

# **cobas<sup>®</sup> HEV**

---

## **Teste de ácidos nucleicos para utilização com os cobas<sup>®</sup> 6800/8800 Systems**

Para diagnóstico in vitro

<b>cobas<sup>®</sup> HEV – 96</b>	P/N: 07001045190
<b>cobas<sup>®</sup> HEV Control Kit</b>	P/N: 07001100190
<b>cobas<sup>®</sup> NHP Negative Control Kit</b>	P/N: 07002220190 ou 09051554190
<b>cobas omni MGP Reagent</b>	P/N: 06997546190
<b>cobas omni Specimen Diluent</b>	P/N: 06997511190
<b>cobas omni Lysis Reagent</b>	P/N: 06997538190
<b>cobas omni Wash Reagent</b>	P/N: 06997503190

# Índice

<b>Utilização prevista .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumo e explicação do teste .....</b>	<b>4</b>
<b>Reagentes e materiais .....</b>	<b>7</b>
Reagentes e controlos do <b>cobas® HEV</b> .....	7
Reagentes <b>cobas omni</b> para preparação da amostra.....	10
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes .....	12
Materiais adicionais necessários.....	13
Equipamentos e software necessários.....	13
<b>Precauções e requisitos de manuseamento .....</b>	<b>14</b>
Advertências e precauções .....	14
Manuseamento de reagentes.....	14
Boas práticas de laboratório.....	15
<b>Colheita, transporte, armazenamento e pooling de amostras.....</b>	<b>15</b>
Amostras de dadores vivos.....	15
<b>Instruções de utilização .....</b>	<b>19</b>
Pooling e pipetagem de amostras automáticos (opcional) .....	19
Notas do procedimento .....	19
Corrida de um teste <b>cobas® HEV</b> .....	19
<b>Resultados .....</b>	<b>20</b>
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	20
Interpretação dos resultados.....	20
Repetição de testes de amostras individuais.....	20
Limitações do procedimento .....	21

---

<b>Avaliação do desempenho não clínico .....</b>	<b>22</b>
Características principais de desempenho - Amostras de doadores vivos.....	22
Limite de deteção (LoD) .....	22
Reprodutibilidade .....	23
Verificação de genótipos.....	24
Especificidade analítica .....	25
Especificidade analítica – substâncias interferentes.....	26
Correlação.....	27
Falha global do sistema .....	27
<b>Informações adicionais .....</b>	<b>28</b>
Características principais do teste.....	28
Símbolos .....	29
Apoio técnico.....	30
Fabricante.....	30
Marcas comerciais e patentes .....	30
Direitos de autor.....	30
Bibliografia .....	31
Revisão do documento .....	34

## Utilização prevista

O teste cobas® HEV para utilização nos cobas® 6800 e cobas® 8800 Systems é um teste qualitativo de amplificação de ácidos nucleicos in vitro para a deteção direta do ARN do vírus da hepatite E (HEV) (genótipos 1 a 4) em plasma humano.

Este teste destina-se a ser utilizado como um teste de rastreio de amostras de dadores para a deteção de ARN do HEV em amostras de plasma de dadores individuais humanos, incluindo dadores de sangue total, componentes sanguíneos (glóbulos vermelhos, plaquetas e plasma) e outros dadores vivos. O plasma de todos os dadores pode ser rastreado como amostras individuais. Para dádivas de sangue total e componentes sanguíneos, as amostras de plasma podem ser testadas individualmente ou o plasma pode ser testado em pools constituídas por alíquotas de amostras individuais.

Este teste não se destina a ser utilizado em amostras de sangue do cordão umbilical.

Este teste não se destina a ser utilizado como auxiliar no diagnóstico de HEV.

## Resumo e explicação do teste

### Fundamentos: Rastreio do sangue para infeções virais transmitidas por transfusões

O vírus da Hepatite E (HEV), um vírus ARN pequeno, não envelopado, que pertence ao género Hepevirus (família Hepeviridae), é um agente patogénico humano com distribuição no mundo inteiro.<sup>1</sup> O vírus é composto por uma partícula icosaédrica que contém um genoma de ARN de cadeia simples, sentido positivo de 7,2 kb.<sup>2</sup> Quatro genótipos principais do HEV, representando um único serotipo, foram identificados em humanos e animais, incluindo suínos domésticos, javalis selvagens, veados e roedores.<sup>1,3,4</sup>

A caracterização molecular de várias estirpes do HEV que circulam entre humanos e animais levou ao reconhecimento de quatro genótipos principais.<sup>1</sup> O genótipo 1, que ocorre principalmente na Ásia, e o genótipo 2, que ocorre em África e no México, estão limitados a humanos e transmitem-se através de água contaminada nos países em desenvolvimento.<sup>1,5</sup> Os genótipos 3 e 4 infetam humanos, suínos e outras espécies de mamíferos e causam casos esporádicos de HEV autóctone, quer nos países em desenvolvimento, quer nos países desenvolvidos.<sup>6</sup> O genótipo 3 é o único genótipo identificado atualmente como causa de infeção autóctone nos EUA<sup>7</sup> e está na origem da grande maioria das infeções na Europa, Nova Zelândia e América do Norte.<sup>1,8-12</sup> Os genótipos 3 e 4 estão ambos presentes no Japão.<sup>1</sup> Os genótipos 1, 3 e 4 do HEV são endémicos da China.<sup>1</sup> A Hepatite E aguda é mais comum do que a Hepatite A na China, França, Reino Unido e Japão.<sup>1</sup>

O principal modo de transmissão do HEV é a via fecal-oral através de água potável contaminada,<sup>1</sup> embora tenham sido reportadas a transmissão por via alimentar pelo consumo de carne de suíno, carne de miudezas ou marisco mal cozidos ou crus, bem como a transmissão zoonótica em consequência do contacto com suínos e animais domésticos ou selvagens infetados.<sup>7,13</sup> A gama total de reservatórios do HEV é desconhecida.<sup>1</sup>

A infeção pelo HEV causa normalmente uma infeção ligeira ou subclínica com uma doença auto-limitativa que dura entre 4 a 6 semanas.<sup>1,8-11,17,18</sup> Os sintomas são muito semelhantes aos de outras formas de infeção pelo vírus da hepatite, particularmente da Hepatite A, com fadiga, icterícia, febre, mal-estar, náuseas, vómitos, anorexia e dores abdominais.<sup>1</sup> Os doentes apresentam frequentemente níveis elevados de alanina transaminase (~1500 UI/L) e muito apresentam icterícia.<sup>1</sup> As infeções pelo HEV podem ocasionalmente ser mais graves e resultar em falha hepática fulminante, particularmente nas mulheres grávidas, em que a taxa de mortalidade pode chegar aos 10% a 25%, em bebés e crianças com idade inferior a 2 anos, em indivíduos com doença hepática subjacente (por exemplo, cirrose) e em pessoas imunocomprometidas.<sup>1,19-23</sup> Anualmente, a infeção pelo HEV causa mais de 3 milhões de casos sintomáticos de Hepatite E aguda no mundo inteiro, com um resultado de aproximadamente 70 000 mortes anuais.<sup>24</sup> A taxa de mortalidade global varia entre 0,2% e 4,0%.<sup>1,25</sup> A maioria das mortes por infeção pelo genótipo 3 (HEV3) resulta de falha hepática aguda ou subaguda em pacientes com

doença hepática pré-existente, como doença hepática relacionada com o álcool.<sup>1,22,26,27</sup>

O HEV3 causa infeção crónica, incluindo até 60% de indivíduos imunossuprimidos infetados, dos quais cerca de 10% desenvolvem cirrose.<sup>1</sup> A infeção crónica define-se como ARN do HEV persistente no soro ou nas fezes durante 6 meses ou mais.<sup>1</sup> A maioria dos casos ocorre em recetores de transplantes de órgãos sólidos, embora tenham sido reportadas também infeções em indivíduos com distúrbios hematológicos que recebem transfusões e quimioterapia, e em alguns indivíduos com HIV.<sup>28-34</sup> Não foi reportada infeção crónica com HEV1 ou HEV2.<sup>1</sup>

A infeção por HEV foi também associada a síndromes neurológicas, incluindo a síndrome de Guillain-Barré, paralisia de Bell, mielite transversa aguda, meningoencefalite aguda, ataxia e encefalite; os sintomas neurológicos resolvem-se normalmente em pacientes que depuram o vírus.<sup>1</sup> Glomerulonefrite membranoproliferativa e membranosa, pancreatite aguda e trombocitopenia grave foram reportadas durante a infeção aguda por HEV, embora não tenham sido estabelecidos os mecanismos patofisiológicos e a relação causal, caso exista.<sup>1</sup> A terapia com ribavirina mostrou ser um tratamento eficaz para a infeção aguda grave pelo HEV3, e os recetores de transplantes com infeção crónica pelo HEV são tratados normalmente com uma redução da imunossupressão (especialmente fármacos com células T alvo), interferon- $\alpha$  e ribavirina.<sup>1</sup>

### Fundamentos dos testes de NAT

Tal como com outros causadores de hepatites, o HEV pode ser transmitido através de transfusão de sangue ou produtos sanguíneos. A Hepatite E pós-transfusional foi reportada em muitos países.<sup>1,34-39</sup> Foi reportado que a taxa de seropositividade para HEV entre os dadores em todo o mundo varia entre 0,4% e 20,6%.<sup>40-48</sup> As infeções assintomáticas pelo HEV ocorrem a uma taxa elevada em todo o mundo e, devido à prevalência do vírus, muitos dadores de sangue podem estar infetados e transmitir o vírus a recetores dos seus produtos sanguíneos. Por exemplo, um estudo recente de dadores de sangue britânicos mostrou que 11% dos soros de dadores eram reativos para HEV IgG, indicando infeção anterior, e 0,7% dos soros de dadores eram reativos para IgM, indicando infeção aguda.<sup>46</sup> Além disso, 0,7% dos minipools de plasma de dadores ingleses continham ARN do HEV.<sup>47</sup> Um estudo de dadores de sangue chineses revelou resultados semelhantes: 32,6% dos soros de dadores eram reativos para IgG; 0,94% dos soros de dadores eram reativos para IgM; e 0,07% das dádivas demonstraram viremia de HEV.<sup>48</sup> Uma investigação global de pools de plasma fracionado reportou que 10% das pools testadas eram positivas para ARN do HEV.<sup>48,49</sup>

### Explicação do teste

O teste **cobas**® HEV é um teste qualitativo de PCR para a deteção de ARN do HEV, que é executado no **cobas**® 6800 System e no **cobas**® 8800 System. O teste **cobas**® HEV permite a deteção simultânea do ARN do HEV e do controlo interno, num teste único, de uma dádiva infetada testada individualmente ou de uma pool de plasma de dádivas individuais.

### Princípios do procedimento

O teste **cobas**® HEV baseia-se em tecnologia de PCR em tempo real num sistema totalmente automático de preparação de amostras (extração e purificação de ácidos nucleicos), amplificação por PCR e deteção. Os **cobas**® 6800/8800 Systems são constituídos pelo módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. A gestão automática de dados é executada pelo software **cobas**® 6800/8800, que atribui resultados a todos os testes, na forma de não-reativos, reativos ou inválidos. Os resultados podem ser examinados diretamente no ecrã do sistema e impressos em forma de relatório, ou podem ser enviados para um sistema de gestão de informação laboratorial (LIMS) ou outro sistema de gestão de resultados.

As amostras podem ser testadas individualmente ou testadas em pools constituídas por várias amostras. Caso se execute

pooling, o equipamento **cobas p 680** ou o software **cobas® Synergy** com o Hamilton MICROLAB® STAR IVD (**cobas® Synergy Core**) poderão ser utilizados opcionalmente num passo pré-analítico.

Os ácidos nucleicos da amostra e o Armored RNA do controlo interno (IC) que é adicionado (que serve como controlo do processo de preparação da amostra e de amplificação/deteção) são extraídos simultaneamente. Adicionalmente, o teste utiliza dois controlos do kit: um controlo positivo e um controlo negativo. O ácido nucleico viral é libertado ao adicionar proteinase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos libertados ligam-se à superfície de sílica das partículas de vidro magnéticas adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteína desnaturada, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR (como a hemoglobina), são removidas com os posteriores passos com reagente de lavagem e o ácido nucleico purificado é eluído das partículas de vidro com tampão de eluição a alta temperatura.

A amplificação seletiva do ácido nucleico alvo da amostra de dador é conseguida através da utilização de primers diretos e reversos específicos do vírus que são seleccionados de regiões altamente conservadas do ácido nucleico viral. É utilizada uma enzima de polimerase do ADN termoestável para a transcrição reversa e para a amplificação. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no ADN acabado de sintetizar (amplicon).<sup>50-52</sup> Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são destruídos pela enzima AmpErase [uracil-N-glicosilase], que é incluída na mistura principal da PCR, quando aquecida no primeiro passo do ciclo térmico. No entanto, o amplicon acabado de formar não é destruído, uma vez que a enzima AmpErase fica inativada quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas® HEV** contém sondas de deteção específicas para o ácido nucleico do HEV e do IC. As sondas de deteção específicas do HEV e do IC estão marcadas com um de dois corantes fluorescentes únicos, que atua como um sinalizador. Cada sonda tem também um segundo corante, que atua como um supressor. Os dois corantes sinalizadores são medidos a comprimentos de onda definidos, permitindo assim a deteção e discriminação do alvo amplificado do HEV e do IC.<sup>53,54</sup> Os sinais de fluorescência das sondas intactas são suprimidos pelo corante supressor. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas para o alvo específico de cadeia simples de ADN resulta na clivagem, pela atividade nuclease 5' a 3' da polimerase do ADN, originando a separação dos corantes de sinalização e de supressão e a geração de um sinal fluorescente. Com cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas, aumentando concomitantemente o sinal cumulativo do corante sinalizador. Uma vez que os dois corantes sinalizadores específicos são medidos a comprimentos de onda definidos, é possível a deteção e discriminação em simultâneo do alvo amplificado do HEV e do IC.

# Reagentes e materiais

## Reagentes e controlos do cobas® HEV

Todos os reagentes e controlos não abertos devem ser armazenados conforme recomendado nas Tabela 1 a Tabela 4.

**Tabela 1** Teste cobas® HEV



<b>Teste cobas® HEV</b>		
Conservar entre 2 e 8 °C		
Cassete de 96 testes (P/N 07001045190)		
<b>Componentes do kit</b>	<b>Ingredientes dos reagentes</b>	<b>Quantidade por kit 96 testes</b>
<b>Solução de proteinase (PASE)</b>	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% (p/v) de proteinase  EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém subtilisina. Pode desencadear uma reação alérgica.	13 ml
<b>Controlo Interno (IC)</b>	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, < 0,001% de estrutura de Armored RNA de controlo interno (ARN não infeccioso encapsulado em bacteriófagos MS2), < 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida sódica	13 ml
<b>Tampão de Eluição (EB)</b>	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	13 ml
<b>Mistura principal Reagente 1 (MMX-R1)</b>	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	5,5 ml
<b>Mistura principal HEV Reagente 2 (HEV MMX-R2)</b>	Tampão de tricina, acetato de potássio, glicerol, 18% de sulfóxido de dimetilo, Tween 20, EDTA, < 0,06% de dATP, dGTP, dCTP, < 0,14% de dUTP, < 0,01% de primers ascendente e descendente do HEV e controlo interno, < 0,01% de sondas com marcação fluorescente para HEV, < 0,01% de sonda com marcação fluorescente para o controlo interno, < 0,01% de aptâmero oligonucleotídico, < 0,01% de polimerase do ADN Z05D, < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida sódica	6 ml

Tabela 2 cobas® HEV Control Kit

**cobas® HEV Control Kit**

Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N 07001100190)

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
<b>HEV</b> <b>Controlo positivo (HEV (+) C)</b>	< 0,001% de ARN do HEV sintético (armored) encapsulado em proteína coberta de bacteriófago MS2, plasma humano normal, ARN do HEV não detetável por métodos de PCR.  0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 x 1 ml)	  <p><b>ADVERTÊNCIA</b></p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1)</p>

\* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE



\*\*Substância perigosa

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit

**cobas® NHP Negative Control Kit**

Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N: 07002220190 ou 09051554190)

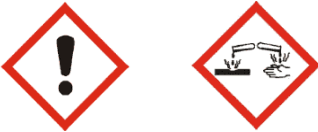
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
<b>Controlo negativo de plasma humano normal (NHP-NC)</b>	Plasma humano normal, ARN do HEV não detetável por métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 x 1 ml)	  <p><b>ADVERTÊNCIA</b></p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 Mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1)</p>

\* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

\*\*Substância perigosa

## Reagentes cobas omni para preparação da amostra

Tabela 4 Reagentes cobas omni para preparação da amostra\*

Reagentes	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
<b>cobas omni MGP Reagent (MGP)</b> Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997546190)	Partículas de vidro magnéticas, Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	480 testes	Não aplicável
<b>cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL)</b> Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997511190)	Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	4 x 875 ml	Não aplicável
<b>cobas omni Lysis Reagent (LYS)</b> Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997538190)	42,56% (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5% (p/v) de polidocanol***, 2% (p/v) de ditioneitol***, citrato de sódio dihidratado	4 x 875 ml	 <p><b>PERIGO</b></p> <p>H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação.            H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.            H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.            EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.            P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.            P273: Evitar a libertação para o ambiente.            P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.            P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.            P304 + P340 + P312: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.            P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.            593-84-0 Tiocianato de guanidina            9002-92-0 Polidocanol</p>

			3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol
<b>cobas omni Wash Reagent (WASH)</b> Conservar entre 15 e 30 °C (P/N 06997503190)	Citrato de sódio dihidratado, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo	4,2 L	Não aplicável

\* Estes reagentes não estão incluídos no kit do teste **cobas**® HEV. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 7).

\*\* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

\*\*\* Substância perigosa

## Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 5 e Tabela 6.

Quando os reagentes não estiverem nos cobas® 6800/8800 Systems, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 5.

**Tabela 5** Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

Reagente	Temperatura de armazenamento
cobas® HEV – 96	2–8 °C
cobas® HEV Control Kit	2–8 °C
cobas® NHP Negative Control Kit	2–8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2–8 °C
cobas omni MGP Reagent	2–8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2–8 °C
cobas omni Wash Reagent	15–30 °C

Os reagentes carregados nos cobas® 6800/8800 Systems são armazenados a temperaturas apropriadas e as datas de validade são controladas pelo sistema. O sistema apenas permite que os reagentes sejam usados, se as condições indicadas na Tabela 6 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 6 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems.

**Tabela 6** Condições de validade impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento (tempo acumulado a bordo do equipamento fora do frigorífico)
cobas® HEV – 96	Prazo não ultrapassado	30 dias desde a primeira utilização	Máx. 10 corridas	Máx. 8 horas
cobas® HEV Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas® NHP Negative Control Kit	Prazo não ultrapassado	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Prazo não ultrapassado	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

\* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado nos cobas® 6800/8800 Systems.

## Materiais adicionais necessários

**Tabela 7** Materiais e consumíveis para utilizar nos **cobas®** 6800/8800 Systems

Material	P/N
<b>cobas omni</b> Processing Plate	05534917001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate	05534941001
<b>cobas omni</b> Pipette Tips	05534925001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Saco de resíduos sólidos	07435967001
Reservatório de resíduos sólidos	07094361001

## Equipamentos e software necessários

O software **cobas®** 6800/8800 e o pacote de análise **cobas®** HEV deverão estar instalados no(s) equipamento(s).

O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema. O software **cobas® Synergy** pode ser instalado, se aplicável.

**Tabela 8** Equipamentos

<b>cobas® 6800/8800 Systems</b>	<b>P/N</b>
<b>cobas®</b> 6800 System (opção móvel)	05524245001 e 06379672001
<b>cobas®</b> 6800 System (fixo)	05524245001 e 06379664001
<b>cobas®</b> 8800 System	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001
<b>Opções para pipetagem e pooling</b>	<b>P/N</b>
<b>cobas p</b> 680 instrument	06570577001
Dongle do software <b>cobas® Synergy</b> (opcional)	07788339001
Hamilton MICROLAB® STAR IVD	04640535001

Para mais informações sobre os tubos primários e secundários aceites nos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas®** 6800/8800 Systems e o Manual do Operador do **cobas p** 680 instrument, ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**.

Nota: contacte o representante local da Roche para uma lista detalhada de racks de amostras, racks de pontas obstruídas e suportes de racks aceites nos equipamentos.

# Precauções e requisitos de manuseamento

## Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste teste. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- Todas as amostras devem ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando boas práticas laboratoriais, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no Documento M29-A4 do CLSI.<sup>38,39</sup> Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de materiais infetados e na utilização do teste **cobas**® HEV, dos **cobas**® 6800/8800 Systems e (opcionalmente) do **cobas p** 680 instrument ou do Hamilton MICROLAB STAR IVD com **cobas**® Synergy Core.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com as precauções universais. Se ocorrer derrame, desinfete imediatamente com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou desionizada (lixívia doméstica diluída a 1:10) ou siga os procedimentos apropriados do laboratório.
- O **cobas**® HEV Control Kit e o **cobas**® NHP Negative Control Kit contêm plasma derivado do sangue humano. Os testes de plasma humano normal por métodos de PCR não apresentaram qualquer ARN do HEV detetável. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- Não congele sangue total.
- Recomenda-se a utilização de pipetas esterilizadas descartáveis e de pontas de pipetagem isentas de nucleases. Para garantir o desempenho ideal do teste, utilize apenas os materiais consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos. Qualquer desvio destes procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados falsos positivos se, durante o manuseamento e processamento das amostras, o carryover de amostras não for controlado adequadamente.

## Manuseamento de reagentes

- Para evitar carryover de amostras ou controlos, manipule todos os reagentes, controlos e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeccione visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise e reagente de lavagem, antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de derrame, não utilize esse material para testes.
- O **cobas omni** Lysis Reagent contém tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras.
- Os kits de teste **cobas**® HEV, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contêm azida sódica como conservante. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.

- Não permita que **cobas omni** Lysis Reagent, que contém tiocianato de guanidina, entre em contacto com solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com amostras e reagentes, de acordo com regulamentações nacionais, estaduais e locais.

## Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular quando manusear amostras e reagentes. Para evitar contaminação, as luvas devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento de kits de teste **cobas**® HEV e reagentes **cobas omni**. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit, e depois de retirar as luvas.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). Em seguida esfregue a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrer um derrame nos **cobas**® 6800/8800 Systems, siga as instruções do Manual do Operador dos **cobas**® 6800/8800 Systems para limpar e descontaminar corretamente as superfícies do(s) equipamento(s).

## Colheita, transporte, armazenamento e pooling de amostras

**Nota: manuseie todas as amostras e controlos tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.**

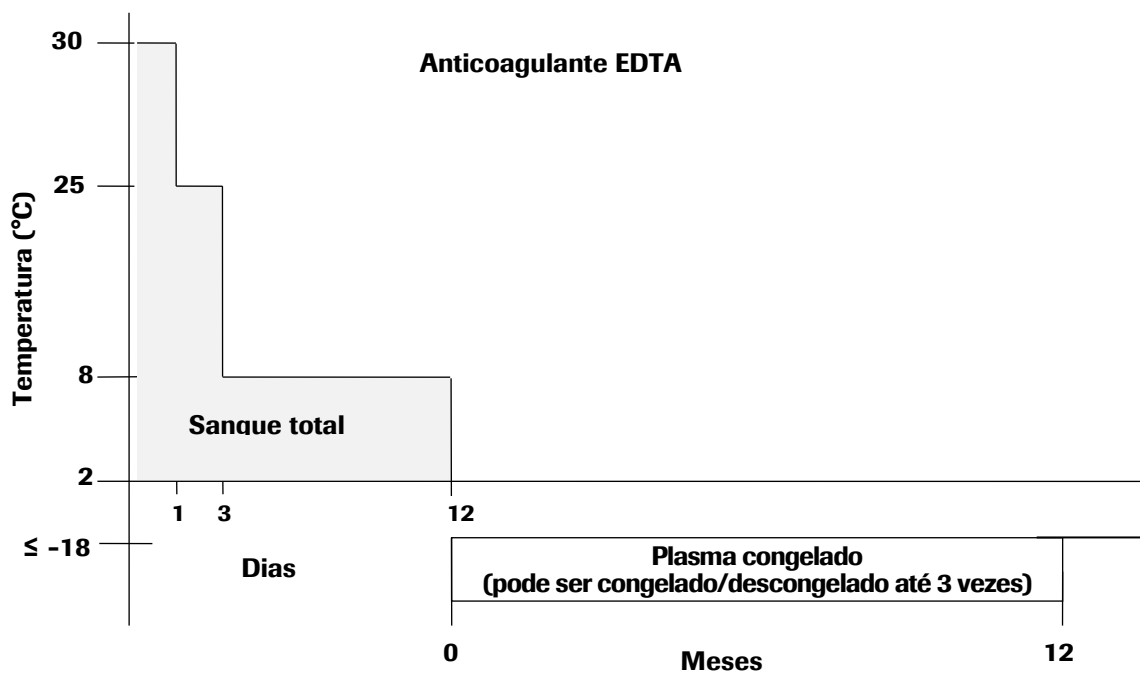
Armazene todas as amostras de dadores às temperaturas especificadas.

A estabilidade das amostras é afetada por altas temperaturas.

## Amostras de dadores vivos

- O plasma colhido com anticoagulante EDTA, CPD, CPDA1, CP2D e citrato de sódio a 4% pode ser utilizado com o teste **cobas**® HEV. Para o manuseamento e a centrifugação, siga as instruções do fabricante dos tubos de amostra/sacos de colheita de amostras.
- O sangue colhido com anticoagulante EDTA pode ser armazenado durante um máximo de 12 dias nas seguintes condições:
  - As amostras devem ser centrifugadas no prazo de 72 horas após a colheita.
  - Para armazenamento acima dos 8 °C, as amostras podem ser armazenadas durante 72 horas a temperaturas até 25 °C, e até 30 °C durante 24 das 72 horas.

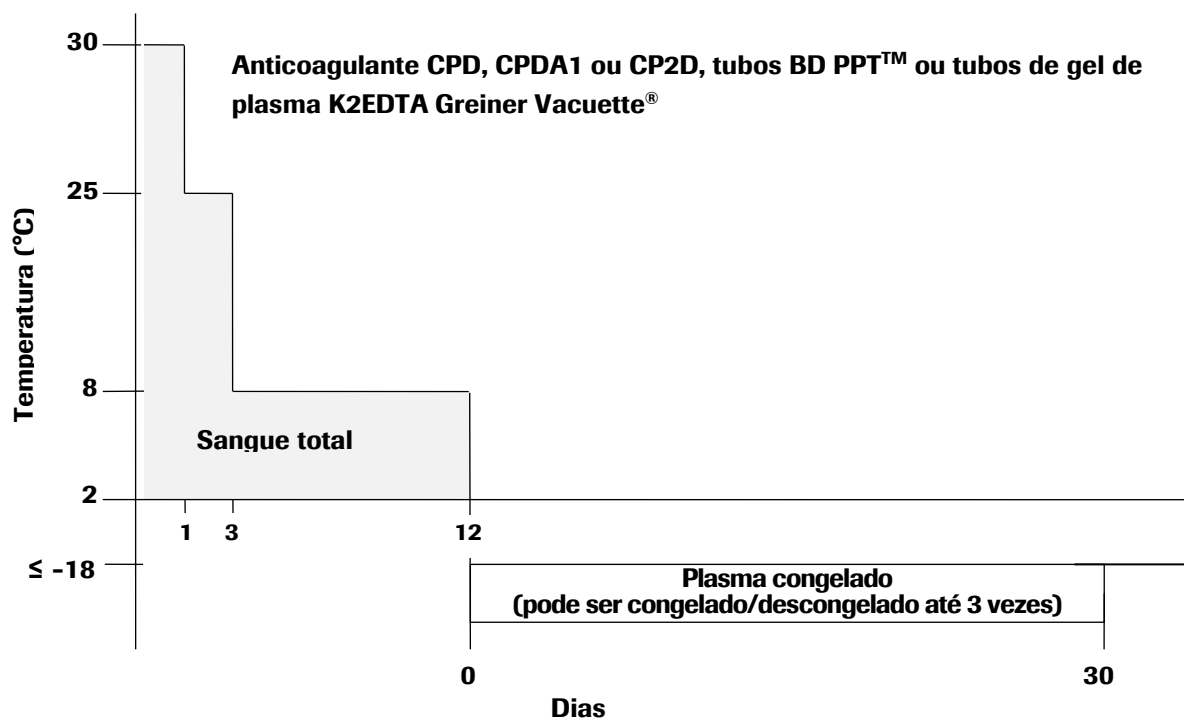
Além do indicado acima, as amostras podem ser armazenadas a temperaturas entre 2 e 8 °C. Além disso, o plasma separado dos glóbulos sanguíneos pode ser armazenado até 12 meses a temperaturas  $\leq -18$  °C, com três ciclos de congelação/descongelação. Consulte a Figura 1.

**Figura 1** Condições de armazenamento de amostras em anticoagulante EDTA

- Os tubos de sangue colhido com anticoagulante CPD, CPDA1 ou CP2D, tubos de preparação de plasma EDTA Becton-Dickinson (BD PPT™) ou os tubos de gel de plasma K2EDTA Greiner Vacuette® poderão ser armazenados até 12 dias nas seguintes condições:
  - As amostras devem ser centrifugadas no prazo de 72 horas após a colheita.
  - Para armazenamento acima dos 8 °C, as amostras podem ser armazenadas durante 72 horas a temperaturas até 25 °C, e até 30 °C durante 24 das 72 horas.

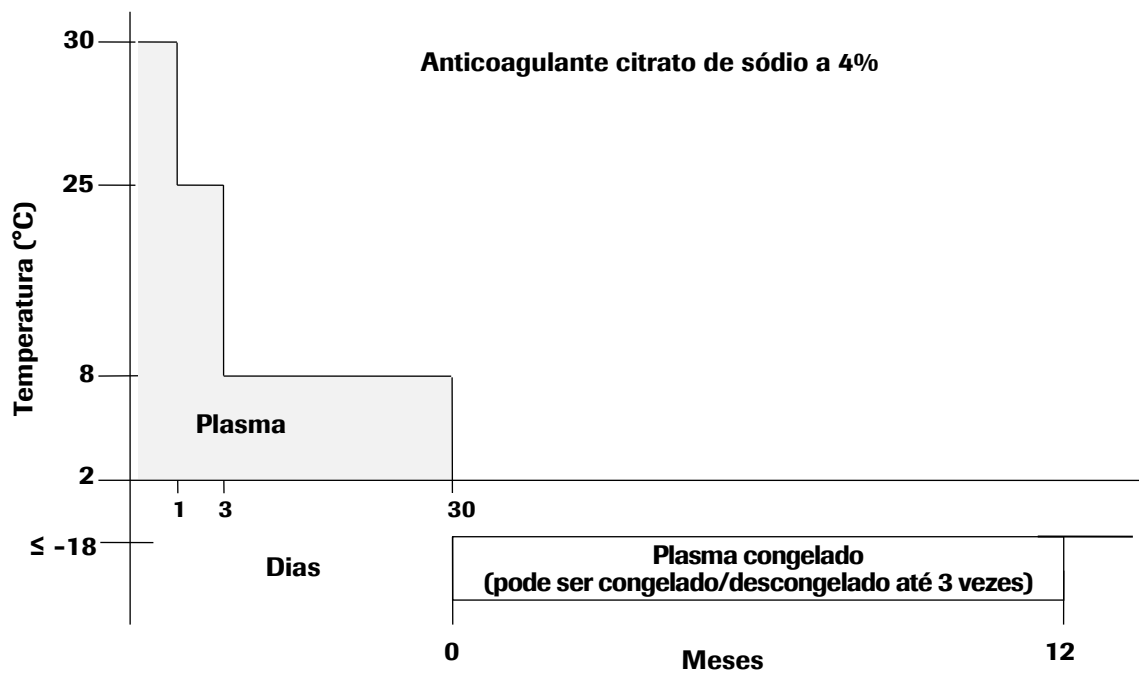
Além do indicado acima, as amostras podem ser armazenadas a temperaturas entre 2 e 8 °C. Além disso, o plasma separado dos glóbulos sanguíneos pode ser armazenado até 30 dias a temperaturas  $\leq -18$  °C, com três ciclos de congelação/descongelação. Consulte a Figura 2.

**Figura 2** Condições de armazenamento de amostras



- O plasma colhido com anticoagulante Citrato de Sódio a 4% pode ser armazenado durante um máximo de 30 dias entre 2 e 8 °C.
  - Para armazenamento acima dos 8 °C, as amostras podem ser armazenadas durante 72 horas a temperaturas até 25 °C, e até 30 °C durante 24 das 72 horas.

Além do indicado acima, as amostras podem ser armazenadas a temperaturas entre 2 e 8 °C. Além disso, o plasma separado dos glóbulos sanguíneos pode ser armazenado até 12 meses a temperaturas  $\leq -18$  °C, com três ciclos de congelação/descongelação. Consulte a Figura 3.

**Figura 3** Condições de armazenamento de amostras em anticoagulante citrato de sódio a 4%

- Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

# Instruções de utilização

## Pooling e pipetagem de amostras automáticos (opcional)

O **cobas p 680** instrument ou o **cobas® Synergy** Core podem ser utilizados como componente opcional dos **cobas® 6800/8800** Systems para pipetagem e pooling automáticos de alíquotas de várias amostras primárias para uma amostra em pool.

Para mais instruções, consulte o Manual do Operador do **cobas p 680** instrument ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**.

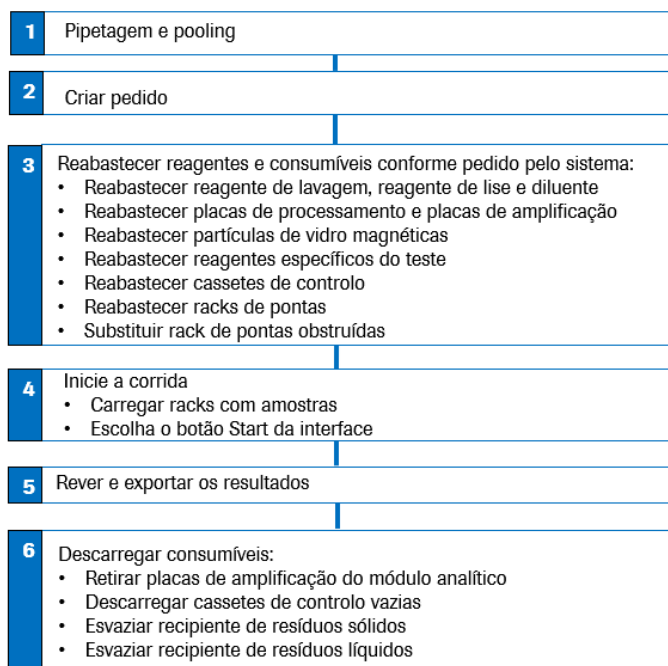
## Notas do procedimento

- Não utilize reagentes do teste **cobas® HEV**, **cobas® HEV Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** ou reagentes **cobas omni** depois de expirados os respetivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800** Systems.

## Corrida de um teste cobas® HEV

O procedimento de teste é descrito detalhadamente no Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800** Systems; para mais informações relativas aos procedimentos opcionais de pooling, consulte o Manual do Operador do **cobas p 680** instrument ou a assistência ao utilizador do software **cobas® Synergy**, conforme aplicável. A Figura 4 a seguir resume o procedimento.

**Figura 4** Procedimento do teste **cobas® HEV**



## Resultados

Os cobas® 6800/8800 Systems detetam automaticamente o ARN do HEV das amostras e dos controlos simultaneamente.

### Controlo de qualidade e validade dos resultados

- Um controlo negativo [(-) C] e um controlo positivo [HEV (+) C] são processados com cada batch.
- No software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios, verifique os alarmes e os resultados associados, para se certificar da validade do batch.
- O batch é válido se não aparecer nenhum alarme para ambos os controlos.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software cobas® 6800/8800, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

### Alarmes de controlos

**Tabela 9** Alarmes de controlos negativos e positivos

Controlo negativo	Alarme	Resultado	Interpretação
(-) C	Q02	Inválido	Se o resultado do (-) C for inválido, todo o batch é considerado inválido.
Controlo positivo	Alarme	Resultado	Interpretação
HEV (+) C	Q02	Inválido	Se o resultado do HEV (+) C for inválido, todo o batch é considerado inválido.

Se o batch for inválido, repita os testes de todo o batch, incluindo todas as amostras e controlos.

### Interpretação dos resultados

Para um batch válido, verifique cada uma das amostras individuais relativamente a alarmes no software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido poderá incluir resultados de amostras de dador válidos e inválidos consoante os alarmes obtidos das amostras individuais.
- Os resultados de amostras apenas são válidos se forem válidos os respetivos controlos positivos e controlo negativo do batch correspondente.

São medidos simultaneamente dois parâmetros para cada amostra: HEV e o Controlo Interno. Os resultados de amostra finais do teste cobas® HEV são reportados pelo software. Para além dos resultados gerais, serão apresentados no software cobas® 6800/8800 os resultados alvo individuais, que deverão ser interpretados da seguinte maneira:

**Tabela 10** Interpretação de resultados alvo individuais para os resultados alvo

Resultados alvo	Interpretação
HEV Non-Reactive (ZIKA não-reactivo)	Nenhum sinal do alvo detetado para o HEV e sinal do IC detetado.
HEV Reactive (ZIKA reativo)	Sinal do alvo detetado para o HEV e sinal do IC poderá ter sido ou não detetado.
Invalid (Inválido)	Sinal do alvo e sinal do controlo interno não detetados.

### Repetição de testes de amostras individuais

Os tubos de amostra com um resultado final Inválido para o alvo necessitam de repetição do teste.

## Limitações do procedimento

- O teste **cobas**® HEV foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **cobas**® HEV Control Kit, o **cobas**® NHP Negative Control Kit, o **cobas omni** MGP Reagent, o **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent e o **cobas omni** Wash Reagent para utilização nos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- Não utilize plasma heparinizado com este teste, porque foi verificado que a heparina inibe a PCR.
- A deteção do ARN do HEV depende do número de partículas virais presentes na amostra e pode ser afetada pelos métodos de colheita, armazenamento e manuseamento de amostras, por fatores inerentes ao próprio doente (por ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou pelo estágio da infeção e tamanho da pool.
- Embora raras, as mutações dentro de regiões altamente conservadas do genoma viral abrangidas pelo teste **cobas**® HEV podem afetar a ligação de primers e/ou sonda e resultar na não deteção da presença do vírus.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas. Os utilizadores deverão seguir os seus próprios específicos procedimentos e políticas.

# Avaliação do desempenho não clínico

## Características principais de desempenho - Amostras de dadores vivos

### Limite de detecção (LoD)

#### Padrão internacional da OMS

O limite de detecção (LoD) do teste cobas® HEV para o ARN do HEV foi determinado utilizando o Padrão Internacional da OMS para o HEV (código PEI 6329/10).

Para o Padrão Internacional da OMS, foram preparadas com plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (HEV), 3 séries de diluições independentes do padrão viral. Cada série de diluições foi testada utilizando 3 lotes diferentes de kits de teste cobas® HEV, com aproximadamente 63 réplicas por lote, num total de cerca de 189 réplicas por concentração. Para o vírus HEV, foi utilizada a análise PROBIT 95% (Tabela 11) e a análise PROBIT 50% (Tabela 12) nos dados combinados de todas as séries de diluições e todos os lotes de reagentes, para calcular o LoD, juntamente com os limites inferior e superior dos intervalos de confiança de 95%. As taxas de reatividade observadas nos estudos do LoD para o HEV estão resumidas na Tabela 13.

**Tabela 11** Resultados da análise PROBIT 95% sobre dados de LoD obtidos com padrões virais em plasma EDTA

Analito	Unidade de medida	LoD	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%	Limite superior do intervalo de confiança de 95%
HEV	UI/ml	18,6	15,9	22,6

**Tabela 12** Resultados da análise PROBIT 50% sobre dados de LoD obtidos com padrões virais em plasma EDTA

Analito	Unidade de medida	LoD	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%	Limite superior do intervalo de confiança de 95%
HEV	UI/ml	3,9	3,4	4,3

**Tabela 13** Resumo das taxas de reatividade para o HEV em plasma EDTA

Concentração de ARN do HEV (UI/ml)	Número de reativos	N.º de réplicas válidas	% de reativos	Limite inferior do intervalo de confiança de 95% (unilateral)
40	187	187	100,0%	98,4%
20	179	188	95,2%	91,8%
10	165	189	87,3%	82,6%
6	113	187	60,4%	54,2%
2	52	189	27,5%	22,2%

## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do teste **cobas**® HEV nos **cobas**® 6800/8800 Systems foi determinada utilizando o Padrão Internacional da OMS para o HEV (código PEI 6329/10). Este estudo foi constituído por 3 painéis de HEV a concentrações de aproximadamente 0,5 x, 1 x e 2 x o LoD do teste **cobas**® HEV. Os testes foram efetuados para os seguintes componentes de variabilidade:

- variabilidade dia-a-dia durante 3 dias
- variabilidade lote-a-lote utilizando 3 lotes de reagente diferentes do teste **cobas**® HEV
- variabilidade equipamento-a-equipamento utilizando 3 **cobas**® 8800 Systems diferentes

Foram testadas aproximadamente 21 réplicas com cada um dos 3 painéis, para um total de 63 réplicas com cada lote de reagente. Foram avaliados todos os dados de reprodutibilidade válidos, calculando a percentagem de resultados de teste reativos para cada nível de concentração, através de todos os componentes de variabilidade.

Foram calculados os limites dos intervalos de confiança bilaterais de 95% de cada taxa de reativos para cada um dos 3 níveis de HEV, testados em 3 dias, 3 lotes de reagente e 3 **cobas**® 8800 Systems. O teste **cobas**® HEV é reprodutível em vários dias, vários lotes de reagente e vários equipamentos. Os resultados da variabilidade lote-a-lote de reagente estão resumidos na Tabela 14.

**Tabela 14** Resumo da reprodutibilidade lote-a-lote de reagente do teste **cobas**® HEV

Analito	Concentração	Lote de reagente	% de reativos (reativos/réplicas válidas)	Limite inferior do intervalo de confiança de 95%	Limite superior do intervalo de confiança de 95%
HEV	2 x LoD	1	100,0% (61/61)	94,1%	100,0%
		2	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
		3	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
	1 x LoD	1	88,9% (56/63)	78,4%	95,4%
		2	96,8% (60/62)	88,8%	99,6%
		3	100,0% (63/63)	94,3%	100,0%
	0,5 x LoD	1	82,5% (52/63)	70,9%	90,9%
		2	95,2% (60/63)	86,7%	99,0%
		3	84,1% (53/63)	72,7%	92,1%

## Verificação de genótipos

Foi determinado o desempenho do teste **cobas**® HEV, para detetar 4 genótipos do HEV, através de testes a um total de 16 amostras clínicas únicas e 7 isolados de cultura do HEV com genótipos conhecidos. Todas as amostras foram quantificadas consoante o padrão da OMS do HEV. Todas as 16 amostras clínicas foram testadas depois de diluição com plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (HEV), para 5 x LoD do teste **cobas**® HEV, e das quais 10 amostras foram também testadas puras. Todos os 7 isolados de cultura foram testados depois de diluição com plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (HEV) para 5 x LoD do teste **cobas**® HEV. As amostras clínicas e os isolados de cultura foram todos detetados puros e/ou a 5 x LoD (Tabela 15).

**Tabela 15** Amostras clínicas e isolados de cultura do HEV

Genótipo	Amostras clínicas		Isolados de cultura
	% de reativas (reativas/amostras testadas) puras	% de reativas (reativas/amostras testadas) diluídas a 5 x LoD	% de reativas (reativas/amostras testadas) diluídas a 5 x LoD
1	Não testada*	Não testada*	100,0% (3/3)
2	Não testada*	Não testada*	100,0% (1/1)
3	100,0% (10/10)	100,0% (10/10)	Não testada*
4	Não testada*	100,0% (6/6)	100,0% (3/3)

\*Volume insuficiente para testar pura/diluída

## Especificidade analítica

A especificidade analítica do teste **cobas**® HEV foi avaliada relativamente a reatividade cruzada com 28 microrganismos a 10<sup>6</sup> partículas, cópias ou PFU/ml, que incluía 21 isolados virais, 6 estirpes bacterianas e 1 isolado de levedura (Tabela 16). Os microrganismos foram adicionados a plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus, e analisados com e sem HEV adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x LoD do teste **cobas**® HEV. Os microrganismos testados não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o teste **cobas**® HEV.

**Tabela 16** Microrganismos testados relativamente a especificidade analítica

<b>Vírus</b>	<b>Flavivírus</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Leveduras</b>
Adenovírus 5	Vírus do Nilo Ocidental	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovírus	Vírus do dengue tipo 1	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Vírus de Epstein Barr	Vírus Usutu	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Vírus do herpes simples tipo 1		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Vírus do herpes simples tipo 2		<i>Streptococcus viridans</i>	
Vírus da hepatite A		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Vírus da hepatite B			
Vírus da hepatite C			
Vírus da hepatite G			
Vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 Grupo M)			
Vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV-2)			
Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I			
Vírus linfotrópico da célula T humana tipo II			
Vírus do herpes humano tipo 6			
Vírus da gripe A			
Parvovírus B19			
Vírus chikungunya			
Vírus da varicela-zoster			

Amostras de plasma de cada um dos estados de doença (Tabela 17) foram testadas sem HEV e com HEV adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x LoD do teste **cobas**® HEV. Estes estados de doença não apresentaram reação cruzada nem interferiram com o teste **cobas**® HEV.

**Tabela 17** Amostras de estados de doença testadas relativamente a especificidade analítica

<b>Agentes causadores de doença</b>		
Adenovírus tipo 5	Vírus da hepatite B	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I
Citomegalovírus	Vírus da hepatite C	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo II
Vírus do dengue	Vírus do herpes simples tipo 1	Parvovírus B19
Vírus de Epstein Barr	Vírus do herpes simples tipo 2	Vírus do Nilo Ocidental
Vírus da hepatite A	Vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV-1)	

## Especificidade analítica – substâncias interferentes

### Substâncias com interferência endógena

Amostras de plasma com níveis anormalmente elevados de triglicéridos (até 33,2 g/l), hemoglobina (até 4,7 g/l), bilirrubina não conjugada (até 0,28 g/l), albumina (até 60 g/l) ou ADN humano (até 0,004 g/l) foram analisadas com e sem vírus HEV adicionado a uma concentração de aproximadamente 3 x o limite de detecção (LoD) do teste **cobas®** HEV. Amostras contendo estas substâncias endógenas não interferiram com a sensibilidade ou especificidade do teste **cobas®** HEV.

### Substâncias com interferência exógena

Foram testadas amostras de plasma EDTA humano normal, negativo para o vírus (HEV) contendo concentrações anormalmente altas de fármacos (Tabela 18) com e sem HEV adicionado a uma concentração de 3 x LoD do teste **cobas®** HEV. Estas substâncias exógenas não interferiram com a sensibilidade ou especificidade do teste **cobas®** HEV.

**Tabela 18** Amostras clínicas testadas com fármacos

Nome do fármaco testado	Concentração
Acetaminofeno	1324 µmol/l
Ácido acetilsalicílico	3620 µmol/l
Ácido ascórbico	342 µmol/L
Atorvastatina	600 µg Eq/l
Fluoxetina	11,2 µmol/L
Ibuprofeno	2425 µmol/L
Loratadina	0,78 µmol/L
Nadolol	3,88 µmol/L
Naproxeno	2170 µmol/L
Paroxetina	3,04 µmol/L
Fenilefrina HCL	491 µmol/L
Sertralina	1,96 µmol/L

## Correlação

### Avaliação do desempenho do teste cobas® HEV em comparação com o teste Realstar® HEV RT-PCR Kit 1.0

Foi comparado o desempenho do teste cobas® HEV e do teste Realstar® HEV RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) utilizando 100 amostras individuais de plasma, positivas para HEV-NAT. 100 amostras positivas foram testadas puras e 67 amostras positivas foram testadas diluídas a 1:6. Adicionalmente, foram testadas 100 amostras de plasma, negativas para HEV, puras, com ambos os métodos.

As amostras seronegativas demonstraram uma especificidade de 100%, ao gerar 100 de 100 resultados não-reativos com ambos os métodos.

Para amostras positivas, ambos os métodos foram concordantes com base no teste de McNemar, demonstrando que o desempenho do teste cobas® HEV é equivalente ao do teste Realstar® HEV RT-PCR Kit 1.0 (Tabela 19).

**Tabela 19** Correlação de amostras positivas (puras)

Métodos		Resultados do HEV	
Teste Realstar® HEV RT-PCR Kit 1.0	cobas® HEV	Puro	Diluído a 1:6
Não reativo	Não reativo	0	3
Reativo	Não reativo	0	3
Não reativo	Reativo	1	9
Reativo	Reativo	99	52
Total		100	67
Teste de McNemar, valor de p (bilateral, $\alpha = 0,05$ )		1,00	0,09

## Falha global do sistema

A taxa de falha global do sistema foi determinada para o teste cobas® HEV testando 100 réplicas de plasma EDTA adicionadas de HEV. Estas amostras foram testadas a uma concentração alvo de aproximadamente  $3 \times \text{LoD}$  e a respetiva corrida foi executada em pools de 1 (não diluídas). O estudo foi realizado utilizando o cobas® 8800 System com o cobas p 680 instrument (pipetagem e pooling).

Os resultados do estudo determinaram que todas as réplicas eram reativas para HEV, originando uma taxa de falha global do sistema de 0%. O intervalo de confiança bilateral exato de 95% foi de 0% para o limite inferior e de 3,62% para o limite superior [0%: 3,62%].

## Informações adicionais












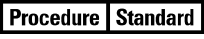








































### Características principais do teste

<b>Tipo de amostra</b>	Plasma
<b>Quantidade de amostra necessária</b>	1000 µl
<b>Quantidade de amostra processada</b>	850 µl
<b>Duração do teste</b>	Os resultados ficam disponíveis em menos de 3,5 horas após o carregamento da amostra no sistema.

## Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

**Tabela 20** Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

 Idade ou data de nascimento	 Dispositivo não para testes efetuados próximo dos pacientes	 UI QS por reação PCR, utilize as Unidades Internacionais QS (UI) por reação PCR no cálculo dos resultados.
 Software auxiliar	 Dispositivo não para autotestes	 Número de série
 Intervalo atribuído (cópias/ml)	 Distribuidor <i>(Nota: o país/região aplicável poderá estar indicado por baixo do símbolo.)</i>	 Centro
 Intervalo atribuído (UI/ml)	 Não reutilizar	 Procedimento padrão
 Representante autorizado na Comunidade Europeia	 Mulher	 Esterilizado com óxido de etileno
 Folha de dados de códigos de barras	 Apenas para avaliação do desempenho IVD	 Armazenar no escuro
 Número do lote	 Global Trade Item Number	 Limite de temperatura
 Risco biológico	 Importador	 Ficheiro de definição de teste
 Referência de catálogo	 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Este lado para cima
 Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	 Limite inferior do intervalo atribuído	 Procedimento ultrasensível
 Data da colheita	 Homem	 Identificação exclusiva do equipamento
 Consulte as instruções de utilização	 Fabricante	 Limite superior do intervalo atribuído
 Conteúdo suficiente para <n> testes	 Controlo negativo	 Linha de enchimento da urina
 Conteúdo do kit	 Não esterilizado	 Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.
 Controlo	 Nome do paciente	 Prazo de validade
 Data do fabrico	 Número do paciente	
 Dispositivo para testes efetuados próximo dos pacientes	 Abra aqui	
 Dispositivo para autotestes	 Controlo positivo	
	 Cópias QS por reação PCR, utilize as cópias QS por reação PCR no cálculo dos resultados.	

## Apoio técnico

Para apoio técnico (assistência), entre em contacto com a sua filial local:

[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Fabricante

### Tabela 21

Fabricante

Fabricado nos Estados Unidos



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Fabricado nos EUA

## Marcas comerciais e patentes

Este produto está coberto por uma ou mais patentes dos EUA N.ºs 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993, 10358675 e respetivas patentes estrangeiras equivalentes.

COBAS, COBAS OMNI, COBAS P e AMPERASE são marcas comerciais da Roche.

A marca comercial “Armored RNA®” é propriedade da Asuragen, Inc. e da Cenetron Diagnostics, Ltd.

Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

A tecnologia de prevenção de carryover na enzima AmpErase está coberta pela patente dos EUA n.º 7,687,247 de propriedade da Life Technologies e licenciada para a Roche Molecular Systems, Inc.

Consultar <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

## Direitos de autor

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



## Bibliografia

1. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012;379:2477-2488.
2. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*. 2011;161:47-58.
3. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9860-9865.
4. Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne, and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10:4507-4533.
5. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20:23-31.
6. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:698-709.
7. Meng XJ. Hepatitis E as a zoonotic disease in the United States. Oral presentation by X.J. Meng at the NIH Research Workshop: Hepatitis E in the United States, Bethesda, Maryland. March 2012;7-8.  
<http://www3.niddk.nih.gov/fund/other/HepE2012/HepatitisE2012ProgramBook.pdf>
8. Mansuy JM, Péron JM, Abravanel F, et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol*. 2004;74:419-424.
9. Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:784-790.
10. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus in Germany. *J Infect Dis*. 2008;198:1732-1741.
11. Dalton HR, Fellows HJ, Gane EJ, et al. Hepatitis E in New Zealand. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1236-1240.
12. Tsang TH, Denison EK, Williams HV, Venczel LV, Ginsberg MM, Vugia DJ. Acute hepatitis E infection acquired in California. *Clin Infect Dis*. 2000;30:618-619.
13. Teo CG. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:24-32.
14. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*. 2010;202:825-834.
15. Matsuda H, Okada K, Takahashi K, Mishoro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis*. 2003;188:944.
16. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishoro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003;362:371-373.
17. Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, et al. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol*. 2007;79:734-742.
18. Mitsui T, Tsukamoto Y, Suzuki S, et al. Serological and molecular studies on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J Med Virol* 2005;76:526-533.

19. Nelson KE, Kmush B, Labrique AB. The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9:1133-1148.
20. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 2008;28:1190-1199.
21. Jilani N, Das BC, Husain SA, et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:676-682.
22. Péron JM, Beureau C, Poirson H, et al. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat.* 2007;14:298-303.
23. Ramachandran J, Eapen CE, Kang G, et al. Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:134-138.
24. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012;55:988-997.
25. World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Hepatitis E. [http://www.who.int/scr/disease/hepatitis/Hepatitis\\_E\\_whocdscredc2001\\_12.pdf](http://www.who.int/scr/disease/hepatitis/Hepatitis_E_whocdscredc2001_12.pdf) (reviewed 13 Feb 2014).
26. Dalton HR, Bendall RP, Rashid M, et al. Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:1200-1205.
27. Dalton HR, Hazeldine S, Banks M, Ijaz S, Bendall R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet* 2007;369:1260.
28. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2008;358:811-817.
29. Gérolami R, Moal V, Colson P, et al. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant patient. *N Engl J Med.* 2008;358:859-860.
30. Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, et al. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008;14:547-553.
31. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology.* 2011;140:1481-1489.
32. Colson P, Kaba M, Moreau J, et al. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol.* 2009;45:269-271.
33. Péron JM, Mansuy JM, Récher C, et al. Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21:1223-1224.
34. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, et al. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res.* 2007;37:113-120.
35. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion.* 2004;44:934-940.
36. Mitsui T, Tsukamoto Y, Yamazaki C, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol.* 2004;74:563-572.
37. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a “nonhyperendemic” country. *Transfus Med.* 2006;16:79-83.

38. Colson P, Coze C, Gallian P, et al. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:648-649.
39. Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:778-784.
40. Zaaijer HL, Kok M, Lelie PN, Timmerman RJ, Chau K, van der Pal HJ. Hepatitis E in The Netherlands: imported and endemic. *Lancet.* 1993;341:826.
41. Christensen PB, Engle RE, Hjort C, et al. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1026-1031.
42. Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Crucière C, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2009-2010.
43. Kaufmann A, Kenfak-Foguena A, André C, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PLoS One.* 2011;6:e21150.
44. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, et al. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2708-2713.
45. Takeda H, Matsubayashi K, Sakata H, et al. A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang.* 2010;99:307-313.
46. Beale MA, Tettmar K, Szypulska R, Tedder RS, Ijaz S. Is there evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors? *Vox Sang.* 2011;100:340-342.
47. Ijaz S, Szypulska R, Tettmar KI, Kitchen A, Tedder RS. Detection of hepatitis E virus RNA in plasma mini-pools from blood donors in England. *Vox Sang.* 2012;102:272.
48. Guo QS, Yan Q, Xiong JH, et al. Prevalence of hepatitis E virus in Chinese blood donors. *J Clin Microbiol.* 2010;48:317-318.
49. Baylis SA, Hanschmann KM, Blümel J, Nubling CM; HEV Collaborative Study Group. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1234-1239.
50. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-128.
51. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature.* 1995;373:487-493.
52. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell.* 1995;80:869-878.
53. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992;10:413-417.
54. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;986-994.
55. Center for Disease Control and Prevention. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition.* CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

## Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 8.0 04/2022	<p>Adicionado <b>cobas</b>® NHP Negative Control Kit P/N 09051554190 para utilização com o teste <b>cobas</b>® HEV.</p> <p>Atualizada a página de símbolos harmonizados.</p> <p>Atualização para os atuais Operadores Económicos.</p> <p>Se tiver quaisquer questões, por favor contacte o representante local da Roche.</p> <p>Secção de “Apoio técnico” adicionada.</p>