



Anti-HAV IgM Elisa

KAPG4AME3

LOT : 110628/2



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




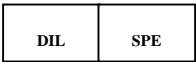

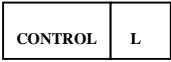
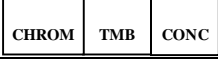
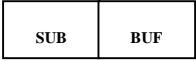

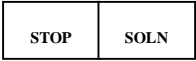
Anti-HAV IgM ELISA is a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay) -- based on the principle of "IgM capture". The solid phase of the microtiter plate is made of polystyrene wells coated with anti-human IgM, while peroxidase-conjugated Anti-HAV acts as liquid phase. When 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^{*8}

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^{*8}.
- 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^{*8}.

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 ₂ O ₂ .	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 ^{*8} , 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

Kit/Components	Storage condition	State	Stability
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.

WARNING

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.

- 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.
 - 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^{*8}.



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 NCx (Mean Absorbance of Negative Control).

Example:

Sample No.	Absorbance
1	0.080
2	0.085
3	0.079

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

NCx must be ≤ 0.2, otherwise, the test is invalid.

5.6.2. Calculation of PCx (Mean Absorbance of Positive Control)

Example:

Sample No.	Absorbance
1	1.223
2	1.205

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

PCx must be ≥ 0.5, otherwise, the test is invalid.

5.6.3. Calculation of P-N Value

$$P-N = PCx - NCx$$

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

$$\text{Cutoff Value} = NCx + (PCx)/4$$

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. **NCx must be ≤ 0.2, otherwise, the test is invalid.**

5.7.2. **PCx 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

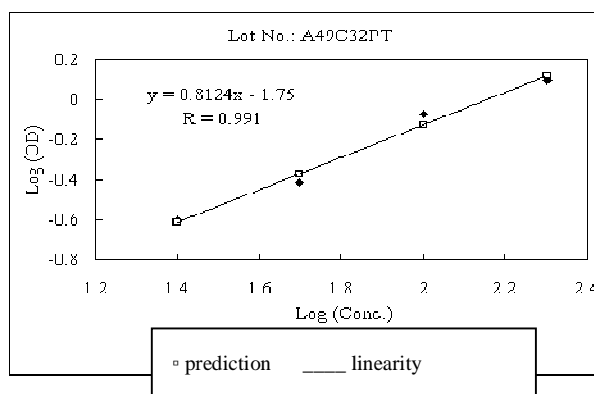
Diagnostic specificity/Conformity = 100%

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 ²	0.982468
Adjusted R ²	0.973702
Standard error	0.051643
Number of observed value	4

5.11.3.

Precision

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

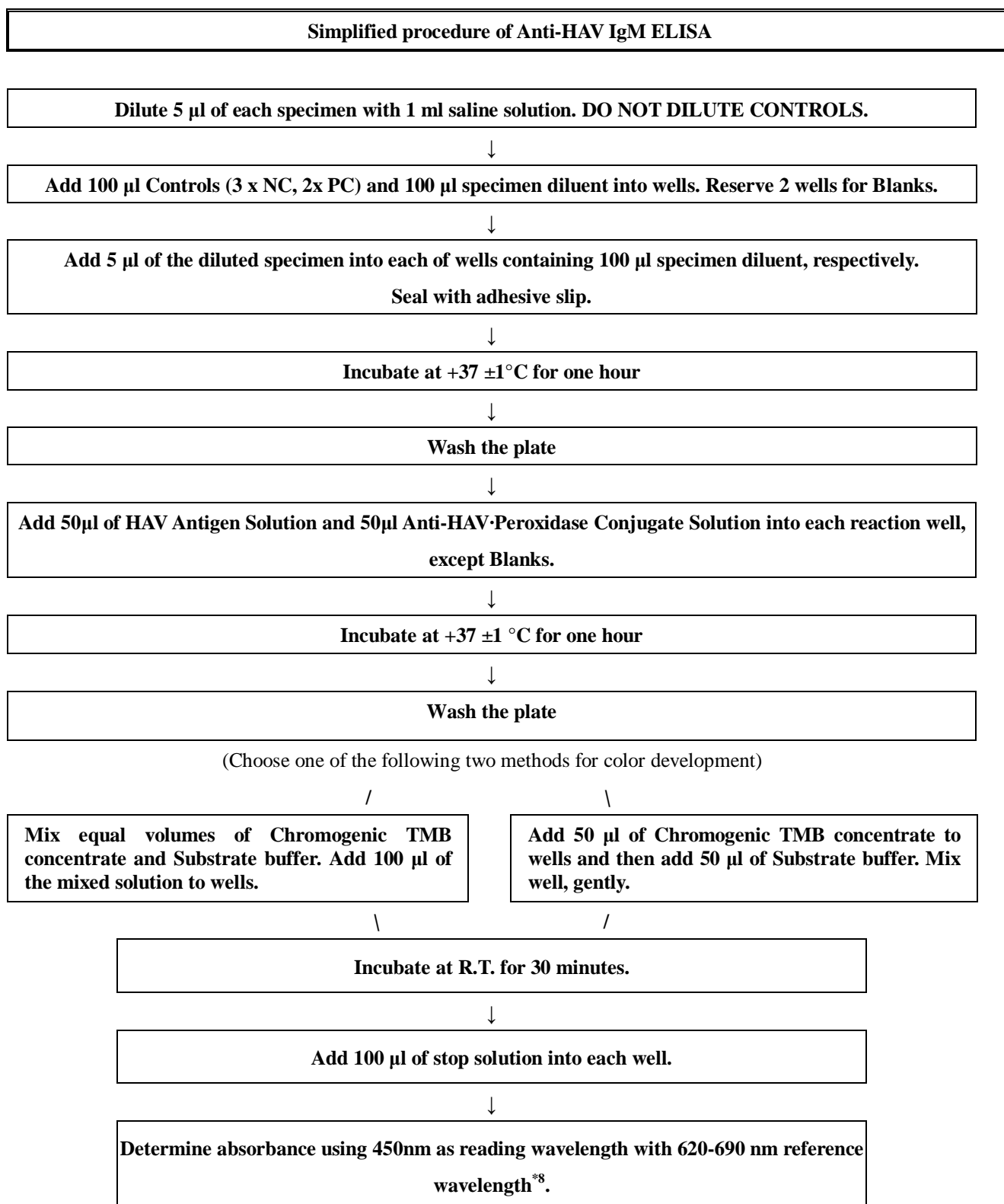
Inter-assay reproducibility: Inter-assay CV% < 20

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 : 2011-06-28



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 posteriores 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^{*8}

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

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


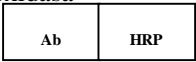
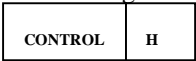
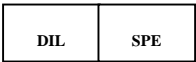

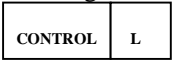
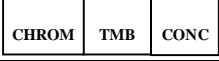

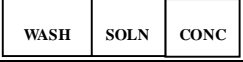
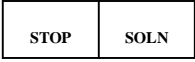
1. Placa (Anti-h IgM) + muestra (que contiene IgM Anti- VHA)
→ Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA
2. Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA + VHA + Anti- VHA • peroxidasa
→ Placa (Anti-h IgM) • IgM Anti- VHA • VHA • (Anti- VHA • HRPO) complejo
3. Lave para eliminar el material que no se ha unido.
4. Placa (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^{*8}

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^{*8}

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 ₂ O ₂ .	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.

Kit/Componentes	Condición de almacenaje	Estado	Estabilidad
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 dias
	+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^{*8}. 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:

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

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

$$\text{Valor de Corte} = CNx + (CPx)/4$$

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

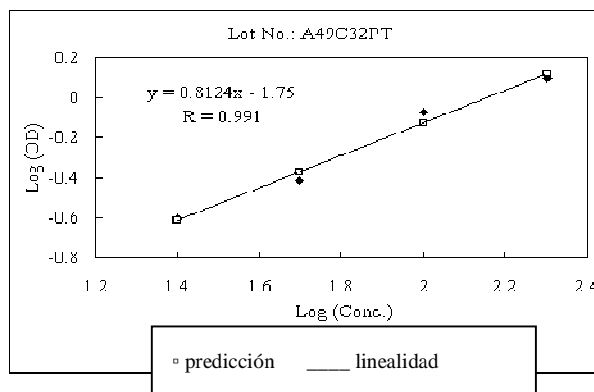
Especificidad diagnóstica / Conformidad = 100%

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	-0.60215999
Corte	0.506	1.79003181	-0.29584948
Sensibilidad (UA/ml)	61.7	-----	-----



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

5.11.3.

Precisión

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

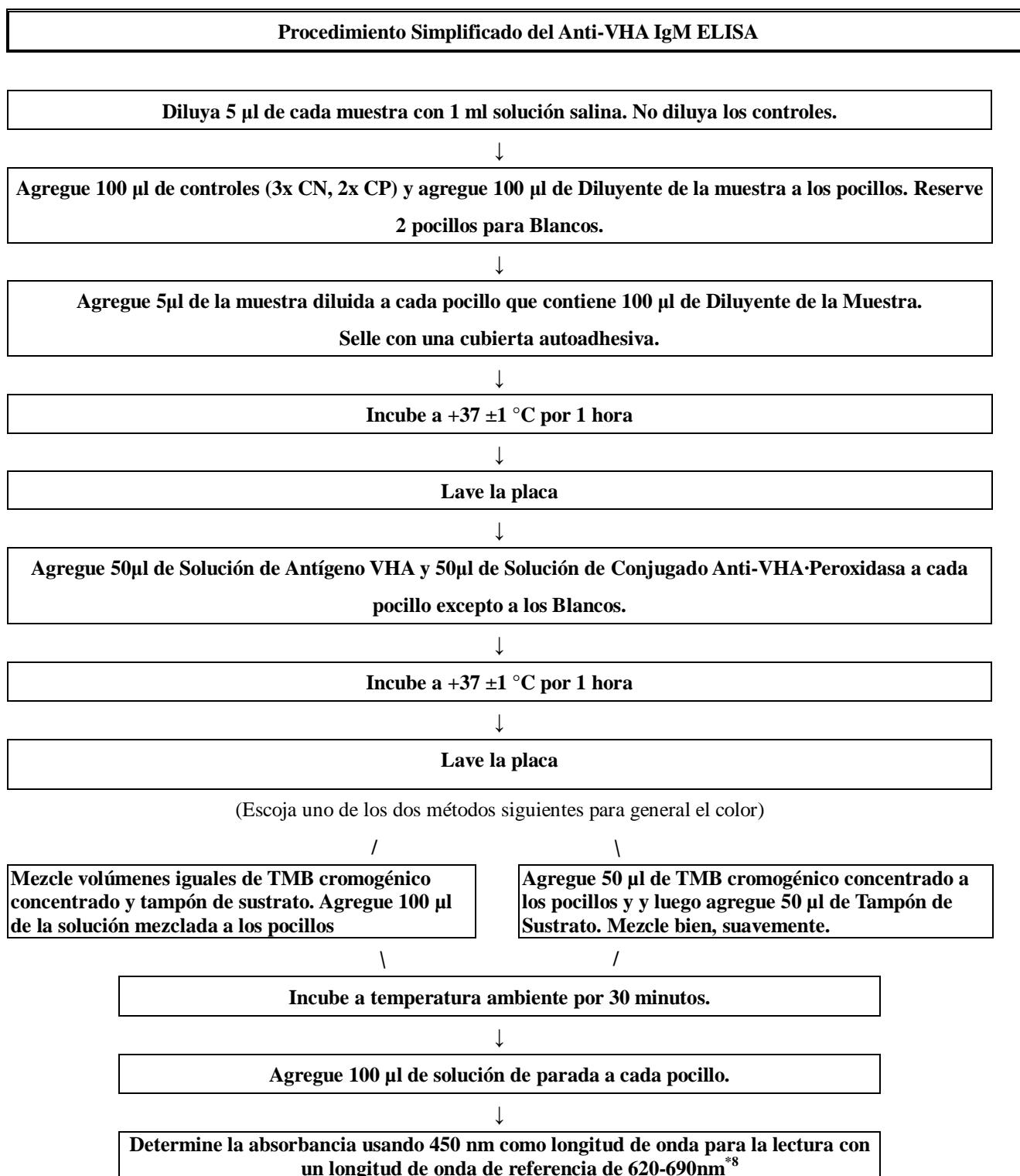
Reproducibilidad entre-ensayo: Intre-ensayo CV% < 20

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: 2011-06-28

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
96	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
	Protect from light

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
TLU	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación