

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

Rendelési szám: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

Rendelési szám: EN250K60

Színkód: fekete

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Németország

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

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

Webhely: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Tartalom

1. Alkalmazás célja	3
2. A teszt működési elve	3
3. A csomag tartalma.....	3
3.1 Ellenőrző kit	3
3.2 Pipetta-ellenőrző készlet	3
4. A tesztkit és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések.....	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 A reagensek előkészítése	4
7.2 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése	4
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	5
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése	5
8.2 A variációs koefficiens számítása.....	5
8.3 Az eredmények interpretációja	5
8.4 Példák.....	5
9. Kiterjesztett alkalmazás	5
10. A teszt folyamatának vázlata	6
11. Függelék	7
11.1 1. példa (validációs kontroll)	7
10.2 2. példa (validációs kontroll)	8

1. Alkalmazás célja

Az ellenőrző kit az Ön félautomata illetve automata ELISA készülékének rendszeres ellenőrzésére szolgál. Az ellenőrző kit a pipettázás, mosás, inkubáció és fotométeres mérés során jelentkező pontatlanságok kumulatív hatását mutatja ki, és ezáltal az ELISA tesztek kifogástalan feldolgozását biztosítja. A félautomata ill. automata készülékek ellenőrzéséhez mindig teljes mikrotiterlemez kell felhasználni. Azokat az automatákat, melyek rutinszerűen több, mint egy lemezt dolgoznak fel, mindig teljes mértékű kihasználtság mellett kell ellenőrizni, vagyis a kétlemezes készülékeket kettő, a háromlemezes készülékeket három lemez teljes lefuttatásával kell ellenőrizni.

A 98/79 EG, 1 paragrafus 3.1 útmutatás előírja két független egészségügyi termék kombinációja esetén az együttes működés bizonyítását (ez esetben az ELISA processzorét és az ELISA tesztét). Az ellenőrző kit ezt lehetővé teszi az alkalmazó számára.

A **pipetta-ellenőrző** a mintaelosztóval ellátott ELISA automaták ellenőrzésére szolgál. Ennek során – mint egy páciens-szérum – 1 + 100 arányban kerül hígításra kék hígítópufferrel, majd pipettázásra és ellenőrzésre az automata által. A pipetta-ellenőrző a használatra kész ellenőrző kit (EC 250.00) helyett alkalmazható. Ennek során kérjük, tartsa be az ellenőrző kit használati útmutatójában foglaltakat.

2. A teszt működési elve

Az ellenőrző-, illetve pipettázó kontrollban található antitestek immunkomplexet alkotnak egy immunkomplexnek a mikrotiter lemezre rögzített antigénjeivel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik. A mikrotiterlemez minden mélyedésébe a mellékelt kontrollszérumot kell pipettázni.

3. A csomag tartalma

3.1 Ellenőrző kit

- 1 **Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont reakciómélyedésből áll, liofilizált
- 2 **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
- 3 **IgG tartalmú ellenőrzőkontroll, 15 ml**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
- 4 **IgG-konjugátum (anti-humán), 2 x 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
- 5 **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'-TMB), 2 x 11ml**, felhasználásra kész
- 6 **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeverék

3.2 Pipetta-ellenőrző készlet

- 1 **pipetta-ellenőrző, 2,8 ml**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel
- 2 **PBS-hígítópuffer (kék, használatra kész), 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20

4. A tesztkit és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A tesztkitet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségi tanúsítványt.

1. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékenyek és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, azt el kell dobni.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószerrel)	3 hónap
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Végighígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Óvintézkedések

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotitercsík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő, és ennek megfelelő óvatossággal kezelendő. A laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok az irányadók.
2. A tartósítószeret tartalmazó komponensek, valamint a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Desztillált / ioncserélt víz
2. Papírkendők
3. Hulladéktároló a fertőző anyagokhoz
4. ELISA pipettázó automata
5. Spektrofotométer mikrotiterlemezekhez 450/620 nm filterekkel (referenciahullám hossza 620-690nm)
6. Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 A reagensek előkészítése

A felhasználásra kész ellenőrzőkontrollok kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
2. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
3. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).

7.2 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Vizsgálati tételenként pipettázzon **100 µl**-t a **használatra kész** érvényesítőkontrollból mindegyik üregbe. Ha a teljes automaták pipettázó eljárásán kívül a hígítási eljárást is vizsgálni kell, akkor a használatra kész érvényesítőkontroll helyett a pipettázókontrollt (pl. 1+100 hígítású páciensszérum) kell használni.
2. A reagensek kipipettázása után **30 perc 37°C**-on történő inkubáció következik.
3. Az inkubációs idő lejártá után **mossa** ki a mélyedéseket **4-szer 350-400 µl mosóoldattal** (mélyedésenként).
4. Minden mélyedésbe pipettázzon **100 µl felhasználásra kész konjugátumot**.
5. A konjugátum inkubációja **30 percig, 37°C-on**.
6. Az inkubációs idő lejártá után **4-szer mossa** ki a mélyedéseket (ld. 3.pont).
7. Pipettázzon **100 µl** felhasználásra kész **TMB szubsztrátoldatot** minden mélyedésbe.
8. Inkubálja a szubsztrát oldatot **30 percig 37°C-on (sötétben)**.
9. Minden mélyedésbe pipettázzon **50 µl citrát fixáló (stop) oldatot**, így leállítva a szubsztrátreakciót.
10. Mérjen extinkciót **450/620 nm**-en (referenciahullám hossza 620-690nm). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után **egy órában belül** el kell végezni.

A teszt folyamatának vázlatát ld. a 9. pontban

Az extinkciós értékeknek megközelítőleg azonosaknak kell lenniük és a minőségi tanúsítványban megadott tartományba kell esniük.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A felhasználásra kész ellenőrzőkontroll az automata által elvégzett lépések, mint a pipettázás, az inkubációs idő, inkubációs hőmérséklet, mérés, mosási folyamat, stb. kiértékelésére szolgál. A módszer alkalmas ELISA teszt elvégzése során előforduló rendellenességek felderítésére.

A pipetta-ellenőrző a mintaelosztóval ellátott ELISA automaták ellenőrzésére szolgál.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

OD-értékek

Az ellenőrző- / pipetta-kontrollok OD-értékei a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell, hogy legyenek.

Amennyiben a fenti feltételek nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A variációs koefficiens számítása

a) A variációs koefficiens **mind a 96 OD-értékből** kell számítani. Ez az érték a standard deviáció és a számtani középérték hányadának 100-szorosa.

b) Ezek után azoknak a mélyedéseknek a számát kell meghatározni, melyek OD értékei több, mint 20%-al a számtani középérték felett vagy alatt vannak (hot spot analízis).

c) A kiértékelés megkönnyítésére a validációs készlethez / pipettázó kontrollhoz egy kiértékelőszoftver is rendelkezésre áll (Rendelési szám: S/250).

8.3 Az eredmények interpretációja

1. Amennyiben a kiszámított variációs koefficiens a tanúsítványban megadott érték alatt van, és a validációs kontrolloknál max. három hot spot, ill. a pipettázó kontrolloknál max. öt hot spot jelentkezik, a készülék rendeltetésszerűen működik.
2. Amennyiben a megállapított variációs koefficiens a minőségi tanúsítványban megadott érték felett van, a tesztet meg kell ismételni. Az eredmények megerősítése során abból kell kiindulni, hogy a munkafolyamat legalább egy lépése nem egyenletes módon került elvégzésre. A munkafolyamat valamennyi lépését egyesével ellenőrizni kell, vagy kapcsolatba kell lépni a gép karbantartását végző céggel.
3. Amennyiben a kiszámított variációs koefficiens a tanúsítványban megadott érték alatt van, de a validációs kontrolloknál több, mint három hot spot, ill. a pipettázó kontrolloknál több, mint öt Hot Spot jelentkezik, ez szintén a készülék pontatlanságára utal. Ha az eredmények megerősítésére további tesztet végez és ennek során a hot spotok ismét ugyanazokon a helyeken jelennek meg, szisztematikus hiba áll fenn (pl. a pipettahegy pontatlan pozíciója, a mosó készülék helytelen működése vagy programozási hiba).
4. Azokat az automatákat, melyek rutinszerűen több, mint egy lemezt dolgoznak fel, mindig teljes mértékű kihasználtság mellett kell ellenőrizni, vagyis a kétlemezes készülékeket kettő, a háromlemezes készülékeket három lemez teljes lefuttatásával kell ellenőrizni.

8.4 Példák

A kiértékelés jobb szemléltetése érdekében a függelékben két példát közlünk.

9. Kiterjesztett alkalmazás

A validációs készlet ELISA fél- és teljes automata készülékek szobahőmérsékleten végzett inkubáció mellett történő ellenőrzésére is alkalmas.

A vizsgálat elvégzése (7.2) ebben az esetben csak az inkubációs hőmérsékletre és az inkubációs időre nézve módosítandó:

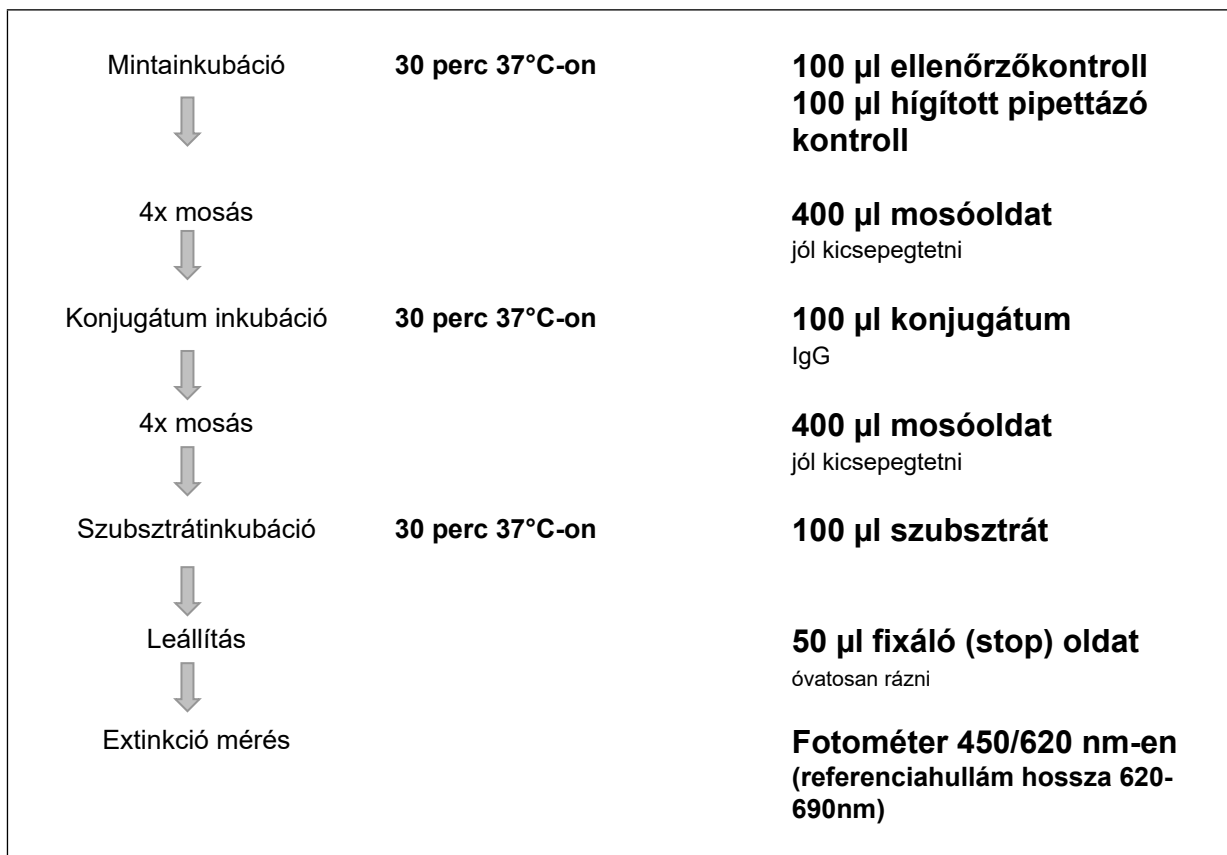
Inkubáció a validációs kontrollal:	40 perc szobahőmérsékleten
A konjugátumok inkubációja:	40 perc szobahőmérsékleten
A TMB inkubációja:	40 perc szobahőmérsékleten

A kiértékelés a kiterjesztett alkalmazás során is elvégezhető a validációs készlet vagy a pipettázó kontroll kiértékelő szoftverével. Ennek során a 7.2 pontban leírtak szerint pontosan teljesülnie kell a minőségi tanúsítványban szereplő kritériumoknak.

A mosóoldat / pipettázó kontroll előkészítése

- ▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.
▼ **Pipettázó kontroll:** 10µl pipettázó kontroll + 1000µl hígítópuffer (1:101)

A vizsgálat elvégzése



11. Függelék

11.1 1. példa (validációs kontroll)

Ebben az esetben a validációs kontroll hibás feldolgozásáról van szó. A variációs koefficiens kisebb, mint 10% és egyetlen OD-érték sincs >20%-al a számított számtani középérték alatt vagy fölött.

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	0,485	0,467	0,452	0,480	A
B	0,562	0,543	0,525	0,517	0,514	0,505	0,493	0,487	0,495	0,467	0,454	0,485	B
C	0,566	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	0,494	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	0,434	0,480	0,504	0,562	0,543	0,545	0,518	0,507	0,495	0,488	0,495	0,521	F
G	0,523	0,480	0,495	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,495	0,524	G
H	0,544	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	2,6	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	5,2	4,2	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	-3,6	-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	2,5	-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.

10.2 2. példa (validációs kontroll)

Ebben az esetben a validációs kontroll hibás feldolgozásáról van szó (VK >10% és 4 kiugró érték). Amint az az analízisből világosan látható, a „hot spot”-ok a mikrotiterlemez bal alsó sarkában találhatók.

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	0,555	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	-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.