

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

Bestell-Nr.: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Bestell-Nr.: EN250K60

Farbcodierung: schwarz

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Testprinzip	3
3. Packungsinhalt	3
3.1 Validierungskit	3
3.2 Pipettierkontrollen-Set	3
4. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	3
5. Vorsichtsmaßnahmen	4
6. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	4
7. Testdurchführung	4
7.1 Vorbereitung der Reagenzien	4
7.2 VIROTECH ELISA Testdurchführung	4
8. Testauswertung	5
8.1 Testfunktionskontrolle	5
8.2 Berechnung des Variationskoeffizienten	5
8.3 Interpretation der Ergebnisse	5
8.4 Beispiele	5
9. Erweiterte Anwendung	5
10. Testablaufschema	6
11. Anhang	7
11.1 Beispiel 1 (Validierungskontrolle)	7
11.2 Beispiel 2 (Validierungskontrolle)	8

1. Verwendungszweck

Der **Validierungskit** dient zur regelmäßigen Überprüfung Ihres ELISA Halb- bzw. Vollautomaten. Er soll den kumulierten Effekt von Ungenauigkeiten beim Pipettieren, Waschen, Inkubieren und Messen am Photometer aufzeigen und damit die Sicherheit einer einwandfreien Abarbeitung des ELISAs geben. Für die Prüfung des Halb- bzw. Vollautomaten sind immer ganze Mikrotiterplatten zu verwenden. Automaten, die routinemäßig mehr als eine Platte abarbeiten, müssen immer in Vollaustlastung evaluiert werden, d.h. bei einem Zwei-Plattengerät sind 2, bei einem Drei-Plattengerät sind 3 Platten in einem Lauf abzuarbeiten.

Die Richtlinie 98/79 EG Anhang 1, 3.1 verlangt die Sicherstellung der Funktion einer Kombination von zwei unabhängigen Medizinprodukten (in diesem Falle ELISA Prozessor und ELISA). Der Validierungskit ist geeignet, dem Anwender dieses zu ermöglichen.

Die **Pipettierkontrolle** dient der Überprüfung von ELISA Vollautomaten mit Probenverteiler. Sie wird – wie ein Patientenserum – 1 + 100 vom Automaten mit blauem Verdünnungspuffer verdünnt, pipettiert und getestet. Die Pipettierkontrolle kann anstelle der ready to use Validierungskontrolle im Validierungskit (EC 250.00) eingesetzt werden. Bitte beachten Sie hierzu die Arbeitsanleitung zum Validierungskit.

2. Testprinzip

Die in der Validierungs- bzw. Pipettierkontrolle befindlichen Antikörper bilden mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt. In alle Kavitäten der Mikrotiterplatte wird das beigefügte Kontrollserum pipettiert.

3. Packungsinhalt

3.1 Validierungskit

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten Kavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **IgG-haltige Validierungskontrolle, 15ml**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
4. **IgG-Konjugat (anti-human), 2 x 11ml**, (Schaf oder Ziege) -Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
5. **Tetramethylbenzidin Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 2 x 11ml**, gebrauchsfertig
6. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

3.2 Pipettierkontrollen-Set

1. **1 Pipettierkontrolle, 2,8 ml**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20

4. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

5. Vorsichtsmaßnahmen

1. Als Kontrollserum wird nur Serum verwendet, welches getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurde. Trotzdem sollten Kontrolle, Konjugat und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, sowie Citrat-Stopp-Lösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

6. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Zellstofftücher
3. Abfallbehälter für infektiöses Material
4. ELISA Pipettierautomat
5. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
6. Brutschrank

7. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

7.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die gebrauchsfertige Validierungskontrolle ist ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
2. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
3. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

7.2 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz **100µl** der **gebrauchsfertigen** Validierungskontrolle in alle Kavitäten pipettieren.
Soll zusätzlich der Pipettiervorgang sowie den Verdünnungsvorgang des Vollautomaten überprüft werden, so ist anstelle der gebrauchsfertigen Validierungskontrolle die Pipettierkontrolle – wie ein Patientenserum 1+100 verdünnt – einzusetzen.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für **30 Min.** bei **37 °C** .
3. Beenden der Inkubationsperiode durch **4-maliges Waschen** mit je **350-400µl Waschlösung** pro Kavität.
4. **100µl** des **gebrauchsfertigen Konjugats** in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation des Konjugates: **30 Min.** bei **37°C** .
6. Beenden der Konjugatinkubation durch **4 maliges Waschen** (siehe Pkt. 3).
7. **100µl** der gebrauchsfertigen **TMB-Substratlösung** in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: **30 Min.** bei **37°C** (Inkubation **dunkel**).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je **50µl Citrat-Stopplösung** pipettieren.
10. Extinktionen bei **450/620nm** (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Die photometrische Messung sollte **innerhalb einer Stunde** nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschaema siehe Seite 6

Die Extinktionen sollten annähernd gleich sein und in dem im Zertifikat angegebenen Bereich liegen.

8. Testauswertung

Die gebrauchsfertige Validierungskontrolle dient zur Bewertung des Pipettiervorganges sowie sämtlicher anderer Arbeitsschritte wie Inkubationstemperatur, Inkubationszeit, Messen, Waschprozeß etc. am Automaten. Die Methode ist geeignet, Unregelmäßigkeiten bei der Abarbeitung eines ELISAs aufzudecken.

Die Pipettierkontrolle dient der Überprüfung von ELISA Vollautomaten mit Probenverteiler.

8.1 Testfunktionskontrolle

OD-Werte

Die OD-Werte der Validierungs-/Pipettierkontrolle sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

Wird diese Anforderung nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

8.2 Berechnung des Variationskoeffizienten

a) Aus **allen 96 OD-Werten** wird der Variationskoeffizient berechnet. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der Standardabweichung und dem arithmetischen Mittelwert multipliziert mit 100.

b) Es wird nun die Anzahl an Kavitäten mit OD Werten, die mehr als 20% über oder unter dem arithmetischen Mittelwert liegen ermittelt (Hot Spot Analyse).

c) Zur Erleichterung der Auswertung wird eine Auswertesoftware zum Validierungskit / zur Pipettierkontrolle (Bestell-Nr. S/250) angeboten.

8.3 Interpretation der Ergebnisse

1. Liegt der errechnete Variationskoeffizient unterhalb des im Zertifikat angegebenen Wertes und werden bei der Validierungskontrolle höchstens drei Hot Spots bzw. bei der Pipettierkontrolle höchstens fünf Hot Spots gefunden, arbeitet das Gerät ordnungsgemäß.
2. Ist der ermittelte Variationskoeffizient größer als der im QK Zertifikat angegebene, sollte der Test wiederholt werden. Bei Bestätigung des Ergebnisses ist davon auszugehen, dass zumindest einer der Arbeitsschritte ungleichmäßig erfolgte. Es sollten alle einzelnen Arbeitsschritte überprüft oder die Wartungsfirma kontaktiert werden.
3. Liegt der berechnete Variationskoeffizient unterhalb des im Zertifikat angegebenen Bereiches, aber es werden mehr als drei Hot Spots (Validierungskontrolle) bzw. fünf Hot Spots (Pipettierkontrolle) gefunden, deutet dies ebenfalls auf eine Ungenauigkeit des Gerätes hin. Wenn Sie zur Bestätigung einen weiteren Test durchführen und feststellen, dass die Hot Spots wieder an der gleichen Stelle auftreten, liegt ein systematischer Fehler vor (z.B. Position der Pipettiernadel ungenau; Waschgerät arbeitet nicht korrekt oder Programmierfehler).
4. Automaten, die routinemäßig mehr als eine Platte abarbeiten, müssen immer in Vollausslastung evaluiert werden, d.h. bei einem Zwei-Plattengerät sind 2, bei einem Drei-Plattengerät sind 3 Platten in einem Lauf abzuarbeiten.

8.4 Beispiele

Zur besseren Veranschaulichung der Auswertung sind im Anhang zwei Beispiele aufgeführt.

9. Erweiterte Anwendung

Zur Überprüfung von ELISA-Halb- und Vollautomaten mit Inkubation bei Raumtemperatur kann der Validierungskit ebenfalls verwendet werden.

Die Testdurchführung (7.2) muss hierbei nur bezüglich der Inkubationstemperatur und der Inkubationszeiten modifiziert werden:

Inkubation der Validierungskontrolle :	40 Minuten bei Raumtemperatur
Inkubation des Konjugates :	40 Minuten bei Raumtemperatur
Inkubation des TMB:	40 Minuten bei Raumtemperatur

Die Auswertung kann auch bei der erweiterten Anwendung über die Auswertesoftware des Validierungskits bzw. der Pipettierkontrolle erfolgen. Hierbei müssen die Kriterien des Qualitätskontrollzertifikats, genau wie bei der Abarbeitung nach 7.2, erfüllt werden.

Vorbereitung der Waschlösung / Pipettierkontrolle

- ▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. Auffüllen
- ▼ **Pipettierkontrolle:** 10µl Pipettierkontrolle + 1000µl Verdünnungspuffer (1:101)

Testdurchführung



11. Anhang

11.1 Beispiel 1 (Validierungskontrolle)

Im diesem Fall handelt es sich um eine fehlerfreie Abarbeitung mit der Validierungskontrolle. Der Variationskoeffizient ist kleiner 10% und es liegen keine OD-Werte >20% über oder unter dem berechneten arithmetischen Mittelwert vor.



Auswertesoftware zum Validierungskit (EC250.00)

Abarbeitung mit Ch-B.: _____ Gerät: _____

OD-Werte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,458	0,439	0,436	0,431	0,431	0,428	0,412	0,411	0,398	0,393	0,397	0,385	A
B	0,452	0,430	0,415	0,425	0,422	0,410	0,413	0,395	0,396	0,392	0,399	0,364	B
C	0,446	0,421	0,418	0,416	0,405	0,412	0,398	0,402	0,381	0,372	0,395	0,378	C
D	0,452	0,431	0,419	0,420	0,418	0,423	0,404	0,384	0,402	0,366	0,386	0,386	D
E	0,454	0,425	0,412	0,417	0,403	0,403	0,394	0,393	0,395	0,378	0,384	0,378	E
F	0,449	0,434	0,423	0,422	0,410	0,407	0,400	0,395	0,376	0,380	0,376	0,372	F
G	0,446	0,438	0,430	0,423	0,419	0,408	0,398	0,400	0,387	0,394	0,389	0,401	G
H	0,474	0,455	0,445	0,439	0,431	0,431	0,409	0,403	0,401	0,376	0,393	0,411	H

n = 96

\bar{x} = 0,41

Min 0,36

s = 0,02

Max 0,47

VK = 5,7 %

Hot Spot Analyse (relative Abweichung zum Mittelwert >20 bzw. <-20) in %

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	11,7	7,1	6,4	5,2	5,2	4,4	0,5	0,3	-2,9	-4,1	-3,1	-6,1	A
B	10,3	4,9	1,3	3,7	3,0	0,0	0,8	-3,6	-3,4	-4,4	-2,7	-11,2	B
C	8,8	2,7	2,0	1,5	-1,2	0,5	-2,9	-1,9	-7,0	-3,2	-3,6	-7,8	C
D	10,3	5,2	2,2	2,5	2,0	3,2	-1,4	-6,3	-1,9	-10,7	-5,8	-5,8	D
E	10,8	3,7	0,5	1,7	-1,7	-1,7	-3,9	-4,1	-3,6	-7,8	-6,3	-7,8	E
F	9,5	5,9	3,2	3,0	0,0	-0,7	-2,4	-3,6	-8,3	-7,3	-8,3	-9,2	F
G	8,8	6,9	4,9	3,2	2,2	-0,5	-2,9	-2,4	-5,6	-3,9	-5,1	-2,2	G
H	15,6	11,0	8,6	7,1	5,2	5,2	-0,2	-1,7	-2,2	-8,3	-4,1	0,3	H

Hot Spots n = 0

Bewertung

▼ Freigabekriterium VK < 10%: **erfüllt**

▼ Freigabekriterium Hot Spots < 4: **erfüllt**

Sind alle Bewertungskriterien erfüllt, so arbeitet das Gerät zuverlässig.
Sind ein oder beide Bewertungskriterien nicht erfüllt, so sollte das Gerät sorgfältig überprüft und der Test wiederholt werden.

11.2 Beispiel 2 (Validierungskontrolle)

Hier liegt eine fehlerhafte Abarbeitung mit der Validierungskontrolle vor (VK >10% und 4 Ausreißer). Wie bei der Analyse deutlich zu sehen ist, liegen diese Ausreißer in der linken unteren Ecke der Mikrotiterplatte.

utsch

P50

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Auswertesoftware zum Validierungskit (EC250.00)													
Abarbeitung mit Ch-B.: _____ Gerät: _____													
OD-Werte													
	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	0,466	0,467	0,454	0,485	B
C	0,556	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	0,557	0,555	0,536	0,531	0,525	0,502	0,492	0,483	0,487	0,463	0,494	D
E	0,523	0,571	0,550	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	0,552	0,543	0,546	0,518	0,507	0,495	0,488	0,486	0,521	F
G	0,229	0,403	0,495	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,486	0,524	G
H	0,251	0,378	0,508	0,548	0,549	0,545	0,558	0,542	0,528	0,486	0,458	0,505	H
	n = 96					\bar{x} = 0,50			Min 0,23				
						s = 0,06			Max 0,57				
VK = 11,3 %													
Hot Spot Analyse (relative Abweichung zum Mittelwert >20 bzw. <-20) in %													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-13,2	7,0	4,6	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	4,6	2,0	0,6	-3,0	-4,0	-5,0	-9,4	-4,4	C
D	3,6	11,4	11,0	7,2	6,2	5,0	0,4	-1,6	-3,4	-2,6	-7,4	-1,2	D
E	4,6	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	4,2	F
G	-54,2	-19,4	-1,0	8,6	9,4	8,2	6,4	2,4	4,4	0,6	-2,8	4,8	G
H	-49,8	-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													
Bewertung													
	Freigabekriterium VK < 10%:					nicht erfüllt							
	Freigabekriterium Hot Spots < 4:					nicht erfüllt							
<p>Sind alle Bewertungskriterien erfüllt, so arbeitet das Gerät zuverlässig. Sind ein oder beide Bewertungskriterien nicht erfüllt, so sollte das Gerät sorgfältig überprüft und der Test wiederholt werden.</p>													