

HEV ELISA 4.0

Instrucciones de uso



Fecha de la revisión: 2016-02
MBE0011-SPN-3

Nota: Cambios resaltados.

REF 23540-096: (96 pruebas)

NOMBRE Y USO PREVISTO

El **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** es un Ensayo Inmunoenzimático absorbente (ELISA) desarrollado para la detección de anticuerpos totales contra el virus de la Hepatitis E en suero y plasma humanos. Está concebido como una prueba de tamizaje que requiere una repetición de pruebas en el caso de especímenes inicialmente reactivos.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Hepatitis E (HEV) es un virus no envuelto con un ARN de cadena simple y de sentido positivo, que fue identificado por primera vez como un virus de transmisión entérica de un tipo distinto al de la hepatitis -A y la hepatitis B, por Genelabs en 1990 (1,2). El curso de la infección por HEV es generalmente agudo y autolimitado sin secuelas crónicas. De todas formas, esta infección presenta una alta incidencia de mortalidad entre las mujeres en el tercer trimestre del embarazo, sobre un 10 al 20% (3), y un índice de mortalidad en la población general entre un 1 y un 2%, unas 10 veces superior al de la hepatitis A (HAV). Con la clonación del agente causal de la ET-NANBH (Enterically Transmitted Non A, Non B Hepatitis) en Genelabs y la identificación de tipos comunes de epitopes virales (1,2), se han podido desarrollar herramientas de diagnóstico para la detección de los anticuerpos contra el HEV.

Las principales epidemias de hepatitis no A y no B de transmisión entérica (ET-NANBH) se han producido en regiones en vías de desarrollo tales como Asia, la antigua Unión Soviética, América Central y África (3,4). Se han documentado también casos esporádicos en países desarrollados, entre otros Australia, el Reino Unido y Estados Unidos (5,6,7). Los casos aparecidos en países desarrollados, han sido asociados generalmente con viajes a regiones endémicas. De todas formas, se están acumulando evidencias que sugieren la aparición de casos esporádicos de infecciones por HEV sin relación con regiones endémicas, en un amplio espectro de zonas no endémicas, entre las que se incluyen Europa occidental, Grecia, Estados Unidos, Australia y Taiwán (8-17).

Experimentos realizados han demostrado que el HEV humano es capaz de infectar a especies animales (18-21), mientras que el virus HEV porcino puede infectar a especies de primates no humanos (21). Estudios recientes sobre la prevalencia de infecciones por HEV en animales, muestran una alta seroprevalencia de anticuerpos contra el HEV en diferentes especies animales incluidas especies porcinas,

equinas, roedores, etc. Existen evidencias cada vez mayores de que la gran amplitud de la infección entre los animales, particularmente entre los cerdos, podría representar una importante reserva para la transmisión del virus. Algunos de los casos esporádicos de infección por HEV en zonas no endémicas podrían atribuirse a la transmisión zoonótica.

Es patente la necesidad de una prueba ELISA para HEC que posea alta sensibilidad y que sea específica para la detección de anticuerpos totales para HEV en el suero o plasma humanos.

MP Diagnostics HEV ELISA 4.0 utiliza una especialidad de antígeno recombinante, que tiene un alto índice de regiones conservadas entre las diferentes variedades de HEV (22,23,24), para detectar la presencia de anticuerpos específicos incluyendo los IgG, IgM y IgA contra el virus HEV.

DESCRIPCIÓN DE SÍMBOLOS UTILIZADOS

Éstos son los símbolos gráficos utilizados o que se pueden encontrar en los productos y embalajes de MP Diagnostics. Estos símbolos son muy comunes en los dispositivos médicos y sus embalajes. Algunos de los símbolos más comunes se explican con más detalle en la norma europea e internacional EN ISO 15223: 2012.

	Fecha de caducidad		Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote		Número de catálogo
	Límite de temperatura		Precaución
	Fabricante		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Contenido suficiente Para <n> ensayos		Consulte las Instrucciones de uso
	No reutilizar		
	Índice		

PRINCIPIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO

Los pocitos de poliestireno de las tiras de microplaca están recubiertos con una especialidad de antígeno recombinante, presentando un epitopo conformacional que aparece en regiones altamente conservadas entre las diferentes variedades de HEV. El conjugado HRP se produce con el mismo antígeno recombinante marcado con peroxidasa de rábano. Este conjugado se diluye correctamente primero en un tampón diluyente antes de colocarse en los pocitos recubiertos de antígeno de las microplacas. Luego se agregan las muestras de suero o plasma a los pocitos recubiertos de antígeno que contienen el tampón diluyente y el conjugado. Tras la incubación, los anticuerpos específicos para el HEV (IgG, IgM y IgA), si se encuentran presentes, ligarán con los antígenos inmovilizados en los pocitos y el antígeno del conjugado en el diluyente. Los pocitos se lavan entonces a conciencia para eliminar los materiales que no hayan ligado. Una solución de sustrato con un contenido de 3,3',5,5'- tetrametilbencidina (TMB) se añade entonces en cada pocito. La presencia de anticuerpos específicos está indicada por la presencia de solución de color azul después de la incubación. La reacción se finaliza con la adición de ácido sulfúrico. La intensidad del color del producto de reacción amarillo resultante se mide en 450nm utilizando el lector de la microplaca y su correspondiente absorbancia o densidad óptica es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el espécimen.

PRECAUCIONES ANALÍTICAS

- Usar solamente muestras de suero o plasma recogidos en EDTA (etilendiamino tetracetato), heparina, citrato de sodio, K-Oxalato o ácido-citrato-dextrosa (ACD). Antes de almacenar, asegurarse de que los coágulos sanguíneos o las células sanguíneas han sido separadas por centrifugación.
- No utilizar sangre u otros fluidos corporales.
- Para lograr un resultado óptimo en los ensayos es necesario **SEGUIR DE FORMA ESTRICTA** el procedimiento para el ensayo descrito en estas Instrucciones de uso. Las desviaciones del procedimiento indicado pueden conducir a resultados anómalos.
- NO MODIFICAR O SUSTITUIR REACTIVOS DE UN KIT DE UN LOTE POR OTRO.** Los controles, conjugados y microplacas están combinados para su funcionamiento óptimo. Utilice solamente los reactivos proporcionados con el kit.
- No utilice los componentes del kit una vez pasada la fecha de caducidad que está impresa en la caja del kit.
- Evitar la contaminación microbiana de los reactivos al abrir y retirar las porciones alícuotas de los frascos o botellas originales. Si esto sucediese, se reduciría la durabilidad en almacenamiento de los kits y podría producir resultados erróneos. Usar técnicas asépticas incluyendo pipetas desechables o de punta desechable para retirar las porciones alícuotas de los frascos.
- Para evitar la contaminación cruzada, utilice una nueva punta de pipeta para cada espécimen y no toque la parte superior o inferior de las tiras, el borde de los pocitos o el líquido que contienen, con los dedos o las puntas de pipeta.
- Se recomienda que los contenedores de cristal que se utilicen con los reactivos se laven con una solución de 2M de ácido clorhídrico y se aclaren bien con agua destilada o desionizada antes de su uso.
- Para obtener resultados óptimos, equilibre todos los reactivos y especímenes de prueba a la temperatura ambiente (25°C ± 5°C) antes de utilizarlos. Inmediatamente después de su uso, volver a colocarlos en almacenaje a una temperatura de 2°C a 8°C.
- Utilizar solamente agua de calidad para reactivos, desionizada o destilada.
- TODOS LOS REACTIVOS DEBEN MEZCLARSE BIEN ANTES DE USARLOS.**
- LA SOLUCIÓN DE CONJUGADO PARA TRABAJAR DEBE PREPARARSE JUSTO ANTES DE SU USO.**

COMPONENTES DEL KIT

	Descripción de componente	Cantidad proporcionada
	MICROPLACAS HEV Doce tiras de 8 pocitos por placa, selladas en una bolsa de aluminio con un secante. Cada pocito de microplaca contiene proteína HEV recombinante absorbida. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 placa (96 pruebas)
	CONTROL NO REACTIVO Suero humano normal inactivado, no-reactivo para anti-HCV, anti-HEV, HBsAg y anti-HIV-1. Contiene thiomersal y azida sódica como conservantes. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 frasco (400µl)
	CONTROL REACTIVO Suero humano inactivado con una alta concentración de anticuerpos IgG específicos para HEV. Contiene thiomersal y azida sódica como conservantes. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 frasco (400µl)
	DILUYENTE SAM (SAM = Sample Addition Monitor / monitor de adición de la muestra) Solución salina basada en tris con contenido de suero de cabra normal tratado térmicamente, albúmina sérica bovina (BSA) y estabilizantes. Contiene BRONIDOX®L como conservante. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 botella (100ml)
	CONCENTRADO PARA LAVADO DE PLACAS (20x) Tampón fosfato-salino con Tween-20. Contiene cloroacetamida como conservante. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 botella (120ml)
	CONJUGADO Antígeno HEV marcado con peroxidasa de rábano. Contiene 0,02% thiomersal como conservante. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 frasco (50µl)
	SUBSTRATO Tampón con contenido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Almacenar en la oscuridad de 2°C a 8°C.	1 botella (12,5ml)
	SOLUCIÓN DE PARADA Solución de 2M de ácido sulfúrico. Almacenar de 2°C a 8°C.	1 botella (30ml)
	CUBIERTAS DE PLACA Cubiertas adhesivas para microplacas para su uso durante la incubación.	4 unidades
	INSTRUCCIONES DE USO	1 copia

ALMACENAMIENTO

- Almacenar el kit **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** y sus componentes de 2°C a 8°C cuando no se estén utilizando.
- Todos los reactivos y tiras de la prueba que se encuentren cerrados o no abiertos, siempre que se almacenen a una temperatura de 2°C a 8°C, se mantendrán estables hasta la fecha de caducidad que aparece en el kit. No congelar los reactivos.
- Cuando el Concentrado para el lavado de placas (20x) se almacena a una temperatura de 2°C a 8°C, pueden formarse cristales. Es necesario disolver estos cristales, calentando el producto a 37°C antes de su uso.
- Cuando el diluyente se almacena entre 2°C y 8°C puede precipitarse. Esto no afectará el funcionamiento del kit.

RECOGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LOS ESPÉCIMENES

Pueden utilizarse especímenes de suero o plasma recogidos en EDTA (etilendiamino tetracetato), heparina, citrato de sodio, K-Oxalato o ácido-citrato-dextrosa (ACD). Antes de almacenar, asegurarse de que los coágulos sanguíneos o las células sanguíneas han sido separadas por centrifugación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- Sólo para uso profesional.
- Acuda al prospecto del producto para encontrar información sobre los componentes potencialmente peligrosos.

INFORMACIÓN DE HIGIENE Y SEGURIDAD

PRECAUCIÓN: Este kit contiene materiales de origen humano. Ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que los productos procedentes de la sangre humana no transmitirán infección alguna.

MANEJE LOS ESPÉCIMENES DEL ENSAYO Y LOS CONTROLES REACTIVOS Y NO REACTIVOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Se recomienda que los componentes y especímenes de la prueba se manejen utilizando prácticas de laboratorio óptimas. Deben desecharse de acuerdo con los procedimientos de seguridad establecidos.

El **Control reactivo** y **Control no reactivo** contienen 0,005% Thiomersal y azida sódica como conservantes. La azida sódica puede reaccionar con el cobre y con el plomo utilizado en algunos sistemas de fontanería formando sales explosivas. Las cantidades utilizadas en este kit son muy pequeñas, de cualquier forma, al desechar materiales que contengan azida es necesario realizar la operación haciendo correr cantidades relativamente importantes de agua para prevenir la posible acumulación de azida en el sistema de fontanería.

En virtud del reglamento de la CE 1272/2008 (CLP), los componentes peligrosos se clasifican y etiquetan de la forma siguiente:

Componente:	CONCENTRADO PARA EL LAVADO DE PLACAS (20X)
Palabra de señal:	advertencia
Pictograma:	
Declaraciones de peligro:	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
Declaraciones de precaución:	P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
Declaraciones complementarias:	La Ficha de datos de seguridad EUH210 está disponible bajo solicitud
Contiene:	2 % Cloroacetamida

Es preferible utilizar especímenes frescos, aquellos que sufren ciclos de congelación y descongelación repetida no son recomendables para su uso. Los especímenes deben almacenarse a una temperatura de 2°C a 8°C si la prueba se va a realizar dentro de los 7 días siguientes a su recogida, o deben congelarse a una temperatura de ≤ -20°C si el análisis se demorará más de 7 días. Además se puede utilizar hasta 0,1% de azida sódica para estabilizar los especímenes de plasma o suero almacenados de 2°C a 8°C.

Es preferible utilizar muestras no hemolizadas. Las muestras lipémicas, ictericas o contaminadas (por partículas) deben filtrarse (0,45µm) o centrifugarse antes de proceder a su análisis.

Se puede realizar la inactivación de las muestras, pero ésta no es necesaria para que el resultado de la prueba sea óptimo

Para inactivar:

- Afloje la tapa del contenedor de la muestra.
- La inactivación térmica de la muestra se consigue a 56°C durante 30 minutos al baño maría.
- Dejar que la muestra enfrie antes de volver a apretar la tapa.
- La muestra se puede almacenar congelada hasta que se vaya a proceder a su análisis.

No se recomienda la congelación y descongelación repetida de las muestras.

MATERIALES ADICIONALES NECESARIOS PERO QUE NO SE PROPORCIONAN

- Papel absorbente desechable para mesa de laboratorio y toallas de papel.
- Tubos o contenedores de polipropileno.
- Pipetas graduadas: 5ml, 10ml.
- Pipeteador o pipeta multicanal capaz de dispensar 20µl, 100µl, y 200µl.
- Pipeteador o pipeta capaz de dispensar 1-1000µl.
- Puntas de pipeta desechables.
- Depósitos para reactivos (cuba) con una capacidad de 25 ml.
- Agua de calidad para reactivos, desionizada o destilada.
- Matraces: 500ml, 1 litro.
- Lavador de microplacas ELISA. Igualmente se puede realizar el lavado de forma manual utilizando un pipeteador o una pipeta multicanal que dispense volúmenes de 0,3 ml y un dispositivo aspirador.
- Una incubadora de 37 ± 1°C.
- Un lector de microplacas con longitud de onda dual (A₄₅₀-A₆₅₀) o sencilla (A₆₅₀).
- Agente desinfectante efectivo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- CONJUGADO DE TRABAJO**
 - EL CONJUGADO DE TRABAJO debe prepararse justo antes de su uso.**
 - Mezclar a conciencia **CONJUGADO** y **DILUYENTE** antes de su uso. **NO CENTRIFUGAR** la mezcla.
 - Diluir **CONJUGADO** con un factor de dilución de 1:500 con **DILUYENTE**. Por ejemplo, añadir 6,0µl de conjugado en 3,0ml de diluyente.
 - Usar solamente tubos o contenedores de polipropileno.
 - 9,0ml de **CONJUGADO DE TRABAJO** son necesarios para una microplaca.

Componente:	SOLUCIÓN DE PARADA
Palabra de señal:	Peligro
Pictograma:	
Declaraciones de peligro:	H315 Provoca irritação cutânea. H319 Provoca irritação ocular grave.
Recomendações de prudência:	P264 Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/ prendas/gafas/máscara de protección. P312 Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. P362 Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P332+P313 En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. P337+P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
Declaraciones complementarias:	La Ficha de datos de seguridad EUH210 está disponible bajo solicitud
Contiene:	El ácido sulfúrico 11,2 %

- Evitar la contaminación microbiana de los reactivos al abrir y retirar las porciones alícuotas de los frascos o botellas originales.
- No utilizar la pipeta con la boca para manipular los productos.
- Manipular los especímenes para los ensayo, las microplacas y los controles reactivos y no reactivos como agentes potencialmente infecciosos.
- Utilizar batas de laboratorio y guantes desechables durante la realización de los ensayos. Desechar guantes en bolsas de basura para materiales de riesgo biológico. Lavar las manos a conciencia al terminar la manipulación.
- Es muy recomendable realizar estos ensayos en una cabina de seguridad biológica.
- Mantener los materiales alejados de cualquier comida o bebida.
- En caso de accidente o de contacto con los ojos, lávelos inmediatamente con agua abundante y acuda al médico.

DIAGRAMA DE PREPARACIÓN DE CONJUGADO (factor de dilución 1:500)		
Número de pruebas	Vol. de conjugado (µl)	Vol. de diluyente (ml)
24	6,0	3,0
48	10,0	5,0
72	14,0	7,0
96	18,0	9,0

2. TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO

- El TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO debe prepararse justo antes de su uso.
- Diluir 1 volumen de CONCENTRADO PARA LAVADO DE PLACAS con 19 volúmenes de agua destilada (de calidad para reactivos). Mezclar bien. Para lavar 1 placa son necesarios unos 200ml de tampón de lavado aproximadamente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

IMPORTANTE: - Los inmunoensayos de este tipo son sensibles a la temperatura y dependientes del tiempo. El seguimiento estricto del procedimiento de ensayo asegurará un resultado óptimo del mismo. Las desviaciones del procedimiento recomendado pueden conducir a resultados anómalos.

- Preparar el **CONJUGADO DE TRABAJO** tal como se describe en la **PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS**.
- Retirar la microplaca de la bolsa de aluminio.
- Agitar los frascos del espécimen y de control antes del uso.
- Rellenar un depósito para reactivos con el **CONJUGADO DE TRABAJO**. Utilizando una pipeta o pipeteador multicanal, añadir 80µl de **CONJUGADO DE TRABAJO** a todos los pocitos.
- Los pocitos A1 y B1 son **'MUESTRAS EN BLANCO'**. **NO AÑADA ESPÉCIMEN A ESTOS POCITOS**. Añada 20µl de diluyente a cada uno de estos pocitos.
- Añadir 20µl de espécimen al pocito asignado, empezando por el pocito A2. Esto proporcionará una dilución final del espécimen de 1:5. Mezclar pipeteando arriba y abajo una vez. **NO COLOCAR ESPÉCIMEN EN UN POCITO VACÍO**.
- Después de añadir el espécimen para analizar, añadir 20µl de **CONTROL NO REACTIVO** por pocito a los pocitos C1, D1 y E1.
- Añadir 20µl de **CONTROL REACTIVO** por pocito a los pocitos F1, G1 y H1. Mezclar bien golpeando suavemente en todos los lados de la microplaca, teniendo cuidado de mantener la placa horizontal encima de la mesa de laboratorio.
- Cubrir con cuidado la microplaca con la cubierta de placa que se proporciona para evitar la evaporación durante la incubación.

- Incubar durante 60 minutos a 37°C (No utilizar un baño maría a 37°C para la incubación)** 60 min
- Retirar y desechar la cubierta de placa y lavar la microplaca con el **TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO** utilizando uno de los dos métodos recomendados. 300µl por pocito por cada lavado
 - Lavador de microplacas automático o semiautomático: lavar seis (6) veces con por lo menos 300µl por pocito por lavado.
 - Lavado manual de microplacas: aspirar totalmente el contenido de todos los pocitos poniendo la punta del aspirador con cuidado en el fondo de cada pocito. **TENER CUIDADO DE NO ARAÑAR LA SUPERFICIE INTERIOR DEL POCITO**. Llenar toda la placa con por lo menos 300µl por pocito, luego aspirar inmediatamente en el mismo orden. Realizar este ciclo seis (6) veces.
- Secar invirtiendo la microplaca y dando golpecitos firmes en un papel absorbente. Todo el tampón de lavado de la placa debe retirarse secando. La formación de colores podría entorpecerse durante la incubación del sustrato si existiesen residuos del tampón de lavado de placa.
- Rellenar un depósito para reactivos con el **SUBSTRATO**. Usando un pipeteador o una pipeta multicanal, añadir 100µl de **SUBSTRATO** a cada pocito. Colocar una cubierta de placa. 100µl
- Incubar en la oscuridad durante 30 minutos a 37°C. (**No utilizar un baño maría a 37°C para la incubación**). 30 min
- Retirar y desechar la cubierta de placa.
- Utilizando una pipeta o pipeteador multicanal, añadir 50µl de **SOLUCIÓN DE PARADA** a cada pocito. Mezclar despacio golpeando suavemente la placa. 50µl
- Determinar la absorbancia para cada pocito a 450nm. Si se utiliza un instrumento de filtro dual, la longitud de onda de referencia debe ser 620nm.

NOTA: La absorbancia debe leerse dentro los 10 minutos siguientes a la adición de la SOLUCIÓN DE PARADA.

	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

5

Especificidad

Se analizaron un total de 368 muestras formadas por una serie de muestras de donantes de sangre (n=236) y otras serie de muestras con reacción cruzada potencial (n=132). Los resultados, resumidos en la Tabla 2, mostraron una especificidad general de diagnóstico del 99,2% tanto para el grupo de muestras de donantes de sangre como para el grupo de muestras de reacción cruzada potencial.

Tabla 2 Rendimiento del ensayo. Especificidad

Controles de otras enfermedades	N° de muestras			Especificidad
	Negativo	Reactivo		
Donantes de sangre (EE. UU.)	236	234	2	99,2%
Anti HAV positivo	33	33	0	100%
Anti HCV positivo	43	43	0	100%
HBsAg positivo	20	20	0	100%
Anti HSV positivo	20	19	1	95%
Factor reumatoide	16	16	0	100%
Total	368	365	3	99,2%

Reproductibilidad

La precisión de **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** se ha evaluado en nuestros laboratorios utilizando 2 calibradores de suero incluyendo una muestra HEV IgG positivo y una muestra HEV IgM positivo.

Intraensayos: Se realizaron ensayos con tres lotes de componentes ELISA de 30 réplicas de cada suero calibrador en 3 ocasiones. El coeficiente de variación (CV) para los 3 calibradores en diferentes ensayos fluctuó entre 3,7% y 5,7% (Tabla 3).

Entreensayos: Se registraron un total de 90 observaciones para establecer la precisión entreensayos. Estas observaciones representan 3 ensayos utilizando 3 lotes de componentes ELISA con cada suero calibrador. El coeficiente de variación para los 2 calibradores presentó una variación entre 5,8% y 10,8% (Tabla 3).

Tabla 3 Rendimiento del ensayo. Reproducibilidad

Muestras	Componentes del ensayo	N° de réplicas	OD/COV Medio	Precisión intraensayos (CV, %)	Precisión entreensayos (CV, %)
HEV IgG Positivo	#1	30	5,344	3,7	5,8
	#2	30	5,752	4,6	
	#3	30	5,337	5,4	
HEV IgG Positivo	#1	30	8,065	5,3	10,8
	#2	30	7,507	4,3	
	#3	30	6,391	5,7	

Precisión total: Se realizaron ensayos con tres lotes de componentes ELISA de 5 réplicas de cada suero calibrador en cada ocasión. Este procedimiento fue repetido 30 veces durante un periodo de 21 días por 4 operadores. La precisión general se estableció con 300 puntos de datos (OD/COV) obtenidos con 2 sueros calibradores. El coeficiente de variación para los 2 calibradores presentó una variación entre 12,1% y 15,7%.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

Los resultados que muestran reactividad repetida a partir de ensayos **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** indican una presunción de evidencia de anticuerpos contra el HEV en el espécimen. Un resultado **NO-REACTIVO** a partir de ensayos

5

CONTROL DE CALIDAD

- El ensayo de la MUESTRA EN BLANCO debe realizarse por duplicado, mientras que el del CONTROL NO REACTIVO y del CONTROL REACTIVO debe hacerse por triplicado en cada placa con cada prueba de especímenes.
- Los valores de la Muestra en blanco deben tener una absorbancia de $\leq 0,100$.
- Los valores de Control no reactivo deben tener una absorbancia de $\leq 0,100$.
- Por lo menos 2 de los 3 valores de Control reactivo deben tener absorbancia de $\geq 0,500$. Cualquier valor fuera de este rango no debe utilizarse para calcular la media del control reactivo (RC \bar{x}).

RESULTADOS

Cada microplaca debe considerarse por separado cuando se calculen e interpreten los resultados del ensayo, sin tener en cuenta el número de placas procesadas al mismo tiempo.

La presencia o ausencia de anticuerpos específicos para HEV se determina relacionando la absorbancia de los especímenes con el VALOR UMBRAL (COV) de la placa.

El VALOR UMBRAL se calcula como (0,40 unidad de absorbancia + Absorbancia media del Control no reactivo):

$$\text{VALOR UMBRAL} = 0,40 + \text{NRC}\bar{x}$$

CÁLCULO DE RESULTADOS

- Cálculo de absorbancia media del control no reactivo (NRC \bar{x})**

Ejemplo:	Pocito n°	Absorbancia
	C1	0,050
	D1	0,051
	E1	0,052
	Total	<u>0,153</u>
	Media	0,153 / 3 = 0,051 (NRC \bar{x})

Los valores individuales de Control no reactivo deben ser $\leq 0,100$ unidades.

Si uno de los valores de Control no reactivo no cumple con el criterio anterior, debe excluirse como anómalo. La media del Control no reactivo (NRC \bar{x}) debe volverse a calcular utilizando el resto de los valores de Control no reactivo. Todos los valores de los controles no reactivos individuales deben cumplir el criterio anterior o el ensayo se considerará no válido y será necesario repetirlo.

- Cálculo de absorbancia media del Control reactivo (RC \bar{x})**

Ejemplo:	Pocito n°	Absorbancia
	F1	1,221
	G1	1,144
	H1	1,298
	Total	<u>3,663</u>
	Media	3,663 / 3 = 1,221 (RC \bar{x})

Los valores individuales de Control reactivo deben ser $\geq 0,500$ unidades.

Si uno de los valores de Control reactivo no cumple con el criterio anterior, debe excluirse como anómalo. La media del Control reactivo (RC \bar{x}) debe volverse a calcular utilizando el resto de los valores de Control reactivo. Todos los valores de los controles reactivos individuales deben cumplir el criterio anterior o el ensayo se considerará no válido y será necesario repetirlo.

- Cálculo de la diferencia entre RC \bar{x} y NRC \bar{x}**

Ejemplo:	NRC \bar{x}	= 0,051
	RC \bar{x}	= 1,221
	RC \bar{x} - NRC \bar{x}	= 1,221 - 0,021
		= 1,200

Para que el ensayo sea válido, el valor RC \bar{x} - NRC \bar{x} debe ser $\geq 0,500$. De lo contrario, debe sospecharse de posibles fallos en la técnica o de deterioro en los reactivos y el ensayo debe repetirse.

- Cálculo del valor UMBRAL**

Ejemplo:	Valor UMBRAL	= 0,40 + NRC \bar{x}
	NRC \bar{x}	= 0,051
	Valor UMBRAL	= 0,40 + 0,051
		= 0,451

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Especímenes con valores de absorbancia menores al valor **UMBRAL** son considerados No reactivos por **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.
- Especímenes con valores de absorbancia **mayores o iguales** al valor UMBRAL se consideran **inicialmente reactivos** siguiendo el criterio de **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** y deben volverse a analizar por duplicado antes de realizar una interpretación.
- Especímenes que se hayan mostrado como Reactivos después de repetir la prueba pueden considerarse que presentan **reactividad repetida** para los anticuerpos contra el HEV de acuerdo al criterio de **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.
- Especímenes que se mostraron inicialmente como reactivos y que se presentan como **No reactivos** tras repetir la prueba, se consideran **negativos** de acuerdo al criterio de **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad

En nuestros laboratorios se analizaron 189 muestras con HEV IgM positivo (infección aguda) y 67 con HEV IgG positivo/IgM negativo (infección en el pasado). Los resultados resumidos en la Tabla 1 muestran una sensibilidad del 99,5% para las 189 muestras confirmadas con HEV IgM positivo, y del 98,5% para aquellas con HEV IgG positivo y IgM negativo.

Tabla 1 Rendimiento del ensayo. Sensibilidad

Tipo de muestra	N° de muestras	Reactivo	Negativo	Sensibilidad
HEV IgM positivo (Nepal)	151	150	1	99,3%
HEV IgM positivo (China)	38	38	0	100%
HEV IgG positivo/IgM negativo (archivado)	67	66	1	98,5%
Total	256	254	2	99,2%

6

- Skidmore, S.J., P.O. Yarbough, K.A. Gabor, A.W. Tam, G.R. Reyes, A.J.E. Flower. Imported Hepatitis E in UK. The Lancet. 1991. 337; 1541.
- Dawson, G.J., I.K. Mushahwar, K.H. Chau, G. L. Gittnick. Detection of long-lasting antibody to Hepatitis E Virus in a US traveller to Pakistan. The Lancet. 1992. 340; 426.
- Pavia M, Iiritano E, Veratti MA, Angelello IF. Prevalence of Hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. Infection. 1998. 26(1): 32-35.
- Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious Hepatitis E Virus isolated from sewage in an area where Hepatitis E is not endemic. Appl Environ Microbiol. 1998. 64(11): 4485-4488.
- Sylvan SP, Jacobson SH, Christenson B. Prevalence of antibodies to Hepatitis E Virus among hemodialysis patients in Sweden. J Med Virol. 1998. 54(1): 38-43.
- McCrudden R, O'Connell S, Farrant T, Beaton S, Iredale JP, Fine D. Sporadic acute Hepatitis E in the United Kingdom: an underdiagnosed phenomenon? Gut. 2000. 46(5): 732-733.
- Dalekos GN, Zervou E, Elisaf M, Germanos N, Galanakis E, Bourantas K, Siamopoulos KC, Tsianos EV. Antibodies to Hepatitis E Virus among several populations in Greece: increased prevalence in an hemodialysis unit. Transfusion. 1998. 38(6): 589-595.
- Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E Virus: relevance in blood donors and other risk groups. Vox Sang. 1998. 75(4): 267-269.
- Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Kwo PY, Knigge MF, Smalley DL, Rosenblatt JE, Desai SM, Mushahwar IK. The sequence and phylogenetic analysis of a novel Hepatitis E Virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. J Gen Virol. 1998. 79(Pt 3): 447-456. Errata en: J Gen Virol. 1998. 79(Pt 10): 2563.
- Tsang TH, Denison EK, Williams HV, Venczel LV, Ginsberg MM, Vugia DJ. Acute Hepatitis E infection acquired in California. Clin Infect Dis. 2000. 30(3): 618-619.
- Heath TC, Burrow JN, Currie BJ, Bowden FJ, Fisher DA, Demeiuk BH, Locarnini SA, Anderson DA. Locally acquired Hepatitis E in the Northern Territory of Australia. Med J Aust. 1995. 162(6): 318-319.
- Wu JC, Chen CM, Chiang TY, Sheen IJ, Chen JY, Tsai WH, Huang YH, Lee SD. Clinical and epidemiological implications of swine Hepatitis E virus infection. J Med Virol. 2000. 60(2): 166-171.
- Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental Hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol. 1990. 32(1): 58-59.
- Usmanov RK, Balaian MS, Dvoynikova OV, Alymbaeva DB, Zamiatina NA, Kazachkov luA, 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.

Oficina regional:

MP Biomedicals GmbH Alemania
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Alemania
Tel. : +49 5651 921 204
Fax : +49 5651 921 181
Correo electrónico : diagnostics@mpbio.com

8