

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Equipo:

WMicrotracker ONE

Revisión del documento: Rev1.0 2024

Número de identificación del equipo: SN#####

Descripción del equipo:

El WMicrotracker es un equipo que utiliza un sistema de microhaces infrarrojos para detectar la refracción de la luz a través del cuerpo de pequeños animales, con el fin de registrar la actividad locomotora de gusanos en tiempo real en cultivos líquidos. El equipo cuenta con un conjunto de detectores infrarrojos independientes que permiten la lectura simultánea de 384 canales, y adaptadores de placa que permiten su uso con placas de cultivo de 6, 24, 96 y 384 pocillos. El equipo posee un algoritmo de ajuste de señales electrónicas que autocalibra los parámetros internos (potencia de leds y ganancia de los fototransistores) de acuerdo al grado de absorbancia óptica del medio de cultivo cada vez que un nuevo experimento es ejecutado.

Planilla de testeos recomendada:

Se recomienda las siguientes acciones de calibración:

Tipo de Calibración	Periodicidad recomendada	Duración estimada
Chequeo interno periódico: Verificación de blanco de medición	Todos los días, antes de comenzar la rutina de ensayos	5 minutos
Chequeo interno periódico: Testeo eléctrico general del dispositivo (TEST Device) y alineación correcta de microhaces	Todos los días, antes de comenzar la rutina de ensayos	5 minutos
Control interno para todos los ensayos: Inclusión de blanco, control y 2 drogas patrón.	Controles internos a incluir en todos los ensayos	N/C
Calibración: Chequeo trimestral de Homogeneidad y Sensibilidad	Trimestral o semestral, de acuerdo al uso	1 hora + preparación de material biológico previo
Mantenimiento preventivo: Ajuste preventivo y limpieza	Trimestral o semestral, de acuerdo al uso	15 minutos

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Chequeo interno periódico: Verificación de blanco de medición

Objetivo:

Verificar que no existen fuentes exógenas ni desperfectos internos que generen ruido en la medición

Duración estimada del ensayo:

5 minutos

Procedimiento:

Se recomienda realizar la verificación del testeo eléctrico periódicamente. Preferentemente en el día antes de comenzar la rutina de ensayos.

Para esta medición debe seguirse el procedimiento detallado en el ANEXO I. En resumen, este ensayo se realiza con una placa de 96 pocillos (formato de fondo de acuerdo a los definido en el laboratorio de ensayos) conteniendo medio líquido, sin animales. Se mide la placa durante 5 minutos.

Condiciones de aceptación:

Se verifica que la actividad detectada sea de 0 (máximo umbral aceptado = 1) en todos los pocillos medidos.

Plan de contingencia ante falla:

En caso de falla en el ensayo, verificar las posibles fuentes de ruido de acuerdo a lo detallado en el Anexo I.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Chequeo interno periódico: Testeo eléctrico general del dispositivo (TEST Device) y alineación correcta de microhaces

Objetivo:

Verificar que los detectores funcionan bien eléctricamente, y que la plantilla de microhaces se encuentra bien alineada con respecto a la bandeja y el adaptador.

Duración estimada del ensayo:

5 minutos

Procedimiento:

Se recomienda realizar la verificación del testeo eléctrico periódicamente. Preferentemente en el día antes de comenzar la rutina de ensayos.

Para esta medición debe seguirse el procedimiento detallado en el ANEXO II. En resumen, este ensayo se realiza con el adaptador de 96 pocillos (de acuerdo al formato de fondo U o Flat puesto a punto en el laboratorio usuario), con la placa guía de alineamiento microperforada. No se coloca la placa de 96 pocillos. El algoritmo de ensayo "TEST Device" hará un protocolo de testeo secuencial de todos los haces del WMicrotracker, en patrón de filas y columnas, emitiendo un reporte de PASSED o NO PASSED al finalizar el mismo.

Condiciones de aceptación:

Reporte de testeo = PASSED

Plan de contingencia ante falla:

En caso de falla en el ensayo, repetir el ensayo para confirmar la falla, y realizar un mantenimiento preventivo.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Control interno para todos los ensayos: Inclusión de blanco, control y 2 drogas patrón.

Objetivo:

Incluir en los ensayos un control interno que verifique la consistencia esperada de los datos obtenidos con el WMicrotracker, y que sirva también como control biológico.

Procedimiento:

Se incluye en el setup de la placa: 2 wells conteniendo solo buffer, 2 wells conteniendo gusano sin tratar, 2 wells conteniendo droga 1 ##uM, 2 wells conteniendo droga 2 ##uM. Puede encontrarse una guía de drogas recomendadas en ensayos de haemonchus contortus en el ANEXO III.

Condiciones de aceptación:

La actividad del control debe estar dentro del rango aceptado para un ensayo normal (predefinido por el laboratorio de ensayos en sus condiciones standard de cría, cultivo y temperatura). La Droga 1 y 2 deben mostrar una disminución en el rango esperado para el organismo testado.

Plan de contingencia ante falla:

Se considera el experimento como invalido y deberá repetirse. Deberán chequearse el estado del material biológico, condiciones ambientales y preparación de las drogas y soluciones.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Calibración: Chequeo trimestral de Homogeneidad y Sensibilidad

Objetivo:

Hacer un chequeo de la homogeneidad de todos los sensores del equipo, y chequear la sensibilidad de detección mediante una curva de microorganismos.

Procedimiento:

La calibración del WMicrotracker se realiza trimestralmente de acuerdo con el procedimiento de calibración interno del laboratorio descrita en el ANEXO IV.

Para este ensayo se utiliza una solución estándar de **nematodos** (a definir en el laboratorio de ensayos si se utiliza *C.elegans* o *haemonchus spp*, y en qué estadio) para calibrar la precisión y sensibilidad del sistema de detección de microhaces infrarrojos. Además, se verifica el correcto funcionamiento del software de análisis de datos.

Condiciones de aceptación:

Desviación de la medición $\pm 25\%$ (ver anexo para explicación del cálculo). Rango lineal de detección entre 10 y 50 gusanos / pocillo. Número absoluto de cuentas de actividad en el rango esperado.

Plan de contingencia ante falla:

Verificar el estado de la placa de nematodos bajo el microscopio para verificar cualitativamente el grado de vitalidad y pipeteo. Repetir el experimento con otro batch de gusanos para verificar la falla.

Si la desviación es entre 25% y 45% generar el archivo patrón de calibración y recalcular. Si es mayor, contactar al fabricante.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Mantenimiento preventivo: Ajuste preventivo y limpieza

Objetivo:

Limpiar el sistema óptico y verificar los ajustes de las piezas mecánicas móviles y de fijación,

Procedimiento:

El mantenimiento preventivo del WMicrotracker se realiza trimestralmente de acuerdo con el procedimiento de mantenimiento interno del laboratorio descrito en el ANEXO V.

Durante el mantenimiento preventivo se limpia el sistema óptico mediante aspiración, se verifica el correcto cierre de la bandeja, los regatones y el nivelado correcto del equipo sobre la mesada de trabajo.

Luego del mantenimiento preventivo se recomienda hacer un testeo de:

- Verificación de blanco de medición
- Testeo eléctrico general del dispositivo (TEST Device) y alineación correcta de microhaces
- Homogeneidad y Sensibilidad

Condiciones de aceptación:

Checklist del mantenimiento preventivo y OK de test posteriores.

Plan de contingencia ante falla:

Se repite el procedimiento de limpieza. Se comunica con el soporte técnico del vendedor para asistencia en el ajuste mecánico avanzado.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Registro de mantenimiento y calibración:

Todas las actividades de mantenimiento y calibración se registran en un formulario de registro de mantenimiento y calibración específico para cada equipo. Los registros deben incluir la fecha de la actividad, el personal responsable, el procedimiento utilizado y los resultados de la actividad. Estos registros se mantienen en un archivo de registro de mantenimiento y calibración y deberán estar disponibles para su revisión por el personal de auditoría interna y externa.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

ANEXO I: Verificación de blanco de medición

Realizar antes de comenzar la rutina de ensayos del día.

Procedimiento:

1. Utilizar una placa de 96 pocillos (formato de fondo de acuerdo a los definido en el laboratorio de ensayos).
2. Pipetear 100 ul de medio líquido (agua, buffer), sin animales.
3. Adquirir la placa durante 5 minutos en Modo 1_ Threshold Avrg (Default.Agar&Liquid) - Treshold 1.8
4. Generar el reporte de los datos.

Condiciones de aceptación:

Se verifica que la actividad detectada sea de 0 (máximo umbral aceptado = 1) en todos los pocillos medidos.

Plan de contingencia ante falla:

En caso de falla en el ensayo, verificar las posibles fuentes de ruido:

- Vibraciones en la mesada donde está situada el equipo.
- Exposición del equipo a rayos de luz.
- Fuente de alimentación defectuosa

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

ANEXO II: Testeo eléctrico general del dispositivo (TEST Device) y alineación correcta de microhaces

Para realizar el testeo eléctrico general del dispositivo, sigue los siguientes pasos:

1. Colocar el adaptador y la plantilla correspondiente en el equipo (w96F o w96U), sin placa
2. Ir a File/Test Device para iniciar el examen.
3. Una vez finalizado el testeo, se generará automáticamente un informe con los resultados obtenidos.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

ANEXO III. Control interno para todos los ensayos: Inclusión de blanco, control y 2 drogas patrón.

En cada placa que se va a analizar incluir los siguientes controles por duplicado:

- **Blanco:** medio sólo sin nematodos.
- **Control Negativo:** nematodos en el medio utilizado + x% DMSO (concentración final en los pocillos con droga)
- **Control positivo:** agregar al menos dos drogas que se sabe que tienen un efecto sobre la actividad de los nematodos. Es importante asegurarse de que las drogas seleccionadas sean apropiadas para el tipo de nematodo que se está evaluando y que se utilicen en las concentraciones adecuadas.

Ejemplo de drogas que se pueden utilizar como control positivo en experimentos con *Haemonchus contortus*: (Concentración final de las drogas en el pocillo 20 µM.)

- Monepantel (Zolvix; Elanco, Greenfield, IN, USA).
- Moxidectin (Cydectin; Virbac, Carros, France)

*El procedimiento de acuerdo a Taki et al: Pharmaceuticals 2021, 14(7), 616; <https://doi.org/10.3390/ph14070616> recomienda Monepantel 20uM para obtener un control positivo con 50% de actividad, y Moxidectin 20uM para obtener un control positivo con 20% de actividad.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

ANEXO IV: Calibración: Chequeo trimestral o semestral de Homogeneidad y Sensibilidad

Calibración de detección de actividad:

- Para estas pruebas se utilizará una solución estándar de nematodos (a definir en el laboratorio de ensayos si se utiliza *C.elegans* o *Haemonchus spp*, y en qué estadio).
- Estos protocolos se deben realizar en una habitación con aire acondicionado.
- Todos los buffers deben estar a temperatura ambiente.

Protocolos utilizando en las pruebas Gusanos N2 Adultos jóvenes.

A) REGISTRO DE HOMOGENEIDAD DE WELLS/CANALES_w96F:

Materiales necesarios:

- 2 placas NGM (10 cm) con gusanos adultos sincronizados.
- Tubo de 15 mL.
- Microplaca fondo plano de 96 pocillos.
- WMicrotracker.
- p20 / p1000
- Pipeta multicanal.
- Reservorio de pipetas multicanal.
- Tips.

Protocolo:

1. Recolectar gusanos adultos jóvenes de 2 placas usando buffer M9 y transferirlos a un tubo estéril de 15 mL.
2. Dejar que los gusanos se asienten durante aproximadamente 3 minutos (los gusanos adultos caerán por gravedad al fondo del tubo).
3. Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta P1000 teniendo cuidado de no perturbar el pellet.
4. Realizar un lavado con 5 ml de buffer M9. Agitar o invertir brevemente el tubo.
5. Repetir el paso de decantación. Desechar el sobrenadante y agregar 3 ml de buffer M9.
6. Homogeneizar la suspensión agitando el tubo a mano 3 veces. Contar el número de gusanos en 10 µl de solución. Repetir tres veces y calcular el número promedio de gusanos/10 µl.
7. Preparar una suspensión para obtener [5 gusanos/10 µl]. Ajustar el volumen en buffer M9 suplementado con OP50 al 1%.
8. Transferir la suspensión de gusanos al reservorio de pipetas multicanal.
9. Transferir 90 µl de solución de gusanos a la microplaca de 96 pocillos con una pipeta multicanal teniendo en cuenta las recomendaciones de pipeteo (ver apéndice).
10. Antes de leer la placa, homogeneizar la población de gusanos agitando suavemente a mano (rotando la microplaca en la mesa) durante 5 segundos.
11. Registrar la actividad de los gusanos usando WMicrotracker durante 10 minutos.
12. Repetir la homogeneización de la placa suavemente a mano y luego, girar la placa para que el pocillo A1 ahora esté en el lado inferior derecho del equipo (placa invertida) y adquirir la actividad locomotora de los gusanos durante 10 minutos más.

Análisis:

13. Generar el informe de ambas adquisiciones.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

14. Calcular la actividad promedio obtenida para cada pocillo y canal en ambas adquisiciones (placa derecha e invertida).

Criterios de aceptación:

- Pocillos: La desviación entre la actividad máxima y mínima de los pocillos debe ser menor al 25% de la actividad promedio de los pocillos.
- Canales: La desviación entre la actividad máxima y mínima de los canales debe ser menor al 35% de la actividad promedio de los canales.

Sugerencias a tener en cuenta para el pipeteo de la solución de nematodos:

- Agregar un exceso de volumen del 25% en el reservorio de pipeteo.
- En la primera vez de pipetear, lavar la punta pipeta pipeteando el contenido hacia arriba y hacia abajo en la cultura de *C. elegans* al menos cuatro veces. (1)
- Agitar el reservorio de la pipeta girando suavemente antes y durante el pipeteo, utilizando su mano libre.
- Mantener el nivel de pipeteo a unos pocos milímetros del fondo del reservorio cada vez que se pipetea.
- Comprobar visualmente que no haya burbujas ni puntas vacías presentes cada vez.

B) CURVA DE GUSANOS:

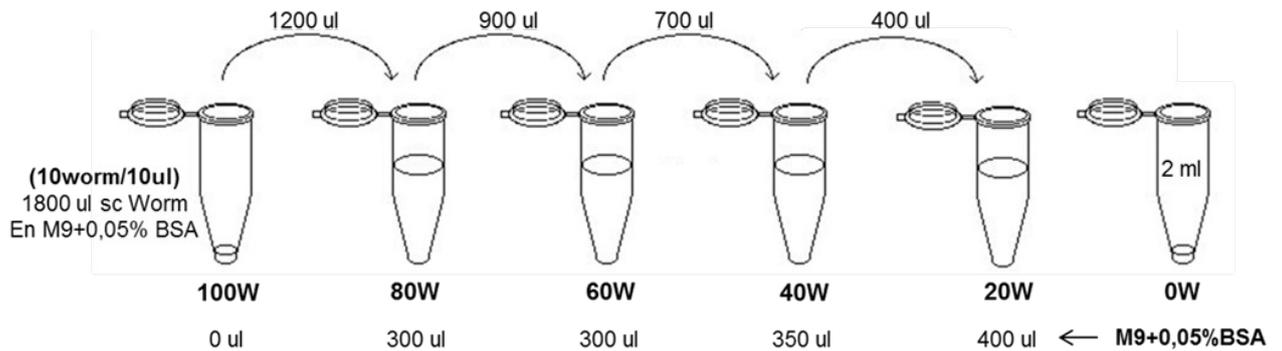
Material es necesarios:

- 1 placa NGM (10 cm) con gusanos adultos sincronizados.
- Tubo de 15 mL.
- Microplaca fondo plano de 96 pocillos.
- WMicrotracker.
- p20/ p200 /p1000
- Puntas.
- Eppendorf.
- Buffer M9 + BSA 0.05%

Protocolo:

1. Recolectar gusanos adultos jóvenes de la placa usando buffer M9 y transferirlos a un tubo estéril de 15 mL.
2. Dejar que los gusanos se asienten durante aproximadamente 3 minutos (los gusanos adultos caerán por gravedad al fondo del tubo).
3. Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta P1000 teniendo cuidado de no perturbar el pellet.
4. Realizar un lavado con 3 ml de buffer M9. Agitar o invertir brevemente el tubo.
5. Repetir el paso de decantación. Desechar el sobrenadante y agregar 2 ml de buffer M9.
6. Homogeneizar la suspensión agitando el tubo a mano 3 veces. Contar el número de gusanos en 10 μ l de solución. Repetir tres veces y calcular el número promedio de gusanos/10 μ l.
7. Preparar una suspensión para obtener [10 gusanos/10 μ l]. Ajustar el volumen en buffer M9 suplementado con 0.05%BSA.
8. Realizar diluciones de la solución de gusanos según se indica en el esquema:

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025



9. Transferir 100ul de cada tubo conteniendo distinto número de gusanos a una placa de 96 pocillos fondo plano, como se indica en el esquema (por cuatuplicado cada condición).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	0W	20W	40W	60W	80W	100W						
F												
G												
H												

10. Registrar durante 20 minutos utilizando el Modo 1_ Threshold Avrg (Default.Agar&Liquid)
- Treshold 1.8

Análisis:

11. Generar el reporte de actividad.
12. Contar el número real de gusanos en cada pocillo y sacar el promedio de gusanos por condición.
13. Graficar actividad de gusanos versus el número promedio real de gusanos por pocillo en un gráfico de dispersión.
14. Evaluar el ajuste a una recta de la actividad entre 20 y 80 gusanos.

Criterio de aceptación:

- El ajuste de la recta a los puntos debe presentar un R2 mayor a 0.9.

Calibración de la sonda de temperatura interna

Material necesario:

- Termómetro de referencia calibrado.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

Procedimiento:

1. Colocar el termómetro dentro del equipo.
2. Luego de 10 minutos, realizar una adquisición en el equipo.
3. Registrar la temperatura que indica el software y la temperatura del termómetro.

Criterio de aceptación:

La diferencia de temperatura entre la indicada por la sonda de temperatura del dispositivo y el termómetro de referencia no debe ser mayor a 1°C.

Plan de contingencia:

Calibrar nuevamente la sonda de temperatura:

1. Ir a File/ Advanced / Factory Settings.
2. Ingresar la temperatura que indica el termómetro de referencia en el casillero Calibration T*.
3. Hacer click en SET.

Ejemplo procedimiento de calibración para WMicrotracker de acuerdo a ISO17025

ANEXO V: Mantenimiento preventivo: Ajuste preventivo y limpieza

1) Limpieza del sistema óptico

Material necesario:

- Mini aspiradora Brigii Y120 Pro, aspiradora de aire y bomba, recargable por USB.
- adaptador con tubo 6mm diam de aspiración

Procedimiento:

Mediante el uso de una mini aspiradora tipo Bridgii y el tubo adaptador se procede a recorrer la superficie microperforada aspirando las partículas sólidas que puedan haberse depositado sobre esta.

2) Verificación del correcto cierre mecánico de puerta

Material necesario:

- alineador plantilla microperforada (para well de 96Flat o U bottom de acuerdo a ensayo)

Procedimiento:

Se verifica que el ajuste de la puerta sea adecuado mediante la alineación de la plantilla microperforada con los microhaces, utilizando la grilla generada por el software propietario provisto.

En caso de detectarse que la bandeja no se desliza suavemente, se lubrica la guía de bandeja con grasa vaselinada (similar a Aceitex Super Grasa Vaselinada)

Verificación del estado de regatones y nivel del equipo

Material necesario:

nivel de burbuja o de aire

Procedimiento:

1. Verificar que los 4 regatones inferiores estén en buen estado de integridad.
2. Verificar la horizontalidad del plano liso donde apoyan los regatones del equipo con un nivel de burbuja o de aire.
3. Repite la operación sobre la carcasa superior del equipo.
4. Ambos deben estar correctos.

Después del mantenimiento preventivo, se hacen ensayos de funcionalidad de acuerdo al chequeo periodico recomendado.