



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACIÓN**

## **FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**“SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-VIRUS DE HEPATITIS E EN  
MUJERES GESTANTES – HOSPITAL SAN BARTOLOMÉ 2018”**

**LINEAS DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y ANATOMÍA  
PATOLÓGICA**

**AUTOR**

**Ochoa Rojas Carlos Gerardo**

**ASESOR**

**Lagos Castillo Moraima Angelica**

**JURADOS**

**Cruz Gonzales Gloria Esperanza**

**Prado Maggia Carlos Toribio**

**Guerrero Barrantes Cesar Enrique**

**Lima – Perú**

**2021**

**SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-VIRUS DE HEPATITIS E EN  
MUJERES GESTANTES - HOSPITAL SAN BARTOLOMÉ 2018**

**CARLOS GERARDO OCHOA ROJAS**

**ASESOR:**

**MG. MORAIMA ANGELICA LAGOS CASTILLO**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCION.....	6
1.1. Descripción y formulación del problema.....	6
1.2. Antecedentes.....	8
1.3. Objetivos.....	10
- Objetivo General.....	10
- Objetivos Específicos.....	10
1.4. Justificación.....	11
1.5. Hipótesis.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	13
III. METODO.....	21
3.1. Tipo de investigación.....	21
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	21
3.3. Variables.....	21
3.4. Población y muestra.....	21
3.5. Instrumentos.....	21
3.6. Procedimientos.....	22
3.7. Análisis de datos.....	29
IV. RESULTADOS .....	30
V. DISCUSION DE RESULTADOS .....	36
VI. CONCLUSIONES.....	41
VII. RECOMENDACIONES.....	42
VIII. REFERENCIAS.....	43
IX. ANEXOS.....	45

## Resumen

**Introducción.** El virus de la hepatitis E (HEV) es probablemente la causa más común de hepatitis viral aguda en el mundo, valorándose que un tercio de la población mundial ha estado infectada por este agente. En Perú se desconoce la epidemiología de la infección originada por este virus.

**Objetivo.** Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en pacientes gestantes del hospital San Bartolomé en Lima.

**Métodos.** Se estudiaron muestras de suero de 316 gestantes que fueron analizadas por anti-HEV para ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

**Resultados.** De las 316 muestras de gestantes, la frecuencia de seropositividad para el virus de la hepatitis E fue de 14.5% (46/316); de estas, 0.3% (1/316) presentó IgM anti-HEV y 14.2% (45/316), IgG anti-HEV. De acuerdo al lugar de procedencia, las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE y las 3 gestantes seropositivas para IgM VHE tienen como procedencia Lima. De acuerdo con la edad de las madres, las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE, el 51,11 % (24 gestantes) presentan edades de 27 a 36 años, de igual modo, de las 3 seropositivas para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) presenta edad entre 15 a 26 años.

**Conclusiones.** La seropositividad descrita indica una frecuencia alta de 14.5% en mujeres del hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” en periodo del mes de diciembre del 2018 a enero del 2019.

**Palabras clave:** Virus de la hepatitis E, seroprevalencia, gestante, anticuerpos.

## Abstract

**Introduction.** Hepatitis E virus (HEV) is probably the most common cause of acute viral hepatitis in the world, assessing that one third of the world's population has been infected by this agent. In Peru, the epidemiology of the infection caused by this virus is unknown.

**Objective.** To determine the seroprevalence of anti-HEV antibodies in pregnant patients at the San Bartolomé hospital in Lima.

**Methods.** Serum samples from 316 pregnant women were studied and analyzed by anti-HEV for ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

**Results.** Of the 316 samples of pregnant women, the seropositivity frequency for hepatitis E virus was 14.5% (46/316); of these, 0.3% (1/316) presented anti-HEV IgM and 14.2% (45/316), anti-HEV IgG. According to the place of origin, the 47 pregnant women seropositive for IgG VHE and the 3 pregnant women seropositive for IgM VHE come from Lima. According to the age of the mothers, the 47 pregnant women seropositive for IgG VHE, 51.11% (24 pregnant women) have ages of 27 to 36 years, likewise, of the 3 seropositive for IgM VHE, 33.3% ( 1 pregnant woman) has an age between 15 to 26 years.

**Conclusions.** The seropositivity described indicates a high frequency of 14.5% in women of the National Mother Child Hospital "San Bartolomé" during the month of December 2018 to January 2019.

**Keywords:** Hepatitis E virus, seroprevalence, pregnant woman, antibodies.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis E (HEV) es probablemente la causa más común de hepatitis viral aguda en el mundo, valorándose que un tercio de la población mundial ha estado infectada por este agente. En Perú se desconoce la epidemiología de la infección originada por este virus.

### 1.1 Descripción y formulación del tema

#### Descripción

Las hepatitis virales son enfermedades infecciosas, agudas y contagiosas que causan daño hepático y forman un problema de salud pública mundial. Los agentes que causan hepatitis viral por transmisión vía fecal-oral son: el virus de la hepatitis A (VHA) y el virus de la hepatitis E (VHE). (Sánchez Partidas & Gutiérrez García, 2012)

El HEV está catalogado en la familia Hepeviridae como único miembro del género Hepevirus; comprende un genoma de tipo ARN de cadena sencilla de sentido positivo de 7,5kb, aproximadamente, que codifica tres marcos de lectura abierta, ORF1, ORF2 y ORF3 (Open Reading Frame, ORF). (Peláez et al., 2014)

El HEV es causante de más del 50% de los casos hepatitis viral aguda en adultos en países endémicos y del 1% en países no endémicos; sin embargo, la infección en las mujeres embarazadas es particularmente grave en los países de alta endemicidad con lo cual se ha informado que una proporción significativa de las mujeres embarazadas con hepatitis E puede evolucionar a hepatitis fulminante durante las epidemias, especialmente en el tercer trimestre, con una alta mortalidad de 15-20%. (Gu et al., 2015)

Según las revisiones bibliográficas se ha encontrado que la prevalencia más alta, existe en México, considerado un país endémico para HEV, con una prevalencia de 1,6% en mujeres gestantes, 6,3% en voluntarios y 10,4% en adultos jóvenes, mientras en países de la región latinoamericana; son

muy parecidos a los de Europa.(Echevarría et al., 2013) Respecto a Perú, se realizó un estudio en grupos de riesgo, como trabajadores de salud, presidiarios y operarios del sistema de agua y alcantarillado, se detectaron anticuerpos anti-HEV en un rango de 7,5 a 12,5% de las muestras.(Peláez et al., 2014)

### **Formulación del problema**

A partir de que las mujeres embarazadas son una población vulnerable, ya que se realizan múltiples tamizajes con la finalidad de detectar enfermedades y poder prevenirlas a tiempo. Más énfasis en las enfermedades como la Hepatitis, con lo cual observe por medio de la Historia Clínica que había pacientes con sintomatología muy similar a la infección por el virus de la Hepatitis A, pero que en el diagnóstico recomendaban otras soluciones. Teniendo literatura regional y mundial sobre el virus de la Hepatitis E, mi pregunta fue ¿De qué manera se relaciona el Virus de la Hepatitis E y mujeres gestantes del Hospital San Bartolomé en el 2018?

### **Pregunta general**

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti- Virus de la hepatitis E en pacientes gestantes del Hospital San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

### **Preguntas específicas**

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo al lugar de procedencia de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé según la edad durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé según la edad gestacional durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé según el contacto con animales, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

¿Cuál es la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé según el consumo de agua no tratada durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019?

## **1.2 Antecedentes**

Obiri-Yeboah D. (2018) realizó el estudio sobre la prevalencia y los factores de riesgo asociados a la infección por VHE entre las mujeres embarazadas en la costa del cabo Metropolis, región central de Ghana, con 398 muestras de suero que fueron analizadas por inmunoensayo HEV (Anti-HEV Ig G y Anti-HEV IgM) ELISA por duplicado usando el kit INNOVITA (Tangshan, China). Resultando positivas para el anticuerpo anti-HEV Ig G y anti-HEV Ig M; 48(12.2%) y 1(0.2%), respectivamente.

Guangyu G. (2015) realizó el estudio con el objetivo de investigar la prevalencia y los posibles factores de riesgo de infección por VHE entre las mujeres embarazadas y observar la evolución del anti-VHE en estas mujeres puérperas y sus hijos después de 6 años de seguimiento, para ello se recolectaron 497 muestras de suero de mujeres durante el embarazo y 6 años después del parto y de sus 497 niños las cuales fueron cribados para anti-HEV por ELISA y confirmados por Western Blot, el ARN del VHE se detectó mediante PCR anidada mediante transcripción inversa. Resultaron positivas de las mujeres embarazadas 3 (0,6%) a IgM anti-HEV y 55 (11,1%) a IgG en



un total de 497 muestras procesadas. A los 6 años postparto, fueron tomadas nuevas muestras a las 497 mujeres de estudio, cuyos resultados nuevos fueron que 18 muestras que fueron positivas para IgG anti-HEV se volvieron negativas para este anticuerpo mientras que otras 18 se convirtieron de Anti IgG contra HEV negativas a positivas; la prevalencia acumulada en este grupo de estudio fue de al menos 14,7% (73/497); mientras de los 497 niños nacidos, las tasas positivas de anti-HEV IgM e IgG fueron 0.2% y 0.4%, respectivamente.

Cong W. (2015) realizó un estudio para estimar la seroprevalencia y los posibles factores de riesgo asociados con la adquisición de la infección por VHE en mujeres embarazadas en China, para lo cual se recolectó 1955 muestras de suero, de las cuales 990 fueron mujeres embarazadas y 965 un grupo control. Todas ellas cuales fueron cribadas por ELISA para HEV IgG e IgM. Resultaron positivas para anti-HEV Ig G, 20,7% de las muestras evaluadas; correspondiendo el 16,2% en mujeres embarazadas, mientras que en el grupo control fue 25,3%. Sesenta y dos (3,2%) de las 1955 muestras de suero fueron positivos para anti-HEV IgM y la seroprevalencia en mujeres embarazadas y sujetos control fue del 2,6% y 3,6% respectivamente. Sesenta y una muestras de suero fueron positivas tanto para anti-HEV Ig G y anti-HEV IgM y una muestra de suero fue positiva para anti-HEV Ig M, pero negativa para anti-HEV Ig G.

Peláez D. (2014) realizó el estudio denominado “Infección por el virus de la hepatitis E en pacientes con diagnóstico clínico de la hepatitis viral en Colombia” evaluando 344 muestras de pacientes remitidas del Instituto Nacional de Salud en el periodo 2005-2010 provenientes de 15 departamentos de Colombia(grupo1) y muestras remitidas del Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia en el periodo 2008-2009(grupo2) que fueron analizadas por inmunoensayo. Los resultados de seropositividad para el virus de la hepatitis E en las 344 muestras analizadas fue

de 8,7% (30/344); de estas, 1,74% (6/344) presento IgM anti- HEV y 7,5% (26/344), IgG anti-HEV.

Abebe M. (2017) realizó un estudio con el objetivo de determinar la incidencia del VHE durante el embarazo asociado con una elevada morbilidad materna y fetal, para ello se recolectaron 386 muestras de suero de mujeres embarazadas que fueron examinados para IgG anti-HEV y IgM anti-HEV usando ELISA. Resultaron positivas para el anticuerpo anti-HEV Ig G y anti-HEV Ig M; 122(31.6%) y 2(0.5%), respectivamente.

### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo General**

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes del Hospital San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

#### **Objetivos Específicos**

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo al lugar de procedencia de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con la edad de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo a la edad gestacional de embarazo de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo al contacto con animales en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con el consumo de agua en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.

#### **1.4 Justificación**

El presente trabajo de investigación será relevante, ya que por medio de su realización se determinará la seroprevalencia de anticuerpos anti-Virus de la Hepatitis E genotipo 1 y 2, en gestantes, y esto permitirá conocer la importancia de su detección, ya que el hospital al ser un hospital materno infantil atiende a madres e hijos de todas partes del Perú.

Con el presente trabajo de estudio se pretende determinar la seroprevalencia de la HEV utilizando marcadores serológicos de tipo antígeno de superficie (HEV) y Anticuerpos contra hepatitis E (HEV) en pacientes gestantes del Hospital San Bartolomé de Lima en el periodo de diciembre 2018- enero del 2019.

El análisis de la población gestante es importante, pues independientemente de que hace posible determinar la prevalencia de otras infecciones en los controles prenatales y tener tamizajes sobre los neonatos, se busca contribuir e identificar con otros factores que pueden jugar un papel importante en la transmisión vertical, así como los mecanismos mediante los cuales se puede incidir en la prevención de la misma mediante programas de vacunación y tamizaje prenatal. La utilización de marcadores serológicos específicos contra este importante virus contribuirá a mejorar el rendimiento y la calidad de vida de las madres y sus hijos en el Hospital de estudio y a nivel Latinoamericano por carencia de estudios previos en esta parte del mundo.

## **1.5 Hipótesis**

No se plantea.

## MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### Antecedentes Históricos

El origen de la hepatitis aguda E se remota hacia finales del siglo XIX en estudios retrospectivos en India de grandes epidemias transmitidas por el agua, atribuidas originalmente al virus de la hepatitis A, en las cuales sugirieron un nuevo agente etiológico como causa de la epidemia.(Rodríguez-Frias, Jardi, & Buti, 2012)

Se logró determinar en 1983 el virus de hepatitis E(VHE), virus de hepatitis entérica no-A, denominado E por entérica y epidémica, que había producido una hepatitis indescriptible en soldados soviéticos en Afganistán.(Kamar, Dalton, Abravanel, & Izopet, 2014)

#### Virología del VHE

El virus de la Hepatitis E (VHE) es una pequeña partícula icosaédrica sin envoltura. Este virus contiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 7.2 kb, que está limitado y poliadenilado en los extremos 5' y 3', respectivamente; constituido por 3 regiones codificantes de proteínas o marcos de lectura abierta (ORFs), las cuales tienen las siguientes características:

ORF1 codifica una proteína de 1,693 aminoácidos que contiene dominios funcionales responsables de la replicación viral. Estos dominios funcionales incluyen metiltransferasa (MetTrf), cisteín-proteasa (Cys-Prot), ARN helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (ARN-pol).(Rodríguez-Frias et al., 2012)

ORF2 ensambla una proteína de la cápside viral de 660 aminoácidos responsable del ensamblaje del virión. Esta proteína contiene 3 dominios lineales: el dominio S (aa: 320-454), que sintetiza la cápside, y los dominios M (aa: 320-454) y P (aa: 320-606) que se relacionan con la interacción virus-célula huésped.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

ORF3 que se superpone a la región ORF2 codifica una fosfoproteína inmunogénica de 114 aminoácidos que se asocia con el citoesqueleto. Esta proteína está involucrada en la morfogénesis del virión y su infectividad.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **Ciclo replicativo del VHE**

El VHE se replica en el citoplasma con un ARN subgenómico que produce las proteínas ORF2 y ORF3, y el ARN genómico completo que codifica proteínas no estructurales y que sirve como plantilla para la replicación. Según este estudio la proteína ORF1 no está sujeta a procesamiento proteolítico. El VHE se replica en los hepatocitos pero también en el intestino delgado, el colon y los ganglios linfáticos, como lo demuestra la detección de RNA intermedio de sentido negativo.(Kamar et al., 2014)

### **Clasificación taxonómica y filogenia del VHE**

El VHE está clasificado en el género Hepevirus de la familia Hepeviridae. La clasificación más común identifica 4 genotipos principales HEV de mamíferos (HEV1 a 4) y varios subgenotipos dentro de cada genotipo. (Rodríguez-Frias et al., 2012)

El genotipo 1 es exclusivo en humanos, aislado en brotes epidémicos y casos esporádicos del Norte de África y Asia donde son endémicos, y más recientemente en América. El genotipo 2 es exclusivo en humanos, comprende una única cepa aislada en una epidemia en México y cepas de epidemias en África Central, y tiene una homología del 75% en nucleótidos y del 86% en aminoácidos con el genotipo 1. El genotipo 3 abarca cepas del VHE humana y porcina procedentes de países desarrollados como Estados Unidos y principalmente Europa, aunque también en Asia, Oceanía y Argentina, e implica un 75% de homología con los genotipos 1 y 2, con lo cual cruzan la barrera de especie. El genotipo 4 engloba cepas del VHE humano y porcino.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

Los genotipos 1 y 2, exclusivo en humanos, se vinculan a grandes de hepatitis E epidemias transmitidas por el agua en las regiones endémicas, mientras que los genotipos 3 y 4 de humanos y otros mamíferos son los principales responsables de casos esporádicos de hepatitis E en regiones no epidémicas. Los genotipos 1 y 2 en países en desarrollo, la afectación clínica fue más alta en niños mayores y adultos jóvenes, mientras que los genotipos 3 y 4 de países desarrollados se contempla en promedio a edades más avanzadas y en infectados con VIH, lo que propone ser más patogénicos que el 3 y el 4, y de estos, el 4 más que el 3. Según estudios recomiendan que los jmbrotos de infección por VHE indican que los genotipos 1 y 2 infectan más eficazmente por vía fecal-oral entre humanos, mientras que los genotipos 3 y 4 se mantienen entre las especies animales e infectan a humanos por transmisión zoonótica.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **Patogenia y cuadro clínico de la enfermedad**

El humano puede adquirir el VHE, que en orden decreciente de importancia son:

- a) Fecal- oral: de mayor importancia en países en desarrollo como Perú por contaminación de los suministros de agua potable. Esta vía explica una gran proporción de casos clínicos, con lo cual los factores de riesgo están relacionados con el saneamiento deficiente, que permite que los virus excretados en las heces de las personas infectadas lleguen al agua de bebida.
- b) Por alimentos contaminados, crudos o poco cocidos
- c) Por trasfusión de productos sanguíneos infectados
- d) Por transmisión vertical (materno- fetal) (OMS, 2017)

## **Epidemiología**

El HEV es probablemente la causa más común de hepatitis viral aguda en el mundo, valorándose que un tercio de la población mundial ha estado infectada por este agente.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

Se estima que cada año hay unos 20 millones de casos de infección por el VHE, que producen 3,3 millones de casos sintomáticos de hepatitis E.(OMS, 2017)

La infección por VHE sigue 2 patrones evidentemente diferenciados: un patrón en las regiones donde se producen epidemias (países subdesarrollados) y otro muy diferente en los países desarrollados.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **Patrón epidémico**

En regiones como India, China, Asia Sudoriental y Central, oriente Medio y partes del norte y del oeste de África y 2 brotes únicos (1986-1987) se han observado epidemias de hepatitis E. Las tasas de morbilidad de este virus van del 1 al 15%, afectando sobre todo a adultos jóvenes, más varones que mujeres. Es sobresaliente que los brotes de hepatitis E se asocian a una alta morbilidad y mortalidad en embarazadas (19% en embarazadas, frente al 2,1% en no embarazadas o 2.8% en hombre) con un alto riesgo obstétrico de prematuridad y riesgo de mortalidad perinatal, y en individuos con una enfermedad hepática crónica subyacente.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **Patrón no endémico**

En países desarrollados, el VHE3 y VHE4 se transmiten zoonóticamente de los reservorios animales, con casos esporádicos que se han informado cada vez más en los últimos años debido a las mejoras de las herramientas de diagnóstico y las estrategias de detección.(Rodríguez-Frias et al., 2012) Sin embargo, también se ha descrito en países en vías de desarrollo.(Peláez et al., 2014)



## **Cuadro clínico**

La etiología más común de esta infección es en forma de hepatitis aguda. A nivel epidemiológico se pueden observar diferencias entre zonas endémicas y no endémicas:

### **a) Zonas con infección por VHE endémica**

En áreas de pobre saneamiento en países en desarrollo, el HEV1 y HEV2 son transmitidos entre humanos por la vía fecal- oral, usualmente por el agua contaminada. En la mayoría de los pacientes, la hepatitis E causa una enfermedad autolimitada que dura unas pocas semanas. Luego de un periodo de incubación de 2 a 6 semanas, se desarrollan los síntomas de la hepatitis, con fiebre y náusea seguido por dolor abdominal, vómito, malestar, y hepatomegalia. La ictericia ocurre alrededor del 40% de pacientes.(Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **b) Áreas no endémicas para infección por VHE**

Según estudios la clínica es mediante:

. La infección aguda que incluye síntomas como: náuseas, fiebre, malestar general, artralgias, vómitos, diarrea y dolor abdominal, y el más predominante, la ictericia, presente en un 75% en pacientes. La mayoría de los casos son esporádicos, y no ocurren por grandes brotes.

. Infección del HEV mal diagnosticada como Lesión Hepática Inducido por Drogas (DILI).

.Manifestaciones extrahepáticas: Incluyen una variedad de síndromes neurológicos, lesiones renales, pancreatitis y problemas hematológicos.(Kamar et al., 2014)

### **c) Hepatitis crónica por VHE**

Según estudios se han descrito casos de infección por VHE con enfermedad hepática crónica, e incluso progresión a cirrosis, en pacientes inmunosuprimidos, como receptores de órganos sólidos, pacientes hematológicos o en quimioterapia o infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).(Rodríguez-Frias et al., 2012)

## **Respuesta inmune**

Frente al ingreso del virus de la hepatitis E, la respuesta serológica anti-VHE presenta un patrón serológico clásico de anti-VHE IgM e IgG detectable generalmente en el momento de la aparición de la enfermedad.

Los anticuerpos del isotipo IgM aparecen en las 2 primeras semanas luego de la infección, seguidos por el isotipo IgG.

En la detección de anticuerpo (Inmunoglobulinas IgG e IgM) se debe considerar:

- Las IgM se forman precozmente en las 2 primeras semanas luego de la infección y alcanzan su pico en el periodo sintomático, considerado como marcador para el diagnóstico de la infección aguda.
- Las IgG se forman simultáneamente a la respuesta de IgM.
- Tanto en el hombre como en los animales la infección natural estimula la aparición simultánea o ligeramente retrasado de las IgM e IgG, pero mientras las IgM declinan y tienden a desaparecer, las IgG se estabilizan y persisten por largo tiempo.

## **Diagnóstico de laboratorio**

La hepatitis E es clínicamente indistinguible de los otros tipos de hepatitis viral aguda. No obstante, el diagnóstico se basa en pruebas de laboratorio (pruebas serológicas y detección de ARN viral).(OMS, 2017)

A nivel inmunológico se efectúa los inmunoensayos enzimáticos de diagnóstico universales tipo ELISA para detectar anticuerpos específicos (anti-VHE) de tipo IgG e IgM; estos inmunoensayos comerciales utilizan antígenos sintéticos específicos de las regiones conservadas e inmunodominantes de las proteínas codificadas por los ORF2 y ORF3 de aislamientos de los genotipos 1 y 2; mientras a nivel virológico abarca la detección del genoma viral ARN-VHE y su

genotipado por secuenciación, y para esta determinación se utilizan ensayos de PCR con transcripción reversa (RT-PCR) convencionales y en tiempo real no comerciales, in-house (no estandarizados) para la detección del ARN del VHE en muestra de sangre, heces y aguas residuales. La detección de ARN-VHE establece la replicación viral y su caracterización genómica posterior, ya que es el único marcador viral útil. (Rodríguez-Frias et al., 2012)

### **Embarazo**

Son los nueve meses durante los cuales el feto se desarrolla en el útero de la mujer. Durante el embarazo, tanto la mujer como su futuro hijo se enfrentan a diversos riesgos sanitarios. Por este motivo, es importante que el seguimiento del embarazo sea realizado por personal profesional calificado.

### **Infección de HEV en mujeres gestantes**

El embarazo asociado con la hepatitis E parece ser un factor de riesgo potencial para la replicación viral y conduce a un estado inmune extremadamente bajo en mujeres embarazadas. Un sinnúmero de estudios de países en desarrollo ha indicado una alta mortalidad en mujeres embarazadas que desarrollan infección por el VHE. La mortalidad es del 20 al 25% y generalmente ocurre en el tercer trimestre. Las mujeres embarazadas mueren por problemas obstétricos, incluyendo hemorragia o eclampsia, o desarrollan insuficiencia hepática fulminante. (Kamar et al., 2014)

Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que la transmisión vertical del VEH ocurren en mujeres gestantes y conduce a resultados fetales adversos, como por ejemplo la muerte fetal, muerte neonatal y el aborto espontáneo. (Gu et al., 2015)

El exceso de mortalidad en el embarazo con HEV genotipo 1 y 2 es único, ya que no se ve con los genotipos 3 y 4. La causa de este exceso es incierto y ha sido objeto de numerosos estudios y mucho debate. El embarazo se caracteriza por un estado de tolerancia inmune materna hacia el

feto. La actividad de las células T se reduce, con lo cual hay una reducción en la producción de citocinas en las primeras 20 semanas, donde predominan las respuestas del linfocito T-helper2 (Th2) y los cambios inmunológicos en la placenta regulan negativamente la presentación del antígeno. Los cambios en las respuestas inmunológicas de la madre se deben, al menos en parte, a cambios significativos en los perfiles hormonales, con niveles aumentados de progesterona, estrógeno y gonadotropina coriónica humana (hCG).(Kamar et al., 2014)

Los estudios han mostrado diferencias significativas en respuestas inmunológicas y hormonales en mujeres embarazadas con insuficiencia hepática fulminante causada por hepatitis E. Finalmente, estudios recientes mostraron que entre las mujeres infectadas con VHE, se observaron cargas virales más altas en mujeres embarazadas que en mujeres que no estaban embarazadas.(Kamar et al., 2014)

#### **Definición de términos básicos**

- a) **Seroprevalencia.** - La presencia global de una enfermedad o condición dentro de una población definida en un momento, medida por pruebas de sangre (pruebas serológicas).
- b) **Anticuerpos.** - Proteínas sintetizadas por el sistema inmunológico del cuerpo en respuesta a un antígeno, con el cual reacciona a fin de contribuir a su eliminación.
- c) **Virus de la Hepatitis E.-** Es el agente etiológico de una enfermedad llamada Hepatitis E.
- d) **Mujer gestante.** - Es aquella mujer, en la cual dentro de su útero se desarrolla el feto durante nueve meses.
- e) **Tamizaje.** - Es el uso de una prueba sencilla en una población saludable, para identificar a aquellos individuos que tienen alguna patología, pero que todavía no presentan síntomas.

## MÉTODO

### 3.1 Tipo de investigación

El presente trabajo fue de tipo descriptivo de corte transversal y diseño no experimental.

### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo se realizó durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019 en el Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”.

### 3.3 Variables

**Anticuerpos anti-Virus de la Hepatitis E.-** Son inmunoglobulinas en consecuencia de la respuesta humoral y se caracteriza por un aumento de la IgM en las fases iniciales, seguido por el cambio en la síntesis de IgG.

**Anticuerpos anti-VHE IgM-** Es la primera inmunoglobulina que sintetiza el neonato por sí mismo, y también es la primera en aparecer durante la respuesta primaria.

**Anticuerpos anti-VHE IgG-** Es el isotipo más abundante en suero, constituyendo el 80% de la Ig totales y son las que mayoritarias durante la respuesta secundaria.

### 3.4 Población y muestra

La población estaba conformada por todos los sueros conservados por congelación de las mujeres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé”.

Estuvo conformada por las 316 crioviales (muestras congeladas) del mes de diciembre del 2018 a enero del 2019.

### 3.5 Instrumento

Para la recolección de los datos, se solicitó el permiso a la institución donde se llevará a cabo el presente trabajo, donde se utilizó el Consentimiento Informado y la Ficha de Encuesta en el Hospital Nacional “San Bartolomé”. INSTRUMENTO VALIDADO

### 3.6 Procedimientos

Durante el periodo comprendido entre diciembre y enero se tomó en el HONADOMANI San Bartolomé, por conveniencia 300 a 400 muestras de suero de mujeres embarazadas que tengan perfil prenatal y acepten participar en el estudio firmando previamente el consentimiento informado, con la cual se les realizó un cuestionario.

Para la realización del ensayo, se utilizó muestras de suero. Las muestras de sangre se recogieron en tubos vacutainer al vacío sin anticoagulante. Posteriormente, la muestra sanguínea se separó en sus componentes a 3500 rpm por 5 minutos.

Este estudio consistió en procesar un número de muestras mediante una metodología, la cual fue: **ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)** de BEIJING WANTAI BIOLOGICAL PHARMACY ENTERPRISE Ig G e Ig M cuyo método es la reacción de los anticuerpos de la muestra frente a los antígenos unidos a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas que no se unan durante la primera incubación serán eliminadas en el primer lavado, pero en caso de persistir inmunoglobulinas específicas formarán el complejo antígeno-anticuerpo que se unirá a la anti- inmunoglobulina humana (anti-Ig G) marcada con una enzima (Conjugado HRP). Luego de la segunda incubación serán eliminados en el segundo lavado, pero en caso de persistir inmunoglobulinas específicas se le añadirán soluciones cromógenas que contienen el sustrato (TMB) y peróxido de urea a los pocillos, originando una reacción coloreada azul que migrará a color amarillo en la adición de la solución de parada, las placas de ELISA serán llevadas al lector Elisa marca GEA LINEAR para su lectura de absorbancias y cálculo. Todo el procedimiento será elaborado bajo protocolos de ensayo de la casa comercial y sometida a la verificación con sus controles respectivos.

Estos inmunoensayos comerciales utilizan antígenos sintéticos específicos del HEV de las regiones conservadas e inmunodominantes de las proteínas sintetizadas por los ORF2 y ORF3 de aislamientos de los genotipos 1 y 2.

**. HEV-IgG ELISA Kit (Wantai Hepatitis E Virus Diagnostics, anexo n° 4)**

Este kit es un ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos clase IgG del virus de la hepatitis de la hepatitis E en suero o plasma humano.

El kit contiene:

- Placa de micropocillos
- Control negativo
- Control positivo
- Conjugado de HRP
- Diluyente de muestras
- Buffer de lavado
- Solución cromógena A
- Solución cromógena B
- Solución de Parada

**Descripción**

- Conjugado de HRP**, reactivo a base de anticuerpos anti-IgG humanos conjugados con Peroxidasa de Rábano Picante.
- Solución cromógena A**, solución de peróxido de urea.
- Solución cromógena B**, solución de tetrametilbencidina (TMB).
- Solución de parada**, solución de ácido sulfúrico diluido (0.5M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

## **Indicaciones**

El kit contiene una prueba, que al realizarse detecta inmunoglobulinas IgG.

## **Conservación**

Durante el almacenamiento y transporte el kit debe mantenerse entre 2°C y 8°C.

## **Procedimiento**

### **Materiales**

- a. Gradilla de alambre para sostener los tubos
- b. Micropipeta graduadas para verter 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01 ml y 0,005 ml.
- c. Material de vidrio (probetas) para la dilución del diluyente

### *Procedimiento*

- a. Marcar tres pocillos como control Negativo, dos como control Positivo y uno vacío, que será el Blanco.
- b. Añadir 100µL de diluyente de muestras en cada pocillo, excepto el blanco.
- c. Añadir 10µL de Control Positivo, Control Negativo y la muestra en sus pocillos respectivos, excepto el Blanco.
- d. Incubar la placa cubriéndola a 37°C por 30 minutos.
- e. Lavar cada pocillo 5 veces con Buffer de Lavado diluido.
- f. Añadir conjugado de HRP 100µl.
- g. Incubar la placa cubriéndola a 37°C por 30 minutos.
- h. Lavar cada pocillo 5 veces con Buffer de Lavado diluido.
- i. Añadir 50µL de Solución Cromógena A y 50µL de Solución Cromógena B en cada pocillo.
- j. Incubar a 37°C por 15 minutos evitando la luz
- k. Añadir 50µL de Solución de Parada.



I. Medir la absorbancia en el lector de placas.

### **Control de calidad y cálculo de resultados**

Cálculo del valor de Cut-off o punto de corte (**C.O.**) =  $N_c + 0.16$  (**N<sub>c</sub>**= el valor de absorbancia media para tres controles negativos)

Control de Calidad (validación del ensayo): Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de Control de Calidad.

-El valor A del pocillo Blanco, que contiene solo Cromógeno y Solución de Parada es  $< 0.080$  a 450 nm.

-Los valores A del control Positivo debe ser  $\geq 0.800$  a 450/630 nm o a 450 nm después del “blanqueo”.

-Los valores A del control Negativo debe ser  $\leq 0.100$  a 450/630 nm o a 450 nm después del “blanqueo”.

Si uno de los valores A del control Negativo no cumple los criterios de Control de Calidad, debe ser descartado, y el valor medio debe ser calculado usando los dos valores restantes. Si más de un valor A del control Negativo no cumple los criterios de Control de Calidad, la prueba es inválida y debe repetirse.

### **Interpretación**

**Resultados Negativos** ( $A/C.O. < 1$ ): Muestras con un valor A menor del punto de corte Cut-off son negativos, lo que indica que no se detectaron anticuerpos IgG para VHE con este kit, por lo tanto, no hay indicadores serológicos de infección con VHE.

**Resultados Positivos** ( $A/C.O. \geq 1$ ): Muestras con un valor A igual o mayor al del punto de corte Cut-off son considerados inicialmente reactivos, lo que indica que probablemente se han detectado anticuerpos IgG para VHE con este kit.

**Límite o Bordeline**(A/ C.O. = 0.9-1.1): Muestras con una razón de valor A/ punto de corte Cut-off de entre 0.9 y 1.1 son considerados límite y se requiere probar de nuevo en duplicado para confirmar los resultados iniciales.

**. HEV-IgM ELISA Kit (Wantai Hepatitis E Virus Diagnostics, anexo n°5)**

Este kit es un ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos clase IgM del virus de la hepatitis de la hepatitis E en suero o plasma humano.

El kit contiene:

- Placa de micropocillos
- Control negativo
- Control positivo
- Conjugado de HRP
- Diluyente de muestras
- Buffer de lavado
- Solución cromógena A
- Solución cromógena B
- Solución de Parada

**Descripción**

- Conjugado de HRP**, reactivo a base de antígenos HEV recombinantes conjugados con Peroxidasa de Rábano Picante.
- Solución cromógena A**, solución de peróxido de urea.
- Solución cromógena B**, solución de tetrametilbencidina (TMB).
- Solución de parada**, solución de ácido sulfúrico diluido (0.5M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

**Indicaciones**

El kit contiene una prueba, que al realizarse detecta inmunoglobulinas IgG.

### **Conservación**

Durante el almacenamiento y transporte el kit debe mantenerse entre 2°C y 8°C.

### **Procedimiento**

#### **Materiales**

- a. Gradilla de alambre para sostener los tubos
- b. Micropipeta graduadas para verter 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01 ml y 0,005 ml.
- c. Material de vidrio (probetas) para la dilución del diluyente

#### *Procedimiento*

- a. Marcar tres pocillos como control Negativo, dos como control Positivo y uno vacío, que será el Blanco.
- b. Añadir 100µL de diluyente de muestras en cada pocillo, excepto el blanco.
- c. Añadir 10µL de Control Positivo, Control Negativo y la muestra en sus pocillos respectivos, excepto el Blanco.
- d. Incubar la placa cubriéndola a 37°C por 30 minutos.
- e. Lavar cada pocillo 5 veces con Buffer de Lavado diluido.
- f. Añadir conjugado de HRP 100µl.
- g. Incubar la placa cubriéndola a 37°C por 30 minutos.
- h. Lavar cada pocillo 5 veces con Buffer de Lavado diluido.
- i. Añadir 50µL de Solución Cromógena A y 50µL de Solución Cromógena B en cada pocillo.
- j. Incubar a 37°C por 15 minutos evitando la luz
- k. Añadir 50µL de Solución de Parada.
- l. Medir la absorbancia en el lector de placas.

## **Control de calidad y cálculo de resultados**

Cálculo del valor de Cut-off o punto de corte (**C.O.**) =  $N_c + 0.26$  (**N<sub>c</sub>**= el valor de absorbancia media para tres controles negativos)

Control de Calidad (validación del ensayo): Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de Control de Calidad.

-El valor A del pocillo Blanco, que contiene solo Cromógeno y Solución de Parada es  $< 0.080$  a 450 nm.

-Los valores A del control Positivo debe ser  $\geq 0.800$  a 450/630 nm o a 450 nm después del “blanqueo”.

-Los valores A del control Negativo debe ser  $\leq 0.100$  a 450/630 nm o a 450 nm después del “blanqueo”.

Si uno de los valores A del control Negativo no cumple los criterios de Control de Calidad, debe ser descartado, y el valor medio debe ser calculado usando los dos valores restantes. Si más de un valor A del control Negativo no cumple los criterios de Control de Calidad, la prueba es inválida y debe repetirse.

## **Interpretación**

**Resultados Negativos** ( $A/C.O. < 1$ ): Muestras con un valor A menor del punto de corte Cut-off son negativos, lo que indica que no se detectaron anticuerpos IgM para VHE con este kit, por lo tanto, no hay indicadores serológicos de infección con VHE.

**Resultados Positivos** ( $A/C.O. \geq 1$ ): Muestras con un valor A igual o mayor al del punto de corte Cut-off son considerados inicialmente reactivos, lo que indica que probablemente se han detectado anticuerpos IgM para VHE con este kit.

**Límite o Bordeline** ( $A/ C.O. = 0.9-1.1$ ): Muestras con una razón de valor A/ punto de corte Cut-

off de entre 0.9 y 1.1 son considerados límite y se requiere probar de nuevo en duplicado para confirmar los resultados iniciales.

Las diluciones son manuales según el inserto de la casa comercial.

### **Equipo**

- Lector de ELISA marca ROBONIK
- Lavador de ELISA marca GEA LINEAR
- Impresora marca HP
- Rotador Digysystem

### **Materiales**

- Pipetas
- Puntas descartables
- Guantes
- Crioviales
- Papel
- Papel filtro
- Parafilm

### **3.7 Análisis de datos**

El análisis de datos se realizó con el programa estadístico SPSS.

#### IV. RESULTADOS

De los sueros de las 316 madres gestantes se tiene:

##### Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en madres gestantes

Se estimó que, de los 316 casos, el 14.5% (46 gestantes) fueron positivos, mientras que el 85.5% (270 gestantes) fueron negativos.

	Número de casos	Frecuencia
Positivo	46	14.5%
Negativo	270	85.5%
Total	316	100.0%

##### Tabla N °1

Se estimó que el 0.6% (2 madres gestantes) dieron positivos tanto para IgG VHE como para IgM VHE, del 14.2% (45 madres gestante) dieron positivo para IgG VHE, pero negativo para IgM VHE, el 0.3% (1 madre gestante) dio negativo para IgG VHE y positivo para IgM VHE, finalmente del 84.8% (268 madres gestantes) dieron negativo para IgG VHE y también negativo para IgM VHE.

		IgM VHE		Total	
		Negativo	Positivo		
IgG VHE	Negativo	N	268	1	269
		%	84,8%	0,3%	85,1%
	Positivo	n	45	2	47
		%	14,2%	0,6%	14,9%
Total	n	313	3	316	
	%	99,1%	0,9%	100,0%	

**Tabla N °2**

**Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo al lugar de procedencia de las madres gestantes**

Se determinó que de las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 83% (39 gestantes) tienen como procedencia Lima, de la misma forma, de las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7% (2 gestantes) tienen como procedencia Lima.

Procedencia	IgG VHE				IgM VHE			
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
LIMA	195	72.5%	39	83.0%	232	74.1%	2	66.7%
CALLAO	4	1.5%	2	4.3%	6	1.9%	0	0.0%
HUANUCO	5	1.9%	2	4.3%	7	2.2%	0	0.0%
HUANCAYO	4	1.5%	1	2.1%	5	1.6%	0	0.0%
HUARMEY	0	0.0%	1	2.1%	1	0.3%	0	0.0%
ICA	1	0.4%	1	2.1%	2	0.6%	0	0.0%
JUNIN	3	1.1%	1	2.1%	4	1.3%	0	0.0%
AMAZONAS	2	0.7%	0	0.0%	2	0.6%	0	0.0%
ANCASH	6	2.2%	0	0.0%	6	1.9%	0	0.0%
APURIMAC	3	1.1%	0	0.0%	3	1.0%	0	0.0%
AREQUIPA	1	0.4%	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
AYACUCHO	2	0.7%	0	0.0%	2	0.6%	0	0.0%
BAGUA	1	0.4%	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
CAJAMARCA	8	3.0%	0	0.0%	8	2.6%	0	0.0%
CAÑETE	1	0.4%	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
CHICLAYO	4	1.5%	0	0.0%	4	1.3%	0	0.0%
LA LIBERTAD	4	1.5%	0	0.0%	4	1.3%	0	0.0%
LAMBAYEQUE	2	0.7%	0	0.0%	1	0.3%	1	33.3%
LORETO	3	1.1%	0	0.0%	3	1.0%	0	0.0%
PASCO	2	0.7%	0	0.0%	2	0.6%	0	0.0%
PIURA	4	1.5%	0	0.0%	4	1.3%	0	0.0%
PUCALLPA	2	0.7%	0	0.0%	2	0.6%	0	0.0%
PUNO	4	1.5%	0	0.0%	4	1.3%	0	0.0%
COREA DEL SUR	1	0.4%	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
ARGENTINA	1	0.4%	0	0.0%	1	0.3%	0	0.0%
VENEZUELA	6	2.2%	0	0.0%	6	1.9%	0	0.0%
<b>Total</b>	<b>269</b>	<b>100.0%</b>	<b>47</b>	<b>100.0%</b>	<b>313</b>	<b>100.0%</b>	<b>3</b>	<b>100.0%</b>

**Tabla N °3**

Se halló que de las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 21.3% (10 gestantes) tienen como origen Cercado de Lima, asimismo, de las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) tienen como origen Callao, Los Olivos y Puente Piedra respectivamente.

Distrito	IgG VHE				IgM VHE			
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CERCADO DE LIMA	37	13.8%	10	21.3%	47	15.0%	0	0.0%
SAN MARTIN DE PORRES	39	14.5%	7	14.9%	46	14.7%	0	0.0%
INDEPENDENCIA	12	4.5%	3	6.4%	15	4.8%	0	0.0%
RIMAC	11	4.1%	3	6.4%	14	4.5%	0	0.0%
SJL	19	7.1%	3	6.4%	22	7.0%	0	0.0%
ATE	4	1.5%	2	4.3%	6	1.9%	0	0.0%
BREÑA	5	1.9%	2	4.3%	7	2.2%	0	0.0%
CALLAO	9	3.3%	2	4.3%	10	3.2%	1	33.3%
CARABAYLLO	10	3.7%	2	4.3%	12	3.8%	0	0.0%
LOS OLIVOS	18	6.7%	2	4.3%	19	6.1%	1	33.3%
SAN JUAN DE LURIGANCHO	13	4.8%	2	4.3%	15	4.8%	0	0.0%
Otro distrito	92	34.2%	9	19.1%	100	31.9%	1	33.3%
		100.0		100.0		100.0		100.0
Total	269		47		313		3	

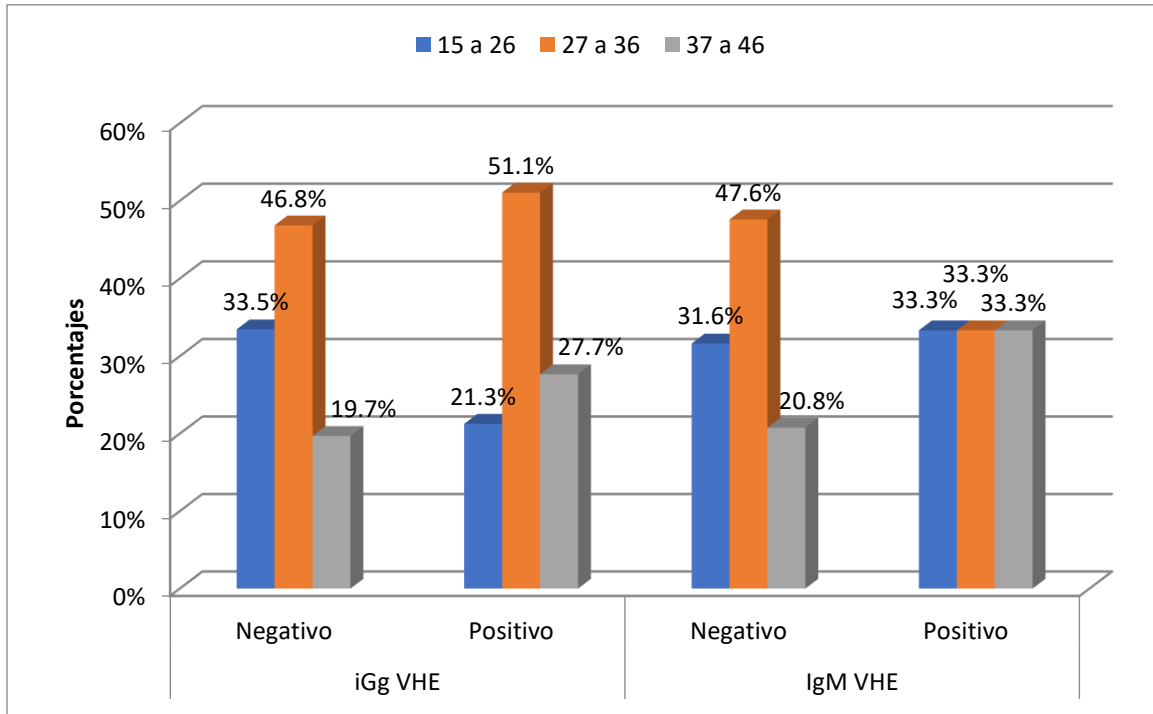
**Tabla N °4**

#### **Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con la edad de las madres gestantes**

Se encontró que de las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 51.1% (24 gestantes) presentan edades de 27 a 36 años, el 27.7% (13 gestantes) presentan edades entre 37 a 46 años y solo el 21.3% (10 gestantes) presentan edades entre 15 a 26 años. Sobre la base de la prueba chi- cuadrado ( $X^2=3.239$  y  $Sig=0.198>0.05$ ) se puede afirmar que no existe relación entre la edad de la gestante y la condición del IgG VHE. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo



para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) presenta edad entre 15 a 26 años, el mismo resultado se observó en los grupos de edad de 27 a 36 años y 37 a 46 años.



**Figura N °1**

### **Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo a la edad gestacional de embarazo de las madres gestantes**

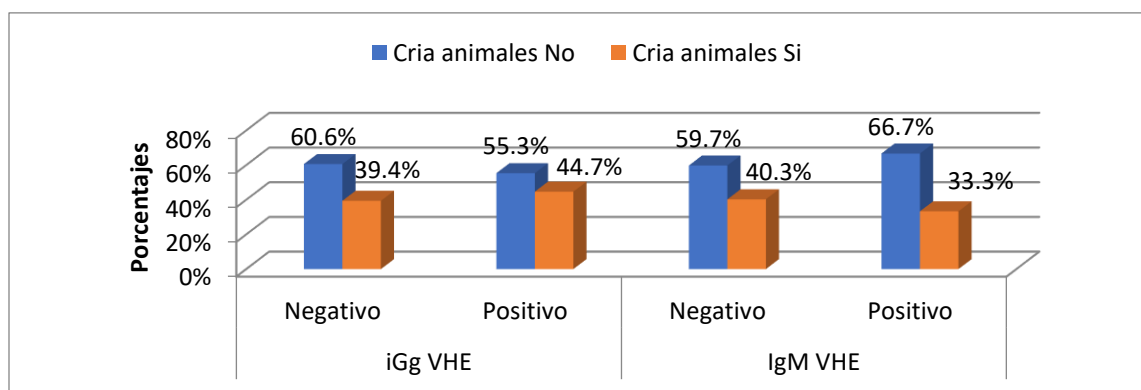
Se encontró que de las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 42.6% (20 gestantes) están en el periodo gestacional II, el 38.3% (18 gestantes) están en el periodo gestacional III y solo el 19.1% (9 gestantes) están en el periodo gestacional I. Sobre la base de la prueba chi-cuadrado ( $X^2=1.232$  y  $Sig=0.54>0.05$ ) se puede afirmar que no existe relación entre la edad gestacional y la condición del IgG VHE. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7% (2 gestantes) están en el periodo gestacional II, el 33.3% (1 gestante) está en el periodo gestacional I y ninguna se encuentra en el periodo gestacional III.

Periodo del tiempo gestacional	IgG VHE (+=Pos / -=neg)				IgM VHE (+=Pos / -=neg)			
	No		Si		No		Si	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I	61	22.7%	9	19.1%	69	22.0%	1	33.3%
II	92	34.2%	20	42.6%	110	35.1%	2	66.7%
III	116	43.1%	18	38.3%	134	42.8%	0	0.0%
Total	269	100.0%	47	100.0%	313	100.0%	3	100.0%

**Tabla N °5**

**Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo al contacto con animales en madres gestantes**

Se encontró que de las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 55.3% (26 gestantes) no tienen contacto con animales y el 44.7% (21 gestantes) si tienen contacto con animales. Sobre la base de la prueba chi- cuadrado ( $X^2=0.463$  y  $Sig=0.496>0.05$ ) se puede afirmar que no existe relación entre el contacto con animales y la condición del IgG VHE. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7% (2 gestantes) no presentan contacto con animales y el 33.3% (1 gestante) si presenta contacto con animales.



**Figura N °2**

## Seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con el consumo de agua en madres gestantes

Se estimó que de las 47 madres gestantes con seroprevalencia de anticuerpo positiva IgG VHE el 81.4% (39 madres gestantes) consume agua potable y el 17.0% (8 madres gestantes) no consume agua potable, sobre la base de la prueba chi-cuadrada de independencia ( $X^2=0.0655$  y  $Sig=0.7980>0.05$ ) se puede afirmar que no existe relación entre la presencia de IgG VHE y el consumo de agua potable. De las 3 madres gestantes con seroprevalencia de anticuerpo positiva IgM VHE el 100% (3 madres gestantes) consume agua potable y el 0% no consume agua potable, sobre la base de la prueba chi-cuadrada de independencia ( $X^2=0.6809$  y  $Sig=0.4093>0.05$ ) se puede afirmar que no existe relación entre la presencia de IgM VHE y el consumo de agua potable.

Consumo agua potable	IgG VHE				IgM VHE			
	Negativa		Positiva		Negativa		Positiva	
	n	%	n	%	n	%	n	%
No	50	18.6%	8	17.0%	58	18.5%	0	0.0%
Si	219	81.4%	39	83.0%	255	81.5%	3	100.0%
Total	269	100.0%	47	100.0%	313	100.0%	3	100.0%

**Tabla N ° 6**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, la seroprevalencia de anticuerpos antiviral de hepatitis E en mujeres gestantes del hospital san Bartolomé 2018, fue de 14,5% la frecuencia de seropositividad de Ig G e Ig M fue de 45 y 1 pacientes gestantes, respectivamente (tabla N°1), lo que se interpreta como la frecuencia positiva alta en comparación con el estudio de Guangyu G. (2015), en China, el cual demostraba alta mortalidad (15-20%), en 19904 gestantes. La seropositividad del 14,2% para Ig G, representados por 45 pacientes, y de 0.3% la frecuencia de seropositividad de Ig M, representada por 1 paciente (según tabla 2), comparado con el estudio de Obiri-Yeboah D. (2018), en Ghana (12,2% de seropositividad de Ig G y 0.2% de seropositividad de Ig M), resultaron muy similares. De las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para Ig G VHE, el 83% (39 gestantes) tiene como procedencia Lima, de la misma forma de las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7%(2 gestantes) tienen como procedencia Lima, como se observa en la tabla N°3, comparado con el estudio de Cong W. (2015), quien señala que en países subdesarrollados el VHE se transmite por vía fecal-oral por el consumo de agua contaminada con eliminación de aguas de residuo, a diferencia de nuestro estudio, en el lugar de residencia el agua no fue el foco de infección a excepción del suelo, precisando que el nivel de saneamiento ambiental sería un factor predisponente en la infección en ambos estudios. Por lo tanto, se sugiere que en estudios posteriores debe centrarse en el análisis de muestras ambientales con el fin de evaluar el nivel de contaminación de las localidades con VHE. De las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 51.1% (24 gestantes) presentan edades de 27 a 36 años, el 27.7% (13 gestantes) presentan edades entre 37 a 46 años y solo el 21.3% (10 gestantes) presentan edades entre 15 a 26 años (Tabla N°5), pudiéndose observar que no existe relación entre la edad de la gestante y la

condición del IgG VHE. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) presenta edad entre 15 a 26 años, el mismo resultado se observó en los grupos de edad de 27 años a 36 años y 37 a 46 años. Sin embargo, en comparación con el estudio de Abebe M. (2017), se encontró una asociación significativa entre la edad y los valores positivos altos anti HEV, los cuales demuestran las probabilidades de las mujeres embarazadas con edad entre 26-34 años estar infectados con VHE. La sinérgica asociación entre la edad y la seroprevalencia del VHE refleja probablemente la vida útil de exposición acumulativa al virus en ambos estudios. De las 47 gestantes (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 42,6% (20 gestantes) están en el periodo gestacional II, el 38,3% (18 gestantes) están en el periodo gestacional III y solo el 19.1% (9 gestantes) están en el periodo gestacional I. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7% (2 gestantes) están en el periodo gestacional II, el 33.3% (gestante) está en el periodo gestacional I y ninguna se encuentra en el periodo gestacional III. En comparación con el estudio de Abebe M. (2017), se encontró en el segundo trimestre una mayor prevalencia de la infección por VHE que en el primer y tercer trimestre la cual fue 35.8% (49 gestantes de 137 gestantes). En otro estudio realizado por Cong W. (2015), se encontró mayor prevalencia de la infección por VHE en el tercer trimestre de 18.7% (178 gestantes de 950 gestantes). Podemos afirmar la similitud con nuestro estudio, por lo tanto, las tasas de morbi-mortalidad por hepatitis E aumentan a medida que progresa la gestación que podría variar en el segundo o tercer trimestre. En relación con la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV en las gestantes con el contacto con animales (gatos, cerdos y perros) de las 47 de ellas (100%) que dieron positivo para IgG VHE, el 55.3% (26 gestantes) no tienen contacto con animales y el 44.7% (21 gestantes) si tienen contacto con animales. De las 3 gestantes (100%) que dieron positivo para IgM VHE, el 66.7% (2 gestantes) no presentan contacto con animales y el 33.3% (1 gestante) si presenta contacto con animales; y

comparando con el estudio de Cong W. (2015), se encontró una mayor prevalencia de 28.6% (58/203 gestantes) de contacto con gatos, mientras que en contacto con cerdos fue 26.5% (57/215 gestantes), además el contacto con perros fue de 19.4% (12/62 gestantes), por lo tanto, los datos obtenidos indican una mayor seroprevalencia HEV en las personas con contacto con gatos, cerdos y perros. En este estudio la importancia que cumple el contacto con cerdos por ser China la industria porcina más grande en el mundo, en cuanto a los gatos y perros a las medidas de higiene que se podrían establecer en el manejo y la alimentación de estos. Además, las mujeres embarazadas especialmente aquellas que viven en zonas rurales y marginales deben ser conscientes de los riesgos de transmisión que podrían adquirir. En la Tabla N° 6 se obtuvo de las 47 madres gestantes con seroprevalencia de anticuerpo positiva IgG VHE el 81.4% (39 madres gestantes) consume agua apta para el consumo humano 17.0% (8 madres gestantes) consume agua no apta para el consumo humano (agua de cisternas, pozo). De las 3 madres gestantes con seroprevalencia de anticuerpo positiva IgM VHE el 100% (3 madres gestantes) consume agua apta para el consumo humano y el 0% consume agua no apta para el consumo humano. En comparación con el estudio de Cong W. (2015), se estimó que la frecuencia del uso de grifo como fuente de agua fue del 16% (48/740); mientras que el de pozo y río fue de 16.8% (42/250). En los países en desarrollo, el VHE se transmite por vía fecal-oral, principalmente por el consumo de agua contaminada con eliminación de aguas residuales, especialmente en las zonas rurales donde se considera la falta de saneamiento e higiene. Sin embargo, el presente estudio mostró que el tipo de zona de residencia fuente (/ rural urbano / suburbano) el agua no fueron los principales causantes de la infección, a excepción de la presencia de suelo. Por lo tanto, la comparación entre los diferentes estudios será difícil debido a las diferencias en los niveles de saneamiento, la selección de la muestra y exposición de por vida, se sugiere realizar nuevos estudios que se centren en el

análisis de muestras ambientales con el fin de evaluar el nivel de contaminación de las comunidades con VHE.

Los resultados de este estudio son muy similares al que reporto Obiri-Yeboah D. en Ethiopia en el 2018, ya que él obtuvo una seroprevalencia de anti-HEV Ig G y anti-HEV IgM de 12,2% y 0.2% respectivamente.

La frecuencia obtenida de este estudio es casi análogo al que reporto Guangyu G. en China en el 2015, puesto que él obtuvo una seroprevalencia de anti-HEV Ig G y anti-HEV IgM de 11,1% (55/497) y 0.6% (3/497) respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio son casi semejantes al que reporto Cong W. en China en el 2015, dado que él obtuvo una seroprevalencia de Ig G anti-HEV de 16.2%; Ig M anti-HEV, 2.6% en mujeres gestantes.

La frecuencia obtenida de este estudio es parecida al que proporciono Peláez D. en Colombia en el 2014, puesto que él obtuvo una seroprevalencia de 8.7% (30/344); de estas, 1.74%(6/344) presento IgM anti-HEV y 7.5% (26/344), IgG anti-HEV, asimismo podemos señalar de que los pacientes en este estudio son tantos varones como mujeres y no exclusivamente mujeres gestantes.

Los resultados obtenidos en este estudio son semejantes al que reporto Abebe M. en Ethiopia en el 2017, ya que obtuvo una seroprevalencia de Ig G anti-HEV de 31.6% (122/386); Ig M anti-HEV, 0.5% (2/386) en mujeres gestantes.

El propósito de este estudio fue generar conocimiento de cómo abordar a la infección por VHE durante el embarazo y determinar los agentes más prevalentes, así como las vías de transmisión y riesgo para el binomio madre-niño, con la finalidad de implementar estrategias de acción y manejo

(protocolos y guías clínicas para el tratamiento de esta infección por VHE) para desarrollarlas y disminuir la morbimortalidad de gestantes infectadas por VHE. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la alta seropositividad de infección VHE en gestantes tanto en el II y/o III trimestre de embarazo. Por lo tanto, se requiere de personal entrenado, insumos (vacunas), materiales y capacitación constante con el objetivo de combatir esta infección por VHE, así como también de estudios para demostrar la utilidad necesaria de implementación adecuada para realizar pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias para la detección precoz de esta infección VHE. Por ello teniendo este primer estudio en América con resultados que ameriten su revisión y evaluación hacemos un llamado a las entidades de salud y al gobierno local para el apoyo y aporte de bienes y divisas que permitan la adquisición de estos materiales e insumos para su realización y así disminuir las tasas de morbimortalidad en gestantes de esta infección por VHE. Se sugiere estudios futuros para comparar la prevalencia de otros tipos de virus de la hepatitis A, B Y C con la incidencia de VHE.



## VI. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia para el virus de la hepatitis E en gestantes del Hospital San Bartolomé fue de 14,5% (45/316); de estas, 0,3% (1/316) presento IgM anti-HEV y 14,2% (45/316), IgG anti-HEV.
2. De acuerdo al lugar de procedencia, las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE y las 3 gestantes seropositivas para IgM VHE, el 83% y el 66.7% respectivamente tienen como procedencia Lima.
3. De acuerdo a la edad de las madres, las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE, el 51,11% (24 gestantes) presentan edades de 27 a 36 años, de igual modo, de las 3 seropositivas para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) presenta edad entre 15 a 26 años
4. Se determinó que de acuerdo a la edad gestacional de embarazo las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE, el 42.6 % (20 gestantes) están en el periodo gestacional II, el 38.3 % (18 gestantes) están en el periodo gestacional III. Asimismo, de las 3 gestantes seropositivas para IgM VHE, el 66.7 % (2 gestantes) están en el periodo gestacional II y el 33.3% (1 gestante) están el periodo gestacional I.
5. De acuerdo al contacto con animales, de las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE, el 44.7% (21 gestantes) si tienen contacto con animales. De las 3 gestantes seropositivas para IgM VHE, el 33.3% (1 gestante) si presenta contacto con animales.
6. De acuerdo con el consumo de agua, de las 47 gestantes seropositivas para IgG VHE el 81.4% (39 madres gestantes) consume agua apta para el consumo humano. De las 3 gestantes seropositivas para IgM VHE el 100% consume agua apta para el consume humano.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1.** Realizar capacitaciones a los profesionales de la salud en el tamizaje, detección, tratamiento y prevención de este patógeno en los distintos establecimientos de salud del país.
- 2.** Efectuar estudios complementarios a este estudio base con el propósito de estar mejor preparados ante cualquier ocurrencia con respecto a este patógeno
- 3.** Estimar un número determinado de reactivos con la finalidad de poder detectar este agente infeccioso.

## VIII. REFERENCIAS

- Abebe, M., Ali, I., Ayele, S., Overbo, J., Aseffa, A., & Mihret, A. (2017). Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E Virus infection among pregnant women in Addis Ababa, Ethiopia. *PLOS ONE*, *12*(6), e0180078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180078>
- Cong, W., Sui, J.-C., Zhang, X.-Y., Qian, A.-D., Chen, J., & Zhu, X.-Q. (2014). Seroprevalence of hepatitis E virus among pregnant women and control subjects in China. *Journal of Medical Virology*, *87*(3), 446-450. <https://doi.org/10.1002/jmv.24058>
- Echevarría, J. M., González, J. E., Lewis Ximenez, L. L., Lopes dos Santos, D. R., Munné, M. S., Pinto, M. A., ... Rodríguez Lay, L. A. (2013). Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A Review. *Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Feng, Y., Feng, Y.-M., Wang, S., Xu, F., Zhang, X., Zhang, C., ... Yin, J. (2018). High seroprevalence of hepatitis E virus in the ethnic minority populations in Yunnan, China. *Plos One*, *13*(5), e0197577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197577>
- Gu, G., Huang, H., Zhang, L., Bi, Y., Hu, Y., & Zhou, Y. H. (2015). Hepatitis E virus seroprevalence in pregnant women in Jiangsu, China, and postpartum evolution during six years. *BMC Infectious Diseases*, *15*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1308-y>
- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(1), 116–138. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
- Lange, H., Overbo, J., Borgen, K., Dudman, S., Hoddevik, G., Urdahl, A. M., ... Sjurseth, S. K. (2017). Hepatitis e in Norway: Seroprevalence in humans and swine. *Epidemiology and Infection*, *145*(1), 181–186. <https://doi.org/10.1017/S0950268816002144>
- Obiri-Yeboah, D., Asante Awuku, Y., Adu, J., Pappoe, F., Obboh, E., Nsiah, P., Amoako-Sakyi,

- D., & Simpure, J. (2018b). Sero-prevalence and risk factors for hepatitis E virus infection among pregnant women in the Cape Coast Metropolis, Ghana. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191685>
- OMS. (2017). Hepatitis E. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- Peláez, D., Hoyos, M., Rendón, J., Mantilla, C., Ospina, M., Cortés-Mancera, F., ... Navas, M. (2014). Infección por el virus de la hepatitis E en pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral en Colombia. *Biomédica*, *34*(3), 354–365.
- Rodríguez-Frias, F., Jardi, R., & Buti, M. (2012). Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(10), 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.014>
- Sánchez Partidas, D. A., & Gutiérrez García, C. del R. (2012). Virus de la hepatitis E. Características biológicas y epidemiológicas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *32*. <https://doi.org/10.4270/ruc.2010216>

## **IX. ANEXOS**

### **ANEXO N°1**

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Título: Seroprevalencia de anticuerpos anti-Virus de Hepatitis E en mujeres gestantes en hospital San Bartolomé**

**Investigador:** Carlos Gerardo Ochoa Rojas.

**¿Cuál es el propósito de este estudio?**

El Servicio de Patología Clínica del Área de Laboratorio de Inmunología está realizando una investigación en mujeres gestantes con casos de Hepatitis E. Esta infección se manifiesta en forma de hepatitis aguda debido principalmente a la contaminación de los suministros de agua potable. Por lo que deseamos realizar el presente estudio con el fin de conocer la seroprevalencia del anticuerpo contra el Virus de la Hepatitis E, presente este grupo de riesgo para su prevención.

**¿Quiénes pueden participar en este estudio?**

Pueden participar en este estudio las gestantes que acudan a realizarse los controles de perfil prenatal con orden del médico ginecobstetra.

**¿Cuál es el procedimiento?**

Para realizar este estudio necesitamos tomarle a Ud. Una muestra de 5 ml. (una cucharadita) de sangre de su antebrazo. Las muestras obtenidas serán procesadas en el Laboratorio de Inmunología del hospital San Bartolomé-Lima. De encontrarse positivo se le comunicará directamente, manteniendo en todo momento la confidencialidad de esta información.

Se le entregara una encuesta para obtener datos importantes para el estudio de investigación (tales como edad, procedencia, antecedentes y otros).

**¿Cuáles son los posibles riesgos de este estudio?**

Este estudio de investigación no implica algún riesgo que comprometa su salud en lo absoluto.

**¿Cuáles son los beneficios de este estudio?**

Usted se beneficiará con los exámenes para saber si tiene la infección por el Virus de la Hepatitis E. La participación **no le costará (GRATUITO)** a Ud. Absolutamente nada.

**¿Si tengo preguntas o inquietudes sobre este estudio de investigación, a quien puedo llamar?**

Si usted tiene dudas puede hacer las preguntas que crea necesarias en este momento o al término de la lectura de este documento. Si usted tiene más preguntas sobre el estudio posteriormente puede contactarse, llamando al teléfono **922624890** o escribir al correo electrónico [caor9410@gmail.com](mailto:caor9410@gmail.com)

Asimismo, si tiene alguna consulta puede comunicarse con el Lic. Tecnólogo Medico Manolo León Velásquez. Licenciado a cargo del servicio de Inmunología del Hospital San Bartolomé.

Su participación en este estudio de investigación es voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Si usted no participa del estudio, esto no afectara su tratamiento médico, o sus beneficios de salud en el hospital. Incluso si usted decidió participar en este estudio, puede retirarse del mismo en cualquier momento. Cualquier información que usted brinde durante el curso de este estudio será protegida.

**DECLARACION DE LA PARTICIPANTE**

Mi firma líneas abajo significa que:

- He leído este formato de consentimiento, o me lo han leído.
- Deseo participar en este estudio.
- Me han explicado los beneficios y riesgos por participar en este estudio.
- Todas mis preguntas han sido respondidas.
- Recibiré una copia de este formato de consentimiento luego de firmarlo.

**Participante:**

\_\_\_\_\_  
(Nombres y Apellidos de la participante)

\_\_\_\_\_  
**Firma de la participante**

\_\_\_\_\_  
**DNI**

**Nota:** En caso de menores de edad de 17 años los padres o apoderados deberán llenar sus datos y firmar.

\_\_\_\_\_  
**Firma del Apoderado**

\_\_\_\_\_  
**DNI**

## ANEXO N°2

### FICHA DE ENCUESTA

Ficha N° \_\_\_\_\_

Fecha de toma de muestra: \_\_\_\_\_

#### **I. Información básica**

1. Paciente: \_\_\_\_\_

2. Sexo: M ( ) F ( )

3. Edad: \_\_\_\_\_ años; altura: \_\_\_\_\_ cm; peso: \_\_\_\_\_ kg;

4. Estado civil: soltera ( ) casada ( ) viuda ( ) divorciado ( ) otro ( )

5. Residencia actual: \_\_\_\_\_

6. Procedencia: \_\_\_\_\_

7. Profesión u ocupación: \_\_\_\_\_

8. Grado de instrucción: Primaria ( ) Secundaria ( ) Superior ( ) Sin estudios ( )

9. ¿Cuál es su ingreso mensual familiar?: \_\_\_\_\_ soles

#### **II. Hábitos de vida y alimentación**

1. ¿Usted consume agua potable? Si ( ) No ( )

2. El Consumo de agua es: Hervido ( ) Sin hervir ( )

3. Fuentes de captación del agua: Caño ( ) Acequia ( ) Pozo ( ) Cisterna ( )

4. Consume verduras crudas: Si ( ) No ( )

5. Animales que cría: Cerdo ( ) Gato ( ) Perro ( ) No tengo ( )

6. Servicios higiénicos: Baño y ducha ( ) Baño ( ) Silo ( ) No cuento ( )

7. Higiene de manos: Después de ir al baño ( ) Antes y después de ir al baño ( ) No  
realizo higiene de manos frecuentemente ( ) No realizo higiene de manos ( )

Ficha de encuesta modificada de (Feng et al., 2018).

**ANEXO N°3**

**OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Escala/Medición</b>
<b>V1</b>  Virus de la Hepatitis E	Virus de la hepatitis E(VHE) se clasifica como un miembro del género Hepevirus en la familia Hepeviridae, que contiene un genoma de ARN monocatenario de aproximadamente 7.3 kb (Echevarría et al., 2013)	Será analizado por el programa spss versión 23, con la recolección de datos mediante una ficha de encuesta que consta de 13 preguntas.		Inmunoensayo ELISA HEV IgM	Cuantitativa nominal
				Inmunoensayo ELISA HEV IgG	Cuantitativa nominal
<b>V2</b>  Mujer Gestante	El embarazo es una condición de salud pública que involucra adolescentes y mujeres adultas (Luz et al., 2011)		Edad	Historia Clínica	Cuantitativa nominal
			Lugar de Procedencia		
			Edad Gestacional		
			Contacto con animales		
			Consumo de agua		

ELABORACION PROPIA



**ANEXO N°4**

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

<b>Formulación del problema</b>	<b>Objetivos</b>	<b>Hipótesis</b>
<p>¿De qué manera se relaciona el Virus de la Hepatitis E y mujeres gestantes del Hospital San Bartolomé en el 2018?</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar la seroprevalencia de anticuerpo anti-HEV en madres gestantes del Hospital San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>(1) Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con el lugar de procedencia de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p> <p>(2) Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con el distrito de procedencia de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p> <p>(3) Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con la edad de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p> <p>(4) Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con la edad gestacional de embarazo de las madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p> <p>(5) Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-HEV de acuerdo con el consumo de agua no tratada en madres gestantes del Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, durante los meses de diciembre 2018- enero del 2019.</p>	<p>No se plantea</p>

**Wantai Hepatitis E Virus Diagnostics**  
**HEV-IgG ELISA**  
 DIAGNOSTIC KIT FOR IgG ANTIBODIES TO HEPATITIS E VIRUS



Read the package insert carefully and completely before performing the assay. Follow the instructions and do not modify them. Only by strict adherence to these instructions, the erroneous results can be avoided and the optimal performance of WANTAI HEV-IgG ELISA achieved.

**INTENDED USE**

Wanted HEV-IgG ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the qualitative detection of IgG-class antibodies to hepatitis E virus in human serum or plasma. It is intended to be used as an aid in supplementary diagnosis to acute hepatitis E infection and prevalence studies among the population.

**SUMMARY**

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped, single-stranded RNA virus identified in 1980. Infection with HEV induces acute or sub-acute liver disease similar to hepatitis A. HEV infections common and frequently epidemic developing in developing countries. HEV is transmitted through contaminated water. The overall case-fatality is 0.5-3%, and much higher (15-25%) among pregnant women. A hypothesis that HEV infection is a zoonosis was presented in 1995. Then a same HEV and later an strain HEV were identified and sequenced separately in 1997 and 2001. Since then, HEV infection include and HEV-V, Vietnam and Laos infection of HEV was seen in a wide variety of animals, i.e. swine, rodents, wild monkeys, deer, cow, goats, dogs and chicken in both the developing and developed countries. A direct testimony was reported that the consumption of uncooked deer roe infected with HEV led to acute hepatitis E in human. And HEV genome sequences can be detected in pork livers readable in the supermarkets in Japan.

**PRINCIPLE OF THE TEST**

HEV-IgG ELISA employs solid phase, indirect ELISA method for detection of IgG-class antibodies to HEV anti-HEV in two-step incubation procedure. Polystyrene microtiter plates are pre-coated with Hemoalbumin. During the first incubation step, anti-HEV specific antibodies, if present, will be bound to the solid phase pre-coated HEV antigen. The wells are washed to remove unbound serum proteins and then, indirect antibody IgG antibodies conjugated with alkaline phosphatase (AP) are added. The AP-conjugated antibodies will be bound to an antigen-antibody (IgG) complexes (monoclonally formed and the indirect AP-conjugated is then removed by washing. Chromogen solutions containing tetramethylbenzidine (TMB) and user controls are added to the wells and in presence of the antigen antibody-anti-IgG (HEV) immunocomplex, the colorless Chromogens are hydrolyzed by the bound HRP conjugative to a blue colored product. The blue color turns yellow after stopping the reaction with sulfuric acid. The amount of color intensity can be measured and proportional to the amount of antibody captured in the wells, and to the sample respectively. Wells containing sample negative for anti-HEV-IgG remain colorless.

**IN Vitro Diagnostic Use Only**

- UNIT PLATE**  
 C0688 (740.0µl per well)  
 C0689 (740.0µl per well)  
 C0690 (740.0µl per well)  
 C0691 (740.0µl per well)
- CONTROL (-)**  
 C0688 (740.0µl per well)  
 C0689 (740.0µl per well)  
 C0690 (740.0µl per well)  
 C0691 (740.0µl per well)
- CONTROL (+)**  
 C0692 (740.0µl per well)  
 C0693 (740.0µl per well)  
 C0694 (740.0µl per well)  
 C0695 (740.0µl per well)
- WELL STRIP**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)
- ANTIBODY I. HRP**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)
- WASH BUFFER**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)
- CHROMOGEN SOLUTION A**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)
- CHROMOGEN SOLUTION B**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)
- STOP SOLUTION**  
 C0696 (740.0µl per well)  
 C0697 (740.0µl per well)  
 C0698 (740.0µl per well)  
 C0699 (740.0µl per well)

- SIDE SOLUTION**  
 Colorless liquid in a white well with white cap.  
 Diluted sulfuric acid solution (2.0M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).  
 Ready to use as supplied. Once open, stable for one month at 2-8°C.
  - PACKAGE INSERT**  
 For enclosing the strips and in use.
  - PACKAGED PLATE COVER**  
 To cover the plates during incubation and prevent evaporation or contamination of the wells.
- MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**
- Freely diluted or desorbed water, disposable figure and other appropriate waste containers, for potentially contaminated materials, dispensing system and/or pipette, single pipette, single pipette box, absorbent tissue or other towel, dry cleaner or water bath, 37±0.5°C plate reader, single wavelength 450nm or dual wavelength 450/630nm, microplate adaptor/wash system.

- SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTING AND STORAGE**
- Specimen Collection: No special patient's preparation required. Collect the specimen in accordance with the normal laboratory practice. Either fresh serum or plasma specimens can be used with this assay. Blood collected by venipuncture should be allowed to clot naturally and centrifuged - the serum/plasma must be separated from the clot as early as possible as to avoid hemolysis of the HBC. Care should be taken to avoid contact with the specimen. The specimen should be stored at 2-8°C (avoid per particular matters in the specimen should be removed by centrifugation at 3000 RPM (round per minute) for 20 minutes at room temperature by HistoLab.
  - Storage: Specimens should be stored at 2-8°C. Specimens at room temperature or higher should be stored at 2-8°C. Do not store specimens at 37°C or higher. Specimens should be stored in a leak-proof container. Do not use mechanical centrifugation should never be used.
  - Shipping: Specimens should be stored at 2-8°C. Specimens should be shipped in a leak-proof container. Do not use mechanical centrifugation should never be used. Shipping of individual serum or plasma samples. Do not use the assay for testing of cadaver samples, saliva, urine or other body fluids, or pooled (mixed) blood.
  - Transportation and Storage: Store specimens at 2-8°C. Specimens not required for assaying within 3 days should be stored frozen (-20°C or lower). Heliox (helium) freeze-drying vials should be used for the assay for testing of cadaver samples, saliva, urine or other body fluids, or pooled (mixed) blood. Regulations for transportation of clinical samples and biological agents.

**STORAGE AND STABILITY**

The components of the kit will remain stable through the expiration date indicated on the label and package when stored between 2-8°C, do not freeze. To assure maximum performance of WANTAI ELISA, during storage, protect the reagents from contamination with microorganisms or chemicals.

**PRECAUTIONS AND SAFETY**

**TO BE USED ONLY FROM QUALIFIED PROFESSIONALS**

The HEV-IgG ELISA assays are time and temperature sensitive. To avoid incorrect results, strictly follow the test procedure steps and do not modify them.

- Do not exchange reagents from different lots or use reagents from other commercially available kits. The lot numbers and expiration dates of the reagents should be recorded on the kit box and the same lot. Never use reagents from different lots together.
- Always use the reagents in the vials as indicated on the kit box and the same lot. Never use reagents beyond their expiry date on labels or boxes.
- CAUTION - CONTROL STRIP: Allow the reagents and specimens to reach room temperature (18-30°C) before use.
- Use dry sufficient number of sample included in the procedure. Failure to do so, may cause in low sensitivity of the assay.
- After the use of the reagents, the reagents may interfere with the reading. When reading the results, ensure that the plate reader is dry and there are no bubbles under the wells. Never allow the microplate wells to dry after the washing step. Immediately proceed to the next step.
- Avoid the formation of bubbles when adding the reagents.
- Calibrate the plate(s) frequently to assure the accuracy of sample/concentrations differing. Use different disposal pipette tips for each specimen and reagents in order to avoid cross-contaminations.
- When adding the reagents, do not touch the bottom of the wells with the pipette tip.
- When measuring with a plate reader, determine the absorbance at 450nm at 450/630nm.
- The enzymatic activity of the HRP-conjugate may be affected from dust and reactive chemical and substrates. The enzymatic activity should be checked before use.
- The enzymatic activity of the HRP-conjugate may be affected from dust and reactive chemical and substrates. The enzymatic activity should be checked before use.
- When measuring with a plate reader, determine the absorbance at 450nm at 450/630nm.
- The enzymatic activity of the HRP-conjugate may be affected from dust and reactive chemical and substrates. The enzymatic activity should be checked before use.
- When measuring with a plate reader, determine the absorbance at 450nm at 450/630nm.
- The enzymatic activity of the HRP-conjugate may be affected from dust and reactive chemical and substrates. The enzymatic activity should be checked before use.
- When measuring with a plate reader, determine the absorbance at 450nm at 450/630nm.
- The enzymatic activity of the HRP-conjugate may be affected from dust and reactive chemical and substrates. The enzymatic activity should be checked before use.

**WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.

**WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.

15. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
16. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
17. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
18. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
19. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
20. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.
21. **WARNING:** Material from human origin may have been used in the preparation of the Negative Control reagents for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV, HTLV-II and Hepatitis. However, there is no scientific method that can assure that infectious agents in the specimens or reagents are completely absent. Therefore, handle reagents and specimens with extreme caution as if capable of transmitting infectious diseases. Before use, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Do not pipette from the assay in the presence of these reagents. If using fully automated equipment, during incubation, do not cover the plates with the plate cover. The stopping and of the reagents under the plate after washing, can also be omitted.



- Procedure 100**  
 525330\_45  
 R33
- Do not eat and drink**  
 at the laboratory
- Wear protective clothing**  
 New eye protection
- Biohazard**  
 Danger

**PROCEDURE**

**Reagents preparation:** Allow the reagents to reach room temperature (18-24°C). Check the Wash buffer concentrate for the presence of salt crystals. If crystals have formed, resolubilize by warming at 37°C until crystals dissolve. Dilute the Wash buffer (20X) as indicated in the washing step instructions. Use distilled or deionized water and only clean vessels to dilute the buffer. All other reagents are READY TO USE AS SUPPLIED.

**Preparation:** Mark three wells as negative control (NEG: B1, C1, D1), two wells as Positive control (PC: E1, F1), and two wells as Quality Control (QC: G1, H1). The reagents should be stored in the original container. If the results will be read by manual method, the reagents should be stored in the original container for use of Blank well could be better. Use only number of strips required for the test.

**Adding Diluent:** Add 100µl of Specimen Diluent into each well.

**Adding Sample:** Add 10µl of Positive control, Negative control, and Specimen into their respective wells except for the Blank. **Note:** Use a separate disposal pipette tip for each specimen, Negative control, Positive control to avoid cross-contamination. Mix by tapping the plate gently.

**Incubation:** Cover the plate with the plate cover and incubate for 30 minutes at 37°C.

**Washing:** Cover the plate with the plate cover and incubate for 30 minutes at 37°C.

**Washing:** After the end of the incubation, remove and discard the plate cover. Wash each well three times with diluted Washing buffer. Each time allow the microplate to soak for 30-60 seconds. After the final washing cycle, turn down the plate and discard the plate cover and tap to remove any remaining liquid.

**Adding HRP-Conjugate:** Add 100µl HRP-Conjugate to each well except the Blank.

**Washing:** Cover the plate with the plate cover and incubate for 30 minutes at 37°C.

**Washing:** After the end of the incubation, remove and discard the plate cover. Wash each well three times with diluted Washing buffer. Each time allow the microplate to soak for 30-60 seconds. After the final washing cycle, turn down the plate and discard the plate cover and tap to remove any remaining liquid.

**Coloring:** Add 50µl of Chromogen A and 50µl Chromogen B solutions into each well including the Blank. Incubate the plate at 37°C for 15 minutes avoiding light. The enzymatic reaction between the Chromogen solutions and the HRP-Conjugate produces blue color in Positive control and anti-HEV-IgG positive sample wells.

**Stopping Reaction:** Using a multichannel pipette or manually, add 50µl Stop solution into each well and gently, intensive yellow color develops in Positive control and IgG-HEV positive sample wells.

**Adding the Substrate:** Calculate the plate reader with the Blank well as zero. Add the substrate solution into each well. The substrate solution will react with the HRP-Conjugate to produce a color change. Add 50µl of Substrate solution into each well. The substrate solution will react with the HRP-Conjugate to produce a color change. Add 50µl of Substrate solution into each well. The substrate solution will react with the HRP-Conjugate to produce a color change.

Calculate the value and evaluate the results. **Note:** read the absorbance within 5 minutes after stopping the reaction).

**INSTRUCTIONS FOR WASHING**

- A good washing procedure is essential in order to obtain correct and precise analytical data.
- It is therefore recommended to use a good quality ELISA microplate washer (300-400µl/well) at the best level of washing performance. If present, no less than 5 automatic washing cycles.
- To avoid cross-contaminations of the plate with specimen or HRP-conjugate, after incubation, do not discard the content of the wells but allow the plate washer to separate it automatically.
- Assure that the microplate washer liquid dispensing channels are not blocked or contaminated and sufficient volume of Wash buffer is dispensed each time into the wells.
- In case of manual washing, we suggest to carry out 5 washing cycles, dispensing 350-400µl/well and aspirating the liquid for 8 times. If poor results (high background) are observed, increase the washing cycles or soaking time per well.
- After the last washing cycle, the plate should be washed with a sodium hydrochloric solution at a final concentration of 2.5% for 24 hours; before they are washed in an appropriate way.
- The concentrated Wash buffer should be diluted 1:20 before use. If less than a whole plate is used, prepare the proportional volume of solution.

**QUALITY CONTROL AND CALCULATION OF THE RESULTS**

Each microplate should be considered separately when calculating and interpreting the results of the assay, regardless of the number of plates concurrently processed. The results are calculated by relating each specimen absorbance (A) value to the Cut-off value (C.O.) of the plate. If the Cut-off reading is based on single plate reader, the results should be calculated by subtracting the Blank well A value from the print report values of specimens and controls. In case the reading is based on dual plate reader, do not subtract the Blank well A value from the print report values of specimens and controls.

**Calculation of the Cut-off value (C.O.) = Mc + 616 Mc** = the mean absorbance value for three negative controls. Important: if the mean OD value of the negative control is lower than 0.03, take it as 0.03. If higher than 0.03 see the Quality Control.

**Quality Control (assy validation):** The best results are yield if the Quality Control criteria are fulfilled. It is recommended that each laboratory must evaluate appropriate quality control system with quality control material similar to or identical with the patient sample being analyzed.

**Example:**

If one of the Negative control values does not meet the Quality Control criteria, it should be discarded and the mean OD value calculated again using the remaining two values. If more than two Negative control A values do not meet the Quality Control criteria, the test is invalid and must be repeated.

**Example:**

1. Quality Control	Mean Value:	A1: 0.025 at 450nm (After blanking is required only when reading with single filter at 450nm)	
Well No.:	B1	C1	D1
Negative control A values:	0.032	0.031	0.027
Well No.:	E1	F1	
Positive control A values:	2.421	2.399	
Mean values are within the stated quality control range			
2. Calculation of Mc = (0.032+0.031+0.027) ÷ 3 = 0.018			
3. Calculation of the C.O. = (0.03 + 616 × 0.018)			

## INTERPRETATIONS OF THE RESULTS

- After addition of the highly sensitive samples, both wells are negative results (A/C.O. < 0.9), these samples should be considered as non-infectious positive or false positive as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are connected with, but not limited to, inadequate washing step. For more information regarding Wenzhi ELISA Troubleshooting, please refer to Wenzhi's "ELISA and Troubleshooting Guide" or contact Beijing Wenzhi technical support for further assistance.
- Common sources for mistakes: kits beyond the expiry date, bad washing procedures, contaminated reagents, incorrect assay procedure steps, insufficient aspiration during washing, failure to add samples or reagents, equipment, wrong volumes, sample nature and quality.
- The kit is intended ONLY for testing of individual serum or plasma samples. Do not use it for testing of cadaver samples, saliva, urine or other body fluids, or pooled (mixed) blood.
- This is a qualitative assay and the results cannot be used to measure antibodies concentrations.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Detection of HEV antibodies in samples from patients with 10 years of HEV post infection history:

Reagents	Samples	Pos. rate%	Cut-off	Positive samples	OD	Avg pos	SDCO
				lowest	avg	highest	
WT1gG*	50	86	0.148	0.532	1.398	2.227	9.24
EA1**	50	36	0.512	0.514	1.018	2.415	1.98
EA2**	50	30	0.228	0.229	0.427	1.594	2.08

\* Beijing Wenzhi BP HEV1gG ELISA (WT1gG)

\*\* Commercially available HEV1gG ELISA tests.

2. Detection of serial serum samples from acute HEV patients

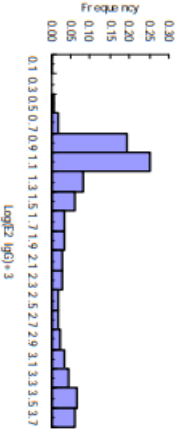
Since no option standard for hepatitis E is available, the reference HEV 1gM assay served as control reagent. Parallel comparison testing was performed with acute hepatitis E samples (Testing Center 1), if the true positive status was defined as positive for any of the two tests used in the study, the sensitivity of Wenzhi HEV1gG and the reference HEV1gG was 97.96% and 91.84% respectively.

In the evaluation of 120 serial sera sample obtained from 30 hepatitis E (Testing Center 2), the sensitivity of Wenzhi HEV1gG was 100%, while the sensitivity of the reference HEV1gG were 93.33%.

The sensitivity of Wenzhi HEV 1gM was 99.08%. In the parallel testing of a total of 216 serum samples of acute hepatitis E, which was significantly higher than the reference HEV 1gG tests (92.66%).

Testing Center	Case Number	WT1gG		EA1**	
		Positive Number	Positive Rate	Positive Number	Positive Rate
1	98	96	97.96%	90	91.84%
2	120	120	100.0%	112	93.33%
TOTAL	218	216	99.08%	202	92.66%

3. Testing 10687 blood samples from blood donors, the results showed in the Fig. 1 from the frequency distribution map, it existed two peaks of WT1gG: the first peak was higher, of which the center was near the OD value 0.0736, representing the people who did not infect HEV. The OD logarithm of the first peak was similar to the log-normal distribution. Considering the first peak as the center, calculate the standard deviation of the data on the left. The corresponding OD values in accordance with 99%-1% and 99.9%-0.1% dependency were 0.086 and 0.122, respectively. The results showed that 99.9% of the blood donors were not infected HEV. The OD value 0.122 represented the HEV infection population, and its logarithm behaved as negative skewed distribution. As a result, the specificity of WT1gG was much higher, with false positive rate at 0.01%.



Sample	Reproducibility		Within Run		Between Run	
	No	Mean SDCO	CV%	Mean SDCO	CV%	
Weak positive	10	4.89	9.1%	4.89	9.5%	
Moderate positive	10	11.21	7.0%	10.49	7.5%	
Strong positive 1	10	16.42	4.2%	16.07	4.4%	
Strong positive 2	10	13.31	3.8%	13.12	4.0%	

## LIMITATIONS

- Positive results must be confirmed with another available method and interpreted in conjunction with the patient clinical information.
1. Non-reproducible positive result may occur due to the general biological and biochemical characteristics of ELISA method. The test is designed to achieve very high performance characteristics of high sensitivity and specificity.
  2. Any positive results must be interpreted in conjunction with patient clinical information and other laboratory testing.
  3. If after retesting of the initially reactive samples, the assay results are negative, these samples should be considered as non-reproducible (false positive) and interpreted as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are related but not limited to inadequate washing step. For more information regarding Wenzhi ELISA Troubleshooting, please refer to Wenzhi's "ELISA and Troubleshooting Guide" or contact Beijing Wenzhi technical support for further assistance.
  4. Common sources for mistakes: kits beyond the expiry date, bad washing procedures, contaminated reagents, incorrect assay procedure steps, insufficient aspiration during washing, failure to add samples or reagents, equipment, wrong volumes, sample nature and quality.
  5. The kit is intended ONLY for testing of individual serum or plasma samples. Do not use it for testing of cadaver samples, saliva, urine or other body fluids, or pooled (mixed) blood.
  6. This is a qualitative assay and the results cannot be used to measure antibodies concentrations.

## REFERENCES

1. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Science 1990; 247: 1335-1339
2. Clayton E, Innis B, Meyer K, et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kaimanalu Valley of Nepal. Am J Trop Med Hyg 1995; 53:228-232
3. Meng XJ, Purcell RH, Haber PC, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9869-9873
4. Meng XJ, Thompson WW, Trawinski K, et al. Genetic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. Lancet 2003; 362(9381):1371
5. Zheng YJ, Zhang J, Xia NS. A debate about that hepatitis E is a zoonosis. Chinese J Zoonosis (in press)
6. Wang YC, Zhang HY, Xia NS, et al. Prevalence, Isolation, and Partial Sequence Analysis of Hepatitis E Virus From Domestic Animals in China. J Med Virol 2002; 67:516-521

## SUMMARY OF THE MAJOR COMPONENTS OF THE KIT:

- Use this summary only as a reference and always follow the comprehensive method sheet when performing the assay. Note the components of individual kits are not for interchangeable.
1. Negative Control
  2. Positive Control
  3. Sample Dilution
  4. HRP-Conjugate
  5. Streptavidin
  6. Chromogen solution A
  7. Chromogen solution B
  8. Stop Solution
  9. Sero Solution

## SUMMARY OF THE ASSAY PROCEDURE:

Use this summary only as a reference and always follow the detailed method sheet when performing the assay.

- ADD SAMPLE DILUTION**
- 100ul Sample
  - 20ul Reagent 1
  - 20ul Reagent 2
  - 20ul Reagent 3
  - 100ul Add HRP Conjugate
  - 30minutes incubate
  - When incubating, wash 4 times with washing buffer
  - 50ul stop solution
  - 450nm or 450/630 nm Read the absorbance

## EXAMPLE SCHEME OF CONTROL SAMPLES DISPENSING:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S3										
B	NSG	NSG										
C	NSG	NSG										
D	NSG	NSG										
E	Pos.	Pos.										
F	Pos.	Pos.										
G	Str	Str										
H	Str	Str										

## CE MARKING SYMBOLS:

- In Vitro diagnostic medical device
- CE Marking - IVD0 88770CE
- EU Authorized Representative
- Content sufficient for <math>10^3</math> tests
- Catalog Number
- Batch
- Use By
- Instructions for Use
- Manufacturer
- 2°C -8°C Storage conditions

For technical questions, please contact:  
**Beijing Wenzhi Biological Pharmacy Enterprise CO., LTD.**  
 No. 31 Xueyuan Road, Changping District, Beijing 102206, China  
 Tel: (86)10 897 028-48, Fax: (86)10 897 028-48  
 Email: wenzhi@wx.cn.gov.cn

EC REP  
 Gened bvba, Vandendrieste 11, B-2400 Merk, Belgium  
 gen@gened.com



# ANEXO N°6

## Wanted Hepatitis E Virus Diagnostics

# HEV-IgM ELISA

### DIAGNOSTIC KIT FOR IgM ANTIBODIES TO HEPATITIS E VIRUS

REF WE-7196

V. 2012- 01 [ Eng. ]

96 Tests

IND

Read the package insert carefully and completely before performing the assay. Follow the instructions and do not perform the assay until you are fully familiar with the procedure. The accuracy of the results can be affected by the performance of WANTAN HEV-IgM ELISA achieved.

#### INTENDED USE

Wanted HEV-IgM ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for qualitative determination of IgM-class antibodies to hepatitis E virus in human serum or plasma samples. The assay is intended to be used in clinical laboratories for diagnosis and management of patients related to infection with hepatitis E virus.

#### SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped, single stranded RNA virus identified in 1969. Infection with HEV induces acute or sub-clinical liver diseases similar to hepatitis A. HEV infections, endemic and frequently epidemic in developing countries, is seen also in developed countries in a sporadic form with or without a history of traveling to endemic areas. The overall case-fatality is 0.5-3%, and much higher (15-25%) among pregnant women. A hypothesis of HEV infection as a zoonosis was presented in 1965. Then a strain HEV and later a human HEV were identified and sequenced in 1992 and 2001. Since then, HEV infection outbreaks have been reported in Africa, Asia and Europe. HEV-IgM antibodies are produced during the acute phase of infection. HEV-IgM antibodies are produced during the acute phase of infection, the antibodies are soluble into the work in presence of methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (M $\beta$ GDG) antigen. HEV-IgM immunoreactivity is detected by the bound anti-IgM conjugate to a blue-colored product. The blue color turns yellow after stopping the reaction with sulfuric acid. The amount of color intensity can be measured and is proportional to the amount of antibody captured in the well, and to the amount of antibody in the sample respectively. Wells containing samples negative for HEV-IgM remain colorless.

#### PRINCIPLE OF THE TEST

This kit is a two-step incubation, solid phase antibody capture ELISA assay in which polystyrene microtiter plates are pre-coated with antibodies directed to human immunoglobulin M proteins (anti-IgM). The patient's serum/plasma sample is added, and during the first incubation step, any IgM-class antibodies will be captured in the wells. After washing out all the other substances of the sample and in particular IgG-class antibodies, the specific HEV-IgM captured on the solid phase is detected by the addition of recombinant HEV-OR2 antigen conjugated to the enzyme-labeled peroxidase (anti-IgM) antibody. During the second incubation, the HEV-OR2 antigen conjugated with the enzyme-labeled peroxidase (anti-IgM) antibody will bind to the HEV-IgM antibodies captured on the solid phase. Subsequently, the colorless substrates are added into the well in presence of methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (M $\beta$ GDG) antigen. HEV-IgM immunoreactivity is detected by the bound anti-IgM conjugate to a blue-colored product. The blue color turns yellow after stopping the reaction with sulfuric acid. The amount of color intensity can be measured and is proportional to the amount of antibody captured in the well, and to the amount of antibody in the sample respectively. Wells containing samples negative for HEV-IgM remain colorless.

#### COMPONENTS

##### IN Vitro Diagnostic Use Only

- [U] ULLI PLATE**  
Covers 5 (96-wells)  
EXACTLY 24 wells per plate
- [C] CONTROL 1**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 2**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 3**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 4**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 5**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 6**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 7**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 8**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 9**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 10**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 11**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 12**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 13**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 14**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 15**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 16**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 17**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 18**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 19**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 20**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 21**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 22**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 23**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 24**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 25**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 26**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 27**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 28**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 29**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 30**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 31**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 32**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 33**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 34**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 35**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 36**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 37**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 38**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 39**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 40**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 41**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 42**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 43**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 44**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 45**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 46**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 47**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 48**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 49**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 50**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 51**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 52**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 53**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 54**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 55**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 56**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 57**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 58**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 59**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 60**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 61**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 62**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 63**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 64**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 65**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 66**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 67**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 68**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 69**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 70**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 71**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 72**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 73**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 74**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 75**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 76**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 77**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 78**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 79**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 80**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 81**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 82**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 83**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 84**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 85**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 86**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 87**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 88**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 89**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 90**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 91**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 92**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 93**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 94**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 95**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 96**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 97**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 98**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 99**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 100**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 101**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 102**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 103**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 104**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 105**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 106**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 107**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 108**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 109**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 110**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 111**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 112**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 113**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 114**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 115**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 116**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 117**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 118**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 119**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 120**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 121**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 122**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 123**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 124**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 125**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 126**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 127**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 128**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 129**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 130**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 131**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 132**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 133**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 134**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 135**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 136**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 137**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 138**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 139**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 140**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 141**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 142**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 143**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 144**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 145**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 146**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 147**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 148**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 149**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 150**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 151**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 152**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 153**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 154**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 155**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 156**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 157**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 158**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 159**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 160**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 161**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 162**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 163**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 164**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 165**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 166**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 167**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 168**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 169**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 170**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 171**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 172**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 173**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 174**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 175**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 176**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 177**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 178**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 179**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 180**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 181**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 182**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 183**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 184**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 185**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 186**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 187**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 188**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 189**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 190**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 191**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 192**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 193**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 194**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 195**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 196**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 197**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 198**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 199**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 200**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 201**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 202**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 203**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 204**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 205**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 206**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 207**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 208**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 209**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 210**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 211**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 212**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 213**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 214**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 215**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 216**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 217**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 218**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 219**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 220**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 221**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 222**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 223**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 224**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 225**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 226**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 227**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 228**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 229**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 230**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 231**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 232**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 233**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 234**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 235**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 236**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 237**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 238**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 239**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 240**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 241**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 242**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 243**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 244**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 245**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 246**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 247**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 248**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 249**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 250**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 251**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 252**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 253**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 254**  
Microtiter (96-well)  
pre-filled 1% Reducin™ 2M
- [C] CONTROL 255**

**Calculation of the Cut-off value (C.O.) = Nc + 0.23 Nc = the mean absorbance value for three negative controls)**

**Quality control (assay validation):** The test results are valid if the Quality Control criteria are fulfilled. It is recommended that each laboratory must establish appropriate quality control system with quality control material similar to or identical with the patient sample being analyzed.

- The absorbance of the Blank well, which contains only Chromogen and Stop solution, is less than 0.050 at 450 nm.
- A value of the Positive control must be  $\geq 0.900$  at 450nm or  $\geq 0.600$  at 450nm after blanking.
- The absorbance of the Negative control must be less than 0.100 at 450nm or  $\leq 0.450$  after blanking.

If one of the Negative control values does not meet the Quality Control criteria, it should be discarded and the mean value calculated again using the remaining two values. If more than one Negative control A values do not meet the Quality Control Range specifications, the test is invalid and must be repeated.

**Example:**

Quantity	Blank well A value: A1 = 0.025	Blank well B value: B1 = 0.112	Blank well C value: C1 = 0.110
Well no	1	2	3
Well name	Blank	Pos. Ctrl	Neg. Ctrl
Positive control A values after blanking:		2.363	2.436
All control values are within the stated quality control range			
2. Calculation of Nc = $(0.025 + 0.112 + 0.110) \div 3 = 0.111$			
3. Calculation of the Cut-off: $(C.O.) = 0.011 + 0.26 \times 0.271$			

## INTERPRETATIONS OF THE RESULTS

**Negative Results (A/C.O. <1):** Samples giving A value less than the Cut-off value are negative for this assay, which indicates that no HEV IgM class antibodies have been detected with WANTUM HEV IgM ELISA kit. Therefore there are no serological indicators for current infection with HEV.

**Positive Results (A/C.O. ≥ 1):** Samples giving A value which is equal to, or greater than the Cut-off value are considered positive for HEV IgM class antibodies. A value which is greater than the Cut-off value is considered positive using the HEV IgM ELISA kit. Repeating analysis on a new sample is recommended. Repeatedly reactive samples could be considered positive for IgM class antibodies to HEV and therefore the patient is probably infected with hepatitis E virus.

**Borderline: (A/C.O. = 0.8-1)** Samples with A value to Cut-off ratio between 0.9 and 1.1 are considered borderline and retesting of these specimens in duplicates is required to confirm the initial results.

- If, after retesting of the initially reactive samples, both wells are negative results (A/C.O. <0.9), these samples should be considered as non-reproducible positive (or false positive) and recorded as negative. As with many very sensitive ELISA assays, false positive results can occur due to the several reasons, most of which are connected with, but not limited to, reagent washing step. For more information regarding Wantum HEV IgM ELISA kit, please refer to Wantum HEV IgM ELISA kit and troubleshooting sheet. The first result from this ELISA test should be recorded as negative result. Repeatedly reactive specimens could be considered positive for HEV IgM antibodies.
- After retesting in duplicate, samples with values close to the Cut-off value should be interpreted with caution and considered as "borderline" zone sample, or uninterpretable for the time of testing.

**Follow-up, confirmation and supplementary testing of any positive specimen with other analytical system (e.g. PCR) is required. Clinical diagnosis should not be established based on a single test result. It should integrate clinical and other laboratory data and findings.**

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Specificity:** The specificity of Wantum HEV IgM ELISA was determined in 11 non-hepatitis E groups (fetalized hepatitis A cases, hepatitis B cases, hepatitis C cases, inoculated with HBV vaccine groups, population with routine virus testing, blood donors and healthy individuals). Each sample group was no less than 150 members, with 7113 participants in the largest testing groups. The specificity ranged of 95.3%–100.0%.

Testing Center	Testing Groups	Specimen	Pos. No.	Specificity (%)	
1	Acute hepatitis A	168	1	99.4	
	Acute hepatitis B	164	4	97.6	
	Hepatitis C	168	9	94.6	
	HEV noninfected	871	29	97.1	
	Healthy individuals	273	0	100.0	
	2	Healthy individuals	298	0	100.0
		Acute hepatitis A	7113	14	98.3
		Healthy individuals	888	1	99.9
		Neonatal population	302	1	99.7
	5	Blood donors	3912	3	99.2
		Healthy individuals	279	129	95.6
Blood donors		270	1	99.6	
Total		11126	177	98.4	

- No interference was observed from rheumatoid factors up to 2000 IU/ml.
- No high dose hook effect observed during clinical testing.
- The assay performance characteristics are unaffected from elevated concentrations of bilirubin (up to 210mg/l), hemoglobin (up to 25mg/l), and albumin (up to 10g/l).
- Frozen positive/negative specimens have been tested to check for interferences due to collection and storage. The performance characteristics of Wantum HEV IgM ELISA were not affected.
- Performance characteristics of Wantum HEV IgM ELISA were not affected by specimens from pregnant women and individuals with autoimmune diseases were tested. The performance characteristics of Wantum HEV IgM were not affected.

**Sensitivity:** In the evaluation of 726 serial serum samples obtained from 311 hepatitis E patients (Testing Center 3), the sensitivity of Wantum HEV IgM for the first serum sample and second serum sample was 100% and 97.02% respectively, with the sensitivity of the reference HEV IgM test was 98.5% and 85.51% respectively.

Patient comparison testing was performed with 202 non-A, non-B hepatitis samples (Testing Center 1). Since no golden standard for hepatitis E is available, reference HEV IgM assay served as control reagent. The concordance rate between Wantum HEV IgM and the reference IgM assay was 93.6%, if the true positive status was defined as positive for any of the two tests used in this study, the sensitivity of Wantum HEV IgM and the reference HEV IgM was 96.43% and 80% respectively.

**Sensitivity Summary:** The sensitivity of Wantum HEV IgM was 97.1% (95% confidence interval: 94.6%–98.5%) in the parallel testing of a total of 314 serum samples of acute hepatitis E, which was significantly higher than the reference HEV IgM tests (81.5%, 95% confidence interval: 76.6%–85.4%) and the reference HEV IgM test (83.8%, 95% confidence interval: 83.1%–93.7%).

Testing Center	Samples	Wantum HEV IgM		Reference HEV IgM ELISA		Reference HEV IgM ELISA	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
1	140	130	10	113	108	32	93.8%
2	48	46	2	36	35	13	93.8%
3	126	123	3	109	85.5%	45	93.8%
Total	314	309	5	256	81.5%	45/48	93.8%

Precision	Dilution	Number	Mean		CV
			SD	CV	
Negative control	Undiluted	70	0.184	0.1180	9%
	1:10	53	20.941	1.962	9%
Positive control	1:10	17	6.286	1.018	12%
	1:3	13	13.029	2.033	16%
	1:2	17	16.878	2.224	13%
	1:1	11	14.870	1.910	13%
	1:2	17	16.878	2.224	13%
	1:1	17	18.873	1.640	9%

## LIMITATIONS

Positive results must be confirmed with another available method and interpreted in conjunction with the patient clinical information.

- The assay is designed to achieve very high performance characteristics of sensitivity and specificity and the standard mode minimizes the nonspecific reactions due to interference with unknown matters in specimen (false positive results).
- Antibodies may be undetectable during the early stage of the disease and in some immunosuppressed patients. Therefore, a negative result does not exclude the possibility that the patient is infected with HEV. A sample does not contain detectable level of HEV IgM class antibody and any negative result should not be considered as conclusive evidence that the individual is not infected with HEV.
- The most common sources for mistakes are: be beyond the expiry date, bad washing procedures, contaminated reagents, incorrect assay procedure steps, insufficient aspiration during washing, failure to add specimens or reagents, improper operation with the laboratory equipment, timing errors, the use of highly hemolytic specimens or specimens containing non-hepatitis E virus. The use of high concentration of the reagent will affect the assay's precision values.
- The performance of the assay is sensitive to the storage conditions. The use of expired reagents and Wantum HEV IgM ELISA kit in a laboratory cannot be used to measure antibodies concentrations.

## REFERENCES

- Zhang J, et al. Two Hepatitis E Virus Neutralization Sites Analyzed by monoclonal antibodies raised against a recombinant peptide of virus capsid protein. *J Med Virol* 2003;71(4):518-26
- Zhang J, et al. Evolution of antibody-based and nucleic acid based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol* 2003;71(4):518-26
- Zhang J, et al. Conformational Antigenic Determinants Generated by Interactions Between a Bacterially Expressed Recombinant Peptide of the Hepatitis E Virus Structural Protein. *J Med Virol* 2001;64:125-132
- Shanley WJ, et al. A broadly expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* 2001;19:3726-3732
- Wang Y, et al. Hepatitis E Virus (HEV) IgM Assay with IgG Serum Antibodies, and Verma in Serologic Cases of Non-A, B, and C Acute Hepatitis. *J Med Virol* 2002;66:40-48
- Ma Y, et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in xenotata and immunoreactivity of the expression products. *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2211-5
- Wang YC, et al. Prevalence, Isolation, and Partial Sequence Analysis of Hepatitis E Virus From Domestic Animals in China. *J Med Virol* 2002;75:6-22
- Acute Viral Diseases. S. Kumar, T.L. et al. *Fundamentals of Hepatitis in a tropical population*. *Clinical course, diagnosis and early prediction of outcome*. *Hepatology* 1999;23:1440-5
- Wang Y, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibody in 1068 healthy individuals. *Sherida SA, Sherida LL. ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved conformational epitope expressed in Escherichia coli*. *J Virol Methods*. 1999 Aug;111(2):131-42
- Chao X-Y, Ma X-Z, Liu Y-Z, et al. Epidemiological and etiological studies on enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in the south part of Xinjiang. In: Shikata T, Purcell RH, Uchida T, eds. *Viral Hepatitis*. C, D, and E. New York: Elsevier Science, 1991:289-312
- Carveris F, Antonov S, Re T, et al. Clinical features of sporadic non-A, non-B hepatitis possibly associated with hepatitis E virus. *Lancet* 1985;1:1481-1483
- Wang Y, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibody in 1989. *Mon Med J* 1993;42:1-4
- Chau KH, Dawson GJ, Bae KJL, et al. Detection of IgM class antibody to hepatitis E virus in serum samples from patients with hepatitis E virus infection. *J Med Virol* 1993;40:334-338
- Chazhian A, Jameel S, Dheeran JB, et al. Hepatitis E virus transmission to a volunteer. *Lancet* 1993;341:149-150
- Torres J, Ulf E, Locarnini SA, et al. Only the non-glycosylated fraction of hepatitis E virus capsid (open reading frame 2) protein is stable in mammalian cells. *J Gen Virol* 1999;80:1185-1188
- Baerens S, Hanley J, Emerson S, et al. ELISA for antibody to hepatitis E virus based on complete open reading frame 2 protein expressed in yeast cells: identification of HEV infection in primates. *J Med Virol* 1991;63:378
- Tseng SK, Emerson SU, Reyes GR, et al. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:555-553

## SUMMARY OF THE MAJOR COMPONENTS OF THE KIT:

- Use this summary only as a reference and always follow the comprehensive method sheet when performing the assay. Components of Wantum HEV IgM are listed in the accompanying list.
- | Kit Component       | Quantity |
|---------------------|----------|
| 1. Microcentrifuge  | one      |
| 2. Negative Control | 1x50 ml  |
| 3. Positive Control | 1x50 ml  |
| 4. Specimen Diluent | 1x12ml   |
| 5. HRP-Conjugate    | 1x12ml   |
| 6. Wash Buffer      | 1x50ml   |
| 7. Chromogen A      | 1x1ml    |
| 8. Chromogen B      | 1x1ml    |
| 9. Stop Solution    | 1x1ml    |

## SUMMARY OF THE ASSAY PROCEDURE:

Use this summary only as a reference and always follow the detailed method sheet when performing the assay.

Add sample diluent

Add sample

Add sample incubate

Wash

Add HRP-Conjugate

Wash

Add Chromogen A

Add Chromogen B

Coloring

Stop the reaction

Read the absorbance

10µl  
10µl  
30minutes  
30times  
30µl/drop  
30times  
50µl A + 50µl B  
15 minutes  
50µl stop solution  
450nm or 450/630 nm

## EXAMPLE SCHEME OF CONTROLS / SAMPLES DISPENSING:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S3										
B	NEG	...										
C	NEG	...										
D	NEG	...										
E	NEG	...										
F	NEG	...										
G	NEG	...										
H	NEG	...										
I	NEG	...										
J	NEG	...										
K	NEG	...										
L	NEG	...										
M	NEG	...										
N	NEG	...										
O	NEG	...										
P	NEG	...										
Q	NEG	...										
R	NEG	...										
S	NEG	...										
T	NEG	...										
U	NEG	...										
V	NEG	...										
W	NEG	...										
X	NEG	...										
Y	NEG	...										
Z	NEG	...										

## CE MARKING SYMBOLS:

- In Vitro Diagnostic Medical Device
- +2°C-8°C Storage Conditions
- CE Marking - IVD symbol
- EU Authorized Representative
- Content Sufficient For  $n \times 2$  Tests
- Catalog Number
- LOT
- Use By
- Instructions For Use
- Manufacturer

For technical assistance, please contact:  
**Beijing Wantum Biological Pharmacy Enterprises CO., LTD.**  
 No.31 Keouyuan Road, Changping District, Beijing 102206, China  
 Tel: (86)10-897-028-48, Fax: (86)10-897-028-48  
 www.wantum.com  
 Email: wantum@wantum.com

Wantum b.v.b.a.: Vonckenhoede 13, B-2400 Merk, Belgium

