

# HBeAg

Antigénio "e" da hepatite B

11820583 122

100 testes

Português

## Função

Imunoensaio para a determinação qualitativa in vitro do antigénio "e" da hepatite B (HBeAg) em soro e plasma humanos.

O imunoensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou "ECLIA") foi concebido para ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

## Características<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9</sup>

O antigénio "e" da hepatite B (HBeAg) é um produto do gene pre-C/C que foi encontrado nos hepatócitos durante a proliferação do vírus da hepatite B. A seguir à proteólise, a proteína HBe é segregada em forma não particulada (com dimensões que variam entre 16 kD e 20 kD) para o soro.

O HBeAg aparece no soro durante infecções agudas por HBV, sendo detectável durante um curto período de tempo (dias a semanas). A detecção do HBeAg está em geral associada à presença de grandes quantidades de vírus. Na fase de recuperação posterior à hepatite B aguda, o HBeAg é o primeiro marcador serológico negativo e substituído pelo anticorpo correspondente (anti-HBe). Podem ocorrer infecções por HBV persistentes e prolongadas sem que o HBeAg seja detectável. Nestes casos, a demonstração do anti-HBe é indicadora da presença de mutantes do codon de stop do pre-core que podem estar associados a quantidades de vírus elevadas, baixas ou não detectáveis.

O teste HBeAg é, pois, útil em associação com o teste dos anticorpos anti-HBe para monitorizar a evolução da infecção por HBV.

O teste Elecsys HBeAg utiliza anticorpos monoclonais (ratinho) anti-HBe para a determinação do HBeAg.

## Princípio do teste

Técnica de sandwich. Duração total do ensaio: 18 minutos.

- 1ª incubação: O antigénio HBe da amostra (35 µl), um anticorpo monoclonal específico de HBeAg biotinilado e um anticorpo monoclonal específico de HBeAg marcado com complexo de ruténio<sup>a</sup> reagem entre si e formam um complexo sandwich.
- 2ª incubação: Após a incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da estreptavidina.
- A mistura de reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados automaticamente pelo software Elecsys comparando o sinal de electroquimioluminescência obtido do produto de reacção da amostra com o sinal do valor de cutoff anteriormente obtido pela calibração do ensaio HBeAg.

a) Complexo Tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)

## Reagentes - soluções de trabalho

Dispositivo de reagentes Elecsys HBeAg, Ref. 11820583 - 100 testes

M	Micropartículas revestidas de estreptavidina (tampa transparente), 1 frasco, 6,5 ml: Micropartículas revestidas de estreptavidina, 0,72 mg/ml, capacidade de fixação: 470 ng biotina/mg micropartículas; conservante.
R1	Anticorpo anti-HBeAg-biotina (tampa cinzenta), 1 frasco, 12 ml: Anticorpo monoclonal biotinilado anti-HBeAg (ratinho) > 0,8 mg/l; tampão TRIS 50 mmol/l, pH 7,4; conservante.
R2	Anticorpo anti-HBeAg-Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> (tampa preta), 1 frasco, 12 ml: Anticorpo monoclonal anti-HBeAg (ratinho) marcado com complexo de ruténio 0,3 mg/l; tampão TRIS 50 mmol/l, pH 7,4; conservante.
Cal1	Calibrador negativo 1 (tampa branca), 2 frascos, cada com 1,0 ml: Soro humano; conservante.
Cal2	Calibrador positivo 2 (tampa preta), 2 frascos, cada com 1,0 ml: HBeAg (E. coli, rDNA) ≥ 3,5 U PEI/ml <sup>b</sup> em tampão HEPES <sup>c</sup> , pH 7,4; conservante.

b) Unidades do Paul-Ehrlich-Institut

c) HEPES = ácido [4-(2-hidroxi-etil)-piperazino]-etanossulfónico

cobas

## Precauções e advertências

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Respeite as precauções normais de manuseamento de reagentes laboratoriais. Elimine todos os resíduos de acordo com os regulamentos locais.

Ficha de segurança fornecida a pedido, para uso profissional.

Todo o material de origem humana deve ser considerado como potencialmente infeccioso. Todos os produtos derivados de sangue foram preparados exclusivamente com sangue de doadores testados individualmente e que, segundo os métodos aprovados pela FDA, estão isentos de HBsAg e de anticorpos para o HCV e HIV.

No entanto, como nenhum método pode excluir com total segurança o risco de potencial infecção, o material deve ser manipulado com o mesmo cuidado que é utilizado no caso das amostras dos pacientes. Em caso de exposição, cumpra as instruções das autoridades de saúde competentes.<sup>10,11</sup>

Os reagentes não podem ser utilizados após o fim do prazo de validade indicado.

**Evite a formação de espuma com todos os reagentes e com todo o tipo de amostras (amostras de pacientes, calibradores e controlos).**

## Preparação dos reagentes

Os reagentes do dispositivo estão prontos a ser utilizados e são fornecidos em frascos compatíveis com o sistema.

**Analizador Elecsys 2010:** Os calibradores Cal1 e Cal2 só devem permanecer nos analisadores durante a calibração a 20-25°C. Após a sua utilização, feche os frascos logo que possível e guarde-os a 2-8°C. Certifique-se de que nenhuma solução de calibração fica na tampa "snap-cap" aberta. Devido a possíveis efeitos de evaporação, não realize mais de 5 procedimentos de calibração por cada conjunto de calibradores.

**Analizador MODULAR ANALYTICS E170:** Se não for necessário o volume total para a calibração no analisador, transfira alíquotas dos calibradores prontos a utilizar para os frascos vazios, munidos de tampa "snap-cap" (CalSet Vials). Coloque os rótulos fornecidos nestes frascos adicionais. Conserve as alíquotas para posterior utilização a 2-8°C.

Efectue **apenas um** procedimento de calibração por alíquota.

Toda a informação necessária ao correcto funcionamento é introduzida no analisador através dos respectivos códigos de barras do reagente.

## Conservação e estabilidade

Conservar a 2-8°C.

Coloque o dispositivo de reagentes Elecsys HBeAg (M, R1, R2) **na vertical** para assegurar a total disponibilidade das micropartículas durante a mistura automática, antes da utilização.

Estabilidade:

em frasco fechado a 2-8°C:	até ao fim do prazo de validade indicado
M, R1, R2 após abertura a 2-8°C: no analisador	8 semanas
MODULAR ANALYTICS E170: no analisador Elecsys 2010:	8 semanas
Cal1, Cal2 após abertura a 2-8°C: no Elecsys 2010 a 20-25°C:	até 5 horas
no analisador	Utilize uma única vez!
MODULAR ANALYTICS E170:	

Guarde os calibradores **na vertical!** Evite que fiquem resíduos da solução de calibração na tampa "snap-cap" aberta.

## Colheita e preparação das amostras

Apenas as amostras indicadas em seguida foram testadas em quantidade suficiente e consideradas aceitáveis.

O soro é colhido utilizando tubos de amostra padrão.

Plasma tratado com heparina de sódio, EDTA-K<sub>3</sub> e citrato de sódio.

Critério: atribuição correcta de amostras negativas e positivas.

Estabilidade: 7 dias a 2-8°C, 3 meses a -20°C. As amostras podem ser congeladas 6 vezes.

Os diferentes tipos de amostras incluídos na lista foram testados com base numa selecção de tubos de colheita de amostras comercialmente disponíveis na altura em que o teste foi realizado, i.e. nem todos os tubos dos diferentes fabricantes disponíveis no mercado foram testados. Os sistemas



## Antigénio "e" da hepatite B

de colheita de amostras de diferentes fabricantes podem, por sua vez, conter materiais diferentes que, em alguns casos, podem afectar os resultados dos testes. Ao utilizar amostras em tubos primários (sistemas de colheita de amostras), consulte as instruções do fabricante dos tubos.

As amostras congeladas, as amostras que contêm precipitado e as amostras que têm de ser analisadas repetidamente devem ser centrifugadas antes da realização do ensaio. Não utilize amostras inactivadas por calor. Não utilize amostras e controlos estabilizados com azida.

Antes da determinação, certifique-se de que as amostras dos pacientes, os calibradores e os controlos estão à temperatura ambiente (20-25°C). Devido a possíveis efeitos de evaporação, as amostras e os calibradores colocados no analisador deverão ser analisados no prazo de duas horas.

### Materiais fornecidos

Consulte a secção "Reagentes - soluções de trabalho".

- 2 x 6 rótulos para frascos

### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Ref. 11876376, Elecsys PreciControl HBeAg, for 8 x 1,3 ml cada de PreciControl HBeAg 1 e 2
- Ref. 11732277, Elecsys Diluent Universal, 2 x 18 ml de diluente de amostras ou Ref. 03183971, Elecsys Diluent Universal, 2 x 40 ml de diluente de amostras
- Ref. 11776576, Elecsys CalSet Vials, 2 x 56 frascos vazios com tampas snap-cap
- Equipamento normal de laboratório
- Analisador Elecsys 2010 ou MODULAR ANALYTICS E170

Acessórios para o analisador Elecsys 2010:

- Ref. 11662988, Elecsys ProCell, 6 x 380 ml de tampão do sistema
- Ref. 11662970, Elecsys CleanCell, 6 x 380 ml de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 11930346, Elecsys SysWash, 1 x 500 ml de aditivo para água de lavagem
- Ref. 11933159, Adaptador para SysClean
- Ref. 11706802, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 de cuvetes de reacção
- Ref. 11706799, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 pontas de pipeta

Acessórios para o analisador MODULAR ANALYTICS E170:

- Ref. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l de tampão do sistema
- Ref. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 03023141, PC/CC-Cups, 50 cuvetes para pré-aquecimento do ProCell M e do CleanCell M antes de usar
- Ref. 03005712, ProbeWash M, 12 x 70 ml de solução de limpeza para finalização da análise e lavagem durante a mudança de reagentes
- Ref. 12102137, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 tabuleiros x 84 cuvetes de reacção ou pontas de pipeta, sacos para lixo
- Ref. 03023150, Wasteliner, sacos para lixo
- Ref. 03027651, SysClean Adapter M

Acessórios para todos os analisadores:

- Ref. 11298500, Elecsys SysClean, 5 x 100 ml de solução de limpeza do sistema

### Realização do ensaio

Para assegurar a correcta execução do ensaio, é importante cumprir as instruções fornecidas neste documento para o analisador utilizado. Consulte o manual do operador apropriado para obter informações mais específicas sobre o ensaio feito no analisador.

A ressuspensão das micropartículas é efectuada automaticamente antes de usar. Introduza os parâmetros específicos do teste através dos códigos de barras dos reagentes. Se, em algum caso excepcional, não for possível ler o código de barras, o código numérico de 15 dígitos deverá ser introduzido manualmente.

**Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010:** Eleve a temperatura do reagente refrigerado até aprox. 20°C e coloque-os no disco dos reagentes (20°C) do analisador. Evite a formação de espuma. O sistema regula **automaticamente** a temperatura dos reagentes e a abertura/fecho dos frascos.

Coloque os calibradores Cal1 e Cal2 na zona de amostras do analisador. Mantenha-os abertos apenas durante a calibração. Todas as informações necessárias para a calibração do teste estão codificadas no código de barras dos rótulos dos frascos do calibrador, sendo lidas automaticamente pelo analisador. Após a realização da calibração, conserve o Cal1 e Cal2 a 2-8°C ou elimine-os (analisador MODULAR ANALYTICS E170).

### Calibração

**Rastreabilidade:** Este método foi padronizado contra o "HBe-Reference Antigen 82 (HBeAg)" do Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Alemanha). As unidades indicadas (U/ml) são unidades do Instituto Paul-Ehrlich.

Uma calibração por lote de reagentes utilizando o Elecsys HBeAg Cal 1, Cal 2 e reagente recém-colocado (i.e. dentro de um máximo de 24 horas após ter sido registado no analisador). Devem ser feitas as seguintes recalibrações:

**Frequência das calibrações:**

- passado 1 mês (28 dias) quando se utiliza o mesmo lote de reagentes
- passados 7 dias (quando se utiliza o mesmo dispositivo de reagentes no analisador)
- conforme necessário: p. ex. em resultados de ensaios de controlo de qualidade com Elecsys PreciControl HBeAg fora dos limites especificados,
- com mais frequência, quando tal se mostra necessário em conformidade com os regulamentos em vigor

O software do analisador verifica automaticamente a validade da curva e alerta para eventuais desvios.

Intervalo dos sinais de electroquimioluminescência (contagens) para os calibradores:

Calibrador negativo (Cal1): 400-2.000, calibrador positivo (Cal2): 20.000-100.000.

### Controlo de qualidade

Para o controlo de qualidade, utilize o Elecsys PreciControl HBeAg. Efectuar os controlos 1 e 2 como determinações simples, pelo menos uma vez em cada 24 horas quando o teste estiver a ser utilizado, uma vez por dispositivo de reagentes e a seguir a cada calibração. Os intervalos e limites de controlo devem ser adaptados às exigências específicas de cada laboratório. Os valores obtidos devem situar-se dentro dos limites definidos. Cada laboratório deverá estabelecer medidas correctivas a tomar no caso de os valores se situarem fora dos limites. Se necessário, repetir as amostras envolvidas.

### Cálculo

O analisador calcula automaticamente o valor de cutoff com base na determinação do Cal1 e Cal2. O resultado de uma amostra é indicado como reactivo ou não reactivo bem como sob a forma de um índice de cutoff (sinal da amostra/cutoff).

### Interpretação dos resultados

As amostras com um índice de cutoff < 1,0 são não reactivas no teste Elecsys HBeAg. Estas amostras são consideradas negativas para o HBeAg.

As amostras com um índice de cutoff ≥ 1,0 são reactivas no teste Elecsys HBeAg. Estas amostras são consideradas positivas para o HBeAg.

### Limitações – interferências

O ensaio não é afectado pela icterícia (bilirrubina < 428 µmol/l ou < 25 mg/dl), hemólise (Hb < 0,99 mmol/l ou < 1,6 g/dl), lipemia (Intralipid < 1.500 mg/dl) e biotina < 164 nmol/l ou < 40 ng/ml.

Critério: atribuição correcta de amostras negativas e positivas.

Nos doentes em tratamento com doses elevadas de biotina (i.e. > 5 mg/dia), as amostras só deverão ser colhidas no mínimo 8 horas após a última administração de biotina.

Não foi observada interferência do factor reumatóide até uma concentração de 2.400 UI/ml.

O efeito "high-dose hook" não leva a resultados falso-negativos no ensaio Elecsys HBeAg.

Foram efectuados testes in vitro com 19 fármacos frequentemente utilizados. Não se encontrou qualquer interferência com o ensaio.

Tal como acontece com todos os testes que contêm anticorpos monoclonais de rato, este teste pode produzir resultados errados em amostras colhidas em pacientes tratados com este tipo de anticorpos ou que os receberam para fins de diagnóstico.



# HBeAg

## Antigénio "e" da hepatite B

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para o ruténio.

O teste contém aditivos que minimizam estes efeitos.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos anti-estreptavidina.

**Analizador MODULAR ANALYTICS E170:** No caso de efectuar os testes Elecsys HBsAg/Anti-HBs e HBeAg/Anti-HBe em conjunto, certifique-se que estes ensaios estão registados na secção "Special Wash" do software e que o "Step 1" (wash execute) está verificado. Por favor, consulte o manual do operador MODULAR ANALYTICS E, capítulo 3, descrição do software, parte B, Utilidades.

Quando o objectivo é o diagnóstico, os resultados devem ser sempre interpretados em conjunto com a anamnese do paciente, o exame clínico e outros resultados.

### Diluição

As amostras podem ser diluídas com Elecsys Diluent Universal ou soro humano negativo para HBV.

### Dados específicos sobre o desempenho

São apresentados a seguir dados representativos do desempenho nos analisadores. Os resultados podem diferir de laboratório para laboratório.

### Precisão

A reprodutibilidade foi determinada com reagentes Elecsys, soros humanos e controlos (intra-ensaio  $n = 21$ , inter-ensaio  $n = 10$ ). A precisão total no analisador MODULAR ANALYTICS E170 foi determinada utilizando um protocolo modificado (EP5-A) do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 vezes por dia durante 10 dias ( $n = 60$ ). Obtiveram-se os seguintes resultados:

Elecsys 2010	Precisão intra-ensaio			Precisão inter-ensaio		
	Média ICO <sup>d</sup>	DP ICO	CV %	Média ICO	DP ICO	CV %
Amostra						
SH <sup>e</sup> , negativo	0,12	0,005	4,0	0,14	0,01	4,0
SH, negativo	-	-	-	0,50	0,01	1,7
SH, positivo	33,0	1,32	4,0	-	-	-
SH, positivo	235	6,63	2,8	64,8	3,17	4,9
PreciControl HBeAg 1	0,14	0,01	6,6	0,13	0,01	4,5
PreciControl HBeAg 2	10,6	0,16	1,6	10,2	0,17	1,7

d) ICO = índice de cutoff

e) SH = soro humano

MODULAR ANALYTICS E170	Precisão intra-ensaio			Precisão total		
	Média ICO	DP ICO	CV %	Média ICO	DP ICO	CV %
Amostra						
SH, negativo	0,11	0,006	5,1	0,15	0,017	11,0
SH, fraco positivo	13,3	0,177	1,3	15,1	0,655	4,3
SH, positivo	1880	22,25	1,2	1393	69,76	5,0
PreciControl HBeAg 1	0,10	0,007	6,4	0,12	0,012	10,2
PreciControl HBeAg 2	12,8	0,321	2,5	12,5	0,511	4,1

### Sensibilidade analítica (limite de detecção inferior)

$\leq 0,30$  U IPE/ml

A sensibilidade indicada foi determinada através da leitura da concentração de HBeAg correspondente ao sinal do valor de cutoff das curvas padrão obtidas com diluições sequenciais de padrões de HBeAg e de soro humano positivo para o HBeAg em soro humano negativo para o HBV.

Amostra	Padrão PEI HBeAg 82		Soros humanos					
	ICO	U/ml	Soro 1		Soro 2		Soro 3	
	ICO	U/ml	ICO	U/ml	ICO	U/ml	ICO	U/ml
1	5,87	1,25	5,67	1,38	6,71	1,67	4,74	1,14
2	3,07	0,63	3,00	0,69	3,34	0,84	2,40	0,57
3	1,59	0,31	1,56	0,34	1,74	0,42	1,24	0,28
4	0,88	0,16	0,82	0,17	0,90	0,21	0,70	0,14
Sensibilidade de Cutoff	0,19 U/ml		0,22 U/ml		0,22 U/ml		0,20 U/ml	

### Especificidade analítica

Não foram observadas reacções cruzadas com HAV, HCV, CMV, EBV, HSV, HIV 1+2, HTLV, E. coli, Toxoplasma gondii, Rubéola e Treponema pallidum. Foram efectuadas determinações para cada um dos patogénios referidos acima, utilizando  $\geq 8$  amostras de soro ou plasma que apresentavam resultado positivo em relação aos anticorpos dos patogénios acima referidos ou que continham auto-anticorpos (AMA, SLE).

### Sensibilidade clínica

Das 334 amostras de pacientes com infecções agudas e persistentes por HBV, 132 foram reactivas e 190 não reactivas, tanto com o teste Elecsys HBeAg como com os testes comparativos. Só se verificaram resultados discrepantes em amostras fracamente reactivas (7 amostras reactivas e 5 amostras não reactivas com o teste Elecsys HBeAg). 61 amostras de um painel comercial foram todas confirmadas como reactivas com ambos os testes.

### Especificidade clínica

Para determinar a especificidade, analisaram-se amostras de dadores de sangue escolhidas aleatoriamente.

Grupo	Quantidade testada	Cantidade reactiva	Especificidade (%)
Dadores de sangue	1002	0	100

239 de 242 amostras de doentes hospitalizados, grávidas e doentes dialisados foram não reactivas com o teste Elecsys HBeAg; com um teste de comparação detectaram-se 222 amostras não reactivas em 242 amostras. 2 das amostras reactivas com ambos os testes e uma amostra reactiva com o teste Elecsys HBeAg, mas não com o teste comparativo, foram consideradas positivas quanto a HBsAg. 18 amostras não reactivas com o teste Elecsys HBeAg e fracamente reactivas com o teste comparativo foram negativas na determinação de HBsAg.

### Bibliografia

- Bruss V, et al. Formation of transmembranous hepatitis B e-antigen by translational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 1988;163:268-275.
- Wang J, et al. Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol* 1991;65:5080-5083.
- Milich DR, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1990;87:6599-6603.
- Brunetto MR, et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990;10:258-261.
- Carman WE, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* ii 1989;588-591.
- Kuhns MC, et al. Quantitation of hepatitis B virus DNA by solution hybridization: comparison with DNA polymerase and hepatitis B e antigen during antiviral therapy. *J Med Virol* 1989;27:274-281.
- Frösner G. *Moderne Hepatitisdiagnostik*. Kilian Verlag, Marburg 1996.
- Hollinger FB, Hepatitis B Virus. In: Fields BN, Knipe DM (eds), *Virology* ed. 2nd Raven Press New York 1990;2:2171-2236.
- Hoofnagle JH. Type B Hepatitis: *Virology, Serology and Clinical Course*. Seminars in Liver Disease 1981;1:7-14.
- Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). *Fed. Register*. July 1, 2001;17:260-273.
- Directiva do Conselho (2000/54/CEE). *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* Nº. L262 de 17 de Out., 2000.

### NOTA PARA O COMPRADOR: LIMITED LICENSE

A aquisição deste produto permite que o comprador o utilize exclusivamente para diagnóstico in vitro humano pela tecnologia ECL. Nenhuma patente geral ou outra licença de qualquer tipo, à excepção deste direito específico de uso de compra, é concedida por este meio. Este produto não pode ser usado pelo comprador na pesquisa/desenvolvimento em ciências da vida, em testes de auto-diagnóstico, na identificação/desenvolvimento de drogas ou em qualquer utilização ou teste veterinário, alimentar, de água ou ambiental.

Para mais informações, consulte o manual do operador adequado ao analisador, as folhas de aplicação respectivas, a informação do produto e os folhetos informativos de todos os componentes necessários.




# HBeAg

Antigénio "e" da hepatite B

cobas

As alterações ou os acréscimos significativos estão assinalados por uma barra de alteração na margem. As alterações dos parâmetros de teste do código de barras do reagente que já foram introduzidas devem ser editadas manualmente.  
©2005 Roche Diagnostics

CE 0123

 Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

