

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

Nº de encomenda: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Nº de encomenda: EN250K60

Código de cor: preto

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Alemanha

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Índice

1. Utilização	3
2. Princípio do teste.....	3
3. Conteúdo da embalagem	3
3.1 Kit de validação	3
3.2 Kit de controlo de pipetagem.....	3
4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar.....	3
5. Medidas de precaução	4
6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)	4
7. Realização do teste.....	4
7.1 Preparação dos reagentes	4
7.2 Realização do teste ELISA VIROTECH	4
8. Avaliação do teste	5
8.1 Controlo de função do teste	5
8.2 Cálculo do coeficiente de variação	5
8.3 Interpretação dos resultados	5
8.4 Exemplos	5
9. Utilização ampliada.....	5
10. Esquema de realização do teste.....	7
11. Anexo	8
11.1 Exemplo 1 (controlo de validação)	8
11.2 Exemplo 2 (controlo de validação)	9

1. Utilização

Este ELISA kit de validação destina-se ao controlo regular do seu ELISA automático ou semi-automático. Ele deve demonstrar o efeito cumulado de imprecisões durante a pipetagem, lavagem, incubação e medição no fotómetro e promover, assim, a segurança de um processamento correcto do ELISA. Para o controlo do aparelho automático ou semi-automático devem ser usados sempre microplacas inteiras. As máquinas automáticas que processam rotineiramente mais que uma placa, devem ser avaliadas sempre com a carga total, isto é, num aparelho de duas placas devem ser processadas 2 placas, num aparelho de três placas devem ser processadas 3 placas no mesmo ciclo.

A Directiva 98/79 CE Anexo 1, 3.1 exige a garantia de função para a combinação entre dois produtos médicos independentes (neste caso o processador ELISA e o ELISA). Esta garantia é proporcionada ao utilizador pelo kit de avaliação.

O controlo de pipetagem serve para a verificação do ELISA automático com distribuidor de amostras. Ele é – tal como um soro para pacientes – diluído, pipetado e testado em 1 + 100 da máquina automática com solução de diluição. Pode-se utilizar o controlo de pipetagem em vez do controlo de validação ready to use do kit de validação (EC 250.00). Como tal, deve ler as instruções de utilização para o kit de validação.

2. Princípio do teste

Os anticorpos existentes no controlo de validação, nomeadamente no controlo de pipetagem formam juntamente com o antígeno fixado na microplaca um imunocomplexo. Os imunoglobulinas não ligados são removidos por processos de lavagem. O conjugado enzimático liga-se a este complexo. Os imunoglobulinas não ligados são novamente removidos por processos de lavagem. Após a adição do substrato (TMB) é criado pela actividade enzimática (peroxidase) um corante azul que após a adição da solução de stop muda para amarelo. O soro de controlo é pipetado para todos os poços da microplaca.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit de validação

1. **1 microplaca**, constituída por 96 poços revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Controlo de validação com IgG, 15ml**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
4. **Conjugado IgG (anti-humano), 2 x 11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com estabilizadores proteicos e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
5. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 2 x 11ml**, pronto a usar
6. **Solução stop citrato, 6ml**, contém uma mistura de ácidos

3.2 Kit de controlo de pipetagem

1. **1 controlo de pipetagem, 2,8 ml**, soro humano com estabilizadores de proteicos e conservantes
2. **PBS solução de diluição (azul, pronto a usar), 2x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20

4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar

Guardar o kit de teste a uma temperatura de 2 – 8 °C. O prazo de validade dos vários componentes é indicada na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. O conjugado pronto a usar e o substrato TMB são sensíveis à luz e devem ser guardados num lugar escuro. Se devido à incidência de luz se verificar uma coloração do substrato, este deve ser inutilizado.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Placa de microtitulação	Depois de abrir	+2 a +8° (armazenamento dentro do saco fornecido com saco contendo dissecante)	3 meses
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Tetrametilbenzidina (TMB)	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução stop	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses

	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +25°C	4 semanas
--	--------------------------------------	------------	-----------

5. Medidas de precaução

1. Como soro de controlo é usado apenas um soro que foi testado e que se revelou negativo em relação aos anticorpos de HIV1, HIV2, HIV3 e ao antigénio de superfície de hepatite B. Mesmo assim, o controlo, o conjugado e as microtiras devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Os componentes que contêm conservantes bem como a solução stop de citrato e a TMB têm um efeito irritante sobre a pele, os olhos e as mucosas. Em caso de contacto lavar as áreas afectadas do corpo imediatamente com água corrente e consultar, eventualmente, um médico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.

6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)

1. Água destilada/desmineralizada
2. Panos de celulose
3. Recipiente para os resíduos de material infeccioso
4. Dispositivo de pipetagem ELISA automático
5. Fotómetro espectral para microplacas com filtro de 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm)
6. Incubadora

7. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho da é uma condição essencial para a obtenção de resultados correctos.

7.1 Preparação dos r

7.2 Reagentes

O controlo de validação pronto a usar deve ser usado, exclusivamente, com o lote de placas indicado no certificado de controlo de qualidade.

1. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente, só então abrir a embalagem com as tiras de teste.
2. Agitar bem todos os componentes líquidos antes da sua utilização.
3. Misturar o concentrado de solução de lavagem com água dest./desmin. até se obter 1 litro de solução (se o concentrado formar cristais, aquecer à temperatura ambiente antes de diluir e agitar bem antes de utilizar).

7.3 Realização do teste ELISA VIROTECH

1. Por cada preparação de teste, pipetar **100µl** do controlo de validação **pronto a utilizar** em todas as cavidades. Quando se pretende verificar adicionalmente o processo de pipetagem, bem como o processo de diluição da máquina inteiramente automatizada, deve utilizar-se, em vez do controlo de validação pronto a ser utilizar, o controlo de pipetagem – diluído 1+100 como um soro de doente.
2. Depois da pipetagem realiza-se a incubação durante **30 min. a 37°C**.
3. Fim do período de incubação com **4 lavagens**, cada uma com **350-400µl de solução de lavagem** por poço.
4. Pipetar **100µl do conjugado pronto a usar** em todos os poços.
5. Incubação dos conjugados: **30 minutos a 37°C**
6. Fim da incubação do conjugado com **4 lavagens** (ver Ponto 3).
7. Pipetar **100µl do substrato TMB** pronto a usar em todos os poços.
8. Incubação do substrato. **30 min. a 37°C** (incubação às **escuras**)
9. Parar a reacção do substrato. Pipetar **50µl de solução stop de citrato** em todos os poços.
10. Medir as extinções com **450/620nm** (comprimento de onda de referência 620-690nm). A medição fotométrica deve ser realizada **no prazo de uma hora** após a adição da solução stop.

Esquema de realização do teste ver página 6

As extinções devem ser mais ou menos idênticas e situar-se na área indicada no certificado.

8. Avaliação do teste

O controlo de validação pronto a usar destina-se à avaliação do processo de pipetagem e de todos os outros passos de trabalho, tal como a temperatura de incubação, o tempo de incubação, a medição, o processo de lavagem etc. na máquina automática. O método é apropriado para descobrir irregularidades que se verificam durante o processamento de um ELISA. O controlo de pipetagem serve para a verificação do ELISA automático com distribuidor de amostras.

8.1 Controlo de função do teste

Valores de OD

Os valores de OD do controlo de validação/pipetagem devem situar-se acima dos valores de OD indicados no certificado de controlo.

Se este requisito não for preenchido, o teste deve ser repetido.

8.2 Cálculo do coeficiente de variação

a) O coeficiente de variação é calculado a partir de **todos os 96 valores de OD**. Ele resulta do quociente do desvio padrão e do valor aritmético médio multiplicado com 100.

b) Agora é determinado o número de poços com valores de OD que se situam mais que 20% acima ou abaixo do valor aritmético médio (análise hot spot).

c) Para facilitar a avaliação existe um software de avaliação para o kit de validação / controlo de pipetagem (n.º de ref. S/250).

8.3 Interpretação dos resultados

1. Se o coeficiente de variação calculado se situar abaixo do valor indicado no certificado e se forem encontrados no controlo de validação no máximo três hot spots ou no controlo de pipetagem no máximo cinco hot spots, o aparelho trabalha correctamente.
2. Se o coeficiente de variação determinado for maior que o indicado no certificado, o teste deve ser repetido. Se o resultado se confirmar, deve partir-se do pressuposto de que houve uma irregularidade em pelo menos um dos passos de trabalho. Todos os passos de trabalho devem ser verificados ou então deve ser contactada uma empresa de manutenção.
3. Se o coeficiente de variação calculado se situar abaixo da gama indicada no certificado e se forem encontrados mais de três hot spots (controlo de validação) ou cinco hot spots (controlo de pipetagem), é um indício de que o trabalho do aparelho é impreciso. Se for realizado um novo teste para confirmação e se se verificar que os hot spots aparecem novamente no mesmo local, há um erro sistemático (por exemplo, posição da agulha de pipetagem imprecisa, máquina de lavar não trabalha correctamente ou erro de programação).
4. As máquinas automáticas que processam rotineiramente mais que uma placa, devem ser avaliados sempre com a carga total, isto é, num aparelho de duas placas devem ser processadas 2 placas, num aparelho de três placas devem ser processadas 3 placas no mesmo ciclo.

8.4 Exemplos

Para uma melhor ilustração da avaliação apresentam-se dois exemplos no anexo.

9. Utilização ampliada

O kit de validação também pode ser usado para a verificação de ELISAs automáticos e semi-automáticos com incubação à temperatura ambiente.

A realização do teste (7.2) tem de ser modificada no referente à temperatura de incubação e aos tempos de incubação.

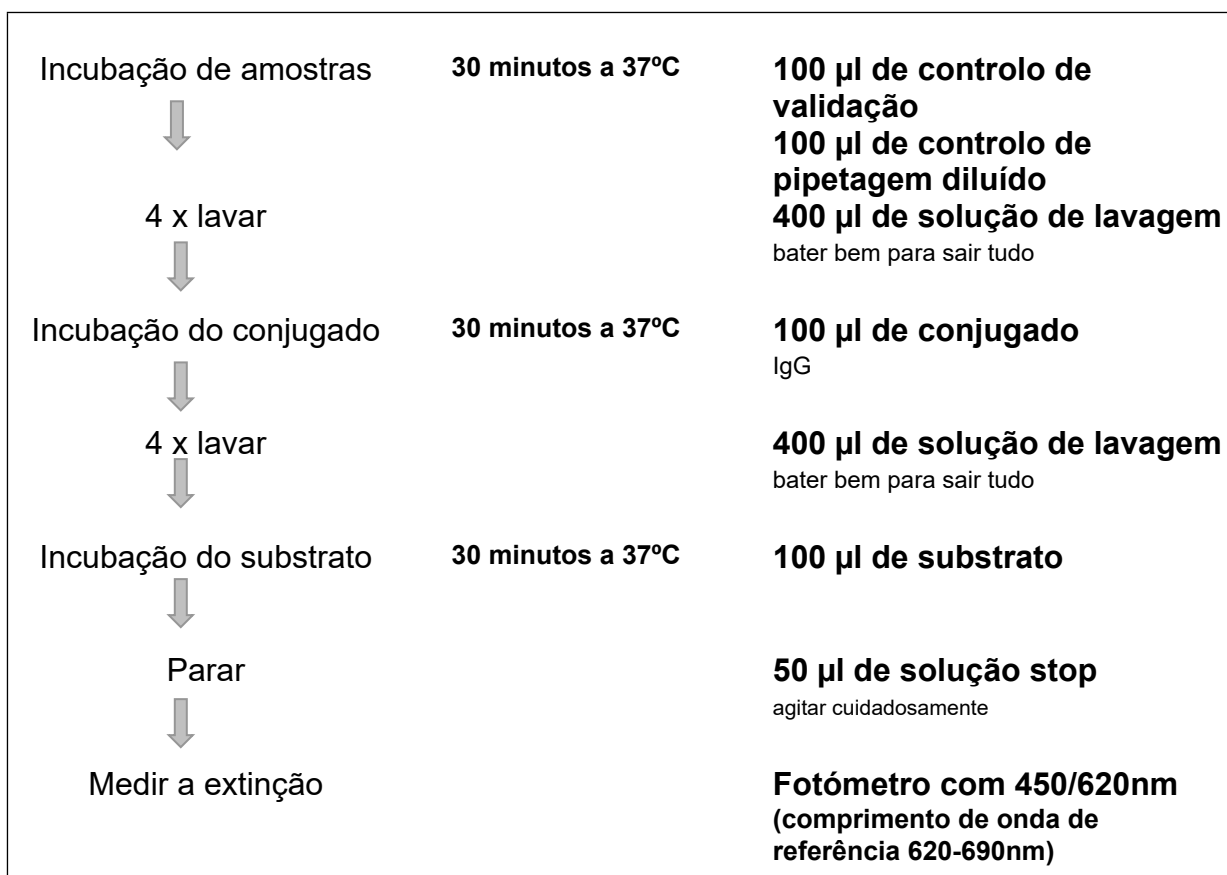
Incubação do controlo de validação:	40 minutos à temperatura ambiente
Incubação do conjugado:	40 minutos à temperatura ambiente
Incubação do TMB:	40 minutos à temperatura ambiente

Também na utilização ampliada, a avaliação pode ser feita através do software de avaliação do kit de validação ou do controlo de pipetagem. Tal como no processamento segundo 7.2, também aqui os critérios do certificado do controlo de qualidade têm de ser preenchidos.

Preparação da solução de lavagem / controlo de pipetagem

- ▼ **Solução de lavagem:** Juntar água destilada/desmineralizada ao concentrado, por forma a obter 1 litro.
- ▼ **Controlo de pipetagem:** 10µl de controlo de pipetagem + 1000µl de tampão de diluição (1:101)

Realização do teste



11. Anexo

11.1 Exemplo 1 (controle de validação)

Neste caso trata-se de um processamento sem erros com o controle de validação. O coeficiente de variação é inferior a 10%, e não há valores de OD >20% acima ou abaixo do valor aritmético médio calculado.

SW Validierungskit

Interpretation Software for the Validationkit (E C250.00)

Ch-B.: 102-01Processor: 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	0,483	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	0,434	0,480	0,504	0,562	0,543	0,546	0,518	0,507	0,496	0,488	0,486	0,521	F
G	0,523	0,480	0,496	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,486	0,524	G
H	0,544	0,480	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,486	0,498	0,505	H

n = 96

$\bar{x}$ = 0,51

s = 0,03

min 0,43

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 Exemplo 2 (controlo de validação)

Aqui há um processamento com erros com o controlo de validação (coeficiente de variação >10% e 4 valores anormais). Como se vê claramente na análise, estes valores anormais situam-se no canto inferior esquerdo da microplaca.

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	0,495	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.