



# **Anti-HAV IgM Elisa**

***KAPG4AME3***



# History

---

## Summary of change :

<b>Previous Version :</b>	<b>Current Version :</b>
110628/3	200224/1
No IVD symbol	IVD symbol added
Old DIAsource logo	New DIAsource logo
LOT	Version
PI number	PI number cleared
No Manufacturer symbol	Manufacturer symbol added
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <a href="https://www.diasource-diagnostics.com/">https://www.diasource-diagnostics.com/</a> "



# Anti-HAV IgM Elisa

en

For qualitative in-vitro detection of IgM antibodies to hepatitis A virus  
(Anti-HAV IgM) in human serum or plasma

KAPG4AME3

*IN VITRO DIAGNOSTIC USE*

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium  
Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. INTENDED USE

**Anti-HAV IgM ELISA** is an enzyme immunoassay kit for in vitro qualitative detection of IgM antibody to hepatitis A virus (Anti-HAV IgM) in human serum or plasma (heparin, EDTA or citrate).

## 2. SUMMARY AND TEST EXPLANATION

The hepatitis A virus (HAV) is a single-stranded RNA-containing virus without an envelope and with a diameter of 27 nm that belongs to the family of Picornaviridae (1-2). Hepatitis A - the most common form of acute viral hepatitis - is an infection of fecal-oral transmission produced in humans after an average incubation period of 28 days (range, 15-50 days). The illness caused by HAV infection typically has an abrupt onset of symptoms that can include fever, malaise, anorexia, nausea, abdominal discomfort, dark urine, and jaundice (2). Hepatitis A antigen can be detected in the feces only briefly before or at the onset of infection becoming generally undetectable during the late acute stage (3). The antibody specific to HAV during the acute phase of hepatitis A is the IgM type (Anti-HAV IgM), which decreases then being replaced by IgG type (Anti-HAV IgG) during early and late convalescence (4). Anti-HAV IgM usually disappears 3 to 4 months after the acute phase. An acute hepatitis A virus infection can be assumed if anti-HAV IgM antibody is detected (5). Anti-HAV IgM antibody develops only very rarely after vaccination (6). Assays to detect anti-HAV IgM antibodies are useful in distinguishing hepatitis A infection from other types of infections

**Anti-HAV IgM ELISA** is a fast test for the qualitative detection of IgM antibody to Hepatitis A virus in serum or plasma (heparin, citrate or EDTA) specimens. This is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) which utilizes Anti-human IgM on microtiter wells as solid phase and HAV Ag and peroxidase-conjugated Anti-HAV in liquid phase in an "IgM capture" principle to detect Anti-HAV IgM levels in serum or plasma.

Specimens with absorbance values **greater** than the Cutoff Value are considered **REACTIVE for Anti-HAV IgM.**

Specimens with absorbance values **less or equal** than the Cutoff Value are considered **NONREACTIVE for Anti-HAV IgM.**

The test has to be repeated in duplicate for specimens with absorbance value within the retest range (Cutoff Value  $\pm$  10 %) and interpreted as above.

If the absorbance of any of the specimens retested in duplicate is still within the retest range, it is suggested to test follow-up samples of the patient.

### 3. TEST DESCRIPTION







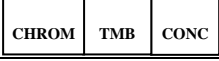

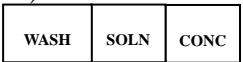
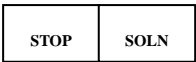
**Anti-HAV IgM ELISA is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) -- based on the principle of "IgM capture".** The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with anti-human IgM, while peroxidase-conjugated Anti-HAV acts as liquid phase. When a serum or plasma specimen containing Anti-HAV IgM is added to the Anti-human IgM-coated wells and incubated, IgM antibodies present in the specimen bind to the Anti-human IgM on the wells. After addition of an HAV Ag-containing solution and a solution containing peroxidase-conjugated anti-HAV a further incubation takes place, during which (Anti-h IgM) • (Anti-HAV IgM) •(HAV Ag) • (Anti-HAV• peroxidase) complex is formed on the wells. After washing the microtiter plate to remove unbound material, a solution of TMB substrate is added to the wells and incubated. If Anti-HAV IgM is present in the specimen, after washing, the activity of peroxidase on the wells reflects the content of anti-HAV IgM in a specimen. The peroxidase-TMB reaction is stopped by addition of sulfuric acid. The optical density of developed color is read with a suitable photometer at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm<sup>\*8</sup>

**The above described test principle is also shown as follows:**

- A. Specimen (containing antibodies IgM Anti-HAV):
1. Plate (Anti-h IgM) + specimen (containing IgM Anti-HAV)  
→ Plate (Anti-h IgM) • IgM Anti-HAV
  2. Plate (Anti-h IgM) • IgM Anti-HAV + HAV + Anti-HAV•peroxidase  
→ Plate (Anti-h IgM) • IgM Anti-HAV•HAV• (Anti-HAV•HRPO) complex
  3. Wash to remove the unbound materials.
  4. plate (Anti-h IgM) • IgM Anti-HAV• HAV(Anti-HAV•HRPO) complex  
+ TMB solution → light blue to blue color.
  5. Light blue to blue color + stop solution → light yellow to yellow color, measured at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm<sup>\*8</sup>.
- B. Specimen (without antibodies IgM Anti-HAV):
1. Plate (Anti-h IgM) + specimen (without IgM Anti-HAV) → Plate (Anti-h IgM)
  2. Plate (Anti-h IgM) + HAV + Anti-HAV• peroxidase → Plate (Anti-h IgM)  
----- no complex will form
  3. Wash to remove the unbound material.
  4. Plate (Anti-h IgM) + TMB solution (colorless) → colorless
  5. colorless + stop solution → colorless, measured at 450nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm<sup>\*8</sup>.

#### 4. DESCRIPTION OF MATERIALS PROVIDED

- **Storage Condition:** Item 1 - 8 on the following reagent table should be refrigerated at +2 to +8°C . Washing Solution (20x) and stop solution can be stored at + 2 to +30°C.

ITEMS	Components	Description	Qt. per 96 tests
(1)	Anti-IgM Coated Plate 	Microtiter plate coated with purified antibody to human IgM.	1 plate
(2)	Anti-HAV · Peroxidase Solution 	Anti-HAV · peroxidase (horseradish) conjugate in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% gentamycin and 0.01% thimerosal.	1 bottle, 8 ml
(3)	Anti-Human-IgM Positive Control 	Serum containing diluted Anti-HAV IgM in buffer with protein stabilizers. Preservatives: 0.003% gentamycin and 0.01% thimerosal.	1 bottle, 2.5 ml
(4)	Specimen Diluent 	Protein stabilizer in buffer. Preservatives: 0.003% gentamycin and 0.01% thimerosal.	1 bottle 12 ml
(5)	Hepatitis A Virus Antigen Solution 	Hepatitis A virus antigen in buffer and protein stabilizer. Preservatives: 0.003% gentamycin and 0.01% thimerosal.	1 bottle, 8 ml
(6)	Anti-HAV IgM Negative Control 	Protein stabilizer in buffer. Preservatives: 0.003% gentamycin and 0.01% thimerosal.	1 bottle, 2.5 ml
(7)	Chromogenic TMB concentrate 	0.6 mg/ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in an organic base (0.6 mg/ml).	1 bottle, 12 ml
(8)	Substrate buffer 	Citric acid buffer containing 0.03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	1 bottle, 12 ml
(9)	Conc. Washing Solution (20x) 	Phosphate buffer with tween-20.	1 bottle 58 ml
(10)	Stop solution 	2N sulfuric acid	1 bottle 12 ml

#### ● OTHER MATERIALS AND DEVICES REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

ITEMS	Components
(1)	5 µl, 50 µl, 100µl and 1.0 ml micropipettes and tips are needed
(2)	100 ml of 0.15M Normal Saline.
(3)	Incubator or waterbath with temperature control at +37 °C.
(4)	Tubes for specimen dilution.
(5)	Plate washing equipment.
(6)	ELISA Microwell Reader: Dual wavelength 450 nm with 620-690 nm as reference wavelength <sup>*8</sup> , bandwidth 10nm.
(7)	Purified water: distilled or deionized water.
(8)	Fully automatic EIA micro-plate analyzer is optional. User should validate the automatic EIA micro-plate analyzer in combination with the kit.

## 4.1.

**Storage Conditions and Stability of Kit and Components**

<b>Kit/Components</b>	<b>Storage condition</b>	<b>State</b>	<b>Stability</b>
Anti-HAV IgM ELISA KIT	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HAV IgM Positive Control	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Anti-HAV IgM Negative Control	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
HAV Antigen Solution	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Specimen Diluent	+2 to +8 °C	Original	16 months
		Once open	1 month
Anti-human IgM Plate	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	2 month
Anti-HAV·Peroxidase Conjugate Solution	+2 to +8 °C	Original	15 months
		Once open	1 month
Concentrated Washing Solution (20x)	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month
20x Diluted Washing Solution	Room temp.	Diluted	2 days
	+2 to +8 °C	Diluted	1 week
Chromogenic TMB concentrate	+2 to +8 °C	Original	24 months
		Once open	1 month
Substrate buffer	+2 to +8 °C	Original	24 months
		Once open	1 month
2N Sulfuric Acid	Room temp.	Original	24 months
		Once open	1 month

## 5. INSTRUCTION FOR USE

### 5.1. Warnings

- 5.1.1. This reagent kit is for professional use only.
- 5.1.2. This reagent kit is for *in vitro* diagnostic use only.
- 5.1.3. Bring all kit reagents and samples to room temperature (+20 to +30°C) and mix gently before use.
- 5.1.4. Do not use reagent beyond its expiration date.
- 5.1.5. Do not interchange reagents between different lots.
- 5.1.6. Do not pipette in the mouth.
- 5.1.7. Do not smoke or eat in areas where specimens or reagents are handled.
- 5.1.8. The positive control, HAV Antigen solution, negative control, conjugate solution and specimens should be regarded as potential hazards to health. They shall be used and discarded according to the user's laboratory safety procedures. Such safety procedures probably shall include wearing protective gloves and avoiding aerosols generation.
- 5.1.9. Potential infectious specimens and nonacid containing spills or leakages should be wiped up thoroughly with 5% sodium hypochlorite or treated in accordance with the laboratory's practice for potential bio-hazard control.
- 5.1.10. **Prior to dispose the waste of used specimens and kit reagents as general waste, it should be treated in accordance with your treatment practice of potential bio-hazardous waste or treated as follows:**  
Both liquid and solid waste should be autoclaved maintaining +121°C for at least 30 minutes. Solid waste can also be incinerated.  
Non-acidic liquid waste can be treated with sodium hypochlorite diluted to a final concentration of 1%.  
Acidic liquid wastes must be neutralized before treatment with sodium hypochlorite as mentioned above and should stand for 30 minutes to obtain effective disinfection.
- 5.1.11. 2N sulfuric acid is an irritant to skin, eyes, respiratory tract and mucous membranes. Avoid contact of the 2N sulfuric acid with skin and mucous membranes. In case of contact, clean with large lots of water immediately. In case of inhalation, supply fresh air and seek medical advice in case of complaints.
- 5.1.12. Chromogenic TMB concentrate contains organic solvent, which is flammable : danger of serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.  
Chromogenic TMB concentrate contains dimethyl sulfoxide, an irritant to skin and mucous membranes.

### 5.2. Specimen Collection and Preparation for Analysis

- 5.2.1. No special preparation of the patient is required prior to blood collection. Blood should be collected by approved medical techniques.
- 5.2.2. Either serum or plasma can be used with this diagnostic kit. Whole blood specimens should be separated as soon as possible in order to avoid hemolysis. Any particulates (e.g. fibrin clots, erythrocytes) contained in the specimen should be removed prior to use.
- 5.2.3. Specimens must be stored at +2 to +8°C and avoided heat-inactivation to minimize deterioration. For long-term storage, they should be frozen below -20 °C. Storage in self-defrosting freezer is not recommended.
- 5.2.4. Frozen specimens must be thoroughly thawed and mixed homogenously before test.
- 5.2.5. Avoid multiple freeze-thaw procedures
- 5.2.6.
  1. The specimen must not contain any compounds of AZIDE, which inhibits the peroxidase activity.
  2. Incompletely coagulated serum samples and microbial-contaminated specimens should not be used.

### WARNING



- 5.3. Reagents storage**
- 5.3.1. The kit must be stored at +2 to +8°C. Do not freeze.
- 5.3.2. Strips of the plate should be used within 2 months after open the original aluminum foil bag. The unused strips should be kept in the aluminum foil bag and taped the opening tightly.
- 5.3.3. Return reagents to +2 to +8°C immediately after use.
- 5.3.4. Washing Solution (20x) Concentrate should be stored at room temperature to avoid crystallization. If the crystal has been precipitated before use, warm up the solution in a +37°C water bath till the crystal is dissolved.
- 5.4. Plate washing procedure**
- 5.4.1. Preparation of washing solution:  
Dilute Washing Solution (20x) Concentrate with distilled or de-ionized water to 1:20 dilution. Do not use tap water.
- 5.4.2. Plate washing:  
Plate washing:
1. Plate washing:
    - (a) For plate washer with overflow aspirating function: 6 cycles with at least 0.5ml washing buffer per well per cycle. or
    - (b) For plate washer without overflow aspirating function: 8 cycles with at least 0.35ml washing buffer per well per cycle.
  2. Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.
- 5.4.3. Blot dry by inverting the plate and tapping firmly onto absorbent paper. Too much residual wash buffer will cause false results.
- WARNING**  
Improper washing will cause false results.
- 5.5. Test procedure**
- Assay process can be performed by an automatic EIA micro-plate immuno-analyzer. Please set up the program according to the following test procedure.
- 5.5.1. Bring all reagents and specimens to room temperature (+20 to +30°C) before assay. Adjust water bath or incubator to +37±1°C.
- 5.5.2. Prepare the needed number of wells, including two wells for blanks, three wells for Negative Control, two wells for Positive Control, and one well for each specimen.  
Reserve 2 wells for Blanks. Add **100 µl** of Negative Control to each of three wells, **100 µl** of Positive Control to each of the two wells, and **100 µl** of Specimen Diluent to each of the other reaction wells for the test specimens.
- 5.5.3. Make 1 : 200 dilution of each specimen:  
Prepare the tubes for dilution as number of specimens. Add 1.0 ml of Saline Solution and 5 µl of each specimen to each tube, respectively and shake to mix.
- 5.5.4. Add **5 µl of each diluted specimen** to each well containing Specimen Diluent, respectively.
- 5.5.5. Gently tap the plate.
- 5.5.6. Seal the plate with an adhesive slip.
- 5.5.7. Incubate the plate in incubator or water bath at +37 ± 1°C for **one hour**.
- 5.5.8. At the end of the incubation period, remove and discard the Adhesive Slip and wash plate in accordance with “5.4. Plate washing procedure”.
- 5.5.9. Add **50 µl** of Hepatitis A Virus Antigen Solution and **50 µl** of Anti-HAV·Peroxidase Conjugate Solution into each reaction well except the Blanks. Apply new adhesive slip.
- 5.5.10. Incubate the plate in incubator or water bath at +37 ± 1°C for **one hour**.
- 5.5.11. At the end of the incubation period, remove and discard the adhesive slip, wash the plate in accordance with “5.4. Plate washing procedure”.
- 5.5.12. Choose one of the following two methods for color development:  
**NOTE:** Chromogenic TMB concentrate should be colorless to light blue, otherwise, it should be discarded. The mixture of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer should be used within 30 minutes after mixing. The mixture should be avoided from intense light.
- A. Mix equal volumes of Chromogenic TMB concentrate and Substrate buffer in a clean container immediately prior to use. Add 100 µl of the mixture solution to each well including the two blank wells.

- B. Add 50 µl of Chromogenic TMB concentrate first, then add 50 µl of Substrate buffer into each well including the two blanks. Mix well gently.
- 5.5.13 Cover the plate with black cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
- 5.5.14 Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well including the blank.
- 5.5.15 Determine the absorbance of controls and test specimens within 15 minutes with a photometer at 450 nm with a selected reference wavelength within 620 to 690 nm<sup>\*8</sup>.



Use the blank well to blank the photometer.

**NOTE:** The color of the blank should be colorless to light yellowish; otherwise, the test result is invalid. In this case the test must be repeated.

Substrate blank : absorbance value must be less than 0.100.

## 5.6.

### Calculation of Tested Results

- 5.6.1. Calculation of the NC<sub>x</sub> (Mean Absorbance of Negative Control).

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.080
2	0.085
3	0.079

$$NC_x = (0.080 + 0.085 + 0.079) / 3 = 0.081$$

**NC<sub>x</sub> must be ≤ 0.2, otherwise, the test is invalid.**

- 5.6.2. Calculation of PC<sub>x</sub> (Mean Absorbance of Positive Control)

Example:

Sample No.	Absorbance
1	1.223
2	1.205

$$PC_x = (1.223 + 1.205) / 2 = 1.214$$

**PC<sub>x</sub> must be ≥ 0.5, otherwise, the test is invalid.**

- 5.6.3. Calculation of P-N Value

$$P-N = PC_x - NC_x$$

Example:

$$P - N = 1.214 - 0.081 = 1.133$$

**P - N Value must be ≥ 0.3, otherwise, the test is invalid.**

- 5.6.4. Calculation of the Cutoff Value

$$\text{Cutoff Value} = NC_x + (PC_x) / 4$$

Example:

$$\text{Cutoff Value} = 0.081 + (1.214 / 4) = 0.385$$

- 5.6.5. Calculation of the Retest Range

$$\text{Retest Range} = \text{Cutoff Value} \pm 10\%$$

Example: Cutoff Value = 0.385

$$\text{Retest Range} = (0.385 - 0.039) \text{ to } (0.385 + 0.039) = 0.346 \text{ to } 0.424$$

## 5.7.



### Validity of Test Runs

- 5.7.1. NC<sub>x</sub> must be ≤ 0.2 , otherwise, the test is invalid.

- 5.7.2. PC<sub>x</sub> must be ≥ 0.5 , otherwise, the test is invalid.

- 5.7.3. P-N Value must be ≥ 0.3 , otherwise, the test is invalid.



**NOTE: Negative Control: absorbance value must be less than or equal to 0.200 after subtracting the blank.**

## 5.8.

### Interpretation Results

- 5.8.1. Specimens with absorbance values **LOWER** than the **Cutoff Value** are considered **non-reactive** for Anti-HAV IgM

- 5.8.2. Specimen with absorbance value **GREATER** than or **EQUAL TO** the **Cutoff Value** is considered **reactive** for Anti-HAV IgM.

- 5.8.3. If the data is within the **Retest Range**, the test must be repeated in duplicate and interpreted as above. If the retested absorbance still within the retest range, it is suggested to test follow-up-samples.

## **5.9. Troubleshooting**

If the result cannot be reproduced, a preliminary troubleshooting should be performed by checking the possibilities listed below:

- 5.9.1. Improper washing procedure.
- 5.9.2. Contamination with positive specimens.
- 5.9.3. Wrong volume of sample, conjugate or substrates.
- 5.9.4. Contamination of well rim with conjugate.
- 5.9.5. Improper specimen such as hemolyzed serum or plasma, specimen containing precipitate and specimen not being mixed well before use.
- 5.9.6. Wrong incubation time or temperature.
- 5.9.7. Obstructed or partial obstructed washer aspirate/dispense head and needles.
- 5.9.8. Insufficient aspiration.

## **5.10. Limitations and Interferences**

- 5.10.1. This reagent kit is to be used for un-pooled human serum or plasma samples only.
- 5.10.2. Non-repeatable reactive results may be obtained with any enzyme immunoassay kit, largely due to technical error either on the part of the operator or malfunction of apparatus used.
- 5.10.3. The reagent kit has not been validated for use with cadaveric samples.
- 5.10.4. Potential interfering substances: By addition tests the following results were obtained:
  - 1. The anticoagulants heparin, citrate and EDTA had no effect on the test result.
  - 2. Hemoglobin up to 8.0 mg/ml had no effect on the test result.
  - 3. Bilirubin up to 0.3 mg/ml had no effect on the test result.
  - 4. Triglyceride up to 5.0 mg/ml had no effect on the test result.
  - 5. A rheumatoid factor high positive specimen exhibited a false positive result.
  - 6. Pregnancy did not affect the test result.

## 5.11. Performance Characteristics

### 5.11.1. 1. Specimens from hospitalized patients:

**Diagnostic Sensitivity  
and Diagnostic  
Specificity**

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	1378	0	1378
	REACTIVE	4	188	192
	total	1382	188	1570
	Diagnostic sensitivity = $100\% \times 188/192 = 98\%$			
Diagnostic specificity = $100\% \times 1378/1378=100\%$				

### 2. Patients with acute hepatitis B:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	51	0	51
	REACTIVE	0	0	0
	total	51	0	51
	Conformity = 100%			

### 3. Hepatitis B patients in convalescent period:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	28	0	28
	REACTIVE	0	0	0
	total	28	0	28
	Conformity = 100%			

### 4. Chronic hepatitis B carriers:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	107	0	107
	REACTIVE	0	0	0
	total	107	0	107
	Conformity = 100%			

### 5. Auto-immune patients:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	20	0	20
	REACTIVE	0	0	0
	total	20	0	20
	Conformity = 100%			

6. Patients with acute hepatitis A:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	0	0	0
	REACTIVE	0	24	0
	total	0	24	24

Diagnostic sensitivity = 100%

Diagnostic specificity = 100%

7. Patients with other viral infections:

		DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NON-REACTIVE	REACTIVE	Total
Comparison assay	NON-REACTIVE	35	0	35
	REACTIVE	0	0	0
	total	35	0	35

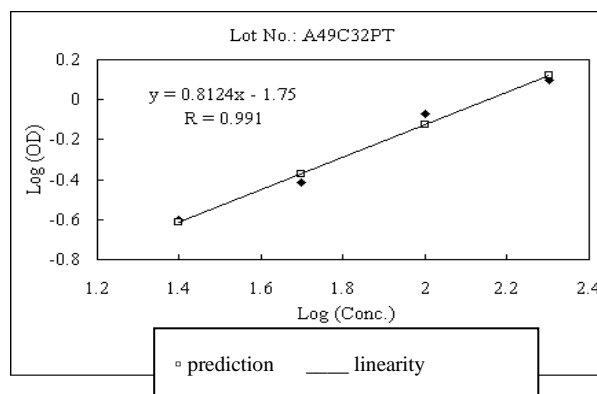
Diagnostic specificity/Conformity = 100%

5.11.2.

Analytical sensitivity ≤ 100 AU/ml

Analytical Sensitivity e.g. (Lot. No.: A49C32PT) Analytical sensitivity = 61.7 AU/ml

Conc. (AU/ml)	OD	Log (Conc.)	Log (OD)
200	1.256	2.30103	0.09898964
100	0.846	2	-0.07262964
50	0.385	1.69897	-0.41453927
25	0.250	1.39794001	-0.60205999
Cutoff	0.506	1.79003187	-0.29584948
Sensitivity (AU/ml)	61.7	-----	-----



Linear regression	
R	0.991195
R <sup>2</sup>	0.982468
Adjusted R <sup>2</sup>	0.973702
Standard error	0.051643
Number of observed value	4

5.11.3.

**Precision**

Intra-assay reproducibility: Intra-assay CV% < 15

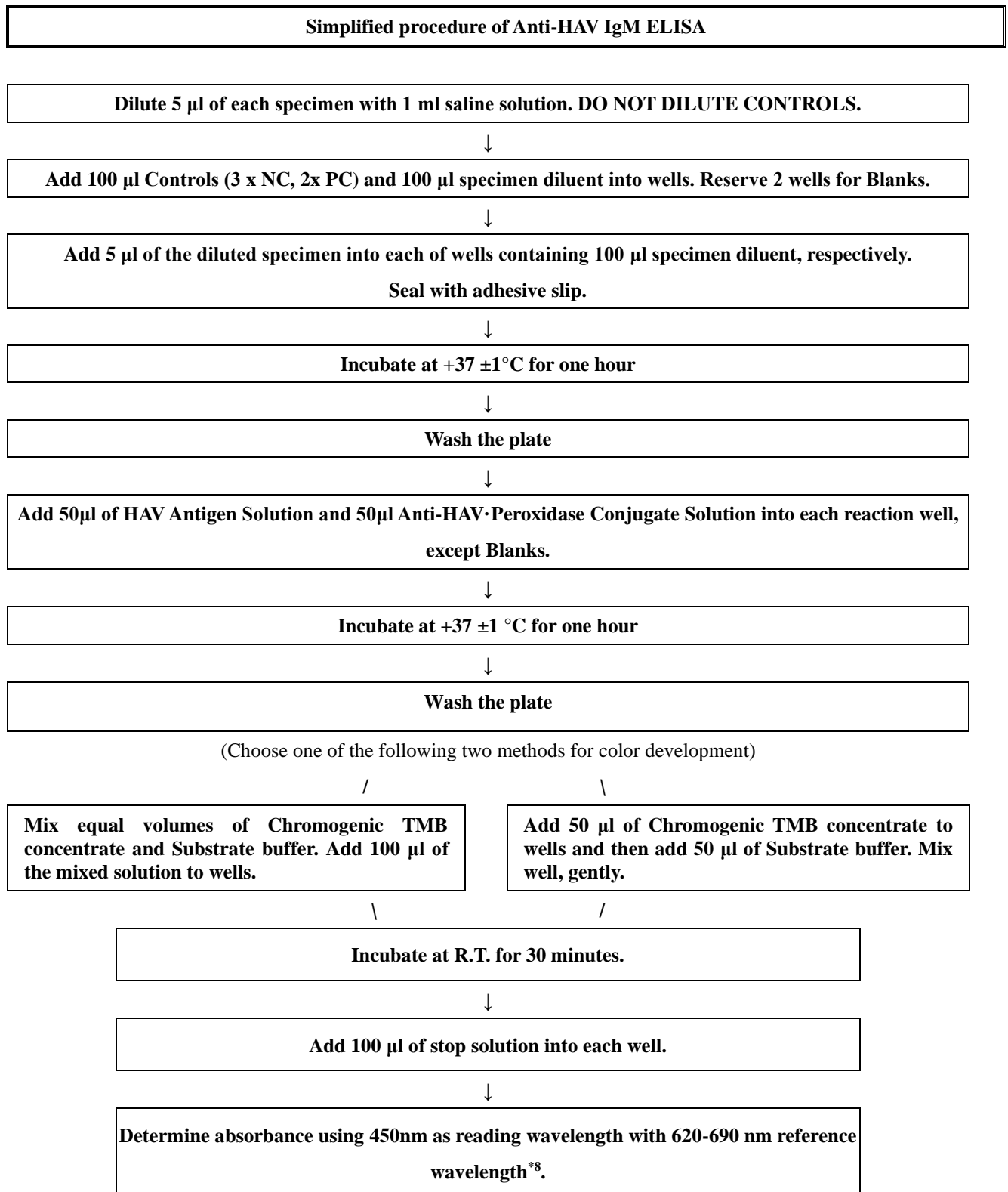
Inter-assay reproducibility: Inter-assay CV% < 20

5.11.4.

**Traceability**

Concentration of Anti-HAV IgM Positive Control = 800±200 AU/ml

5.12. Flow chart of the test procedure



## 6. BIBLIOGRAPHY

1. Melnick JL. History and epidemiology of hepatitis A virus. J Infect Dis 1995;171(Suppl 1):2-8.
2. Koff RS. Hepatitis A. Lancet 1998;341:1643-49.
3. Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. J Infect Dis. 1983;148: 1033-1039.
4. Duermeyer W, Van der Veen J, Koster B. ELISA in Hepatitis A. Lancet. 1978; 1(8068):823-824.
5. Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. J Infect Dis. 2000;182:12-17.
6. Craig AS, Schaffner W. Prevention of hepatitis A with the hepatitis A vaccine N Engl J Med 2004; 350:476-481
7. The reference wavelength of spectrometer can be 620nm to 690nm. However, user should validate the photometer in combination with this kit before use.

### NOTE :

- \*8. The reference wavelength of spectrometer could be 620nm to 690nm. However, user should validate the spectrometer in combination with this kit before use.

**Revision date : 2020-02-24**

**Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website:**

<https://www.diasource-diagnostics.com/>





# Anti-HAV IgM Elisa

es

Para la detección cualitativa in-vitro de anticuerpos IgM contra el virus de la hepatitis A (Anti-VHA IgM) en suero o plasma humano

KAPG4AME3

*PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO*

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. USO PREVISTO

El kit **Anti-VHA IgM ELISA** es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa in-vitro del anticuerpo IgM contra el virus de la hepatitis A (Anti-VHA IgM) en suero o plasma humano (heparina, EDTA o citrato).

## 2. RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO

El virus de la hepatitis A (VHA) es un virus que contiene una sola cadena de ARN sin envoltura con un diámetro de 27 nm. Pertenece a la familia de los Picornaviridae (1-2). La hepatitis A – la forma más común de hepatitis viral aguda– es una infección de transmisión fecal-oral producida en humanos después de un periodo de incubación promedio de 28 días (rango, 15-50 días). En la enfermedad causada por la infección con VHA generalmente se produce un inicio abrupto de la sintomatología que puede incluir fiebre, malestar, anorexia, náusea, molestia abdominal, orina oscura, e ictericia (2). El antígeno de la hepatitis A puede detectarse en las heces solo brevemente antes o al inicio de la infección volviéndose generalmente indetectable durante la etapa aguda (3). El anticuerpo específico para el VHA durante la fase aguda de la hepatitis A es del tipo IgM (IgM Anti-A), que disminuye y luego es reemplazado por el tipo IgG (IgG Anti-VHA) al principio y al final de la convalecencia (4). IgM Anti-VHA generalmente desaparece entre 3 y 4 meses después de la fase aguda. Se puede presuponer una infección aguda por el virus de la hepatitis A si se detecta anticuerpo IgM anti-VHA (5). El anticuerpo IgM Anti-VHA se desarrolla muy rara vez después de la vacunación (6). Los ensayos para detectar IgM anti-VHA son útiles para distinguir la infección por hepatitis A de otros tipos de infecciones.

**Anti-VHA IgM ELISA** es un ensayo rápido para la detección cualitativa del anticuerpo IgM contra el virus de la hepatitis A en muestras de suero o plasma (heparina, citrato o EDTA). Este es un inmunoensayo enzimático (ELISA) que utiliza anti- IgM humana en micropocillos como fase sólida y VHA Ag con Anti-VHA conjugado con peroxidasa en fase líquida en un principio de “captura de IgM” para detectar los niveles de IgM Anti-VHA en el suero o plasma.

Muestras con absorbancias **mayores que** el Valor de Corte se consideran como **REACTIVAS para IgM**

### Anti-VHA.

Muestras con absorbancias **menores o iguales** al valor de corte se consideran como **NO REACTIVAS para IgM Anti-VHA.**

El ensayo debe ser repetido en duplicado para muestras con absorbancias dentro del rango de repetición (Valor de Corte  $\pm$  10%) e interpretada como se ha indicado.

Si la absorbancia de cualquiera de las muestras repetidas en duplicado aún cae dentro del rango de repetición, se sugiere analizar muestras ulteriores del paciente.

### 3. DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Anti-VHA IgM ELISA** es un inmunoensayo enzimático de fase sólida (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) -- basado en el principio de "captura de IgM". La fase sólida de la microplaca está hecha de pocillos de poliestireno que están recubiertos con anti- IgM Humana mientras, que el Anti-VHA conjugado con Anti-VHA actúa como fase líquida.

Cuando una muestra de suero o plasma que contiene IgM anti-VHA se agrega a los pocillos recubiertos con anti- IgM humana y se incuban, los anticuerpos IgM presentes en la muestra se unen a la anti- IgM humana en los pocillos. Después de agregar un reactivo que contiene VHA Ag y una solución que contiene anti-VHA IgM conjugado con peroxidasa hay otra incubación durante la cual se forma el complejo (anti- IgM humano) • (IgM Anti-VHA) • (VHA Ag) • (Anti-VHA IgM • peroxidasa) en los pocillos. Después de lavar la microplaca para eliminar el material que no se ha unido, se agrega una solución de sustrato TMB a los pocillos y se incuban. Si IgM anti-VHA IgM está presente, en la muestra, después de lavar, la actividad de la peroxidasa en los pocillos refleja el contenido de IgM anti-VHA en la muestra. La reacción peroxidasa-TMB se detiene agregando ácido sulfúrico. La densidad óptica del color que se ha generado se mide con un fotómetro adecuado a 450 nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690 nm<sup>\*8</sup>

#### **El principio del ensayo descrito anteriormente se ilustra también en el siguiente diagrama.**

A. Muestra (que contiene anticuerpos IgM Anti-VHA):


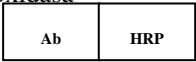



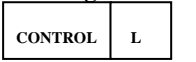
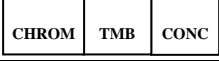
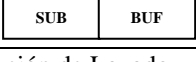
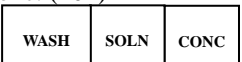
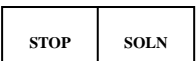
1. Placa (Anti-h IgM) + muestra (que contiene IgM Anti- VHA)  
→ Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA
2. Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA + VHA + Anti- VHA • peroxidasa  
→ Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA • VHA • (Anti- VHA • HRPO) complejo
3. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA • VHA (Anti- VHA • HRPO) complejo  
+ solución de TMB → de color azul celeste
5. De color celeste a azul claro a azul + solución de parada → de color amarillo pálido a amarillo, medido a 450nm con una longitud de onda seleccionada entre 620 y 690nm<sup>\*8</sup>

B. Muestra (sin anticuerpos IgM Anti-VHA):

1. Placa (Anti-h IgM) + muestra (sin IgM Anti-VHA) → Placa (Anti-h IgM)
2. Placa (Anti-h IgM) + VHA + Anti-VHA • peroxidasa → Placa (Anti-h IgM)  
----- no se formará un complejo
3. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (Anti-h IgM) + solución de TMB (incolora) → incolora
5. incolora + solución de parada → incolora, medida a 450nm con una longitud de onda de referencia seleccionada de 620 a 690nm<sup>\*8</sup>

#### 4. DESCRIPCIÓN DE LOS MATERIALES PROPORCIONADOS

- Condiciones de almacenaje : Ítems 1- 8 de la siguiente tabla de reactivos deben permanecer refrigerados entre + 2 y +8°C. La Solución de Lavado (20X) y la solución de parada pueden almacenarse entre +2 y +30°C.

ITEMS	Componentes	Descripción	Cant. para 96 ensayos
(1)	Microplaca con Anti-IgM 	Microplaca recubierta con anticuerpo purificado anti IgM humana	1 placa
(2)	Solución Anti-HAV · Peroxidasa 	Conjugado de Anti-VHA · peroxidasa (rábano picante) en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 8 ml
(3)	Control Positivo Anti-Humano-IgM 	Suero con IgM anti-VHA en tampón con estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial, 2.5 ml
(4)	Diluyente de la Muestra 	Tampón con estabilizadores de proteínas Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial 12 ml
(5)	Solución de Antígeno del Virus de la Hepatitis A 	Antígeno del virus de la hepatitis A en tampón y estabilizadores de proteínas. Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial 8 ml
(6)	Control Negativo Anti-VHA IgM 	Tampón con estabilizadores de proteínas Conservantes: Gentamicina 0,003% y Timerosal 0,01%.	1 vial 2.5 ml
(7)	Cromógeno TMB Concentrado 	0,6 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en una base orgánica (0,6 mg/ml)	1 vial 12 ml
(8)	Tampón del Sustrato 	Tampón de ácido cítrico con 0,03% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	1 vial 12 ml
(9)	Solución de Lavado Conc. (20x) 	Tampón Fosfato con Tween-20.	1 vial 58 ml
(10)	Solución de Parada 	2N ácido sulfúrico	1 vial 12 ml

#### • OTROS MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

ITEMS	Componentes
(1)	Micropipetas y puntas de 5µl, 50µl and 100 µl
(2)	100 ml de Salino Normal 0.15M.
(3)	Incubadora o baño maría con control de temperatura a +37°C
(4)	Tubos para dilución de las muestras.
(5)	Equipo para lavado de placas.
(6)	Lector de microplacas ELISA: Longitud de onda dual 450nm con longitud de onda de referencia de 620-690nm*8, ancho de banda 10nm.
(7)	Agua purificada: destilada o desionizada.

(8)	Un analizador EIA de microplacas totalmente automático es opcional. El usuario debe validar el equipo en conjunto con el kit.
-----	---

4.1.

**Condiciones de almacenaje y estabilidad del kit y sus componentes.**

<b>Kit/Componentes</b>	<b>Condición de almacenaje</b>	<b>Estado</b>	<b>Estabilidad</b>
Anti-VHA IgM ELISA kit	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Positivo Anti-VHA IgM	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Control Negativo Anti-VHA IgM	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución VHA Antígeno	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Diluyente de la Muestra	+2 to +8 °C	Original	16 meses
		Una vez abierto	1 mes
Placa IgM Anti-humano	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	2 mes
Solución Conjugado Anti-VHA • Peroxidasa	+2 to +8 °C	Original	15 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Concentrada (20x)	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Solución de Lavado Diluida 20x	Temp ambiente	Diluido	2 días
	+2 to +8 °C	Diluido	1 semana
TMB Concentrado cromogénico	+2 to +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
Tampón del sustrato	+2 to +8 °C	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes
2N ácido sulfúrico	Temp ambiente	Original	24 meses
		Una vez abierto	1 mes

## 5. INSTRUCCIONES DE USO

### 5.1. Advertencias

- 5.1.1. Este kit de reactivos es sólo para uso profesional.
- 5.1.2. Este kit de reactivos es sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.
- 5.1.3. Procure que todos los reactivos del kit y las muestras alcancen temperatura ambiente (+20 to +30 °C) y mézclelos cuidadosamente antes de usar.
- 5.1.4. No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- 5.1.5. No intercambie reactivos entre lotes diferentes.
- 5.1.6. No pipetee con la boca.
- 5.1.7. No fume o coma en zonas donde se manipulan muestras o reactivos.
- 5.1.8. El control positivo, negativo, solución HAV Antígeno, solución del conjugado y las muestras deben considerarse como peligros potenciales para la salud. Deben usarse y eliminarse de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio del usuario. Estos procedimientos de seguridad probablemente incluirán el uso guantes de protección y evitar la generación de aerosoles.
- 5.1.9. Las muestras potencialmente infecciosas y derrames o goteos que no contienen ácidos deben ser limpiados concienzudamente con hipoclorito de sodio al 5% o tratado de acuerdo con las prácticas del laboratorio para el control de un potencial riesgo biológico.
- 5.1.10. **Antes de eliminar los desechos de las muestras usadas y reactivos del kit como desechos generales, este debe ser tratado de acuerdo con el procedimiento local para desecho con potencial riesgo biológico o tratado como sigue:**  
Tanto los desechos sólidos como los líquidos deben ser autoclavados a +121 °C por lo menos por 30 minutos.  
El desecho sólido también se puede incinerar.  
El desecho líquido no ácido puede tratarse con hipoclorito de sodio diluido a una concentración final de 1%.  
Los desechos ácidos deben ser neutralizados antes de tratarlos con hipoclorito de sodio como se mencionó antes y debe mantenerse por 30 minutos para obtener una desinfección efectiva.
- 5.1.11. 2N ácido sulfúrico es irritante para los ojos, la piel, vías respiratorias y membranas mucosas. Evite el contacto de 2N ácido sulfúrico con la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lave con copiosa cantidad de agua inmediatamente. En caso de inhalación, proporcione aire fresco y busque ayuda médica en caso de molestias.
- 5.1.12. El concentrado cromogénico TMB contiene un disolvente orgánico, que es inflamable: peligro de efectos graves irreversibles por inhalación, contacto con la piel o ingestión. El concentrado cromogénico TMB contiene dimetil sulfóxido, un irritante para la piel y membranas mucosas.

### 5.2. Toma de Muestra y Preparación para el Análisis

- 5.2.1. El paciente no requiere preparación especial antes de la toma de la muestra. La sangre debe ser tomada con técnicas médicas aprobadas.
- 5.2.2. Con este kit diagnóstico se puede usar suero o plasma. La muestra de sangre total debe separarse lo antes posible para evitar hemólisis. Cualquier partícula presente en la muestra (por ej. Glóbulos rojos, coágulos de fibrina) deben eliminarse antes de usar.
- 5.2.3. Las muestras deben almacenarse de +2 a +8 °C y evitar inactivación por calor para minimizar el deterioro. Para almacenar por periodos largos, las muestras se deben congelar por debajo de -20 °C. No se recomienda almacenarlas en congeladores que se auto descongelan.
- 5.2.4. Las muestras congeladas deben ser descongeladas completamente y mezcladas en forma homogénea antes del ensayo.
- 5.2.5. Evite congelar y descongelar en forma sucesiva
- 5.2.6.

### ADVERTENCIA

1. La muestra no debe tener ningún componente de AZIDA que inhibe la actividad de la peroxidasa
2. Muestras de suero coaguladas y muestras con contaminación bacteriana no deben ser usadas

### 5.3. Almacenaje del kit

- 5.3.1. El kit debe almacenarse entre + 2 y +8 °C. No congelar.
- 5.3.2. Las tiras de las placas debes usarse dentro de 2 meses después de abrir la bolsa original de aluminio. Las tiras no usadas deben permanecer en la bolsa de aluminio firmemente sellada.
- 5.3.3. Almacene los reactivos nuevamente entre +2 y +8 °C inmediatamente después de su uso.

- 5.3.4. El concentrado (x20) de la solución de lavado es almacenado y transportado entre +2 y +8 °C, lo que puede causar cristalización. Si hay precipitado de cristales antes del uso, caliente la solución en un baño maría a +37 °C hasta que los cristales se disuelvan.

#### 5.4. Procedimiento de lavado de placas

- 5.4.1. Preparación de la solución de lavado:  
Diluya la solución de Lavado (x20) con agua destilada o desionizada a una dilución de 1:20.  
No use agua del grifo.
- 5.4.2. Lavado de las placas:  
(a) Para un lavador de placas con función de aspiración de desborde: 6 ciclos de por lo menos 0,5 ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo  
o  
(b) Para un lavador sin la función de aspiración de desborde: 8 ciclos de por lo menos 0,35ml de tampón de lavado por pocillo, por ciclo.
- 5.4.3. Seque la placa invirtiéndola sobre un papel absorbente y golpeándola enérgicamente. Si queda demasiado tampón de lavado residual, podría causar resultados falsos.

**ADVERTENCIA** Un lavado inadecuado causará resultados falsos.

#### 5.5. Procedimiento del Ensayo

El ensayo puede ser realizado por un analizador automático de microplacas para inmunoensayos. Prepare el programa de acuerdo con el siguiente procedimiento.

- 5.5.1. Permita que todos los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente (+20 a +30°C) antes del ensayo. Ajuste el baño maría o incubadora a +37±1°C.
- 5.5.2. Prepare la cantidad necesaria de pocillos, incluyendo dos pocillos para blancos, tres para el control negativo, dos para el control positivo y un pocillo para cada muestra.  
Reserve 2 pocillos para blancos. Agregue **100 µl** de Control Negativo a cada uno de tres pocillos, **100 µl** de Control Positivo a cada uno de dos pocillos y **100 µl** de Diluyente de la Muestra a cada uno de los demás pocillos para las muestras.
- 5.5.3. Diluya cada muestra 1 : 200:  
Prepare los tubos para dilución según el número de muestras. Agregue 1,0 ml de Solución Salina y 5 µl de cada muestra a cada tubo y agite para mezclar.
- 5.5.4. Agregue **5 µl** de **cada muestra diluida** a cada pocillo que ya contiene Diluyente de la muestra.
- 5.5.5. Golpee la placa suavemente.
- 5.5.6. Selle la placa con una cubierta autoadhesiva.
- 5.5.7. Incube la placa en un incubadora o baño maría a +37 ± 1°C por **una hora**.
- 5.5.8. Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo **“5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS”**.
- 5.5.9. Agregue **50 µl** de Solución para el Antígeno del Virus de la Hepatitis A y **50 µl** de Solución del Conjugado Anti-VHA·Peroxidasa a cada pocillo excepto los blancos. Cubra con cubierta autoadhesiva.
- 5.5.10. Incube la placa en un incubadora o baño maría a +37 ± 1°C por **una hora**.
- 5.5.11. Al finalizar el periodo de incubación retire y elimine la cubierta autoadhesiva y lave la placa siguiendo **“5.4. PROCEDIMIENTO DE LAVADO DE PLACAS”**.
- 5.5.12. Seleccione uno de los dos métodos siguientes para desarrollar el color:  
**NOTA:** El concentrado cromogénico TMB debe ser entre incoloro y celeste; de otro modo debe ser eliminado. La mezcla de concentrado cromogénico TMB con tampón del sustrato debe usarse dentro de los 30 minutos a partir del momento de la mezcla. La mezcla debe protegerse de la luz intensa.

**A.** Mezcle volúmenes iguales de **concentrado cromogénico TMB y Tampón de sustrato** en un recipiente limpio inmediatamente antes de usar. Agregue **100 µl** de la solución de la mezcla a cada pocillo incluyendo los dos blancos.

**B.** Agregue primero **50 µl** de **concentrado cromogénico TMB concentrado** y luego agregue **50 µl** de **Tampón del sustrato** a cada pocillo incluyendo los dos blancos. Mezcle suavemente.

- 5.5.13. Cubra la placa con la cubierta negra e incube a temperatura ambiente por 30 minutos.

- 5.5.14. Detenga la reacción agregando 100 µl de solución de parada en cada pocillo incluyendo el blanco.

- 5.5.15. Determine la absorbancia de los controles y muestras dentro de 15 minutos con un fotómetro de precisión a 450 nm con una longitud de onda seleccionada de referencia de 620 a 690nm<sup>\*8</sup>. Use el blanco para blanquear el fotómetro.

**NOTA:** El color del blanco debe ser de incoloro a amarillento pálido; de otro modo el



ensayo es inválido. En este caso el ensayo debe ser repetido.  
Blanco Sustrato: la absorbancia debe ser menor de 0,100.

## 5.6. Cálculo de los resultados del ensayo

5.6.1. Cálculo de la CNx (Absorbancia promedio del Control Negativo).  
Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	0.080
2	0.085
3	0.079



$$CNx = (0.080 + 0.085 + 0.079) / 3 = 0.081$$

**CNx debe ser  $\leq 0,2$  de otro modo el ensayo es inválido.**

5.6.2. Cálculo de CPx (Absorbancia Promedio del Control Positivo)  
Ejemplo:

Muestra No.	Absorbancia
1	1.223
2	1.205

$$CPx = (1.223 + 1.205) / 2 = 1.214$$

**CPx debe ser  $\geq 0,5$  de otro modo el ensayo es inválido.**

5.6.3. Cálculo del **Valor P-N**

$$P-N = CPx - CNx$$

Ejemplo:

$$P - N = 1.214 - 0,081 = 1,133$$



**El valor P - N debe ser  $\geq 0,3$  de otro modo el ensayo es inválido.**

5.6.4. **Valor de Corte =  $CNx + (CPx)/4$**

Ejemplo:

$$\text{Valor de Corte} = 0.081 + (1.214/4) = 0.385$$

5.6.5. Cálculo del **Rango de Repetición**

$$\text{Rango de Repetición} = \text{Valor de Corte} \pm 10\%$$

$$\text{Ejemplo: Valor de Corte} = 0.385$$

$$\text{Rango de Repetición} = (0.385 - 0.039) \text{ a } (0.385 + 0.039) = 0.346 \text{ a } 0.424$$



## 5.7. Validez de los Ensayos

5.7.1. **CNx debe ser  $\leq 0,2$  de otro modo el ensayo es inválido.**

5.7.2. **CPx debe ser  $\geq 0,5$  de otro modo el ensayo es inválido.**

5.7.3. **Valor de P-N debe ser  $\geq 0,3$  de otro modo el ensayo es inválido.**



**NOTA: Control Negativo: la absorbancia debe ser menor o igual a 0,200 después de restar el blanco.**

## 5.8. Interpretación de los Resultados

5.8.1. Las muestras con absorbancia **MENOR** que el **Valor de Corte** se consideran como **no reactivas** para IgM Anti-VHA

5.8.2. Las muestras con absorbancia **MAYOR o IGUAL** al **valor de corte** se consideran **reactivas** para IgM Anti-VHA.

Si los resultados caen dentro del Rango de Repetición, la prueba debe ser repetida en duplicado e interpretada como se ha indicado. Si la absorbancia repetida aún cae dentro el rango de repetición, se sugiere analizar muestras ulteriores.

## 5.9. Solución de Problemas

Si el resultando no puede ser reproducido, una solución preliminar podría obtenerse revisando las posibilidades mencionadas a continuación:

5.9.1. Procedimiento de lavado inadecuado.

5.9.2. Muestra contaminada con positivo.

5.9.3. Volumen de muestra, conjugado o sustrato equivocado.

5.9.4. Contaminación del borde del pocillo con conjugado.

5.9.5. Muestra inadecuada, p.ej. suero o plasma hemolizados, muestra con precipitado, muestra no suficientemente mezclada antes del uso.

- 5.9.6. Tiempo o temperatura de incubación equivocados.
- 5.9.7. Cabeza y agujas de la lavadora para dispensar/aspirar total o parcialmente obstruidas.
- 5.9.8. Aspiración insuficiente.

**5.10. Limitaciones e Interferencias**

- 5.10.1. Este kit de reactivos es para ser usado con muestras de suero o plasma humano individual.
- 5.10.2. Resultados falsos positivos no reproducibles pueden producirse en cualquier kit de inmunoensayo enzimático, principalmente debido a error técnico ya sea de parte del operador o funcionamiento defectuoso del aparato usado.
- 5.10.3. El kit no ha sido validado par uso con muestras de cadáver.
- 5.10.4. Sustancias que podrían interferir: Al agregar estas sustancias a las muestras del ensayo se obtuvieron los siguientes resultados:
  - 1. Los anticoagulantes heparina, citrato y EDTA no produjeron ningún efecto sobre el resultado del ensayo.
  - 2. Hemoglobina hasta 8,0 mg/ml no produjo ningún efecto sobre el resultado del ensayo.
  - 3. Bilirrubina hasta 0,3 mg/ml no tuvo ningún efecto sobre el resultado del ensayo.
  - 4. Triglicéridos hasta 5,0 mg/ml no produjeron ningún efecto sobre el resultado del ensayo.
  - 5. Una muestra con alto contenido de factor reumatoide dio un resultado falso positivo.
  - 6. El Embarazo no afectó el resultado del ensayo.



## 5.11.

### Características del Ensayo

#### 5.11.1.

**Sensibilidad y  
Especificidad  
Diagnostica**

#### 1. Muestras de pacientes hospitalizados:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Ensayo Comparativo	Negativo	1378	0	1378
	Positivo	4	188	192
	total	1382	188	1570
	Sensibilidad diagnóstica = $100\% \times 188/192 = 98\%$			
Especificidad diagnóstica = $100\% \times 1378/1378=100\%$				

#### 2. Pacientes con hepatitis B aguda:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Ensayo Comparativo	Negativo	51	0	51
	Positivo	0	0	0
	total	51	0	51
	Conformidad = 100%			

#### 3. Pacientes con hepatitis B en periodo de convalecencia:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Ensayo Comparativo	Negativo	28	0	28
	Positivo	0	0	0
	total	28	0	28
	Conformidad = 100%			

#### 4. Portadores de hepatitis B crónica:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Ensayo Comparativo	Negativo	107	0	107
	Positivo	0	0	0
	total	107	0	107
	Conformidad = 100%			

#### 5. Pacientes auto- inmunes:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Ensayo Comparativo	Negativo	20	0	20
	Positivo	0	0	0
	total	20	0	20
	Conformidad = 100%			

6. Pacientes con hepatitis A aguda:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
Ensayo Comparativo		Negativo	Positivo	Total
	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	24	0
	total	0	24	24

Sensibilidad diagnóstica = 100%

Especificidad diagnóstica = 100%

7. Pacientes con otras infecciones virales:

		DIAsource Anti-VHA IgM ELISA		
Ensayo Comparativo		Negativo	Positivo	Total
	Negativo	35	0	35
	Positivo	0	0	0
	total	35	0	35

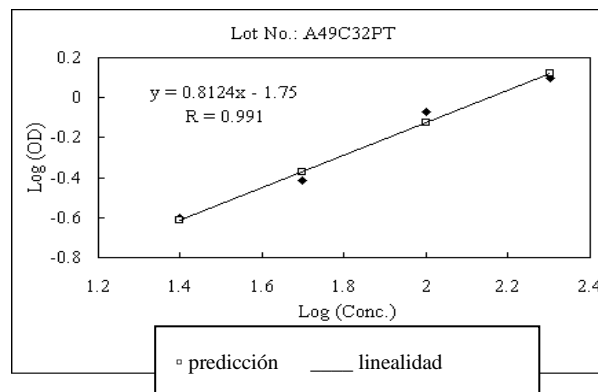
Especificidad diagnóstica / Conformidad = 100%

5.11.2.

**Sensibilidad Analítica ≤ 100 AU/ml**

**Sensibilidad Analítica p. ej. (Lot. No.: A49C32PT) Sensibilidad Analítica = 61,7 AU/ml**

Conc. (UA/ml)	DO	Log (Conc.)	Log (DO)
200	1.256	2.30103	0.09898964
100	0.846	2	-0.07262964
50	0.385	1.69897	-0.41453927
25	0.250	1.39794001	-0.602 5999
Corte	0.506	1.7900318	-0.29584948
<b>Sensibilidad (UA/ml)</b>	<b>61.7</b>	-----	-----



Regresión Lineal	
R	0.991195
R <sup>2</sup>	0.982468
R <sup>2</sup> Ajustado	0.973702
Error estándar	0.051643
Número de valor observado	4

5.11.3.

**Precisión**

Repetibilidad intra-ensayo: Intra-ensayo CV% < 15

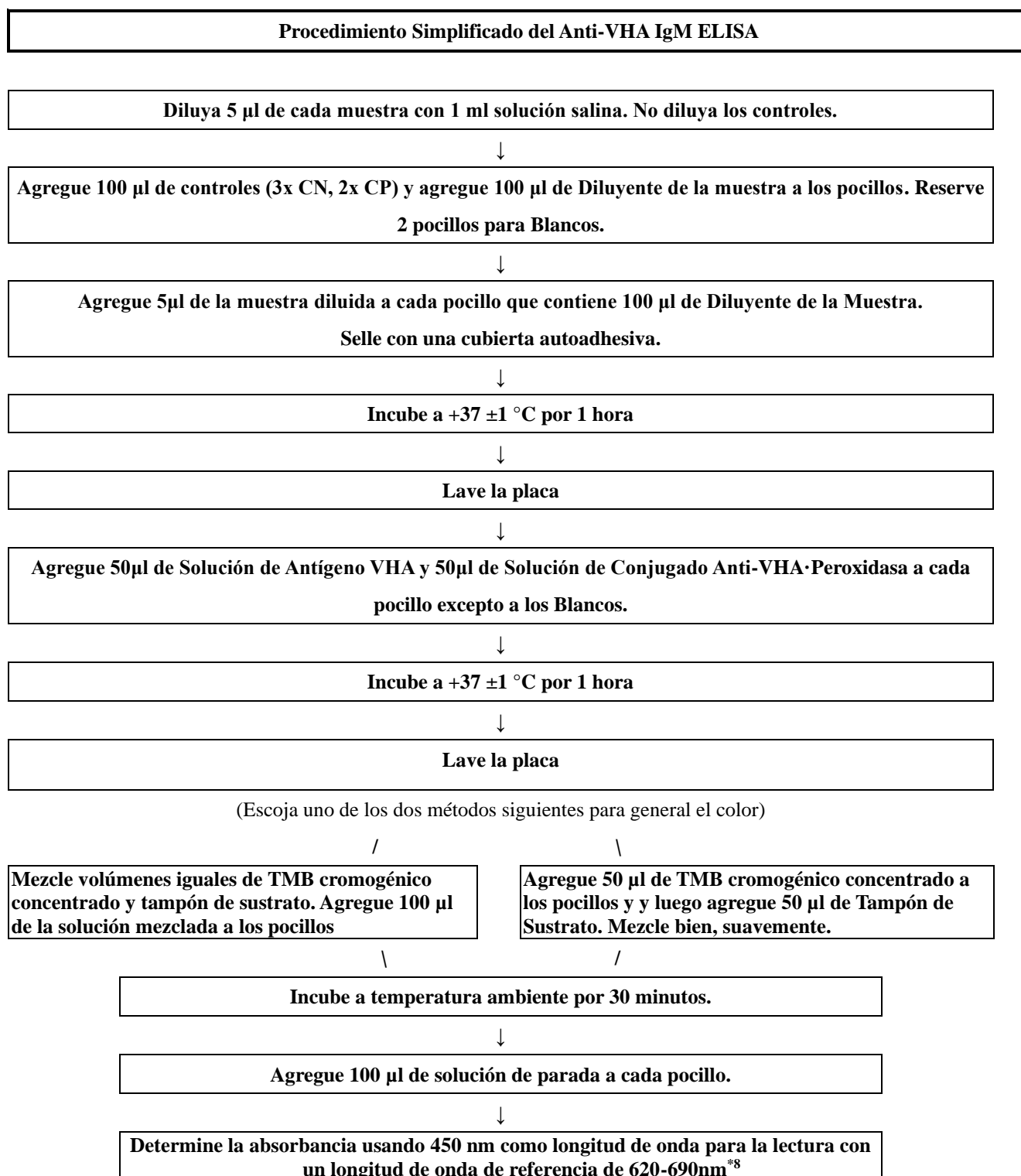
Reproducibilidad entre-ensayo: Intre-ensayo CV% < 20

5.11.4.

**Seguimiento**

Concentración del Control Positivo de Anti-VHA IgM = 800±200 AU/ml

5.12. Diagrama de Flujo del Procedimiento del Ensayo



## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Melnick JL. History and epidemiology of hepatitis A virus. J Infect Dis 1995;171(Suppl 1):2-8.
2. Koff RS. Hepatitis A. Lancet 1998;341:1643-49.
3. Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. J Infect Dis. 1983;148: 1033-1039.
4. Duermeyer W, Van der Veen J, Koster B. ELISA in Hepatitis A. Lancet. 1978; 1(8068):823-824.
5. Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. J Infect Dis. 2000;182:12-17.
6. Craig AS, Schaffner W. Prevention of hepatitis A with the hepatitis A vaccine N Engl J Med 2004; 350:476-481
7. The reference wavelength of spectrometer can be 620nm to 690nm. However, user should validate the photometer in combination with this kit before use.

### NOTAS:

\*8 La longitud de onda de referencia del espectrofotómetro puede ser de 620nm a 690nm. Sin embargo el usuario debe validar el foto metro en conjunto con este kit antes de su uso.

Fecha de la revisión: 2020-02-24

# Zestaw Anty-HAV IgM Elisa

PL



Przeznaczony do jakościowego wykrywania przeciwciał wirusa zapalenia wątroby typu A klasy IgM (Anty-HAV IgM) w ludzkiej surowicy lub osoczu

KAPG4AME3

DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Tel.:+32 10 84 99 11 - Faks:+32 10 84 99 90

## 1. PRZEZNACZENIE

**Anty-HAV IgM ELISA** to zestaw immunoenzymatyczny przeznaczony do jakościowego wykrywania przeciwciał wirusa zapalenia wątroby typu A klasy IgM (Anti-HAV IgM) w surowicy ludzkiej lub osoczu ludzkim (heparyna, EDTA lub cytrynian).

## 2. STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE DZIAŁANIA TESTU

Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV) jest wirusem z rodziny *Picornaviridae* pozbawionym otoczki, zawierającym jednoniciowe RNA, o średnicy 27 nm (1-2). Wirus zapalenia wątroby typu A jest najczęściej występującym wirusem ostrego zapalenia wątroby, przenoszonym przez kał u ludzi po średnim okresie inkubacji, trwającym 28 dni (zakres 15-50 dni). Choroba wywołana zakażeniem HAV zazwyczaj charakteryzuje się nagłym wystąpieniem objawów, takich jak gorączka, złe samopoczucie, brak apetytu, nudności, dyskomfort brzuszny, ciemne zabarwienie moczu oraz żółtaczka (2). Przeciwciała wirusa zapalenia wątroby typu A wykrywalne są w kale krótko przed lub na początku infekcji, natomiast w ostrej fazie choroby są zazwyczaj niewykrywalne (3). Swoiste przeciwciała przeciwko HAV w ostrej fazie wirusowego zapalenia wątroby typu A to przeciwciała klasy IgM (Anty-HAV IgM), których miano stopniowo ulega obniżeniu, w miarę jak są zastępowane przeciwciałami klasy IgG (Anty-HAV IgG) we wczesnej i późnej fazie rekonwalescencji (4). Przeciwciała anty-HAV IgM zazwyczaj zanikają po upływie 3 - 4 miesięcy po fazie ostrej. Wykrycie przeciwciał anty-HAV IgM (5) może wskazywać na obecność zakażenia wirusem ostrego zapalenia wątroby typu A. Przeciwciała anty-HAV IgM pojawiają się tylko w bardzo nielicznych przypadkach po szczepieniu (6). Oznaczenia przeciwciał anty-HAV IgM stosuje się w diagnozie różnicowej zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu A i zakażeń innego typu.

**Anty-HAV IgM ELISA** to szybki test do jakościowego wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu A klasy IgM w surowicy krwi lub osoczu (heparyna, cytrynian lub EDTA). Jest to test immunoenzymatyczny (ELISA), wykorzystujący przeciwciała klasy IgM przeciwko ludzkiemu wirusowi zapalenia wątroby typu A, znajdujące się w studzienkach płytki mikrotitracyjnej w fazie stałej oraz HAV Ag i przeciwciała anty-HAV skoniugowane z peroksydazą w fazie płynnej. Test działa na zasadzie "wychwytywania IgM" i służy do oznaczania poziomów przeciwciał IgM przeciwko HAV w surowicy lub osoczu.

Próbki z wartościami absorbancji powyżej wartości odcięcia uznawane są za POZYTYWNE dla Anty-HAV IgM. Próbki o absorbancji co najmniej równej wartości odcięcia uznawane są za NIEREAKTYWNE w teście anty-HAV IgM.

Test należy powtórzyć w podwójnych oznaczeniach dla próbek z wartościami absorbancji jest w zakresie kwalifikującym do powtórzenia testu (wartość odcięcia  $\pm 10\%$ ) i interpretować jak powyżej.

Jeżeli absorbancja którejkolwiek próbki ponownie testowanej będzie nadal w granicach zakresu kwalifikującego do powtórzenia testu, sugeruje się aby ponownie wykonać oznaczenia .

### 3. OPIS TESTU

**Anty-HAV IgM ELISA** jest testem immunoenzymatycznym fazy stałej (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) — opartym na zasadzie "wychwytu IgM". Faza stała płytki mikrotitracyjnej jest wykonana z polistyrenowych dołków opłaszczonych anty-ludzką IgM, natomiast koniugat Anty-HAV · peroksydaza stanowi fazę ciekłą. Po dodaniu próbki surowicy lub osocza, zawierającej Anty-HAV IgM, do dołków opłaszczonych przeciw- ludzką IgM- oraz jej inkubacji, przeciwciała przeciwko IgM, znajdujące się w próbce wiążą się z przeciw- ludzką IgM na powierzchni dołków. Po dodaniu roztworu zawierającego HAV Ag oraz roztworu zawierającego koniugat anty-HAV · peroksydaza, odbywa się dalsza inkubacja, podczas której tworzy się kompleks (Anty-h IgM) • (Anty-HAV IgM) • (HAV Ag) • (Anty-HAV• peroksydaza) na powierzchni dołków. Po wypłukaniu płytki mikrotitracyjnej w celu usunięcia niezwiązanego materiału, roztwór substratu tetrametylobenzydyny (TMB) dodawany jest do dołków i inkubowany. W przypadku obecności Anty-HAV IgM w próbce, po wypłukaniu, aktywność peroksydazy na dołkach odzwierciedla zawartość Anty-HAV IgM w próbce. Reakcja peroksydazy - TMB zatrzymywana jest poprzez dodanie kwasu siarkowego. Optyczna gęstość uzyskanego koloru odczytywana jest za pomocą odpowiedniego fotometru przy długości fali 450 nm (wybrana referencyjna długość fali w zakresie 620 - 690 nm <sup>\*8</sup>)

#### Zasada testu została przedstawiona na poniższym schemacie:

A. Próbka (zawierająca przeciwciała IgM Anty-HAV):



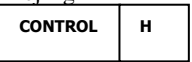


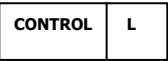
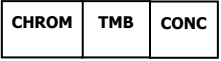
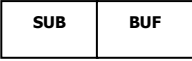

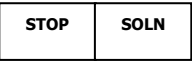
1. Płytki (Anty-h IgM) + próbka (zawierająca IgM Anty-HAV)  
→ Płytki (Anty-h IgM) ▪ IgM Anty-HAV
2. Płytki (Anty-h IgM) ▪ peroksydaza IgM Anty-HAV + HAV + Anty-HAV  
→ Płytki (Anty-h IgM) ▪ IgM Anti-HAV·HAV ▪ kompleks (Anty-HAV·HRPO)
3. Płukanie w celu usunięcia niezwiązanych materiałów.
4. Płytki (Anty-h IgM) - IgM Anty-HAV ▪ kompleks HAV(Anty-HAV·HRPO)  
+ roztwór TMB → kolor od jasnoniebieskiego do niebieskiego.
5. Kolor od jasnoniebieskiego do niebieskiego + roztwór zatrzymujący reakcję → kolor od jasnożółtego do żółtego, mierzony przy 450 nm z wybraną długością fali odniesienia w zakresie 620 - 690 nm <sup>\*8</sup>

B. Próbka (bez przeciwciał IgM Anty-HAV):

1. Płytki (Anty-h IgM) + próbka (bez IgM Anty-HAV) → Płytki (Anty-h IgM)
2. Płytki (Anty-h IgM) + HAV + Anty-HAV ▪ peroksydaza → Płytki (Anty-h IgM  
----- nie powstanie żaden kompleks
3. Płukanie w celu usunięcia niezwiązanego materiału.
4. Płytki (Anty-h IgM) + roztwór TMB (bezbarwny) → bezbarwny
5. Roztwór bezbarwny + zatrzymujący reakcję → bezbarwny, mierzony przy długości fali 450nm (wybrana referencyjna długość fali w zakresie 620 - 690 nm <sup>\*8</sup>).

#### 4. OPIS MATERIAŁÓW ZAWARTYCH W ZESTAWIE

- **Warunki przechowywania:** Pozycje 1 - 8 w poniższej tabeli odczynników powinny być przechowywane w lodówce w temperaturach od +2 do +8°C. Roztwór do płukania (20x) oraz roztwór stopujący reakcję należy przechowywać w temperaturach od +2 do +30°C.

POZYCJE	Składniki	Opis	Ilość na 96 testów
(1)	Płytką opłaszczoną Anti-IgM 	Mikropłytką opłaszczoną oczyszczonym przeciwciałem ludzkiej IgM.	1 płytką
(2)	Roztwór Anti-HAV · peroksydaza 	Koniugat Anti-HAV · peroksydaza (chrzanowa) w buforze ze stabilizatorami białka. Środki konserwujące: gentamycyna 0,003% i timerosal 0,01%	1 butelka, 8 ml
(3)	Dodatnia kontrola przeciw-ludzkiej -IgM 	Surowica zawierająca rozcieńczoną Anti-HAV IgM w buforze za stabilizatorami białka. Środki konserwujące: gentamycyna 0,003% i timerosal 0,01%	1 butelka, 2,5 ml
(4)	Rozcieńczalnik próbki 	Stabilizator białka w buforze. Środki konserwujące: gentamycyna 0,003% i timerosal 0,01%	1 butelka 12 ml
(5)	Roztwór antygeny zapalenia wątroby typu A 	Antygen wirusa Hepatitis A w buforze I stabilizatorze białka. Środki konserwujące: gentamycyna 0,003% i timerosal 0,01%.	1 butelka, 8 ml
(6)	Ujemna kontrola Anti-HAV IgM 	Stabilizator białka w buforze. Środki konserwujące: gentamycyna 0,003% i timerosal 0,01%..	1butelka, 2,5 ml
(7)	Chromogeny koncentrat TMB 	0,6 mg/ml 3,3',5,5'-tetrametylobezydiny (TMB) w zasadzie organicznej (0,6 mg/ml).	1 butelka, 12 ml
(8)	Bufor substratu 	Bufor zawierający kwas cytrynowy H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03%.	1 butelka, 12 ml
(9)	Skoncentrowany roztwór do płukania (20x) 	Bufor fosforanowy tween-20.	1 butelka 58 ml
(10)	Roztwór zatrzymujący reakcję 	Kwas siarkowy 2N	1 butelka 12 ml



• INNE NIEZBĘDNE MATERIAŁY I URZĄDZENIA NIEDOŁĄCZONE DO ZESTAWU

POZYCJE	Składniki
(1)	Potrzebne są mikropipety 5 µl, 50 µl 100 µl I 1,0 ml oraz końcówki
(2)	100 ml soli fizjologicznej 0,15M.
(3)	Inkubator lub łaźnia wodna z kontrolą temperatury do +37 °C.
(4)	Probówki do rozcieńczenia próbki.
(5)	System płuczący do mikropłytek
(6)	Czytnik płytek ELISA: Dwie długości fali - 450 nm i 620-690 nm jako referencyjna długość fali <sup>8</sup> , szerokość pasma 10 nm.
(7)	Woda oczyszczona: woda destylowana lub dejonizowana.
(8)	W pełni automatyczny analizator mikropłytek EIA jest urządzeniem opcjonalnym. Użytkownik powinien dokonać walidacji automatycznego analizatora mikropłytek EIA w połączeniu z zestawem.

4.1. Warunki przechowywania oraz stabilność zestawu I jego elementów

Zestaw/Elementy	Warunki przechowywania	Stan	Stabilność
Zestaw Anty-HAV IgM ELISA	+2 do +8 °C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kontrola dodatnia Anty-HAV IgM	+2 do +8 °C	Oryginalny	15miesiący
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kontrola ujemna Anty-HAV IgM	+2 do +8 °C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Roztwór antygeny HAV	+2 do +8 °C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Rozcieńczalnik do próbek	+2 do +8 °C	Oryginalny	16 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Płytki przeciw-ludzkiej IgM	+2 do +8 °C	Oryginalny	15miesiący
		Raz otwarty	2 miesiąc
Roztwór koniugatu Anty-HAV · peroksydaza	+2 do +8 °C	Oryginalny	15 miesięcy
		Raz otwarty	1 miesiąc
Roztwór płuczący ,koncentrat (20x)	Temp. pokojowa	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
Rozcieńczony roztwór płuczący (20x)	Temp. pokojowa	Rozcieńczony	2 dni
	+2 do +8 °C	Rozcieńczony	1 tydzień
Chromogeny koncentrat TMB	+2 do +8 °C	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
Bufor substratu	+2 do +8 °C	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc
Kwas siarkowy 2N	Temp. pokojowa	Oryginalny	24 miesiące
		Raz otwarty	1 miesiąc

## 5. INSTRUKCJA STOSOWANIA

### 5.1. Ostrzeżenia

- 5.1.1. Niniejszy zestaw odczynników przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego użytku
- 5.1.2. Niniejszy zestaw odczynników przeznaczony jest wyłącznie do diagnostyki in vitro.
- 5.1.3. Wszystkie odczynniki i próbki znajdujące się w zestawie pozostawić do momentu osiągnięcia temperatury pokojowej (+20 do +30°C), a przed użyciem delikatnie wymieszać.
- 5.1.4. Nie należy używać odczynnika po upływie jego daty ważności.
- 5.1.5. Nie należy wymieniać odczynników pomiędzy zestawami o różnych numerach serii.
- 5.1.6. Nie należy pipetować ustami.
- 5.1.7. Nie należy palić tytoniu ani jeść w miejscach pracy z próbkami lub odczynnikami.
- 5.1.8. Kontrolę dodatnia, roztwór antygenu HAV, kontrolę ujemną, roztwór koniugatu oraz próbki należy traktować jak potencjalne zagrożenie dla zdrowia. Należy stosować je i utylizować zgodnie z procedurami bezpieczeństwa użytkownika laboratorium. Takie procedury bezpieczeństwa obejmują m.in. stosowanie rękawic ochronnych oraz unikanie generowania aerozoli.
- 5.1.9. Potencjalnie zakaźne próbki oraz rozlania lub wycieki roztworów niezawierające kwas należy dokładnie wytrzeć 5% podchlorynem sodu lub postępować zgodnie z zasadami praktyki laboratoryjnej w zakresie kontroli potencjalnego zagrożenia biologicznego.
- 5.1.10. **Pozostałości zużytych próbek oraz odczynników zanim zostaną usunięte jako odpady ogólne, należy utylizować zgodnie z zasadami postępowania z odpadami stwarzającymi potencjalne zagrożenie biologiczne lub w następujący sposób:**  
Odpady płynne oraz stałe należy umieścić w autoklawie, utrzymując temperaturę +121°C przez co najmniej 30 minut. Odpady stałe można również poddać spalaniu.  
Odpady płynne nie zawierające kwasów można oczyszczać podchlorynem sodu rozcieńczonym do ostatecznego stężenia 1%.  
Odpady płynne zawierające kwasy przed utylizacją należy zneutralizować za pomocą podchlorynu sodu (jak powyżej) oraz pozostawić na 30 minut w celu uzyskania skutecznej dezynfekcji.
- 5.1.11. Kwas siarkowy 2N działa drażniąco na skórę, oczy, drogi oddechowe oraz błony śluzowe. Należy unikać kontaktu kwasu siarkowego 2N ze skórą oraz błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu miejsca narażone należy niezwłocznie przemyć dużą ilością wody. W przypadku narażenia przez drogi oddechowe, należy zapewnić dopływ świeżego powietrza, a w razie dolegliwości, skonsultować się z lekarzem.
- 5.1.12. Chromogeny koncentrat TMB zawiera rozpuszczalnik organiczny, który jest łatwopalny: zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia w następstwie narażenia przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po spożyciu.  
Chromogeny koncentrat TMB zawiera dimetylosulfotlenek, który działa drażniąco na skórę i błony śluzowe.

### 5.2. Pobieranie próbek i przygotowanie do analizy

- 5.2.1. Przed pobraniem krwi nie jest wymagane specjalne przygotowanie pacjenta. Krew należy pobierać stosując zatwierdzone techniki medyczne.
- 5.2.2. Niniejszy zestaw diagnostyczny można stosować z surowicą lub osoczem. Próbki krwi pełnej należy możliwie jak najszybciej odwirować, aby uniknąć hemolizy. Wszelkie zanieczyszczenia (np. skrzepy fibrynowe lub erythrocyty) znajdujące się w próbce należy usunąć przed użyciem próbki.
- 5.2.3. Próbki należy przechowywać w temperaturze +2 do +8°C oraz unikać dezaktywacji wysoką temperaturą, aby zminimalizować ryzyko obniżenia jakości próbki. W przypadku długotrwałego przechowywania, próbki należy zamrozić w temperaturze poniżej -20 °C. Nie zaleca się przechowywania w samorozmrażającej się zamrażarce.
- 5.2.4. Zamrożone próbki należy dokładnie odmrozić i dobrze wymieszać przed wykonaniem testu.
- 5.2.5. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania
- 5.2.6.

#### OSTRZEŻENIE

1. Próbka nie może zawierać żadnych związków AZYDKU, który hamuje aktywność peroksydazy.
2. Nie należy używać niekompletnie skoagulowanych próbek surowicy oraz próbek skażonych mikrobiologicznie.

### 5.3. Przechowywanie odczynników

- 5.3.1. Zestaw należy przechowywać w temperaturze +2 do +8°C. Nie zamrażać.
- 5.3.2. Paski płytki należy zużyć w ciągu 2 miesięcy od otwarcia oryginalnej torebki z folii aluminiowej. Nieużywane paski należy trzymać w torebce z folii aluminiowej, zaklejając szczelnie otwór taśmą.
- 5.3.3. Bezpośrednio po użyciu odczynnik należy umieścić ponownie w temperaturze +2 do +8°C.
- 5.3.4. Koncentrat roztworu do płukania (20x) należy przechowywać w temperaturze pokojowej, aby uniknąć krystalizacji. Jeżeli kryształ wytrąci się przed użyciem koncentratu, roztwór należy podgrzewać w łaźni wodnej w temperaturze +37°C aż do rozpuszczenia się kryształu.

### 5.4. Procedura płukania płytek

- 5.4.1. Przygotowanie roztworu do płukania:  
Rozcieńczyć koncentrat roztworu do płukania (20x) destylowaną lub dejonizowaną wodą w proporcji 1:20. Nie używać wody z kranu.
- 5.4.2. Płukanie płytek  
Płukanie płytek:
  - 1. Płukanie płytek
    - (a) W płuczce do płytek z funkcją odsysania roztworu płuczającego: 6 cykli z co najmniej 0,5ml buforu płuczającego na dołek na cykl lub
    - (b) W płuczce do płytek bez funkcji odsysania roztworu płuczającego: 8 cykl z co najmniej 0,35ml buforu płuczającego na dołek na cykl.
- 5.4.3. Osuszyć, odwracając płytkę i obstukując mocno na papierze absorpcyjnym. Nadmierna pozostałość buforu płuczającego może prowadzić do błędnych wyników.  
**OSTRZEŻENIE:** Nieodpowiednie płukanie może prowadzić do błędnych wyników.

### 5.5. Procedura wykonania oznaczenia

- Oznaczenie może być wykonywane na automatycznych analizatorach mikropłytek EIA. Należy ustawić program zgodnie z poniższą procedurą testu.
- 5.5.1. Przed rozpoczęciem oznaczenia należy umieścić wszystkie odczynniki oraz próbki w temperaturze pokojowej (+20 do +30°C). Ustawić temperaturę łaźni wodnej lub inkubatora na +37±1°C.
  - 5.5.2. Przygotować wymaganą liczbę dołków – dwa dołki należy przeznaczyć na próbę ślepa, trzy na kontrolę ujemną, dwie na kontrolę dodatnią i jedną na każdą próbkę.  
Zarezerwować dwa dołki na próbę ślepa. Dodać **100 µl** kontroli ujemnej do każdego z trzech dołków, **100 µl** kontroli dodatniej do każdego z dwóch dołków oraz **100 µl** rozcieńczalnika do każdego dołka reakcyjnego przeznaczonego do badanych próbek.
  - 5.5.3. Rozcieńczyć każdą próbkę w proporcji 1: 200:  
Przygotować próbki do rozcieńczania w liczbie odpowiadającej liczbie próbek. Dodać 1,0 ml roztworu soli fizjologicznej - 5 µl na każdą próbkę i wstrząsnąć, aby wymieszać.
  - 5.5.4. Dodać **5 µl** **każdej rozcieńczonej próbki odpowiednio** do każdego dołka zawierającego rozcieńczalnik.
  - 5.5.5. Delikatnie ostukać płytkę.
  - 5.5.6. Uszczelnić płytkę paskiem samoprzylepnym.
  - 5.5.7. Inkubować płytkę w inkubatorze lub łaźni wodnej w temperaturze +37 ± 1°C przez **jedną godzinę**.
  - 5.5.8. Pod koniec okresu inkubacji usunąć i wyrzucić pasek samoprzylepny, i przepłukać płytkę zgodnie z punktem "5.4. Procedura płukania płytek".
  - 5.5.9. Dodać **50 µl** roztworu antygeny wirusa A oraz **50 µl** roztworu koniugatu Anty-HAV · peroksydaza do każdego dołka reakcyjnego z wyjątkiem dołków próby ślepej. Nałożyć nowy pasek samoprzylepny.
  - 5.5.10. Inkubować płytkę w inkubatorze lub łaźni wodnej w temperaturze +37 ± 1 °C przez **jedną godzinę**.
  - 5.5.11. Pod koniec okresu inkubacji usunąć i wyrzucić pasek samoprzylepny, i przepłukać płytkę zgodnie z punktem "5.4. Procedura płukania płytek".
  - 5.5.12. Wybrać jedną z następujących dwóch metod przeprowadzania reakcji barwnej:  
**UWAGA:** Chromogeny koncentrat TMB powinien być bezbarwny do jasnoniebieskiego, w przeciwnym razie należy go wyrzucić. Mieszaninę chromogennego koncentratu TMB oraz buforu substratu należy zużyć w ciągu 30 minut po zmieszaniu. Należy unikać ekspozycji mieszaniny na intensywne światło.
    - A. Bezpośrednio przed użyciem wymieszać w czystym pojemniku równe objętości chromogennego koncentratu TMB oraz buforu substratu. Dodać 100 µl roztworu mieszaniny do każdego dołka, także do dwóch dołków przeznaczonych na próbę ślepa.

- B. Najpierw dodać 50 µl chromogennego koncentratu TMB, a następnie dodać 50 µl buforu substratu do każdego dołka, także do dwóch dołków próby ślepej. Starannie wymieszać.
- 5.5.13. Przykryć płytkę czarną nakrywką i inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- 5.5.14. Zastopować reakcję dodając 100 µl roztworu stopującego do każdego dołka, także do dwóch dołków próby ślepej.
- 5.5.15. Odczytać absorbancję kontroli oraz badanych próbek w ciągu 15 minut za pomocą fotometru przy długości fali 450 nm (wybrana referencyjna długość fali w zakresie 620 - 690 nm<sup>\*8</sup>).  
Użyć dołka próby ślepej do wyzerowania fotometru.



**UWAGA:** Dołek próby ślepej powinien być bezbarwny do jasno żółtawego; w przeciwnym razie wynik testu jest nieważny. W tym przypadku oznaczenie należy powtórzyć.  
Próba ślepa substratu: wartość absorbancji nie może przekraczać 0,100.

## 5.6. Obliczanie wyników testów

- 5.6.1. Obliczanie NCx (średnia absorbancja kontroli ujemnej).

Przykład:

Numer próbki	Absorbancja
1	0,080
2	0,085
3	0,07



$$NCx = (0,080 + 0,085 + 0,079) / 3 = 0,081$$

**NCx musi wynosić ≤ 0,2, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

- 5.6.2. Obliczanie PCx (średniej absorbancji kontroli dodatniej)

Przykład:

Numer próbki.	Absorbancja
1	1,223
2	1,205

$$PCx = (1,223 + 1,205) / 2 = 1,214$$

**PCx musi wynosić ≥ 0,5, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

- 5.6.3. Obliczanie wartości P-N

$$P-N = PCx - NCx$$

Przykład:

$$P-N = 1,214 - 0,081 = 1,133$$

**Wartość P-N musi wynosić ≥ 0,3, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

- 5.6.4. Obliczanie wartości odcięcia

$$\text{Wartość odcięcia} = NCx + (PCx/4)$$

Przykład:

$$\text{Wartość odcięcia} = 0,081 + (1,214/4) = 0,385$$

- 5.6.5. Obliczanie zakresu dla powtórzenia testu (Retest Range)

$$\text{Zakres dla powtórzenia testu} = \text{Wartość odcięcia} \pm 10\%$$

Przykład: Wartość odcięcia = 0,385

$$\text{Zakres dla powtórzenia testu} = (0,385 - 0,039) \text{ do } (0,385 + 0,039) = 0,346 \text{ do } 0,424$$

## 5.7. Ważność serii testów

- 5.7.1. **NCx musi wynosić ≤ 0,2, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

- 5.7.2. **PCx musi wynosić ≥ 0,5, w przeciwnym razie test jest nieważny.**

- 5.7.3. **Wartość P-N musi wynosić ≥ 0,3, w przeciwnym razie test jest nieważny.**



**UWAGA: Kontrola ujemna: wartość absorbancji po odjęciu próby ślepej nie może przekraczać 0,200.**

## 5.8. Interpretacja wyników

- 5.8.1. Próbki o wartościach absorbancji **PONIŻEJ wartości odcięcia** uznawane są za **negatywne** dla Anti-HAV IgM

- 5.8.2. Próbki z wartościami absorbancji **POWYŻEJ** lub **RÓWNYMI wartości odcięcia** uznawane są za **pozytywne** dla Anti-HAV IgM.

- 5.8.3. Jeśli otrzymane wartości mieszczą się w **zakresie kwalifikującym do powtórzenia testu**, test należy powtórzyć w podwójnych oznaczeniach i zinterpretować jak wyżej. Jeżeli ponownie otrzymana wartość absorbancji mieści się w zakresie kwalifikującym do powtórzenia testu, sugeruje się ponowne wykonanie oznaczenia (świeża próbka..)

## **5.9. Rozwiązywanie problemów**

Jeżeli nie można odtworzyć wyniku, należy przeprowadzić wstępne czynności kontrolne przedstawione poniżej:

- 5.9.1. Nieodpowiednia procedura płukania.
- 5.9.2. Zanieczyszczenie próbkami dodatnimi.
- 5.9.3. Niewłaściwa objętość próbki, koniugatu lub substratów.
- 5.9.4. Zanieczyszczenie obrzeża dołka koniugatem.
- 5.9.5. Nieprawidłowa próbka, np. zhemolizowana surowica lub osocze, próbka zawierająca osad oraz próbka niestarannie wymieszana przed użyciem.
- 5.9.6. Niewłaściwy czas inkubacji lub niewłaściwa temperatura.
- 5.9.7. Całkowicie lub częściowo niedrożna głowica aspirująco-dozująca płuczki i igły.
- 5.9.8. Niedostateczna aspiracja.

## **5.10. Ograniczenia i interferencje**

- 5.10.1. Niniejszy zestaw odczynników jest przeznaczony do użycia wyłącznie z niepulowanymi próbkami ludzkiej surowicy lub osocza.
- 5.10.2. W przypadku każdego zestawu immunoenzymatycznego, niepowtarzalne wyniki oznaczenia można uzyskać najczęściej w wyniku błędu technicznego osób wykonujących badanie lub niesprawnością aparatury.
- 5.10.3. Zestaw odczynników nie został zwalidowany dla próbek pobranych ze zwłok.
- 5.10.4. Substancje potencjalnie interferujące: W poszczególnych badaniach uzyskano następujące rezultaty
  1. Nie wykazano wpływu antykoagulantów, takich jak heparyna, cytrynian i EDTA, na wynik testu.
  2. Nie wykazano wpływu hemoglobiny do 8,0 mg/ml na wynik testu.
  3. Nie wykazano wpływu bilirubiny do 0,3 mg/ml na wynik testu.
  4. Nie wykazano wpływu triglicerydów do 5,0 mg/ml na wynik testu.
  5. Wysoce dodatnia próbka czynnika reumatoidalnego wykazała fałszywie dodatni wynik.
  6. Cięża nie miała wpływu na wynik testu.

## 5.11. Charakterystyka metody

5.11.1.

1. Próbkę pochodzące od hospitalizowanych pacjentów:

**Czułość diagnostyczna i swoistość diagnostyczna**

Test DIASource Anti-HAV IgM ELISA				
Próba		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
porównawcza	NEGATYWNE	1378	0	1378
	POZYTYWNE	4	188	192
	ogółem	1382	188	1570

Czułość diagnostyczna =  $100\% \times 188/192 = 98\%$  swoistość diagnostyczna =  $100\% \times 1378/1378 = 100\%$

2. Pacjenci ostrym wirusowym zapaleniu wątroby typu B:

Test DIASource Anti-HAV IgM ELISA				
Próba		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
porównawcza	NEGATYWNE	51	0	51
	POZYTYWNE	0	0	0
	ogółem	51	0	51

Zgodność = 100%

3. Pacjenci wirusowym zapaleniu wątroby typu B w okresie rekonwalescencji:

Test DIASource Anti-HAV IgM ELISA				
Próba		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
porównawcza	NEGATYWNE	28	0	28
	POZYTYWNE	0	0	0
	ogółem	28	0	28

Zgodność = 100%

4. Nosiciele przewlekłego wirusowym zapaleniu wątroby typu B:

Test DIASource Anti-HAV IgM ELISA				
Próba		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
porównawcza	NEGATYWNE	107	0	107
	POZYTYWNE	0	0	0
	ogółem	107	0	107

Zgodność = 100%

5. Pacjenci z chorobami autoimmunologicznymi:

Test DIASource Anti-HAV IgM ELISA				
Próba		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
porównawcza	NEGATYWNE	20	0	20
	POZYTYWNE	0	0	0
	ogółem	20	0	20

Zgodność = 100%

6. Pacjenci z ostrym wirusowym zapaleniu wątroby typu A:

		Test DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
Próba porównawcza	NEGATYWNE	0	0	0
	POZYTYWNE	0	24	0
	ogółem	0	24	24

Czułość diagnostyczna = 100%

Swoistość diagnostyczna = 100%

7. Pacjenci z innymi infekcjami wirusowymi:

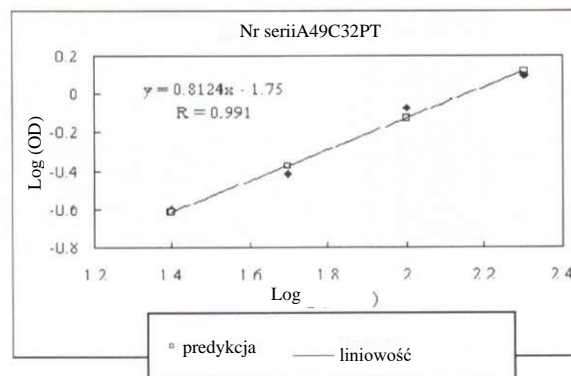
		Test DIAsource Anti-HAV IgM ELISA		
		NEGATYWNE	POZYTYWNE	Ogółem
Próba porównawcza	NEGATYWNE	35	0	35
	POZYTYWNE	0	0	0
	ogółem	35	0	35

Swoistość diagnostyczna/Zgodność = 100%

5.11.2. Czułość analityczna  $\leq 100$  AU/ml

Czułość analityczna np. (Nr serii: A49C32PT) Czułość analityczna= 61,7 AU/ml

Stężenie (AU/ml)	OD	Log (Stężenie.)	Log (OD)
200	1,256	2,30103	0,09898964
100	0,846	2	-0,07262964
50	0,385	1,69897	-0,41453927
25	0,250	1,39794001	-0,60205999
Odcięcie	0,506	1,79003187	-0,29584948
Czułość (AU/ml)	61,7	-----	-----



Regresja liniowa	
R <sup>2</sup>	0,991195
R <sup>2</sup>	0,982468
Dostosowany R <sup>2</sup>	0,973702
Błąd standardowy	0,051643
Numer obserwowanej wartości	4

5.11.3. **Precyzja**

Powtarzalność wewnątrzseryjna: wewnątrzseryjna CV% < 15

Powtarzalność międzyseryjna: międzyseryjna CV% < 20

5.11.4. **Identyfikowalność**

Stężenie kontroli dodatniej Anty-HAV IgM = 800±200 AU/ml



### 5.12.Karta procedury wykonania oznaczenia

