

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

**Nº de pedido: EC250.00**

**Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set**

**Nº de pedido: EN250K60**

**Código de color: negro**

**EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

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

**Tel.: +49-6142-6909-0**

**Fax: +49-6142-966613**

**<http://www.virotechdiagnostics.com>**



# Índice

|                                                                                         |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Finalidad .....</b>                                                               | <b>3</b> |
| <b>2. Principio de la prueba .....</b>                                                  | <b>3</b> |
| <b>3. Contenido .....</b>                                                               | <b>3</b> |
| 3.1 Kit de validación.....                                                              | 3        |
| 3.2 Juego para el control del pipeteado .....                                           | 3        |
| <b>4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos listos para utilizar.....</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Medidas de precaución .....</b>                                                   | <b>4</b> |
| <b>6. Material adicional necesario (no suministrado) .....</b>                          | <b>4</b> |
| <b>7. Realización de la prueba .....</b>                                                | <b>4</b> |
| 7.1 Preparación de los reactivos.....                                                   | 4        |
| 7.2 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH.....                                     | 4        |
| <b>8. Valoración del ensayo .....</b>                                                   | <b>5</b> |
| 8.1 Control del funcionamiento del ensayo:.....                                         | 5        |
| 8.2 Cálculo del coeficiente de variación .....                                          | 5        |
| 8.3 Interpretación de los resultados .....                                              | 5        |
| 8.4 Ejemplos .....                                                                      | 5        |
| <b>9. Aplicación ampliada .....</b>                                                     | <b>5</b> |
| <b>10. Esquema de la realización de la prueba.....</b>                                  | <b>7</b> |
| <b>11. Anexo .....</b>                                                                  | <b>8</b> |
| 11.1 Ejemplo 1 (control de validación) .....                                            | 8        |
| 11.2 Ejemplo 2 (control de validación) .....                                            | 9        |

## 1. Finalidad

El kit de validación sirve para la comprobación periódica de su aparato ELISA automático o semiautomático. Permite señalar el efecto acumulado de las imprecisiones de pipeteado, lavado, incubación y medición en el fotómetro, y asegurar de ese modo que las pruebas ELISA se realizan correctamente. Para la comprobación de los aparatos automáticos o semiautomáticos siempre deben utilizarse placas de microtitulación completas. Los aparatos que analicen de forma habitual más de una placa deben evaluarse siempre con su carga completa: es decir, en un aparato de dos placas deben analizarse 2 placas a la vez, en uno de tres placas 3, etc.

La Directiva 98/79 CE Anexo 1, 3.1 exige garantizar el funcionamiento de una combinación de dos productos sanitarios independientes (en este caso, el procesador ELISA y la prueba ELISA). Este kit de validación está destinado a permitir al usuario esta garantía.

El Control del pipeteado sirve para la comprobación de dispositivos ELISA automáticos con distribuidor de muestras. Éste, como un suero de paciente, se diluye, se pipetiza y se prueba por el dispositivo automático en la proporción 1 + 100 con tampón de dilución azul. El control del pipeteado se puede aplicar en lugar del control de validación listo para utilizar en el kit de validación (EC 250.00). Le rogamos que para ello preste atención a las instrucciones de manejo del kit de validación.

## 2. Principio de la prueba

Los anticuerpos existentes en el control de validación o del pipeteado forman un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas de nuevo mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro. El suero de control adjunto se pipetea en todas las cavidades de la placa de microtitulación.

## 3. Contenido

### 3.1 Kit de validación

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Control de validación con presencia de IgG, 15 ml**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
4. **Conjugado IgG (anti-humano), 2 x 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
5. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3,3',5,5'), 2 x 11ml**, lista para utilizar
6. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

### 3.2 Juego para el control del pipeteado

1. **1 Control del pipeteado, 2,8 ml**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservantes
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20

## 4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.

| Material                 | Estado           | Almacenamiento                                                                   | Durabilidad |
|--------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Controles                | tras la apertura | de +2 hasta +8°C                                                                 | 3 meses     |
| Placa de microtitulación | tras la apertura | de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante) | 3 meses     |
| Conjugado                | tras la apertura | de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)                                       | 3 meses     |

|                           |                                    |                                            |           |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| Tetrametilbencidina (TMB) | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz) | 3 meses   |
| Solución de parada        | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C                           | 3 meses   |
| Solución de lavado        | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C                           | 3 meses   |
|                           | dilución final (lista para el uso) | de +2 hasta +25°C                          | 4 semanas |

## 5. Medidas de precaución

1. Como suero de control sólo se emplea suero que ha dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, el control, el conjugado y las tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de paro de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

## 6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Servilletas de celulosa
3. Recipientes para residuos infecciosos
4. Pipeteador automático ELISA
5. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
6. Estufa de incubación

## 7. Realización de la prueba

Para obtener resultados correctos es imprescindible respetar exactamente las instrucciones de trabajo de VIROTECH Diagnostics.

### 7.1 Preparación de los reactivos

El control de validación listo para usar debe utilizarse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
2. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
3. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).

### 7.2 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Por cada ensayo deben pipetarse **100µl** del control de validación **listo para el uso** en todas las cavidades. Si debe comprobarse adicionalmente el procedimiento de pipeteado así como de dilución del autómatas completo, ha de emplearse en lugar del control de validación listo para el uso el control de pipeteado al igual que un suero de paciente diluido 1+100.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación durante **30 min. a 37 °C**.
3. El periodo de incubación finaliza con **4 lavados** utilizando cada vez **350-400µl de solución de lavado** por cavidad.
4. Pipetee en todas las cavidades **100µl** del **conjugado listo para utilizar**.
5. Incubación de los conjugados: **30 min. a 37°C**
6. Finalización de la incubación de los conjugados con **4 lavados** (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada cavidad **100µl** de la **solución de sustrato TMB** lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: **30 min. a 37°C** (incubación **en oscuridad**).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada cavidad **50µl de la solución de paro de citrato**.

10. Mida los niveles de extinción a **450/620 nm** (longitud de onda de referencia 620-690nm). La medición fotométrica debe realizarse **en la hora siguiente** a la adición de la solución de paro.

|                                                             |
|-------------------------------------------------------------|
| Véase el esquema de realización de la prueba en la página 6 |
|-------------------------------------------------------------|

Los valores de extinción deben ser aproximadamente iguales y encontrarse en el intervalo que figura en el certificado.

## 8. Valoración del ensayo

El control de validación listo para usar sirve para evaluar el proceso de pipeteado y todos los demás pasos de trabajo del aparato, como temperatura y tiempo de incubación, medición, lavado, etc. El método sirve para detectar irregularidades en la realización de una prueba ELISA.

El control del pipeteado sirve para comprobar los dispositivos automáticos ELISA con distribuidor de muestras.

### 8.1 Control del funcionamiento del ensayo:

#### Valores de densidad óptica

Los valores de densidad óptica del control de validación y pipeteado deben estar por encima de los indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumple este requisito, la prueba debe repetirse.

### 8.2 Cálculo del coeficiente de variación

a) A partir de **los 96 valores de densidad óptica** se calcula el coeficiente de variación. Dicho coeficiente es el cociente entre la desviación estándar y la media aritmética, multiplicado por 100.

b) A continuación se determina el número de cavidades con valores de densidad óptica que difieran en más de un 20% con respecto a la media aritmética (análisis de puntos críticos)

c) Para facilitar la evaluación se ofrece un software de evaluación para el kit de validación / control de pipeteado (nº de pedido S/250).

### 8.3 Interpretación de los resultados

1. Si el coeficiente de variación calculado es inferior al valor indicado en el certificado y se encuentran en el control de validación como máximo tres puntos críticos o bien en el control de pipeteado como máximo cinco puntos críticos, el aparato funciona debidamente.
2. Si el coeficiente de variación obtenido es mayor que el que figura en el certificado de control de calidad, la prueba debe repetirse. Si el resultado se confirma hay que partir de la base de que al menos unos de los pasos de trabajo se ha realizado de forma irregular. Es necesario comprobar cada uno de los pasos o ponerse en contacto con el servicio de mantenimiento del aparato.
3. Si el coeficiente de variación calculado es inferior al intervalo indicado en el certificado, encontrándose, no obstante, más de tres puntos críticos (control de validación) y cinco puntos críticos (control de pipeteado), respectivamente, esto señala asimismo una falta de precisión del aparato. Si para la confirmación realiza otra prueba, comprobando que los puntos críticos aparecen en el mismo lugar, se trata de un error sistemático (p. ej., posición inexacta de la aguja de pipeteado; funcionamiento indebido del aparato de lavado o error de programación).
4. Los aparatos que analicen de forma habitual más de una placa deben evaluarse siempre con su carga completa: es decir, en un aparato de dos placas deben analizarse 2 placas a la vez, en uno de tres placas 3, etc.

### 8.4 Ejemplos

Para ilustrar mejor el proceso de evaluación se incluyen dos ejemplos en el anexo.

## 9. Aplicación ampliada

El kit de validación puede emplearse asimismo para la comprobación de dispositivos ELISA semiautomáticos y automáticos con incubación a temperatura ambiente.

Para ello, la realización de la prueba (7.2) sólo debe modificarse en cuanto a la temperatura de incubación y a los tiempos de incubación:

Incubación del control de validación : 40 minutos a temperatura ambiente

Incubación del conjugado : 40 minutos a temperatura ambiente

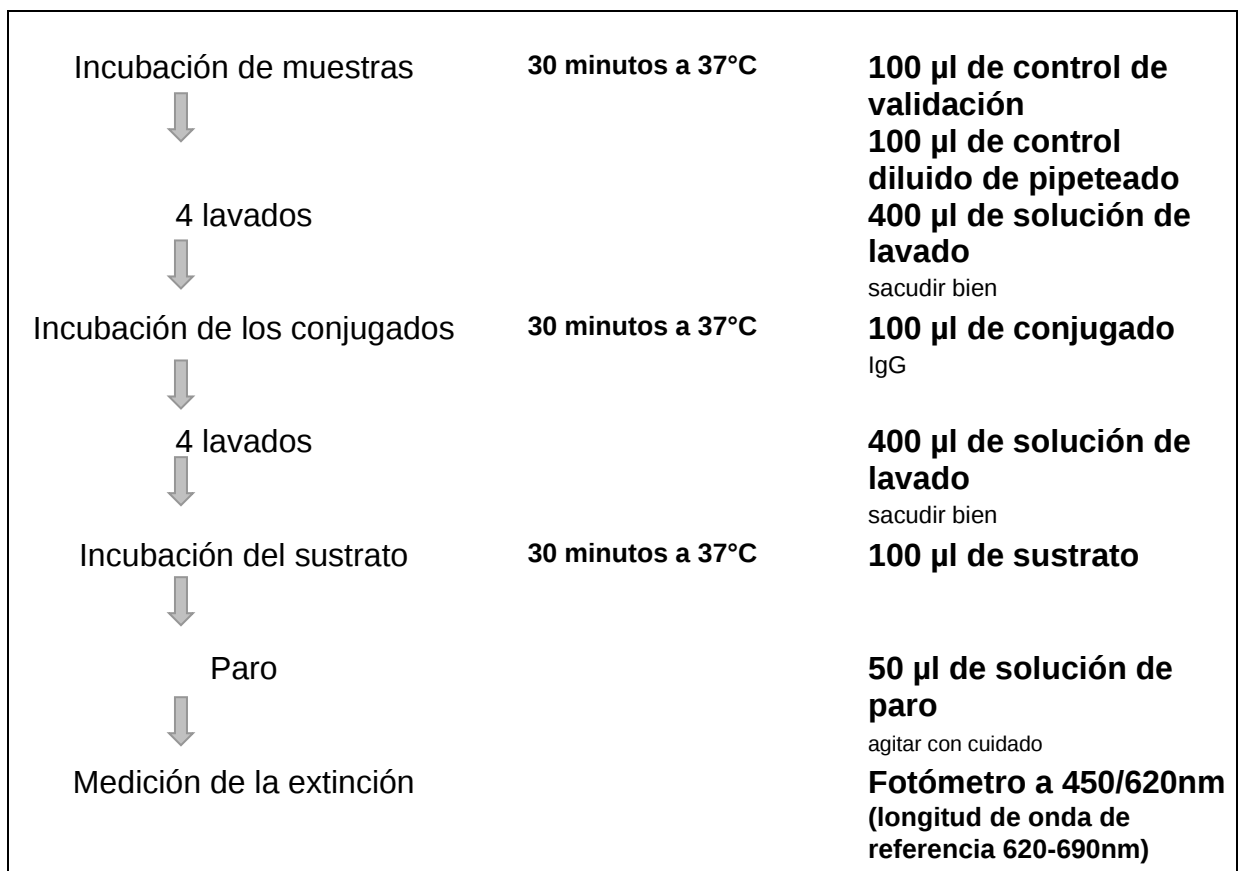
Incubación del TMB: 40 minutos a temperatura ambiente

La evaluación también puede efectuarse con la aplicación ampliada a través del kit de validación y del control de pipeteado, respectivamente. A este respecto deben cumplirse los criterios del certificado de control de calidad, al igual que en la ejecución según el apartado 7.2.

## Preparación de la solución de lavado / del control de pipeteado

- ▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro
- ▼ **Control de pipeteado:** 10µl de control de pipeteado + 1000µl de tampón de dilución (1:101)

## Realización de la prueba



## 11. Anexo

### 11.1 Ejemplo 1 (control de validación)

En este caso se trata de una ejecución exenta de errores con el control de validación. El coeficiente de variación es menor del 10% y no existen valores de densidad óptica que sean más del 20% superiores o inferiores a la media aritmética calculada.

**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 | 0,486 | 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 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 Ejemplo 2 (control de validación)

En este caso se trata de una ejecución inexacta con el control de validación (CF >10% y 4 valores anómalos). Puede verse claramente que estos valores anómalos corresponden a la esquina inferior izquierda de la placa de microtitulación.

**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 | 0,485 | 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 | 0,495 | 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 | -48,8 | -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.