



Vitrotest[®]

Vitrotest HAV-IgM

**Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А**

Інструкція із застосування

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK069

«Vitrotest HAV-IgM» Імуноферментна тест-система для якісного визначення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HAV-IgM» призначена для якісного визначення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

Гепатит А є однією з найпоширеніших інфекцій людини. Збудником хвороби є вірус гепатиту А (ВГА або HAV), що належить до родини пікорнавірусів. Геном вірусу представлений однією ниткою РНК. Особливістю вірусу гепатиту А є його стійкість в оточуючому середовищі: при кімнатній температурі він може зберігати життєздатність декілька тижнів чи місяців, а за температури 4°C – декілька місяців або років. Знищити вірус можна лише термоінактивацією при 100°C протягом 5 хвилин.

Щорічно в світі вірусом гепатиту А інфікується близько десяти мільйонів людей. У дітей і підлітків гепатит А може протікати безсимптомно, більш тяжко переносять хворобу діти до одного року та люди похилого віку. У дорослих інфекція нерідко протікає з вираженою інтоксикацією і жовтухою. Тривалість хвороби залежить від стану імунітету, віку людини та інших чинників, але в середньому вона триває близько 40 днів. У 15 % хворих спостерігається хронічна форма гепатиту А з перебігом від 6 до 9 місяців. Ризик смерті від хвороби коливається від 0,1 до 2,4% у людей, що старші за 40 років. Повне одужання відмічається у 90% хворих, в інших випадках мають місце залишкові явища.

Джерелом інфекції є хвора гепатитом А людина, яка з фекаліями виділяє в оточуюче середовище мільярди вірусів. При вживанні зараженої води та харчових продуктів віруси потрапляють до кишечника, проникають крізь стінки епітелію і з током крові потрапляють до печінки та проникають у її клітини – гепатоцити та клітини Купфера. Після розмноження вірусу клітини руйнуються за рахунок його цитолітичної дії, наслідком чого є розвиток запалення та порушення функцій печінки. Вірусні частинки секретуються в жовч і виводяться під час дефекації (зі стулом). В середньому, вони екскретуються у значних кількостях близько 11 днів, до появи симптомів або антитіл класу IgM проти вірусу гепатиту А в крові. Інкубаційний період при гепатиті А триває від 15 до 50 днів. Антитіла класу IgM з'являються за 3-5 днів до появи перших симптомів і зберігаються в крові хворого протягом 3-6 місяців, знижуючись до низьких рівнів протягом року. Поява антитіл класу IgG свідчить про закінчення гострої фази і формування імунітету до вірусу. Антитіла класу IgG до HAV з'являються в крові також після введення вакцини проти гепатиту А і зберігаються протягом всього життя, забезпечуючи стійкий імунітет. Наявність в крові людини антитіл класу IgG свідчить про перенесену в минулому інфекцію або вакцинацію проти цього вірусу.

3. Принцип аналізу

Виявлення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А в тест-системі «Vitrotest HAV-IgM» ґрунтується на принципі «IgM-захвату» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу М людини. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається «захват» імуноглобулінів класу М моноклональними антитілами на твердій фазі. Після відмивання нез'язаних компонентів в лунки додається антиген вірусу гепатиту А та кон'югат пероксидази хрому з антитілами специфічними до ВГА. Під час інкубації на твердій фазі формується імунний комплекс зв'язаних специфічних антитіл класу IgM з антигеном вірусу і пероксидазним кон'югатом моноклональних антитіл до ВГА. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імунні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів класу IgM людини зшитих з моноклональними антитілами, специфічними до пероксидази хрому (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Розчин для розведення сироваток – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока та консервантом (коричнево-зелений).

Розчин для розведення кон'югату – 1 флакон, що містить 14 мл буферного розчину антигену інактивованого вірусу гепатиту А зі стабілізаторами та консервантом (жовтий).

Кон'югат (11х) – 1 мікропробірка, що містить 1,4 мл 11-ти кратного кон'югату антитіл до вірусу гепатиту А з пероксидазою хрому у буфері зі стабілізаторами (синій).

Розчин для промивання Tw20 (20х) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Tween 20 (безбарвний).

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5М сірчаної кислоти.

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2} Будьласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

5. Застереження та техніка безпеки

5.1 Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення терміну придатності;

– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

- *Примітка:* Допускається використання Розчину для промивання Tw20 (20х), Розчину ТМБ та Стоп-реагенту інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реагенти використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будьласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтеся режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;

– розчин ТМБ перед використанням має бути безбарвним або світло блакитним. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

- для внесення в лунки планшета розчину ТМБ використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2 Техніка безпеки:

– всі реагенти набору призначені лише для *in vitro* діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– контролі тест-системи «Vitrotest HAV-IgM» протестовано та визнано негативними на наявність HBsAg, а також антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак, працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи необхідно інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, чи іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати автоклавуванням при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклауйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;
– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти (наприклад, сироваток), обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, за умови їх зберігання при температурі 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі впродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest HAV-IgM» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4мл концентрату – 76мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

8.3. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (жовтий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у зелений колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 1 мл розчину для розведення кон'югату 100 мкл концентрату кон'югату.

Розчин кон'югату в робочому розведенні стабільний протягом однієї години за умови зберігання при 18-24°C.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки контролі та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – 10 мкл позитивного контролю, в лунки В1, С1 та D1 – по 10 мкл негативного контролю, в решту лунок – по 10 мкл досліджуваних сироваток. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом **30 хвилин при 37°C**.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;

- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом **30 хвилин при 37°C**.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.11. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом **30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C**.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.14. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{- \text{середнє}} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{- \text{середнє}} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{- \text{середнє}} \times 2,0$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,25, тобто

$$\text{Граничне значення} = ОГ K_{- \text{середнє}} + 0,25$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Зразки із значенням індексу позитивності вище 1,1 є **позитивними**.

Негативними є досліджувані сироватки із значенням ІП нижче 0,9.

Досліджувані зразки із значенням ІП в межах 0,9-1,1 вважати **невизначеними**. Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи, якщо результати знову будуть в межах невизначених слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі повторного отримання невизначених результатів вважати такі зразки негативними.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest HAV-IgM» оцінювали за допомогою комерційної панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «Anti-Hepatitis A Virus (HAV) Mixed Titer Performance Panel PHT 202», що складається з 21 охарактеризованого зразка сироваток та плазми крові людини, з яких 7 зразків містять антитіла класу IgM специфічні до вірусу гепатиту А. Всі зразки панелі PHT 202 в тест-системі «Vitrotest HAV-IgM» визначались коректно, відповідно до паспортних даних.

Діагностичні характеристики тест-системи «Vitrotest HAV-IgM» визначали також у порівняльних дослідженнях із двома іншими комерційними тест-системами. Було проаналізовано 57 сироваток, що містять антитіла класу IgM до вірусу гепатиту А, отриманих від людей із клінічними проявами гепатиту А. Усі зразки були позитивними у всіх трьох тест-системах.

При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest HAV-IgM» з використанням 204 сироваток, негативних на антитіла класу IgM до вірусу гепатиту А, специфічність становила вище 99,5%.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох позитивних сироваток оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем, CV₁ та CV₂, відповідно.

№ сироватки	ОГ середня	CV ₁ , %	CV ₂ , %
102	2,018	4,4	4,1
121	1,522	5,1	5,8

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох позитивних сироваток оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ОГ середня	CV, %
102	1,983	5,1
121	1,472	6,3

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest HAV-IgM» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM, специфічних до вірусу гепатиту А. Анти-ВГА специфічні антитіла класу IgM є, як правило, маркерами активної реплікації вірусу гепатиту А.

Для постановки діагнозу слід враховувати як результати лабораторних досліджень, так і клінічні прояви захворювання.

З метою нівелювання хибнопозитивних результатів, спричинених наявністю в зразках сироваток крові людини аутоантитіл, специфічних до імуноглобулінів класу G (ревматоїдного фактору), в тест-системі використовується спеціальний блок-компонент, що перешкоджає формуванню імунних комплексів з анти-людськими антитілами на твердій фазі.

Література

1. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита.- 1999. - 423 с.
2. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. С.-Птб.-1998.-391 с.
3. Kathryn J. Jacobsen, Steven T. Wierzma. Hepatitis A seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005.// Vaccine. - 2010. – V.28. – P.6653-6657.
4. Anne Marie Moller, Lars R. Mathiesen. Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Hepatitis A Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. // Journal Of Clinical Biology. – 1979. – V.10. – N.5. – P.628-632.
5. S.D. Chitambar, S. Murthy-Grewal, M. Bokil, V.A. Arankalle, M.M. Gore, K. Banerjee. Indigenous anti-hepatitis A virus Ig M capture ELISA for the diagnosis of hepatitis A.// Indian Journal of Medical Research. – 1994. – V.99. – P.243-251.
6. W. Duermeyer, F. Wielaard, J. van der Veen. A new principle for the detection of specific IgM antibodies applied in an ELISA for hepatitis A. // Journal Of Medical Biology. – 1979. – V.4. – P.25-32.
7. J.V. Parry. Hepatitis A infection: guidelines for development of satisfactory assays for laboratory diagnosis. // Medical Laboratory Sciences. – 1981. – V38. – P.303-311.
8. Liaw Y.F., Yang C.Y., Chu C.M., Huang M.J. Appearance and persistence of hepatitis A IgM antibody in acute clinical hepatitis A observed in an outbreak. // Infection. – 1986. – V14. – P156-8.
9. Stapleton J.T. Host immune response to hepatitis A virus. //Journal of infection diseases. – 1995. – V171. – P.S9-S14

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest HAV-IgM»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tw20* очищеною водою 1:20(тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль, B1, C1,D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при температурі 37°C

Промити лунки 5 разів

Розвести концентрат кон'югату (11×) (*синій*) розчином для розведення кон'югату (*жовтий*) 1:11(тобто, 1+10). Наприклад, 100 мкл кон'югату + 1000 мкл розчину для розведення кон'югату(*розчин забарлюється в зелений колір*)

В лунки стрипів внести по 100 мкл розведеного кон'югату

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при температурі 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest HAV-IgM» за формулою

$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,25$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:

$$ІП = \frac{ОГ_{досліджуваного\ зразка}}{граничне\ значення}$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення ІП	Результат
$ІП_{зразка} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{зразка} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{зразка} < 0,9$	Негативний