

HEV ELISA 4.0

Instruções de utilização



Data de revisão: 2016-02
MBE0011-POR-3

Observação: alterações realçadas.

REF 23540-096: (96 testes)

NOME E USO PRETENDIDO

O **HEV ELISA 4.0** da **MP Diagnostics** é um ensaio imunoenzimático destinado à detecção de anticorpos totais para vírus da hepatite E em plasma ou soro humanos. Ele deve ser usado como teste de rastreamento, exigindo repetição da análise das amostras inicialmente reativas.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite E (HEV) é um vírus que possui RNA de fita simples de polaridade positiva, não encapsulado, e que foi originalmente identificado como um vírus de hepatite não A, não B transmissível entericamente pela Genelabs em 1990 (1,2). O curso da infecção por HEV é geralmente agudo e autolimitado, sem sequelas crônicas. Porém há alta incidência de mortalidade em gestantes no terceiro trimestre de gravidez – entre 10 e 20% (3) – e uma taxa de mortalidade de 1 a 2% na população geral, que é 10 vezes maior que a da hepatite A (HAV). Com a clonagem do agente etiológico da transmissão enteral de hepatite não A e não B (ET-NANBH) na Genelabs e a identificação de epítomos virais de tipo comum (1,2), desenvolveram-se ferramentas diagnósticas específicas para detecção de anticorpos para HEV.

Verificou-se a ocorrência de grandes epidemias de hepatite não A, não B transmissível entericamente em regiões em vias de desenvolvimento, como Ásia, antiga União Soviética, América Central e África (3,4). Relataram-se casos esporádicos em países desenvolvidos, entre os quais Austrália, Reino Unido e Estados Unidos (5,6,7). Tais casos foram em geral associados a viagens a regiões endêmicas. Contudo, vêm-se acumulando indícios de que também ocorrem casos esporádicos de infecções por HEV sem nenhuma associação com regiões endêmicas em diversas áreas não endêmicas, entre as quais Europa Ocidental, Grécia, Estados Unidos, Austrália e Taiwan (8-17).

Os experimentos já demonstraram que o HEV humano pode infectar espécies animais (18-21) e que primatas não humanos podem infectar-se com o HEV suíno (21). Recentes estudos sobre a prevalência da infecção por HEV em animais mostram a alta soroprevalência de anticorpos para HEV em diferentes espécies animais, entre as quais suínos, equinos, roedores etc. Cada vez mais evidências indicam que a ampla disseminação da infecção por HEV entre animais, em particular suínos, poderia representar um importante meio de transmissão de vírus. Alguns dos casos esporádicos de infecção por HEV em

áreas não endêmicas podem ser atribuídos à transmissão zoonótica.

Faz-se necessário um HEV ELISA extremamente sensível e específico para detecção de anticorpos totais para HEV em plasma ou soro humanos.

O **HEV ELISA 4.0** da **MP Diagnostics** utiliza um antígeno recombinante de propriedade exclusiva, que tem alta conservação entre diferentes cepas de HEV (22,23,24), para detectar a presença de anticorpos específicos, entre os quais IgG, IgM e IgA, para HEV.

DESCRIÇÃO DOS SÍMBOLOS USADOS

A seguir, apresentamos alguns dos símbolos gráficos usados nos produtos e embalagens da MP Diagnostics. Alguns dos símbolos comuns são explicados em maior pormenor na norma internacional e europeia EN ISO 15223: 2012.

	Usar até		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código do lote <i>Sinónimos:</i> Número do lote Nº do lote		Referência de catálogo
	Limites de temperatura		Atenção
	Fabricante		Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Conteúdo suficiente para <n> ensaios		Consulte as instruções de utilização
	Não reutilizar		

CONT

Índice

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

As cavidades das microplacas de poliestireno são impregnadas com um antígeno recombinante de propriedade exclusiva que possui um epítipo conformacional de alta conservação entre diferentes cepas de HEV. O conjugado HRP (horseradish peroxidase) é produzido com o mesmo antígeno recombinante marcado com a enzima HRP. Esse conjugado é devidamente diluído em tampão antes de ser colocado nas cavidades impregnadas com antígeno das microplacas. Em seguida, adicionam-se amostras de soro/plasma às cavidades das microplacas, que contêm o antígeno impregnado e mais o tampão diluente e o conjugado. Após a incubação, estando presentes anticorpos específicos para HEV (IgG, IgM e IgA), estes se fixam tanto aos antígenos adsorvidos nas cavidades das microplacas quanto ao antígeno do conjugado do diluente. Subseqüentemente, as cavidades são rigorosamente lavadas para remover os materiais não fixados. Adiciona-se então a cada cavidade uma solução de substrato que contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A presença de anticorpos específicos é indicada pela presença de solução de cor azul após a incubação. A reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico. A intensidade da cor da reação amarela resultante é medida a 450nm por leitora de microplacas e sua correspondente absorbância ou densidade óptica (OD) é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

- Usar apenas amostras de soro ou plasma coletadas em etileno diamino tetra-acetato (EDTA), heparina, citrato de sódio, oxalato de potássio ou ácido-citrato-dextrose (ACD). Antes da armazenagem, separar coágulos e células sanguíneas por centrifugação.
- Não usar sangue nem outros fluidos corporais totais.
- SEGUIR À RISCA** o procedimento descrito nestas instruções de uso para desempenho ótimo do ensaio. Os desvios do procedimento podem levar a resultados anômalos.
- NÃO MODIFICAR NEM SUBSTITUIR OS REAGENTES DE UM LOTE DE KITS POR OUTRO.** Controles, conjugado e microplacas são combinados para desempenho ótimo. Usar apenas os reagentes fornecidos com o kit.
- Não usar os componentes após vencida a data de validade impressa na caixa do kit.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes ao abrir os recipientes originais para remover alíquotas, pois isso reduzirá prematuramente a vida útil dos kits e propiciará resultados errôneos. Usar técnicas assépticas (inclusive pipetas e pontas de pipeta descartáveis) ao retirar alíquotas dos recipientes.
- Para evitar contaminação cruzada, usar uma nova ponta de pipeta para cada amostra pipetada e não tocar as partes superior ou inferior das microplacas, a borda das cavidades nem o líquido nelas contido com os dedos ou as pontas da pipeta.
- Recomenda-se que os recipientes de vidro usados com os reagentes sejam lavados com ácido hidroclórico 2M e muito bem enxaguados com água destilada ou desionizada antes do uso.
- Para os melhores resultados, deixar que os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (25°C ± 5°C) antes do uso. Voltar a armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C imediatamente após o uso.
- Usar apenas água destilada ou desionizada com qualidade de reagente analítico para diluição dos reagentes.
- MISTURAR BEM TODOS OS REAGENTES ANTES DO USO.**
- PREPARAR A SOLUÇÃO DO CONJUGADO DE TRABALHO LOGO ANTES DO USO.**
- Não expor os reagentes nem realizar os exames numa área que contiver alto nível de gases de desinfetantes químicos (ex.: gases de hipoclorito) durante a armazenagem ou as etapas de incubação. O contato inibe a reação da cor. Não expor os reagentes a luz forte.

COMPONENTES DO KIT

	Descrição dos componentes	Quantidade fornecida
MICROPLATE	MICROPLACA para HEV Doze cartelas de 8 cavidades por placa, embaladas em invólucro lacrado de alumínio com dessecante. Cada cavidade da microplaca contém proteína recombinante de HEV adsorvida. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 placa (96 testes)
CONTROL	CONTROLE NÃO REATIVO Soro humano normal inativado, não reativo para anti-HCV, anti-HEV, HBsAg e anti-HIV-1. Contém os conservantes azida de sódio e timerosal. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (400µl)
CONTROL	CONTROLE REATIVO Soro humano inativado com alta concentração de anticorpos IgG específicos para HEV. Contém os conservantes azida de sódio e timerosal. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (400µl)
DILUENT	DILUENTE SAM (SAM = Sample Addition Monitor / Monitor de Adição de Amostra) Solução salina à base de tris contendo soro caprino normal tratado a quente, albumina de soro bovino e estabilizantes. Contém o conservante BRONIDOX®.L. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (100ml)
WASH PLATE	CONCENTRADO PARA LAVAGEM DE PLACAS (20x) Salina fosfatada tamponada com Tween-20. Contém o conservante cloroacetamida. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (120ml)
CONJUGATE	CONJUGADO Antígeno HEV marcado com a enzima HRP. Contém 0,02% de timerosal como conservante. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (50µl)
SUBS TMB	TAMPÃO DE SUBSTRATO Tampão que contém 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Armazenar em local escuro a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (12,5ml)
SOLN STOP H₂SO₄ IN	SOLUÇÃO DE PARADA Solução de ácido sulfúrico 2M. Armazenar a temperatura entre 2°C e 8°C.	1 frasco (30ml)
	COBERTURAS PARA PLACAS Coberturas adesivas para tampar as microplacas durante a incubação.	4 unidades
	INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO	1 cópia

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
- Exclusivo para uso profissional.
- Consultar os rótulos dos produtos para mais informações sobre componentes potencialmente perigosos.

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E SEGURANÇA



CUIDADO: Este kit contém materiais de origem humana. Nenhum método de testagem oferece total garantia de que produtos em que há sangue humano não transmitam infecções.

MANUSEAR AS AMOSTRAS E CONTROLES REATIVOS E NÃO REATIVOS DOS ENSAIOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECIOSOS. Recomenda-se manusear os componentes e amostras dos exames com base em boas práticas de trabalho em laboratório. Eles devem ser descartados conforme os procedimentos de segurança estabelecidos.

O *controle reativo* e o *controle não reativo* contêm 0,005% de timerosal e 0,1% de azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com o cobre e o chumbo de alguns sistemas de encanamento e formar sais explosivos. As quantidades usadas neste kit são pequenas. Contudo, no descarte de materiais que contêm azida deve-se usar água em abundância a fim de evitar o acúmulo de azida metálica no encanamento.

Em conformidade com a norma CE 1272/2008 (CLP), os componentes perigosos são classificados e rotulados da seguinte forma:

Componente:	CONCENTRADO (20X) PARA LAVAGEM DE PLACAS
Palavra-sinal:	aviso
Pictograma:	
Advertências de perigo:	H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
Recomendações de prudência:	P261 Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P272 A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho. P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar com sabonete e água abundantes. P333+P313 Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consulte um médico.
Advertências suplementares:	Folha de dados de segurança EUH210 disponível mediante pedido
Contém:	2 % Cloroacetamida

Componente:	SOLUÇÃO DE PARADA
Palavra-sinal:	perigo
Pictograma:	
Advertências de perigo:	H315 Provoca irritação cutânea. H319 Provoca irritação ocular grave.
Recomendações de prudência:	P264 Lavar mãos cuidadosamente após manuseamento. P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P312 Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. P362 Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: Lavar com sabonete e água abundantes. P332+P313 Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. P337+P313 Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
Advertências suplementares:	Folha de dados de segurança EUH210 disponível mediante pedido
Contém:	11,2 % de ácido sulfúrico

- Evitar contaminação microbiana dos reagentes ao abrir os recipientes originais para remover alíquotas.
- Não pipetar usando a boca.
- Manusear as amostras, microplacas e controles reativos e não reativos dos ensaios como agentes potencialmente infecciosos.
- Usar guarda-pós e luvas descartáveis no laboratório durante a realização do ensaio. Descartar as luvas em sacos de lixo hospitalar. Lavar bem as mãos após o procedimento.
- É altamente recomendável realizar este ensaio numa cabine de segurança biológica.
- Mantener os materiais longe de bebidas e alimentos.
- Em caso de acidente ou contato com os olhos, lavar imediatamente com água em abundância e procurar orientação médica.

- Só remover as microplacas do invólucro em que se armazenam no momento em que forem ser usadas. Armazenar as cartelas de microplacas abertas e não utilizadas a temperatura entre 2°C e 8°C na embalagem com dessecante em que são fornecidas.
- Ensaier os controles dos kits simultaneamente com as amostras a cada rodada de exames.
- Evitar tocar a borda das cavidades ou respingá-las com o conjugado. Não "soprar" a micropipeta com a boca. Recomenda-se usar pipetagem reversa sempre que possível.
- O uso de amostras altamente hemolisadas, amostras de soro com coagulação incompleta, amostras de plasma que contêm fibrina ou amostras com contaminação microbiana pode causar resultados errôneos.
- Não usar banho-maria para incubar as microplacas.
- Em incubação a 37°C, é preciso evitar a evaporação. Cobrir as placas com as coberturas adesivas fornecidas.
- Evitar abrir e fechar repetidamente a porta da incubadora durante as etapas de incubação.
- Verificar, antes da leitura, se o fundo da placa está limpo e seco e se há alguma bolha na superfície do líquido. Eliminar possíveis bolhas nas cavidades com batidas delicadas, por exemplo.
- Verificar, antes do uso, se o equipamento automatizado está na validade.
- É altamente recomendável submeter o sistema de aspiração/lavagem a manutenção de rotina, a fim de evitar transporte de amostras altamente reativas para amostras não reativas.

ARMAZENAGEM

- Armazenar o kit e os componentes do **HEV ELISA 4.0** da **MP Diagnostics** a temperatura entre 2°C e 8°C quando não estiverem em uso.
- Quando armazenados entre 2°C e 8°C, todos os reagentes e cartelas fechados ou não abertos mantêm sua estabilidade até a data de validade indicada no kit. Não congelar os reagentes.
- É possível a formação de cristais quando o concentrado para lavagem de placas (20x) é armazenado a temperatura entre 2°C e 8°C. É preciso dissolvê-los aquecendo o concentrado até 37°C antes de usá-lo.
- É possível a formação de precipitação quando o diluente é armazenado a temperatura entre 2°C e 8°C. Isso não afeta o desempenho do kit.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAGEM DE AMOSTRAS

Podem-se usar amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina, citrato de sódio, oxalato de potássio ou ACD. Antes da armazenagem, separar coágulos e células sanguíneas por centrifugação.

Dar preferência a amostras recém-coletadas; não se recomenda submeter repetidamente as amostras a ciclos de congelamento-descongelamento. As amostras devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C para os exames realizados até

7 dias após a coleta ou congeladas a temperatura igual ou inferior a -20°C se os exames forem realizados depois desse prazo. Além disso, pode-se utilizar até 0,1% de azida de sódio para estabilizar amostras de soro ou plasma armazenadas entre 2°C e 8°C.

Dar preferência a amostras claras e não hemolisadas. As amostras lipêmicas, ictericas ou contaminadas (por partículas) devem ser filtradas (0,45µm) ou centrifugadas antes do exame.

As amostras podem ser inativadas, mas isso não é requisito para desempenho ótimo do exame.

Inativar as amostras da seguinte maneira:

- Folgar a tampa do recipiente.
- Aquecer a amostra para inativação a 56°C por 30 minutos em banho-maria.
- Deixar que a amostra esfrie antes de voltar a tampá-la.
- A amostra pode ser armazenada congelada até a análise.

Não é recomendável submeter repetidamente as amostras a congelamento e descongelamento.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Papel absorvente descartável para bancada e toalhas de papel.
- Tubos ou recipientes de polipropileno.
- Pipetas graduadas: 5ml, 10ml.
- Pipeta multicanal para administração de 20µl, 100µl e 200µl.
- Pipeta para administração de 1 a 1000µl.
- Pontas de pipeta descartáveis.
- Recipientes para reagentes com capacidade para 25ml.
- Água destilada ou desionizada com qualidade de reagente.
- Frascos: 500ml, 1 litro.
- Lavadora de microplacas para exames ELISA. Opcionalmente, pode-se executar manualmente a lavagem com uma pipeta multicanal para volumes de 0,3ml e um aspirador.
- Uma incubadora de 37 ± 1°C.
- Uma leitora de microplacas para comprimento de onda duplo (A₄₀₇-A₆₂₀) ou simples (A₄₀₇).
- Agente desinfetante de boa qualidade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- CONJUGADO DE TRABALHO**
 - Preparar o **CONJUGADO logo antes do uso**.
 - Misturar bem o **CONJUGADO** e o **DILUENTE** antes do uso. **NÃO CENTRIFUGAR** a mistura.
 - Diluir o **CONJUGADO** a um fator de diluição de 1:500 com **DILUENTE**. Por exemplo, adicionar 6,0µl de conjugado a 3,0ml de diluente.
 - Usar apenas tubos ou recipientes de polipropileno.
 - Usar 9,0ml de **CONJUGADO DE TRABALHO** para cada microplaca.

QUADRO PARA PREPARAÇÃO DO CONJUGADO (fator de diluição de 1:500)		
Número de exames	Vol. de conjugado (µl)	Vol. de diluente (ml)
24	6,0	3,0
48	10,0	5,0
72	14,0	7,0
96	18,0	9,0

- 2. TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO**
- Preparar o TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO logo antes do uso.
 - Diluir 1 volume de CONCENTRADO PARA LAVAGEM DE PLACAS com 19 volumes de água destilada (com qualidade de reagente). Misturar bem. Para lavar 1 placa são necessários aproximadamente 200ml de tampão de lavagem.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

IMPORTANTE: Os imunoenaios deste tipo são sensíveis à temperatura e dependentes do tempo. Seguir à risca o procedimento garantirá desempenho ótimo do ensaio. Os desvios do procedimento recomendado podem levar a resultados anômalos.

- Preparar o **CONJUGADO DE TRABALHO** conforme descrito na **PREPARAÇÃO DOS REAGENTES**.
- Retirar a microplaca do invólucro de alumínio.
- Agitar os frascos de amostras e controles antes do uso.
- Encher um recipiente para reagentes com o **CONJUGADO DE TRABALHO**. Com uma pipeta multicanal, adicionar 80µl do **CONJUGADO DE TRABALHO** a todas as cavidades. 80µl
- As cavidades A1 e B1 são “BRANCOS” (provas em branco). **NÃO ADICIONAR AMOSTRAS A ESSAS CAVIDADES**. Adicionar 20µl de diluente a cada uma delas. 20µl
- Adicionar 20µl da amostra à cavidade correspondente, começando da cavidade A2. Isso propiciará à amostra uma diluição final de 1:5. Misturar pipetando para cima e para baixo uma vez. **NÃO COLOCAR AMOSTRAS EM CAVIDADES VAZIAS**. 20µl
- Após acrescentar a amostra, adicionar 20µl de **CONTROLE NÃO REATIVO** a cada uma das cavidades C1, D1 e E1. 20µl
- Adicionar 20µl de **CONTROLE NÃO REATIVO** a cada uma das cavidades F1, G1 e H1. Misturar bem dando batidas delicadas em todas as laterais da microplaca, cuidando para mantê-la estabilizada na bancada. 20µl
- Cobrir a microplaca cuidadosamente com uma das coberturas adesivas fornecidas para evitar a evaporação durante a incubação.
- Incubar por 60 minutos a 37°C (não usar banho-maria)**. 60 min
- Retirar a cobertura adesiva e descartá-la. Em seguida, lavar a microplaca com o **TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDO** usando um dos seguintes métodos recomendados: 300µl por cavidade em cada lavagem
 - Lavadora automática ou semiautomática de microplacas

– lavar seis (6) vezes com pelo menos 300µl por cavidade em cada lavagem.

- Lavadora manual de microplacas – aspirar completamente o conteúdo de todas as cavidades baixando delicadamente a ponta do aspirador até o fundo de cada cavidade. **CUIDADO: NÃO ARRANHAR O INTERIOR DAS CAVIDADES**. Encher toda a placa com pelo menos 300µl por cavidade e depois aspirar imediatamente na mesma ordem. Repetir o ciclo seis (6) vezes.

- Secar virando a microplaca e batendo-a com firmeza sobre papel absorvente. Todos os resíduos do tampão de lavagem da placa devem ser enxugados com papel. A formação da cor pode ser inibida durante a incubação do substrato se houver resíduos do tampão de lavagem.
- Encher um recipiente para reagentes com o **SUBSTRATO**. Com uma pipeta multicanal, adicionar 100µl do **SUBSTRATO** a cada cavidade. Aplicar uma cobertura adesiva na placa. 100µl
- Incubar por 30 minutos no escuro a 37°C. (**Não usar banho-maria para a incubação**). 30 min
- Retirar e descartar a cobertura adesiva da placa.
- Com uma pipeta multicanal, adicionar 50µl da **SOLUÇÃO DE PARADA** a cada cavidade. Misturar batendo delicadamente na microplaca. 50µl
- Determinar a absorbância de cada cavidade a 450nm. Se for usado um instrumento de filtragem dupla, o comprimento de onda de referência deve ser 620nm.

OBSERVAÇÃO: A absorbância deve ser lida em até 10 minutos após a adição da SOLUÇÃO 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

CONTROLE DE QUALIDADE

- A prova em BRANCO deve ser ensaiada em duplicata. Já o CONTROLE NÃO REATIVO e o CONTROLE REATIVO, em triplicata em cada placa a cada rodada de amostras.
- Os valores da prova em branco devem ter absorbância ≤ 0,100.
- Os valores do controle não reativo devem ter absorbância ≤ 0,100.
- Pelo menos 2 dos 3 valores do controle reativo devem ter absorbância ≥ 0,500. Nenhum valor fora dessa faixa deve ser usado para o cálculo da média do controle reativo (RCx̄).

RESULTADOS

Deve-se considerar separadamente cada microplaca ao calcular e interpretar os resultados do ensaio, não importando o número de placas processadas simultaneamente.

A presença ou ausência de anticorpos específicos para HEV é determinada pela relação entre a absorbância das amostras e o VALOR DE CORTE (COV) da placa.

O VALOR DE CORTE é calculado como (0,40 unidade de absorbância + absorbância média do controle não reativo [NRC]):

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

CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Cálculo da absorbância média do controle não reativo (NRCx̄)**

Exemplo:	N° da cavidade	Absorbância
	C1	0,050
	D1	0,051
	E1	0,052
	Total	0,153
	Média	0,153 / 3 = 0,051 (NRCx̄)

Os valores individuais do controle não reativo devem ser ≤ 0,100 unidade.

Se algum dos valores do controle não reativo deixar de atender aos critérios acima, deve ser excluído como anômalo. A média do controle não reativo (NRCx̄) deve ser então recalculada com base nos valores individuais do controle não reativo restantes. Todos os valores individuais do controle não reativo restantes devem atender aos critérios acima; do contrário, o ensaio é inválido e deve ser repetido.

- Cálculo da absorbância média do controle reativo (RCx̄)**

Exemplo:	N° da cavidade	Absorbância
	F1	1,221
	G1	1,144
	H1	1,298
	Total	3,663
	Média	3,663 / 3 = 1,221 (RCx̄)

Os valores individuais do controle reativo devem ser ≥ 0,500 unidade.

Se algum dos valores do controle reativo deixar de atender aos critérios acima, deve ser excluído como anômalo. A média do controle reativo (RCx̄) deve ser então recalculada com base nos valores individuais do controle reativo restantes. Todos os valores individuais do controle reativo restantes devem atender aos critérios acima; do contrário, o ensaio é inválido e deve ser repetido.

- Cálculo da diferença entre RCx̄ e NRCx̄**

Exemplo:	NRCx̄	=	0,051
	RCx̄	=	1,221
	RCx̄ - NRCx̄	=	1,221 - 0,051
		=	1,200

Para que o ensaio seja válido, o valor de RCx̄ - NRCx̄ deve ser ≥ 0,500. Caso contrário, pode-se suspeitar de impropriedade da técnica ou de deterioração dos reagentes e repetir o ensaio.

- Cálculo do valor de CORTE**

Exemplo:	Valor de CORTE	=	0,40 + NRCx̄
	NRCx̄	=	0,051
	Valor de CORTE	=	0,40 + 0,051
		=	0,451

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- As amostras com valores de absorbância **inferiores** ao valor de CORTE são consideradas **não reativas** pelo **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics**.
- As amostras com valores de absorbância **superiores ou iguais** ao valor de CORTE são consideradas **inicialmente reativas** conforme os critérios do **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics**, devendo ser reexaminadas em duplicata antes da interpretação.
- As amostras que se revelarem **reativas** em exames subsequentes podem ser interpretadas como sendo **repetidamente reativas** a anticorpos para HEV conforme os critérios do **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics**.
- As amostras inicialmente reativas que se revelarem **não reativas** em exames subsequentes são consideradas **negativas** conforme os critérios do **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics**.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade

Estudaram-se in house 189 amostras anti-HEV IgM positivas (infecção aguda) e 67 anti-HEV IgG positivas/IgM negativas (após infecção). O resumo dos resultados, apresentado na Tabela 1, mostrou sensibilidade de 99,5% para as 189 amostras anti-HEV IgM positivas confirmadas e de 98,5% para as amostras anti-HEV IgG positivas porém IgM negativas.

Tabela 1: Desempenho do ensaio – Sensibilidade

Tipo de amostra	N° de amostras	Reativas	Negativas	Sensibilidade
Anti-HEV IgM positiva (Nepal)	151	150	1	99,3%
Anti-HEV IgM positiva (China)	38	38	0	100%
Anti-HEV IgG positiva/IgM negativa (arquivada)	67	66	1	98,5%
Total	256	254	2	99,2%

Especificidade

Testou-se um total de 368 amostras, compostas de 236 amostras de doadores de sangue e 132 amostras com potencial de reação cruzada. Os resultados, resumidos na Tabela 2, mostraram uma especificidade geral de 99,2% para ambos os tipos de amostra.

Tabela 2: Desempenho do ensaio – Especificidade

Controles de outras doenças	N° de amostras	Negativas	Reativas	Especificidade
Doadores de sangue (EUA)	236	234	2	99,2%
Anti-HAV positivos	33	33	0	100%
Anti-HCV positivos	43	43	0	100%
Anti-HBsAg positivos	20	20	0	100%
Anti-HSV positivos	20	19	1	95%
Fator reumatóide	16	16	0	100%
Total	368	365	3	99,2%

Reprodutibilidade

A precisão de ensaio do **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics** foi avaliada *in house* com 2 calibradores de soro, uma amostra anti-HEV IgG positiva e uma amostra anti-HEV IgM positiva.

Intra-ensaio: Ensaíram-se três lotes de componentes do ELISA como 30 replicações por calibrador de soro em 3 ocasiões. O coeficiente de variação (CV) dos 3 calibradores em rodadas diferentes do mesmo exame variou de 3,7% a 5,7% (Tabela 3).

Inter-ensaio: Registrou-se um total de 90 observações para avaliar a precisão entre ensaio. Essas observações representam 3 rodadas de exames com 3 lotes de componentes do ELISA para cada calibrador de soro. Os coeficientes de variação dos 2 calibradores variaram de 5,8% a 10,8% (Tabela 3).

Tabela 3: Desempenho do ensaio – Reprodutibilidade

Amostras	Componentes do ensaio	N° de replicações	Média de OD/COV	Precisão intra-ensaio (CV em %)	Precisão inter-ensaio (CV em %)
Anti-HEV IgG positivas	N° 1	30	5,344	3,7	5,8
	N° 2	30	5,752	4,6	
	N° 3	30	5,337	5,4	
Anti-HEV IgM positivas	N° 1	30	8,065	5,3	10,8
	N° 2	30	7,507	4,3	
	N° 3	30	6,391	5,7	

Precisão total: Ensaíram-se três lotes de componentes do ELISA como 5 replicações por calibrador de soro em cada ocasião. Isso foi repetido 30 vezes num período de 21 dias por 4 operadores. A precisão geral foi avaliada com 300 pontos

de dados (OD/COV) obtidos com 2 calibradores de soro. Os coeficientes de variação dos 2 calibradores variaram de 12,1% a 15,7%.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

A repetição de resultados reativos no **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics** constitui um indício presumido da presença de anticorpos para HEV na amostra. O resultado **NÃO REATIVO** no **HEV ELISA 4.0 da MP Diagnostics** indica a provável ausência de anticorpos para HEV detectáveis na amostra. O resultado **NEGATIVO** não exclui a possibilidade de exposição a infecção ou infecção por HEV.

Com um kit de exames desta natureza, há possibilidade de resultados falso-reativos. A proporção de falso-reativos depende da sensibilidade e especificidade do kit de exames. Na maioria dos ensaios de rastreamento, quanto mais alta a prevalência de anticorpos numa população, mais baixa a proporção de amostras falso-reativas.

ISENÇÃO DE GARANTIA EXPRESSA LIMITADA

O fabricante não oferece outra garantia expressa que não a de que o kit de exames funcionará como ensaio diagnóstico *in vitro* dentro das especificações e limitações descritas no respectivo Manual de instruções quando usado conforme as instruções lá contidas. O fabricante se exime de qualquer garantia expressa ou implícita, inclusive a que respeita à comerciabilidade, adequação de uso ou utilidade implícita para qualquer outro fim. A responsabilidade do fabricante limita-se à substituição do produto ou reembolso de seu preço de compra. O fabricante não poderá ser responsabilizado, seja pelo comprador ou por terceiros, por nenhum dano, lesão ou perda econômica de qualquer natureza que venham a ser causados pelo produto em decorrência de seu uso ou aplicação. O fabricante não declara, seja expressa ou implicitamente, que o produto não infringe os direitos de propriedade intelectual de terceiros.

PROBLEMAS TÉCNICOS/RECLAMAÇÕES

Em caso de problema técnico ou reclamação, proceder da seguinte forma:

- Anotar o número de lote e a data de validade do kit.
- Guardar os kits e os resultados obtidos.
- Entrar em contato com o distribuidor local ou o escritório mais próximo da MP Biomedicals.

BIBLIOGRAFIA

- Reyes, G.R., M.A. Purdy, J.P. Kim, K.C. Luk, L.M. Young, K.E. Fry e 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 e 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 (org.). British Medical Bulletin 46(2). Churchill Livingstone, Nova York.
- Purcell, R.H. e J.R. Ticehurst. 1988. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: Epidemiology and clinical characteristics. pp. 131-137. In A.J. Zuckerman (org.). Viral Hepatitis and Liver Disease. Alan R. Liss Inc., Nova York.
- Moaven, L.D., A.J. Fuller, J.C. Doultree, J.A. Marshall, D.S. Bowden, R.A. Moeckli e 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, Iiritano E, Veratti MA, 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.
- Prevalence of Hepatitis E antibodies in healthy persons in southern Italy. Infection. 1998. 26(1): 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 K, 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.
- 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.
- Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: An experimental infection in lambs by the Hepatitis E Virus. Vopr Virusol. 1994. 39(4): 165-168.
- Maneerat Y, Clayson 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.

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

EC REP MP Biomedicals Germany GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Alemanha
N.º tel. : +49 5651 921 204
N.º fax. : +49 5651 921 181
Correio eletrônico : diagnostics@mpbio.com

Escritório regional:

MP Biomedicals Germany GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Alemanha
N.º tel. : +49 5651 921 204
N.º fax. : +49 5651 921 181
Correio eletrônico : diagnostics@mpbio.com