

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

Nr zamówienia: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Nr zamówienia: EN250K60

Kod barwny: czarny

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

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

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw do walidacji.....	3
3.2 Komplet kontrolny pipetowania.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności.....	4
6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezałączone w zestawie).....	4
7. Przeprowadzenie badania	4
7.1 Przygotowanie odczynników	4
7.2 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA.....	4
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania.....	5
8.2 Obliczenie współczynnika zmienności.....	5
8.3 Interpretacja wyników.....	5
8.4 Przykłady	5
9. Rozszerzone zastosowanie.....	5
10. Schemat przebiegu badania	7
11. Aneks	8
11.1 Przykład 1 (kontrola walidacji).....	8
11.2 Przykład 2 (kontrola walidacji).....	8

1. Cel zastosowania

Niniejszy **zestaw do walidacji** - test ELISA - służy do regularnego sprawdzania Państwa półautomatu lub automatu pełnego ELISA. Ma on na celu wskazanie skumulowanego efektu niedokładności podczas pipetowania, płukania, inkubowania i mierzenia fotometrem oraz tym samym ma gwarantować bezpieczeństwo bezbłędnego przetworzenia wyników testów ELISA. Do sprawdzania półautomatów lub automatów pełnych należy zawsze używać całych mikropłytek. Automaty, które rutynowo przetwarzają więcej niż jedną płytkę, muszą być zawsze oceniane przy pełnym obciążeniu, tzn. w przypadku urządzenia 2-płytkowego należy w jednym przebiegu przetwarzać 2 płytki, a w przypadku urządzenia 3-płytkowego 3 płytki.

Dyrektywa 98/79 WE Aneks 1, 3.1 wymaga zabezpieczenia działania kombinacji dwóch niezależnych produktów medycznych (w tym przypadku Procesor ELISA oraz ELISA). Zestaw do walidacji jest przystosowany do umożliwienia tego użytkownikowi.

Komplet kontrolny pipetowania służy do sprawdzania pełnych automatów ELISA z rozdzielaczem próbek. Próbką zostaje rozcieńczona - tak jak surowica pacjenta - 1 + 100 przez automat przy pomocy niebieskiego buforu do rozcieńczania, jest pipetowana i testowana. Kontrolę pipetowania można stosować w miejsce gotowej do użycia kontroli walidacji przy pomocy zestawu do walidacji (EC 250.00). Proszę w tym przypadku zwrócić uwagę na instrukcję roboczą dołączoną do zestawu do walidacji.

2. Zasada badania

Znajdujące się w kontroli walidacyjnej lub w kontroli pipetowania przeciwciała tworzą razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydazy) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto. Do wszystkich dołków mikropłytki dodawana jest za pomocą pipety załączona surowica kontrolna.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw do walidacji

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowana
2. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **IgG kontrola walidacyjna, 15 ml**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
4. **koniugat IgG (anty-human), 2 x 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzastkowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
5. **tetrametylobenzidyna - roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 2 x 11ml**, gotowy do użycia
6. **roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszaną kwasów

3.2 Komplet kontrolny pipetowania

1. **1 kontrola pipetowania, 2,8 ml**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środek konserwujący
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia), 2x50ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do zabarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Kontrola	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytkę mikrotitracyjną	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzidyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące

Roztwór zatrzymujący reakcję	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności

1. Jako surowica kontrolna stosowana jest tylko taka surowica, która była przebadana i uzyskała wynik negatywny na przeciwciała przeciw HIV1, HIV2, HCV i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Kontrole, koniugat i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, jak również roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. chusty z masy celulozowej
3. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
4. Automat do pipetowania ELISA
5. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
6. inkubator

7. Przeprowadzenie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Przygotowanie odczynników

Gotową do użycia kontrolę walidacyjną należy stosować wyłącznie z szarżą płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
2. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
3. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).

7.2 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100µl gotowej do użycia kontroli walidacyjnej do wszystkich dołków. Jeśli dodatkowo ma być sprawdzona procedura pipetowania pełnego automatu, zamiast gotowej do użycia kontroli walidacyjnej należy zastosować kontrolę pipetowania, rozcieńczoną jak surowica pacjenta 1 + 100.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez **30 minut** w temperaturze **37°C**.
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez **4-krotne płukanie**, każdorazowo po **350-400 µl roztworu do płukania** na dołek.
4. Dodać pipetami **100µl gotowego do użycia koniugatu** do wszystkich dołków.
5. Inkubacja koniugatu: **30 minut** w temperaturze **37°C**.
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez **4-krotne płukanie** (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami **100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB** do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: **30 minut** w temperaturze **37°C** (inkubacja **w ciemności**).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po **50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu**.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy **450/620nm** (referencyjna długość fali 620-690nm). Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony **w ciągu godziny** po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Ekstynkcje powinny być w przybliżeniu takie same i znajdować się w zakresie podanym w certyfikacie.

8. Ocena wyników badania

Gotowa do użycia kontrola walidacyjna służy do oceny procesu pipetowania oraz wszystkich innych etapów roboczych, takich jak temperatura inkubacji, czas inkubacji, pomiar, proces płukania etc. w automacie. Metoda ta nadaje się do wykrycia nieprawidłowości w przetwarzaniu testu ELISA.

Kontrola pipetowania służy do sprawdzania pełnych automatów ELISA zawierających rozdzielacz próbek.

8.1 Kontrola badania

Wartości OD (gęstości optycznej)

Wartości OD kontroli walidacyjnej /lub kontroli pipetowania/ powinny znajdować się powyżej wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymaganie to nie jest spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie współczynnika zmienności

a) ze **wszystkich 96 wartości OD** obliczany jest współczynnik zmienności. Wynika on ze współczynnika odchylenia standardowego oraz arytmetycznej wartości średniej pomnożonej przez 100.

b) Ustalana jest ilość dołków z takimi wartościami OD, które są o więcej niż 20% powyżej lub poniżej arytmetycznej wartości średniej (analiza Hot Spot).

c) W celu ułatwienia oceny oferowane jest oprogramowanie do oceny do zestawu do walidacji / do kontroli pipetowania (nr zamówienia S/250).

8.3 Interpretacja wyników

1. Jeżeli obliczony współczynnik zmienności znajduje się poniżej wartości podanej w certyfikacie i jeżeli podczas kontroli walidacji były znalezione najwyżej trzy tzw. hot spots lub podczas kontroli pipetowania najwyżej pięć tzw. hot spots, to urządzenie działa prawidłowo.
2. Jeżeli obliczony współczynnik zmienności jest większy niż ten podany w certyfikacie kontroli jakości, należy powtórzyć test. Przy potwierdzaniu wyniku należy wyjść z założenia, że przynajmniej jeden z etapów roboczych przebiegał nierównomiernie. Wszystkie poszczególne etapy robocze powinny być sprawdzone lub należy skontaktować się z firmą konserwatorską.
3. Jeżeli obliczony współczynnik zmienności znajduje się poniżej wartości podanej w certyfikacie, ale były znalezione powyżej trzy tzw. hot spots (kontrola walidacji) lub pięć tzw. hot spots (kontrola pipetowania), to wskazuje to również na niedokładność urządzenia. Jeżeli do potwierdzenia będzie przeprowadzony kolejny test i będzie stwierdzone, że tzw. hot spots ponownie występują w tym samym miejscu, to występuje błąd systematyczny (np. pozycja igły pipetującej jest niedokładna, urządzenie płuczące nie pracuje prawidłowo lub istnieje błąd programowania).
4. Automaty, które rutynowo przetwarzają więcej niż jedną płytkę muszą być zawsze oceniane przy pełnym obciążeniu, tzn. w przypadku urządzenia 2-płytkowego należy w jednym przebiegu przetwarzać 2 płytki, a w przypadku urządzenia 3-płytkowego 3 płytki.

8.4 Przykłady

W celu lepszego wyjaśnienia oceny w aneksie przedstawiono dwa przykłady.

9. Rozszerzone zastosowanie

Zestaw do walidacji można również stosować do sprawdzania półautomatów i automatów pełnych do testów ELISA z inkubacją w temperaturze pokojowej.

Przeprowadzenie testu (7.2) należy przy tym zmodyfikować tylko odnośnie temperatury inkubacji i czasów inkubacji.

Inkubacja kontroli walidacji: 40 minut w temperaturze pokojowej

Inkubacja koniugatu: 40 minut w temperaturze pokojowej

Inkubacja TMB:

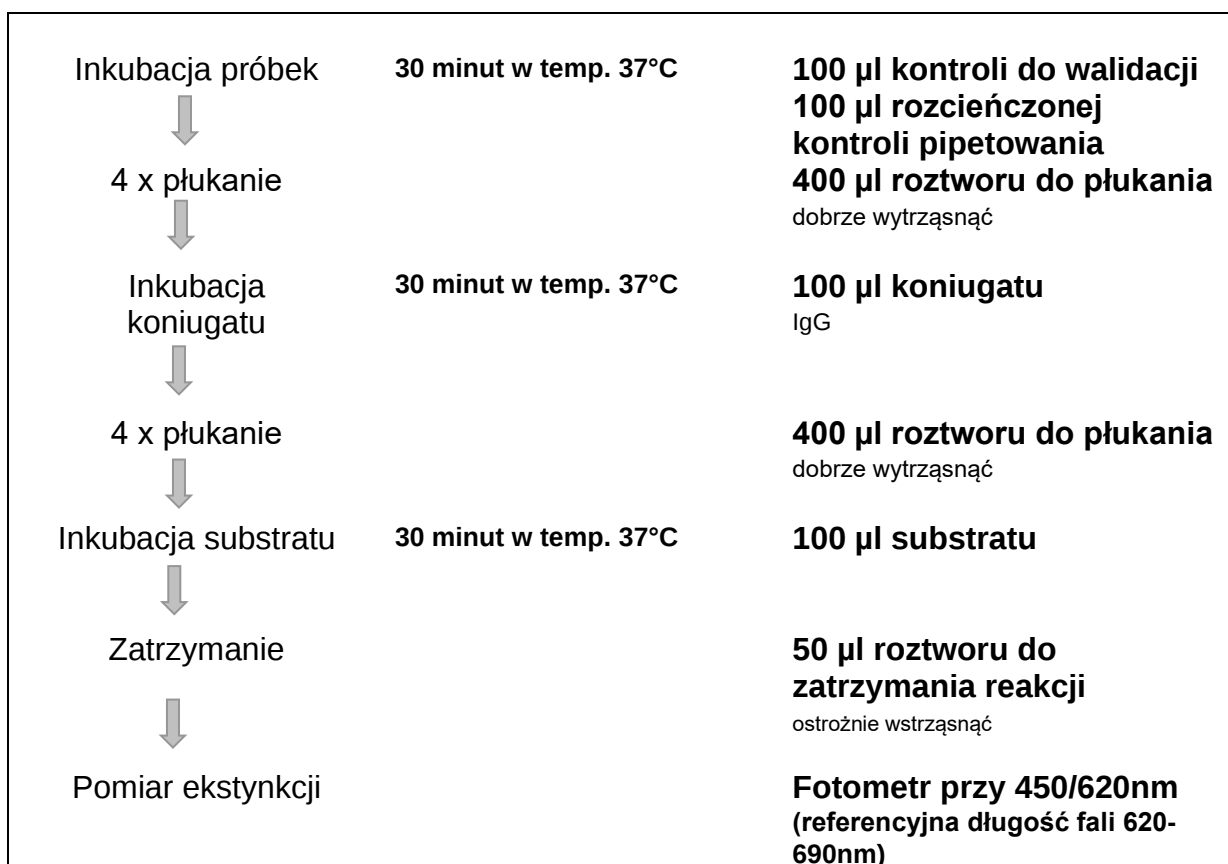
40 minut w temperaturze pokojowej

Ocena może być także w rozszerzonym zastosowaniu wykonana za pomocą oprogramowania do oceny zestawu do walidacji lub kontroli pipetowania. Muszą być przy tym spełnione kryteria certyfikatu kontroli jakości, dokładnie jak w przypadku przetwarzania zgodnie z punktem 7.2.

Przygotowanie roztworu do płukania / kontroli pipetowania

- ▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.
- ▼ **Kontrola pipetowania:** 10µl kontroli pipetowania + 1000µl buforu do rozcieńczania (1:101)

Przeprowadzenie badania



11. Aneks

11.1 Przykład 1 (kontrola walidacji)

W tym przypadku występuje bezbłędne przetworzenie z kontrolą walidacji. Współczynnik zmienności jest mniejszy o 10% i nie występują wartości gęstości optycznej OD >20% powyżej lub poniżej obliczonej arytmetycznej wartości średniej.

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	0,43+	0,535	0,523	0,516	0,502	0,495	0,491	0,47+	0,465	0,467	0,452	0,430	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,51+	0,505	0,493	0,487	0,495	0,467	0,45+	0,435	B
C	0,565	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	0,49+	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	0,43+	0,480	0,50+	0,552	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	0,52+	G
H	0,54+	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	2,5	1,3	-1,5	-2,9	-3,6	-7,0	-8,2	-8,4	-11,3	-5,8	A
B	10,3	6,5	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	2,5	0,1	-1,3	-4,8	-5,8	-6,8	-11,1	-6,2	C
D	7,5	9,3	8,9	5,2	+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	-3,5	-5,4	-4,2	-0,3	E
F	-14,8	-5,8	-1,1	8,3	6,5	7,2	1,7	-0,5	-2,9	-4,2	-4,5	2,2	F
G	2,5	-5,8	-2,9	6,5	7,3	6,2	+4	0,5	2,4	-1,3	-4,5	2,8	G
H	6,8	-5,8	-0,3	7,5	7,7	7,0	9,5	6,4	3,5	-4,5	-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 Przykład 2 (kontrola walidacji)

W tym przypadku występuje błędne przetworzenie z kontrolą walidacji (współczynnik zmienności >10% oraz 4 wartości nietypowe). Jak widoczne jest w analizie, te wartości nietypowe znajdują się w lewym dolnym rogu mikro płytki.

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	0,482	0,483	0,487	0,463	0,494	D
E	0,523	0,571	0,560	0,549	0,566	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	0,545	0,518	0,507	0,495	0,488	0,495	0,521	F
G	0,229	0,400	0,486	0,543	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,496	0,524	0,524	G
H	0,251	0,378	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,495	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	-54,2	-19,4	-1,0	8,6	9,4	8,2	6,4	2,4	+4,4	0,6	-2,8	+2	G
H	-48,2	-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.