

HEV ELISA 4.0

Istruzioni per l'uso



Data della revisione: 2016-02
MBE0011-ITA-3

Nota: modifiche evidenziate

REF 23540-096: (96 test)

NOME ED USO PREVISTO

Il sistema **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** è un saggio di immunoassorbimento enzimatico destinato alla rilevazione degli anticorpi totali contro il virus dell'epatite E nel siero o nel plasma umano. È inteso come prova di screening, poiché richiede test ripetuti degli esemplari inizialmente reattivi.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus RNA non avvolto in senso positivo a singolo filamento, identificato come un virus dell'epatite E per la prima volta nel 1990 (1,2) da Genelabs. L'andamento dell'infezione dell'epatite E è generalmente acuto e auto-limitato senza conseguenze croniche. Tuttavia, è presente un'alta incidenza di mortalità nelle donne incinte al terzo trimestre di gravidanza, circa il 10-20% (3) ed un tasso di mortalità dell'1-2% nella popolazione in genere, che è di 10 volte superiore a quello dell'epatite A (HAV). Con la clonazione dell'agente eziologico di ET-NANBH presso Genelabs e l'identificazione del tipo comune di epitopo virale (1.2), sono stati sviluppati strumenti diagnostici specifici per rilevare gli anticorpi dell'HEV.

Le maggiori epidemie dell'epatite E (ET-NANBH) si sono verificate nelle regioni in via di sviluppo quali l'Asia, l'ex URSS, l'America Centrale e l'Africa (3.4). Casi sporadici sono anche stati segnalati nelle nazioni sviluppate, compresa l'Australia, il Regno Unito e gli Stati Uniti (5.6.7). Generalmente, i casi nelle nazioni sviluppate sono stati associati ai viaggi nelle regioni endemiche. Tuttavia, prove accumulate suggeriscono che casi sporadici di infezioni dell'epatite E senza un'associazione alle regioni endemiche si verificano anche in un'ampia parte delle zone non endemiche, compresa l'Europa occidentale, la Grecia, gli Stati Uniti, l'Australia e Taiwan (8-17).

Negli esperimenti è stato dimostrato che l'HEV umano può infettare le specie animali (18-21), mentre i primati non umani possono essere infettati con l'HEV dei maiali (21). Studi recenti sulla prevalenza dell'infezione HEV negli animali mostrano un'elevata sieroprevalenza di anticorpi dell'HEV in varie specie animali, compresi i maiali, gli equini, i roditori, ecc. Molte prove indicano che la larga diffusione dell'infezione HEV negli animali, in particolare nei maiali, potrebbe rappresentare un serbatoio importante per la trasmissione del virus. Alcuni casi sporadici dell'infezione HEV nelle zone non endemiche possono essere attribuiti alla trasmissione zoonotica.

Un HEV ELISA altamente sensibile e specifico è necessario per la rilevazione degli anticorpi totali contro l'HEV nel siero o nel plasma umano.

Il metodo **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** utilizza un antigene ricombinante proprietario, che si conserva in misura elevata tra vari ceppi dell'HEV (22.23.24) per rilevare la presenza di anticorpi specifici, inclusi nelle classi IgG, IgM e IgA contro l'HEV.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

Il seguente simboli grafici vengono utilizzati o si trovano nei prodotti e nelle confezioni del Sistema diagnostico MP. Questi simboli sono tra quelli più comuni visualizzati sui dispositivi medici e sulle relative confezioni. Alcuni dei simboli comuni sono spiegati con maggiori dettagli nella norma europea e internazionale EN ISO 15223: 2012.

	Utilizzare entro		Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Codice del lotto		Numero di catalogo
	Limiti di temperatura		Attenzione
	Fabbricante		Mandatario nella Comunità Europea
	Contenuto sufficiente per <n> saggi		Consultare le istruzioni per l'uso
	Non riutilizzare		

CONT Sommario

PRINCIPI CHIMICI E BIOLOGICI DELLA PROCEDURA

I pozzetti delle strisce delle micropiastre di polistirolo sono ricoperti con un antigene ricombinante proprietario che presenta un epitopo conformazionale che si conserva in misura elevata tra i vari ceppi dell'HEV. Il coniugato HRP viene prodotto con lo stesso antigene ricombinante identificato con la perossidasi di rafano. Questo coniugato viene prima diluito accuratamente nel tampone diluente, quindi erogato nei pozzetti rivestiti di antigene delle micropiastre. I campioni del plasma o del siero vengono quindi aggiunti ai pozzetti rivestiti di antigene che contengono il tampone diluente ed il coniugato. Dopo l'incubazione, gli anticorpi specifici dell'HEV (IgG, IgM e IgA), se presenti, si legheranno sia agli antigeni immobilizzati sui pozzetti che all'antigene del coniugato nel diluente. Successivamente, i pozzetti vengono lavati completamente per rimuovere i materiali separati. Una soluzione del substrato che contiene tetrametilbenzidina al 3.3', 5.5' viene quindi aggiunta a ciascun pozzetto. La presenza di anticorpi specifici viene indicata dalla presenza della soluzione di colore blu dopo l'incubazione. La reazione viene completata con l'aggiunta di acido solforico. L'intensità del colore del prodotto giallo risultante dalla reazione viene misurata a 450nm usando il lettore della micropiastro e la relativa densità ottica o la capacità di assorbimento corrispondente proporzionalmente alla quantità di anticorpi presenti nella provetta.

- L'acido solforico può causare ustioni. **EVITARE IL CONTATTO.** Se entra in contatto con la pelle, lavarsi con molta acqua.
- Evitare il contatto dell'acido solforico con qualsiasi agente ossidante o metallo.
- Non esporre il substrato a luce forte.
- Ripulire immediatamente qualsiasi materiale potenzialmente contagioso con carta assorbente e tamponare la zona contaminata con disinfettante efficace prima di riprendere il lavoro.

PRECAUZIONI ANALITICHE

- Usare soltanto sieri o campioni del plasma raccolti in EDTA, eparina, citrato di sodio, K Ossalato o Destrosio di citrato acido (ACD). Prima dell'immagazzinaggio, accertarsi che i grumi o le cellule di sangue siano stati separati con centrifugazione.
- Non usare sangue intero o altri fluidi fisiologici.
- Le prestazioni ottimali del saggio richiedono il **RISPETTO RIGOROSO** delle procedure del saggio descritte in queste Istruzioni per l'uso. Le deviazioni dalla procedura possono causare risultati aberranti.
- NON MODIFICARE O SOSTITUIRE I REAGENTI DI UN LOTTO DEL KIT DA UN ALTRO KIT.** I controlli, il coniugato e le micropiastre sono abbinati per prestazioni ottimali. Utilizzare soltanto i reagenti forniti con il kit.
- Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza stampata sulla confezione del kit.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti nell'aprire e rimuovere le aliquote dalle fiale o dalle bottiglie originali. Questo eviterà la riduzione prematura della durata d'immagazzinaggio dei kit, nonché risultati errati. Usare tecniche asettiche, comprese le pipette o punte monouso delle pipette nell'estrarre le aliquote dalle fiale.
- Per impedire la contaminazione trasversale, usare una nuova punta della pipetta per ogni provetta con aliquote e non toccare la parte superiore o inferiore delle strisce, del bordo dei pozzetti o del liquido nei pozzetti con le dita o le punte della pipetta.
- Prima dell'uso, si consiglia di lavare con acido cloridrico 2M i componenti di vetro utilizzati con i reagenti e di risciacquare abbondantemente con acqua distillata o deionizzata.
- Per risultati migliori, equilibrare tutti i reagenti e le provette a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) prima dell'uso. Subito dopo l'uso, ritornare alla temperatura di immagazzinaggio compresa tra 2°C e 8°C.
- Usare soltanto reagenti di qualità, acqua distillata o deionizzata per diluire i reagenti.
- TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE MESCOLATI BENE PRIMA DELL'USO.**
- LA SOLUZIONE CONIUGATA DEVE ESSERE FRESCA PRIMA DELL'USO.**
- Non esporre i reagenti o eseguire le prove in una zona che contiene un elevato livello di vapori chimici disinfettanti (per esempio vapori di ipoclorito) durante l'immagazzinaggio o durante le fasi di incubazione. Il contatto inibisce la reazione al colore. Inoltre, non esporre i reagenti alla luce forte.

COMPONENTI DEL KIT		
	Descrizione componente	Quantità fornita
	HEV MICROPLATE Dodici strisce di 8-pozzetti per piastra, sigillate in un sacchetto di alluminio con dissecante. Ogni pozzetto della micropiastra contiene proteine HEV ricombinanti assorbite. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 piastra (96 test)
	CONTROLLO NON REATTIVO Siero umano normale inattivato, non-reattivo per l'anti-HCV, anti-HEV, l'HBsAg e l'anti-HIV-1. Contiene conservanti quali thimerosal e azoturo di sodio. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 fiala (400µl)
	CONTROLLO REATTIVO Siero umano inattivato che contiene un elevato titolo di anticorpi IgG specifici per l'HEV. Contiene conservanti quali azoturo di sodio e thimerosal. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 fiala (400µl)
	DILUENTE SAM (SAM = Sample Addition Monitor / metodo di analisi del campione) Soluzione salina basata su Tris che contiene siero di capra normale trattato termicamente, albumina del siero di bue e stabilizzatori. Contiene conservanti quali BRONIDOX®L. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 bottiglia (100ml)
	CONCENTRATO PER LAVAGGIO PIASTRE (20x) Soluzione salina tamponata al fosfato con Tween-20. Contiene il conservante cloroacetamide. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 bottiglia (120ml)
	CONIUGATO Antigene HEV identificato con la perossidasi di rafano. Contiene il conservante thimerosal allo 0,02%. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 fiala (50µl)
	SUBSTRATO Tampone contenente 3.3', 5.5' di tetrametilbenzidina (TMB). Conservare al buio ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 bottiglia (12,5ml)
	SOLUZIONE DI ARRESTO Soluzione acida solforica 2M. Conservare ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.	1 bottiglia (30ml)

COPERCHI DELLA PIASTRA 4 parti
Coperchi dell'adesivo per la micropiastra durante l'incubazione.

ISTRUZIONI PER L'USO 1 copia

AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

- Soltanto per l'uso diagnostico *in vitro*.
- Soltanto per l'uso professionale.
- Fare riferimento al prodotto che identifica le informazioni sui componenti potenzialmente pericolosi.

INFORMAZIONI SULLA SALUTE E LA SICUREZZA



ATTENZIONE: Questo kit contiene materiali di origine umana. Nessun metodo di prova può offrire la garanzia completa che i prodotti derivati da sangue umano non trasmetteranno infezioni.

MANIPOLARE LE PROVETTE, I CONTROLLI REATTIVI E NON-REATTIVI COME AGENTI POTENZIALMENTE CONTAGIOSI. Si consiglia di manipolare i componenti e le provette attenendosi alle norme corrette per il lavoro in laboratorio. Devono essere smaltite conformemente alle procedure di sicurezza definite.

Il **Controllo reattivo** ed il **Controllo non reattivo** contengono Thimerosal allo 0,005% e azoturo di sodio allo 0,1%. L'azoturo di sodio può reagire con il rame ed il piombo usati in alcuni sistemi dell'impianto idraulico per formare i sali esplosivi. Le quantità utilizzate in questo kit sono piccole. Tuttavia, nello smaltire i materiali contenenti azoturo devono essere risciacquati con quantità di acqua relativamente grandi per impedire l'accumulazione di azoturo di metallo nel sistema dell'impianto idraulico.

In conformità con il Regolamento CE 1272/2008 (CLP) i componenti pericolosi sono classificati ed etichettati come segue:

Componente:	SOLUZIONE CONCENTRATA LAVAGGIO PIASTRE (20X)
Simbolo di avvertenza:	avvertimento
Pittogramma:	
Frase di rischio:	H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.
Consigli di precauzione:	P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272 Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.
Dichiarazioni supplementari:	La scheda dati di sicurezza EUH210 è disponibile a richiesta
Contiene:	2 % cloroacetammide

effettuata entro 7 giorni dalla raccolta o congelata a ≤ -20°C, se il test deve essere ritardato per oltre 7 giorni. Inoltre, è possibile utilizzare fino allo 0,1% di azoturo di sodio per stabilizzare le provette del plasma o del siero immagazzinate ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

Sono preferiti i campioni vuoti e non emolizzati. I campioni itterici o lipemici contaminati (particolato) devono essere filtrati a (0,45µm) o centrifugati prima della prova.

I campioni possono essere inattivati, ma questo non è un requisito per le prestazioni ottimali della prova.

Inattivare come segue:

- Allentare la protezione del contenitore del campione.
- Inattivare il campione con calore a 56°C per 30 minuti in un bagno d'acqua.
- Attendere che il campione si raffreddi prima di riserrare la protezione.
- Il campione può essere immagazzinato nello stato congelato fino all'analisi.

Non si consiglia di congelare/scongelerare ripetutamente il campione.

MATERIALI SUPPLEMENTARI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Carta assorbente monouso da banco e tovaglioli di carta.
- Tubi o contenitori di polipropilene.
- Pipette graduate: 5ml, 10ml.
- Pipetta multicanale in grado di erogare 20µl, 100µl e 200µl.
- Pipetta in grado di erogare 1-1000µl.
- Punte delle pipette monouso.
- Serbatoi del reagente (vaschette) con una capacità di 25ml.
- Acqua deionizzata o distillata, qualità di categoria reagente.
- Boccette: 500ml, 1 litro.
- Rondella per micropiastra ELISA. Alternativamente, il lavaggio può essere realizzato manualmente usando una pipetta multicanale che eroga volumi di 0,3ml e un dispositivo di aspirazione.
- Un'incubatrice da 37 ± 1°C.
- Un doppio lettore di micropiastre con una lunghezza d'onda doppia (A₄₅₀-A₆₂₀) o singola (A₄₅₀).
- Un agente disinfettante efficace.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- CONIUGATO ATTIVO**
a. Il **CONIUGATO ATTIVO** deve essere preparato fresco prima dell'uso.
b. Miscelare completamente il **CONIUGATO** ed il **DILUENTE** prima dell'uso. **NON CENTRIFUGARE** la miscela.
c. Diluire il **CONIUGATO** al fattore di diluizione di 1:500 con **DILUENTE**. Ad esempio, aggiungere coniugato a 6,0µl in un diluente da 3,0ml.
d. Utilizzare soltanto i contenitori o i tubi del polipropilene.
e. Per una micropiastra sono necessari 9,0ml di **CONIUGATO ATTIVO**.

RACCOLTA, TRASPORTO ED IMMAGAZZINAGGIO DELLE PROVETTE

È possibile utilizzare provette del plasma o del siero raccolte in EDTA, eparina, citrato di sodio, K ossalato o ACD. Prima dell'immagazzinaggio, accertarsi che i grumi o le cellule di sangue siano stati separati con centrifugazione.

Sono preferite le provette fredde, le provette sottoposte a cicli di congelamento/decongelamento non sono consigliate. Le provette devono essere immagazzinate ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C, nel caso il cui la prova deve essere

Componente:	SOLUZIONE DI ARRESTO
Simbolo di avvertenza:	Pericolo
Pittogramma:	
Frase di rischio:	H315 Provoca irritazione cutanea. H319 Provoca grave irritazione oculare.
Consigli di precauzione:	P264 Lavare accuratamente mani dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P312 In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P362 Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone. P332+P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
Dichiarazioni supplementari:	La scheda dati di sicurezza EUH210 è disponibile a richiesta
Contiene:	11,2 % di acido solforico

- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti nell'aprire e rimuovere le aliquote dalle fiale o dalle bottiglie originali.
- Non pipettare per via orale.
- Manipolare le provette reattive, le micropiastre ed i controlli reattivi e non reattivi come agenti potenzialmente contagiosi.
- Indossare guanti da laboratorio e guanti monouso mentre si effettua il test. Gettare i guanti in sacchetti per rifiuti biologici. Successivamente, lavarsi completamente le mani.
- Si consiglia vivamente di eseguire questo test in un armadietto per rischi biologici.
- Mantenere i materiali lontano da alimenti e bevande.
- In caso di incidenti o contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con molta acqua e chiedere il parere medico.
- Consultare immediatamente un medico nel caso in cui i materiali contaminati vengano ingeriti o entrino in contatto con lacerazioni aperte, o altre lacerazioni della pelle.

TABELLA PER LA PREPARAZIONE DEL CONIUGATO (1:fattore di diluizione 500)		
Numero di prove	Volume del coniugato (µl)	Volume del diluente (ml)
24	6,0	3,0
48	10,0	5,0
72	14,0	7,0
96	18,0	9,0

2. TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO

- Il TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO deve essere **preparato fresco prima dell'uso**.
- Diluire 1 volume di CONCENTRATO PER IL LAVAGGIO DELLA PIASTRA con 19 volumi di acqua distillata (qualità di livello reagente). Mescolare correttamente. Per lavare 1 piastra sono necessari circa 200ml di soluzione tampone per il lavaggio.

PROCEDURA DEL SAGGIO

IMPORTANTE: - I saggi immunologici di questo tipo sono termosensibili e dipendono dalla durata. Il rispetto rigoroso della procedura del saggio garantirà prestazioni ottimali del saggio. Le deviazioni dalla procedura possono causare risultati aberranti.

- Preparare il **CONIUGATO ATTIVO** come descritto nella **PREPARAZIONE DEI REAGENTI**.
- Rimuovere la micropiastra dal sacchetto di alluminio.
- Agitare la provetta e le fiale di controllo prima dell'uso.
- Riempire un serbatoio con reagente di **CONIUGATO ATTIVO**. Con una pipetta multicanale, aggiungere 80µl di **CONIUGATO ATTIVO** a tutti i pozzetti. 80µl
- I pozzetti A1 e B1 sono **"VUOTI"**. **NON AGGIUNGERE PROVETTE A QUESTI POZZETTI**. Aggiungere 20µl di diluente per pozzetta a queste pozzette. 20µl
- Aggiungere 20µl di provetta al pozzetto assegnato, cominciando dal pozzetto A2. Questo fornirà una diluizione di 1:5 alla provetta finale. Miscelare pipettando una volta verso l'alto e verso il basso. **NON POSIZIONARE LA PROVETTA IN UN POZZETTO VUOTO**. 20µl
- Dopo che è stata aggiunta la provetta, aggiungere correttamente 20µl di **CONTROLLO NON REATTIVO** per pozzetto ai pozzetti C1, D1 e E1. 20µl
- Aggiungere 20µl di **CONTROLLO REATTIVO** per pozzetto ai pozzetti F1, G1 e H1. Mescolare completamente colpendo delicatamente da entrambi i lati della micropiastra, facendo attenzione a mantenere la piastra in posizione piana sul banco. 20µl
- Coprire accuratamente la micropiastra con il coperchio della piastra fornito per impedire l'evaporazione durante l'incubazione.

10. **Incubare per 60 minuti ad una temperatura di C (non usare un bagno d'acqua di 37°C per l'incubazione).** 60 minuti

- Rimuovere e scartare il coperchio della piastra e lavare la micropiastra con la **SOLUZIONE TAMPONE DILUITA PER IL LAVAGGIO** usando uno dei due metodi consigliati. 300µl per pozzetto per lavaggio

A. Rondella della micropiastra automatica o semiautomatica - Lavare sei (6) volte con almeno 300µl per pozzetto per ogni lavaggio.

B. Rondella della micropiastra manuale – Aspirare correttamente il contenuto di tutti i pozzetti abbassando delicatamente la punta dell'aspiratore in fondo ad ogni pozzetto. **FARE ATTENZIONE A NON GRAFFIARE LA PARTE INTERNA DELLA SUPERFICIE DEL POZZETTO**. Riempire l'intera piastra con almeno 300µl per pozzetto, quindi aspirare immediatamente nello stesso ordine. Effettuare questo ciclo per (6) volte.

- Asciugare tamponando, invertendo la micropiastra e colpendo saldamente sulla carta assorbente. Qualsiasi soluzione tampone e residua per il lavaggio della piastra deve essere asciugata tamponando. La formazione del colore può essere inibita durante l'incubazione del substrato con una soluzione tampone residua per il lavaggio della piastra.

- Riempire un serbatoio con reagente di **SUBSTRATO**. Con una pipetta multicanale, aggiungere 100µl di **SUBSTRATO** ad ogni pozzetto. Applicare un coperchio alla piastra. 100µl

- Incubare per 30 minuti al buio a 37°C. **(Non usare un bagno d'acqua a 37°C per l'incubazione)**. 30 minuti

- Rimuovere e scartare il coperchio della piastra.

- Con una pipetta multicanale, aggiungere 50µl di **SOLUZIONE DI ARRESTO** ad ogni pozzetto. Mescolare delicatamente colpendo la piastra. 50µl

- Determinare correttamente la capacità di assorbimento per ogni pozzetto di 450nm. Se viene utilizzato uno strumento con doppio filtro, la lunghezza dell'onda di riferimento deve essere di 620nm.

NOTA: La capacità di assorbimento deve essere letta entro 10 minuti dall'aggiunta della SOLUZIONE DI ARRESTO.

	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

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

- Lo SPAZIO VUOTO deve essere analizzato due volte, mentre il CONTROLLO NON REATTIVO ed il CONTROLLO REATTIVO tre volte su ogni piastra con ogni test della provetta.
- I valori vuoti devono avere una capacità di assorbimento di $\leq 0,100$.
- I valori del controllo non reattivo devono avere una capacità di assorbimento di $\leq 0,100$.
- Almeno 2 dei 3 valori del Controllo reattivo devono avere una capacità di assorbimento di $\geq 0,500$. Qualsiasi valore all'esterno di questa gamma non deve essere utilizzato per il calcolo della Media di controllo reattiva (RCx).

RISULTATI

Ogni micropiastra deve essere considerata separatamente nel calcolare ed interpretare i risultati del saggio, a prescindere dal numero di piastre elaborate simultaneamente.

La presenza o l'assenza degli anticorpi specifici per l'HEV viene determinata correlando la capacità di assorbimento delle provette al VALORE DI CUT-OFF (COV) della piastra.

Il VALORE DI CUT-OFF viene calcolato come (unità della capacità di assorbimento 0,40 + capacità di assorbimento media NRC):

$$\text{VALORE DI CUT-OFF} = 0,40 + \text{NRCx}$$

CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolo della capacità di assorbimento media del controllo non reattivo (NRCx)**

Esempio:	N. pozzetto	Capacità di assorbimento
	C1	0,050
	D1	0,051
	E1	0,052
	Totale	0,153
	Media	0,153 / 3 = 0,051 (NRCx)

I valori di controllo non reattivo devono essere di $\leq 0,100$ unità.

Se un valore di Controllo non reattivo non soddisfa i criteri suddetti, deve essere escluso come aberrante. La Media di controllo non reattivo (NRCx) deve quindi essere ricalcolata usando i valori reattivi rimanenti del Controllo non reattivo. Tutti i singoli valori rimanenti del Controllo non reattivo devono soddisfare i criteri di verifica suddetti, altrimenti il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

2. Calcolo della capacità di assorbimento media del controllo reattivo (RCx)

Esempio:	N. pozzetto	Capacità di assorbimento
	F1	1,221
	G1	1,144
	H1	1,298
	Totale	3,663
	Media	3,663 / 3 = 1,221 (RCx)

I singoli valori del Controllo reattivo devono essere di $\geq 0,500$ unità.

Se un valore di controllo reattivo non risponde ai criteri suddetti, deve essere escluso come aberrante. La Media del controllo reattivo (RCx) deve quindi essere ricalcolata con i singoli Valori di controllo reattivo. Tutti i singoli valori del Controllo reattivo rimanenti devono soddisfare i criteri suddetti, altrimenti il saggio non è valido e deve essere ripetuto.

3. Calcolo della differenza fra RCx e NRCx

Esempio:	NRCx	= 0,051
	RCx	= 1,221
	RCx - NRCx	= 1,221 - 0,021 = 1,200

Affinché il saggio sia valido, il valore RCx - NRCx deve essere di $\geq 0,500$. Altrimenti, una tecnica impropria o il deterioramento dei reagenti può essere ritenuto presunto e il saggio deve essere ripetuto.

4. Calcolo del valore di CUT - OFF

Esempio:	Valore di CUT - OFF	= 0,40 + NRCx
	NRCx	= 0,051
	Valore di CUT - OFF	= 0,40 + 0,051 = 0,451

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Le provette con valori della capacità di assorbimento inferiori al valore di CUT - OFF vengono considerati come **Non reattivi da MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.
- Le provette con valori della capacità di assorbimento **superiori o uguali al valore di CUT - OFF** sono considerati inizialmente reattivi dai criteri del saggio **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** e devono essere riprovati due volte prima dell'interpretazione.
- Le provette ritenute Reattive ad un ulteriore test possono essere interpretate come **ripetutamente reattive** per gli anticorpi dell'HEV dai criteri del saggio **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.
- Inizialmente, le provette reattive che sono **Non reattive** nei nuovi test vengono considerate negative dai criteri del test **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0**.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI SPECIFICHE

Sensibilità

189 campioni positivi alla classe IgM dell'HEV (infezione acuta) e 67 campioni negativi alla classe IgM e positivi alla classe IgG dell'HEV (infezione precedente) sono stati studiati internamente. I risultati riepilogati nella Tabella 1 hanno mostrato una sensibilità del 99,5% per 189 campioni positivi confermati nella classe IgM dell'HEV e nel 98,5% per i campioni positivi nella classe IgG dell'HEV, ma negativi nella classe IgM.

Tabella 1 – Prestazioni del saggio – Sensibilità

Tipo di campione	N. di campioni	Sensibilità		
		Reattivo	Negativo	Sensibilità
Positivo alla classe IgM dell'HEV (Nepal)	151	150	1	99,3%
Positivo alla classe IgM dell'HEV (Cina)	38	38	0	100%
Positivo alla classe IgC dell'HEV/negativo alla classe IgM (archiviato)	67	66	1	98,5%
Totale	256	254	2	99,2%

Specificità

È stato esaminato un totale di 368 campioni che contengono campioni dei donatori di sangue (n=236) e campioni potenzialmente a reazione incrociata (n=132). I risultati, riepilogati nella Tabella 2, hanno mostrato una specificità complessiva diagnostica del 99,2%, sia per il donatore di sangue che per i campioni potenzialmente a reazione incrociata.

Tabella 2 – Prestazioni del saggio - Specificità

Altri controlli della malattia	N. di campioni	Specificità		
		Negativo	Reattivo	Specificità
Donatori di sangue (USA)	236	234	2	99,2%
Positivo all'anticorpo del virus epatitico A	33	33	0	100%
Positivo all'anticorpo del virus epatitico C	43	43	0	100%
Positivo all'anticorpo anti-antigene di superficie del virus epatitico B	20	20	0	100%
Positivo all'anticorpo del virus dell'herpes simplex	20	19	1	95%
Fattore reumatoide	16	16	0	100%
Totale	368	365	3	99,2%

Riproducibilità

La precisione del saggio **MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** è stata valutata internamente con 2 calibratori del siero, compreso un campione positivo alla classe IgG dell'HEV e un campione positivo alla classe IgM dell'HEV.

Nelle prove: Sono stati analizzati tre lotti dei componenti ELISA come 30 repliche per il calibratore del siero in 3 occasioni. Il coefficiente di variazione (CV) per i 3 calibratori nelle varie prove variava tra 3,7% e 5,7% (tabella 3).

Tra le prove: È stato registrato un totale di 90 osservazioni per valutare la precisione tra le prove. Queste osservazioni rappresentano 3 test che utilizzano 3 lotti di componenti ELISA con ogni calibratore del siero. I coefficienti della variazione per i 2 calibratori variava tra il 5,8% e il 10,8% (Tabella 3).

Tabella 3 – Prestazioni del saggio - Riproducibilità

Campioni	Componenti del saggio	N. di repliche	OD/COV medio	Precisione nelle prove (CV, %)	Precisione tra le prove (CV, %)
Positivo alla classe IgG dell'HEV	#1	30	5,344	3,7	5,8
	#2	30	5,752	4,6	
	#3	30	5,337	5,4	
Positivo alla classe IgM dell'HEV	#1	30	8,065	5,3	10,8
	#2	30	7,507	4,3	
	#3	30	6,391	5,7	

Precisione totale: Sono stati analizzati tre lotti dei componenti ELISA come 5 repliche per il calibratore del siero in ogni occasione. Questo test è stato ripetuto 30 volte per 21 giorni da 4 operatori. La precisione complessiva è stata valutata con 300 punti di rilevamento (OD/COV) ottenuti con 2 calibratori del siero. I coefficienti della variazione per i 2 calibratori variavano tra il 12,1% ed il 15,7%.

LIMITAZIONI DEL METODO

I risultati ripetutamente reattivi dell'**MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** sono una prova presuntiva degli anticorpi all'HEV in provetta. Un risultato **NON-REATTIVO** dell'**MP Diagnostics HEV ELISA 4.0** indica l'assenza probabile degli anticorpi rilevabili nell'HEV nella provetta. Un risultato **NEGATIVO** non esclude la possibilità dell'esposizione o infezione all'HEV.

I risultati reattivi possono essere ritenuti presunti con questo tipo di kit. Le proporzioni dei reattivi falsi dipenderanno dalla sensibilità e dalla specificità del kit. Per la maggior parte dei saggi di screening, più alta è la prevalenza degli anticorpi in una popolazione, più bassa è la proporzione dei campioni erroneamente reattivi.

DICHIARAZIONE ESPLICITA DI NON RESPONSABILITÀ PER LA GARANZIA LIMITATA

Il produttore non offre nessuna garanzia esplicita, tranne che il kit funzionerà come saggio diagnostico *in vitro* e come previsto dalle specifiche e dalle limitazioni descritte nelle Istruzioni per l'uso del prodotto, se usato conformemente alle istruzioni che contiene. Il produttore declina ogni responsabilità per qualsiasi garanzia esplicita o implicita, comprese le garanzie implicite o esplicite di commerciabilità, idoneità per l'uso o utilità implicita e per qualsiasi altro scopo. Il produttore si limiterà alla sostituzione del prodotto o al rimborso del prezzo d'acquisto del prodotto. Il produttore non sarà responsabile nei confronti dell'acquirente o di terzi per qualsiasi danno, lesione o perdita economica di qualsiasi tipo causati dall'uso del prodotto o dalla sua applicazione. Il produttore non fornisce alcuna garanzia esplicita o implicita che questo prodotto non violerà i diritti di proprietà intellettuale di terzi.

TECHNISCHE PROBLEME/BESCHWERDEN

In caso di problemi tecnici e/o reclami, procedere come segue:

- Annotare il numero di lotto del kit e la data di scadenza.
- Conservare i kit ed i risultati ottenuti.
- Contattare l'ufficio più vicino di MP Biomedicals o il proprio distributore locale.

BIBLIOGRAFIA

- Reyes, G.R., M.A. Purdy, J.P. Kim, K.C. Luk, L.M. Young, K.E. Fry, and D. Bradley. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. 1990. Science. 247: 1335-1359.
- Yarborough, P.O., A.W. Tam, K.E. Fry, K. Krawczynski, K.A. McCaustland, D.W. Bradley and G.R. Reyes. Hepatitis E Virus: Identification of type-common epitopes. J Virol. 1991. 65(11): 5790-5797.
- Bradley, D.W. 1990. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. pp 442-461. In A.J. Zuckerman (ed) British Medical Bulletin 46(2). Churchill Livingstone, New York.
- Purcell, R.H. and J.R. Ticehurst. 1988. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Epidemiology and clinical characteristics. pp. 131-137. In A.J. Zuckerman (ed). Viral Hepatitis and Liver Disease. Alan R. Liss Inc., New York.
- Moaven, L.D., A.J. Fuller, J.C. Doultree, J.A. Marshall, D.S. Bowden, R.A. Moeckli and S.A. Locarnini. 1993. A case of acute Hepatitis E in Victoria. Medical Journal of Australia. 159; 124-125.
- Skidmore, S.J., P.O. Yarborough, 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, Iritano E, Veratti M, Angelillo 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. Erratum in: 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, Demediuk 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.

- Balayán 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, Sumarisdidi 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*. 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
 Singapore 627885
 N. tel. : + 65 6775 0008
 N. fax : + 65 6774 6146
 E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

EC REP MP Biomedicals Germany GmbH
 Thüringer Straße 15
 37269 Eschwege
 Germania
 N. tel. : +49 5651 921 204
 N. fax : +49 5651 921 181
 E-mail : diagnostics@mpbio.com

Ufficio regionale:

MP Biomedicals Germany GmbH
 Thüringer Straße 15
 37269 Eschwege
 Germania
 N. tel. : +49 5651 921 204
 N. fax : +49 5651 921 181
 E-mail : diagnostics@mpbio.com