

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е (HEV)

## 1877-12, HEV Ab

Каталог. № : 1877-12

Методика от 06-09-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



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 Ab ELISA  |
|----------------------|---|
| Метод                | Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов  |
| Принцип              | Сэндвич ИФА: двойной антиген                                  |
| Диапазон обнаружения | Качественный: положительный, отрицательный контроль и cut-off |
| Образец              | 50 мкл  |
| Специфичность        | 99.60%  |
| Чувствительность     | 99.80%  |
| 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

Цель набора ИФА HEV Ab - использование в качестве вспомогательного средства в научно-исследовательской лаборатории диагностики зооноза и вируса гепатита Е, передаваемого человеком. ИФА HEV Ab является иммуноферментным анализом для качественного определения общих антител (IgG, IgM и т.д.) к вирусу гепатита Е в сыворотке/плазме животных. Предназначен для диагностики *In Vitro*.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ АНАЛИЗА

(См. в оригинале инструкции).

#### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Рекомбинантные антигены HEV (HEV-Ag), соответствующие структурным белкам ORF-2 нативного вируса, предварительно нанесены на полистирольные стрипы этого набора ИФА, используемого образцы сыворотки или плазмы, которые пипетируются в лунки. Предварительно нанесенные антигены будут связываться со всеми присутствующими антителами к HEV, и на первой стадии инкубации, образуется специфический иммунный комплекс, захваченный на твердой фазе. Далее, важно промыть лунки так, чтобы любые несвязанные сывороточные белки были удалены. Добавленный после этого в лунки второй рекомбинантный антиген HEV конъюгируется с пероксидазой хрена (HRP). Этот антиген, на второй стадии инкубации, связывается со вторым переменным доменом антител к HEV, если они были захвачены HEV-антигеном на первом этапе инкубации. Затем несвязанный конъюгат пероксидазы хрена удаляется промывкой лунок. В лунки добавляются лунки растворы хромогена, содержащие тетраметилбензидин (ТМБ) и перекиси мочевины. Это делается в присутствии сэндвич-комплекса антиген-антитело-антиген (HRP). Появляется продукт синего цвета, когда бесцветные хромогены гидролизуются связанным HRP-конъюгатом. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител, захваченных в лунках, а также в образце соответственно. Бесцветные лунки появляются, когда образцы являются негативными к HEV.

#### Схема принципа анализа: сэндвич-ИФА с двойным антигеном

(См. в оригинале инструкции).

#### КОМПОНЕНТЫ

- Микролуночные стрипы, зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.
- 12x8-луночных стрипов на планшет.

Каждая лунка содержит рекомбинант HEV антигенов. Микролуночные стрипы могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.

- Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Голубая 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°C.
- Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой  
0,5 мл во флаконе  
анти-HEV антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1% Проклин 300  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- Разбавитель образцов, 1 фл**  
Голубая жидкость в белом флаконе с голубой крышкой  
6 мл во флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, казеин и раствор сахарозы  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- HRP-конъюгат реагент, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной/оранжевой крышкой  
12 мл во флаконе  
Рекомбинирующие антигены HAV, конъюгированные пероксидазой хрена.  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- 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°C.
- 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°C.
- Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой  
7 мл во флаконе  
ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны месяц при 2-8°C.
- 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°C.
- 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 мкм фильтр. 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 °C. Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до -20 °C 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 моющих 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 вносится достаточное количество объема, моющего 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 моющего буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем моющего 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.

#### ПРЕДОТВЕРЖДЕНИЯ 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. Калибруйте 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 раздражении 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 моющего буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный промывочный буфер 1:20 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления моющего 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 **50 мкл** разбавителя образца в каждую лунку, кроме лунки бланка.
4. **Добавление образца:** Добавьте **50 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:** 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:** После окончания инкубации, выньте и выбросите накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** моющим 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:** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37 °C**.
9. **Промывание:** После окончания инкубации, удалите и выбросите накрыватель. Промойте каждую лунку 5 раз разбавленным моющим буфером как в **этапе 6**.
10. **Образование окраса:** Внесите **50 мкл** хромогена **A** и **50 мкл** хромогена **B** в каждую лунку, включая **бланк** и смешайте постукиванием по планшету. Инкубируйте планшет **15 минут при 37°C**, в темном месте. Энзимная реакция между хромогеном **A/B** вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и анти-HEV положительном образце.
11. **Остановка реакции:** Используйте 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 отнимайте ОП лунки бланка от напечатанных образцов и контролей.

### 1. Вычисление порогового значения (СО) = \*Nc+0,12

\*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.**

|  |      |       |       |
|--|------|-------|-------|
| <b>Пример:</b>   |      |       |       |
| 1. 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) |      |       |       |
| 2. Вычисление порогового значения (СО) = 0,016 + 0,12 = 0,136              |      |       |       |

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.

1. Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор меньше 0,080 при 450 нм.
2. Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фонового определения (бланка).
3. Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фонового 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 к вирусу гепатита E. 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 антитела к гепатиту E. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на антитела HEV и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом E.

**Граничные значения:** 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 антитела к HEV.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Экспериментальные данные исследований в лаборатории производителя: граничное значение (cut-off) = 0,19. Значения абсорбции (ОП) приведены ниже:

| Отрицательный образец |       |       | Положительный образец |        |         |
|-----------------------|-------|-------|-----------------------|--------|---------|
| 1                     | 2     | 3     | Контроль              | Слабый | Сильный |
| 0.030                 | 0.008 | 0.042 | 1.934                 | 1.839  | 2.441   |

Обнаружение общих антител к HEV в образцах от пациентов через 10 лет после заражения HEV:

| Реагенты | Образцы | Пол.% | Cut-off | ОП полож. образцов |        |        | Средн. полож. S/CO |
|----------|---------|-------|---------|--------------------|--------|--------|--------------------|
|          |         |       |         | Низк.              | Средн. | Высок. |                    |
| WT Ab*   | 50      | 83    | 0.150   | 0.418              | 1.573  | 2.415  | 10.2               |
| EIA 1**  | 50      | 36    | 0.530   | 0.514              | 1.018  | 2.415  | 1.98               |
| EIA 2**  | 50      | 30    | 0.215   | 0.229              | 0.457  | 1.094  | 2.08               |

\* Набор ИФА HEV Ab компании Диагностик Аутомейшн.

\*\* Коммерчески доступный набор ИФА HEV IgG

### Исследования распространенности анти-HEV среди животных с помощью ИФА HEV-Ab

Распространенность анти-HEV была самой высокой в свиней, 83,34%, затем у крупного рогатого скота, 6,38%. Среди 419 сывороток свиней распространенность анти-HEV и вирусемия HEV составила 78,8% и 1,9% соответственно. Пять частичных геномных последовательностей HEV было получено и классифицировано как генотип-IV HEV.

### Исследования распространенности анти-HEV среди животных

| Животное | К-во исследованных | К-во положительных | Положительный диапазон (%) |
|----------|--------------------|--------------------|----------------------------|
| Свинья   | 8628               | 7191               | 83.34                      |
| Скот     | 392                | 25                 | 6.38                       |
| Коза     | 370                | 5                  | 1.35                       |
| Курица   | 173                | 3                  | 1.73                       |

### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ИФА. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности и «сэндвич-модель» минимизирует неспецифические реакции, что может проявляться через влияние между неизвестными частицами в образце.
2. 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.
3. Преобладание маркера влияет на величины анализа. Этот анализ является качественным, его результаты не можно использовать для измерения концентрации антител.

### ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

1. 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.
2. 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.Черновола, 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)