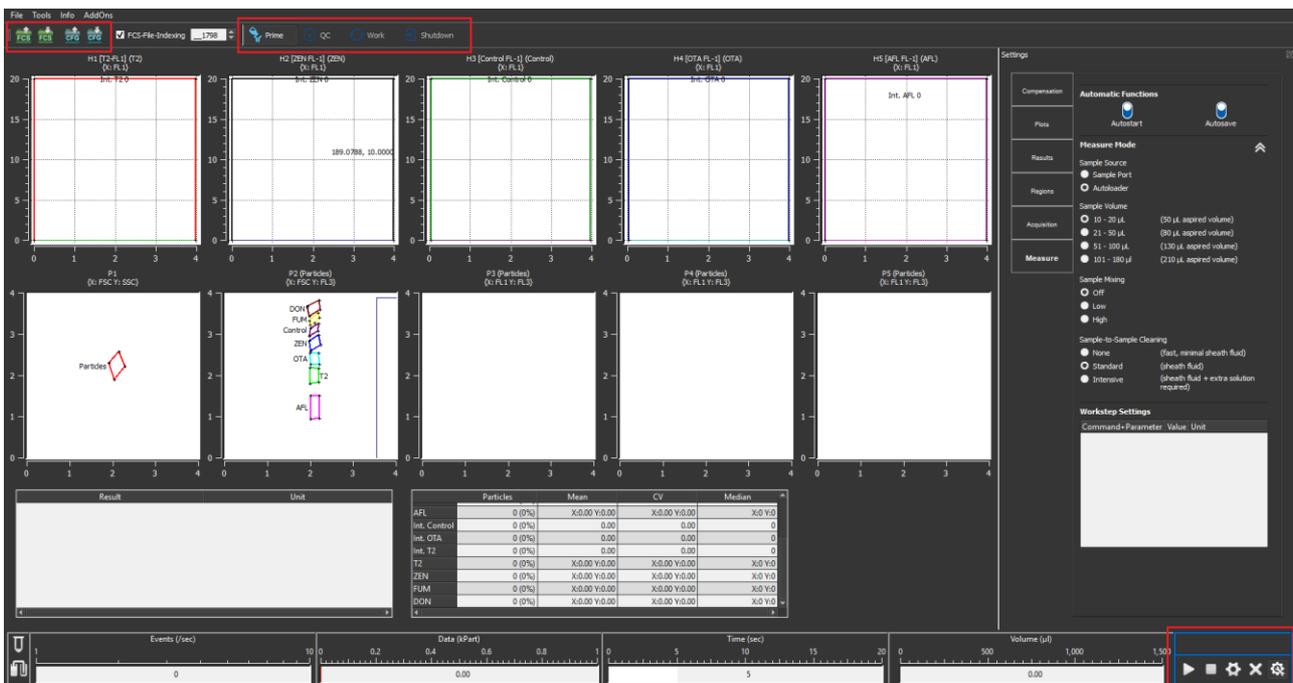
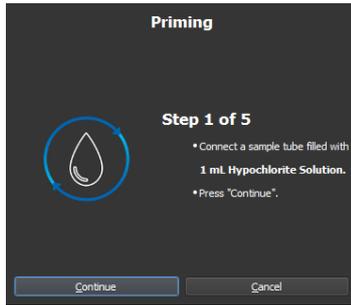
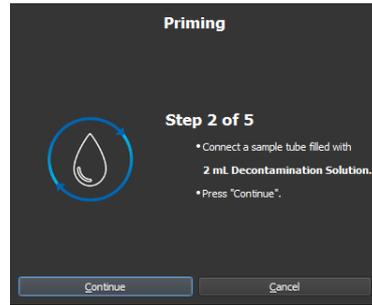


Abbildung 2. Lage des Prime Programms, der Einstellungen und des Start Buttons

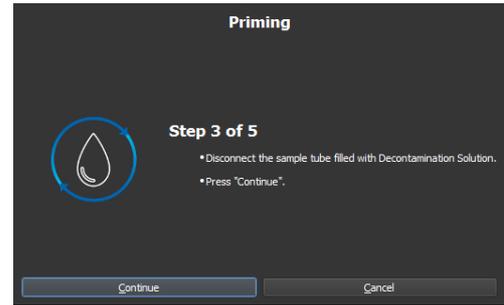
## Schritt 1



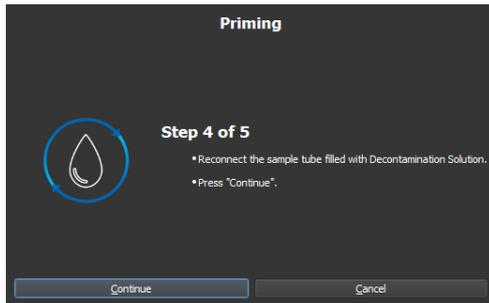
## Schritt 2



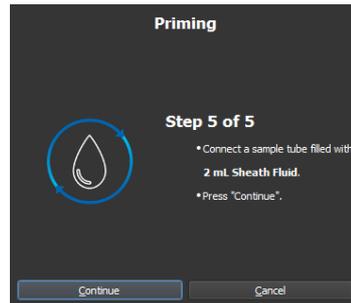
## Schritt 3



## Schritt 4



## Schritt 5



## Schritt 6

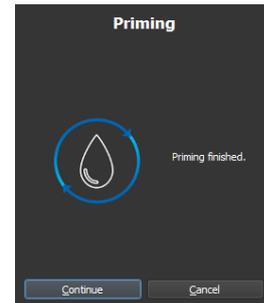


Abbildung 3. Schritte des Prime Programms

# 4 Durchführung eines Performance Checks

## 4.1 Erläuterung des Performance Checks

Wir empfehlen die messtägliche Überprüfung der Geräteperformance des Cube 6 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 Cube 6 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 entsprechenden 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 (s. Abbildung 4 A). In Streuplot FSC/FL-3 sind 5 Gates eingezeichnet, in denen jeweils 1 oder 2 Populationen sichtbar werden (s. Abbildung 4 B). Die Populationen aus diesen 5 Gates sind in 5 Histogrammen in FL-1 aufgetrennt, sodass jeweils eindeutig zwei Peaks zwei Populationen abbilden (s. Abbildung 4 C).

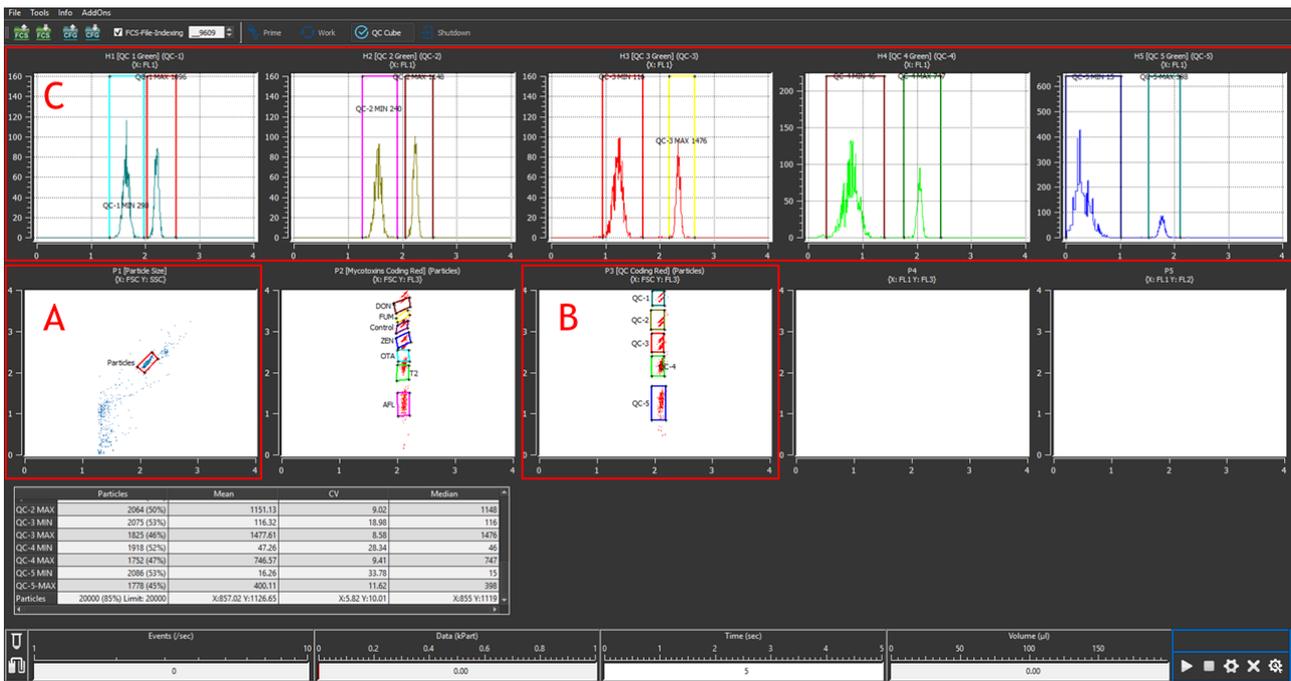


Abbildung 4. Übersicht SAFIA Check. FSC/SSC-Streuplot in A, FSC/FL-3-Streuplot in B sowie FL-1-Histogramm in C

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-3. Mit dem *SAFIA Performance Check* können somit kontrolliert werden:

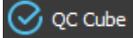
- die korrekte Funktionsweise des fluidischen Systems,
- der Status des Lasers,
- die korrekte Funktionsweise des FL-3 Detektors (Codierung der SAFIA Assay Partikel).
- die korrekte Funktionsweise des FL-1 Detektors (dynamischer Bereich der SAFIA Assays).

## 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 auf QC Cube  in der Hauptleiste und überprüfen Sie unter Einstellungen  → Measure, ob der Sample Port als Sample Source ausgewählt ist und die Einstellungen mit denen in Abbildung 5 übereinstimmen.

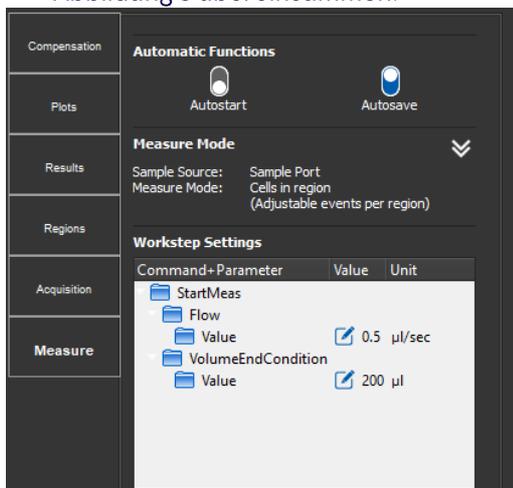


Abbildung 5. Einstellungen der Messung

2. Klicken Sie auf Start  und folgen Sie den Anweisungen durch das QC-Programm (s. Abbildung 6). Sollten keine Partikel erfasst werden, befolgen Sie die Hinweise in [Abschnitt 10.1](#).

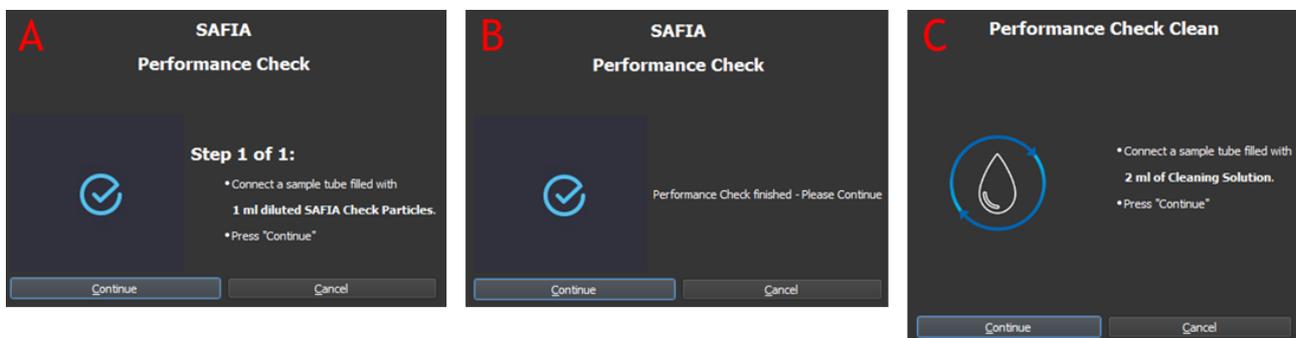


Abbildung 6. Ansicht der Anweisungen des QC-Programm Ablaufs

3. Wenn die Messung beendet ist, öffnet sich automatisch das Programm *FCS Express*. Auf der linken Seite sind die oben beschriebenen Plots und Histogramme zu sehen, auf der rechten Seite in *Datalist* ist die verwendete .fcs-Datei sichtbar (s. Abbildung 7). Wenn nicht automatisch die richtigen Daten geladen werden, beachten Sie die Hinweise in [Abschnitt 10.2](#).

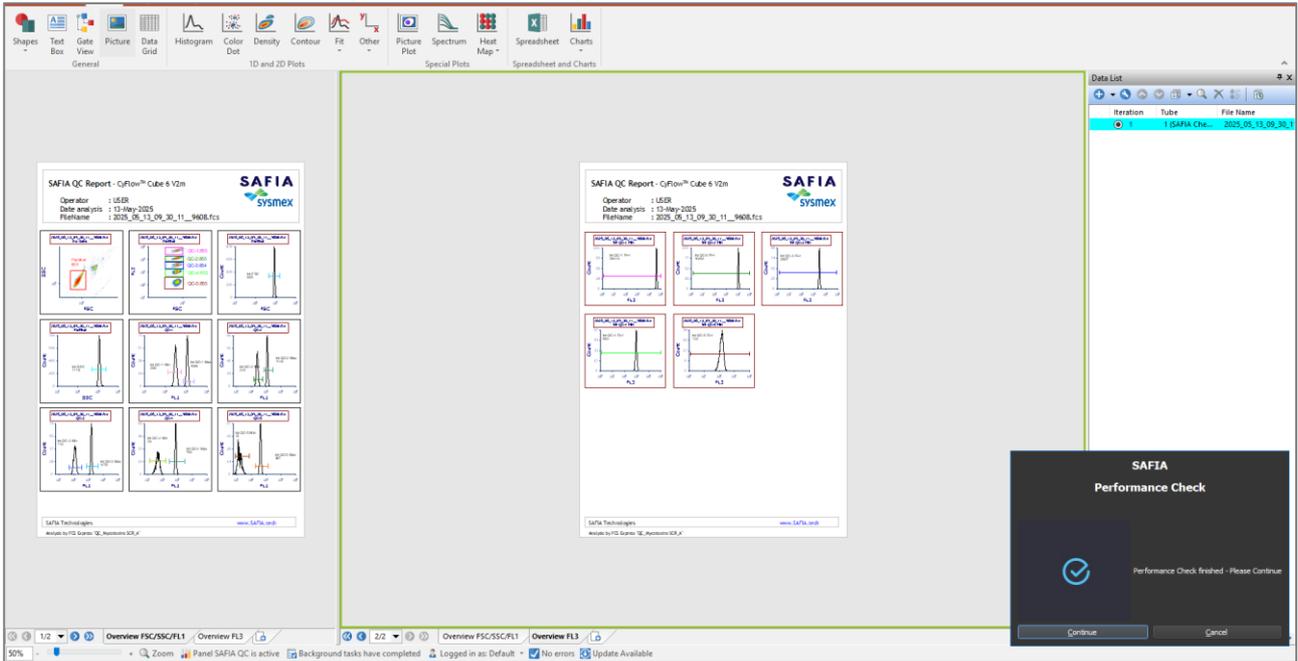


Abbildung 7. Darstellung der .fcs-Daten in FCS Express

4. Überprüfen Sie in *FCS Express*, ob die Populationen in den vorgesehenen Gats liegen und passen sie bei Bedarf leicht an. Klicken Sie dazu das entsprechende Gate an und verschieben es an die gewünschte Position. Klicken Sie unter dem Reiter *Batch & Export* auf *Run* (s. Abbildung 8).
5. Es öffnet und schließt sich kurz ein Fenster, welches Sie ignorieren können. Nun wird die .fcs-Datei eine in .csv-Datei konvertiert, welche mit SAFIA Check ausgewertet werden kann. Die .csv-Datei wird automatisch im Ordner *SAFIA Check* → *Export-Files* gespeichert.

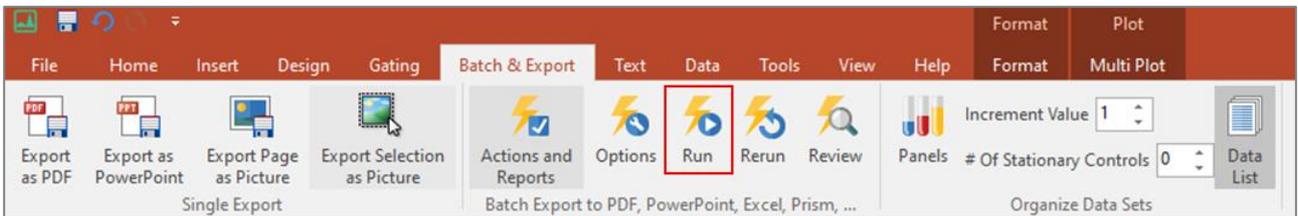


Abbildung 8. Ansicht des Reiters *Batch & Export* in *FCS Express* sowie Lage von *Run*

#### 4.4 Auswertung eines Performance Checks mit SAFIA Check

1. Öffnen Sie *SAFIA Check* und klicken Sie auf den Button **Add New Performance Check**.
2. Zum Hinzufügen der .csv-Datei klicken Sie in dem sich öffnenden Fenster auf *Load CSV-File*. Wählen Sie die entsprechende Datei aus dem Ordner *SAFIA Check* → *Export-Files* aus.

Abbildung 9. Ansicht des Fensters *Add New Check* mit den Buttons *Load CSV-File* und *Confirm New Performance Check* sowie den Freitextfeldern *Operator* und *Comment*



Sie haben die Möglichkeit den Namen der durchführenden Person einzutragen, sowie einen Kommentar zu speichern, die bei der Interpretation hilfreich sein können, bspw. wenn Wartungen am Gerät vorgenommen wurden.

3. Durch Klicken des Button *Confirm New Performance Check* wird die *.csv*-Datei in *SAFIA Check* geladen und der Performance Check wird ausgeführt.



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. Das Ergebnis des Performance Checks wird automatisch als *.pdf*-Datei im Ordner *SAFIA Check* → *Reports* gespeichert.



Schließen Sie *FCS Express* nach Abschluss, ohne zu speichern, damit die Vorlage nicht überschrieben wird.

## 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 **New LOT** . Tragen Sie in das sich öffnende Fenster die *LOT-ID* und die aufgelisteten Parameter ein (s. Abbildung 10). Die Parameter werden mit den *SAFIA Check Partikeln* mitgeliefert. Sie dienen als Vergleichsgrößen (Benchmark) für jeden *Performance Check*.

The screenshot shows a window titled "New LOT" with a "Select Device" dropdown menu currently set to "Cube6 V2M". Below the dropdown are ten input fields for various parameters: LOT ID, Int FSC, Int SSC, %CV FSC, %CV SSC, %CV QC-1 FL1, %CV QC-2 FL1, %CV QC-3 FL1, %CV QC-4 FL1, %CV QC-5 FL1, and %CV QC-1 FL4.

Abbildung 10. Ansicht des Fensters *New LOT*

2. Klicken Sie auf den Button *Add LOT File*.



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](#).

## 4.6 Manueller Reinigungszyklus

! Beachten Sie, dass sofort Flüssigkeit aufgesogen wird, sobald der rote *Intermediate Cleaning Button*  betätigt wird. Platzieren Sie also das Röhrchen mit der entsprechenden Lösung in dem *Sample Port* bevor Sie auf den Button klicken.

1. Führen Sie nach Abschluss der Messung einen Reinigungszyklus durch. Befüllen Sie dazu ein Röhrchen mit ca. 2 ml *Cleaning Solution* und verbinden Sie es mit dem *Sample Port*.
2. Klicken Sie dann auf den roten *Intermediate Cleaning Button* .
3. Befüllen Sie ein Röhrchen mit ca. 2 ml *Sheath Fluid* und verbinden Sie es mit dem *Sample Port*.
4. Klicken Sie erneut auf den *Intermediate Cleaning Button* .

## 5 Planen des SAFIA Assays in SAFIA Score

- ! Stellen Sie sicher, dass jede Platte (Well A1 bis H12) mindestens eine Acht-Punkte-Kalibrierkurve enthält! Diese sollte in Doppelbestimmung ausgeführt werden. Andernfalls ist die Auswertung des Tests mit SAFIA Score nicht möglich.
- ! Benutzen Sie ausschließlich die mitgelieferte, schwarze 96-Well Mikrotiterplatte zur Durchführung des Assays.

### 1. Öffnen Sie SAFIA Score.



In der Menüleiste finden Sie die Reiter *File* (Laden, Speichern, Editieren von Dateien und Beenden der Software), *Export* (Erstellen eines Reports) und *Raw Data* (Anzeigen der Daten aus der .csv-Datei). Die Software gliedert sich in die Arbeitsbereiche *Start*, *Samples and Calibrations*, *Plate Layout*, *Calibration Curves*, *Results* und ggf. *Raw Data*. Diese Reiter können durch Anklicken erreicht werden. Die Arbeitsbereiche *Calibration Curves*, *Results*, *References* und *Raw Data* sind erst nach Einlesen der .csv-Datei und nach Anklicken des Buttons *Calculate* im Arbeitsbereich *Plate Layout* freigeschaltet.

### 2. Starte Sie eine neue Analyse im Reiter *Start* über den grünen Button *+ New Analysis* (s. Abbildung 11).

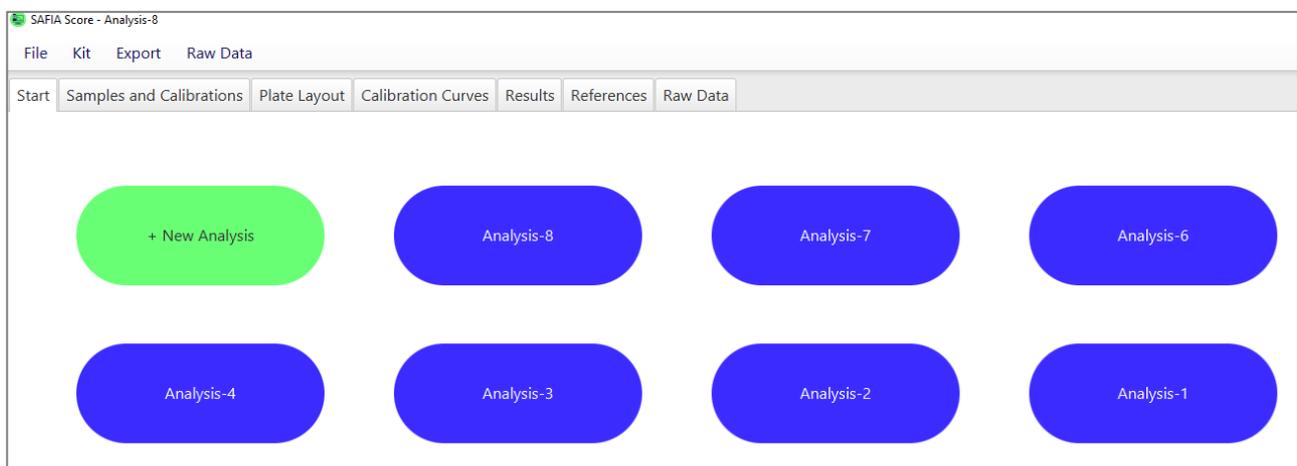


Abbildung 11. Ansicht des Startbereichs von SAFIA Score



Sie können auch eine ältere Analyse öffnen. Klicken Sie dazu im Startbereich auf den blauen Button einer älteren Analyse. Alternativ können Sie ein *SAFIA Data File* (.sdf-Datei) auch unter *File* → *Load* öffnen.

- Wählen Sie in dem sich öffnenden Fenster im Dropdown-Menü das entsprechende Kit aus. Geben Sie eine Analysis-ID ein und klicken Sie auf Start Analysis (s. Abbildung 12).

Abbildung 12. Ansicht des Fensters *New Analysis*



Das Vergeben einer *Analysis-ID* erleichtert die Verknüpfung von .fcs, .csv und .sdf Daten. Sie kann im Menü unter *File/Edit Analysis ID* geändert werden.

- Gehen Sie zum Arbeitsbereich *Sample and Calibration*. Hier befinden sich drei Tabellen, die sich über die entsprechenden Buttons ein- und ausblenden lassen. In der *Calibration Table* finden Sie vorausgefüllt die Konzentration der einzelnen Standards, die mit dem Kit mitgeliefert werden. Sie haben die Möglichkeit diese nach Bedarf zu editieren, z. B. Ändern der Konzentration, Löschen und Hinzufügen eines Standards. Außerdem kann über die Spalte *Replicates* festgelegt werden, wie oft ein Standard gemessen werden soll, siehe Abbildung 13.



**Ändern Sie diese Tabelle nicht, wenn Sie planen alle Standards wie von uns geliefert zu verwenden. Legen Sie lediglich die Anzahl der Wiederholungsmessungen fest.**

Wir empfehlen jeden Standard oder jede Probe mindestens zweimal zu messen; unerfahrene Personen sollten jeden Standard/jede Probe dreimal messen.

Calibration	Replicates	Color	c (KON) [µg/l]	c (OTA) [µg/l]	c (DON) [µg/l]	c (FUM) [µg/l]	c (ZEN) [µg/l]	c (AFL) [µg/l]
Calibration1	3		1000.0	1000.0	10000.0	10000.0	1000.0	1000.0
Calibration2	3		100.0	100.0	1000.0	1000.0	100.0	100.0
Calibration3	3		10.0	10.0	100.0	100.0	10.0	10.0
Calibration4	3		1.0	1.0	10.0	10.0	1.0	1.0
Calibration5	3		0.3	0.3	3.0	3.0	0.3	0.3
Calibration6	3		0.1	0.1	1.0	1.0	0.1	0.1
Calibration7	3		0.01	0.01	0.1	0.1	0.01	0.01
Calibration8	3		0.001	0.001	0.01	0.01	0.001	0.001

Sample ID	Replicates	Dilution	Color
Sample 1	3	16	
Sample 2	3	16	
Sample 3	3	16	

Abbildung 13. Übersicht der Funktionen des Arbeitsbereichs *Samples and Calibration*

- Tragen Sie nun Ihre Proben in die *Sample Table* ein. Vergeben Sie für jede Probe eine eindeutige *Sample ID* (Probenbezeichnung) und legen Sie über das *Replicates* Fenster fest, wie oft eine Probe gemessen werden soll.



Die Sample ID kann auch mittels Barcode Scanner in die Zwischenablage gespeichert werden und in SAFIA Score eingefügt werden.

- Geben Sie den Verdünnungsfaktor der Probe unter *Dilution* ein. Klicken Sie anschließend auf *Add Sample* um die Probe zur Tabelle hinzuzufügen. Die Werte in den Spalten *Replicates* und *Dilution* können auch später noch editiert werden. Die vergebene Farbe der Probe hilft im nächsten Schritt beim Erstellen des Plattenlayouts.



Den Verdünnungsfaktor können Sie [Abschnitt 6](#) entnehmen. Für das SAFIA Mykotoxin Kit beträgt er nach der Standard-Prozedur „16“, für Flüssige Proben „8“ und für Kräuter und Gewürze „32“. Wenn Sie Proben in mehreren Verdünnungsstufen messen wollen, müssen Sie für jede unterschiedlich verdünnte Probe eine eigene *Sample ID* angeben.

- Optional: Sie können in der *Reference Table* Proben mit Referenzkonzentration eintragen, analog zur *Sample Table* (z. B. Referenzmaterialien oder Blank-Messung).  
Nach dem Ende der Analyse ermittelt *SAFIA Score* automatisch die Wiederfindungsrate der Referenzproben. Diese finden Sie im Arbeitsbereich *References*. Mithilfe des Buttons *Transfer Sample to References* können Sie auch Referenzproben, die versehentlich in die Sample Tabelle eingetragen wurden, zur *References Table* hinzufügen.

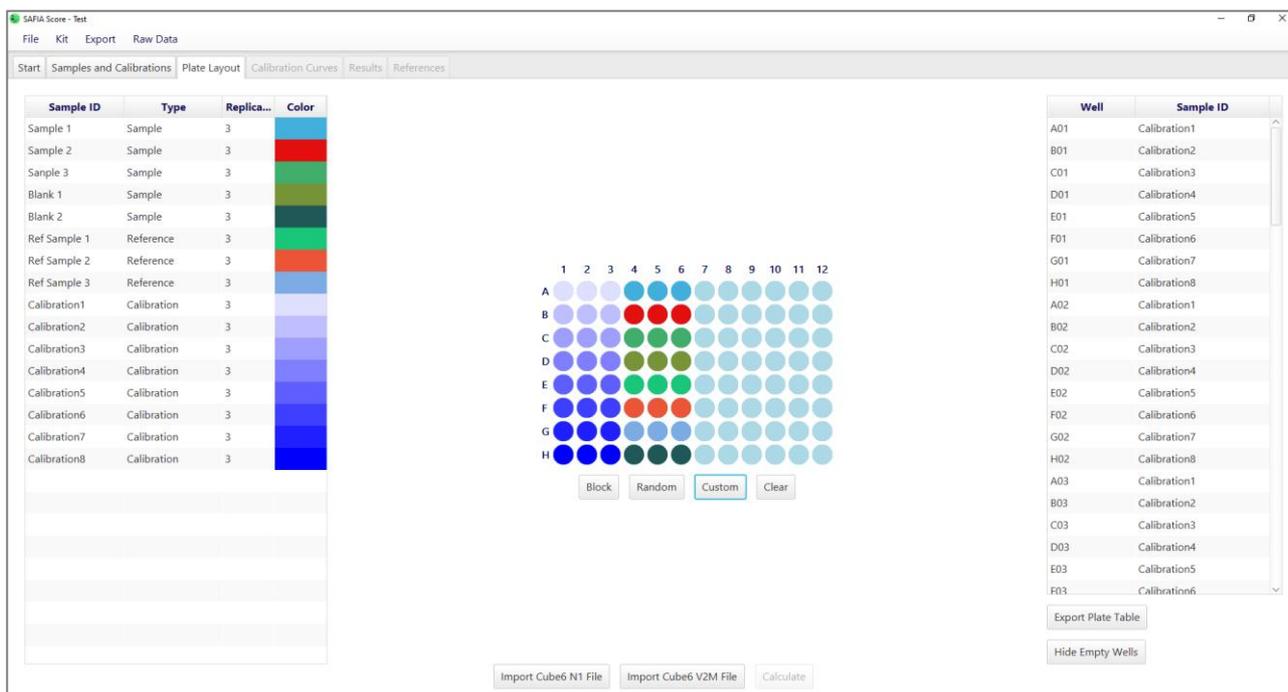


Abbildung 14. Übersicht der Funktionen im Arbeitsbereich Plate Layout

- Gehen Sie zum Arbeitsbereich *Plate Layout* 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) (s. Abbildung 14). Sie haben die Möglichkeit dies automatisch über die Buttons *Block* oder *Random* durchzuführen. Mithilfe des Buttons *Clear* können sie alle Eingaben löschen.
- Das Plattenlayout kann auch manuell mithilfe des Buttons *Custom* erstellt werden. Hier öffnet sich ein extra Fenster (s. Abbildung 15 A). In diesem wählen Sie die entsprechende Probe im Dropdown-Menü aus und

weisen Sie ein Well durch Klicken oder mehrere Wells durch Klicken und Ziehen zu. Falsch zugewiesene Proben können Sie durch Auswählen der Funktion *EMPTY* im Dropdown-Menü in analoger Weise wieder löschen.



Es ist essenziell, dass die angegebenen Wiederholungsmessungen der Standards und Proben aus dem Arbeitsbereich *Samples und Calibration* mit den Replikaten im Arbeitsbereich *Plate Layout* übereinstimmen. Sollte dies nach der Erstellung des *Plate Layouts* mithilfe der Funktion *Custom* nicht der Fall sein wird automatisch folgende Warnung angezeigt: „*WARNING: Replicates are not matching*“, siehe Abbildung 15 B. Sie haben nun die Möglichkeit entweder den Vorgang abubrechen und das *Plate Layout* entsprechend zu ändern (Button *Cancel*), oder die Wiederholungsmessungen gleich in die entsprechende Tabelle unter *Sample and Calibration* eintragen zu lassen (Button *Transfer Replicates to Table*).

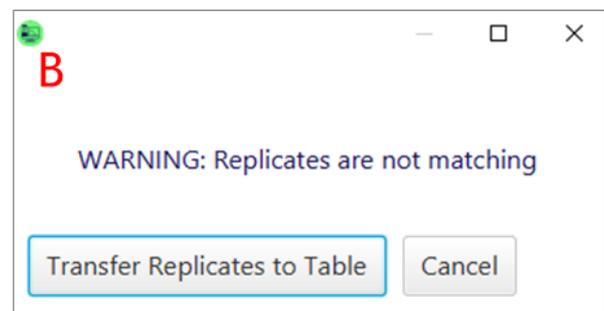
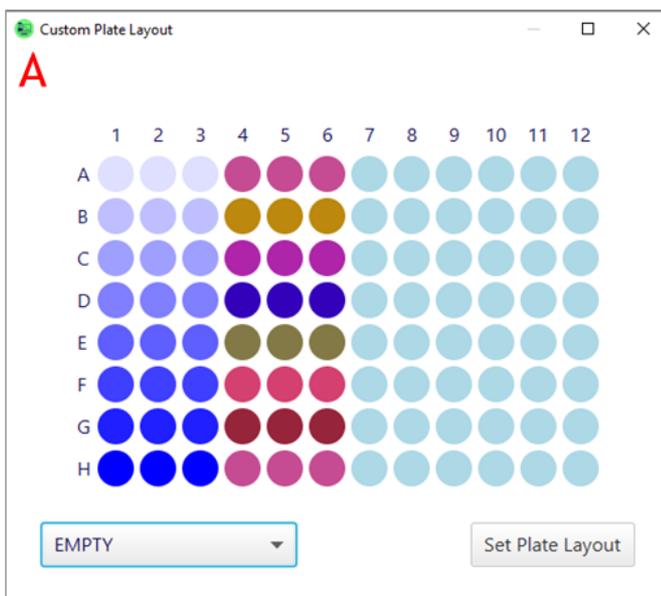


Abbildung 15. A) Menü zum Erstellen eines benutzerdefinierten Plattenlayouts B) Warnung bei nicht passenden Wiederholungsmessungen im Arbeitsbereich Plate Layout



Über den Button *Export Plate Table* können Sie das Plate Layout in eine Microsoft® Excel® Datei (.xlsx) exportieren.

10. Speichern Sie das *SAFIA Data File* (.sdf) ab, um die Analyse später fortzusetzen. Dies ist möglich unter dem Menü *File* → *Save As*.
11. Die Vorbereitung des Assays in *SAFIA Score* ist nun abgeschlossen. Sie können das erstellte *Plate Layout* nun im Assay verwenden und die Messung im Cube 6 durchführen.

## 6 Probenvorbereitung

Die zu wählende Probenvorbereitung ist abhängig von der Art des Lebensmittels (s. Tabelle 5). Die Proben müssen vor der Extraktion homogenisiert vorliegen, z. B. durch Vermahlen des Probenmaterials mit einer Mühle. Hierbei ist z. B. auf einheitlich 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 (s. Abbildung 16):



Abbildung 16. 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 Protokoll aus Tabelle 5 für die jeweilige Matrix. Die Probenvorbereitung ist matrixspezifisch, daher ergibt sich für manche Matrices eine leichte Anpassung des Standardprotokolls (Feste Lebensmittel mit hohem Proteingehalt). Beachten Sie die Hinweise zu besonderen Matrices in [Abschnitt 9](#).

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	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für 15 min schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>10 min</b> bei <b>12.000 g</b> zentrifugieren.</li> </ol>	16
Lebensmittel mit hohem Fettgehalt	Haselnüsse, Erdnüsse, Mandeln, Pistazien, Öle	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für 15 min schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>3 Spatelspitzen*</b> SAFIA PVPP-Adsorber pro 1 mL verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) <b>10 min</b> bei <b>12.000 g</b> zentrifugieren.</li> </ol>	16
Feste Lebensmittel mit hohem Zuckergehalt	Getrocknete Rosinen, Datteln, Feigen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für 15 min schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>10 min</b> bei <b>12.000 g</b> zentrifugieren.</li> </ol>	16

Probenart	Beispiele	Probenvorbereitung	Faktor
Spezialwaren	Kräuter und Gewürze (Paprika, Chili, Ingwer)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>40 mL 70 %iges</b> (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>2 Spatelspitzen*</b> SAFIA PA-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	32
	Heu	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>40 mL</b> 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>2 Spatelspitzen*</b> SAFIA PA-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	32
	Cannabis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>3 Spatelspitzen*</b> SAFIA PVPP-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	16

Probenart	Beispiele	Probenvorbereitung	Faktor
Stark geröstete Produkte	Malz, Melasse	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>3 Spatelspitzen*</b> SAFIA PVPP-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	16
Produkte mit viel Chlorophyll		<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>2 Spatelspitzen*</b> SAFIA PA-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	16
Produkte mit viel Anthocyanen und Polyphenolen	Cranberrys, Himbeeren	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 g</b> Probenmaterial einwiegen.</li> <li>2) <b>20 mL</b> 70%iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben für <b>15 min</b> schütteln, z. B. in einem Überkopfschüttler.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) <b>3 Spatelspitzen*</b> SAFIA PVPP-Adsorber pro <b>1 mL</b> verdünnte Probe hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln.</li> <li>6) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	16

Probenart	Beispiele	Probenvorbereitung	Faktor
Flüssige Lebensmittel ohne viele Farbstoffe	Säfte, Getränke, Weißwein	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 mL</b> Probe abmessen.</li> <li>2) <b>5 mL</b> 100 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben kurz schütteln.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren, wenn viele Schwebstoffe vorhanden sind.</li> <li>4) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>5) 10 min bei 12.000 g zentrifugieren.</li> </ol>	8
Flüssige Lebensmittel mit vielen Farbstoffen	Kirschsafft, Beerensaft, Roter Traubensaft, Rotwein	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) <b>5 mL</b> Probe abmessen.</li> <li>2) <b>5 mL</b> 100 %iges (vol/vol) Ethanol hinzugeben und die Proben kurz schütteln.</li> <li>3) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren, wenn viele Schwebstoffe vorhanden sind.</li> <li>4) <b>3 Spatelspitzen*</b> SAFIA PVPP-Adsorber pro <b>1 mL</b> Extrakt hinzugeben und <b>15 min</b> schütteln</li> <li>5) <b>5 min</b> bei <b>1.000 g</b> zentrifugieren.</li> <li>6) Überstand <b>1:4</b> in Probenpuffer verdünnen (z.B. 250 µL Probe in 750 µL Probenpuffer) und kurz schütteln.</li> <li>7) <b>10 min</b> bei <b>12.000 g</b> zentrifugieren.</li> </ol>	8

\* 2 Spatelspitzen PA bzw. 3 Spatelspitzen PVPP sind ca. 15–25 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.

## 7 Durchführung des SAFIA Assays

Abbildung 17 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der Durchführung des SAFIA Assays

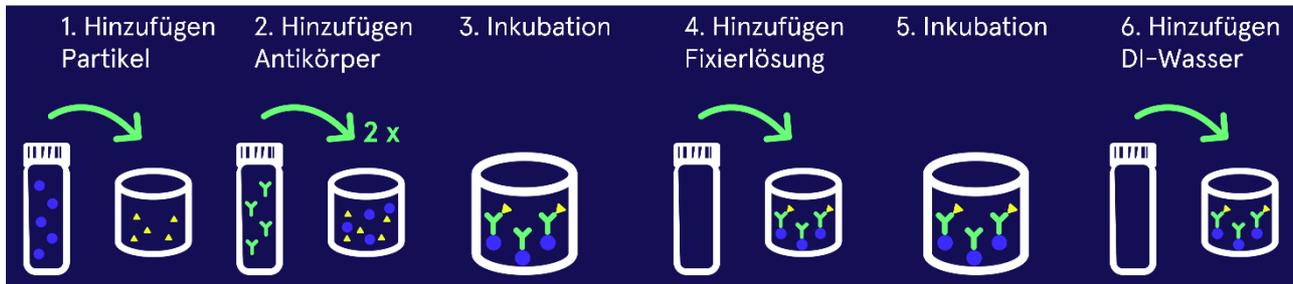


Abbildung 17. Durchführen des SAFIA Assays

### 7.1 Vorbereitung

1. Wenn nicht bereits geschehen, planen Sie Ihr Plattenlayout (Zuweisung der Proben und Standards zu den Wells der Mikrotiterplatte). Dies kann mithilfe der Software *SAFIA Score* vorgenommen werden (s. [Abschnitt 5](#)).
2. Alle Kit-Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
3. Fixierlösung vor Verwendung schütteln, da es bei der Lagerung von 2-8 °C zum Ausfallen einer Komponente kommen kann, die sich jedoch bei Raumtemperatur wieder vollständig löst.
4. Benötigte Menge der Partikelarbeitslösung frisch herstellen:
  - Partikelstocklösung mind. **20 s** gut schütteln
  - **1:33** in Partikelpuffer verdünnen, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6. Pipettierschema für 1, 3, 6, 9 und 19 Streifen einer MTP

	1 Streifen (8 Wells)	3 Streifen (24 Wells)	6 Streifen (48 Wells)	9 Streifen (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

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

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

5. Alle anderen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfähig.

## 7.2 Durchführung des Assays

6. In jedem Well der Mikrotiterplatte werden **25 µL** verdünnten Probe/ Standard vorgelegt, entsprechend dem gewählten Plattenlayout.
7. 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).
8. **20 min** bei RT unter Schütteln inkubieren.
9. **50 µL** Fixierlösung hinzugeben und **5 min** inkubieren.
10. **140 µL** DI-Wasser hinzugeben.



Die Zugabe der Reagenzien sollte mit einer Mehrkanalpipette erfolgen. Wenn Sie eine Mehrkanalpipette mit Dispensierfunktion verwenden, können Sie folgendes Schema zum Pipettieren verwenden:

Beispiel

- Sie haben 48 Wells mit Standard/Probe befüllt, in Well A1 bis F8 (die ersten 6 Spalten) → Demnach haben Sie 6 Streifen mit jeweils 8 Proben
- Verwenden Sie ein Multi-Kanal-Reservoir und pipettieren Sie das für einen Streifen benötigte Volumen (s. Tabelle 7) 6-mal nebeneinander.
- Stellen Sie die Mehrkanalpipette auf das Volumen für 1 Well (z.B. bei der Partikellösung 10 µl) und 8 Dispensier-Schritte ein
- Beladen Sie nun 6 Kanäle der Pipette mit Pipettenspitzen und nehmen mit jedem Kanal das vorbereitete Volumen aus dem Multi-Kanal-Reservoir auf.
- Dispensieren Sie nun das Volumen 8-mal in die Wells der Reihen 1-6.
- Arbeit Sie hierbei von unten nach oben (H zu A), um Fehler durch Kreuzkontamination zu minimieren.

Tabelle 7. 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

- ! 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!

11. Die Messung im Durchflusszytometer kann nun gestartet werden, siehe [Abschnitt 7.3](#).

### 7.3 Auslesen mit dem Cyflow® Cube 6 Durchflusszytometer

1. Wenn Sie am Messtag noch keine Performance Check durchgeführt haben, folgen Sie zunächst den Schritten in [Abschnitt 4](#).
2. Ziehen Sie den beweglichen Tray der CyFlow® Robby Autoloading Station heraus und stellen Sie die Mikrotiterplatte auf die dafür vorgesehene Plattform. Beachten Sie die richtige Orientierung der Platte. Das Well A1 muss sich oben rechts befinden.
3. Klicken Sie auf **Work**  in der Hauptleiste.
4. Überprüfen Sie unter *Einstellungen*  → *Measure*, ob die Parameter wie in [Abbildung 18](#) dargestellt eingestellt sind.

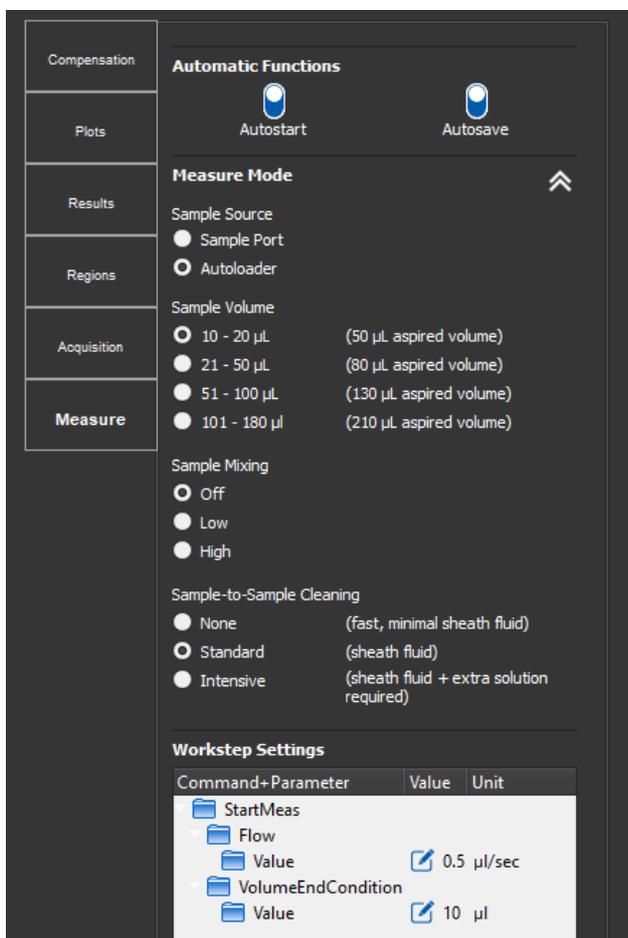


Abbildung 18. Einstellungen des Cube 6 zur Messung

5. Klicken Sie auf **Start** , um die Messung zu beginnen.

- Nun öffnet sich ein Fenster (s. Abbildung 19). Hier haben Sie die Möglichkeit eine *Tray-ID* (Batch-Nummer) (z.B. die Analyse-ID) zu vergeben. Verwenden Sie nur alphanumerische Zeichen (A-Z, a-z, 0-9) und den Tiefstrich „\_“ für die Tray-ID (z.B. 20250213\_TESTBATCH), da andere Zeichen & Sonderzeichen nicht erkannt werden und bei der Erstellung des Ordners gelöscht werden.

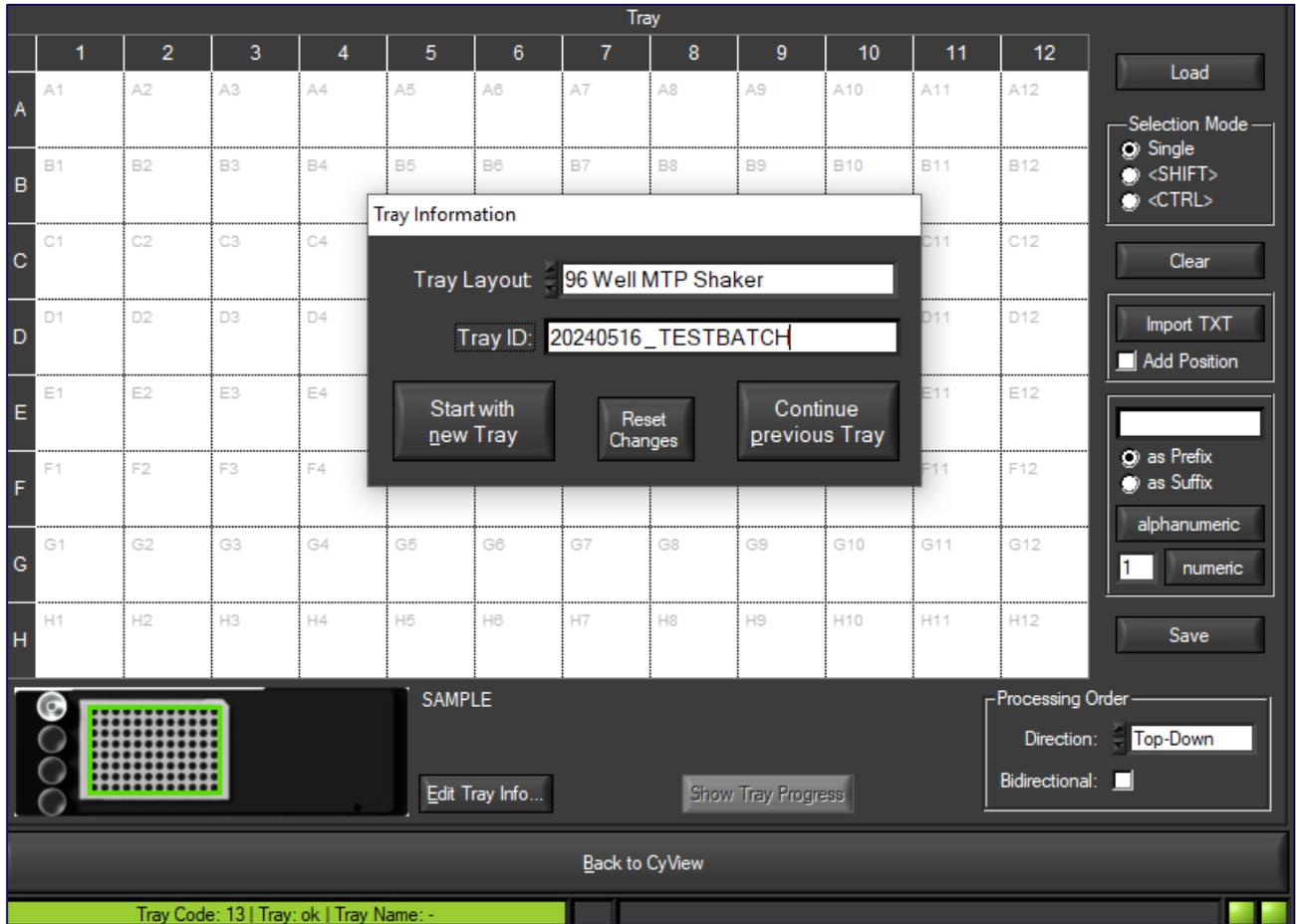


Abbildung 19. Auswahl des Plattenlayouts

- Klicken Sie auf *Start with a new Tray* um einen neuen Batch zu erstellen.

8. Wählen Sie nun die Wells aus, die gemessen werden sollen. Dies kann einzeln geschehen oder durch Ziehen über die Felder. Ausgewählte Wells erscheinen hell-blau (s. Abbildung 20).
9. Um die Daten mithilfe von SAFIA Score auswerten zu können, ist es unbedingt erforderlich, die Well-ID einzufügen. Verwenden Sie hierfür immer die Einstellung *as Prefix*. Drücken Sie auf den Button *alphanumeric*, dann erscheint die Well-ID in der entsprechenden Kavität. Die Well-ID wurde übernommen, wenn die Werte in der Mitte der Kavitäten in schwarz dargestellt wurden.
10. Optional kann für jede Probe ein Probenname angegeben werden. Dies wird im weißen Feld eingetragen, (s. Abbildung 20, rot markiert). Drücken Sie den Button *alphanumeric*, damit der Probenname übernommen wird und in der entsprechenden Kavität in schwarzer Schrift erscheint.



Abbildung 20. Das Menü für die Mikrotiterplattenbelegung

11. Klicken Sie nun auf den Button *Back to CyView*. Dadurch gelangen Sie zu *CyView* und die Messung kann über *Fortfahren*  gestartet werden.
12. Achten Sie vor und während der Messung darauf, dass ausreichend *Sheath Fluid* vorhanden ist. Füllen Sie die Flasche nach, wenn eine Warnung erscheint.
13. Die Messung erfolgt nun vollautomatisch. Sie sollten dennoch die ersten 5 Messungen überwachen, ob z. B. im System befindliche Luftblasen die Messungen beeinflussen.



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, s. Abbildung 21. 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.

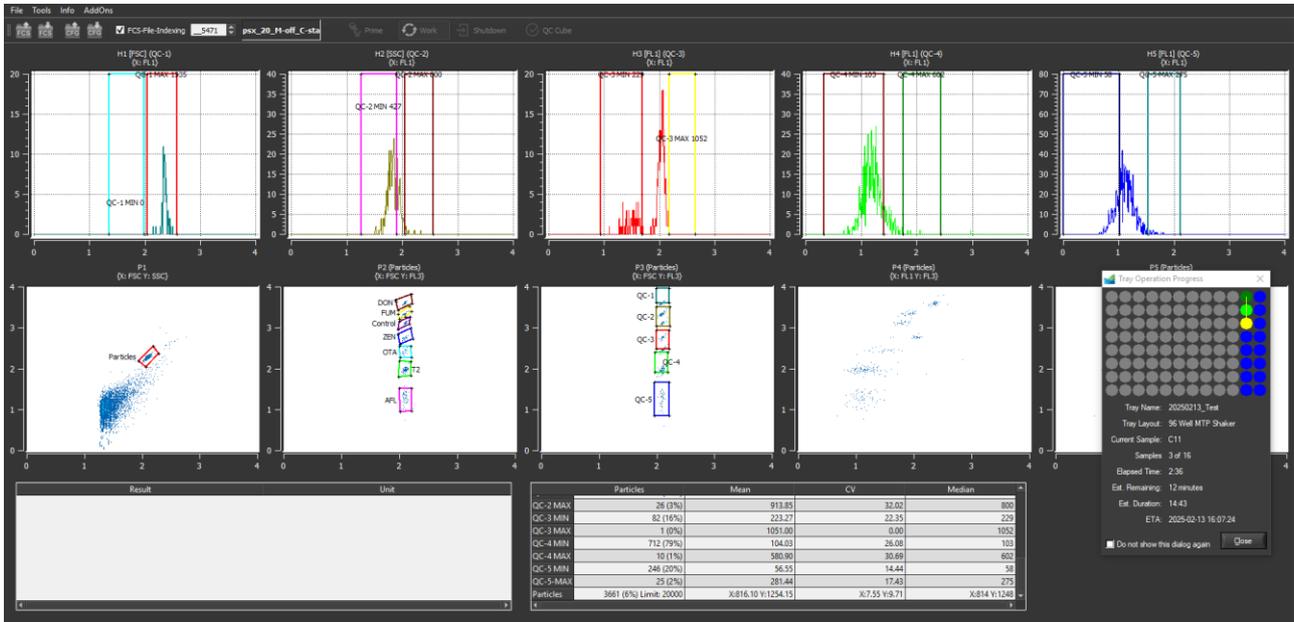


Abbildung 21. Typische Ansicht bei der Messung eines SAFIA Assays. Oben: Histogramm für die Intensität im FL-1 eines Analyten. Unten: Streuplot FSC/SSC und Streuplot FSC/FL-3

14. Optional nach der Messung: Führen Sie einen manuellen Reinigungszyklus durch, siehe [Abschnitt 4.6](#).

15. Nach vollendeter Messung öffnet sich automatisch *FCS Express* und zeigt die gemessenen Daten. Wenn nicht automatisch die richtigen Daten geladen werden, befolgen Sie die Hinweise in [Abschnitt 10.1](#).

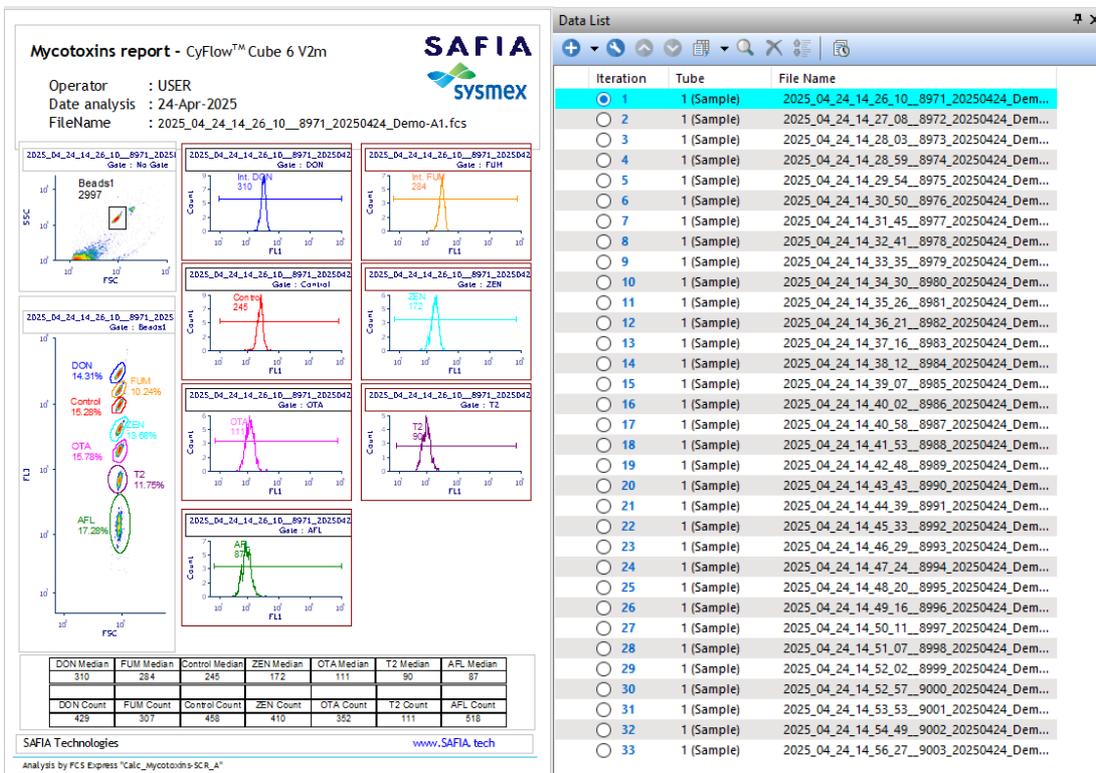


Abbildung 22. Darstellung der .fcs-Daten in FCS Express

16. In der Data List auf der rechten Seite sehen Sie, dass die erste Messung ausgewählt ist. Die Daten dieser Messung sind auf der linken Seite dargestellt. Überprüfen Sie, ob die Populationen in den Gates liegen. Liegt eine Population nicht im Gate, muss sie angepasst werden. Dazu kann das entsprechende Gate angeklickt und verschoben oder vergrößert/verkleinert werden.
17. Um diese Überprüfung für alle Messungen durchzuführen & die Daten zu konvertieren klicken Sie nun unter dem Reiter *Batch & Export* auf *Run*.

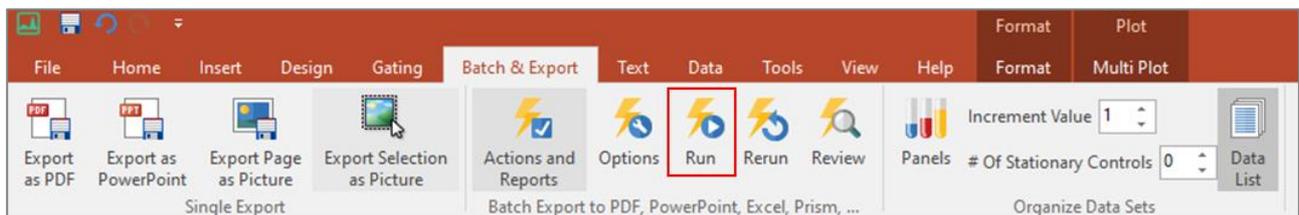


Abbildung 23. Ansicht des Reiters *Batch & Export* in FCS Express sowie Lage von *Run*

18. Überprüfen Sie nun die Gates der zweiten Messung und klicken Sie in dem geöffneten Fenster (s. Abbildung 24) auf *Continue*, um zur nächsten Messung zu gelangen. Wenn *Keep the changes* ausgewählt ist, übertragen sich die Anpassungen auf alle Messungen. Wenn eine Anpassung nicht auf alle Messungen übertragen werden soll, wählen Sie *Restore the state of the layout before the next iteration* aus. Mit *Run to End* kann zur letzten Messung gesprungen werden, wobei die gegebenen Gates auf alle Messungen angewendet werden und die Konvertierung durchgeführt wird.

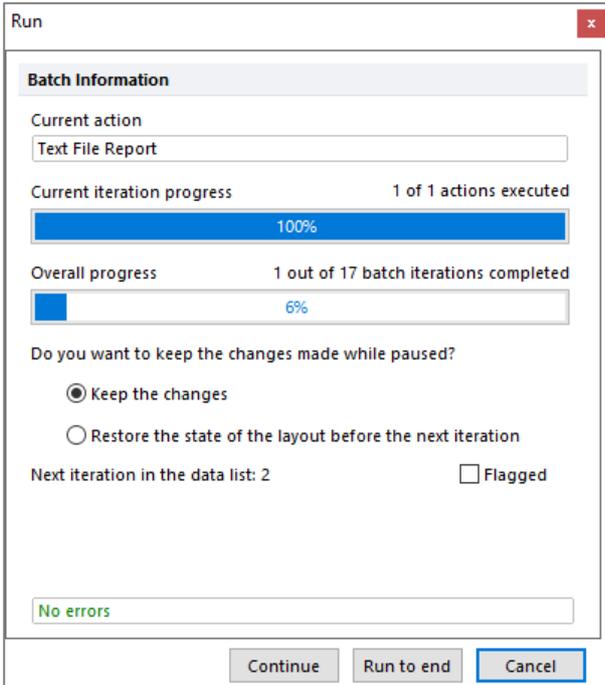


Abbildung 24. Iteration der Messungen zur Konvertierung der .fcs-Dateien zu .csv-Dateien

19. Wenn alle Messungen überprüft wurden, schließt sich das Fenster und es wurde automatisch eine .csv-Datei mit den gesammelten Messungen erstellt.
20. Schließen Sie *FSC Express* ohne zu speichern und fahren mit der Auswertung in *SAFIA Score* fort.



Speichern Sie nicht das Layout, da Sie sonst die Vorlage überschreiben. Wenn Sie das individuelle Layout speichern möchten, wählen Sie dazu die Option *Speichern Unter*.



Dass die Partikelpopulationen nicht immer vollständig im Gate liegen, ist vollkommen normal, da die Messung täglichen Schwankungen unterworfen ist und sich chargenabhängig leicht ändern kann.



Beachten Sie, dass die Reihenfolge der Gates sowie die Namen der Gates und Regionen nicht umbenannt werden dürfen. Eine Vertauschung von Gates führt zur falschen Dekodierung der Partikel und damit zu einer falschen Auswertung! Bei Fragen hierzu, wenden Sie sich bitte an den [SAFIA Technologies Support](#).



Bei Bedarf können die Plots über *Zoom* vergrößert werden.



## 7.4 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. Wählen Sie im Arbeitsbereich *Plate Layout Cube6 V2m FCS Express* aus, klicken Sie anschließend auf *Import File* und wählen die zuvor generierten .csv-Dateien aus (s. Abbildung 25).

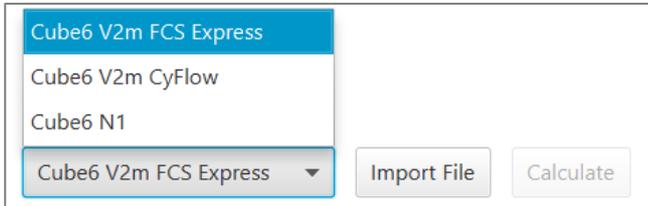


Abbildung 25. Ausschnitt des Arbeitsbereichs *Plate Layout*

3. Klicken Sie anschließend auf den Button *Calculate*. Nun werden anhand des *Plate Layouts* und der Messdaten der Kalibrationsstandards sigmoidale Kalibrationskurve erstellt, anhand welcher die Gehalte in den Proben und Referenzproben automatisch berechnet werden (s. Abbildung 26).

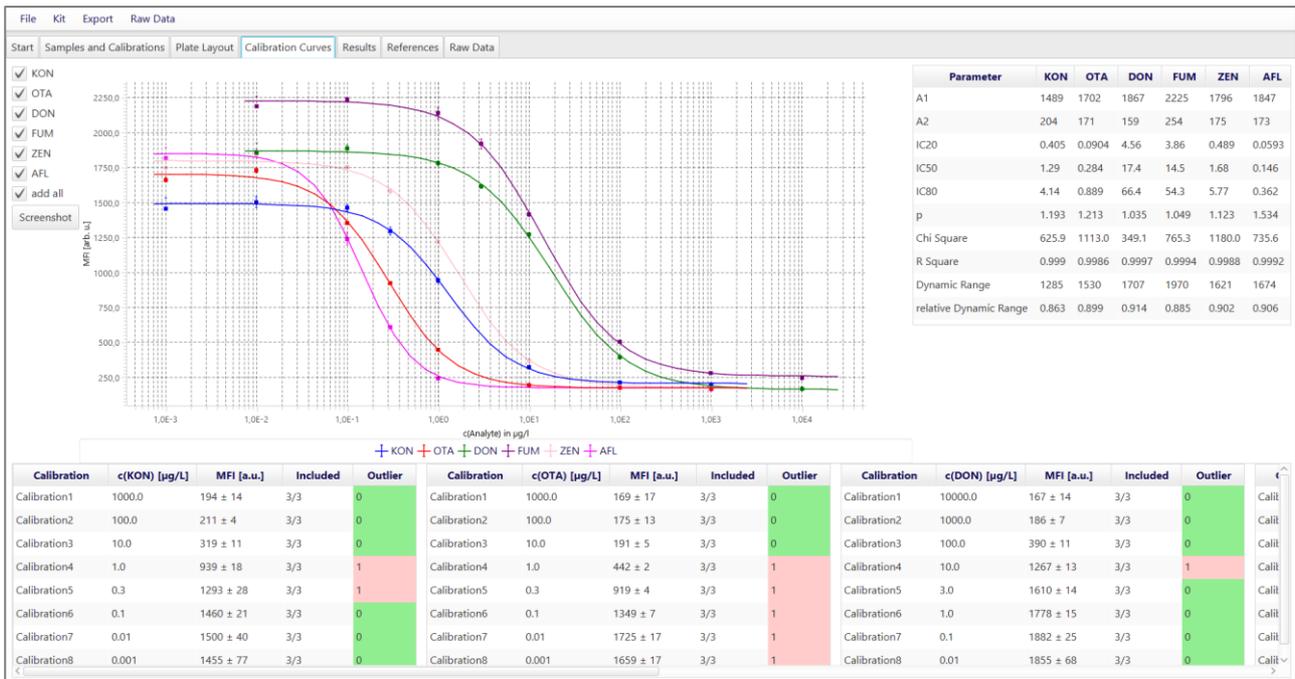


Abbildung 26. Übersicht über die Funktionen im Arbeitsbereich *Calibration*

4. Rechts oben werden die durch den Fit ermittelten Kurvenparameter dargestellt, mithilfe deren Sie beurteilen können, ob die Kalibration des Assay erfolgreich verlaufen ist. Eine Kalibrationskurve sollte folgende Parameter ausweisen:

- *relative Dynamic Range*: mindestens 0.70, optimal > 0.80
- Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ; *R Square*): 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	T2
IC50 Min [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,250	0,180	4,35	3,00	1,10	0,0650	0,360
IC50 Max [ $\mu\text{g/L}$ ]	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 10.6](#).



Unten im Tab sehen Sie tabellarisch die Ergebnisse der einzelnen Standards zusammengefasst, geordnet nach Analyten.

Die Berechnung der Kalibrationskurve 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 (s. Abbildung 27). Mithilfe der Buttons *Exclude Measurement* und *Exclude All Outliers* lassen sich Messungen entweder einzeln oder auf Basis des Grubbs-Tests ausschließen. Dies wird in der Berechnung berücksichtigt und gespeichert. Über *Include Measurement* können vorher ausgeschlossene Messungen wieder einbezogen werden. Zum Anwenden klicken Sie auf *Apply*, zum Verwerfen auf *Close*.

Well	Count	MFI	is Included	Outlier
D01	575.0	441.09	included	No
D02	534.0	445.08	EXCLUDED	Yes
D03	505.0	441.09	included	No

Buttons: Exclude Measurement, Include Measurement, Exclude All Outliers, Close, Apply

Abbildung 27. Detailanzeige einer einzelnen Messung in den Arbeitsbereichen *Calibration Curves* und *Results*. Diese kann durch Doppelklick auf einen Tabelleneintrag geöffnet werden. Über die Buttons können Messungen in die Berechnung ein- oder ausgeschlossen werden. Im Feld *Outlier* sehen Sie die Ergebnisse des Ausreißertests nach Grubbs



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.



Im Arbeitsbereich *Calibration Curves* haben Sie links oben die Möglichkeit sich die verschiedenen Kalibrationskurven anzeigen zu lassen und diese über die Screenshot Funktion als Grafik zu exportieren.

- In den Arbeitsbereichen *Results* und *References* sind die Ergebnisse der einzelnen Proben bzw. Referenzproben aufgelistet (s. Abbildung 28).
- Über den Button *Show Outlier* bzw. *Show Interpretations* können Sie zwischen der Interpretationsansicht bzw. der Ausreißer-Ansicht hin und her schalten. Die Ausreißer-Ansicht ist analog zur Ausreißer-Ansicht der *Calibration Curves* gestaltet und zeigt Ihnen die Ergebnisse einen Grubbs-Ausreißer-Tests an.

Sample 1 Dilution Factor: 16				Sample 2 Dilution Factor: 16				Sample 3 Dilution Factor: 16			
Analyte	[µg/l]	Interpretation	Included	Analyte	[µg/l]	Interpretation	Included	Analyte	[µg/l]	Interpretation	Included
Control	0.0881 ± 0.0353	passed (<0.258 µg/L)	3/4	Control	Out of Lower Co...	passed (<4.12 µg/L)	0/1	Control	0.834 ± 0	passed (<4.12 µg/L)	1/1
OTA	0.0168 ± 0.0123	<0.147 µg/L (IC20)	3/4	OTA	0.497 ± 0	<2.35 µg/L (IC20)	1/1	OTA	0.388 ± 0	<2.35 µg/L (IC20)	1/1
DON	0.733 ± 0.391	<5.51 µg/L (IC20)	4/4	DON	129 ± 0	>88.1 µg/L (IC20)	1/1	DON	16.3 ± 0	<88.1 µg/L (IC20)	1/1
FUM	0.0703 ± 0.0029	<2.43 µg/L (IC20)	3/4	FUM	16.6 ± 0	<38.8 µg/L (IC20)	1/1	FUM	Out of Lower Co...	<38.8 µg/L (IC20)	0/1
ZEN	0.227 ± 0.0236	<0.991 µg/L (IC20)	3/4	ZEN	Out of Lower Co...	<15.9 µg/L (IC20)	0/1	ZEN	Out of Lower Co...	<15.9 µg/L (IC20)	0/1
AFL	0.0538 ± 0.0129	<0.118 µg/L (IC20)	3/4	AFL	0.808 ± 0	<1.89 µg/L (IC20)	1/1	AFL	0.381 ± 0	<1.89 µg/L (IC20)	1/1
T2	0.218 ± 0.0818	<1.25 µg/L (IC20)	3/4	T2	46.4 ± 0	>20.0 µg/L (IC20)	1/1	T2	Out of Lower Co...	<20.0 µg/L (IC20)	0/1

Abbildung 28 Ausschnitt des Arbeitsbereichs *Results* mit einer Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Proben. Dies ist identisch zu Ansicht im Arbeitsbereich *References*



Die Interpretationsansicht gibt Ihnen eine optische Hilfestellung, ob die Kontrollmessung bestanden wurde (Anzeige: passed/failed) 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. **Bitte beachten Sie, dass es sich hierbei nur um eine Interpretationshilfe handelt. Die Interpretation ob ein Mykotoxin über oder unter der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze liegt, ist abhängig von der getesteten Matrix und muss von Ihnen anhand der Kit-Daten oder eigener Validierungsdaten für nicht aufgelistete Matrices erfolgen.**



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



Analog zu den Tabellen im Arbeitsbereich *Calibration Curves* gelangen Sie durch Doppelklick auf eine Detailansicht. Hier können einzelne Messungen in die Berechnung ein- oder ausgeschlossen werden. Ist die gemessene MFI größer als der A1-Wert der Kalibrationskurve, wird der Wert als *Out of Lower Concentration Range* angezeigt, da für diesen Fall eine Quantifizierung der Proben mathematisch nicht möglich ist. Dies bedeutet, dass die Konzentration des Analyten kleiner als die Bestimmungsgrenze des Assays war. Die Werte werden in der Berechnung automatisch ausgeschlossen. Analoges gilt für Werte, die kleiner sind als der A2-Wert der Kalibrationskurve. 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.



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



Im unteren Bereich werden die ermittelten Konzentrationen in Form eines Säulendiagramms angezeigt, geordnet nach Analyten. Das Diagramm kann ebenfalls über den Button *Screenshot Results Graphs* exportiert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit den Verdünnungsfaktor in jeder Grafik einzubeziehen, sowie Referenzlinien anzuzeigen.

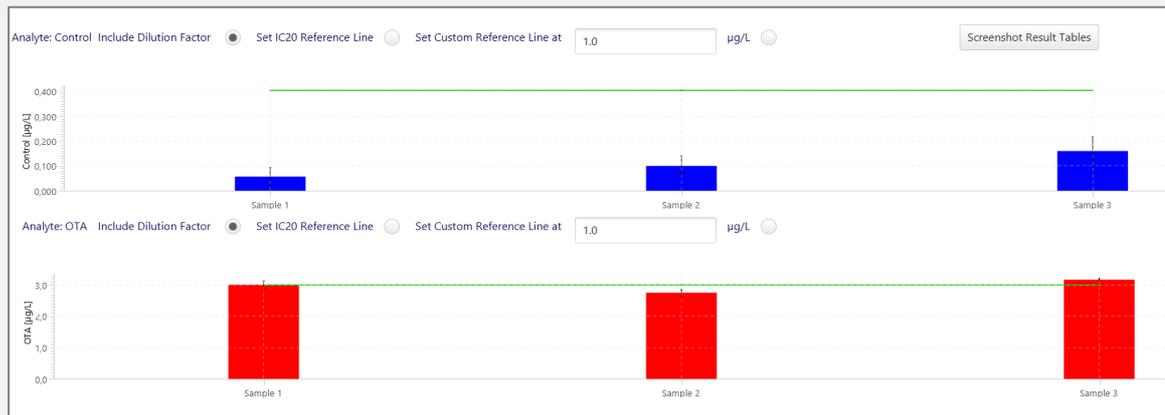


Abbildung 29 Ausschnitt des Arbeitsbereichs *Results* mit den Ergebnissen der einzelnen Proben als Säulendiagramm. Dies ist identisch zu Ansicht im Arbeitsbereich *References*



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-Kalibrationskurve ist. Dies kann leicht grafisch überprüft werden. Dazu muss das Feld *Include Dilution Factor* deaktiviert und das Feld *Set IC20 Reference Line* aktiviert sein (s. Abbildung 29).

7. Im Menü *Raw Data* 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 *Raw Data* ist nur aktiv, wenn im Menü *Raw Data* die Option *Show Raw Data* aktiviert wurde. Dieser Arbeitsbereich kann bei Bedarf auch wieder geschlossen werden.

8. Weiterhin können die berechneten Werte in eine Microsoft® Excel® Datei (.xlsx) exportiert werden. Klicken Sie hierzu im Menü *Export* auf *Excel-Export* und speichern Sie die Datei ab. In der Microsoft® Excel® Datei finden Sie in den entsprechenden Blättern die zusammengefassten Ergebnisse der Messungen der Proben und Referenzproben, sowie die Parameter der einzelnen Kalibrationskurven.

## 8 Reinigen und Herunterfahren des Cube 6



Um eine einwandfreie Funktion des Cube 6 zu gewährleisten, empfehlen wir folgende Reinigung des Zytometers nach Abschluss der SAFIA Messungen durchzuführen. Dies ist nur im MTP-Format möglich. Für das Tube Format kann einfach die *Intermediate Cleaning Funktion* verwendet werden.

1. Füllen Sie nacheinander jeweils einen Streifen (8 Kavitäten Reihe A→ H) einer Mikrotiterplatte, jeweils mit 4 Wells *Hypochlorite Solution*, 4 Wells *Decontamination Solution*, 4 Wells *Cleaning Solution* und 4 Wells *Sheath Fluid*.
2. Ziehen sie den beweglichen Tray der CyFlow® Robby Autoloading Station heraus und stellen Sie die Mikrotiterplatte auf die dafür vorgesehene Plattform. Bitte beachten Sie, die richtige Orientierung der Platte (Well A1 oben rechts).
3. Öffnen Sie das *Configuration File* mit Namen *Cleaning-MTP*. Klicken Sie dazu auf den Button **CFG** .
4. Klicken Sie nun auf **Work**  in der Hauptleiste.
5. Überprüfen Sie, ob folgende Einstellungen unter *Einstellungen*  *Measure* eingestellt sind (s. Abbildung 30).

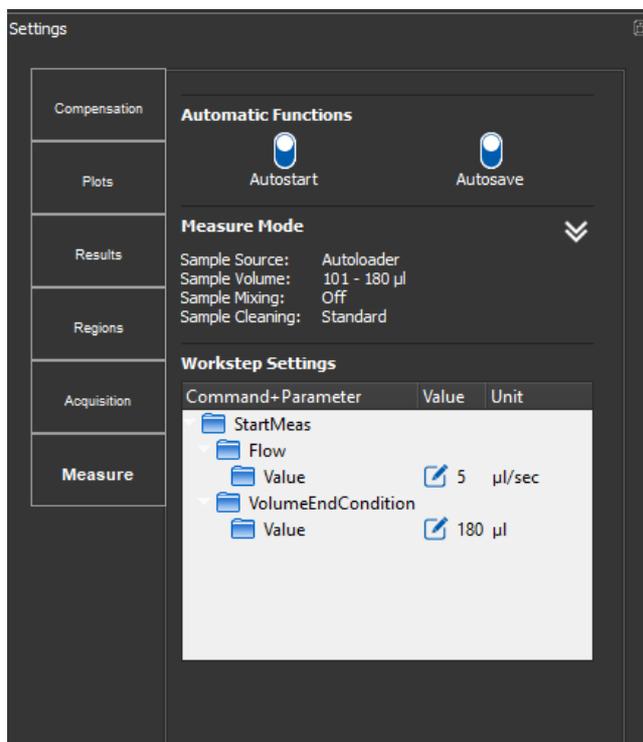


Abbildung 30. Einstellungen zum Ausführen des SAFIA Reinigungsprogramms (Cleaning-MTP)

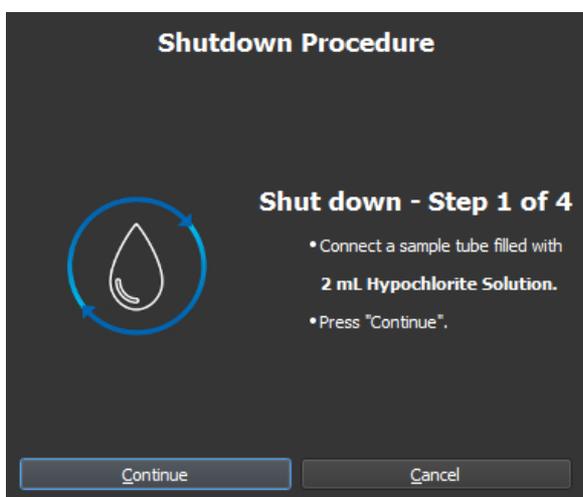
6. Führen Sie die Messung analog zum [Abschnitt 7.3](#) aus.



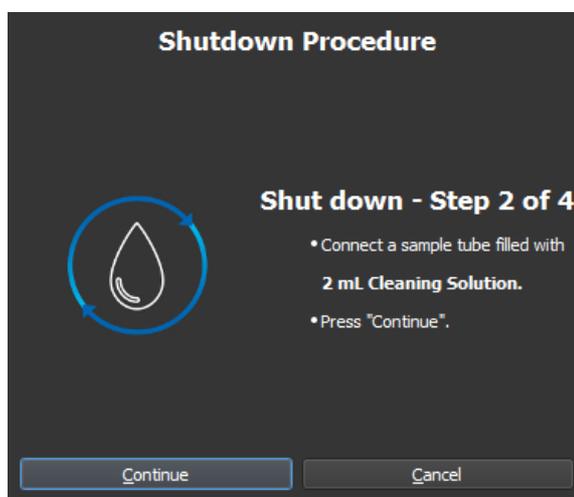
Die aus dem Reinigungsprogramm entstandenen *.fcs-Dateien* enthalten keine sinnvollen Daten, werden aber dennoch im Ordner C:\Users\Public\Documents\Cyflow automatisch gespeichert. Zur besseren Übersicht können Sie diese Dateien löschen.

7. Führen Sie nun den Shutdown durch, indem Sie den *Shutdown*  **Shutdown** klicken.
8. Starten Sie das Programm, indem Sie auf *Start*  klicken.
9. Folgen Sie den Anweisungen durch das Shutdown-Programm, s. Abbildung 31. Nach Abschluss des Geräts schließt sich die CyView™ Software automatisch.

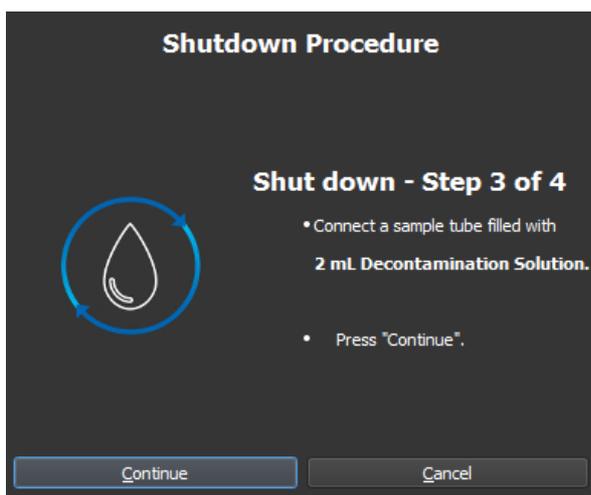
Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3



Schritt 4

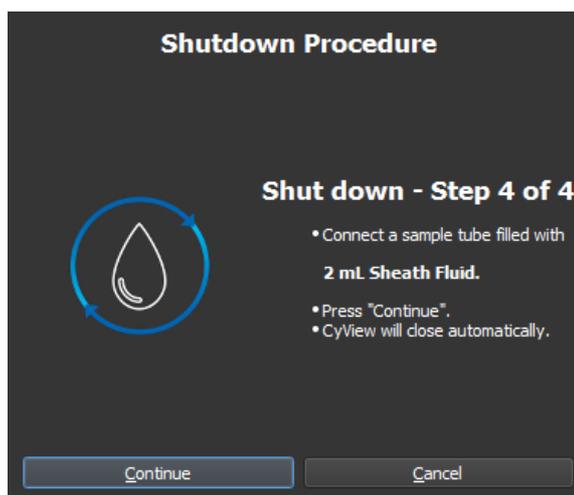


Abbildung 31. Schritte des Prime Programms Die Software schaltet sich automatisch ab, sobald der Vorgang abgeschlossen ist. Sie können den PC nun herunterfahren

## 9 Hinweise für besondere Matrices

Matrix	Hinweis
<b>Soja</b>	Bei hohen Anteilen von Soja werden zu hohe OTA-Werte erhalten. Abhilfe: Soja-Produkte sollten etwas stärker verdünnt werden.
<b>Zimt</b>	Zimt kann mit SAFIA nicht analysiert werden.
<b>Kaffee</b>	Kaffee kann mit SAFIA nicht analysiert werden.
<b>Mango</b>	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 ist davon nicht betroffen.

# 10 Häufige Fehler und Trouble Shooting

## 10.1 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 (s. [Abschnitt 4.6](#)) oder führen Sie erneute des Prime-Programms durch (s. [Abschnitt 3](#)).

## 10.2 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.

Die *Gain Settings* und *Tresholds* der Detektoren wurden bereits bei der Installation des Systems eingestellt und dürfen nicht verändert werden!

## 10.3 Nach Abschluss der Messung öffnet sich FCS Express nicht automatisch mit den richtigen Daten

Wenn sich *FCS Express* nach Ihrer Messung nicht automatisch mit den Daten öffnet, können Sie diese manuell importieren. Um diesen Fehler in Zukunft zu verhindern, achten Sie darauf, dass *FCS Express* vor dem Starten der Messung in *CyView* geschlossen ist.

1. Öffnen Sie *FCS Express* und klicken auf *Open Layout*.

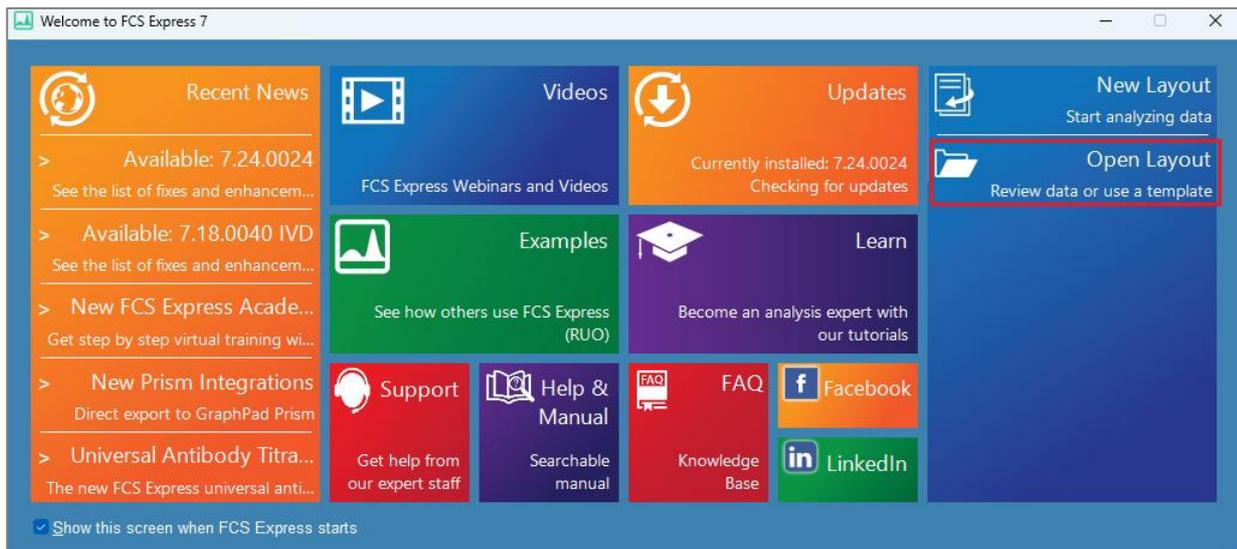


Abbildung 32 Ansicht der Startseite von FCS Express

- Wählen Sie das Layout mit dem Namen Calc\_Mycotoxins-SCR\_A aus, dies befindet sich in C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube\_18\templates\Quality Control

Wenn Sie bereits Messungen vorgenommen haben, erscheinen unterhalb von *Open Layout* die zuletzt verwendeten Layouts, von denen Sie das auswählen können.

- Es öffnet sich ein Fenster mit dem leeren Layout links und der leeren *Data List* rechts. Per *Drag and Drop* können Sie hier Ihre fcs.-Dateien ablegen. Ihre Dateien befinden sich in C:\ProgramData\PartecGmbH\Cube\_18\data\cyflow\ in einem Ordner mit dem Namen der von Ihnen vergebenen Tray-ID
- Folgen Sie nun den Anweisungen in [Abschnitt 7.3](#). Erscheint eine Fehlermeldung sobald Sie auf *Run* klicken, folgen Sie den folgenden Anweisungen in [Abschnitt 10.4](#).

## 10.4 FCS Express Fehlermeldung

- Öffnet sich die Fehlermeldung (s. Abbildung 33), wenn Sie auf *Run* klicken, dann klicken Sie *Cancel* und führen die folgenden Schritte durch.

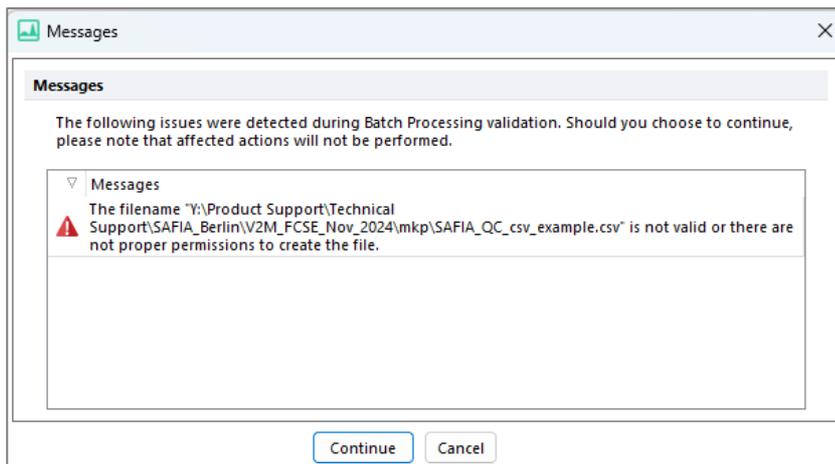


Abbildung 33 Ansicht der Fehlermeldung in FCS Express, wenn das Konvertieren der .fcs- in eine .csv-Datei fehlschlägt.

2. Klicken Sie unter Batch & Export auf Actions and Reports.

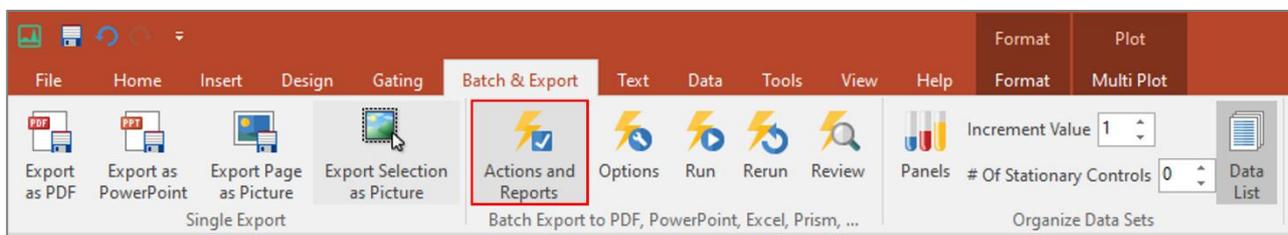


Abbildung 34 Ansicht des Reiters *Batch & Export* in FCS Express sowie Lage von *Actions and Reports*.

3. Daraufhin öffnet sich dieses Fenster:

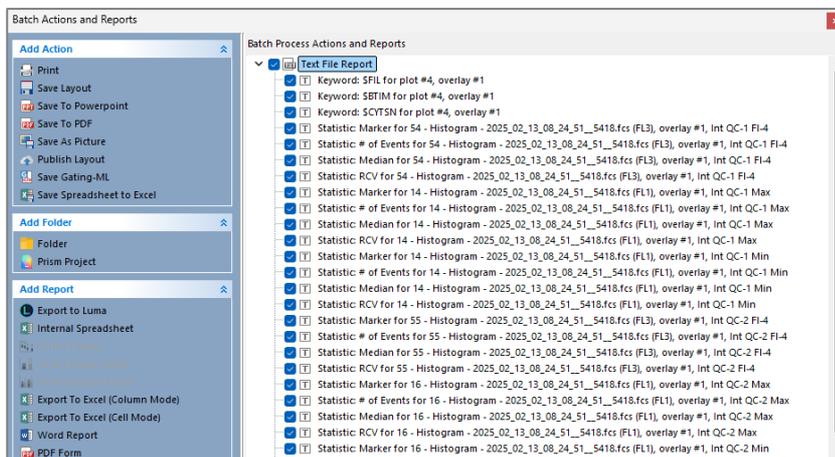


Abbildung 35 Ansicht des Fensters *Batch Actions and Reports*.

4. Klicken Sie mit einem Doppelklick auf *Text File Report*.

5. Daraufhin öffnet sich ein neues Fenster in dem Reiter *File Options*:

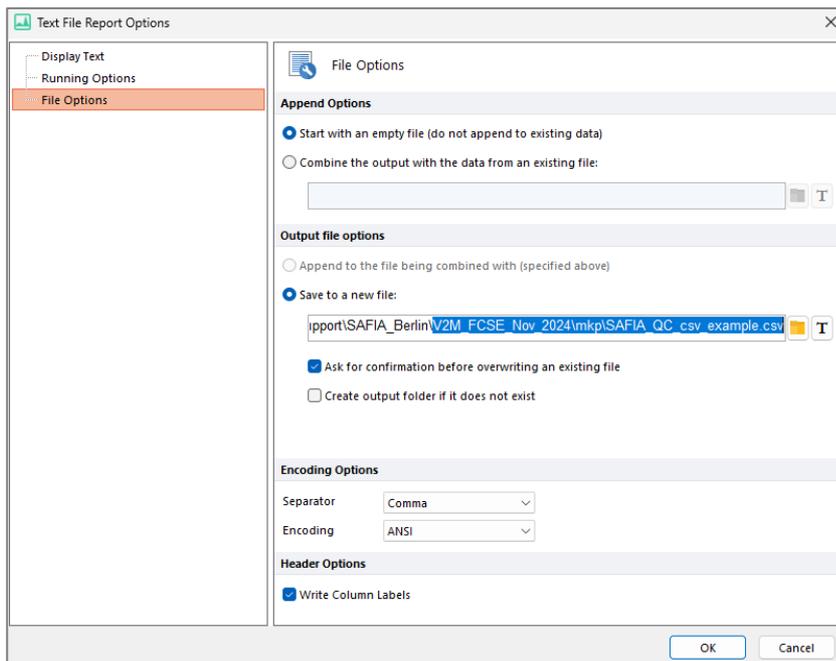


Abbildung 36 Ansicht des Fensters *Text File Report Options*.

6. Überprüfen Sie, ob unter *Append Options* die Option *Start with an empty file* [] ausgewählt ist und bei *Encoding Options* *Comma* und *ANSI* ausgewählt sind.
7. Wählen Sie unter *Output file Options* bei *Save to a new file* den Speicherort aus, indem Sie auf das Ordner-Symbol klicken. Der Speicherort ist in Ordner *SAFIA Check* bzw. *SAFIA Mykotoxins* → *Exportfiles*. Geben Sie hier den Dateinamen ein.
8. Klicken Sie nun auf das *T* (rechts neben dem Ordner-Symbol), daraufhin öffnet sich das Fenster *Insert a Token*:

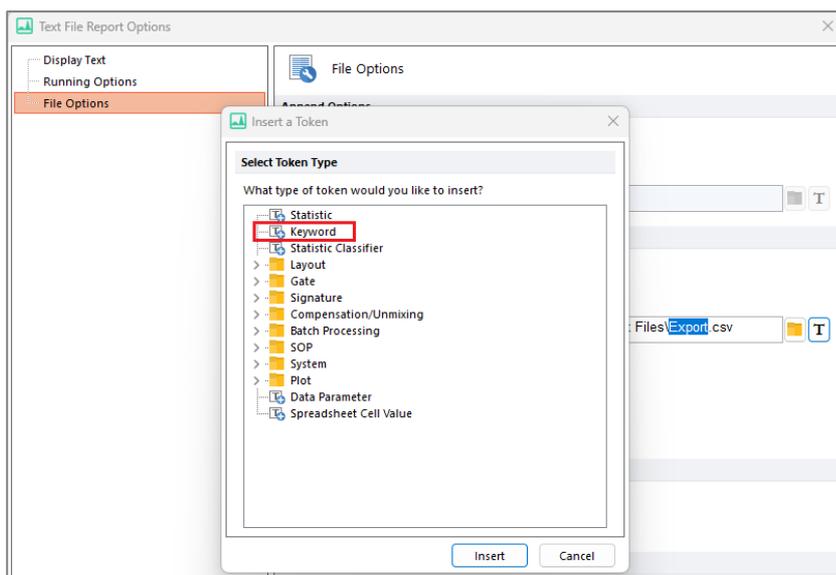


Abbildung 37 Ansicht des Fensters *Insert a Token*.

9. Wählen Sie mit einem Doppelklick *Keyword* aus, darauf hin öffnet sich das Fenster *Create Keyword*. Wählen Sie den Reiter *Keyword* aus und klicken Sie auf die drei Punkte.

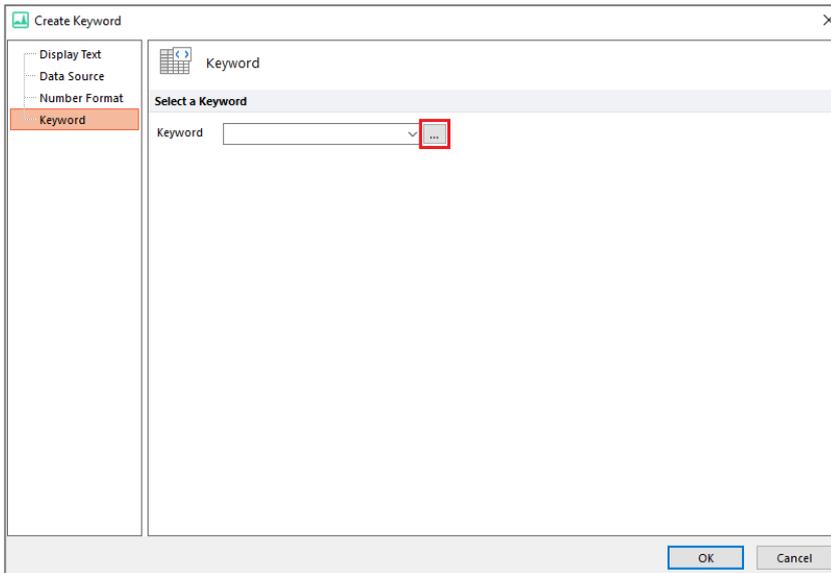


Abbildung 38 Ansicht des Fensters *Create Keyword*.

10. Nun öffnet sich das Fenster *Keyword List*. Wählen Sie das Keyword \$FIL aus und bestätigen über OK. Nun kann das Fenster *Batch Actions and Reports* geschlossen werden.

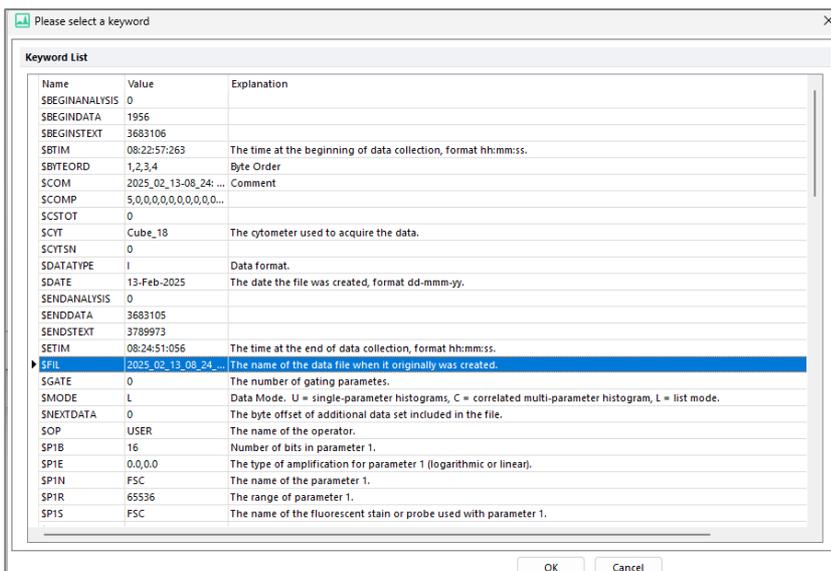


Abbildung 39 Ansicht des Fensters *Please select a keyword*.

11. Klicken Sie auf *Run* und folgen den Schritten in Abschnitt 7.4 7.3. Speichern Sie das Layout über File speichern unter mit dem Namen RP\_Mycotoxin\_A.

## 10.5 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.

## 10.6 Kalibrationskurve erfüllt nicht die Richtwerte

### 10.6.1 Relativer dynamischer Bereich, IC50, $p$ -Werte

Ist die Kalibrationskurve zu flach, so ergibt der relative dynamische Bereich und/oder weitere Parameter der Kalibrationskurve wie die IC50 Werte und der Steigungsparameter der Kurve am Testmittelpunkt ( $p$ ) nicht den Richtwerten (s. [Abschnitt 7.4](#)). Die Proben können nicht korrekt quantifiziert werden. Prüfen Sie das Mindesthaltbarkeitsdatum des Kit und achten Sie immer auf die korrekte Lagerung des Kits (s. [Abschnitt 2.3](#)). 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.

### 10.6.2 R Square <0.990

Ist das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ / R Square) kleiner als 0,990, überprüfen Sie die einzelnen Messwerte der Kalibrationskurve in SAFIA Score. Wenn mindestens 3 Replikate gemessen wurden, wird automatisch ein Ausreißertest nach Grubbs (Signifikanzlevel  $\alpha = 0,95$ ) 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 (Abbildung 27), wodurch das Bestimmtheitsmaß steigt. Achten Sie beim Pipettieren der Kalibrationsstandards auf sauberes Pipettieren, damit das Bestimmtheitsmaß größer 0,990 ist.

## 10.7 SAFIA Score

Sollten Sie nach dem Laden Ihrer Daten in SAFIA Score keine Ergebnisse bekommen, kann dies verschiedene Ursachen haben. Folgendes sind häufige Fehler:

- Sie haben in der References Table als Dezimaltrennzeichen ein Komma statt einem Punkt verwendet → Verwenden Sie in SAFIA Score ausschließlich das englische Zahlenformat
- Sie haben bei einem Referenzmaterial für ein oder mehrere Mykotoxine keine Werte eingetragen → Tragen Sie die Ihnen bekannten Werte ein und bei unbekanntem Konzentrationen 0.0.
- Das Plattenlayout in SAFIA Score stimmt nicht mit dem tatsächlichen Layout Ihrer Messplatte überein → Passen Sie das Layout in SAFIA Score entsprechend ihrem tatsächlichen Layout an und laden Sie ihre Messdaten erneut hoch.

Wenden Sie sich an den [SAFIA Technologies Support](#), wenn Sie Ihren Fehler nicht beheben können.

# 11 Anhang

## 11.1 Checkliste

Ausstattung	Spezifikation	Beispiel
<b>Fläche</b>		
Arbeitsplatz	ca. 2 x 1 Meter	
<b>Geräte</b>		
Zentrifuge	15/50 mL: 1,000 g 2 mL: 12,000 g	
(Mikrotiter-)Plattenschüttler/ Orbitalschüttler		Titramax 101
Rotator/ Überkopfschüttler		uniLOOPMIX 2
Analysewaage		Ohaus Pioneer PC
Mühle zum Mahlen von Probenmaterial		Analysenmühle A11 basic (IKA)
Single channel Pipette	10-100 µL	Research plus, 10-100 µL (Eppendorf)
	100-1000 µL	Research plus, 100-1000 µL (Eppendorf)
	1000-10000 µL	Research plus, 1000-10000 µL (Eppendorf)
8-Kanalpipette, manuell		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)

Ständer für Zentrifugenröhrchen	für 50 mL, 15 mL und 2 mL Röhrchen	
PC-Bildschirm		
Cuttermesser		
Tischmüllständer		
Wannen für Mehrkanal	1er Kammer	
	8 bzw 12 er Kammer	
Messzylinder	150 mL, 500 mL	
Laborflasche	250 mL, 500 mL	
<b>Verbrauchsmaterial</b>		
Pipettenspitzen für die jeweiligen Pipetten		
Zentrifugenröhrchen	2 mL	
	15 mL	
	50 mL	
96-Well-Platte, flachboden		
Tischmülltüten		

## 11.2 Glossar

Begriff	Erläuterung
\$FIL	FCS-Key, gibt den Dateinamen (Fortlaufende Run-Nummer und Datum der Messung) wieder.
\$WELLID	FCS-Key, gibt die alphanumerische Bezeichnung eines Mikrotiterplatten-Wells wieder.
.csv-Datei	Von der <i>FCS Express</i> Software exportierte Datei, die in SAFIA Score importiert werden kann. Es handelt sich um eine Datei im ASCII Format. CSV steht für <i>Comma-separated values</i> (Durch Komma getrennte Werte)
.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. Sie ist standardisiert und kann z. B. in FCS Express geladen werden um sie in eine .csv -Datei zu konvertieren.
.sdf-Datei	<i>SAFIA Data File</i> . 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.
Analysis-ID	Eine durch den Anwendenden zu vergebende eindeutige Analysennummer. Sie sollte für jede gemessene Mikrotiterplatte einmal vergeben 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.
Batch	Ein Batch bezeichnet die gesammelten Messungen einer Platte eines Messdurchlaufes. Jede Messung gehört zu einem Batch.
Clean-Programm	Reinigungszyklus des Cube 6
Configuration file	Eine Datei die bestimmte Einstellungen für das Auslesen des Assays mit dem Cyflow® Cube 6 Durchflusszytometer beinhaltet.
Dilution (Factor)	Verdünnungsfaktor einer Probe. Der Standardverdünnungsfaktor im SAFIA Mykotoxin (Getreide) Kit beträgt 16.
FCS Express Layout	Vorlage zur Konvertierung von .fcs Dateien in .csv-Dateien mittels FCS Express.

FL-1	Fluoreszenzdetektor 1 Detektionskanal für Fluoreszenz der sekundären Antikörper im SAFIA
FL-3	Fluoreszenzdetektor 3 Detektionskanal für Fluoreszenz der Partikelcodierung im SAFIA
FSC	<i>Forward Scatter</i> . 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.
FSC-Key	Ein Schlagwort, das dem Textteil einer .fcs-Datei entnommen werden kann und bspw. Informationen zu einer Messung enthält.
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 kodierte 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.
<i>R Square</i>	Bestimmtheitsmaß
Recovery rate	Wiederfindungsrate. Prozentuales Verhältnis vom Soll-Wert einer Referenzprobe zum ermittelten Ist-Wert.
<i>Relative Dynamic range</i>	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 Kalibrationskurve Ein Relative Dynamic Range von 0,80 entspricht einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 5.
Replicates	Wiederholungsmessung
Sample ID	Eineindeutige Probenbezeichnung

Sheath Fluid	Flüssigkeit, die zum Betrieb eines Durchflusszytometers (hydrodynamischen Fokussierung) verwendet wird.
SSC	<i>Side Scatter</i> . 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.

## SAFIA Technologies

SAFIA Technologies ist ein Spin-off der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Das Gründungsprojekt spezialisiert sich auf die Entwicklung von antikörperbasierten Analysekits (Immunoassays) auf Grundlage der SAFIA-Technologie. Als Plattformtechnologie eignet sich die SAFIA-Technologie für den Einsatz in verschiedenen Anwendungsbereichen wie der Lebensmittel-, Futtermittel- und der Umweltanalytik.

## Kontakt

### SAFIA Technologies Support

**T:** +49 (0) 1556 3234634

**M:** [support@safia.tech](mailto:support@safia.tech)

### Sysmex Support

**T:** +49 (0) 2534 8008 111

**M:** [support@sysmex-partec.com](mailto:support@sysmex-partec.com)