

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

Objednací číslo: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Objednací číslo: EN250K60

barevné kódování: černý

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

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

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Validační souprava	3
3.2 Pipetovací kontrolní sada	3
4. Přechovávání a upotřebitelnost testovací soupravy a reagensů připravených k použití	3
5. Preventivní opatření.....	4
6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)	4
7. Provedení testu	4
7.1 Příprava reagensů.....	4
7.2 Provedení testu VIROTECH ELISA.....	4
8. Vyhodnocení testu	5
8.1 Kontrola funkce testu	5
8.2 Výpočet variačního koeficientu.....	5
8.3 Interpretace výsledků	5
8.4 Příklady.....	5
9. Další použití	5
10. Schéma provedení testu	6
11. Příloha.....	7
11.1 Příklad 1 (validační kontrola)	7
11.2 Příklad 2 (validační kontrola)	8

1. Účel použití

Tato validační souprava slouží k pravidelné kontrole Vašeho poloautomatu nebo automatu ELISA. Ukazuje kumulovaný efekt nepřesností při pipetování, promývání, inkubaci a měření fotometrem a poskytuje tak jistotu bezvadného zpracování testů ELISA. Pro kontrolu poloautomatu nebo automatu je třeba vždy použít celé mikrotitrační destičky. Automaty, které rutinně zpracovávají více než jednu destičku, musí být vždy evaluovány při plném zatížení, tzn. že u dvoudestičkového přístroje je třeba zpracovat 2 a u třidestičkového přístroje 3 destičky v průběhu jednoho testu.

Směrnice ES č. 98/79 ES příloha 1, 3.1 vyžaduje zajištění funkce kombinace dvou nezávislých medicínálních výrobků (v tomto případě procesoru ELISA a testu ELISA). Tato validační souprava je vhodná k tomu, aby to uživateli umožnila.

Pipetovací kontrolní test slouží k testování poloautomatů ELISA s třídícím vzorků. Automat zředí tento test jako sérum pro pacienty 1+ 100 modrým ředícím pufrům, a potom se pipetuje a testuje. Pipetovací kontrolní test může být použit místo validačního testu ready to use ve validační soupravě (EC 250.00). Zde prosím dbejte pracovního návodu k validační soupravě.

2. Princip testu

Protilátky, které se nacházejí v kontrolním validačním resp. pipetovacím roztoku vytvářejí s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nevázané imunoglobulíny jsou odstraněny promýváním. S tímto komplexem se spojuje enzymový konjugát. Nevázané imunoglobulíny se opět odstraní promýváním. Po přidání roztoku substrátu (TMB) vznikne díky aktivitě enzymu (peroxidázy) modré barvivo, které po přidání roztoku zastavujícího vývoj barvy změní barvu na žlutou. Připojené kontrolní sérum se pipetuje do všech kavit mikrotitrační destičky.

3. Obsah balení

3.1 Validační souprava

- 1 **mikrotitrační destička**, skládající se z 96 kavit, obsahujících vrstvu antigenu, lyofilizovaná
- 2 **PBS-promývací roztok (20x koncentrovaný, 50 ml)**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
- 3 **kontrolní validační roztok obsahující IgG, 15 ml**, lidské sérum se stabilizátory bílkovin a konzervačním prostředkem, připravené k použití
- 4 **konjugát proti lidským IgG, 2 x 11 ml**, (ovčí nebo ostrucha křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
- 5 **tetrametylbendizinový roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 2 x 11 ml**, připravený k použití
- 6 **citronanový roztok zastavující vývoj barvy, 6 ml**, obsahující směs kyselin

3.2 Pipetovací kontrolní sada

- 1 **1 pipetovací kontrolní test, 2,8 ml**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervačními přípravky
- 2 **ředicí pufr PBS (modrý, připravený k použití), 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20

4. Přechovávaní a upotřebitelnost testovací soupravy a reagentů připravených k použití

Testovací soupravu přechovávejte při 2 - 8 °C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je uvedena na jejich jednotlivých štítcích; upotřebitelnost soupravy (tzv. datum expirace) viz příslušný certifikát o kontrole kvality.

1. Konjugát připravený k použití a TMB-roztok substrátu jsou citlivé na světlo a musí být přechovávány ve tmě. Dojde-li přesto vlivem světla k zabarvení, je příslušný roztok třeba zlikvidovat.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetrametylbendizin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce

	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny
--	-----------------------------------	-------------	---------

5. Preventivní opatření

1. Jako kontrolní sérum je používáno pouze takové sérum, které bylo testováno a shledáno negativní na protilátky proti HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a na povrchový antigen hepatitidy typu B. Přesto by mělo být kontrolní sérum, konjugát a mikrotitrovací proužky pokládány za infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými odpovídajícím způsobem zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce v laboratoři.
2. Složky, které obsahují konzervační prostředky, jakož i citronanový zastavovací roztok vývoje barvy a roztok TMB působí dráždivě na pokožku, oči a sliznice. Při kontaminaci je třeba kontaminovaná místa těla ihned opláchnout pod tekoucí vodou a případně vyhledat lékařskou pomoc.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle směrnic specifických v dané zemi použití.

6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)

1. destilovaná / demineralizovaná voda
2. roušky z buničiny
3. nádoby na odpad obsahující infekční materiál
4. pipetující automat ELISA
5. spektrofotometr pro mikrotitrační destičky s filtrem pro vlnové délky 450 / 620 nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
6. skříňka ve výši hrudi

7. Provedení testu

Pro dosažení správných výsledků se musí přesně dodržovat pracovní předpis firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Příprava reagensů

Validační roztok připravený k použití je třeba používat výhradně s šarží desky, která je uvedena na certifikátu o kontrole kvality.

1. Všechny reagensie je třeba vytemperovat na teplotu místnosti, teprve poté otevřete obal s testovacími proužky.
2. Všechny kapalné složky před použitím dobře protřepejte.
3. Koncentrát pracího roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).

7.2 Provedení testu VIROTECH ELISA

1. Každou testovací dávku **100µl** kontroly validity **hotového vzorku** pipetujte do všech kavit. Má-li se dodatečně kontrolovat pipetování jakož i ředění v automatu, je třeba místo kontroly validity hotového vzorku použít kontrolu pipetování – např. zředěné sérum pacienta 1+100.
2. Po napipetování následuje inkubace po dobu **30 minut při 37 °C**.
3. Ukončení inkubační periody **4-násobným promýváním, vždy s 350 - 400 µl promývacího roztoku** na kavitu.
4. Napipetujte **100 µl konjugátu připraveného k použití** do všech kavit destičky.
5. Následuje inkubace s konjugátem po dobu **30 min. při 37 °C**.
6. Ukončení inkubace s konjugátem **4-násobným promýváním** (viz bod 3).
7. Napipetujte **100 µl TMB-roztoku substrátu** připraveného k použití do každé kavity
8. Následuje inkubace s roztokem substrátu: **30 min. při 37 °C** (inkubace **ve tmě**).
9. Zastavení reakce substrátu: do všech kavit napipetujte po **50 µl citronanového roztoku zastavujícího vývoj barvy**.
10. Změřte hodnoty extinkcí při vlnové délce **450 / 620 nm** (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometrické měření by mělo být provedeno **během jedné hodiny** od přidání roztoku zastavujícího vývoj barvy.

Schéma provedení testu viz strana 6

Hodnoty extinkcí by měly být přibližně stejné a měly by ležet v rozmezí uvedeném v certifikátu.

8. Vyhodnocení testu

Kontrolní validační roztok připravený k použití slouží ke zhodnocení pipetovacího pochodu, jakož i veškerých ostatních pracovních kroků jako je teplota inkubace, doba inkubace, měření, promývání atd. automatického zařízení (automatu). Tato metoda je vhodná k odhalení nepravidelností při zpracovávání testů ELISA.

Pipetovací kontrolní test slouží ke kontrole poloautomatů ELISA s třídíčem vzorků.

8.1 Kontrola funkce testu

Hodnoty OD

Hodnoty OD kontrolního validačního/pipetovacího roztoku by měly ležet nad hodnotami OD, uvedenými v certifikátu kontroly kvality.

Není-li tento požadavek splněn, musí být test zopakován.

8.2 Výpočet variačního koeficientu

a) Ze **všech 96 hodnot OD** se vypočítává variační koeficient. Tento koeficient vyplývá z kvocientů standardní odchylky a aritmetického průměru násobeného 100.

b) Nyní se zjistí počet kavit s hodnotami OD, které leží o více než 20 % výše nebo níže než jejich celkový aritmetický průměr (tzv. analýza Hot Spotů).

c) K usnadnění vyhodnocení je nabízen software sloužící k vyhodnocení výsledků validační soupravy / pipetovací kontrolní sady (objednací číslo S/250).

8.3 Interpretace výsledků

1. Pokud je zjištěný variační koeficient nižší než jaká hodnota je uvedena v certifikátu kontroly kvality, a pokud budou při validační kontrole nalezeny maximálně tři „Hot Spoty“, popř. při pipetovací kontrole maximálně pět „Hot Spotů“, pracuje přístroj správně.
2. Pokud je zjištěný variační koeficient vyšší než jaká hodnota je uvedena v certifikátu kontroly kvality, měl by být test zopakován. Při potvrzení tohoto výsledku je třeba vycházet z toho, že přinejmenším jeden z pracovních kroků proběhl nerovnoměrně. Měly by být prověřeny všechny jednotlivé pracovní kroky nebo vyzkoušena servisní firma.
3. Pokud je zjištěný variační koeficient nižší než jaký rozsah je uveden v certifikátu kontroly kvality, avšak jsou nalezeny více než tři „Hot Spoty“ (validační kontrola), resp. pět „Hot Spotů“ (pipetovací kontrola), ukazuje to na nepřesnost přístroje. Pokud k potvrzení provedete další test a zjistíte, že „Hot Spoty“ se vyskytují na stejném místě, jedná se o systémovou chybu (např. nepřesná poloha pipetovací jehly; přístroj na promývání nepracuje správně, nebo se jedná o chybu v naprogramování).
4. Automaty, které rutinně zpracovávají více než jednu destičku, musí být vždy evaluovány při plném zatížení, tzn. že u dvoudestičkového přístroje je třeba zpracovat 2 a u třídestičkového přístroje 3 destičky v průběhu jednoho testu.

8.4 Příklady

K lepšímu znázornění vyhodnocení jsou v příloze uvedeny dva příklady.

9. Další použití

Validační soupravu je možné rovněž použít ke kontrole poloautomatu nebo automatu ELISA s inkubací při pokojové teplotě. Provedení testu (7.2) se k tomuto účelu musí modifikovat co se týče inkubační teploty a inkubačních časů:

Inkubace validační kontroly : 40 minut při pokojové teplotě

Inkubace konjugátu : 40 minut při pokojové teplotě

Inkubace TMB: 40 minut při pokojové teplotě

Vyhodnocení výsledků je možné i u tohoto použití provést pomocí softwaru k vyhodnocení výsledků validační soupravy / pipetovací kontrolní sady. Kritéria certifikátu kontroly kvality musí být splněna přesně jako v případě postupu provedení testu v bodu 7.2.

Příprava promývacího roztoku / pipetovacího kontrolního roztoku

- ▼ **Promývací roztok:** koncentrát doplnit na 1 litr destil./demineralizovanou vodou
- ▼ **Pipetovací kontrolní roztok:** 10 µl pipetovací kontroly + 1 000 µl ředícího pufru (1:101)

Provedení testu

Inkubace vzorků ↓	30 minut při 37 °C	100 µl kontrolní validační roztok 100 µl naředěné pipetovací kontroly 400 µl promývacího roztoku dobře vyklepat
4 x promývání ↓		
inkubace s konjugátem ↓	30 minut při 37 °C	100 µl konjugátu IgG
4 x promývání ↓		400 µl promývacího roztoku dobře vyklepat
inkubace se substrátem ↓	30 minut při 37°C	100 µl substrát
zastavení vývoje barvy ↓		50 µl roztoku zastavujícího vývoj barvy opatrně protřepávat
měření extinkce ↓		fotometr při 450 / 620 nm (Délka referenční vlny 620-690nm)

11. Příloha

11.1 Příklad 1 (validační kontrola)

V tomto případě se jedná o bezchybné zpracování s validační kontrolou. Variační koeficient je menší než 10 % a nejsou zjištěny žádné hodnoty odlišující se o více než 20 % od vypočteného aritmetického průměru.

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	0,496	0,491	0,474	0,488	0,497	0,452	0,480	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,514	0,505	0,493	0,487	0,496	0,497	0,454	0,485	B
C	0,566	0,549	0,528	0,527	0,523	0,510	0,503	0,485	0,490	0,475	0,453	0,478	C
D	0,548	0,557	0,566	0,536	0,531	0,525	0,502	0,492	0,493	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	0,434	0,480	0,504	0,562	0,543	0,546	0,518	0,507	0,496	0,488	0,496	0,521	F
G	0,523	0,480	0,496	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,496	0,524	G
H	0,544	0,480	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,496	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	6,2	4,2	3,0	-1,5	-3,4	-5,2	-4,4	-9,1	-3,1	D
E	2,6	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	2,6	-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 Příklad 2 (validační kontrola)

Zde se jedná o chybu v provedení testu s validační kontrolou (VK >10 % a 4 extrémní hodnoty). U této analýzy lze zřetelně pozorovat, že tyto extrémní hodnoty leží v levém dolním rohu mikrotitrační destičky.

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	0,430	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,514	0,505	0,493	0,487	0,485	0,467	0,454	0,425	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	0,595	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	0,495	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	-5,2	-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	-48,8	-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.