

E型肝炎ウイルス抗体キット

イムニス[®] IgA anti-HEV EIA

**ご使用に際しては、本電子化された添付文書(電子添文)をよく読んでから使用してください。

【全般的な注意】

1. 本キットは体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
- ** 3. 本電子添文に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 本キット中の陰性コントロール及び陽性コントロールはHBs抗原、HCV抗体、HIV-1抗体及びHIV-2抗体が陰性であることを確認していますが、感染性を完全に否定できるものではありません。従って、本品の取扱いに際しては、検体と同様に感染の危険性を考慮し、十分に注意してください。
- ** 5. 使用する機器の添付文書等又は取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等(キットの構成)】

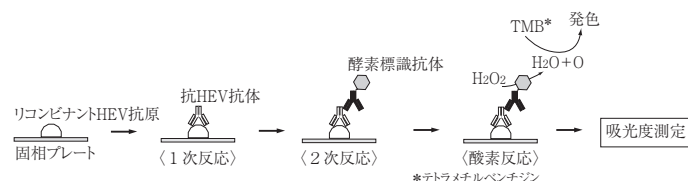
1. HEV抗原固相プレート(8ウェル×12) …………… 1枚
(リコンビナントHEV抗原)
 2. 陰性コントロール …………… 0.5mL×1本
 3. 陽性コントロール …………… 0.5mL×1本
 4. 検体希釈液 …………… 50mL×1本
 - * 5. 酵素標識モノクローナル抗体 …………… 5mL×1本
(ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgAマウスモノクローナル抗体)
 6. 酵素基質液 …………… 5mL×1本
(テトラメチルベンチジン、過酸化水素)
 7. 反応停止液 …………… 5mL×1本
 8. 洗浄原液(20倍濃縮液) …………… 50mL×1本
- 付属品: プレートシール …………… 3枚

【使用目的】

血清中のIgAクラス抗HEV抗体の検出(E型肝炎ウイルス(HEV)感染の診断の補助)

【測定原理】

酵素免疫測定法(EIA)を応用した本検出系は、二段階の抗原抗体反応と酵素呈色反応とからなります。1次抗原抗体反応は、プレートに固相されたHEV抗原と被検検体中の抗HEV抗体との間で起こります。2次抗原抗体反応は、固相抗原に結合したIgAクラスの抗HEV抗体と酵素標識抗体(ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgAマウスモノクローナル抗体)との間で起こります。検体中にIgAクラス抗HEV抗体が存在すれば1次、2次抗原抗体反応が成立し、酵素反応により発色します。検体中のIgAクラスの抗HEV抗体量に応じて呈色物質が生成されます。一定時間で反応を停止させて吸光度を測定します。



【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法
 - (1) 採血は溶血を避け、速やかに血清分離を行ってください。
 - (2) 検体は、採取後できるだけその日のうちに使用してください。もし、保存が必要な場合は凍結して保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
 - (3) 検体は希釈後、2～8℃で14日間保存可能です。
 - (4) 被検検体を冷蔵、冷凍保存した場合は室内温度に戻してから使用してください。
2. 妨害物質・妨害薬剤

乳ビ1,500度(ホルマジン濁度数)、ビリルビンC15mg/dL、ビリルビンF15mg/dL、溶血ヘモグロビン400mg/dL、リウマチ因子400IU/mLの濃度までは影響がありません。
3. その他
 - (1) 測定器具の精度を確認し、各器具の操作法に従い測定してください。
 - (2) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用してください。
 - (3) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替えてください。
 - (4) ブランク用及び陰性、陽性コントロール用ウェルは、測定ごとに設けてください。
 - (5) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定になるように留意してください。
 - (6) 各反応は15～30℃の範囲で行ってください。
 - (7) 酵素反応停止後、30分以内に吸光度を測定してください。
 - (8) 操作中、プレートを強くこすったり、底面に触れたりしないでください。また、ウェル内面が乾燥しないように注意してください。

【用法・用量(操作方法)】

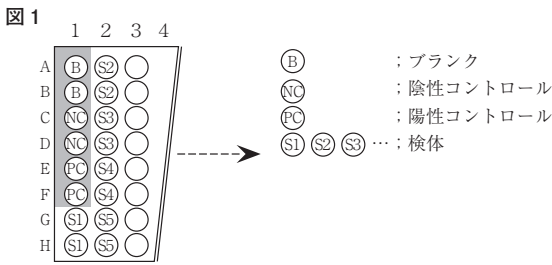
1. 試薬の調製方法
 - (1) 洗浄液

洗浄原液を精製水で20倍希釈してください。15～25℃で調製時より7日間使用可能です。

 - キットの試薬は使用前に必ず15～30℃に戻してください。
 - プレートは着脱式で12分割が可能ですから、必要数を使用し未使用のものは乾燥剤とともにアルミ袋に密封し、2～10℃で保存してください。
2. 必要な器具・器材・試料等
 - (1) マイクロピペット 10μL、100μL、200μL、1,000μL
 - (2) メスシリンダー 1L
 - (3) マイクロプレートミキサー
 - (4) アスピレーター及びポリ洗浄瓶又はマイクロプレートウォッシャー
 - (5) 暗箱(暗い戸棚又は引き出しでも可)
 - (6) マイクロプレートリーダー(主波長450nm(或いは440nm～460nm)、副波長630nm)

3. 測定（操作）法

測定ごとにブランク用1ウェル以上、陰性コントロール用2ウェル以上及び陽性コントロール用2ウェルを設けてください。（図1：参考例）



- (1) 検体の希釈
検体希釈液を用いて検体を101倍に希釈します。
例えば、検体希釈液500 μ Lに血清5 μ Lを加えます。
- (2) 検体の添加
陰性コントロール、陽性コントロール及び希釈した検体を50 μ LずつHEV抗原固相プレートのウェルに添加します。
- (3) 1次反応
プレート上面に添付のプレートシールを貼り、15～30 $^{\circ}$ Cで1時間静置します。
- (4) 洗浄
プレートシールをはがし、ウェル内容物をアスピレーターで吸引除去します。プレートの各ウェルを洗浄瓶を用いて「1. 試薬の調製方法(1)」で調製した洗浄液で満たし、プレートを逆さにして洗浄液を振り流します。この洗浄操作を5回繰り返します。
また、マイクロプレートウォッシャーを用いる場合も5回洗浄します。
- 洗浄操作中、プレートのウェル内面が乾燥しないように注意し、洗浄終了後は迅速に次の操作を行ってください。
- (5) 酵素標識モノクローナル抗体の添加
酵素標識モノクローナル抗体をブランクウェル以外のウェルに50 μ Lずつ加えます。
- (6) 2次反応
プレート上面に添付のプレートシールを貼り、15～30 $^{\circ}$ Cで1時間静置します。
- (7) 洗浄
(4)と同じ手順でプレートを洗浄します。
- (8) 酵素基質液の添加
酵素基質液を全ウェルに50 μ Lずつ加えます。
- (9) 酵素反応
プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレートを暗所に入れて、15～30 $^{\circ}$ Cで30分間静置します。
- (10) 反応停止液の添加
プレートシールをはがし、反応停止液を全ウェルに50 μ Lずつ加えてよく混合します。
- (11) 吸光度の測定
マイクロプレートリーダー（主波長450nm（或いは440nm～460nm）、副波長630nm）で各ウェルの吸光度を測定します。

ウェルの割付と手順

	ブランク	陰性コントロール・陽性コントロール	検体
	1 A, 1 B	1 C～1 F	1 G～12 H
1	検体の希釈	そのまま使用	検体希釈液で101倍に希釈
2	コントロール及び検体の添加 陰性コントロール 陽性コントロール 希釈検体	50 μ L 50 μ L	50 μ L
3	1次反応	15～30 $^{\circ}$ C、1時間静置	
4	洗浄	5回繰り返す	
5	酵素標識モノクローナル抗体の添加	50 μ L	50 μ L
6	2次反応	15～30 $^{\circ}$ C、1時間静置	
7	洗浄	5回繰り返す	
8	酵素基質液の添加	50 μ L	
9	酵素反応	15～30 $^{\circ}$ C、30分間 暗所静置	
10	反応停止液の添加	50 μ L	
11	吸光度の測定	主波長450nm（440nm～460nm）、副波長630nm	
12	結果の判定		

【測定結果の判定法】

1. カットオフ値（COV）の算出
 - (1) [各吸光度値－ブランクウェルの吸光度の平均値]（Net OD値）を算出します。
 - (2) 次式に当てはめカットオフ値を算出します。
算出カットオフ値＝（陽性コントロールの平均Net OD値－陰性コントロールの平均Net OD値） \times 0.5
2. 結果の判定
陰性：検体のNet OD値<算出カットオフ値
陽性：検体のNet OD値 \geq 算出カットオフ値
○算出カットオフ値（COV）を基にカットオフインデックス（COI）を算出し、判定することもできます。
COI＝検体のNet OD値/COV
陰性： COI < 1
陽性： COI \geq 1
3. 判定上の注意
 - (1) 測定結果が陰性であっても、ウイルス関連抗体が検出されない空白期間である場合や免疫機能低下により抗体産生能が低下している場合があります。
 - (2) 自己免疫性疾患患者の血清の場合、非特異反応が起こりえますので、測定結果に基づく診断は他の検査や臨床症状等を考慮して総合的に判断してください。

【臨床的意義】

E型肝炎ウイルス（HEV）は急性或いは劇症E型肝炎の起因ウイルスです。従前、HEVは衛生環境が整っていない熱帯・亜熱帯の発展途上国に常在するウイルスであり、日本を含む先進国では、E型肝炎は輸入感染症としてのみ散発発生すると認識されてきました。しかし、近年、流行国への渡航歴のないE型肝炎症例が日本を含む先進国で少なからず発生し、ブタなどの動物でも感染が認められる人獣共通感染症であることが明らかにされました¹⁾。それらの事実を踏まえ、わが国では、E型肝炎は平成15年11月5日から施行された改正感染症法において新4類感染症に指定され、届出が義務づけられています。

本キットは、リコンビナントHEV抗原タンパク質を使用した、血清診断法に基づくIgAクラス抗HEV抗体測定試薬であり、IgMクラス抗HEV抗体検出系よりも非特異反応による偽陽性が少なく、かつ良好な感度を有しています²⁾。

E型肝炎は、A型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスなどによる他の急性肝炎との臨床的な区別が難しく、適切な診断を行うには血清学的検査が重要な手段となります。E型肝炎の急性期には、IgAクラス抗HEV抗体が患者血清中に出現し、ほとんどの場合において発症時に検出が可能です。多くの場合、HEV RNAは発症後1～6週（平均3週）で検出限度以下となりますが、IgAクラス抗HEV抗体は、同じく感染初期抗体であるIgMクラス抗HEV抗体と同様に発症後2ヶ月から5ヶ月持続します³⁾。

1. 標的疾患

本品はIgAクラス抗HEV抗体を測定することにより、E型急性肝炎の診断を可能とします。

2. 有病正診率及び無病正診率

本キットと臨床診断（臨床症状、肝機能検査及びHEV RNA検出による診断）との相関は以下のとおりです。

		臨床診断	
		E型急性肝炎患者検体	健康人
本キット	陽性	92	0
	陰性	2 ^{※1}	1,001
合計		94	1,001

有病正診率：97.8 %
無病正診率：100 %
診断効率：99.8 %

注)本キットで陰性と判定されたE型急性肝炎患者検体のデータを以下に示します。これら2検体は、ウイルス核酸が検出されウイルス血症の状態にあっても、ウイルス関連抗体が検出されない感染初期の空白期間の検体であった可能性が考えられます。

*本キットで陰性であったE型急性肝炎患者検体のデータ

検体	本キットでの測定値 (Net OD ₅₅₀)	発症からの 日数	診断名	ALT (IU/mL)	HEV RNA	遺伝子型	他の肝炎 の否定
1	0.340(-)	0	急性肝炎	2,940	+	3	Non-A,B,C
2	0.188(-)	3	急性肝炎	5,860	+	4	Non-A,B,C

【性能】

1. 感度試験

陰性コントロールを試料として5回測定するとき、その平均Net OD値は、0.1以下である。

陽性コントロールを試料として5回測定するとき、その平均Net OD値は、0.9～1.8の範囲内である。

2. 特異性試験

抗HEV抗体陰性管理用検体を試料として5回測定するとき、陰性を示す。

抗HEV抗体陽性管理用検体を試料として5回測定するとき、陽性を示す。

3. 同時再現性試験

抗HEV抗体陰性管理用検体を試料として5回同時測定するとき、すべて陰性を示す。

抗HEV抗体陽性管理用検体を試料として5回同時測定するとき、すべて陽性を示す。

4. カットオフ値

本キットの参考カットオフ値：0.639（自社検討データ）

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

- 検体はHBV、HCV、HIVなどの感染の危険性があるものとして注意して取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるために使い捨て手袋を着用し、また口によるピペティングを行わないでください。
- 酵素基質及び反応停止液は皮膚や粘膜に接触させないでください。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流してください。（毒性、刺激性で火傷のおそれがあります。）必要があれば医師の手当等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 本品は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。また、同一製造番号の試薬であっても、試薬を注ぎ足さないでください。プレートの再利用をしないでください。
- キットの構成試薬は、いずれも個別の補充が可能です。補充に関しては、問い合わせ先までご連絡ください。
- 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。

3. 廃棄上の注意

(1) 使用後の検体、試薬、検体に使用した器具類は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。

- 0.05 w/v%ホルマリン溶液に37℃、72時間以上浸す。
- 2 w/v%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸す。
- 次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1,000 ppm以上）に1時間以上浸す。
- 121℃、20分間以上オートクレーブにかける。

(2) 検体希釈液、陰性コントロール及び陽性コントロールにはアジ化ナトリウムが添加されていますので、廃棄する時は爆発性の金属アジドが発生しないように多量の水を流しながら行ってください。

(3) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、医療廃棄物等の廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制に従って処理してください。

(4) 検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1,000 ppm以上、1時間以上浸漬）、グルタルアルデヒド（2 w/v%、1時間以上浸漬）等による拭き取りと消毒を行ってください。

【貯蔵方法・有効期間】

凍結を避け、2～10℃で保存。製造後1年間有効。（包装に表示の使用期限内に使用してください。）

【包装単位】

96テスト（CODE：1A71）

【主要文献】

- Mizuo H, Suzuki K, Takikawa Y, et al: Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. J Clin Microbiol **40**: 3209-3218, 2002.
- 飯野四郎、狩野吉康、前久保博士、他：E型急性肝炎の血清診断におけるIgAクラス抗HEV抗体測定用試薬「イムニスIgA anti-HEV EIA」の有用性の検討. 医学と薬学 **53**(4): 461-469, 2005.
- Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, et al: Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. J Clin Microbiol **43**: 49-56, 2005.

【問い合わせ先】

株式会社特殊免疫研究所 営業部
〒112-0004
東京都文京区後楽一丁目1番10号
日本生命水道橋ビル
TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957

