

**VIROTECH Validierung/Validation ELISA
(Validierung/Validation ELISA)**

Réf.: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Réf.: EN250K60

Code couleur : noir

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tél. : +49-6142-6909-0
Télécopie : +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu.....	3
3.1 Kit de validation.....	3
3.2 Kit de contrôle de pipetage.....	3
4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi	3
5. Mesures de précaution	4
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	4
7. Réalisation du test	4
7.1 Préparation des réactifs	4
7.2 Réalisation du test ELISA VIROTECH	4
8. Interprétation du test	5
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	5
8.2 Calcul des coefficients de variation	5
8.3 Interprétation des résultats.....	5
8.4 Exemples.....	5
9. Application élargie	6
10. Schéma du déroulement du test	7
11. Annexe	8
11.1 Exemple 1 (contrôle de validation)	8
11.2 Exemple 2 (contrôle de validation)	9

1. Usage prévu

Le kit de validation ELISA est destiné au contrôle régulier de votre dispositif de traitement entièrement automatisé ou semi-automatisé des tests ELISA. Sa fonction est de mettre en évidence l'effet cumulé des imprécisions survenant lors du dépôt, du lavage, de l'incubation et de la mesure sur le photomètre, et donc de garantir un traitement optimal du test ELISA. Pour le contrôle des dispositifs de traitement automatisés ou semi-automatisés, toujours utiliser des microplaques entières. Les dispositifs traitant habituellement plus d'une plaque doivent toujours être contrôlés en état complètement chargé : il faudra traiter deux plaques à la fois dans un appareil à deux plaques, trois plaques à la fois dans un appareil à trois plaques, etc. L'annexe 1, 3.1 de la directive 98/79 CE exige que la combinaison de dispositifs médicaux (dans ce cas, le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA et le test ELISA) utilisés ensemble soit sûre et ne porte pas atteinte aux performances prévues des dispositifs. Le kit de validation offre cette possibilité à l'utilisateur.

Le contrôle de pipetage sert au contrôle des traitements automatisés ELISA avec des répartiteurs d'échantillons. Comme pour un sérum de patient, il est dilué à 1 + 100 par le traitement automatisé avec un tampon de dilution bleu, puis est pipeté et testé. Le contrôle de pipetage peut être utilisé à la place du contrôle de validation prêt à l'emploi dans le kit de validation (EC 250.00). Respectez la notice d'utilisation du kit de validation.

2. Principe du test

Les anticorps présents dans le contrôle de validation ou de pipetage forment un immunocomplexe avec l'antigène coâté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt. Le sérum de contrôle fourni est déposé dans chacun des puits de la microplaque.

3. Contenu

3.1 Kit de validation

1. **Une microplaque**, composée de 96 puits à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Contrôle de validation contenant des IgG, 15 ml**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
4. **Conjugué IgG (anti-humain), 2 x 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
5. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3,3',5,5'), 2 x 11 ml**, prêt à l'emploi
6. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide

3.2 Kit de contrôle de pipetage

7. **1 contrôle de pipetage, 2,8 ml**, sérum humain avec stabilisants de protéines et conservateur
8. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 2x50ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois

Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution

1. Le sérum de contrôle utilisé a réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Chiffons en cellulose
3. Poubelle pour les déchets infectieux
4. Dispositif de pipetage pour test ELISA
5. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
6. Incubateur

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est une condition essentielle à l'obtention de résultats corrects.

7.1 Préparation des réactifs

Les contrôles de validation prêts à l'emploi doivent exclusivement être utilisés avec le lot de plaque indiqué dans le certificat de contrôle-qualité.

1. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les barrettes.
2. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
3. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).

7.2 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, pipeter **100 µl** de contrôle de validation **prêt à l'emploi** dans chacune des cavités.
Si la procédure de pipetage et la procédure de dilution de l'automate doivent être en plus vérifiées, un contrôle du pipetage (sérum de patient dilué à 1+100) doit être utilisé au lieu du contrôle de validation prêt à l'emploi.
2. Après la distribution, incuber la plaque à **37 °C** pendant **30 minutes**.
3. Mettre fin à la période d'incubation par **quatre lavages** effectués chacun à l'aide de **350 à 400 µl de solution de lavage** pour chaque puits.
4. Déposer **100 µl de conjugué prêt à l'emploi** dans tous les puits.
5. Incubation du conjugué : **30 minutes à 37 °C**.
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant par **quatre lavages** (voir le point 3).
7. Déposer **100 µl de substrat TMB en solution** dans chacun des puits.
8. Incubation du substrat en solution : **30 minutes à 37 °C** (incubation **dans l'obscurité**).
9. Arrêt de la réaction : déposer **50 µl de solution d'arrêt** dans chacun des puits.

10. Mesurer les extinctions à **450/620 nm** (longueur d'onde de référence 620-690nm). La mesure photométrique doit être réalisée **en l'espace d'une heure** à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir page 6
--

Les extinctions doivent être presque similaires et se trouver dans la plage indiquée dans le certificat.

8. Interprétation du test

Le contrôle de validation prêt à l'emploi est destiné à l'évaluation de l'opération de dépôt ainsi que de toutes les autres étapes de travail ayant lieu sur les dispositifs automatisés. Sont par exemples contrôlés : température d'incubation, durée d'incubation, mesure, lavage, etc. Cette méthode est conçue pour et se prête à la mise en évidence des irrégularités survenant au cours le traitement d'un test ELISA.

Le contrôle de pipetage sert au contrôle des traitements automatisés ELISA avec répartiteur d'échantillons.

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

Valeurs de DO

Les valeurs de DO du contrôle de validation / de pipetage doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

Si cette exigence n'est pas remplie, répéter le test.

8.2 Calcul des coefficients de variation

a) Le coefficient de variation est calculé à partir de **toutes les (96) valeurs de DO**. Pour l'obtenir, on divise l'écart type par la moyenne arithmétique, puis on multiplie le résultat par 100.

b) On détermine ensuite le nombre de puits dont les valeurs de DO sont supérieures à 20 % ou sont inférieures à la moyenne arithmétique (analyse des valeurs aberrantes).

c) Pour faciliter l'interprétation du test, un logiciel d'évaluation est proposé pour le kit de validation / de contrôle de pipetage (référence S/250).

8.3 Interprétation des résultats

1. Si le coefficient de variation calculé est inférieur à la valeur indiquée dans le certificat et si au maximum trois valeurs aberrantes ont été trouvées au contrôle de validation et au maximum cinq valeurs aberrantes au contrôle de pipetage, cela signifie que l'appareil fonctionne correctement.
2. Si le coefficient de variation est supérieur à celui indiqué dans le certificat de contrôle-qualité, répéter les test. Si le résultat se confirme, il faut partir du principe qu'au moins une étape de travail s'est déroulée de façon irrégulière. Il faut alors contrôler toutes les étapes de travail ou bien contacter la société chargée de la maintenance et de l'entretien.
3. Si le coefficient de variation calculé est inférieur à la plage indiquée dans le certificat, mais si plus de trois valeurs aberrantes (contrôle de validation) ou plus de cinq valeurs aberrantes (contrôle de pipetage) ont été trouvées, cela signifie également que l'appareil est imprécis. Si vous effectuez un autre test pour confirmer le résultat et constatez que les valeurs aberrantes apparaissent de nouveau au même endroit, cela signifie qu'il y a une erreur systématique (p.ex., position inexacte de l'aiguille de pipetage ; le dispositif de lavage ne fonctionne pas correctement ; erreur de programmation).
4. Les dispositifs traitant habituellement plus d'une plaque doivent toujours être contrôlés en état complètement chargé : il faudra traiter deux plaques à la fois dans un appareil à deux plaques, trois plaques à la fois dans un appareil à trois plaques, etc.

8.4 Exemples

Dans le but d'offrir une meilleure illustration de l'évaluation, nous en avons présenté deux exemples en annexe.

9. Application élargie

Le kit de validation peut également être utilisé pour vérifier les dispositifs de traitement automatisé et semi-automatisé ELISA avec incubation à la température ambiante.

Pour la réalisation de ce test de vérification (7.2), seuls la température d'incubation et le temps d'incubation doivent être modifiés :

Incubation du contrôle de validation : 40 minutes à la température ambiante

Incubation du conjugué : 40 minutes à la température ambiante

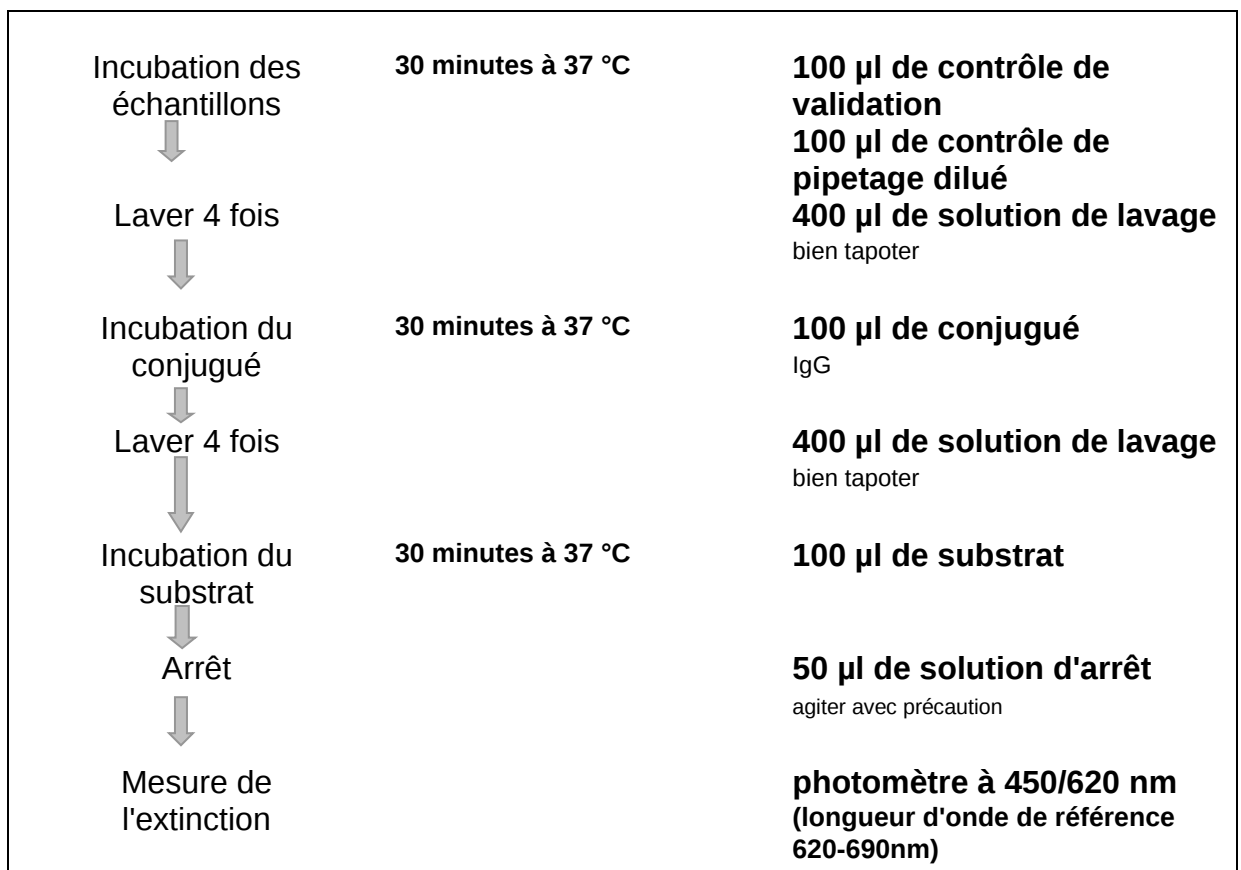
Incubation du substrat TMB : 40 minutes à la température ambiante

Dans l'application élargie également, on peut utiliser pour l'interprétation le logiciel d'évaluation du kit de validation ou du contrôle de pipetage. Il faut pour cela que les critères du certificat de contrôle-qualité soient remplis comme pour la réalisation du test comme indiqué au point 7.2.

Préparation de la solution de lavage / du contrôle de pipetage

- ▼ **Solution de lavage** : ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.
- ▼ **Contrôle de pipetage** : 10 µl de contrôle de pipetage + 1000 µl de tampon de dilution (1:101)

Réalisation du test



11. Annexe

11.1 Exemple 1 (contrôle de validation)

Il s'agit dans ce cas d'un traitement sans erreur avec le contrôle de validation. Le coefficient de variation est inférieur à 10 % et aucune valeur de DO n'est supérieure à 20 % ou inférieure à la moyenne arithmétique calculée.

SW Validierungskit

Interpretation Software for the Validationkit (E C250.00)

Ch-B.: 102-01 Processor: DSX

OD-values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,434	0,535	0,523	0,516	0,502	0,495	0,491	0,474	0,485	0,467	0,452	0,480	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,514	0,505	0,493	0,487	0,495	0,467	0,454	0,485	B
C	0,566	0,549	0,528	0,527	0,523	0,510	0,503	0,485	0,480	0,475	0,453	0,478	C
D	0,548	0,567	0,565	0,535	0,531	0,525	0,502	0,492	0,483	0,487	0,463	0,494	D
E	0,523	0,571	0,560	0,549	0,565	0,535	0,519	0,519	0,491	0,482	0,488	0,508	E
F	0,434	0,480	0,504	0,562	0,543	0,545	0,518	0,507	0,495	0,488	0,495	0,521	F
G	0,523	0,480	0,495	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,495	0,524	G
H	0,544	0,480	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,495	0,498	0,505	H

n = 96 $\bar{x}$ = 0,51 min 0,43
 s = 0,03 max 0,57

CV = 6,2 %

Hot Spot Analysis (relative deviation to the average value >20 resp. <-20) in %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-14,8	5,0	2,6	1,3	-1,5	-2,9	-3,6	-7,0	-8,2	-8,4	-11,3	-5,8	A
B	10,3	6,6	3,0	1,5	0,9	-0,9	-3,3	-4,4	-8,5	-8,4	-10,9	-4,8	B
C	9,1	7,7	3,6	3,4	2,6	0,1	-1,3	-4,8	-5,8	-6,8	-11,1	-6,2	C
D	7,5	9,3	8,9	5,2	4,2	3,0	-1,5	-3,4	-5,2	-4,4	-9,1	-3,1	D
E	2,5	12,1	7,9	7,7	8,9	5,0	1,9	1,9	-3,6	-5,4	-4,2	-0,3	E
F	-14,8	-5,8	-1,1	8,3	6,6	7,2	1,7	-0,5	-2,9	-4,2	-4,6	2,2	F
G	2,5	-5,8	-2,9	6,6	7,3	6,2	4,4	0,5	2,4	-1,3	-4,6	2,8	G
H	6,8	-5,8	-0,3	7,5	7,7	7,0	9,5	6,4	3,6	-4,6	-10,1	-0,9	H

Hot Spots n = 0

Interpretation

▼ Release Criteria CV < 10%: passed

▼ Release Criteria Hot Spots < 4: passed

If both interpretation criteria are fulfilled, the processor is working reliably.
 If one or even both interpretation criteria are not fulfilled, the processor should be checked thoroughly and the test should be repeated.

11.2 Exemple 2 (contrôle de validation)

Il y a ici une erreur dans le traitement avec le contrôle de validation (CV >10% et 4 valeurs aberrantes). Comme l'analyse le montre clairement, ces valeurs aberrantes sont situées dans l'angle inférieur gauche de la microplaque.

SW Validierungskit
Interpretation Software for the Validationkit (E C250.00)

Ch-B.: 102-01 Processor: DSX

OD-values

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,434	0,535	0,523	0,516	0,502	0,495	0,491	0,474	0,468	0,467	0,452	0,480	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,514	0,505	0,493	0,487	0,486	0,467	0,454	0,485	B
C	0,596	0,549	0,528	0,527	0,523	0,510	0,503	0,485	0,480	0,475	0,453	0,478	C
D	0,548	0,567	0,565	0,536	0,531	0,525	0,502	0,492	0,483	0,487	0,463	0,494	D
E	0,523	0,571	0,560	0,549	0,555	0,535	0,519	0,519	0,491	0,482	0,488	0,508	E
F	0,279	0,480	0,504	0,562	0,543	0,546	0,518	0,507	0,495	0,488	0,495	0,521	F
G	0,229	0,403	0,486	0,543	0,541	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,495	0,524	G
H	0,251	0,378	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,485	0,488	0,505	H

$n = 96$ $\bar{x} = 0,50$ min 0,23
 $s = 0,06$ max 0,57

CV = 11,3 %

Hot Spot Analysis (relative deviation to the average value >20 resp. <-20) in %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-13,2	7,0	+6	3,2	0,4	-1,0	-1,8	-6,2	-6,4	-6,6	-9,6	-4,0	A
B	12,4	8,6	5,0	3,4	2,8	1,0	-1,4	-2,6	-6,8	-6,6	-9,2	-3,0	B
C	11,2	9,8	5,6	5,4	+6	2,0	0,6	-3,0	-4,0	-5,0	-9,4	-4,4	C
D	9,6	11,4	11,0	7,2	6,2	5,0	0,4	-1,6	-3,4	-2,6	-7,4	-1,2	D
E	+6	14,2	10,0	9,8	11,0	7,0	3,8	3,8	-1,8	-3,6	-2,4	1,6	E
F	-44,2	-4,0	0,8	10,4	8,6	9,2	3,6	1,4	-1,0	-2,4	-2,8	+2	F
G	-64,2	-19,4	-1,0	8,6	9,4	8,2	6,4	2,4	+4,4	0,6	-2,8	+8	G
H	-48,8	-24,4	1,6	9,6	9,8	9,0	11,6	8,4	5,6	-2,8	-8,4	1,0	H

Hot Spots n = 4

Interpretation

Release Criteria CV < 10%: not passed

Release Criteria Hot Spots < 4: not passed

If both interpretation criteria are fulfilled, the processor is working reliably.
 If one or even both interpretation criteria are not fulfilled, the processor should be checked thoroughly and the test should be repeated.