

# HEV Ab

## Version **ULTRA**

**Enzyme Immunoassay for the  
determination of total antibodies to  
Hepatitis E Virus  
in serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl**  
**Via Carducci n° 27**  
**20099 Sesto San Giovanni**  
**(MI) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF EVABULTRA.CE  
96/192/480/960 Tests

## HEV Ab ULTRA

### A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of total antibodies to Hepatitis E Virus (HEV) in serum and plasma. The kit is intended for the follow-up of HEV-infected patients and the screening of blood units.

In addition, due to the assay configuration of the product, the kit may be used also in testing total antibodies to HEV in serum and plasma derived from other not-human recipients for zoonotic studies.

For "in vitro" diagnostic use only.

### B. INTRODUCTION

Hepatitis E Virus or HEV is a recently discovered agent of enterically transmitted viral hepatitis. HEV is an un-enveloped single-strand RNA virus, after being provisionally assigned to the Caliciviridae family, HEV was re-classified as the sole member of the genus Hepevirus, family Hepeviridae, in 2004. HEV is found in the stool of infected patients and present in 4 strains (1, 2, 3 and 4) differently spread geographically and virulent.

HEV is a serious problem in many developing countries since its first outbreak was reported in 1955 in New Delhi, India.

A high case-fatality rate has been found among pregnant women and chronic hepatitis carriers.

The cloning and sequencing of HEV genome have led to the development of serological tests for the detection of anti HEV antibodies based on recombinant immunodominant antigens derived from conservative regions of the four virus strains.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with highly specific synthetic antigen encoding for conservative and immunodominant determinants of HEV.

The solid phase is first treated with the sample where anti HEV total antibodies (mostly IgG, IgM and IgA) are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the second incubation bound anti HEV total antibodies are detected by the addition of the same HEV highly specific synthetic antigen labeled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti HEV antibodies present in the sample. After blocking the enzymatic reaction, its optical density is measured by an ELISA reader.

The version ULTRA is particularly suitable for automated screenings.

### D. COMPONENTS

The standard configuration of the kit contains sufficient reagents to perform 192 tests.

#### 1. Microplate: MICROPLATE

n° 2 microplates. 12 strips of 8 breakable wells. Microplates are coated with HEV highly specific synthetic antigen. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

#### 2. Negative Control CONTROL -

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains bovine carrier proteins, 10 mM phosphate buffer pH 7.4 ± 0.1, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300. Yellowish colour coded.

#### 3. Positive Control CONTROL +

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains bovine carrier proteins, 10mM phosphate buffer pH 7.4 ± 0.1, inactivated human serum positive to HEV Ab and negative for HBsAg, HIV, Syphilis and HCV markers, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300. Green colour coded.

#### 4. Calibrator: CAL ...ml

N° 2 vials. Lyophilized calibrator. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains fetal bovine serum proteins, human antibodies to HEV whose content is calibrated on 1<sup>st</sup> WHO reference reagent for HEV antibody, NIBSC code 95/584, at 1 IU/ml ± 20%, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

**Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .**

#### 5. Wash buffer concentrate WASHBUF 20X

2x60ml/bottle. 20x concentrated solution containing 0.045% ProClin 300 as preservative. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2 and 0.05% Tween 20 .

#### 6. Enzyme conjugate : CONJ

1x25.0 ml/bottle. Ready-to-use solution. It contains HEV specific synthetic antigen, labeled with HRP, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8 ± 0.1, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Pink/red color coded

#### 7. Chromogen/Substrate SUBS TMB

1x25ml/bottle. Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.**

#### 8. Sulphuric Acid: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x25ml/ bottle. Contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 9. Plate sealing foil n° 4

#### 10. Package insert n° 1

**Important note:** Only upon specific request, Dia.Pro can supply reagents for 96, 480, 960 tests, as reported below :

Number of tests	96	480	960
Code	EVABULTRA.CE.96	EVABULTRA.CE.480	EVABULTRA.CE.960
1. Microplate	n°1	n°5	n°10
2. Negative Control	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
3. Positive Control	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
4. Calibrator	n° 1 vial	n° 5 vials	n° 10 vials
5. Wash buff conc	1x60ml/bottle	5x60ml/bottles	4x150ml/bottles
6. Enz. Conjugate	1x16ml/vial	2x40ml/bottles	4x40ml/bottles
7. Chromog/Subs	1x16ml/vial	2x40ml/bottles	4x40ml/bottles
8. Sulphuric Acid	1x15ml/vial	2x40ml/bottles	2x80ml/bottles
9. Plate seal foils	n° 2	n° 10	n° 20
10. Pack. insert	n° 1	n° 1	n° 1

#### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200ul and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

#### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated

before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

16. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

#### G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin, clots or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

#### H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

##### Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned green, indicating a defect in conservation. In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°-8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

##### Negative and Positive Controls:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Even if the HEV positive material used in the preparation of the positive control has been chemically inactivated and derived from HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb and Syph Ab negative material, handle such control as potentially infective.

##### Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

##### Important Notes:

- The calibrator after dissolution is stable at +2..8°C for 1 month if properly handled. For longer storage store frozen in aliquots at -20°C and thaw only once.
- Even if the HEV positive material used in the preparation of the positive control has been chemically inactivated and

derived from HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb and Syph Ab negative material, handle such control as potentially infective

#### Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use.

During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

**Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.**

#### Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic and possibly sterile disposable containers.

#### Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred, use only plastic and possibly sterile disposable containers.

#### Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

#### Warning H statements:

**H315** – Causes skin irritation.

**H319** – Causes serious eye irritation.

#### Precautionary P statements:

**P280** – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

**P302 + P352** – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

**P332 + P313** – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

**P305 + P351 + P338** – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

**P337 + P313** – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**P362 + P363** – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

### I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. **Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of  $\pm 2\%$ . Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right

dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. **Incubation times** have a tolerance of  $\pm 5\%$ .
5. The **ELISA reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth  $\leq 10$  nm; (b) absorbance range from 0 to  $\geq 2.0$ ; (c) linearity to  $\geq 2.0$ ; (d) repeatability  $\geq 1\%$ . Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an **ELISA automated workstation**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. When using ELISA automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to 2..8°C, firmly capped.
8. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit, such the ELISA platform, **DIA.BLOod**, supplied by DiaPro already validated for the DiaPro's line of products.

### L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.

- Dissolve the Calibrator as described above.
- Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
- Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturer's instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
- Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
- If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
- Check that the micropipettes are set to the required volume.
- Check that all the other equipment is available and ready to use.
- In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

pink/red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important notes:**

*Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when the conjugate is dispensed. Contamination might occur.*

- Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
- Wash the microplate with an automatic washer as in step 4.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 15 minutes**.

**Important note:** *Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.*

**M. ASSAY PROCEDURE**

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

**Automated assay:**

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to dispense the sample directly into the appropriate sample well of the microplate. Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples. Do not dilute controls/calibrator as they are ready to use. Dispense 100 µl controls/calibrator in the appropriate control/calibration wells.

**Important Note:** *Visually monitor that samples have been dispensed into appropriate wells.*

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay. It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly. In case an automatic workstation is used, first assure that the instrument is validated according to point I.6.

**Manual Assay:**

- Place the required number of microwells in the microwell holder. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at 2..8°C, sealed.
- Leave A1 well empty for the operation of blanking. Dispense 100 µl of Negative Control in triplicate, and 100 µl of Positive Control in single in proper wells, followed by 100 µl of each of samples. In case the Calibrator is used (\*) dispense 100 µl of it in a proper defined well in duplicate. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use! Check for the presence of samples in wells by naked eye (there is a marked color difference between empty and full wells) or by reading at 450/620nm. (samples show OD values higher than 0.100).

**Important note:**

*Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*

- Incubate the microplate for **45 min at 37°**.
- Wash the microplate with an automatic washer as reported in section I.3.
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the 1<sup>st</sup> blanking well, and cover with the sealer. Check that this

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 8 to stop the enzymatic reaction. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow/brown.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5, with a microplate reader at 450nm (reading) and at 620-630nm (background Subtraction), blanking the instrument on A1 well.

**Important notes:**

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.*
- Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.*
- Shaking at 350 ± 150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.*

**N. ASSAY SCHEME**

Method	Operations
Controls & Calibrator (*)	100 µl
Samples	100 µl
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	100 µl
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>15 min</b>
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm/620-630nm

**(\*) Important Notes:**

- The Calibrator (CAL) does not affect the Cut Off calculation, therefore it does not affect the test's results calculation.*
- The Calibrator (CAL) might be used only whenever a laboratory internal quality control is required by the Management.*

An example of dispensation scheme is reported below:

#### Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S4										
B	NC	S5										
C	NC	S6										
D	NC	S7										
E	PC	S8										
F	S1	S9										
G	S2	S10										
H	S3	S11										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control  
PC = Positive Control S = Sample

#### O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether their OD450nm/620-630nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.150 mean OD450nm value after blanking
Positive Control (PC)	> 1.000 OD450nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.150 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Control < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in the distribution of controls (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.150, too. 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should these problems happen, after checking, report any residual problem to the supervisor for further actions.

#### Important Note:

If Calibrator has been used, verify the following data:

Check	Requirements
Calibrator	S/Co > 1.5

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Calibrator S/Co < 1.5	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (e.g.: dispensation of negative control instead of Calibrator) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, Negative Control, Positive Control), match the established requirements, the test may be considered valid.

#### Important note:

*The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 10.*

#### P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula on the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC):

$$NC + 0.250 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

**Important note:** *When the calculation of results is done by the operative system of an ELISA automated work station be sure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the right interpretations of results.*

#### Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm/620-630nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A **negative** result indicates that the patient has not been infected by HEV or that the blood unit may be transfused.

Any patient showing an **equivocal** result should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later from the patient and examined. The blood unit should not be transfused.

A **positive** result is indicative of HEV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

#### Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect anti HEV antibodies with a different technology.

- When comparing the results of the assay with any other commercial CE/FDA marked product be reminded that the DiaPro's kit detects all the antibodies including IgM and IgA and not only IgG.
- When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
- Diagnosis of HEV infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.
- In case the kit is used with samples of animal origin it will be responsibility of the Lab Manager to assign a proper cut-off to the system and then calculate results.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 10):

The following data must not be used instead or real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.049 – 0.050 – 0.051 OD450nm  
Mean Value: 0.050 OD450nm  
Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 2.589-2.591 OD450nm  
Mean Value: 2.590 OD450nm  
Higher than 1.000 – Accepted

Cut-Off = 0.050+0.250 = 0.300  
Calibrator: 0.930 - 0.936 OD450nm  
Mean value: 0.933 OD450nm S/Co = 3.1  
S/Co higher than 1.5 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm  
Sample 2: 1.690 OD450nm  
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative  
Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

## R. PERFORMANCES

### 1. LIMIT OF DETECTION

It was assessed on the 1<sup>st</sup> WHO reference reagent for HEV antibody, NIBSC code 95/584. The preparation was diluted in a pooled human HEV Ab negative serum and then tested in three lots. Results are reported in the table below:

IU/ml	P 1	P 2	P 3	Average OD450	Average STD
	mean OD450	mean OD450	mean OD450		
2.0	2,442	2,456	2,452	2,450	0,088
1.0	1,305	1,301	1,297	1,301	0,111
0.5	0,587	0,600	0,603	0,597	0,019
0.25	0,269	0,273	0,272	0,272	0,029
0.125	0,131	0,129	0,127	0,129	0,007
0.062	0,068	0,070	0,065	0,068	0,008
0.031	0,036	0,034	0,034	0,035	0,005
0	0,009	0,008	0,004	0,007	0,006

The limit of detection, calculated as Negative Control (0 IU/ml) mean OD450nm + 5xSTD, turned out to be far and far better than **0.25 WHO IU/ml**.

### 2. DIAGNOSTIC PERFORMANCES

The studies were carried out considering a cut-off set at 0.25 WHO IU/ml.

### 2.1 Diagnostic Sensitivity:

It was calculated on a panel of positive samples prescreened with a CE marked commercial product for the determination of anti HEV Ab (but prevalently IgG as reported in their IFU) and on two commercially available sero-conversions.

Results are reported in the table below for these two panels (Biomex – Germany).

	HEV Ab version ULTRA		REFERENCE KIT	
	mean OD450	S/CO	mean OD450	S/CO
SCP-HEV-006b No 1	0,015	0,1	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 2	0,010	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 3	0,011	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 4	0,016	0,1	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 5	0,015	0,1	0,001	0,0
SCP-HEV-006b No 6	0,009	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 7	0,010	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-006b No 8	0,592	2,3	0,013	0,1
SCP-HEV-006b No 9	2,859	11,1	1,868	9,8
SCP-HEV-006b No 10	1,755	6,8	1,972	10,4
SCP-HEV-006b No 11	3,526	13,7	2,866	15,1
SCP-HEV-006b No 12	3,625	14,1	2,459	12,9
SCP-HEV-006b No 13	3,712	14,4	2,959	15,6
SCP-HEV-006b No 14	3,703	14,4	2,857	15,0
SCP-HEV-006b No 15	3,609	14,0	3,130	16,5
SCP-HEV-006b No 16	3,749	14,5	3,068	16,1
SCP-HEV-006b No 17	3,700	14,3	3,160	16,6
SCP-HEV-006b No 18	3,650	14,1	3,096	16,3
SCP-HEV-006b No 19	3,695	14,3	2,776	14,6
SCP-HEV-006b No 20	over	> 19	3,032	16,0
SCP-HEV-006b No 21	over	> 19	3,170	16,7
SCP-HEV-006b No 22	3,852	14,9	3,224	17,0
SCP-HEV-006b No 23	over	> 19	3,280	17,3

	HEV Ab version ULTRA		REFERENCE KIT	
	mean OD450	S/CO	mean OD450	S/CO
SCP-HEV-001b No 1	0,008	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-001b No 2	0,006	0,0	0,000	0,0
SCP-HEV-001b No 3	1,049	4,1	0,007	0,0
SCP-HEV-001b No 4	3,487	13,5	0,918	4,8
SCP-HEV-001b No 5	3,236	12,5	2,160	11,4
SCP-HEV-001b No 6	2,377	9,2	3,074	16,2
SCP-HEV-001b No 7	2,113	8,2	3,310	17,4
SCP-HEV-001b No 8	3,577	13,9	3,875	20,4

Samples SCP-HEV-006b No 8 and SCP-HEV-001b No 3 turned out to be positive for anti HEV IgM with the DiaPro's product code EVM.CE.

The overall value found for the Diagnostic Sensitivity was 100%.

### 2.2 Diagnostic Specificity

It was calculated on a panel of negative samples prescreened with a CE marked commercial product for the determination of anti HEV Ab (but prevalently IgG as reported in their IFU) and on a panel of potential interferents.

No interference was seen in such samples and the overall value found for the Diagnostic Specificity was > 99.5.

The resulting 0.5% false positive samples turned out to be mostly IgM and/or IgA positive.

### 3. PRECISION:

It has been calculated on two samples, one negative and one low positive, examined in 16 replicates in three separate runs. CV values ranging between 5-10%, depending on OD450nm values, were found. The variability seen did not result in sample misclassification.

#### Important note:

*The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 10.*

### S. LIMITATIONS

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing have been observed to generate some false results.

### REFERENCES

1. Tian-Cheng Li et al., Journal of Virology, 1997, p 7207-7213
2. Michaela A. Riddel et al., Journal of Virology, 2000, p 8011-8017
3. J.M.Echevarria et al., J. Med. Virol., 85, 2013, p 1037-1045
4. M.Fogeda et al., 2012, 84, p 71-74
5. Saskia A. et al., EID Journal, 2009, 15/3,

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy









# HEV Ab

## Version ULTRA

**Ensayo inmunoenzimático para la  
determinación de anticuerpos totales  
frente al  
virus de la hepatitis E  
en suero y plasma**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(MI) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

Correo electrónico: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF. EVABULTRA.CE  
96/192/480/960 pruebas

## Ac VHE ULTRA

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos totales frente al virus de la hepatitis E (VHE) en suero y plasma. El equipo está previsto para el seguimiento de pacientes infectados por el VHE y para el cribado de unidades de sangre.

Además, debido a la configuración de ensayo del producto, el equipo también puede usarse para la comprobación de anticuerpos totales frente al VHE en suero y plasma derivados de otros receptores no humanos para estudios zoonóticos.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis E (VHE) es un agente de hepatitis viral transmitida por vía entérica descubierto recientemente. El VHE es un virus ARN monocatenario no encapsulado. Tras asignarse de forma provisional a la familia *Caliciviridae*, el VHE se reclasificó como el único miembro del género *Hepevirus*, familia *Hepeviridae*, en 2004. El VHE se encuentra en las heces de pacientes infectados y se presenta en 4 cepas (1, 2, 3 y 4) con distinta distribución geográfica y virulencia.

El VHE es un problema grave en muchos países en desarrollo desde que se registró el primer brote en 1955 en Nueva Delhi, India.

Se ha encontrado una tasa alta de mortalidad en mujeres embarazadas y en portadores de hepatitis crónica.

La clonación y la secuenciación del genoma del VHE ha llevado al desarrollo de pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti VHE basadas en antígenos inmunodominantes recombinantes derivados de regiones conservadoras de las cuatro cepas del virus.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas se recubren con antígeno altamente específico, para identificar los determinantes conservadores y inmunodominantes de VHE.

La fase sólida se trata primero con la muestra, donde los anticuerpos totales anti VHE (principalmente IgG, IgM e IgA) se capturan, si existen, mediante los antígenos.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la segunda incubación se detectan anticuerpos totales anti VHE unidos por la adición de lo mismo antígeno sintético altamente específico del VHE marcado con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla substrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos anti VHE presentes en la muestra. Tras bloquear la reacción enzimática, su densidad óptica se mide mediante un lector ELISA.

La versión ULTRA resulta especialmente adecuada para cribados automatizados.

### D. COMPONENTES

La configuración estándar del equipo contiene reactivos suficientes para realizar 192 pruebas.

#### 1. Microplaca: MICROPLACA

2 microplacas. 12 tiras de 8 pocillos rompibles. Se han recubierto las microplacas con antígeno sintético altamente específico del VHE. Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4 °C.

#### 2. Control negativo CONTROL-

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas de portadores bovinos, tampón fosfato 10 mM a pH 7,4 ± 0,1, azida sódica 0,09% y ProClin al 0,045%. Codificado con color amarillento.

#### 3. Control positivo CONTROL+

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas de portadores bovinos, tampón fosfato 10 mM a pH 7,4 ± 0,1, suero humano inactivado positivo a Ac VHE y negativo para marcadores de HBsAg, VIH, sífilis y VHC, azida sódica 0,09% y ProClin al 0,045%. Codificado con color verde.

#### 4. Calibrador: CAL ...ml

2 viales. Calibrador liofilizado. Para disolver en el volumen de agua de calidad EIA indicado en la etiqueta. Contiene proteínas de suero fetal bovino, anticuerpos humanos frente al VHE cuyo contenido está calibrado frente al 1<sup>er</sup> reactivo de referencia de la OMS para anticuerpos VHE, código NIBSC 95/584, a 1 UI/ml ± 20%, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0±0,1, sulfato de gentamicina 0,3 mg/ml y ProClin 0,045% como conservantes.

**Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial puede variar en cada lote. Usar el volumen correcto indicado en la etiqueta.**

#### 5. Solución de lavado concentrada WASHBUF 20X

2 botellas de 60 ml. Solución concentrada 20x que contiene ProClin al 0,045% como conservante. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7,0±0,2 y Tween 20 al 0,05%.

#### 6. Conjugado: CONJ

1 botella de 25,0 ml. Solución lista para el uso. Contiene antígeno sintético altamente específico del VHE marcado con, marcadas con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10mM a pH 6,8±0,1, 0,3 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin al 0,045% como conservantes. Codificado con color rosa/rojo.

#### 7. Cromógeno/Substrato SUBS TMB

1 botella de 25 ml. Componente listo para el uso. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,02%.

**Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.**

#### 8. Ácido sulfúrico: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M

1 botella de 25 ml. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### 9. Sellador adhesivo, 4 uds.

#### 10. Manual de instrucciones, 1 ud.

**Nota importante:** Solo a petición del cliente, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 96, 480, 960 pruebas, como se describe a continuación:

Número de pruebas	96	480	960
Código	EVABULTRA.CE.96	EVABULTRA.CE.480	EVABULTRA.CE.960
1. Microplaca	1 ud.	5 uds.	10 uds.
2. Control negativo	1 vial de 2,0 ml	1 vial de 10 ml	1 vial de 20 ml
3. Control positivo	1 vial de 2,0 ml	1 vial de 10 ml	1 vial de 20 ml
4. Calibrador	1 vial	5 viales	10 viales
5. Soluc. lav. conc.	1 botella de 60 ml	5 botellas de 60 ml	4 botellas de 150 ml
6. Conjugado	1 vial de 16 ml	2 botellas de 40 ml	4 botellas de 40 ml
7. Cromóg./subs.	1 vial de 16 ml	2 botellas de 40 ml	4 botellas de 40 ml
8. Ácido sulfúrico	1 vial de 15 ml	2 botellas de 40 ml	2 botellas de 80 ml
9. Sellador adhesiv.	2 uds.	10 uds.	20 uds.
10. Manual instrucc.	1 ud.	1 ud.	1 ud.

#### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (200 µl y 10 µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA, calibrada, capaz de proporcionar una temperatura de +37 °C.
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

#### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Cuando el equipo se utiliza para el cribado de unidades de sangre y componentes sanguíneos, debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar dicho tipo de análisis.
3. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE. UU., y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/substrato a la luz intensa y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.
7. No intercambiar componentes de lotes distintos, ni tampoco de dos equipos del mismo lote.
8. Comprobar que los reactivos estén claros y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
11. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados, a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y muestras, deben tratarse como potencialmente infecciosos y deben inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

15. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores adecuados designados para residuos de laboratorio/hospitalarios.

16. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, lavar la superficie con abundante agua. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

#### G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar del laboratorio de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.
2. Evitar la adición de conservantes a las muestras, en particular azida sódica, ya que podría afectar a la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado de unidades de sangre, se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) y visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, coágulos o partículas pesadas, o filamentos y organismos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de partículas, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con filtros de 0,2-0,8 micras.

#### H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

##### Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Comprobar que el desecante no muestre un color verde, lo que indicaría un defecto de conservación.

De ser así, contactar con el servicio de atención al cliente de Dia.Pro.

Doc.:	INS EVABULTRA.CE/Esp	Página	4 de 8	Rev.: 2	Fecha: 2020/01
-------	----------------------	--------	--------	---------	----------------

Las tiras no utilizadas deben guardarse en la bolsa de aluminio con el desecante herméticamente cerrada a una temperatura de 2 a 8 °C.

Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

#### Controles negativo y positivo:

Listos para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Manipular el control como potencialmente infeccioso, aunque el material positivo para VHE utilizado en la preparación del control positivo se haya inactivado químicamente y provenga de material negativo a HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb y Ac sifilis.

#### Calibrador:

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y después mezclar con cuidado en el vórtex.

#### Notas importantes:

- *Tras la disolución, el calibrador se mantiene estable a una temperatura de 2 a 8 °C durante un mes si se manipula correctamente. Para períodos de conservación más largos, congelar en alícuotas a -20 °C y descongelar solo una vez.*
- *Manipular el control como potencialmente infeccioso, aunque el material positivo para VHE utilizado en la preparación del control positivo se haya inactivado químicamente y provenga de material negativo a HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb y Ac sifilis.*

#### Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada y mezclarse con cuidado antes de usarse.

Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

**Nota: Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante una semana a temperaturas entre 2 y 8 °C.**

#### Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Cromógeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Ácido sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

#### Leyenda:

#### Indicación de peligro, Frases H

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

#### Consejo de prudencia, Frases P

**P280** – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

**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.

**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.

**P337 + P313** – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

#### I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. **Las micropipetas** deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de  $\pm 2\%$ . También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
2. La **incubadora ELISA** debe ajustarse a 37 °C ( $\pm 0,5$  °C de tolerancia) y controlarse periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua, siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350  $\mu$ l/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los **tiempos de incubación** deben tener un margen de  $\pm 5\%$ .
5. El **lector ELISA** debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro (620-630 nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) ancho de banda  $\leq 10$  nm; b) rango de absorbancia de 0 a  $\geq 2,0$ ; c) linealidad  $\geq 2,0$ ; d) reproducibilidad  $\geq 1\%$ . El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente se debe proceder al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
6. En caso de usar un **sistema automatizado de ELISA**, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y validarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe validarse y fijarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de

contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados ELISA para el cribado de sangre cuando la cantidad de muestras supere las 20-30 unidades por serie.

7. Cuando se utilizan instrumentos automáticos ELISA, en caso de que los soportes de los viales del instrumento no se ajusten a los viales del equipo, debe transferirse la solución a contenedores adecuados y marcarlos con la misma etiqueta despegada del vial original. Esta operación es importante para evitar la falta de coincidencia de los contenidos de los viales al transferirlos. Cuando termine la prueba, guardar los contenedores secundarios etiquetados a una temperatura de 2 a 8 °C, firmemente cerrados.
8. El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos para usar con el equipo, como la plataforma ELISA, **DIA.BLOod**, suministrada por DiaPro ya validada para la línea de productos de DiaPro.

#### L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista. Comprobar que el cromógeno/substrato sea incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico transparente. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir todo el contenido de la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
4. Disolver el calibrador como se ha indicado anteriormente.
5. Esperar hasta que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y, a continuación, mezclar como se indica.
6. Ajustar la incubadora de ELISA a 37 °C y preparar el lavador de ELISA cebando con la solución de lavado diluida, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
7. Comprobar que el lector ELISA se haya encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar los ajustes y asegurarse de que se use el protocolo de ensayo correcto.
9. Comprobar que las micropipetas estén ajustadas al volumen requerido.
10. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
11. En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

#### M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

##### Ensayo automatizado:

En caso de que el ensayo se realice automáticamente con un sistema ELISA, se recomienda dispensar la muestra directamente en el pocillo de muestra adecuado de la microplaca. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben lavarse debidamente para evitar cualquier contaminación cruzada entre las muestras.

No diluir el calibrador ni los controles, ya que están listos para el uso.

Dispensar 100 µl de controles/calibrador en los pocillos correspondientes.

**Nota importante:** *Comprobar visualmente que las muestras se hayan dispensado en los pocillos correspondientes.*

Para las operaciones siguientes, consultar las instrucciones que aparecen abajo para el Ensayo manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

En caso de que se use un equipo automático, asegurarse en primer lugar de que el instrumento esté validado de acuerdo con el punto I.6.

##### Ensayo manual:

1. Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte de micropocillos. Guardar las tiras restantes en la bolsa con desecante a una temperatura entre 2 y 8 °C, sellada.  
Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
2. Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado y 100 µl de control positivo una sola vez en los pocillos correspondientes, seguidos de 100 µl de cada muestra. En caso de que se use el calibrador (\*), dispensar 100 µl de este en un pocillo debidamente definido por duplicado.  
¡No diluir los controles ni el calibrador, están prediluidos y listos para el uso!  
Comprobar la presencia de muestras en los pocillos a simple vista (hay una diferencia de color notable entre los pocillos vacíos y llenos) o mediante una lectura a 450/620 nm (las muestras presentan valores DO superiores a 0,100).

##### Nota importante:

*Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.*

3. Incubar la microplaca durante **45 minutos a 37 °C**.
4. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indica en la sección I.3.
5. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el primer pocillo de blanco, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rosa/rojo se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

##### Notas importantes:

*Hay que tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.*

6. Incubar la microplaca durante **45 min. a +37 °C**.
7. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indica en el paso 4.
8. Dispensar 100 µl de la mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo para el blanco. Comprobar que se haya añadido correctamente el reactivo. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 15 minutos**.

**Nota importante:** *No exponer a luz intensa directa, ya que se podría generar un fondo excesivo.*

9. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 8 para detener la reacción

enzimática. La adición del ácido cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo/marrón.

10. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, como se indica en la sección I.5, con un lector de microplacas a 450 nm (lectura) y a 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

**Notas importantes:**

1. Asegurarse de que no haya impresiones digitales en el fondo de los micropocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
3. Se ha comprobado que agitar a  $350 \pm 150$  rpm durante la incubación aumenta la sensibilidad del ensayo aprox. el 20%.

**N. ESQUEMA DEL ENSAYO**

Método	Operaciones
Controles y calibrador (*)	100 µl
Muestras	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/Substrato	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>15 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm/620-630 nm

**(\*) Notas importantes:**

- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de las pruebas.
- El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensado:

**Microplaca**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M4										
B	CN	M5										
C	CN	M6										
D	CN	M7										
E	CP	M8										
F	M1	M9										
G	M2	M10										
H	M3	M11										

Leyenda: BL = Blanco CN = Control Negativo  
CP = Control Positivo M = Muestra

**O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

Se realiza una comprobación en los controles cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores de DO 450 nm /620-630 nm son los esperados e indicados en la siguiente tabla.

Comprobar	Requisitos
Pocillo blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
Control negativo (CN)	Valor medio < 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco
Control positivo (CP)	Valor > 1,000 DO 450 nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Comprobar
<b>Pocillo blanco</b> > 0,100 DO 450 nm	1. que la solución cromógeno/substrato no se haya contaminado durante el ensayo.
<b>Control negativo (CN)</b> > 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y se ha alimentado con esta el lavador antes del uso; 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo); 4. no se ha producido contaminación del control negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas, derrames o al conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están bloqueadas o parcialmente obstruidas.
<b>Control positivo</b> < 1,000 DO 450 nm	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en la distribución de controles (dispensar el control negativo en lugar del positivo). En este caso, el control negativo también tendrá un valor de DO 450 nm > 0,150; 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si se producen esos problemas, tras la comprobación, informar al responsable de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

**Nota importante:**

Si se ha utilizado calibrador, comprobar los siguientes datos:

Comprobar	Requisitos
Calibrador	M/Co > 1,5

Si los resultados del ensayo no coinciden con los requisitos establecidos anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Comprobar
<b>Calibrador</b> M/Co < 1,5	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (por ejemplo, dispensar el control negativo en lugar del calibrador); 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.



En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, control negativo, control positivo) coinciden con los requisitos establecidos, la prueba podría considerarse válida.

**Nota importante:**

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 10.

**P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE**

Los resultados de las pruebas se calculan a partir de un valor de corte determinado con la fórmula siguiente sobre el valor medio de DO 450 nm / 620-630 nm del control negativo (CN):

$$CN + 0,250 = \text{Valor de corte (Co)}$$

El valor encontrado en la prueba se utiliza para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

**Nota importante:** Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un sistema automatizado ELISA, es necesario asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte y para la interpretación de los resultados sea correcta.

**Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

La interpretación de los resultados se realiza como la relación entre el valor de DO 450 nm / 620-630 nm de la muestra y el valor de corte (M/Co). Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Equívoco
> 1,1	Positivo

Un resultado **negativo** indica que el paciente no está infectado por VHE o que la unidad de sangre se puede transfundir.

Los pacientes cuya muestra resulte **equivoca** deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada del paciente 1 o 2 semanas después. La unidad de sangre no se puede transfundir.

Un resultado **positivo** indica infección por VHE y, por lo tanto, el paciente debe ser tratado en consecuencia o la unidad de sangre debe descartarse.

**Notas importantes:**

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio e interpretación.
2. Cualquier resultado positivo debe confirmarse mediante un método alternativo capaz de detectar anticuerpos anti VHE con una tecnología distinta.
3. Al comparar los resultados del ensayo con cualquier otro producto comercial con marca CE/FDA, se debe tener en cuenta que el equipo de DiaPro detecta todos los anticuerpos, incluidos IgM e IgA, y no solo IgG.
4. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.
5. El diagnóstico de infección por VHE debe ser realizado y comunicado al paciente solo por un médico cualificado.

6. En caso de que se use el equipo con muestras de origen animal, será responsabilidad del jefe de laboratorio asignar un valor de corte adecuado al sistema y, posteriormente, calcular los resultados.

A continuación se incluye un ejemplo de los cálculos (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 10).

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control negativo: 0,049 – 0,050 – 0,051 DO 450 nm  
 Valor medio: 0,050 DO 450 nm  
 Menor de 0,150 – Válido

Control positivo: 2,589-2,591 DO 450 nm  
 Valor medio: 2,590 DO 450 nm  
 Mayor de 1,000 – Válido  
 Valor de corte = 0,050+0,250 = 0,300

Calibrador: 0,930 – 0,936 DO 450 nm  
 Valor medio: 0,933 DO 450 nm M/Co = 3,1  
 M/Co mayor de 1,5 – Válido

Muestra 1: 0,070 DO 450 nm  
 Muestra 2: 1,690 DO 450 nm  
 Muestra 1 M/Co < 0,9 = negativa  
 Muestra 2 M/Co > 1,1 = positiva

**R. RENDIMIENTO**

**1. LÍMITE DE DETECCIÓN**

Se estableció frente al 1<sup>er</sup> reactivo de referencia de la OMS para anticuerpos VHE, código NIBSC95/584. La preparación se diluyó en suero humano negativo a Ac VHE mezclado y, a continuación, se comprobó en tres lotes. Los resultados se indican en la siguiente tabla:

UI/ml	P 1 v.medio DO 450	P 2 v.medio DO 450	P 3 v.medio DO 450	Promedio DO 450	Promedio STD
2,0	2,442	2,456	2,452	2,450	0,088
1,0	1,305	1,301	1,297	1,301	0,111
0,5	0,587	0,600	0,603	0,597	0,019
0,25	0,269	0,273	0,272	0,272	0,029
0,125	0,131	0,129	0,127	0,129	0,007
0,062	0,068	0,070	0,065	0,068	0,008
0,031	0,036	0,034	0,034	0,035	0,005
0	0,009	0,008	0,004	0,007	0,006

El límite de detección, calculado como control negativo (0 UI/ml) valor medio DO 450 nm + 5xSTD, resultó mucho mejor que **0,25 UI/ml OMS**.

**2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO**

Los estudios se realizaron considerando un valor de corte establecido en 0,25 OMS UI/ml.

**2.1 Sensibilidad diagnóstica**

Se calculó en un panel de muestras positivas previamente cribadas con un producto comercial con marca CE para la determinación de Ac anti VHE (pero prevalentemente IgG como se indica en sus instrucciones de uso) y en dos seroconversiones disponibles en el mercado.

Los resultados para estos dos paneles (Biomex – Alemania) se indican en la siguiente tabla.

	Ac VHE versión ULTRA		EQUIPO DE REFERENCIA	
	v. medio DO 450	M/CO	v. medio DO 450	M/CO
SCP-VHE-006b N.º 1	0,015	0,1	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 2	0,010	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 3	0,011	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 4	0,016	0,1	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 5	0,015	0,1	0,001	0,0
SCP-VHE-006b N.º 6	0,009	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 7	0,010	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-006b N.º 8	0,592	<b>2,3</b>	0,013	0,1
SCP-VHE-006b N.º 9	2,859	<b>11,1</b>	1,868	<b>9,8</b>
SCP-VHE-006b N.º 10	1,755	<b>6,8</b>	1,972	<b>10,4</b>
SCP-VHE-006b N.º 11	3,526	<b>13,7</b>	2,866	<b>15,1</b>
SCP-VHE-006b N.º 12	3,625	<b>14,1</b>	2,459	<b>12,9</b>
SCP-VHE-006b N.º 13	3,712	<b>14,4</b>	2,959	<b>15,6</b>
SCP-VHE-006b N.º 14	3,703	<b>14,4</b>	2,857	<b>15,0</b>
SCP-VHE-006b N.º 15	3,609	<b>14,0</b>	3,130	<b>16,5</b>
SCP-VHE-006b N.º 16	3,749	<b>14,5</b>	3,068	<b>16,1</b>
SCP-VHE-006b N.º 17	3,700	<b>14,3</b>	3,160	<b>16,6</b>
SCP-VHE-006b N.º 18	3,650	<b>14,1</b>	3,096	<b>16,3</b>
SCP-VHE-006b N.º 19	3,695	<b>14,3</b>	2,776	<b>14,6</b>
SCP-VHE-006b N.º 20	superior	<b>&gt; 19</b>	3,032	<b>16,0</b>
SCP-VHE-006b N.º 21	superior	<b>&gt; 19</b>	3,170	<b>16,7</b>
SCP-VHE-006b N.º 22	3,852	<b>14,9</b>	3,224	<b>17,0</b>
SCP-VHE-006b N.º 23	superior	<b>&gt; 19</b>	3,280	<b>17,3</b>

	Ac VHE versión ULTRA		EQUIPO DE REFERENCIA	
	v. medio DO 450	M/CO	v. medio DO 450	M/CO
SCP-VHE-001b N.º 1	0,008	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-001b N.º 2	0,006	0,0	0,000	0,0
SCP-VHE-001b N.º 3	1,049	<b>4,1</b>	0,007	0,0
SCP-VHE-001b N.º 4	3,487	<b>13,5</b>	0,918	<b>4,8</b>
SCP-VHE-001b N.º 5	3,236	<b>12,5</b>	2,160	<b>11,4</b>
SCP-VHE-001b N.º 6	2,377	<b>9,2</b>	3,074	<b>16,2</b>
SCP-VHE-001b N.º 7	2,113	<b>8,2</b>	3,310	<b>17,4</b>
SCP-VHE-001b N.º 8	3,577	<b>13,9</b>	3,875	<b>20,4</b>

Las muestras SCP-VHE-006b N.º 8 y SCP-VHE-001b N.º 3 resultaron positivas para anti VHE IgM con el producto de DiaPro con código EVM.CE.

El valor global encontrado para la sensibilidad diagnóstica fue 100%.

### 2.3 Especificidad diagnóstica

Se calculó en un panel de muestras negativas previamente cribadas con un producto comercial con marca CE para la determinación de Ac anti VHE (pero prevalentemente IgG como se indica en sus instrucciones de uso) y en un panel de interferentes potenciales.

No se observó ninguna interferencia en dichas muestras y el valor global encontrado para la especificidad diagnóstica fue > 99,5.

Las muestras positivas falsas resultantes, 0,5%, resultaron ser en su mayoría positivas a IgM y/o IgA.

### 3. PRECISIÓN

Ha sido calculada a partir de dos muestras, una negativa y una positiva débil, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas.

Se encontraron valores de CV que oscilaban entre 5-10%, dependiendo de los valores DO 450 nm. La variabilidad observada no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

#### Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 10.

### S. LIMITACIONES

Se ha observado que las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados tras descongelarse generan algunos resultados falsos.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Tian-Cheng Li et al., Journal of Virology, 1997, p 7207-7213
2. Michaela A. Riddell et al., Journal of Virology, 2000, p 8011-8017
3. J.M.Echevarria et al., J. Med. Virol., 85, 2013, p 1037-1045
4. M.Fogeda et al., 2012, 84, p 71-74
5. Saskia A. et al., EID Journal, 2009, 15/3.

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma ISO 13485. Cada lote se somete a control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (Mi) – Italia





