

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ГЕПАТИТА E (HEV)

## 1876-12, HEV IgM

Каталог. № : 1876-12  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 04-09-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### Двухшаговая инкубация, Принцип непрямого анализа

Анализ	HEV IgM ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА: захват антител
Диапазон обнаружения	Качественный: положительный и отрицательный контроль, cut-off
Образец	10 мкл
Специфичность	100%
Чувствительность	97.1%
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12 -14 мес.

\*Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для медицинского заключения. Принять во внимание историю болезни пациента и дальнейшие тесты.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА HEV IgM предназначен для постановки клинического диагноза лабораториями и лечение пациентов с подозрением на вирус гепатита E. Настоящий набор ИФА представляет собой иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов для качественного определения антител IgM-класса к вирусу гепатита E в человеческой сыворотке/плазме.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ АНАЛИЗА

(См. в оригинале инструкции).

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор ИФА HEV IgM использует твердую фазу, двухступенчатую инкубацию, анализ захвата антител. Антитела, направленные на человеческие белки иммуноглобулина М (анти-и цепочка) предварительно наносят на полистирольные микролуночные стрипы. На первом этапе инкубации добавляется образец сыворотки или плазмы пациента. В этот момент любые антитела IgM-класса захватываются в лунках. Далее, все другие компоненты образца вымываются, особенно любые антитела IgG-класса. Что становится видимым после добавления рекомбинантных антигенов HEV ORF2, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат), который представляет собой специфические антитела IgM-класса к HEV на твердой фазе. В ходе второго этапа инкубации HRP-конъюгированные антигены индивидуально реагируют с антителами IgM-класса к HEV. Хромогенные растворы добавляются после промывания лунок для удаления несвязанного HRP-конъюгата. В этот момент, когда присутствует иммунокомплекс (анти-и) - (анти-HEV-IgM)-(HEV Ag-HRP), образуется продукт синего цвета, который является результатом бесцветных хромогенов гидролизованных связанным HRP-конъюгатом. После остановки реакции серной кислотой, синий цвет изменится на желтый. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител, захваченных в лунках и, соответственно, в образце. Бесцветные лунки появляются, когда образцы отрицательны к HEV- IgM.

### КОМПОНЕНТЫ

- Микролуночные стрипы, зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем. 12x8-луночных стрипов на планшет. Каждая лунка содержит анти-IgM антитела (анти-и цепочка). Микролуночные стрипы могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8 °С.

- Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтоватая жидкость во флаконе с зеленой крышкой 0,5 мл во флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к HEV антителам.  
Консерванты: 0,1% Проклин 300  
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой 0,5 мл во флаконе  
Очищенные антитела IgM-класса, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % Проклин 300  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- Разбавитель образцов, 1 фл**  
Голубая жидкость в белом флаконе с голубой крышкой 12 мл во флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, казеин и раствор сахарозы  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- HRP-конъюгат реагент, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной/оранжевой крышкой 12 мл во флаконе  
Рекомбинантные антигены HAV, конъюгированные пероксидазой хрена.  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- Промывочный буфер, 1 бут.**  
**Разбавить перед использованием**  
Бесцветная жидкость 50 мл в бутылке  
РН 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)  
Концентрат необходимо разбавить 1:20 дистиллированной/деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабильны одну неделю при комнатной температуре или две недели при 2-8 °С.
- Раствор хромогена А, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой 7 мл во флаконе  
Раствор перекиси мочевины  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой 7 мл во флаконе  
TMB раствор, TMB растворенный в лимонной кислоте  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны месяц при 2-8 °С.
- Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой. 7 мл во флаконе  
Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Готовый к использованию
- Полиэтиленовый пакет, 1 шт.**  
Для неиспользуемых стрипов
- Картон для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения.
- Инструкция, 1 копия**

### Требуемые, но не поставляемые материалы

- Свежая дистиллированная или деионизированная вода
- Одноразовые перчатки и часы
- Контейнер для отходов.
- Сменный лоток V-формы.
- Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
- Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
- Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5 °С.
- Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
- Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
- Микропланшетная система для аспирации / промывания.

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна стугиться природным путем. Необходимо проследить, что б образцы сыворотки не содержали микроорганизмов. Любые видимые частицы в образце необходимо удалить

центрифугированием при 3000 об/мин 20 минут при комнатной температуре или фильтрацией на 0,22 м фильтре. Плазма, собранная в EDTA, цитрат натрия или гепарин может тестироваться, но нельзя использовать высоко липемические, иктерические или гемолизированные образцы, что могут дать фальшивые результаты. Не нагревайте инактивированные образцы. Это может вызвать ухудшение образцов.

2. **Транспортировка и хранение:** Храните образцы при 2-8 °С. Образцы, что не будут анализироваться в течение 3 дней необходимо заморозить до -20 °С или ниже. Избегайте многократных замораживания / оттаивания.

#### СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПРОМЫВКИ

1. Правильная процедура промывания важна для корректных и точных данных.
2. Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный вошер хорошего качества. В основном требуется не менее 5 мощных циклов при 350-400 мкл на лунку для предотвращения фальшиво положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое лунок, а дайте возможность планшетному вошеру автоматически аспирировать его.
4. Мы рекомендуем калибровать вошер. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносит достаточное количество объема, промывочного буфера.
5. При ручном промывании необходимо 5 циклов промывания при 350-400 мкл на лунку и аспирировать жидкость 5 раз. Если получены низкие результаты, увеличьте количество циклов промывания и время выдержки.
6. При аспирации жидкости из лунок, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
7. Концентрированный промывочный буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного планшета смешайте 50 мл концентрата с 950 мл воды до конечного объема 1000 разбавленного промывочного буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем промывочного буфера.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока пригодности, указанной на этикетке при хранении при 2-8°C, **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

##### **ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОФЕССИОНАЛАМИ**

ELISA анализ является чувствительным к температуре и времени. Для точных результатов строго следуйте инструкции.

1. Не меняйте реагенты разных лотов и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
2. Убедитесь, что все реагенты соответствуют своему лоту. Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
3. Приведите реагенты к комнатной температуре (18-25°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
4. Используйте только необходимый объем, как указано в шагах процедуры. Иначе это может вызвать низкую чувствительность анализа.
5. Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности лунок; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания лунок после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.
8. Избегайте длительных перерывов между шагами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех лунок.
9. Калибрируйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
10. Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
11. Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37°C.
12. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну лунок.
13. При измерении планшетным считывателем, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
14. Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированными.

15. Материалы человеческого происхождения могут использоваться в этом наборе. Однако, строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
16. Сыворотка быка может использоваться в DAI HEV набора. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) и сыворотка фетального тельца (FCS) взята из животных BSE/TSE свободных географических территорий.
17. Наконечники пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при 121°C или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
18. Стоп раствор является сильной кислотой. **ЯДОВИТЫЙ**. Используйте осторожно. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте водой. Проклин 300, что используется в качестве консерванта, может вызывать раздражение кожи.
19. На энзимную активность HRP-конъюгата могут влиять пыль и реактивные химикалии и вещества, как гипохлорид натрия, кислоты, щелочи и т.п. Не проводите анализ при присутствии этих веществ.
20. Лист безопасности материалов доступен по требованию.
21. Если используется автоматическая система, во время инкубации не накрывайте планшет. Вытряхивание остатков из планшета также можно пропустить.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) за 15-30 минут. Проверьте концентрат промывочного буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный промывочный буфер 1:19 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления промывочного буфера.
2. **Число лунок:** Поместите необходимые полоски в держатель, что включают лунки для трех отрицательных контролей (например, **B1, C1, D1**), двух положительных (напр., **E1, F1**) и одного бланка (**A1**, в эту лунку не добавляются ни образцы, ни HRP-конъюгат). Если результаты будут определяться при использовании двойной длины волны, использование бланка можно пропустить. Используйте только необходимое число полосок.
3. **Добавление разбавителя:** Добавьте **100 мкл** разбавителя образца в каждую лунку, кроме лунки бланка.
4. **Добавление образца:** Добавьте **10 мкл** положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие лунки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Смешайте легким постукиванием по планшету.
5. **Инкубация образца (1):** Накройте планшет и инкубируйте **30 минут при 37°C**. Рекомендуется использовать водяной резервуар для поддержания стабильной температуры и влажности во время инкубации. Если используется сухой инкубатор, не открывайте двери часто.
6. **Промывание (2):** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** мощным буфером. Каждый раз выдержите лунки 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
7. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
8. **Инкубация HRP-конъюгата (2):** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37°C**.
9. **Промывание (2):** После окончания инкубации, удалите и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** разбавленным мощным буфером как в **этапе 6**.
10. **Образование окраса:** Внесите **50 мкл** хромогена А и **50 мкл** хромогена В в каждую лунку, включая **бланк** и смешайте постукиванием по планшету. Инкубируйте планшет **15 минут при 37°C**, в темном месте. Энзимная реакция между хромогеном А/В вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и анти-HEV положительном образце.
11. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл** **стоп раствора** в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и анти-HEV положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
12. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель бланком и считайте абсорбцию при **450 нм**. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите длину волны при **630 нм**. Вычислите величину исключения и оцените результаты (Примечание: считайте абсорбцию в течении 5 минут после остановки реакции).

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый планшет должен приниматься отдельно, несмотря на количество анализируемых планшетов. Результаты вычисляются как отношение ОП образца к величине исключения (СО). Если величина исключения была считана на планшетном считывателе с одним фильтром, результаты необходимо вычислять отниманием ОП лунки бланка от напечатанных величин образцов и контролей. Если считывается на планшетном считывателе с двойным фильтром, не снимайте ОП лунки бланка от напечатанных образцов и контролей.

### 1. Вычисление порогового значения (СО) = \*Nc+0,26

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

**Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже 0,02, принимайте ее как 0,02. Если выше 0,02, смотрите диапазон контроля качества.**

#### Пример:

- Вычисление Nc:  
№ ячейки B1 C1 D1  
ОП отрицательных контролей 0,02 0,012 0,016  
Nc = 0,016 (значение Nc ниже 0,02, поэтому его следует принимать как 0,02)
- Вычисление порогового значения (СО) = 0,016 + 0,26 = 0,276

Если один из отрицательных контролей не соответствует спецификации диапазона контроля качества, его необходимо отбросить и вычислить среднее двух оставшихся величин. Если ОП более чем одного контроля не соответствует спецификации диапазона контроля качества, тест неверный и его нужно повторить.

### 2. Диапазон контроля качества

Тестовые результаты достоверны, если выполнены критерии контроля качества. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

- Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор ниже 0,080 при 450 нм.
- Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фоновое определения (бланка).
- Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фоновое определения.

### 3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция каждого образца)

**Отрицательные результаты (S/CO < 1):** образцы, что дали абсорбцию ниже величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие антител IgM-класса к вирусу гепатита Е. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HEV.

**Положительные результаты (S/CO ≥ 1):** образцы дали абсорбцию выше или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие антител IgM-класса к гепатиту Е. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на антитела IgM-класса к HEV и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом Е.

**Граничные значения: (S/CO = 0,9-1,1):** образцы с абсорбцией величины исключения между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HEV.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Экспериментальные данные исследований в лаборатории производителя: граничное значение (cut-off) = 0,286. Значения абсорбции (ОП) приведены ниже:

Отрицательный образец			Положительный образец		
1	2	3	Контроль	Слабый	Сильный
0,028	0,008	0,042	1,978	2,610	2,562

Рабочие характеристики чувствительности и специфичности.

Реагенты	HEV IgM		Референт. ИФА HEV IgM	
	-/всего	Специфичность	+/всего	Чувствительность
ИФА HEV IgM	273/273	100.0	47/48	97.9
ИФА IgM	264/273	96.7	35/48	72.9
ИФА IgG	233/273	85.4	45/48	93.8

Место	HEV IgM		Референт. ИФА HEV IgM		Референт. ИФА HEV IgG	
	+/всего	Чувствит.	+/всего	Sens.	+/всего	Чувствит.
1	135/140	96.4%	112/140	80.0%	---	---
2	47/48	97.9%	35/48	72.9%	45/48	93.8%
3	123/126	97.6%	109/126	86.5%	---	---
Всего	305/314	97.1%	256/314	81.5%	45/48	93.8%

Тип образца	К-во	В процедуре		Между процедурами	
		Среднее S/CO	КВ%	Среднее S/CO	КВ%
Слабо положит.	10	3.93	8.1%	3.85	8.5%
Умеренно положит.	10	9.52	7.3%	9.37	7.6%
Сильно положит.	10	17.80	4.6%	17.67	5.1%

### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Отрицательный результат при определении антитела не исключает возможность инфекции. Антитела могут не определяться во время ранних стадий заболеваний и в некоторых иммунодепрессивных индивидов.
- Если после повторного анализа первично реактивных образцов результаты анализа остаются отрицательными, эти образцы необходимо считать неповторяемыми (ошибочно положительными) и интерпретировать как отрицательные. Как и в других очень чувствительных ИФА, ошибочно положительные результаты могут случаться по нескольким причинам, большинство из которых относятся, но не ограничиваются, к несоответствию промывочного этапа.
- Все положительные результаты необходимо подтверждать другими имеющимися методами и интерпретировать, принимая во внимание клиническую информацию о пациенте.
- Распространенные ошибки: закончился срок пригодности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Преобладание маркера влияет на величины анализа.
- Ошибочно отрицательные результаты могут происходить от ингибирования специфического IgM в присутствии высоких титров специфического IgG. Удаление IgG может быть полезно для предотвращения ложных отрицательных результатов и используемых для этого методов в другом месте.
- Это набор предназначен ТОЛЬКО для анализа отдельно взятых образцов сыворотки или плазмы. Не использовать для анализа трупных образцов, слюны, мочи или других биожидкостей или собранной (смешанной) крови.
- Этот анализ является качественным, его результаты не можно использовать для измерения концентрации антител.

### ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

- Значения положительного и отрицательного контролей выходят за границы контроля качества, что указывает на загрязнение реагентов и/или ошибку оператора или оборудования. В таком случае следует повторить анализ. После повторного получения неверных результатов, возьмите новые реагенты.
- Если после смешивания растворов хромогена А и хромогена В в ячейке, цвет смеси превращается на голубой в течении пяти минут, не продолжайте тестирование и замените реагенты.

### ГОДНОСТЬ

**Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке набора и этикетках реагентов.**



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»