

HEV ELISA 4.0

Gebrauchsanweisung



Datum der Revision: 2016-02
MBE0011-GER-3

Hinweis: Änderungen hervorgehoben.

REF 23540-096: (96 Tests)

NAME UND VERWENDUNGSZWECK

Der **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** ist ein enzymgebundener immunabsorbierender Assay, der zur Erkennung der Gesamtantikörper von Hepatitis-E-Viren in Humanserum oder -plasma dient. Es wird als Screening-Test verwendet, wobei Wiederholungstests der anfänglich reaktiven Proben notwendig sind.

EINLEITUNG

Das Hepatitis-E-Virus (HEV) ist ein einzelsträngiges, plusstrangorientiertes RNA-Virus ohne Hülle, das 1990 zuerst von Genelabs als enteral-übertragenes Nicht-A-, Nicht-B-Hepatitis-Virus identifiziert wurde (1,2). Der Verlauf der Infektion mit HEV ist in der Regel akut und selbstlimitierend ohne chronische Schäden. Es liegt jedoch eine hohe Sterblichkeitsrate bei schwangeren Frauen im 3. Trimester von ca. 10 bis 20 % (3) und eine Sterblichkeitsrate von 1 bis 2 % in der allgemeinen Bevölkerung vor – dies ist zehnmal höher als bei Hepatitis A (HAV). Durch das Klonen des ätiologischen Agenten der ET-NANBH bei Genelabs und die Identifizierung der gemeinsamen viralen Epitope (1,2) wurden spezifische Diagnosetools entwickelt, um Antikörper gegen HEV zu erkennen.

Größere Epidemien enteral übertragener Nicht-A-, Nicht-B-Hepatitis (ET-NANBH) traten in Entwicklungsregionen auf, z. B. in Asien, der ehemaligen UdSSR, Zentralamerika und Afrika (3,4). Sporadische Fälle wurden in entwickelten Nationen gemeldet, z. B. in Australien, Großbritannien und den Vereinigten Staaten (5,6,7). Die Fälle in entwickelten Nationen standen in der Regel im Zusammenhang mit Reisen in endemische Regionen. Ein gehäufter Nachweis lässt jedoch darauf schließen, dass sporadische Fälle von HEV-Infektionen ohne eine Verbindung zu endemischen Regionen auch in einem großen Bereich nicht-endemischer Gebiete, zum Beispiel Westeuropa, Griechenland, USA, Australien und Taiwan, auftreten (8-17).

In Experimenten wurde nachgewiesen, dass das menschliche HEV Tierarten infizieren kann (18-21), nicht-menschliche Primaten hingegen können mit dem Schweine-HEV infiziert werden (21). Neueste Studien zur Verbreitung der HEV-Infektionen in Tieren zeigen die hohe Seroprävalenz des Antikörpers gegen HEV in verschiedenen Tiersarten, zum Beispiel in Schweinen, Pferden, Nagern usw. Gehäufte Nachweise deuten darauf hin, dass die weite Verbreitung

der HEV-Infektion in Tieren, besonders in Schweinen, ein bedeutendes Reservoir für die Virusübertragung darstellen könnte. Einigen der sporadischen Fälle von HEV-Infektionen in nicht-endemischen Gebieten kann eine zoonotischen Übertragung zugeordnet werden.

Für die Erkennung der gesamten HEV-Antikörper in Humanserum oder -plasma wird ein sehr sensibler und spezifischer HEV ELISA benötigt.

Der **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** verwendet ein geschütztes rekombinantes Antigen, das zwischen verschiedenen HEV-Stämmen (22,23,24) gut konserviert wird, um die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen HEV, zum Beispiel IgG, IgM und IgA, zu erkennen.

BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN SYMBOLE

Die folgenden grafischen Symbole finden Sie in oder auf MP Diagnostics-Produkten und -Verpackungen. Diese Symbole sind die häufigsten, die auf medizinischen Geräten und deren Verpackung verwendet werden. Einige der allgemeinen Symbole sind in der europäischen und internationalen Norm EN ISO 15223: 2012 näher erklärt.

	Verwendbar bis		In-Vitro-Diagnostikum
	Chargenbezeichnung		Bestellnummer
	Temperaturbegrenzung		Vorsicht
	Hersteller		Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Inhalt ausreichend für n Prüfungen		Gebrauchsanweisungen beachten
	Nicht zur Wiederverwendung		
	Inhaltsverzeichnis		

CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Die Wells der Mikroplattenstreifen aus Polystyren sind mit einem geschützten rekombinanten Antigen beschichtet, das ein konformatives Epitop darstellt und zwischen verschiedenen HEV-Stämmen gut konserviert wird. Das HRP-Konjugat wird mit demselben rekombinanten Antigen hergestellt, das als Meerrettichperoxidase bezeichnet wird. Dieses Konjugat wird zunächst ordnungsgemäß im Verdünnungspuffer verdünnt, bevor es in die mit Antigen beschichteten Wells der Mikroplatten gegeben wird. Serum- oder Plasmaproben werden anschließend in die mit Antigen beschichteten Wells hinzugegeben, die den Verdünnungspuffer und das Konjugat enthalten. Nach der Inkubation binden sich die gegebenenfalls vorhandenen HEV-spezifischen Antikörper (IgG, IgM und IgA) sowohl an die Antigene, die in den Wells immobilisiert sind, als auch an das Antigen des Konjugates in der Verdünnung. Danach werden die Wells gründlich gewaschen, um das nicht gebundene Material zu entfernen. Anschließend wird eine Substratlösung, die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) enthält, in jedes Well gegeben. Sind die spezifischen Antikörper vorhanden, wird dies durch die blaue Farbe der Lösung nach der Inkubation angezeigt. Die Reaktion wird durch Hinzugabe von Schwefelsäure abgeschlossen. Die Farbintensität des entstehenden gelben Reaktionsprodukts wird bei 450 nm mit einem Mikroplattenlesegerät gemessen, und die entsprechende optische Dichte oder Absorption ist proportional zum Anteil der Antikörper in der Probe.

- Schwefelsäure kann Verbrennungen verursachen. **VERMEIDEN SIE JEDLICHEN KONTAKT.** Waschen Sie die Haut bei Kontakt mit der Haut gründlich.
- Vermeiden Sie den Kontakt von Schwefelsäure mit Oxidationsmitteln oder Metall.
- Setzen Sie das Substrat nicht starkem Licht aus.
- Beseitigen Sie verschüttetes, potenziell infektiöses Material sofort mit saugfähigem Papier und reinigen Sie den kontaminierten Bereich vor Wiederaufnahme der Arbeiten mit einem effektiven Desinfektionsmittel.

ANALYTISCHE VORSICHTSMAßNAHMEN

- Verwenden Sie nur Serum- oder Plasmaproben, die in EDTA, Heparin, Natriumcitrat, K-Oxalat oder Acid-Citrate-Dextrose (ACD) gesammelt wurden. Vor der Lagerung müssen Blutgerinnsel oder Blutzellen durch Zentrifugierung abgetrennt werden.
- Verwenden Sie kein Vollblut oder andere Körperflüssigkeiten.
- Eine optimale Assay-Qualität setzt die **STRIKTE EINHALTUNG** des Assay-Verfahrens voraus, das in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben wird. Abweichungen vom Verfahren können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- ÄNDERN ODER TAUSCHEN SIE KEINE REAGENZIEN MIT EINER ANDEREN CHARGE.** Kontrollen, Konjugat und Mikroplatten sind für eine optimale Durchführung aufeinander abgestimmt. Verwenden Sie nur die Reagenzien, die mit dem Kit mitgeliefert wurden.
- Verwenden Sie keine Kit-Komponenten über das Verfallsdatum hinaus, das auf der Verpackung des Kits aufgedruckt ist.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien beim Öffnen und Entfernen der Aliquots von den Originalampullen oder -flaschen. Dadurch verringert sich die Lagerungsdauer des Kits, und es können fehlerhafte Ergebnisse entstehen. Verwenden Sie aseptische Verfahren, zum Beispiel Pipetten oder Einwegpipettenspitzen, wenn Sie die Aliquots von den Ampullen abziehen.
- Um eine Kreuzkontamination zu verhindern, verwenden Sie für jede Probe eine neue Pipettenspitze und berühren Sie weder die Enden der Streifen noch die Kante der Wells noch die Flüssigkeit in den Wells mit Ihren Fingern oder den Pipettenspitzen.
- Es wird empfohlen, dass die mit den Reagenzien verwendeten Glasbehälter vor der Verwendung mit 2M Chlorschwefelsäure gewaschen und gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gespült werden.
- Die besten Ergebnisse erhalten Sie, wenn Sie alle Reagenzien und Testproben vor der Verwendung auf Raumtemperatur (25 °C ± 5 °C) bringen. Bringen Sie die Materialien sofort nach der Verwendung wieder auf die Lagertemperatur von 2 °C–8 °C.
- Verwenden Sie nur für Reagenzien geeignetes deionisiertes oder destilliertes Wasser für die Verdünnung der Reagenzien.
- ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR DER VERWENDUNG GRÜNDLICH GEMISCHT WERDEN.**

KOMPONENTEN DES KITS		
	Beschreibung der Komponente	Gelieferte Menge
	HEV-MIKROPLATTE 12 Streifen pro Platte mit jeweils 8 Wells, versiegelt in einem Aluminiumbeutel mit Trockenmittel Jedes Mikroplattenwell enthält adsorbiertes rekombinantes HEV-Protein. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Platte (96 Tests)
	N I C H T - R E A K T I V E KONTROLLE Inaktiviertes normales Humanserum, nicht-reaktiv für anti-HCV, anti-HEV, HBsAg und anti-HIV-1. Enthält Thiomersal und Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Ampulle (400µl)
	REAKTIVE KONTROLLE Inaktiviertes Humanserum mit einem hohen Feingehalt an IgG-Antikörpern gegen HEV. Enthält Thiomersal und Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Ampulle (400µl)
	SAM-VERDÜNNUNG (SAM = Sample Addition Monitor / Probenzugabeüberwachung) Tris-basierte Kochsalzlösung, die ein wärmebehandeltes normales Ziegenserum, Rinderserum, Albumin sowie Stabilisatoren enthält. Enthält BRONIDOX [®] L als Konservierungsmittel.	1 Flasche (100ml)
	PLATTENWASCHKONZENTRAT (20x) Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20. Enthält Chloracetamid als Konservierungsmittel. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Flasche (120ml)
	KONJUGAT H E V - A n t i g e n m i t Meerrettichperoxidase. Enthält 0,02 % Thiomersal als Konservierungsmittel. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Ampulle (50µl)
	SUBSTRATPUFFER Puffer mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Lichtgeschützt bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Flasche (12,5ml)
	STOPPLÖSUNG 2M Schwefelsäurelösung. Bei 2 °C–8 °C lagern.	1 Flasche (30ml)
	PLATTENABDECKUNGEN Klebeabdeckungen für Mikroplatten während der Inkubation	4 Teile
	GBRAUCHSANWEISUNG	1 Kopie

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN
<ol style="list-style-type: none"> Nur zur In-vitro-Diagnose. Nur zur professionellen Anwendung. Informationen zu potenziell gefährlichen Komponenten finden Sie auf dem Produktetikett.

GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSMITTELSINFORMATIONEN

VORSICHT: Dieses Kit enthält Materialien menschlichen Ursprungs. Kein bekanntes Testverfahren kann mit vollständiger Sicherheit garantieren, dass mit Humanblutproben keine Infektionen übertragen werden.

BEHANDELN SIE ASSAY-PROBEN, REAKTIVE UND NICHT-REAKTIVE KONTROLLEN ALS POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL. Es wird empfohlen, die Komponenten und Testproben entsprechend der bewährten Laborarbeitsvorschriften zu behandeln. Materialien sollten entsprechend den festgelegten Sicherheitsprozeduren entsorgt werden.

Die **reaktive Kontrolle** und **nicht-reaktive Kontrolle** enthalten 0,005 % Thiomersal sowie 0,1 % Natriumazid. Natriumazid kann mit in einigen Abflusssystemen verwendetem Kupfer und Blei reagieren und explosive Salze bilden. Die in diesem Kit verwendete Mengen sind klein, trotzdem sollten sie bei der Entsorgung Azid-haltiger Stoffe immer mit einer großen Wassermenge weggespült werden, um zu verhindern, dass sich Metallazide im Abflusssystem ansammeln.

Gemäß EU-Verordnung 1272/2008 (CLP) sind gefährliche Komponenten wie folgt eingestuft und gekennzeichnet:

Komponente:	PLATTENWASCHKONZENTRAT (20X)
Signalwort:	Warnung
Piktogramm:	
Gefahrenhinweise:	H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Sicherheitshinweise:	P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Ergänzende Hinweise:	EUH210 Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich
Enthält:	2% Chloroacetamide

PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG
Serum- oder Plasmaproben, die in EDTA, Heparin, Natriumcitrat, K-Oxalat oder ACD gesammelt werden, können verwendet werden. Vor der Lagerung müssen Blutgerinnsel oder Blutzellen durch Zentrifugierung abgetrennt werden.

Es werden frische Proben bevorzugt. Proben, die mehrfach eingefroren und aufgetaut werden, werden nicht empfohlen. Proben sollten bei 2 °C–8 °C gelagert werden, wenn der Test innerhalb von 7 Tagen nach Sammlung durchgeführt wird, oder bei ≤ -20 °C eingefroren werden, wenn der Test erst nach mehr als 7 Tagen durchgeführt werden kann. Zusätzlich kann bis zu 0,1 % Natriumazid verwendet werden, um Serum- oder Plasmaproben, die bei 2 °C–8 °C gelagert werden, zu stabilisieren.

Klare, nicht hämolysierte Proben werden bevorzugt. Lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben (mit Partikeln) sollten gefiltert (0,45 µm) oder vor dem Test zentrifugiert werden.

Proben können inaktiviert werden, dies ist jedoch keine Voraussetzung für eine optimale Testqualität.

- Inaktivieren Sie wie folgt:
- Lösen Sie den Deckel des Probenbehälters.
 - Wärmeinaktivieren Sie die Probe bei 56 °C 30 Minuten lang in einem Wasserbad.
 - Lassen Sie die Probe vor dem Wiederaufbringen des Deckels abkühlen.
 - Die Probe kann in gefrorenem Zustand bis zur Analyse aufbewahrt werden.

Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe wird nicht empfohlen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL, DAS NICHT IM TESTKIT ENHALTEN IST

- Saugfähiges Einwegpapier und Papiertücher für die Arbeitsfläche
- Röhrchen oder Behälter aus Polypropylen
- Graduierte Pipetten: 5 ml, 10 ml
- Mehrkanalpipettor für 20 µl, 100 µl und 200 µl
- Pipettor für 1-1000 µl
- Einwegpipettenspitzen
- Reagenzbehälter (Wannen) mit einem Volumen von 25 ml
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser, für Reagenzien geeignet
- Flaschen: 500 ml, 1 Liter
- ELISA-Mikroplattenwaschvorrichtung: Das Waschen kann alternativ auch manuell mit einem Mehrkanalpipettor für 0,3 ml und einer Ansaugvorrichtung durchgeführt werden.
- Ein Inkubator für 37 ± 1 °C
- Ein duales (A₄₅₀-A₆₂₀) oder ein einfaches (A₄₅₀) Wellenlängen-Mikroplattenlesegerät.
- Effektives Desinfektionsmittel

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN
<ol style="list-style-type: none"> ARBEITSKONJUGAT Das ARBEITSKONJUGAT sollte vor der Verwendung frisch vorbereitet werden. Mischen Sie das KONJUGAT und die VERDÜNNUNG gründlich vor der Verwendung. SCHLEUDERN SIE die Mischung NICHT.

Komponente:	STOPPLÖSUNG
Signalwort:	Achtung
Piktogramm:	
Gefahrenhinweise:	H315 Verursacht Hautreizungen. H319 Verursacht schwere Augenreizung.
Sicherheitshinweise:	P264 Nach Gebrauch Hände gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. P312 Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. P332+P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
Ergänzende Hinweise:	EUH210 Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich
Enthält:	11,2% Schwefelsäure

- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien beim Öffnen und Entfernen der Aliquots von den Originalampullen oder -flaschen.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund.
- Behandeln Sie Assay-Proben, Mikroplatten, reaktive und nicht-reaktive Kontrollen als potenziell infektiös.
- Tragen Sie beim Durchführen des Assays Laborkittel und Einmalhandschuhe. Entsorgen Sie die Handschuhe in Behältern für biogefährlichen Abfall. Waschen Sie Ihre Hände danach gründlich.
- Es wird empfohlen, diesen Assay in einer Einrichtung für biogefährliche Materialien durchzuführen.
- Halten Sie die Materialien von Nahrungsmitteln und Getränken fern.
- Bei einem Unfall oder bei Berührung mit den Augen müssen Sie sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
- Gehen Sie sofort zu einem Arzt, wenn kontaminierte Materialien verschluckt werden oder in Kontakt mit offenen Wunden oder anderen Rissen in der Haut kommen.

- c. Verdünnen Sie das **KONJUGAT** mit einem Verdünnungsfaktor von 1:500 mit der **VERDÜNNUNG**. Geben Sie beispielsweise 6,0 µl Konjugat in 3,0 ml Verdünnung.
- d. Verwenden Sie nur Behälter oder Röhrchen aus Polypropylen.
- e. 9,0 ml des **ARBEITSKONJUGATS** sind für eine Mikroplatte notwendig.

KONJUGATVORBEREITUNGSTABELLE (Verdünnungsfaktor 1:500)		
Anzahl der Tests	Vol. des Konjugats (µl)	Vol. der Verdünnung (ml)
24	6,0	3,0
48	10,0	5,0
72	14,0	7,0
96	18,0	9,0

2. VERDÜNNTER WASCHEPUFFER

- a. Der VERDÜNNTE WASCHEPUFFER sollte vor der Verwendung **frisch vorbereitet werden**.
- b. Verdünnen Sie 1 Volumenteil PLATTENWASCHKONZENTRAT mit 19 Volumenteilen destilliertem Wasser (für Reagenzien geeignet). Mischen Sie alles gründlich. Zum Waschen einer Platte sind ca. 200 ml Waschpuffer notwendig.

ASSAY-VERFAHREN

WICHTIG: - Immunoassays dieser Art sind temperaturempfindlich und zeitabhängig. Eine strenge Einhaltung des Assay-Verfahrens gewährleistet eine optimale Assay-Qualität. Abweichungen von dem empfohlenen Verfahren können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

- Bereiten Sie das **ARBEITSKONJUGAT** entsprechend der Beschreibung unter **VORBEREITUNG DER REAGENZIEN** vor.
- Nehmen Sie die Mikroplatte aus dem Aluminiumbeutel.
- Schütteln Sie die Proben- und Kontrollampullen vor der Verwendung.
- Füllen Sie einen Reagenzienbehälter mit dem **ARBEITSKONJUGAT**. Geben Sie mit einem Mehrkanalpipettor 80 µl des **ARBEITSKONJUGATS** in alle Wells. 80µl
- Die Wells A1 und B1 sind **LEERPROBEN**. **GEBEN SIE KEINE PROBEN IN DIESE WELLS**. Geben Sie 20 µl Verdünnung pro Well in diese Wells. 20µl
- Geben Sie 20 µl Probe in das entsprechende Well. Beginnen Sie dabei mit Well A2. Dadurch wird am Ende eine Probenverdünnung von 1:5 erreicht. Mischen Sie alles durch einmaliges Auf- und Abpipettieren. **GEBEN SIE DIE PROBE NICHT IN EIN LEERES WELL**. 20µl
- Nach dem Hinzufügen der Testproben geben Sie 20 µl **NICHT-REAKTIVE KONTROLLE** pro Well in die Wells C1, D1 und E1. 20µl

- Geben Sie 20 µl **REAKTIVE KONTROLLE** pro Well in die Wells F1, G1 und H1. Mischen Sie alles gründlich durch vorsichtiges Klopfen aller Seiten der Mikroplatte. Dabei muss die Platte flach auf der Arbeitsfläche stehen bleiben. 20µl
- Bedecken Sie die Mikroplatte mit der mitgelieferten Plattenabdeckung, um eine Verdampfung während der Inkubation zu vermeiden.
- Inkubieren Sie 60 Minuten bei 37 °C (verwenden Sie kein Wasserbad von 37 °C für die Inkubation).** 60 min
- Entfernen oder entsorgen Sie die Plattenabdeckung und waschen Sie die Mikroplatte mit **VERDÜNNTEM WASCHEPUFFER** und einer der beiden empfohlenen Methoden. 300µl pro Well pro Waschvorgang

- A. **Automatisierte oder halb automatisierte** Mikroplattenwaschvorrichtung – Waschen Sie jedes Well sechsmal (6) mit mindestens 300 µl pro Waschvorgang.
- B. **Manuelle** Mikroplattenwaschvorrichtung – Saugen Sie den Inhalt aller Wells vollständig an, indem Sie die Ansaugvorrichtung vorsichtig bis zum Boden jedes Wells absenken. **ZERKRATZEN SIE DABEI NICHT DIE INNENSEITE DES WELLS**. Füllen Sie die gesamte Platte mit mindestens 300 µl pro Well, saugen Sie dann die Flüssigkeit in der gleichen Reihenfolge wieder an. Führen Sie diesen Zyklus sechsmal (6) durch.

- Trocknen Sie die Mikroplatte, indem Sie sie umdrehen und fest auf saugfähiges Papier klopfen. Damit sollte der gesamte verbleibende Plattenwaschpuffer entfernt werden. Farbbildung kann bei der Substratinkubation durch verbleibenden Plattenwaschpuffer verhindert werden.
- Füllen Sie einen Reagenzienbehälter mit **SUBSTRAT**. Geben Sie mit einem Mehrkanalpipettor 100 µl **SUBSTRAT** in jedes Well. Verwenden Sie eine Plattenabdeckung. 100µl
- Inkubieren Sie 30 Minuten bei 37 °C ohne Lichtzufuhr. (**Verwenden Sie kein Wasserbad von 37 °C für die Inkubation**). 30 min
- Entfernen und entsorgen Sie die Plattenabdeckung.
- Geben Sie mit einem Mehrkanalpipettor 50 µl **STOPPLÖSUNG** in jedes Well. Mischen Sie alles vorsichtig durch Klopfen an der Platte. 50µl
- Bestimmen Sie die Absorption für jedes Well bei 450 nm. Bei Verwendung eines dualen Filterinstruments sollte die Referenzwellenlänge 620 nm betragen.

HINWEIS: Die Absorption sollte innerhalb von zehn Minuten nach Zugabe der **STOPPLÖSUNG** abgelesen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	

A1, B1 = Blank
C1, D1, E1 = NRC
F1, G1, H1 = RC

QUALITÄTSKONTROLLE

- Die **LEERPROBE** sollte auf jeder Platte bei jedem Probendurchlauf in zweifacher Ausführung, die **NICHT-REAKTIVE KONTROLLE** und die **REAKTIVE KONTROLLE** sollten hingegen in dreifacher Ausführung getestet werden.
- Leerwerte müssen eine Absorption von $\leq 0,100$ aufweisen.
- Die Werte für die nicht-reaktive Kontrolle müssen eine Absorption von $\leq 0,100$.
- Mindestens zwei der drei reaktiven Kontrollwerte müssen eine Absorption von $\geq 0,500$. Werte außerhalb dieses Bereichs sollten nicht für die Berechnung des Durchschnittswertes der reaktiven Kontrolle (RC \bar{x}) verwendet werden.

ERGEBNISSE

Jede Mikroplatte muss bei der Berechnung und der Auswertung der Ergebnisse des Assays separat betrachtet werden, unabhängig von der Anzahl der Platten, die gleichzeitig verarbeitet werden.

Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von HEV-Antikörpern wird bestimmt durch den Vergleich der Absorption der Proben mit dem CUT-OFF-WERT (COV) der Platte.

Der CUT-OFF-WERT wird wie folgt berechnet (0,40 Absorptionseinheit + mittlere Absorption NRC):

$$\text{CUT-OFF-WERT} = 0,40 + \text{NRC}\bar{x}$$

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Die Berechnung der mittleren Absorption der nicht-reaktiven Kontrolle (NRC \bar{x})

Beispiel:	Well-Nummer	Absorption
	C1	0,050
	D1	0,051
	E1	0,052
	Summe	0,153
	Mittelwert	0,153 / 3 = 0,051 (NRC \bar{x})

Einzelne Werte der nicht-reaktiven Kontrolle sollten $\leq 0,100$ Einheiten sein.

Wenn ein Wert der nicht-reaktiven Kontrolle die oben genannten Kriterien nicht erfüllt, muss dieser als fehlerhaft ausgeschlossen werden. Der Mittelwert der nicht-reaktiven Kontrolle (NRC \bar{x}) sollte anschließend mit den restlichen Werten der nicht-reaktiven Kontrolle neu berechnet werden. Alle restlichen Werte der nicht-reaktiven Kontrolle müssen die oben genannten Kriterien erfüllen, sonst ist der Assay ungültig und muss wiederholt werden.

2. Berechnung der mittleren Absorption der reaktiven Kontrolle (RC \bar{x})

Beispiel:	Well-Nummer	Absorption
	F1	1,221
	G1	1,144
	H1	1,298
	Summe	3,663
	Mittelwert	3,663 / 3 = 1,221 (RC \bar{x})

Die einzelnen Werte der reaktiven Kontrolle müssen $\geq 0,500$ Einheiten sein.

Wenn ein Wert der reaktiven Kontrolle die oben genannten Kriterien nicht erfüllt, muss dieser als fehlerhaft ausgeschlossen werden. Der Mittelwert der reaktiven Kontrolle (RC \bar{x}) sollte anschließend mit den verbleibenden einzelnen Werten der reaktiven Kontrolle neu berechnet werden. Alle verbleibenden einzelnen Werte der reaktiven Kontrolle müssen die oben genannten Kriterien erfüllen, sonst ist der Assay ungültig und muss wiederholt werden.

3. Berechnung der Differenz zwischen RC \bar{x} und NRC \bar{x}

Beispiel:	NRC \bar{x}	=	0,051
	RC \bar{x}	=	1,221
	RC \bar{x} - NRC \bar{x}	=	1,221 - 0,051
		=	1,200

Damit der Assay gültig ist, sollte der Wert RC \bar{x} - NRC \bar{x} $\geq 0,500$ sein. Andernfalls sind Fehler beim Verfahren oder eine Qualitätsminderung der Reagenzien zu vermuten, und der Assay sollte wiederholt werden.

4. Berechnung des CUT-OFF-Wertes

Beispiel:	CUT-OFF-Wert	=	0,40 + NRC \bar{x}
	NRC \bar{x}	=	0,051
	CUT-OFF-Wert	=	0,40 + 0,051
		=	0,451

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Proben mit Absorptionswerten kleiner als der CUT-OFF-Wert werden vom **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** als nicht-reaktiv betrachtet.
 - Proben mit Absorptionswerten **größer oder gleich** dem CUT-OFF-Wert werden entsprechend den Kriterien von **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** als **anfänglich reaktiv** betrachtet und sollten vor der Auswertung in zweifacher Ausführung erneut getestet werden.
 - Werden Proben beim erneuten Testen als reaktiv identifiziert, können diese als **wiederholt reaktiv** für HEV-Antikörper entsprechend den Kriterien von **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** interpretiert werden.
 - Anfänglich reaktive Proben, die beim wiederholten Test **nicht-reaktiv** sind, gelten als negativ entsprechend den Kriterien von **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.
- Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumaliev DI, Karas FR. Brief report: experimental Hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol. 1990. 32(1): 58-59.
 - Usmanov RK, Balaian MS, Dvoinkova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov IuA, Belov VI. An experimental infection in lambs by the Hepatitis E Virus. Vopr Virusol. 1994. 39(4): 165-168.
 - Maneerat Y, Clayton ET, Myint KS, Young GD, Innis BL. Experimental infection of the laboratory rat with the Hepatitis E Virus. J Med Virol. 1996. 48(2): 121-128.
 - Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS, Govindarajan S, Bruna JD, Mushahwar IK, Purcell RH, Emerson SU. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine Hepatitis E Virus. J Virol. 1998. 72(12): 9714-9721.
 - Anderson DA, Li F, Riddell M, Howard T, Seow H-F, Torresi J, Perry G, Sumarididi D, Shrestha S M, Shrestha IL. ELISA for IgG-class antibody to Hepatitis E Virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. J. Virol. Methods. 1999. 81: 131-142.
 - Chen HY, Lu Y, Howard T, Anderson D, Fong PY, Hu WP, Chia CP, Guan M. An Immunochromatographic Test and its comparison to Enzyme-linked Immunosorbent assay for rapid detection of Immunoglobulin M antibodies to Hepatitis E Virus in patient sera. Clin Diagn Lab Immunol. 2005. 12: 593-598.
 - Hu WP, Lu Y, Precioso NA, Chen HY, Howard T, Anderson D, Guan M. Double-antigen Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of Hepatitis E Virus-specific antibodies in human or swine sera. Clin Vaccine Immunol. 2008. 15(8): 1151-1157.



MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd.
2 Pioneer Place
Singapur 627885
Tel. : +65 6775 0008
Fax : +65 6774 6146
E-Mail : enquiry_ap@mpbio.com



MP Biomedicals Deutschland GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Deutschland
Tel. No. : +49 5651 921 204
Fax No. : +49 5651 921 181
Email : diagnostics@mpbio.com

Regionalbüro:

MP Biomedicals Deutschland GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Deutschland
Tel. No. : +49 5651 921 204
Fax No. : +49 5651 921 181
Email : diagnostics@mpbio.com

SPEZIELLE LEISTUNGSDATEN

Empfindlichkeit
Intern wurden 189 HEV IgM positive (akute Infektion) und 67 HEV IgG positive/IgM negative (vergangene Infektion) Proben untersucht. Die in Tabelle 1 zusammengefassten Ergebnisse zeigen eine Empfindlichkeit von 99,5 % für 189 bestätigte HEV IgM positive Proben und 98,5 % für HEV IgG-positive, jedoch IgM negative Proben.

Tabelle 1 Assay-Qualität – Empfindlichkeit

Probenart	Anzahl der Proben			Empfindlichkeit
	Reaktiv	Negativ		
HEV IgM positiv (Nepal)	151	150	1	99,3 %
HEV IgM positiv (China)	38	38	0	100 %
HEV IgG positiv/IgM negativ (archiviert)	67	66	1	98,5 %
Summe	256	254	2	99,2 %

Spezifität

Insgesamt wurden 368 Proben, bestehend aus Blutspenderproben (n=236) und potenziell kreuzreaktiven Proben (n=132) getestet. Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen eine Diagnosespezifität von insgesamt 99,2 % sowohl für Blutspender- als auch für potenziell kreuzreaktive Proben.

Tabelle 2 Assay-Qualität – Spezifität

Andere Krankheitskontrollen	Anzahl der Proben			Spezifität
	Negativ	Reaktiv		
Blutspender (USA)	236	234	2	99,2 %
HAV-Antikörper positiv	33	33	0	100 %
HCV-Antikörper positiv	43	43	0	100 %
HBsAg positiv	20	20	0	100 %
HSV-Antikörper positiv	20	19	1	95 %
Rheumafaktor	16	16	0	100 %
Summe	368	365	3	99,2 %

Wiederholbarkeit

Die Assay-Präzision des **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** wurde intern mit zwei Serumkalibratoren sowie einer HEV IgG positiven Probe und einer HEV IgM positiven Probe untersucht.

Innerhalb eines Testlaufs: Drei Chargen ELISA-Komponenten wurden als 30 Replikate pro Serumkalibrator in drei Fällen getestet. Der Abweichungskoeffizient (CV) für die drei Kalibratoren in verschiedenen Durchläufen schwankte zwischen 3,7 % und 5,7 % (Tabelle 3).

Zwischen den Testläufen: Insgesamt wurden 90 Beobachtungen erfasst, um die Präzision zwischen den Testläufen zu bewerten. Diese Beobachtungen repräsentieren drei Durchläufe mit 3 Chargen ELISA-Komponenten mit jedem Serumkalibrator. Die Abweichungskoeffizienten für zwei Kalibratoren schwankten zwischen 5,8 % und 10,8 % (Tabelle 3).

Tabelle 3 Assay-Qualität – Wiederholbarkeit

Proben	Assay-Komponenten	Anzahl der Replikate	Mittelwert OD/COV	Präzision innerhalb eines Testlaufs (CV, %)	Präzision zwischen Testläufen (CV, %)
HEV IgG positiv	#1	30	5,344	3,7	5,8
	#2	30	5,752	4,6	
	#3	30	5,337	5,4	
HEV IgM positiv	#1	30	8,065	5,3	10,8
	#2	30	7,507	4,3	
	#3	30	6,391	5,7	

Gesamtpräzision: Drei Chargen ELISA-Komponenten wurden als 5 Replikate pro Serumkalibrator in jedem Durchlauf getestet. Dies wurde dreifach über einen Zeitraum von 21 Tagen von vier Bedienern durchgeführt. Die Gesamtpräzision wurde mit 300 Datenpunkten (OD/COV) bewertet, die mit zwei Serumkalibratoren erhalten wurden. Die Abweichungskoeffizienten für die beiden Kalibratoren schwankten zwischen 12,1 % und 15,7 %.

EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODE

Wiederholt reaktive Ergebnisse vom **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** sind ein anzunehmender Nachweis von Antikörpern gegen HEV in der Probe. Ein **NICHTREAKTIVES** Ergebnis vom **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** weist auf die wahrscheinliche Abwesenheit erkennbarer Antikörper gegen HEV in der Probe hin. Ein **NEGATIVES** Ergebnis schließt die Möglichkeit eines Kontakts oder einer Infektion mit HEV nicht aus.

Falsch-reaktive Ergebnisse können bei einem Testkit dieser Art vermutet werden. Der Anteil der falsch-reaktiven Ergebnisse hängt von der Empfindlichkeit und der Spezifität des Testkits ab. Bei den meisten Screening-Assays ist bei höherer Prävalenz von Antikörpern in einer Population der Anteil falsch-reaktiver Proben geringer.

EINGESCHRÄNKTE AUSDRÜCKLICHE GEWÄHRLEISTUNG/HAFTUNGS AUSSCHLUSS

Der Hersteller gibt keine ausdrückliche Gewährleistung, außer dass das Testkit als *In-vitro*-Diagnose-Assay mit den in den Gebrauchsanweisungen des Produktes beschriebenen Spezifikationen und Einschränkungen funktioniert, wenn dieses in Übereinstimmung mit den hierin enthaltenen Anweisungen verwendet wird. Der Hersteller schließt jede direkte oder indirekte Zusage aus, u. a. auch eine direkte oder indirekte Gewährleistung zur Handelbarkeit, Gebrauchstauglichkeit oder implizierten Verwendung für andere Zwecke. Der Hersteller beschränkt sich auf den Ersatz des Produktes oder die Erstattung des Einkaufspreises des Produktes. Der Hersteller ist nicht haftbar gegenüber dem Käufer oder Dritten für Schäden, Verletzungen, wirtschaftliche Verluste usw., die durch das Produkt bei Verwendung oder Anwendung entstanden sind. Der Hersteller gibt keine direkten noch indirekten Zusicherungen, dass dieses Produkt Rechte am geistigen Eigentum Dritter nicht verletzt.

TECHNISCHE PROBLEME/BESCHWERDEN

Bitte gehen Sie wie folgt vor, wenn Sie ein technisches Problem/ eine Beschwerde haben:

- Notieren Sie sich die Chargennummer des Kits und das Verfallsdatum.
- Heben Sie die Kits und die Ergebnisse auf.