

VIDAS® HBe/Anti-HBe (HBE/HBET)**Destinazione d'uso**

VIDAS® HBe/Anti-HBe è un test qualitativo, automatizzato sugli strumenti della famiglia VIDAS®, che permette la ricerca dell'antigene e del virus dell'epatite B (Ag HBe) o degli anticorpi anti-antigene e (Anti-HBe) nel siero o nel plasma umano (eparinato di litio, citrato di sodio o EDTA) con la tecnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Introduzione e obiettivo del test

Circa il 5% della popolazione mondiale viene infettata dal virus dell'epatite B (HBV), che causa una malattia epatica necroinfiammatoria di durata e gravità variabile. I pazienti portatori di epatite cronica attiva hanno un rischio elevato di sviluppare una cirrosi epatica o un carcinoma epatocellulare. Nel corso dell'infezione, la risposta immunitaria diretta contro gli antigeni dell'HBV è responsabile dell'eliminazione del virus, ma può anche essere causa di lesioni epatiche. La trasmissione del virus può avvenire per via sessuale, parenterale o perinatale.

Nelle zone a forte endemia o nelle regioni in cui non viene eseguito uno screening delle donne in gravidanza, la trasmissione perinatale può verificarsi nel 90% delle donne portatrici croniche dell'HBV. Il bambino diventa portatore cronico dell'antigene HBs nel 90% dei casi.¹

Il gene C dell'HBV codifica per due proteine funzionalmente diverse: 1) la proteina del core (Ag HBc), che forma il nucleocapside; 2) la proteina e (Ag HBe), solubile, che si rinviene nel siero dei pazienti infettati dal virus selvaggio durante la fase di replicazione virale attiva.² La funzione dell'antigene HBe nel ciclo della replicazione virale non è ancora del tutto chiara: pur non essendo indispensabile al virus, questo antigene rappresenta infatti un importante bersaglio immunologico che interviene nell'eliminazione del virus stesso.

Generalmente, la presenza dell'antigene HBe si rileva precocemente nel corso di una epatite B acuta; infatti coincide o segue di poco la comparsa dell'antigene HBs. Nei casi acuti che evolvono verso la guarigione, l'antigene HBe scompare generalmente entro qualche settimana e si ha la sieroconversione con la comparsa degli anticorpi anti-HBe. Nei casi di epatite B cronica, l'antigene HBe può persistere per parecchi mesi o, addirittura, per parecchi anni, e la sua presenza è indicativa dello stadio di replicazione attiva dell'infezione cronica.² I soggetti trovati positivi per l'antigene HBe sono da considerarsi altamente infettivi per l'epatite B.³

L'antigene HBe viene utilizzato per il monitoraggio delle epatiti croniche e delle terapie antivirali. L'obiettivo di tali terapie è di prevenire che l'infezione evolva in cirrosi epatica. La sieroconversione dell'antigene in anticorpo (Ag HBe/anti-HBe) è generalmente considerata come indicativa del passaggio verso uno stadio di latenza del virus con normalizzazione del tasso delle transaminasi. La sieroconversione è associata ad una diminuzione del rischio di evoluzione della malattia verso la cirrosi epatica ovvero verso una patologia epatica scompensata.⁴

Un test positivo per la presenza di anticorpi anti-HBe in pazienti con epatite acuta in corso di guarigione, indica un processo di guarigione normale, in particolare se non sono più rilevabili gli antigeni HBs ed HBe. Nei soggetti portatori del virus HBV, la positività del test per la ricerca dell'anti-HBe indica di solito uno stadio di inattività del virus ed un basso livello di infettività.⁵ Tuttavia, un risultato positivo per gli anti-HBe associato alla presenza di un test HBV-DNA positivo, come si riscontra nelle mutazioni genetiche dell'HBV, può essere indice di una replicazione virale attiva e della progressione della malattia nel portatore.⁵

È in particolare il caso delle infezioni provocate da alcuni virus mutanti che non sono in grado di esprimere l'antigene HBe. Questi mutanti possono prevalere, rispetto al ceppo virale selvaggio, nei pazienti affetti da forme gravi di epatite B acuta o cronica e nei portatori dell'antigene HBs in corso di sieroconversione Ag HBe/anti-HBe.⁶

Il test VIDAS® HBe/anti-HBe permette di rivelare la presenza dell'antigene HBe o degli anticorpi anti-HBe che sono, ad eccezione dei casi di infezione da virus HBe mutanti, i marcatori rispettivamente di una fase di replicazione virale o di un'evoluzione verso la guarigione.

Principio

Antigene HBe

Il principio del dosaggio associa il metodo immunoenzimatico ad una rivelazione finale in fluorescenza (ELFA).

Il cono (SPR) monouso funge sia da fase solida, sia da dispositivo di pipettamento. I reagenti impiegati nel test sono pronti all'uso e predistribuiti nelle cartucce monouso sigillate.

Tutte le fasi del protocollo analitico vengono eseguite automaticamente dallo strumento. Il mezzo di reazione viene aspirato e rilasciato diverse volte dal cono SPR.

Dopo una fase iniziale di diluizione realizzata nello strumento, il campione viene sottoposto a ripetuti cicli di aspirazione/erogazione all'interno del cono, in modo tale da consentire all'antigene HBe eventualmente presente nel campione di legarsi simultaneamente all'anticorpo monoclonale fissato sul cono e ad un altro anticorpo monoclonale marcato con biotina.

I componenti non legati vengono eliminati durante le fasi di lavaggio.

La presenza della biotina è rivelata da un'incubazione con streptavidina marcata con fosfatasi alcalina. Una nuova fase di lavaggio elimina i componenti non fissati.

Nella fase finale di rivelazione il substrato (4-Metil-umbelliferil fosfato) viene aspirato/rilasciato dal cono. L'enzima del coniugato catalizza la reazione di idrolisi di questo substrato in un prodotto (4-metil-umbelliferone), la cui fluorescenza viene misurata a 450 nm.

Il valore del segnale di fluorescenza è proporzionale alla concentrazione dell'antigene presente nel campione.

Al termine della sessione di lavoro, i risultati vengono calcolati automaticamente dallo strumento in rapporto a una curva di calibrazione inserita in memoria. Quindi è possibile stampare i risultati.

Anticorpi anti-HBe

Il test anti-HBe utilizza lo stesso protocollo sopra descritto, con la differenza che il campione viene dapprima pre-incubato con antigene HBe ricombinante. Durante questa incubazione, l'antigene HBe ricombinante viene neutralizzato dagli anticorpi anti-HBe del campione, se sono presenti. Successivamente, per rilevare la presenza dell'antigene HBe residuo, viene realizzato il test per la ricerca dell'HBe Ag. La presenza di anticorpi nel campione diminuisce l'intensità del segnale. Se nel campione non sono presenti anticorpi anti-HBe, l'HBe ricombinante aggiunto verrà totalmente rilevato. Il risultato in anti-HBe è calcolato automaticamente dallo strumento, quindi viene stampato.

Contenuto della confezione (30 test) - Ricostituzione dei reagenti

30 cartucce HBe ^(a)	STR	Pronto all'uso.
30 coni HBe 1 x 30	SPR	Pronto all'uso. Per uso singolo. Coni sensibilizzati con anticorpo monoclonale di topo anti-HBe.
Standard Ag HBe 4 x 1 ml (liofilizzato)	S1	Base proteica stabilizzata, addizionata di antigene HBe ricombinante + stabilizzanti proteici. Per la ricostituzione dello standard, diluire il contenuto del flacone con 1 ml di diluente dello standard. Dopo la ricostituzione lo standard può essere conservato per 6 mesi a +2 °C/+8 °C.
Standard Anti-HBe 1 x 2 ml (liquido)	S2	Pronto all'uso. Siero umano* delipidato + 0,9 g/l di sodio azide.
Controllo positivo Anti-HBe 1 x 1,5 ml (liquido)	C1	Pronto all'uso. Base proteica stabilizzata, addizionata di anticorpi monoclonali di topo anti-HBe + 0,9 g/l di sodio azide. I dati MLE indicano l'indice: intervallo di confidenza ("Control C1 (+) Test Value Range").
Controllo negativo ^(b) 1 x 1,9 ml (liquido)	C2	Pronto all'uso, Controllo negativo valido per entrambi i test Ag HBe ed Anti-HBe. Tampone fosfato + protein stabilizer of animal origin + preservatives.
Controllo positivo Anti-HBe 1 x 1,5 ml (liquido)	C3	Pronto all'uso. Base proteica stabilizzata, addizionata di anticorpi monoclonali di topo anti-HBe + 0,9 g/l di sodio azide. I dati MLE indicano l'indice: intervallo di confidenza ("Control C3 (+) Test Value Range").

Diluyente dello Standard S1 1 x 5 ml (liquido)	R1	Pronto all'uso. Contiene 0,9 g/l di sodio azide.
Specifiche per i dati anagrafici di fabbrica richiesti per calibrare il dosaggio: codice a barre MLE (Master Lot Entry) stampato sull'etichetta della confezione.		
1 scheda tecnica scaricabile da www.biomerieux.com		

* È stata verificata l'assenza di antigeni HBs, di anticorpi anti-HIV1, HIV2 e di anticorpi anti-HCV. Tuttavia, poiché nessun test può darne garanzia assoluta, questo prodotto deve essere manipolato con le precauzioni d'uso reative ai prodotti potenzialmente infettivi. Pertanto, durante la manipolazione, è necessario attenersi alle procedure di sicurezza abituali.



(a) **PERICOLO**

H318 / H360FD / P201 / P280 / P305 + P351 + P338 / P308 + P313



(b) **ATTENZIONE**

EUH208 / H317 / P261 / P280 / P302 + P352

Indicazione di pericolo

- H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.
- EUH208: Contiene 2-metil-2H-isotiazolin-3-one. Può provocare una reazione allergica.
- H318: Provoca gravi lesioni oculari.
- H360FD: Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.

Consigli di prudenza

- P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
- P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.
- P305 + P351 + P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a risciacquare.
- P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
- P302 + P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
- P308 + P313: In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.

Per maggiori informazioni, consultare la Scheda di sicurezza.

Il cono

Il cono è sensibilizzato, durante la produzione, con anticorpo monoclonale di topo anti-HBe. Ogni cono è identificato con il codice HBE.

Prelevare soltanto il numero di dispositivi a cono necessari dal sacchetto e richiuderlo accuratamente dopo l'apertura.

La cartuccia reagente

La cartuccia è composta da 10 pozzetti ricoperti da un foglio di alluminio sigillato ed etichettato. Sull'etichetta è stampato un codice a barre che indica principalmente il codice del test, il numero di lotto del kit e la data di scadenza. L'etichetta, in corrispondenza del primo pozzetto, è preforata per facilitare l'introduzione del campione. L'ultimo pozzetto di ciascuna cartuccia è una cuvetta che consente la lettura in fluorimetria. I pozzetti intermedi contengono i diversi reagenti necessari all'esecuzione del test.

Descrizione della cartuccia HBe/Anti-HBe

La strip contiene dietanolamina e sodio azide. Fare riferimento alle indicazioni di pericolo "H" e ai consigli di prudenza "P" sopra riportati.^(a)

Pozzetto	Reagenti
1	Pozzetto del campione.
2	Coniugato: anticorpo monoclonale di topo anti-HBe biotinilato + 0,9 g/l di sodio azide (300 µl).
3 - 4 - 6 - 7 - 8 - 9	Soluzione di lavaggio: tampone pH = 7,8 (0,05 mol/l) + 0,9 g/l di sodio azide (600 µl).

Pozzetto	Reagenti
5	Tracciante: Streptavidina marcata con fosfatasi alcalina + 0,9 g/l di sodio azide (400 µl).
10	Cuvetta di lettura contenente il substrato: 4-Metil-umbelliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (DEA) (0,62 mol/l o 6,6%, pH 9,2) + sodio azide 1g/l (300 µl).

Materiali e consumabili necessari ma non forniti.

- Pipetta con puntali monouso per la distribuzione di 100 µl, 150 µl e 1 ml.
- Guanti di lattice monouso senza talco.
- Per altri materiali o consumabili specifici, consultare il Manuale dell'Utilizzatore.
- Strumenti della famiglia VIDAS®.

Avvertenze e precauzioni

- **Unicamente per diagnostica *in vitro*.**
- **Esclusivamente per uso professionale.**
- **Questa confezione contiene componenti di origine umana. Poiché nessuno dei metodi di analisi attualmente conosciuti può garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile, si raccomanda di trattarli con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi e manipolarli con le usuali precauzioni d'uso di sicurezza (consultare Laboratory Biosafety Manual, OMS, Ginevra, ultima edizione).**
- Questa confezione contiene dei componenti di origine animale. Poiché i controlli sull'origine e/o sullo stato sanitario degli animali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile, si raccomanda di manipolarli con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare).
- Non utilizzare i dispositivi a cono il cui sacchetto sia forato o che presentano l'opercolo scollato.
- Non utilizzare le strip visibilmente alterate (foglio di alluminio o plastica danneggiati).
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Non mescolare i reagenti (o i consumabili) di lotti differenti.
- I guanti non devono essere talcati poiché il talco, in alcuni test immunoenzimatici, può causare falsi risultati.
- I reagenti della confezione contengono sodio azide che può reagire con le tubature dei lavelli in piombo o in rame formando azidi metalliche esplosive. Nel caso in cui liquidi contenenti sodio azide vengano smaltiti nel sistema idraulico, è necessario fare scorrere acqua negli scarichi per evitarne l'accumulo.
- Fare riferimento alle indicazioni di pericolo "H" e ai consigli di prudenza "P" sopra riportati.
- In caso di versamento di liquidi, asciugare accuratamente dopo il trattamento con detergente liquido o con una soluzione di ipoclorito di sodio almeno allo 0,5%. Per eliminare liquidi versati all'interno o sullo strumento, consultare il Manuale dell'Utilizzatore. Non trattare in autoclave soluzioni contenenti candeggina.
- Lo strumento deve essere pulito e decontaminato con regolarità (per le operazioni di manutenzione da parte dell'utilizzatore e preventive, consultare il Manuale dell'Utilizzatore).

Condizioni di conservazione

- Conservare il kit a +2°C/+8°C.
- **Non congelare i reagenti.**
- **Conservare tutti i reattivi non utilizzati a +2 °C/+8 °C, incluso lo standard S1 dopo la ricostituzione.**
- All'apertura della confezione, verificare l'integrità e la corretta chiusura del sacchetto dei coni (SPR). In caso contrario, non utilizzare i dispositivi a cono.
- **Dopo l'uso, richiudere accuratamente il sacchetto contenente il disidratante per conservare la stabilità dei coni e riportare l'intera confezione a +2°C/+8°C.**
- Tutti i componenti, se correttamente conservati alle condizioni prescritte, sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.

Campioni

Tipo di campione e prelievo

Siero o plasma (eparinato di litio, citrato di sodio o EDTA).

Si raccomanda che ogni laboratorio verifichi l'idoneità delle provette utilizzate per il prelievo.

Non è stato validato per questo test l'uso di campioni inattivati con il calore. Non scaldare i campioni.

Per questo dosaggio non è stata riscontrata alcuna interferenza significativa in caso di:

- emolisi (dopo aggiunta nel campione di concentrazioni scalari di emoglobina (monomero) da 0 a 5,6 mg/ml),
- lipemia (dopo aggiunta nel campione di concentrazioni scalari di lipidi [equivalenti trigliceridi] da 0 a 10 mg/ml),
- bilirubinemia (dopo aggiunta nel campione di concentrazioni scalari di bilirubina da 0 a 490 µmol/l).

Si consiglia di non utilizzare campioni emolizzati o lipemici e di eseguire, se possibile, un nuovo prelievo.

Stabilità dei campioni

I campioni possono essere conservati, in provette tappate, a +2 °C/+8 °C al massimo per 1 settimana. Se è necessario conservarli più a lungo, congelare il siero o il plasma a -31 °C/-19 °C.

Evitare congelamenti e scongelamenti successivi.

Uno studio effettuato su campioni congelati per due mesi, non ha mostrato alcuna influenza sulla qualità dei risultati.

Istruzioni per l'uso

Per le istruzioni complete, consultare il Manuale dell'Utilizzatore.

Lettura dei dati MLE

All'apertura di un nuovo lotto di reagenti

Con il lettore esterno di codici a barre, leggere i dati MLE riportati sull'etichetta della confezione prima dell'esecuzione del test.

Se questa operazione non è stata fatta **prima di avviare gli esami**, lo strumento non potrà stampare i risultati.

Nota: La registrazione delle specifiche va fatta una sola volta per lotto.

È possibile inserire i dati MLE **manualmente o in automatico** a seconda dello strumento (consultare il Manuale dell'Utilizzatore).

Calibrazione

La calibrazione, mediante gli standard forniti nel kit, deve essere effettuata all'apertura di ogni nuovo lotto dopo aver memorizzato i dati MLE e deve essere ripetuta ogni 14 giorni.

Questa operazione definisce le curve di calibrazione specifiche per lo strumento e compensa eventuali variazioni minime del segnale del test per l'intera durata del periodo di conservabilità della confezione.

Gli standard, identificati con S1 (HBe Ag) ed S2 (Anti-HBe), devono essere analizzati in doppio.

Il valore dello standard deve essere compreso nei limiti di RFV ("Relative Fluorescence Value") fissati ed il coefficiente di variazione dei due dati deve essere inferiore al valore normale indicato sulla card MLE.

In caso contrario occorrerà eseguire una nuova calibrazione.

Procedimento del test HBe Ag

1. **Prelevare dal frigorifero soltanto i reattivi necessari e lasciarli a temperatura ambiente per almeno 30 minuti prima dell'uso.**
2. Prelevare dalla confezione una cartuccia "HBE" ed un cono "HBE" per ciascun campione, controllo o standard da analizzare. **Richiudere accuratamente il sacchetto dei coni (SPR) dopo aver prelevato i coni SPR necessari.**
3. Il test è identificato sullo strumento con il codice "HBE". Lo standard, identificato con "S1", dovrà essere inserito in doppio obbligatoriamente all'inizio della serie. Se si deve esaminare il controllo positivo, dovrà essere identificato con "C1". Se si deve esaminare il controllo negativo, dovrà essere identificato con "C2".
4. Omogeneizzare con un agitatore tipo vortex il calibratore, i controlli ed i campioni (per i sieri o i plasmi separati dal sedimento).
5. **Per questo test, il volume dello standard, del controllo e del campione è 150 µl.**
6. Inserire nello strumento i coni "HBE" e le cartucce "HBE". Verificare attentamente la concordanza dei codici (colori e lettere) tra i coni SPR e le cartucce del reagente.
7. Avviare la sessione di lavoro come indicato nel Manuale dell'Utilizzatore. Tutte le fasi del protocollo analitico vengono gestite automaticamente dallo strumento.
8. Dopo il pipettamento, ritappare i flaconi e rimetterli a +2°C/+8°C.

9. I risultati si ottengono in **circa 90 minuti**. Al termine dell'analisi, estrarre dallo strumento i coni SPR e le cartucce.
 10. Eliminare coni e cartucce usati in un recipiente idoneo.

Risultati e interpretazione del test HBe

Una volta terminata la sessione di lavoro, i risultati vengono analizzati automaticamente dal computer. L'apparecchio esegue per ogni test due misure di fluorescenza nella cuvetta di lettura del reagente. La prima lettura è una lettura di fondo della cuvetta di substrato prima di inserire il cono (SPR) nel substrato.

La seconda lettura è eseguita dopo l'incubazione del substrato con l'enzima eventualmente legato all'interno del cono.

Il calcolo dell'RFV (Valore di fluorescenza relativa) è il risultato della differenza tra il valore di fondo e il risultato finale. Questo calcolo compare sul foglio dei risultati.

L'indice del test viene calcolato dividendo l'RFV del campione o del controllo per l'RFV dello standard:

$i = \text{indice} = \text{RFV del campione} / \text{RFV dello standard S1}$

L'indice del test e l'interpretazione vengono stampati sul foglio dei risultati:

Indice	Interpretazione
$i < 0,1$	Negativo: assenza di antigene HBe
$i \geq 0,1$	Positivo: presenza di antigene HBe

L'interpretazione dei risultati deve essere fatta tenendo conto dell'anamnesi del paziente ed, eventualmente, dei risultati di altri test.

Poiché per il dosaggio dell'antigene HBe non è disponibile nessuno standard internazionale, il reattivo VIDAS® è calibrato in rapporto a sieri di collezione.

Procedimento del test anti-HBe

Nota: il test VIDAS® Anti-HBe inizia con una fase di pre-incubazione che può essere eseguita in un bagnomaria, in un termostato o direttamente nello strumento.

Attenzione: Ogni ricostituzione di un nuovo flacone di S1 da utilizzare per il test anti-HBe deve essere validata analizzando i controlli C2 e C3.

Pre-incubazione

- Omogeneizzare con un agitatore tipo vortex gli standard S1 e S2, i controlli C2 e C3 ed i campioni.
- Per ogni campione, standard (S2) e controllo da saggiare, pipettare 100 µl di standard HBe (S1) in una provetta di vetro o di plastica o nel pozzetto del campione della cartuccia VIDAS® "HBE". Aggiungere 100 µl di campione, di standard (S2) o di controllo. Coprire ed agitare le provette con un agitatore tipo vortex o pipettando più volte nei pozzetti del campione delle cartucce.

Per una pre-incubazione nelle provette incubare a +35 °C/+39 °C per 1 ora ± 5 minuti in bagnomaria o in un termostato; idem nello strumento per una pre-incubazione nelle cartucce.

Dosaggio sullo strumento

- Estrarre i reattivi necessari dal frigorifero 30 minuti prima della fine della pre-incubazione per riportarli a temperatura ambiente.
- Il test è identificato sullo strumento con il codice "HBET". Lo standard, identificato obbligatoriamente con "S2", dovrà essere inserito in doppio. Se si deve esaminare il controllo positivo, dovrà essere identificato con "C3". Se si deve esaminare il controllo negativo, dovrà essere identificato con "C2".
- a) Se la pre-incubazione non è stata fatta nella cartuccia, distribuire 150 µl della miscela (preparata durante la pre-incubazione) nei pozzetti del campione delle cartucce "HBE" (NB: i campioni ed i controlli vanno analizzati in singolo, lo standard in doppio). Inserire quindi nello strumento i coni e le cartucce.
 - b. **Se la pre-incubazione è stata fatta nello strumento, non dimenticare di inserire i coni.**
- Verificare la concordanza dei codici (colori e lettere) dei coni "HBE" e delle cartucce "HBE".
- Avviare la sessione di lavoro come indicato nel Manuale dell'Utilizzatore. Tutte le fasi del protocollo analitico vengono gestite automaticamente dallo strumento.
- Dopo il pipettamento, ritappare i flaconi e rimetterli a +2°C/+8°C.
- I risultati si ottengono in circa 90 minuti. Al termine dell'analisi, estrarre dallo strumento i coni SPR e le cartucce.
- Eliminare coni e cartucce usati in un recipiente idoneo.

Risultati e interpretazione del test Anti-HBe

Una volta terminata la sessione di lavoro, i risultati vengono analizzati automaticamente dal computer. L'apparecchio esegue per ogni test due misure di fluorescenza nella cuvetta di lettura del reagente. La prima lettura è una lettura di fondo della cuvetta di substrato prima di inserire il cono (SPR) nel substrato.

La seconda lettura è eseguita dopo l'incubazione del substrato con l'enzima eventualmente legato all'interno del cono.

Il calcolo dell'RFV (Valore di fluorescenza relativa) è il risultato della differenza tra il valore di fondo e il risultato finale. Questo calcolo compare sul foglio dei risultati.

L'indice del test viene calcolato dividendo l'RFV del campione o del controllo per l'RFV dello standard:

$i = \text{indice} = \text{RFV del campione} / \text{RFV dello standard S2}$

L'indice del test e l'interpretazione vengono stampati sul foglio dei risultati. L'interpretazione, in funzione dell'indice del test, è la seguente:

Indice	Interpretazione
$i < 0,4$	Positivo: presenza di anti-HBe
$0,4 \leq i < 0,5$	Dubbio
$i \geq 0,5$	Negativo: assenza di anti-HBe

L'interpretazione dei risultati deve essere fatta tenendo conto dell'anamnesi del paziente ed, eventualmente, dei risultati di altri test.

Poiché per il dosaggio degli anticorpi anti-HBe non è disponibile nessuno standard internazionale, il reattivo VIDAS® è calibrato in rapporto a sieri di collezione

Controllo di qualità

In ogni confezione VIDAS® HBe/Anti-HBe sono inclusi un controllo Ag HBe positivo (C1), un controllo Anti-HBe positivo (C3) ed un controllo HBe/Anti-HBe negativo (C2) utilizzabile per entrambi i test.

Questi controlli devono essere utilizzati all'apertura di ogni nuova confezione per verificare che i reattivi non siano alterati. I controlli del kit devono essere utilizzati per convalidare ogni calibrazione. Se i valori dei controlli risultano al di fuori degli ambiti indicati, i risultati non possono essere considerati validi.

Attenzione: ogni ricostituzione di un nuovo flacone di S1 da utilizzare per il test anti-HBe deve essere validata analizzando i controlli C2 e C3.

Nota: È responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il controllo di qualità corrisponda a quanto previsto dalla legislazione vigente.

Limiti del metodo

- Sono possibili interferenze con alcuni sieri che contengono anticorpi diretti contro qualche componente del reagente. Per tale motivo, i risultati devono essere interpretati tenendo conto dell'anamnesi del paziente ed, eventualmente, dei risultati di altri test.

Performance del test HBe

Precisione

Riproducibilità inter-serie, intra-strumento

5 campioni sono stati dosati in singolo in 12 serie analitiche con lo stesso strumento nel corso di 7 settimane (ogni 14 giorni si è proceduto a una calibrazione come descritto nel paragrafo "Procedimento").

Campione	Indice medio	CV (%)
1	0,01	20,4
2	0,01	15
3	0,22	5,1

Campione	Indice medio	CV (%)
4	0,80	4,2
5	2,12	5,5

Riproducibilità (inter-strumento)

Ciascuno dei 3 campioni selezionati è stato analizzato in singolo in 3 serie analitiche ed in 4 diversi Centri.

Campione	Indice medio	CV (%)
Negativo	0,00	-
Positivo debole	0,29	12,5
Positivo forte	1,61	8,6

Sensibilità analitica

La sensibilità, determinata secondo la norma PEI, è stata stimata a 0,25 PEI U/ml.

Specificità e sensibilità**1) Analisi di una popolazione non selezionata**

413 campioni prelevati da donatori di sangue sono stati analizzati in parallelo con il VIDAS® e con un'altra tecnica immunoenzimatica (EIA).

		EIA	
		Positivo	Negativo
VIDAS® Ag HBe	Positivo	0	0
	Negativo	3*	410

* Questi campioni sono risultati negativi con una seconda tecnica EIA utilizzata per la risoluzione dei risultati discordanti. Inoltre, anche la ricerca del DNA virale è risultata negativa.

Specificità relativa dopo conferma: 100% (Ambito fiduciario al 95%: 99,04% - 100%).

2) Studio di una popolazione della routine

368 campioni sono stati analizzati in 2 diversi Centri con il VIDAS® HBe e con una tecnica immunoenzimatica. 5 campioni discordanti (negativi con il VIDAS®/positivi con l'EIA) sono stati analizzati con un secondo metodo EIA e con la ricerca del DNA virale. I risultati finali sono i seguenti:

		Interpretazione finale	
		Positivo	Negativo
VIDAS® Ag HBe	Positivo	204	0
	Negativo	4	160

Sensibilità relativa dopo conferma: 98,1% (Ambito fiduciario al 95%: 95,1% - 99,3%).

Specificità relativa dopo conferma: 100% (Ambito fiduciario al 95%: 97,6% - 100%).

3) Studio di 203 campioni clinici negativi

203 campioni sono stati analizzati con il VIDAS HBe e con una tecnica immunoenzimatica EIA.

La risoluzione dei risultati discordanti è stata fatta con una seconda tecnica EIA.

		Interpretazione finale	
		Positivo	Negativo
VIDAS® Ag HBe	Positivo	1	1
	Negativo	0	201

Specificità relativa dopo conferma: 99,5% (Ambito fiduciario al 95%: 97,2% - 99,9%).

Reazioni crociate e interferenze

Sono stati analizzati 69 campioni di siero contenenti possibili interferenti.

	VIDAS®	EIA 1
	Negativo	Negativo
Anticorpi anti-nucleo	9	9
Anticorpi anti-EBV	3	3
Anticorpi anti-HCV	18	18
IgM anti-HAV	6	6
Fattore reumatoide	33	33

Performance del test anti-HBe

Precisione

La precisione è stata valutata con il controllo positivo e con il controllo negativo, analizzati in doppio, due volte al giorno per otto giorni, in 3 Centri.

Campione	Controllo negativo C2	Controllo positivo C3
Indice medio	0,99	0,20
Riproducibilità intra-serie	3,4%	6,6%
Riproducibilità inter-serie	10,8%	8,2%

Sensibilità analitica

La sensibilità, determinata secondo la norma PEI, è stata stimata a 0,03 PEI U/ml.

Specificità e sensibilità

1) Studio di una popolazione della routine

900 campioni di soggetti con epatiti acute, croniche o con potenziali interferenti, sono stati saggiati in due diversi Centri. I risultati ottenuti con il VIDAS® sono stati comparati ai risultati di un test anti-HBe EIA del commercio. I campioni risultati dubbi non sono stati inclusi nel calcolo delle performance del test. I risultati discordanti sono stati analizzati con un secondo test anti-HBe EIA disponibile in commercio, tenendo conto della storia clinica del paziente

		Risultati confermati	
		Positivo	Negativo
VIDAS® Anti-HBe	Positivo	292	3
	Negativo	4	581

Sensibilità relativa dopo conferma: 98,65% (Ambito fiduciario al 95%: 96,52% - 99,48%).

Specificità relativa dopo conferma: 99,49% (Ambito fiduciario al 95%: 98,47% - 99,83%).

2) Studio di 210 campioni di donatori di sangue

210 campioni sono stati analizzati con il VIDAS® Anti-HBe e con una tecnica immunoenzimatica EIA.

La risoluzione dei risultati discordanti è stata fatta con una seconda tecnica EIA.

		Positivo	Negativo
VIDAS® Anti-HBe	Positivo	0	1
	Negativo	0	209

Specificità relativa dopo conferma: 99,5% (Ambito fiduciario al 95%: 97,3% - 99,9%).

Reazioni crociate e interferenze

Sono stati analizzati 58 campioni di siero contenenti possibili interferenti.

	VIDAS®	EIA 1
	Negativo	Negativo
Anticorpi anti-HBs	10	10
Anticorpi anti-nucleo	10	10

	VIDAS®	EIA 1
	Negativo	Negativo
Anticorpi anti-HCV	8	8
IgM anti-HAV	9	9
Fattore reumatoide	11	11
Anticorpi anti-EBV	10	10

Valori attesi

L'incidenza dei casi di epatite B registrati in Europa è di circa 20/100.000, e varia da 1/100.000 nei Paesi Scandinavi a 60/100.000 nell'Europa Centrale. In Europa l'endemia va aumentando dal Nord al Sud e dall'Ovest all'Est. Nel Sud-Est asiatico, in Cina, nell'Africa Nera o nell'America del Sud la prevalenza di questa endemia può superare il 10%.

Dato che l'antigene HBe esiste solamente nei soggetti HBs Ag positivi, la sua presenza è un elemento sfavorevole poiché è il marcatore di una replicazione virale attiva.

Gli anticorpi anti-HBe rappresentano un elemento prognostico favorevole, in particolare se compaiono precocemente.

Smaltimento dei rifiuti

Smaltire i reattivi utilizzati e i materiali monouso contaminati seguendo le procedure relative ai prodotti infettivi o potenzialmente infettivi.

È responsabilità di ogni laboratorio gestire i rifiuti e gli effluenti prodotti a seconda della loro natura e della loro pericolosità ed assicurarne (o farne assicurare) il trattamento e lo smaltimento conformemente alla legislazione vigente.

Bibliografia

1. CHISARI F., FERRARI C. Hepatitis B virus immunopathology, Springer Semin Immunopathol, 1995, 17, 261-281.
2. ZUCKERMAN A.J., THOMAS H.C. Viral Hepatitis. Scientific Basis and Clinical Management, Churchill Livingstone, 1993, 396.
3. AHTONE J., MAYNARD J.E. Laboratory Diagnosis of Hepatitis B, *JAMA*, 1983, 249: 2067-2069.
4. HEIJTINK R.A., SNOBL J., KRUIJNING J., KERKHOFF-LOS C., DE MAN R.A., JANSSEN H.L.A., SCHALM S.W. Quantitative measurement of HBe Ag in chronic hepatitis B. *Journal of Medical Virology*, 1995, 47, 245-250.
5. CHEN D.S., LAI M.Y., LEE S.C., *et al*: Serum HBsAg, HBeAg, anti-HBe and Hepatitis B virus DNA in Asymptomatic Carriers in Taiwan. *J. Med. Virol.*, 1986, 19: 87-94.
6. BONINO F., BRUNETTO M.R. Hepatitis B Virus Precore Mutants, *Viral Hepatitis and Liver Disease*, 1994, 256-260.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Fabbricante
	Limite di temperatura
	Utilizzare entro la data
	Codice del lotto
	Consultare le Istruzioni per l'uso

Simbolo	Significato
	Contenuto sufficiente per "n" prove
	Data di fabbricazione

Limiti della garanzia

bioMérieux garantisce le performance del prodotto per l'uso previsto dichiarato a condizione che tutte le procedure per l'utilizzazione, lo stoccaggio e la manipolazione, la conservazione (se applicabile) e le precauzioni siano rigorosamente seguite come descritto nelle istruzioni per l'uso (IFU).

Ad eccezione di quanto espressamente stabilito sopra, bioMérieux declina tutte le garanzie, comprese eventuali garanzie implicite di commerciabilità e di idoneità per un particolare scopo o uso, e declina ogni responsabilità, diretta, indiretta o consequenziale, per qualsiasi utilizzazione del reagente, del software, dello strumento e dei materiali di consumo (il "Sistema") diversa da quanto riportato nelle IFU.

Storico delle revisioni

Legenda dei tipi di modifica

N/A	Non applicabile (prima versione)
Correzione	Correzione di anomalie documentali
Modifica tecnica	Aggiunta, modifica e/o rimozione di informazioni relative al prodotto
Amministrativa	Implementazione di modifiche non tecniche rilevanti per l'utilizzatore

Nota: Le modifiche minori di tipografia, di grammatica e di impaginazione non sono riportate nello storico delle revisioni.

Data di emissione	Codice del documento	Tipo di modifica	Riepilogo delle modifiche
2016/04	09078L	Modifica tecnica	Contenuto della confezione (30 test) - Ricostituzione dei reagenti
2019-10	054827-01	Amministrativa	Limiti della garanzia
		Modifica tecnica	Contenuto della confezione (30 test) Avvertenze e precauzioni
2020-10	054827-02	Amministrativa	Modifiche della formattazione e della formulazione.
		Modifica tecnica	Smaltimento dei rifiuti
2022-09	054827-03	Modifica tecnica	Contenuto della confezione (30 test) - Ricostituzione dei reagenti

BIOMÉRIEUX, il logo BIOMÉRIEUX, SPR e VIDAS sono marchi utilizzati, depositati e/o registrati di proprietà di bioMérieux o di una delle sue filiali o di una delle sue società.

CLSI è un marchio di proprietà di Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

Gli altri marchi e nomi di prodotti menzionati appartengono ai loro rispettivi detentori.

