



Иммуноферментный набор для качественного определения антител к вирусу гепатита Е в человеческой плазме

Каталог. № : KHE1IW
Количество тестов: 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 08-2005

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO
Набор может использоваться для скрининга единиц крови и наблюдения за пациентами, инфицированными вирусом гепатита Е (HEV)

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Микролуки покрыты HEV-специфичными синтетическими антигенами, предназначенными для определений консервативных и иммунодоминантных детерминантов, полученных из мексиканского и бирманского штамма вируса.

В твердой фазе анализа сначала используется разбавленный образец, в которой захватываются антигенами антитела HEV, при их наличии.

После вымывания всех других компонентов образца, во 2-ой инкубации связанные антитела HEV, также IgG и IgM, обнаруживаются путем добавления поликлональных специфических анти-человеческих антител IgG и M, маркированных пероксидазой (HRP).

Фермент, захваченный в твердой фазе, реагирующий на смеси субстрата/хромогена, производит оптический сигнал, который является пропорциональным количеству анти-HEV антител, присутствующих в образце. Пороговое значение позволяет интерпретировать оптические плотности как отрицательные и положительные результаты антитела HEV.

КОМПОНЕНТЫ

- Микропланшет:** 1 планшет, 12 полосок по 8 микролунок, покрытых HEV специфическими синтетическими антигенами. Планшеты герметично закрыты в пакете с осушителем.
- Отрицательный контроль:** 2x2,0 мл/фл. Готовый к использованию контроль. Содержит 1% протеинов козьей сыворотки, 10 mM буфера цитрата Na pH 6.0+/-0.1, 0.5%, Tween 20, 0.09% азида Na и 0.1% катона GC в качестве консервантов.
- Положительный контроль:** 1x2,0 мл/фл. Готовый к использованию контроль. Содержит 1% протеинов козьей сыворотки, положительные к HEV человеческие антитела, 10 mM буфера цитрата Na pH 6.0+/-0.1, 0.5%, Tween 20, 0.09% азида Na и 0.1% катона GC в качестве консервантов.
- Калибратор:** 2 фл. Лиофилизированный калибратор. Подлежит растворению указанным на этикетке объемом подготовленной воды. Содержит эмбриональные бычьи сывороточные протеины, человеческие антитела к HEV, чье содержимое откалибровано 1-м, референтным реагентом на антитела к HEV ВОЗ, NIBSC код 95/584, при 4 % +/-10 МЕ/мл, 10 mM буфера цитрата Na pH 6.0 +/-0.1, 0.3 мг/мл сульфата гентамицина и 0.1% катона GC в качестве консервантов.
Замечание: объем, необходимый для растворения содержимого флакона может отличаться в зависимости от партии. Пожалуйста, используйте правильный объем, указанный на этикетке.
- Концентрат промывочного буфера:** 1x50 мл/бут. Концентрированный раствор 20x. После разбавления промывочный раствор содержит 10 mM фосфатного буфера pH 7.0+/-0.2, 0.05%, Tween 20 и 0.1% катона GC.
- Ферментный конъюгат:** 1x16 мл/фл. Готовый к использованию реагент красного цвета. Содержит конъюгированные пероксидазой хрена козы поликлональные антитела к человеческому IgG и IgM, 5% BSA, 10 mM Tris

- буфера pH 6.8+/-0.1, 0.1%, катон GC и 0,02% гентамицина сульфата в качестве консервантов.
- Хромоген/субстрат:** 1x16 мл/фл. Готовый к использованию компонент. Содержит 50 mM цитрат фосфатного буфера pH 3,5-3,8, 4% диметилсульфоксида, 0,03% TMB и 0,02 перекиси водорода.
Примечание: хранить вдали от света, поскольку средство чувствительное к сильному свету.
- Разбавитель:** 1x8 мл/фл. 10 mM раствора Tris буфера pH 8,0+/-0.1, с 0.1% катона GC для предварительной обработки образцов и контролей на планшете. Предотвращает влияние извне.
- Серная кислота:** 1x16 мл/фл. Содержит 0,3 M раствора H₂SO₄. **Внимание:** раздражитель.
- Разбавитель образца:** 1x50 мл/фл. Содержит 10 mM буфера цитрата Na pH 6.0+/-0.1, 0.5%, Tween 20, 0.09% азида Na и 0.1% катона GC в качестве консервантов. Используется для разбавления образца.
Примечание: в присутствии образца разбавитель изменяет цвет от оливкового зеленого к темному сине-зеленому.
- Пленки для накрывания планшета:** 2 шт.
- Инструкция пользователя:** 1 шт.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Откалиброванные микропипетки (200 и 10 мкл) со сменными пластмассовыми наконечниками.
- Подготовленная вода (бидистиллированная или деионизированная и др.).
- Таймер с 600минутным диапазоном или более.
- Промокательная бумага.
- Откалиброванный термостатический инкубатор микропланшетов ИФА на 37°C.
- Откалиброванный микролуночный считыватель для ИФА с диапазоном считывания 450 нм, и также с возможностью установки фильтров (бланков) на 620-630 нм.
- Откалиброванное промывочное устройство для ИФА.
- Вихревые или аналогичные смесители.

Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не смешивайте специфичные реагенты из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
 - Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
 - Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем

состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.

- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Недостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.
- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

ОБРАЗЦЫ: ПОДГОТОВКА И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сбор крови проводится асептически венепункцией и плазма или сыворотка подготавливаются с использованием стандартных методик подготовки образцов для клинического лабораторного анализа. Не наблюдалось никакого влияния при подготовке образца с цитратом, EDTA и гепарином.
2. Избегайте любого добавления консервантов к образцам, особенно азида натрия, так как этот химический продукт повлиял бы на ферментативное действие конъюгата, приводя к отрицательным результатам.
3. Выборки должны быть четко идентифицированы по кодами или названиями, чтобы избежать неверной интерпретации результатов. При использовании набора для скрининга единичной крови, настоятельно рекомендуется использовать метку штрих-кода.
4. Гемолизированные (красные) и явно гиперлипемические ("молочные") образцы должны быть удалены, так как они могут производить ошибочные результаты. Образцы, содержащие остатки фибрина или тяжелые частицы или же нитчатые формы бактерий и

тел, должны быть удалены, поскольку они могут вызывать ошибочные результаты.

5. Сыворотки и плазмы могут храниться при +2-8°C до пяти дней после сбора. Для более длительного хранения образцы могут быть заморожены до -20°C в течение нескольких месяцев. Любые замороженные образцы не должны замораживаться/размораживаться более чем один раз, поскольку это может производить частицы, влияющие на результат анализа.

6. При наличии частиц, центрифугируйте при 2.000 об/мин в течение 20 минут или профильтруйте, используя 0.2-0.8 мкм фильтры для очистки образца для анализа.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Анализ должен быть выполнен согласно тому, что выложено ниже, придерживаясь одного инкубационного времени для всех образцов в анализе.

Автоматизированный анализ:

В случае, если анализ выполняется автоматически системой ИФА, мы предлагаем настроить аппарат на аспирацию 200 мкл разбавителя образца и затем 10 мкл образца.

Затем вся смесь тщательно распределяется прямо в соответствующую лунку образца на микропланшете. Перед аспирацией следующего образца иглы должны быть соответствующим образом промыты во избежание любого перекрестного загрязнения между образцами.

Распределите 200 мкл контролей / калибратора в соответствующие лунки контроля / калибратора.

Важное замечание: проследите, чтобы образцы были разбавлены и распределены в соответствующие лунки. Это просто сделать, проверив, что цвет распределенных образцов изменился на темный синевато - зеленый, в то время как цвет отрицательного контроля остался оливково-зеленым.

Для последующих операций следуйте инструкциям по использованию, указанным ниже для ручного анализа.

Настоятельно рекомендуется проверять вычислением аппаратом времени между распределением первого и последнего образца, принимая во внимание задержку во время первой промывки соответственно.

Ручной анализ:

1. Разместите требуемое количество микролунок в штативе. Оставьте 1-ю лунку пустой для операции бланкирования.
2. Распределите 200 мкл отрицательного контроля в трех экземплярах, 200 мкл калибратора в двойном экземпляре и 200 мкл положительного контроля в одном экземпляре в соответствующие лунки.
3. Добавьте 200 мкл разбавителя образца (DILSPE) во все лунки с образцами; тогда распределите 10 мкл образца в каждую, должным образом распознанную лунку, осторожно перемешайте планшет, избегая переливания и загрязнения близлежащих лунок, чтобы полностью растворить образец в его разбавителе.

Важное замечание: удостоверьтесь, что цвет разбавителя образца после добавления образца изменяется от светло-зеленого на темный синевато-зеленый, проверяя, что образец был действительно добавлен.

4. Распределите 50 мкл разбавителя образца (DILAS) во все лунки контролей / калибратора и образца.

Проверка(запорный клапан), которую цвет выборки вращался к синей темноте.

5. Инкубируйте микропланшет в течение **45 минут при +37°C**.

Важное замечание: полоски должны быть герметично закрыты с поставляемой липкой пленкой только когда анализ проводится вручную. Не накрывайте полоски при использовании автоматических аппаратов для ИФА.

6. Промойте микропланшет автоматическим промывающим устройством путем вливания и аспирации 300 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора.

7. Пипетируйте 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, кроме 1-й лунки бланка, и накройте пленкой.

Проверьте, чтобы этот компонент красного цвета был внесен во все лунки. Кроме лунки А1.

Важное замечание: Будьте осторожны, чтобы не коснуться внутренней пластмассовую поверхности лунки наконечником. заполненным ферментным конъюгатом. Может произойти загрязнение.

8. Инкубируйте микропланшет в течение **45 минут при +37°C**.

9. Промойте микролунки как в п. 6.

10. Пипетируйте 100 мкл смеси хромогена/субстрата в каждую лунку, включая лунки бланка. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (18-24°C) в течении 15 минут.

Важное замечание: Не подвергайте влиянию сильного прямого света. Может образоваться высокий фон.

11. Для остановки ферментативной реакции раскатайте 100 мкл серной кислоты во все лунки, следуя той же самой последовательности пипетирования как и в п. 10. Добавление кислоты превратит положительный контроль и положительные образцы из синего цвета в желтый.

12. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке при 450 нм фильтра считывания и как вариант при 620-630 нм (фоновая субтракция), проведя слепой тест аппаратом на А1.

Важные замечания:

1. Если второго фильтра нет в наличии, убедитесь перед считыванием, что никаких следов пальцев на дне микролунки нет.

2. Считывание должно быть выполнено только после добавления стоп раствора, и в любом случае не позднее чем через 20 минут после его добавления. Иногда может происходить самоокисление хромогена, приводя к высокому фону.

Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя. При использовании вышеуказанного оборудования, спектрофотометрическое считывание будет проводиться автоматически при 3 различных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом, позволяя расширить диапазон кривой.

Метод	Действия
Контроли и калибратор	200 мкл
Разбавитель образца + образцы	200 мкл разбавителя образца
Разбавитель (DILAS)	+ 10 мкл образцов 50 мкл
1-я инкубация	45 мин.
Температура	+37°C
Этап промывки	4-5 циклов 300 мкл/лунку
Ферментный конъюгат	100 мкл
2-я инкубация	45 мин.
Температура	+37°C
Этап промывки	4-5 циклов 300 мкл/лунку
ТМВ/Н2О2	100 мкл
3-я инкубация	15 мин.
Температура	КТ
Серная кислота	100 мкл
ОП считывания	450 нм

Пример схемы распределения приведен ниже:

МИКРОПЛАНШЕТ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Сокращения: BLK = бланк NC = отрицательный контроль
CAL = калибратор PC = положительный контроль S = образец

ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверка проводится с использованием контролей и калибратора при каждом использовании набора, чтобы проверить соответствие значений их ОП 450 нм ожидаемым значениям, указанным в таблице ниже:

Проверка	Требования
Лунка бланка	< 0.100 значение ОП при 450 нм
Отрицательный контроль (NC)	< 0.050 среднее значение ОП при 450 нм после слепого теста
Калибратор	S/Co > 1
Положительный контроль	> 1.000 значение ОП при 450 нм

Если результаты анализа соответствуют требованиям, указанным выше, переходите к следующему этапу. Если нет, дальше не продолжайте и сделайте следующее:

Проблема	Проверка
Лунка бланка > 0.100 ОП 450 нм	1. Раствор хромогена/субстрата не был загрязнен во время анализа
Отриц. Контроль (NC) > 0.050 ОП 450 нм после слепого теста	1. Процедура промывки и настройки устройства для промывки соответствуют данным проверки перед исследованием; 2. Был использован правильный промывочный раствор и промывочное устройство было проверено перед его использованием; 3. Не было допущено ошибки в процедуре анализа (распределения положительного контроля вместо отрицательного); 4. Не произошло загрязнения отрицательного контроля или его лунок, поскольку образцы положительные, нет разливания, ферментный конъюгат в норме; 5. Микропипетки не были загрязнены положительными образцами или ферментным конъюгатом; 6. Промывочные голки не заблокированы или частично засорены.
Калибратор S/Co < 1	1. Процедура была проведена правильно; 2. Не было ошибок в распределении (напр.: в распределении отрицательного контроля вместо калибратора); 3. Процедура промывки и настройки промывочного устройства были проверены перед его использованием; 4. Не произошло внешнего загрязнения калибратора.
Положит. контроль < 1.000 ОП 450 нм	1. Процедура была проведена правильно; 2. Не было ошибок в распределении контролей (напр.: в распределении отрицательного контроля вместо положительного); В этом случае отрицательный контроль будет иметь значение ОП 450 нм > 0.150. 3. Процедура промывки и настройки промывочного устройства были проверены перед его использованием; 4. Не произошло внешнего загрязнения положительного контроля.

При возникновении этих проблем после проверки, сообщите о проблеме вышестоящему лицу для предпринятая дальнейших действий.

ВЫЧИСЛЕНИЕ ПОРОГОВОГО ЗНАЧЕНИЯ

Результаты анализа рассчитываются посредством среднего значения ОП 450 нм отрицательного контроля и математического вычисления, чтобы определить пороговое значение:

Пороговое значение = среднее отриц. контроля ОП 450 нм + 0.350

Полученное в анализе значение используется для интерпретации результатов, как описано в следующем разделе.

Важное замечание: При вычислении результатов оперативной системой автоматической станции ИФА убедитесь в использовании правильной формулы для вычисления порогового значения и проведите правильную интерпретацию результатов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты интерпретируются как соотношение значения ОП образца при 450 нм и порогового значения (или S/Co) согласно следующей таблицы:

S/Co	Интерпретация
< 0.9	Отрицательный
0.9 - 1.1	Сомнительный
> 1.1	Положительный

Отрицательный результат указывает, что пациент не был инфицирован HEV или что единица крови может быть перелитой.

Любой пациент, показывающий сомнительный результат должен быть проверен на втором образце через 1-2 недели. Единица крови не должна быть перелита.

Положительный результат указывает на HEV инфекцию, и поэтому пациент подлежит соответствующему лечению или единицу крови следует утилизировать.

Пример вычисления приведен ниже:

Последующие данные не должны использоваться как замена или как действительные цифры, полученные пользователем.

Отрицательный контроль: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450 нм

Среднее значение: 0.020 ОП 450 нм

Ниже чем 0.050 – приемлемо

Положительный контроль: 2.189 ОП 450 нм

Более чем 1.000 – приемлемо

Пороговое значение = 0.020+0.350 = 0.370

Калибратор: 0.550 - 0.530 ОП 450 нм

Среднее значение: 0.540 ОП 450 нм

S/Co = 1.4

S/Co более чем 1.0 – приемлемо

Образец 1: 0.070 = ОП 450 нм

Образец 2: 1.690 ОП 450 нм

Образец 1 S/Co < 0.9 = отрицательный

Образец 2 S/Co > 1.1 = положительный

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценка рабочей характеристики проводилась на отрицательных и положительных образцах во внешнем клиническом центре ссылаясь на утвержденный FDA набор.

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Предел обнаружения анализа был рассчитан посредством 1-ого референтного реагента ВОЗ на антитела, NIBSC код 95/584.

Анализ демонстрирует чувствительность около 2 МЕ/мл.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Этот параметр был проверен на больше чем 700 образцах.

2.1 Диагностическая специфичность

Полученная специфичность составила $\geq 99,5\%$.

2.2 Диагностическая чувствительность

Составляет 100%.

ТОЧНОСТЬ

Значения КВ в пределах от 5–10%, в зависимости от ОП 450 нм.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Регулярные ошибочные положительные результаты составили менее чем 1 % совокупности нормы.

Наблюдалось, что замороженные образцы, содержащие частицы фибрина или сгустки после размораживания давали некоторые ошибочные результаты.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com

www.diameb.com

