

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

N° articolo: EC250.00

Pipettierkontrollen/Pipetting Control-Set

N° articolo: EN250K60

Codice colore: nero

SOLO PER LA DIAGNOSTICA IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germania

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

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

Sito Web: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit di convalida	3
3.2 Set di controllo dispensazione	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso	3
5. Precauzioni	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito)	4
7. Esecuzione del test	4
7.1 Preparazione dei reattivi	4
7.2 Esecuzione del test VIROTECH ELISA	4
8. Valutazione del test	5
8.1 Controlli funzionali del test	5
8.2 Calcolo dei coefficienti di variazione	5
8.3 Interpretazione dei risultati	5
8.4 Esempi	5
9. Uso ampliato	5
10. Schema di svolgimento del test	7
11. Appendice	8
11.1 Esempio 1 (Controllo di convalida)	8
11.2 Esempio 2 (Controllo di convalida)	9

1. Finalità d'uso

Questo kit di convalida serve per il regolare controllo del vostro strumento automatico o semiautomatico ELISA. Deve indicare l'effetto cumulativo di imprecisioni durante la dispensazione, il lavaggio, l'incubazione e la misurazione sul fotometro, garantendo la perfetta esecuzione del test ELISA. Per il controllo dello strumento automatico o semiautomatico utilizzare sempre micropiastre intere. Gli strumenti automatici che processano più di una piastra devono sempre essere valutati a pieno carico, vale a dire per uno strumento a due piastre si devono processare 2 piastre per ogni ciclo, per uno strumento a 3 piastre, 3.

La direttiva 98/79 CE, Appendice 1, 3.1, richiede la garanzia di funzionamento di una combinazione di prodotti medicali indipendenti (in questo caso il processore e il test ELISA). Il kit di convalida consente all'utilizzatore di soddisfare questo requisito.

Il **controllo della dispensazione** serve per il controllo di strumenti automatici ELISA con distributore di campioni. Come un siero di paziente, viene diluito 1 + 100 dallo strumento automatico con tampone di diluizione blu, dispensato e testato. Il controllo della dispensazione può essere impiegato invece del controllo di convalida 'ready to use' nel kit di convalida (EC 250.00). Si osservino in merito le istruzioni di lavoro del kit di convalida.

2. Principio del test

L'anticorpo rilevato nel controllo di convalida o di dispensazione forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Le immunoglobuline non legate sono rimosse anch'esse a loro volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante. Il siero di controllo fornito in dotazione viene dispensato in tutti i pozzetti delle micropiastre.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit di convalida

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte, , 50ml)**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **controllo di convalida contenente IgG, 15ml**, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante, pronto per l'uso
4. **coniugato IgG (anti-umano), 2 x 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con stabilizzante proteico e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
5. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 2 x 11ml**, pronta per l'uso
6. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

3.2 Set di controllo dispensazione

1. **1 controllo dispensazione, 2,8 ml**, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati in luogo oscuro. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi

Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni

1. Come siero di controllo si impiega esclusivamente siero testato e riscontrato negativo per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia il controllo, il coniugato e gli strip della micropiastre devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione di citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Acqua distillata/demineralizzata
2. Salviette di carta
3. Contenitore per rifiuti infetti
4. Dispensatore automatico ELISA
5. Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
6. Incubatore

7. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

7.1 Preparazione dei reattivi

Il controllo di convalida pronto per l'uso va impiegato esclusivamente con le piastre indicate sul certificato di controllo qualità.

1. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
2. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
3. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).

7.2 Esecuzione del test VIROTECH ELISA

1. Per ogni serie di test, dispensare in tutti i pozzetti **100 µl** del controllo di convalida **pronto per l'uso**. Qualora si debba monitorare anche il processo di dispensazione, nonché il ciclo di diluizione dello strumento automatico, al posto del controllo di convalida pronto per l'uso si dovrà utilizzare il controllo di dispensazione – come un siero del paziente diluito a 1+100.
2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per **30 min. a 37 °C**.
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da **4 lavaggi**, ciascuno eseguito con **350-400µl di soluzione di lavaggio** per ogni pozzetto.
4. Dispensare **100µl del coniugato pronto per l'uso** in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: **30 minuti a 37°C**.
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante **4 lavaggi** (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto **100µl della soluzione per substrato TMB pronta** per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: **30 minuti a 37°C** (incubazione **al buio**).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare **50µl della soluzione bloccante di citrato** in ciascun pozzetto.
10. Misurare le estinzioni a **450/620nm** (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata **entro un'ora** dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Le estinzioni dovrebbero essere quasi uguali e trovarsi entro i valori limite indicati sul certificato.

8. Valutazione del test

Il controllo di convalida pronto per l'uso serve per la valutazione del processo di dispensazione nonché di tutte le altre fasi di lavoro, quali temperatura e tempo d'incubazione, misurazione, processo di lavaggio, ecc., nello strumento automatico. Il metodo è indicato a rilevare eventuali irregolarità durante l'esecuzione di un test ELISA.

Il controllo della dispensazione serve per il controllo di strumenti automatici ELISA con distributore di campioni.

8.1 Controlli funzionali del test

Valori DO

I valori DO del controllo di convalida/dispensazione devono trovarsi al di sopra dei valori DO indicato nel certificato di controllo qualità.

Il mancato rispetto di questo requisito richiede la ripetizione del test.

8.2 Calcolo dei coefficienti di variazione

a) Il coefficiente di variazione si ottiene dai **96 valori DO**, vale a dire si calcola dal quoziente della deviazione standard e del valore medio aritmetico moltiplicato per 100.

b) Si calcola ora il numero dei pozzetti con valori DO superiori o inferiori di oltre il 20% rispetto al valore medio aritmetico (analisi hot spot).

c) Per facilitare la valutazione, viene offerto un software di valutazione per il kit di convalida / controllo della dispensazione (n. articolo S/250).

8.3 Interpretazione dei risultati

1. Se il coefficiente di variazione calcolato è al di sotto del valore indicato nel certificato e se si trovano nel controllo di convalida al massimo tre hot spot e nel controllo di dispensazione al massimo cinque hot spot, lo strumento funziona regolarmente.
2. Se il coefficiente di variazione calcolato è superiore a quello indicato sul certificato di controllo qualità, è necessario ripetere il test. In caso di conferma del risultato si deve ipotizzare che almeno una delle fasi di lavoro è stata eseguita in modo non uniforme. Si raccomanda di controllare le singole fasi di lavoro oppure contattare la ditta di manutenzione.
3. Se il coefficiente di variazione calcolato è al di sotto del valore indicato nel certificato e se si trovano nel controllo di convalida al massimo tre hot spot e nel controllo di dispensazione al massimo cinque hot spot, lo strumento funziona regolarmente. Se per conferma viene effettuato un altro test e si osserva che gli hot spot compaiono di nuovo nello stesso punto, c'è un errore di sistema (es. posizione non esatta dell'ago della pipetta; l'apparecchio di lavaggio non funziona correttamente o errore di programmazione).
4. Gli strumenti automatici che eseguono il test su più di una piastra, devono sempre essere valutati a pieno carico, vale a dire per uno strumento a due piastre si devono testare 2 piastre per ogni ciclo, per uno strumento a 3 piastre, 3.

8.4 Esempi

Per una migliore comprensione della valutazione, si riportano in appendice due esempi.

9. Uso ampliato

Il kit di convalida può essere usato anche per la verifica degli strumenti ELISA automatici e semiautomatici con incubazione a temperatura ambiente.

Basta solo modificare la conduzione del test (7.2) in base alla temperatura e ai tempi di incubazione:

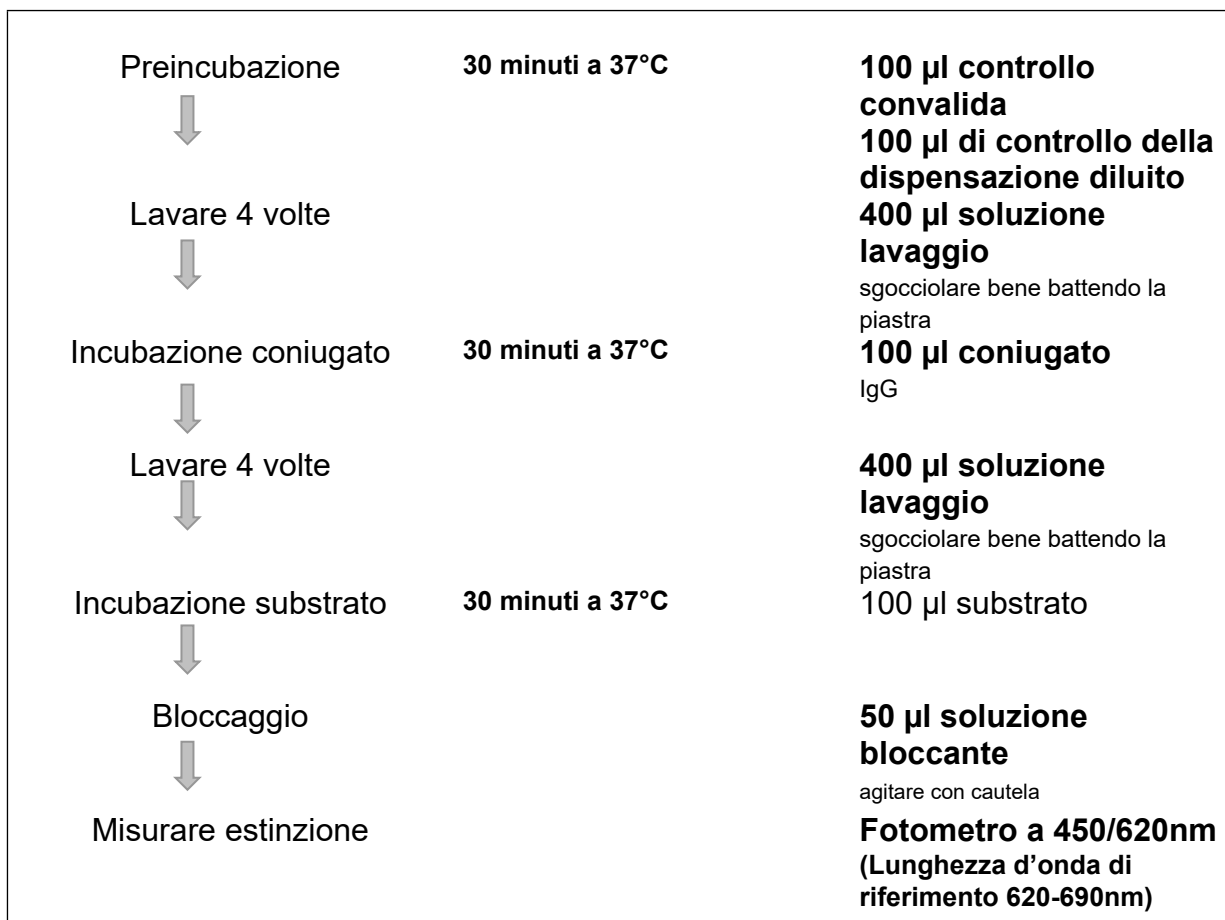
Incubazione del controllo di convalida:	40 minuti a temperatura ambiente
Incubazione del coniugato:	40 minuti a temperatura ambiente
Incubazione del TMB:	40 minuti a temperatura ambiente

La valutazione può avvenire anche nell'uso ampliato tramite il software di valutazione del kit di convalida o del controllo della dispensazione. In questo caso, vanno soddisfatti i criteri del certificato di controllo di qualità, esattamente come nella processazione secondo 7.2.

Preparazione della soluzione di lavaggio / del controllo della dispensazione

- ▼ **Soluzione per lavaggio:** diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro
- ▼ **Controllo della dispensazione:** 10 µl di controllo della dispensazione + 1000 µl di tampone di diluizione (1:101)

Esecuzione del test



11. Appendice

11.1 Esempio 1 (Controllo di convalida)

In questo caso, si tratta di una processazione priva di errori con il controllo di convalida. Il coefficiente di variazione è inferiore del 10% e non vi sono valori DO superiori o inferiori di oltre il 20% rispetto al valore medio aritmetico calcolato.

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	0,486	0,521	F
G	0,523	0,480	0,495	0,543	0,547	0,541	0,532	0,512	0,522	0,503	0,486	0,524	G
H	0,544	0,480	0,508	0,548	0,549	0,545	0,568	0,542	0,528	0,485	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.

11.2 Esempio 2 (Controllo di convalida)

In questo caso, si tratta di una processazione errata con il controllo di convalida (CC > 10% e 4 valori abnormi). Come chiaramente rilevabile dall'analisi, tali valori abnormi si trovano nell'estremità inferiore sinistra della micropiastra.

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	0,557	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	0,552	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.