

RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG
RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)



Deutsch	3
English.....	17
Español.....	31
Français.....	45
Italiano	59
Portugues	73

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Die RIDASCREEN[®] Parvovirus B19-Tests sind Enzymimmunoassays zum quantitativen Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen Parvovirus B19 in humanem Serum.

Die Tests sollten bei begründetem Verdacht auf eine Infektion mit Parvovirus B19 oder zur Abklärung des Immunstatus durchgeführt werden.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das Parvovirus B19 ist ein kleines, nicht umhülltes Einzelstrang-DNA-Virus und ist der bedeutendste virale Erreger aus der Familie der Parvoviridae. Aufgrund der selektiven Replikation in sich proliferierenden erythroiden Vorläuferzellen wird die Pathogenität neben den Entzündungsreaktionen durch das Blockieren der Erythropoese verursacht.¹⁰ Infektionen mit dem humanen Parvovirus B19 treten weltweit auf, wobei die Übertragung hauptsächlich über den Respirationstrakt (Tröpfcheninfektion) erfolgt. Akute Parvovirus-Infektionen treten in allen Altersstufen auf, am häufigsten in der Altersgruppe zwischen 6 und 15 Jahren. Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Wochen.⁶ Die Durchseuchungsrate im Erwachsenenalter liegt bei schätzungsweise 60 - 70 %⁷.

Eine Parvovirus B19 Infektion verläuft oftmals asymptomatisch oder es treten milde Grippe-ähnliche Symptome auf. Parvovirus B19-Infektionen werden jedoch auch mit unterschiedlichen Krankheitsbildern assoziiert. Das Erythema infectiosum (Ringelröteln), welches hauptsächlich Kinder im Alter zwischen 4-10 Jahren betrifft, weist dabei die höchste Prävalenz auf.⁸ Komplikationen können vor allem bei seronegativen Schwangeren auftreten, da die Übertragungsraten auf den Fötus nach einer Parvovirus B19-Infektion 30 % beträgt.⁵ Fetale Infektion kann zu Spontanaborten oder der Ausbildung schwerer fetaler Missbildungen, wie dem Hydrops fetalis, führen. Ein erhöhtes Risiko für eine Fehlgeburt besteht besonders bei maternalen Infektionen während des ersten und zweiten Trimesters der Schwangerschaft. Insgesamt wird angenommen, dass eine fetale Infektion in 5 – 10 % der Fälle zum Tod des ungeborenen Kindes führt.⁵ Eine weitere Risikogruppe bilden Patienten mit chronisch hämolytischen Anämien. Die Anämien werden durch

die infektionsbedingte Einschränkung der Erythropoese weiter verschärft, sodass die Gefahr einer aplastischen Krise besteht.⁸

Nach einer Infektion mit Parvoviren setzt als Reaktion des Immunsystems die Bildung spezifischer Antikörper gegen den Erreger ein. Diese können im Serum mittels immunologischer Verfahren nachgewiesen werden. Für die Aussagekraft eines Tests ist dabei neben der Auswahl des verwendeten erregerspezifischen Antigens auch die verwendete Testmethode von Bedeutung. Der ELISA ist als Screening-Methode sehr gut geeignet, um Aussagen über den immunologischen Status eines Patienten zu treffen.

Ein positives Ergebnis kann anschließend durch einen Line Blot weiter differenziert und unterschiedlichen Phasen einer Infektion wie z. B. der Viruspersistenz zugeordnet werden (siehe RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, Art. Nr. LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, Art. Nr. LB6033 (LB6023 und LB6033 Distribution weltweit außer USA, Kanada, Australien und Israel).

3. Testprinzip

Die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen ist mit rekombinanten Antigenen, im Falle des IgG-Nachweises mit einem Gemisch aus VP1 und VP2 und im Falle des IgM-Nachweises mit VP2, des Parvovirus B19 beschichtet. In Patientenproben vorhandene Antikörper binden an die Antigene und werden in einem zweiten Schritt mit Enzym-markierten Anti-human-Antikörpern (Konjugat) nachgewiesen. Nicht gebundene Antikörper bzw. nicht gebundenes Konjugat werden nach der Inkubation mittels Waschen entfernt. Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat (H₂O₂/TMB) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm).

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit rekombinantem Parvovirus B19-Antigen; IgG und IgM-Test: eukaryontisch exprimierte Antigene	X	X
SeroPP	110 ml	Probenpuffer, gebrauchsfertig; Phosphat-gepufferte NaCl-Lsg., gelb gefärbt	X	X
SeroWP	100 ml	Waschpuffer, 10fach konzentriert; Tris-gepufferte NaCl-Lsg.	X	X
Control IgG + grüner Deckel	2,5 ml	Standardkontrolle IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum, grün gefärbt	X	
Control IgM + roter Deckel	2,5 ml	Standardkontrolle IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum, rot gefärbt		X
Control IgG - farbloser Deckel	1,2 ml	Negativkontrolle IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum	X	
Control IgM - farbloser Deckel	1,2 ml	Negativkontrolle IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum		X
Control IgG A grüner Deckel	1,2 ml	Qualitätskontrolle A IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum	X	
Control IgG B grüner Deckel	1,2 ml	Qualitätskontrolle B IgG, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum	X	
Control IgM A roter Deckel	1,2 ml	Qualitätskontrolle A IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum		X
Control IgM B roter Deckel	1,2 ml	Qualitätskontrolle B IgM, gebrauchsfertig; verdünntes Humanserum		X
SeroG HD grüner Deckel	12 ml	Anti-human-IgG-Konjugat HD (Ziege), gebrauchsfertig; Peroxidase-konjug. Antikörper in stabil. Proteinlösung	X	
SeroM HD roter Deckel	12 ml	Anti-human-IgM-Konjugat HD (Ziege), gebrauchsfertig; Peroxidase-konjug. Antikörper in stabil. Proteinlösung		X
SeroSC	12 ml	Substrat H ₂ O ₂ /Tetramethylbenzidin; gebrauchsfertig	X	X
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig	X	X

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Das Testkit ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) eine Woche haltbar. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel, in dem sich die Mikrotiterplatte befindet, ist so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind sofort im verschlossenen Alu-Beutel bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine Kontamination der Reagenzien ist ebenso zu vermeiden wie eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Brutschrank bei 37 °C
- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 – 100 µl und 100 – 1000 µl Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Natriumhypochloritlösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details, siehe Safety Data Sheets (SDS) www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standardkontrolle, Negativkontrolle, Qualitätskontrolle A und Qualitätskontrolle B) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HbsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potentiell infektiös behandelt und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Der Test ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Nach der Blutentnahme sollte zur Vermeidung einer Hämolyse das Serum möglichst schnell vom Blutkuchen getrennt werden. Die Proben sind bis zur Testung kühl oder gefroren zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Tab. 2: Probenlagerung

Unverdünntes Serum		Verdünntes Serum
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 Woche	> 1 Woche	7 Stunden

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch ist das Kit sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Es sollte nur so viel Reagenz entnommen werden, wie für die Durchführung des Tests benötigt wird. Überschüssiges Reagenz darf nicht in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

Die Mikrotiterstreifen können nicht mehrfach verwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Einige der im Kit enthaltenen Reagenzien sind nicht testspezifisch. Diese mit Sero gekennzeichneten Reagenzien (z. B. **SeroPP**) können auch bei anderen RIDASCREEN® Sero ELISA mit entsprechenden Reagenzien verwendet werden.

Die Kontrollseren sind chargenspezifisch. Ein Austausch der Kontrollseren zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

Die RIDASCREEN® Sero ELISA Qualitätskontrollen A bzw. B werden als zusätzliche, spezifische Kontrollproben im entsprechenden RIDASCREEN® Sero ELISA Testkit angeboten. Dabei handelt es sich um Kontrollproben zur zusätzlichen Qualitätssicherung, die optional eingesetzt werden können. Sie enthalten humanes Kontrollserum mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen.

9.2 Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **SeroWP** wird mit 9 Teilen destillierten Wassers gemischt. Hierfür werden 100 ml des Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) eine Woche haltbar.

9.3 Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer **SeroPP** 1: 50 verdünnt. z. B. 10 µl Serum + 490 µl **SeroPP**

Für IgM-Bestimmungen wird empfohlen, Seren vor der Testung einer IgG-Absorption (z. B. mit dem RIDA® RF-Absorbens, Art. Nr. Z0202) zu unterziehen.

Hinweis!

Negativkontrolle, Standardkontrolle, Qualitätskontrolle A und Qualitätskontrolle B sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt oder absorbiert werden.

9.4 Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Reagenzienleerwert) bleibt frei. Die Negativkontrolle **Control IgG -** oder **Control IgM -** wird einfach und die Standardkontrolle **Control IgG +** oder **Control IgM +** doppelt mitgeführt. Die Qualitätskontrollen **Control IgG A** und **Control IgG B** bzw. die Qualitätskontrollen **Control IgM A** und **Control IgM B** werden einfach mitgeführt. Die Platte wird 30 Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien haben. Die Mikrotiterplatte ist während der Inkubation abzudecken.

Die der Bestimmung (IgG bzw. IgM) entsprechenden Kontrollen sind zu verwenden.

A1	Reagenzienleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Standardkontrolle
D1	Standardkontrolle

E1	Qualitätskontrolle A
F1	Qualitätskontrolle B
G1,H1	Patientenserum 1,2 usw.

Hinweis:

Die Mikrotiterplatte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muss schon vorab an 37 °C adaptiert sein.

9.5 Waschen

Die Kavitäten sollten in einen Abfallbehälter mit Hypochloritlösung zur Desinfektion entleert werden. Anschließend wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Danach wird 4mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten. Nach dem Waschen sollte die Platte auf saugfähigem, sauberem Papier ausgeklopft werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

9.6 Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Anti-human-IgG-Konjugat HD **SeroG HD** bzw. Anti-human-IgM-Konjugat HD **SeroM HD** in die entsprechenden Vertiefungen (einschließlich A1). Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert (siehe Pkt. 9.4.).

9.7 Waschen

4maliges Waschen gemäß Pkt. 9.5.

9.8 Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Reagenzienleerwert (Position A1).

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Standardkontrolle (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mitzuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bei 450/620 nm in dem Wertebereich liegt, der auf dem beigefügten Datenblatt angegeben ist. Weichen

die beiden Einzelmessungen um mehr als 20 % vom Mittelwert ab, muss der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muss bei 450/620 nm einen Extinktionswert < 0,3 aufweisen.

Die RIDASCREEN® Sero ELISA Qualitätskontrollen A bzw. B sind zusätzliche Kontrollproben zur Qualitätssicherung, die optional eingesetzt werden können. Die Zielbereiche sind dem beigefügten, chargen-spezifischen Qualitätszertifikat zu entnehmen. Die erzielten Werte (U/ml, IU/ml oder mIU/ml) dienen dem Anwender als Richtwerte für die laborinterne Qualitätssicherung.

Eine Abweichung von den geforderten Werten sowie eine Reagenzientrübung oder Blaufärbung des Substrates vor Zugabe in die Kavitäten können ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

11. Auswertung und Interpretation

Durch Anpassung der Standardkurve an den internationalen WHO-Standard (NIBSC 93/724) kann der IgG-Test in internationalen Einheiten (IU/ml) ausgewertet werden. Die Auswertung des Tests kann auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

1. Über die beiliegende Standardkurve
2. Über die Wertetabelle (siehe beiliegendes Datenblatt)
3. Mathematisch nach der 4-Parameter-Methode oder der α -Methode

Von allen Extinktionswerten muss vor der Auswertung der Reagenzienleerwert abgezogen werden.

11.1. Auswertung über die Standardkurve

Um eine Auswertung mittels Standardkurve durchzuführen, muss zunächst über den Mittelwert der Standardkontrolle eine Korrektur der Tagesschwankung vorgenommen werden. Aus dem Sollwert der Standardkontrolle und dem aktuell gemessenen Wert der Kontrolle wird der Korrekturfaktor F berechnet. Der chargenabhängige Sollwert ist auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

$$F = \frac{\text{Sollwert der Standardkontrolle}}{\text{Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle}}$$

Mit dem Faktor F werden alle OD-Werte der Proben multipliziert. Mit diesen korrigierten Werten wird dann der entsprechende IU/ml (IgG)- bzw. U/ml (IgM)-Wert in der Standardkurve abgelesen.

11.2. Auswertung über die Wertetabelle

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bestimmt in der Wertetabelle die Spalte mit dem Wertebereich, der für die aktuelle Messung gültig ist. Innerhalb der Spalte wird der gemessene Extinktionswert der Probe dem passenden Extinktionsbereich zugeordnet und in der zweiten Spalte von links dem entsprechenden Titer in U/ml abgelesen.

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle beträgt beispielsweise bei einer Messung 1,02. In diesem Fall ist für die Ermittlung des Ergebnisses die Spalte mit dem Bereich 1,00 bis 1,05 aus der Tabelle entscheidend. Eine Patientenprobe mit einem Extinktionswert von 1,38 liegt dann einem Titer-Bereich von 50,1 bis 100,0 IU/ml. (Die genannten Werte sind als Beispiel zu sehen und können von den aktuellen Werten des Datenblattes abweichen.)

Die Bewertung des ermittelten Ergebnisses - positiv (+), negativ (-) oder grenzwertig (?) - ist der ersten Spalte der Wertetabelle zu entnehmen.

	IU/ml	Wertebereich der Standardkontrolle	
		1,00 - 1,05	
-	< 3,0	< 0,11	
?	3,0 - 5,0	0,11 - 0,17	
	5,1 - 10,0	0,18 - 0,31	
	10,1 - 30,0	0,32 - 0,68	
+	30,1 - 50,0	0,69 - 0,95	
	50,1 - 100,0	0,96 - 1,42	
	100,1 - 200,0	1,43 - 2,09	
	> 200,0	> 2,09	

Abb. 1: Beispiel für eine IgG-Bestimmung (Auszug aus einem chargenspezifischen Datenblatt)

11.3. Mathematische Auswertung

Die benötigten Werte für eine mathematische Auswertung nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α -Methode sind auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

11.4. Testergebnis

Tab. 3: Bewertung der ermittelten Units

	IgG	IgM
negativ	< 3 IU/ml	< 10 U/ml
grenzwertig	3 - 5 IU/ml	10 - 12 U/ml
positiv	> 5 IU/ml	> 12 U/ml

12. Grenzen der Methode

Die RIDASCREEN® Parvovirus B19 Enzymimmunoassays weisen IgG- bzw. IgM-Antikörper gegen Parvovirus B19 nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein negatives Ergebnis schließt eine bestehende Infektion nicht aus. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion kann die Antikörperbildung noch so gering sein, dass eine Untersuchung hierauf negativ ausfällt. Bei bestehendem klinischen Verdacht sollte deshalb ein Folgeserum untersucht werden.

Bei Schwangeren kann es manchmal durch eine polyklonale Stimulierung des Immunsystems auch ohne Vorliegen einer Infektion zu positiven Ergebnissen im IgM-Test kommen. Deshalb sollten positive Ergebnisse mittels Line Blot (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, Art. Nr. LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, Art. Nr. LB6033 (LB6023 und LB6033 Distribution weltweit außer USA, Kanada, Australien und Israel) bestätigt werden.

Durch die Identifizierung von Antikörpern gegen einzelne Epitope des Virusantigens können bei dieser Methode bessere Aussagen über eine akute oder kurzzeitig zurückliegende Infektion bzw. einen Immunstatus getroffen werden.

Generell sollten bei serologischen Untersuchungen zur Verbesserung der diagnostischen Aussage immer zwei aufeinander folgende Seren eines Patienten untersucht werden. Wichtig für die Interpretation eines Befundes ist der Verlauf des Titers.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger als Ursache für eine Erkrankung nicht aus.

13. Leistungsmerkmale

Tab. 4: Inter-Assay-Varianz (n=30)

Inter-Assay-Varianz	IgG		IgM	
	OD	VK	OD	VK
Serum 1	0,210	9,3%	0,394	5,8%
Serum 2	0,469	8,6%	1,455	4,3%
Serum 3	0,718	7,5%	1,698	3,6%

Tab. 5: Intra-Assay-Varianz (n=24)

Inter-Assay-Varianz	IgG		IgM	
	OD	VK	OD	VK
Serum 1	0,212	9,3%	0,365	2,4%
Serum 2	0,442	8,2%	1,268	2,5%
Serum 3	1,098	8,5%	1,580	4,5%

Tab. 6: Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu zwei anderen, kommerziellen ELISA

	IgG	IgM
Sensitivität	100,0%	100,0%
Spezifität	100,0%	100,0%

Tab.7: Ergebnisse mit 200 untersuchten Blutspendeseren aus einem Blutspendezentrum in Deutschland










200 Blutspendeseren	IgG	IgM
negativ	22,5%	99,5%
grenzwertig	4,5%	0,0%
positiv	73,0%	0,5%

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-02-20	Generelle Überarbeitung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Plate	Mikrotiterplatte
SeroPP	Probenpuffer
SeroWP	Waschpuffer 20x
Control IgG +	Positivkontrolle IgG
Control IgM +	Positivkontrolle IgM
Control IgG -	Negativkontrolle IgG
Control IgM -	Negativkontrolle IgM
Control IgG A	Qualitätskontrolle A IgG
Control IgG B	Qualitätskontrolle B IgG
Control IgM A	Qualitätskontrolle A IgM
Control IgM B	Qualitätskontrolle B IgM
SeroG LD	Konjugat IgG
SeroM LD	Konjugat IgM
SeroSC	Substrat
Stop	Stopp Reagenz

16. Literatur

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvoviru-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484-7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician*. 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 189:456-61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblozki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)

RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN® Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDASCREEN® Parvovirus B19 Tests are enzyme immunoassays for the quantitative determination of IgG or IgM antibodies against Parvovirus B19 in human serum.

The tests should be used for confirmation purposes when there is a suspected case of infection with Parvovirus B19 or for clarifying the immune status.

2. Summary and explanation of the test

Parvovirus B19 is a small single-stranded DNA virus lacking a lipid envelope and representing the most important pathogen within the family of Parvoviridae. Besides the induction of inflammatory processes the pathogenicity is caused by a suppressed erythropoiesis due to a selective replication of the virus in progenitor erythroid cells.¹⁰ Infections with Parvovirus B19 occur worldwide and the transmission occurs predominantly by droplet infection *via* the respiratory tract. Acute parvovirus infections occur in all age groups, however are most often observed in children between the age of 6-15 years. The incubation period is 1-3 weeks.⁶ The percentage of the adult population infected is about 60 - 70 %.⁷

Parvovirus B19 infections are often asymptomatic or show weak flu-like symptoms. However parvovirus infections are also associated with different clinical pictures. Erythema infectiosum, also called fifth disease, shows the highest prevalence generally affecting children between the age of 4-10 years.⁸ Complications can occur in pregnant women being seronegative due to a 30 % chance of foetal transmission.⁵ Foetal infections may lead to spontaneous abortions or severe foetal deformities like Hydrops fetalis. Maternal infection during the first and second trimester of pregnancy can lead to an increased risk of pregnancy loss. Overall, fetal death is estimated to occur in 5-10 % of cases of foetal infection.⁵ Upon infection with parvovirus B19 patients suffering from chronic hemolytic anemia are at high risk of developing aplastic crisis due to a suppressed erythropoiesis.⁸

After infection with parvoviruses, specific antibodies are formed against the pathogen as a result of the response from the immune system. By using immunological methods, it is possible to determine those antibodies in the serum. Both the choice of

the pathogen-specific antigen and the selected test method have a significant influence on the test result. The ELISA is very suitable as a screening method for drawing conclusions about the immunological status of a patient. Subsequently a positive result can be further differentiated by Line Blot and can be assigned to the different phases of an infection such as virus persistence (see RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, Art. No. LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, Art. No. LB6033 (LB6023 and LB6033 world-wide distributed except for USA, Canada, Australia and Israel).

3. Test principle

Recombinant antigens are coated onto the surface of microtiter plates. In case of IgG detection, a mixture of VP1 and VP2 is used as Parvovirus B19 antigen whereas for IgM detection, VP2 is used. Antibodies in the patient samples bind to the antigens and are determined during the second incubation step by using enzyme-labelled anti-human antibodies (the conjugate). The enzyme converts the colourless substrate (H₂O₂/TMB) to a blue end product. The enzyme reaction is stopped by adding sulphuric acid and the colour of the mixture switches from blue to yellow at the same time. The final measurement is carried out at 450 nm on a photometer using a reference wavelength ≥ 620 nm.

4. Reagents provided

Table 1: Pack contents (there are enough reagents in a pack for 96 determinations)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 det.	Microwell plate; 12 microwell strips (can be divided) in the strip holder; coated with recombinant Parvovirus B19 antigen; IgG- and IgM-test: eukaryotic-expressed antigens	X	X
SeroPP	110 ml	Sample buffer, ready for use; phosphate-buffered NaCl solution; coloured yellow;	X	X
SeroWP	100 ml	Wash buffer, 10-fold concentrate; tris-buffered NaCl solution;	X	X
Control IgG + <i>green lid</i>	2.5 ml	Standard control IgG, ready for use; diluted human serum; coloured green;	X	
Control IgM + <i>red lid</i>	2.5 ml	Standard control IgM, ready for use; diluted human serum; coloured red;		X
Control IgG - <i>colourless lid</i>	1.2 ml	Negative control IgG, ready for use; diluted human serum;	X	
Control IgM - <i>colourless lid</i>	1.2 ml	Negative control IgM, ready for use; diluted human serum;		X
Control IgG A <i>green lid</i>	1.2 ml	Quality control A IgG, ready for use; diluted human serum	X	
Control IgG B <i>green lid</i>	1.2 ml	Quality control B IgG, ready for use; diluted human serum	X	
Control IgM A <i>red lid</i>	1.2 ml	Quality control A IgM, ready for use; diluted human serum		X
Control IgM B <i>red lid</i>	1.2 ml	Quality control B IgM, ready for use; diluted human serum		X
SeroG HD <i>green lid</i>	12 ml	Anti-human IgG conjugate HD (goat), ready for use; peroxidase conjugated antibodies in stabilised protein solution;	X	
SeroM HD <i>red lid</i>	12 ml	Anti-human IgM conjugate HD (goat), ready for use; peroxidase conjugated antibodies in stabilised protein solution;		X
SeroSC	12 ml	Substrate; H ₂ O ₂ /tetramethylbenzidine; ready for use	X	X
Stop	12 ml	Stop reagent 0.5 M sulphuric acid; ready for use	X	X

Details of hazardous substances according to labeling obligations. For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com

5. Storage instructions

The test kit must be stored at 2 - 8 °C and can be used until the expiry date printed on the label. The diluted wash buffer can be used for a maximum of 4 weeks when stored at 2 - 8 °C or for one week when stored at room temperature (20 - 25 °C).

After the expiry date, the quality guarantee is no longer valid.

The aluminium bag containing the microwell plate must be opened in such a way that the clip seal is not torn off. Any microwell strips which are not required must be immediately returned to the aluminium bag and stored at 2 - 8 °C.

The reagents also must not be allowed to become contaminated and the colourless substrate must be protected from exposure to direct light.

6. Additional necessary reagents – and necessary equipment

6.1. Reagents

- distilled or deionised water

6.2. Accessories

- Incubator at 37 °C
- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipettes for 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl capacities
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop clock
- Microplate washer or multichannel pipette
- Microplate reader (450 nm, reference wavelength ≥ 620 nm)
- Filter paper (laboratory towels)
- Waste container containing 0.5 % sodium hypochlorite solution

7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use only.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com

The control sera (standard control, negative control, quality control A and quality control B) in the kit have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as HbsAg with negative results. Nevertheless, they must be treated as potentially infectious in the same way as the patient samples and all other materials with which they come into contact and they must be handled in accordance with the relevant national safety regulations.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

8. Specimen collection and storage

The test has been developed for testing human serum samples. After blood collection, the blood should be separated from blood clots as soon as possible in order to prevent haemolysis. The samples must be stored cold or frozen until they are tested. Repeated freezing and thawing of the samples and microbial contamination must be prevented at all costs. Using heat-inactivated, lipaemic, haemolytic, icteric or turbid samples can lead to false results.

Table 2: Sample storage

Undiluted serum		Diluted serum
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 week	>1 week	7 hours

9. Test procedure

9.1. General information

All reagents and the microwell plate must be brought to room temperature (20 - 25 °C) before use. The microwell strips must not be removed from the aluminium bag until they have reached room temperature. The reagents must be thoroughly mixed immediately before use. After use, the kit must be immediately returned to storage at 2 - 8 °C.

Take only the volume of reagents that is needed for test procedure. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Do not pour reagents back into vials as this may lead to reagent contamination.

The microwell strips cannot be used more than once. The reagents and microwell strips must not be used if the packaging is damaged or the vials are leaking.

Some of the reagents in the kit are not test specific. The reagents labelled Sero (such as **SeroPP**) can also be used with other RIDASCREEN® Sero ELISA with the corresponding reagents.

The control sera relate to the lot. Control sera from kits with different lot numbers must not be exchanged.

RIDASCREEN® Sero ELISA controls A and B are provided as additional components to the respective RIDASCREEN® Sero ELISA test kits. These are controls for additional quality control purposes which can be used optional. They contain human control serum with different antibody concentrations.

9.2. Preparing the wash buffer

1 part wash buffer concentrate **SeroWP** is mixed with 9 parts distilled water. In order to do this, place 100 ml of the concentrate in a 1000 ml measuring cylinder and make up the solution to 1000 ml with distilled water. Any crystals present in the concentrate must be dissolved beforehand by warming in a water bath at 37 °C. The diluted wash buffer can be used for a maximum of 4 weeks when stored at 2 - 8 °C or for one week when stored at room temperature (20 - 25 °C).

9.3. Preparing the samples

Dilute the serum samples to be tested with sample buffer **SeroPP** 1:50 before starting the test.

e.g. 10 µl Serum + 490 µl **SeroPP**

For the IgM determinations, it is recommended to subject the sera to IgG absorption (e.g. with RIDA® RF Absorbens, Article no. Z0202) before testing.

Note:

The negative control, standard control, quality control A and quality control B are ready for use and must NOT be diluted or absorbed.

9.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of wells into the frame, pipette 100 µl diluted sera and 100 µl ready-to-use control into each of the corresponding wells leaving Position A1 (reagent blank value) empty. Add the negative control **Control IgG | -** or **Control IgM | -** once and the standard control **Control IgG | +** or **Control IgM | +** in duplicate. Add the quality controls **Control IgG | A** and **Control IgG | B** or the quality controls **Control IgM | A** and **Control IgM | B** once. Cover the plate and incubate at 37 °C for 30 minutes in an incubator. During this process, the bottoms of the wells must not be in contact with heat-conductive materials. The microwell plate must be covered during incubation.

The controls which correspond to the determination (IgG or IgM) must be used.

A1	Reagent blank value
B1	Negative control
C1	Standard control
D1	Standard control
E1	Quality control A
F1	Quality control B
G1, H1	Patient serum 1 and 2 etc.

Note:

The microwell plate must not be placed in a cold incubation container reaching 37 °C during incubation. The temperature of the container must be adjusted to 37 °C beforehand.

9.5. Washing

The wells must be emptied into a waste container containing hypochlorite solution for disinfection. Then knock out the plate onto absorbent paper in order to remove the residual moisture. After this, wash the plate 4 times using 300 µl wash buffer each time. Make sure that the wells are emptied completely by knocking them out on an unused part of the absorbent paper after each wash.

When using a microplate washer, make sure that the machine is correctly adjusted to the type of plate being used. After washing, knock out the plate onto clean absorbent paper in order to remove any residual moisture.

9.6. Second incubation

Add 100 µl Anti-human IgG conjugate HD **SeroG HD** or Anti-human IgM conjugate HD **SeroM HD** to the corresponding wells (including A1). Next, cover the plate and incubate at 37 °C for 30 minutes in an incubator (see Section 9.4).

9.7. Washing

Wash 4 times in accordance with Section 9.5.

9.8. Third incubation

Add 100 µl substrate **SeroSC** to each well. Then, cover the plate and incubate at 37 °C for 30 minutes in an incubator. After this, stop the reaction by adding 100 µl stop reagent **Stop** to each well. After mixing carefully (by lightly tapping the side of the plate), measure the absorbance at 450 nm (reference wavelength \geq 620 nm) in a plate photometer. Calibrate the reagent blank value (Position A1) to zero.

10. Quality control and indications of instability or deterioration

For quality control purposes, the standard control (in duplicate) and the negative control must be used every time the test is carried out. The test has been carried out correctly if the average absorbance for the standard control at 450/620 nm is within the range stated on the enclosed data sheet. If the two individual measurements deviate from the average by more than 20 %, the test must be repeated. The absorbance for the negative control at 450/620 nm must be < 0.3 .

RIDASCREEN® Sero ELISA controls A and B are additional controls for quality control purposes which can be used optional.

The target values are stated on the enclosed, lot-specific quality assurance certificate. The obtained values (U/ml, IU/ml or mIU/ml) are recommended as reference values for the quality assurance in accredited laboratories.

If the values differ from those required, if the reagent is turbid or the substrate has turned blue before adding to the wells, it may indicate that the reagents have expired. If the stipulated values are not met, the following points must be checked before repeating the test:

- Expiry date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used (e.g. calibration)
- Correct test procedure
- Visual inspection of the kit components for contamination or leaks – a substrate solution which has turned blue must not be used.

If the conditions are still not fulfilled after repeating the test, please contact your local R-Biopharm distributor.

11. Evaluation and interpretation

The IgG test can be evaluated in international units (IU/ml) by adjusting the standard curve to the international WHO standard (NIBSC 93/724). The test can be evaluated using three different methods:

4. By using the standard curve provided in the kit
5. By using the table of values (see data sheet provided in the kit)
6. Mathematically using the 4-parameter method or the α method

The reagent blank value must be subtracted from each measured value before the evaluation.

11.1. Evaluation by using the standard curve provided in the kit

In order to carry out the evaluation using the standard curve, a correction must be made to the average value for the standard control first in order to take into account any fluctuations which may occur from one day to the next. The correction factor F is calculated from the current measured average value for the standard control and its target value. The target value, which depends on the lot, is recorded on the enclosed data sheet.

$$F = \frac{\text{standard control target value}}{\text{standard control measured average value}}$$

All OD values for the samples must be multiplied by the factor F. The corresponding IU/ml (IgG) or U/ml (IgM) values are then read off the standard curve using these corrected values.

11.2. Evaluation by using the table of values

The absorbance for the standard control is used to identify the column in the table with the range of values which applies to the current measurement. The measured absorbance for the sample is assigned to the appropriate range of values and then the titer in U/ml is read from the second column to the left in the table.

For example, the absorbance for the standard control for a certain measurement is 1.02. In this case, the column in the table with the range 1.00 - 1.05 is the one to use to determine the results. A patient sample with an absorbance of 1.38 therefore corresponds to the titer range 50.1 - 100.0 IU/ml. (The values cited are merely to be regarded as examples and may differ from the current values on the data sheet.)

The evaluation for the determined results (positive (+), negative (-) or equivocal (?)) must be taken from the first column of the table of values.

	IU/ml	Range of values for the standard control	
			1.00 - 1.05
-	< 3.0		< 0.11
?	3.0 - 5.0		0.11 - 0.17
	5.1 - 10.0		0.18 - 0.31
	10.1 - 30.0		0.32 - 0.68
+	30.1 - 50.0		0.69 - 0.95
	50.1 - 100.0		0.96 - 1.42
	100.1 - 200.0		1.43 - 2.09
	> 200.0		> 2.09

Figure 1: Example of an IgG determination (Extract from a lot-specific data sheet)

11.3. Mathematical evaluation

The required values for mathematical evaluation according to the 4-parameter method or the α method are recorded on the enclosed data sheet.

11.4. Test result

Table 3: Evaluation of the determined units

	IgG	IgM
negative	< 3 IU/ml	< 10 U/ml
equivocal	3 - 5 IU/ml	10 - 12 U/ml
positive	> 5 IU/ml	> 12 U/ml

12. Limitations of the method

RIDASCREEN® Parvovirus B19 EIA detects IgG or IgM antibodies against Parvovirus B19. The test cannot be used to derive a relationship between the extinction determined and occurrence of serious clinical symptoms. The results obtained must always be interpreted in combination with the clinical picture.

A negative result does not necessarily mean that there is no infection. During the early stages of the infection, the number of antibodies may still be so small that looking for them may yield a negative result. If there is a suspected clinical case, therefore, a follow up serum should also be tested.

With pregnant women, the IgM test can also sometimes yield positive results due to polyclonal stimulation of the immune system without there being an infection. For this reason, positive results should be confirmed using Line Blot (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, Art. No. LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, Art. No. LB6033 (LB6023 and LB6033 world-wide distributed except for USA, Canada, Australia and Israel). With this method, more accurate assertions can be made about an acute or short-term past infection or an immune status by identifying antibodies against individual epitopes of the virus antigen.

Two consecutive samples of sera should always be collected from a patient and subjected to serological testing in order to improve the quality of the diagnostics. The progress of the titre is important for interpreting the findings.

A positive result does not rule out the presence of another infectious pathogen as the cause of the disease.

13. Performance characteristics

Table 4: Inter-assay variation (n = 30)

Inter-assay variation	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Serum 1	0.210	9.3 %	0.394	5.8 %
Serum 2	0.469	8.6 %	1.455	4.3 %
Serum 3	0.718	7.5 %	1.698	3.6 %

Table 5: Intra-assay variation (n = 24)

Inter-assay variation	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Serum 1	0.212	9.3 %	0.365	2.4 %
Serum 2	0.442	8.2 %	1.268	2.5 %
Serum 3	1.098	8.5 %	1.580	4.5 %

Table 6: Sensitivity and specificity in comparison with two other commercial ELISAs

	IgG	IgM
Sensitivity	100.0 %	100.0 %
Specificity	100.0 %	100.0 %

Table 7: Results from testing 200 blood-donor sera taken from a blood donor center in Germany










200 blood donor sera	IgG	IgM
negative	22.5 %	99.5 %
equivocal	4.5 %	0 %
positive	73.0 %	0.5 %

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2019-02-20	General revision

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Test-specific symbols

Plate	Microwell plate
SeroPP	Sample dilution buffer
SeroWP	Wash buffer 10x
Control IgG +	Standard control IgG
Control IgM +	Standard control IgM
Control IgG -	Negative control IgG
Control IgM -	Negative control IgM
Control IgG A	Quality control A IgG
Control IgM A	Quality control A IgM
Control IgG B	Quality control B IgG
Control IgM B	Quality control B IgM
SeroG HD	Anti-human IgG conjugate
SeroM HD	Anti-human IgM conjugate
SeroSC	TMB substrate
Stop	Stop solution

16. References

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvoviru-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484–7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician*. 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirolgy* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 189:456–61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblozki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. Las pruebas RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 son inmunoensayos enzimáticos para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG o IgM contra el parvovirus B19 en suero humano.

Las pruebas deben usarse para la confirmación cuando exista sospecha de infección por parvovirus B19 o para aclarar el estado inmunitario.

2. Resumen y descripción del ensayo

El parvovirus B19 es un pequeño virus de ADN monocatenario que carece de envoltura lipídica y constituye el patógeno más importante de la familia *Parvoviridae*. Además de inducir procesos inflamatorios, su patogenia se debe a una supresión de la eritropoyesis por medio de una replicación selectiva del virus en las células eritroides progenitoras.¹⁰ Se registran infecciones por parvovirus B19 en todo el mundo y la transmisión se efectúa principalmente mediante la infección por microgotas a través de las vías respiratorias. Se observan infecciones agudas por parvovirus en todos los grupos de edad, aunque la mayor incidencia es en la población infantil de 6 a 15 años. El periodo de incubación es de una a 1-3 semanas.⁶ El porcentaje de la población adulta infectada está entre el 60 % y el 70 %.⁷ Las infecciones por parvovirus B19 son a menudo asintomáticas o producen síntomas gripales leves. Sin embargo, también están asociadas a diferentes cuadros clínicos. El eritema infeccioso, denominado también quinta enfermedad, tiene la máxima prevalencia y afecta por lo general a la población infantil de 4 a 10 años de edad.⁸ Puede haber complicaciones en mujeres embarazadas seronegativas, debido a una probabilidad del 30 % de transmisión fetal.⁵ Las infecciones fetales pueden causar abortos espontáneos o deformidades fetales graves, como hidropesía fetal. La infección de la madre durante el primer y segundo trimestres de embarazo puede aumentar el riesgo de pérdida del feto. En total, la tasa de muerte fetal estimada oscila entre el 5 % y el 10 % de los casos de infección fetal.⁵ Los pacientes con anemia hemolítica crónica, en caso de ser infectados por el parvovirus B19, tienen más riesgo de desarrollar crisis aplásica como consecuencia de la supresión eritropoyética.⁸

Tras la infección por parvovirus, se forman anticuerpos específicos contra el patógeno a través de la respuesta del sistema inmunitario. El uso de métodos inmunitarios permite determinar estos anticuerpos en el suero. Tanto la elección del antígeno específico del patógeno como el método de prueba seleccionado influyen notablemente en el resultado de la prueba. El ELISA es un método de detección muy adecuado para extraer conclusiones sobre el estado inmunitario de un paciente. Después, se puede diferenciar mejor un resultado positivo por Line Blot y asignarse a las diferentes fases de una infección, como la persistencia del virus (consultar RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, ref. LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, ref. LB6033 [LB6023 y LB6033 se distribuyen en todo el mundo, con excepción de EE. UU., Canadá, Australia e Israel]).

3. Principio del ensayo

Se recubre la superficie de placas de microtitulación con antígenos recombinantes. Para la detección de IgG se utiliza una mezcla de VP1 y VP2 como antígeno del parvovirus B19, mientras que para detectar IgM se emplea VP2. Los anticuerpos en las muestras del paciente se unen a los antígenos y se detectan durante la segunda fase de incubación mediante anticuerpos anti-humanos marcados con enzimas (el conjugado). La enzima convierte el substrato incoloro (H_2O_2/TMB) en un producto final de color azul. La reacción enzimática se detiene añadiendo ácido sulfúrico y el color de la mezcla cambia de azul a amarillo al mismo tiempo. La medición final se realiza a 450 nm en un fotómetro, con una longitud de onda de referencia ≥ 620 nm.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Contenido del envase (incluye reactivos suficientes para 96 ensayos)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 determinaciones	Placa de micropocillos; 12 tiras de micropocillos (se pueden dividir) en el portatiras; recubiertas con antígeno recombinante de parvovirus B19; prueba de IgG e IgM: antígenos de expresión eucariótica	X	X
SeroPP	110 ml	Búfer de muestras, listo para usar; solución salina amortiguada con fosfato; color amarillo;	X	X
SeroWP	100 ml	Búfer de lavado, concentrado 10x, solución salina tamponada con Tris;	X	X
Control IgG + tapa verde	2,5 ml	Control estándar de IgG, listo para usar; suero humano diluido; color verde;	X	
Control IgM + tapa roja	2,5 ml	Control estándar de IgM, listo para usar; suero humano diluido; color rojo;		X
Control IgG - tapa incolora	1,2 ml	Control negativo de IgG, listo para usar; suero humano diluido;	X	
Control IgM - tapa incolora	1,2 ml	Control negativo de IgM, listo para usar; suero humano diluido;		X
Control IgG A tapa verde	1,2 ml	Control de calidad A de IgG, listo para usar; suero humano diluido	X	
Control IgG B tapa verde	1,2 ml	Control de calidad B de IgG, listo para usar; suero humano diluido;	X	
Control IgM A tapa roja	1,2 ml	Control de calidad A de IgM, listo para usar; suero humano diluido;		X
Control IgM B tapa roja	1,2 ml	Control de calidad B de IgM, listo para usar; suero humano diluido		X
SeroG HD tapa verde	12 ml	Conjugado anti-IgG humana HD (cabra), listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en solución de proteínas estabilizada;	X	
SeroM HD tapa roja	12 ml	Conjugado anti-IgM humana HD (cabra), listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en solución de proteínas estabilizada;		X
SeroSC	12 ml	Substrato; H ₂ O ₂ /tetrametilbencidina; listo para usar	X	X
Stop	12 ml	Reactivo de parada ácido sulfúrico 0,5 M; listo para usar	X	X

Detalles sobre las sustancias peligrosas conforme a las obligaciones de etiquetado. Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com

5. Instrucciones de almacenamiento

El kit de prueba debe almacenarse a 2 - 8 °C y puede usarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. El búfer de lavado diluido puede utilizarse hasta 4 semanas como máximo si se conserva a 2 - 8 °C, o durante una semana cuando se conserva a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.

La bolsa de aluminio que contiene la placa de micropocillos debe abrirse sin que se rompa el precinto de seguridad. Devolver inmediatamente las tiras de micropocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas a 2 - 8 °C.

Debe evitarse la contaminación de los reactivos y el sustrato incoloro debe protegerse de la exposición a la luz directa.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Incubadora a 37 °C
- Tubos de ensayo
- Mezclador vórtex
- Micropipetas para volúmenes de 10 - 100 µl y 100 - 1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Equipo de limpieza de microplacas o pipeta multicanal
- Lector de microplacas (450 nm, longitud de onda de referencia ≥620 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %

7. Precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com

Los sueros de control del kit (control estándar, control negativo, control de calidad A y control de calidad B) se han probado para detectar anticuerpos anti-VIH y anti-VHC, así como el antígeno de superficie de la hepatitis B, con resultados negativos. No obstante, deben tratarse como potencialmente infecciosos, igual que las muestras de pacientes y todos los demás materiales con los que entren en contacto, y deben manipularse de acuerdo con las reglas de seguridad nacionales pertinentes. Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

El ensayo se desarrolló para evaluar muestras de suero humanas. Tras la recogida de la sangre, se debe separar la sangre de los coágulos sanguíneos lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras deben conservarse en frío o congeladas hasta el momento de realizar el ensayo. Deberán evitarse a toda costa los ciclos repetidos de congelación y descongelación de las muestras, así como la contaminación microbiana. El uso de muestras turbias, ictéricas, hemolíticas, lipémicas o termoinactivadas puede dar lugar a resultados falsos.

Tabla 2: Almacenamiento de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 semana	>1 semana	7 horas

9. Ejecución de la prueba

9.1. Información general

Los reactivos y la placa de micropocillos deben adquirir la temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de la utilización. Las tiras de micropocillos no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no estén a temperatura ambiente. Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de su uso. Tras el uso, el kit debe volver a almacenarse inmediatamente a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Tomar únicamente el volumen de reactivos que sea necesario para la ejecución de la prueba. No volver a verter los reactivos en los viales, pues puede producirse contaminación de los reactivos. No volver a verter los reactivos en los viales, pues esto puede dar lugar a la contaminación de los reactivos.

Las placas de micropocillos no pueden utilizarse más de una vez. No utilice los reactivos ni las tiras de micropocillos si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Algunos reactivos del kit no son específicos del ensayo. Los reactivos marcados como Sero (como el **SeroPP**) se pueden usar también en otros ensayos RIDASCREEN® Sero ELISA con los reactivos correspondientes.

Los sueros de control se relacionan con el lote. No se deben intercambiar sueros de control de kits que tengan diferente número de lote.

Los controles de calidad A y B RIDASCREEN® Sero ELISA se ofrecen como componentes adicionales para los kits de ensayo RIDASCREEN® Sero ELISA correspondientes. Estos controles son de uso optativo con fines de control de calidad adicional. Contienen suero humano de control con diferentes concentraciones de anticuerpos.

9.2. Preparación del búfer de lavado

Mezclar 1 parte de búfer de lavado concentrado [SeroWP] con 9 partes de agua destilada. Para esto, añadir 100 ml de concentrado a una probeta de 1000 ml y aforar la solución a 1000 ml con agua destilada. Todos los cristales presentes en el concentrado deben disolverse previamente, calentando en baño maría a 37 °C. El búfer de lavado diluido se puede utilizar durante un máximo de 4 semanas (siempre que se haya almacenado a 2 - 8 °C) o durante una semana si se conserva a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparación de las muestras

Diluir las muestras de suero para el ensayo con el búfer de muestra [SeroPP] en proporción 1:50 antes de iniciar el ensayo.

Por ejemplo, 10 µl de suero + 490 µl de [SeroPP]

Para las determinaciones de IgM, se recomienda realizar una absorción de IgG en el suero (por ejemplo, con RIDA® RF Absorbens, ref. Z0202) antes del ensayo.

Nota:

El control negativo, el control estándar, el control de calidad A y el control de calidad B están listos para usarse y NO se deben diluir ni absorber.

9.4. Primera incubación

Tras la inserción de un número suficiente de pocillos en el soporte, pipetear 100 µl de suero diluido y 100 µl de control listo para usar en cada pocillo correspondiente, dejando vacía la posición A1 (valor del blanco del reactivo). Agregar el control negativo [Control IgG -] o [Control IgM -] una vez, y el control estándar [Control IgG +] o [Control IgM +] por duplicado. Agregar los controles de calidad [Control IgG A] y [Control IgG B], o los controles de calidad [Control IgM A] y [Control IgM B] una vez. Cubrir la placa e incubarla a 37 °C durante 30 minutos en una incubadora. Durante este proceso, el fondo de los pocillos no debe entrar en contacto con materiales termoconductores. La placa de micropocillos debe cubrirse durante la incubación.

Se deben usar los controles que correspondan a la determinación (IgG o IgM).

A1	Valor del blanco del reactivo
B1	Control negativo
C1	Control estándar
D1	Control estándar
E1	Control de calidad A
F1	Control de calidad B
G1, H1	Suero del paciente 1, 2, etc.

Nota:

La placa de micropocillos no debe colocarse en un recipiente de incubación frío que alcance los 37 °C durante la incubación. La temperatura del recipiente debe ajustarse previamente a 37 °C.

9.5. Lavado

Los pocillos se deben vaciar en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. A continuación, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa 4 veces con 300 µl de búfer de lavado cada vez. Después de cada lavado, golpear los pocillos sobre una parte no utilizada del papel absorbente para verificar que estén completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas, asegurarse de que la máquina esté ajustada correctamente al tipo de placa utilizado. Después del lavado, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar cualquier resto de humedad.

9.6. Segunda incubación

Agregar 100 µl de conjugado anti-IgG humana HD SeroG HD o conjugado anti-IgM humana HD SeroM HD a los pocillos correspondientes (incluido A1). A continuación, cubrir la placa e incubarla a 37 °C durante 30 minutos en una incubadora (ver la sección 9.4).

9.7. Lavado

Lavar 4 veces conforme a la sección 9.5.

9.8. Tercera incubación

Agregar 100 µl de sustrato SeroSC a cada pocillo. Después, cubrir la placa e incubarla a 37 °C durante 30 minutos en una incubadora. Luego, parar la reacción agregando 100 µl de reactivo de parada Stop a cada pocillo. Después de mezclar con cuidado (golpeando ligeramente en el lateral de la placa), medir la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm) en un fotómetro de placas. Calibrar el valor del blanco de reactivo (posición A1) en cero.

10. Control de calidad, e indicaciones de inestabilidad o deterioro

Para fines de control de calidad, se debe analizar el control estándar (por duplicado) y el control negativo cada vez que se lleve a cabo el ensayo. El ensayo se realizó correctamente si la absorbancia promedio para el control estándar a 450/620 nm está dentro del intervalo indicado en la hoja de datos adjunta. Si las dos mediciones individuales se desvían del promedio más de un 20 %, se debe repetir el ensayo. La absorbancia del control negativo a 450/620 nm debe ser $<0,3$.

Los controles A y B RIDASCREEN® Sero ELISA son controles adicionales que pueden utilizarse de manera opcional con fines de control de calidad.

Los valores objetivo se indican en el certificado de garantía de calidad específico del lote adjunto. Los valores obtenidos (U/ml, UI/ml o mUI/ml) se recomiendan como valores de referencia para el aseguramiento de la calidad en laboratorios acreditados. Si los valores difieren de los requeridos, si el reactivo está turbio o el sustrato se pone azul antes de agregarlo a los pocillos, es posible que los reactivos estén caducados. Si no se alcanzan los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos usados (p. ej., calibración)
- Ejecución correcta de la prueba
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas.
No utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si tampoco se alcanzan las condiciones después de repetir la prueba, ponerse en contacto con el distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

El ensayo de IgG puede evaluarse en unidades internacionales (UI/ml) ajustando la curva estándar con el estándar internacional de la OMS (NIBSC 93/724). El ensayo puede evaluarse por tres métodos distintos:

7. Utilizando la curva estándar incluida en el kit
8. Utilizando la tabla de valores (consultar la hoja de datos incluida en el kit)
9. Matemáticamente, utilizando el método de 4 parámetros o el método α

El valor del blanco de reactivo debe restarse de cada valor medido antes de la evaluación.

11.1. Evaluación utilizando la curva estándar incluida en el kit

Para llevar a cabo la evaluación utilizando la curva estándar, es necesario corregir primero el valor promedio del control estándar para tomar en cuenta cualquier fluctuación que pueda haberse producido de un día para otro. El factor de corrección F se calcula a partir del valor promedio actual medido para el control estándar y su valor objetivo. El valor objetivo, que depende del lote, se registra en la hoja de datos adjunta.

$$F = \frac{\text{valor objetivo del control estándar}}{\text{valor promedio medido del control estándar}}$$

Todos los valores de DO de las muestras deben multiplicarse por el factor F. Los valores correspondientes en UI/ml (IgG) o U/ml (IgM) se leen en la curva estándar utilizando estos valores corregidos.

11.2. Evaluación utilizando la tabla de valores

La absorbancia del control estándar se utiliza para identificar la columna de la tabla que tiene el intervalo de valores aplicable a la medición actual. La absorbancia medida para la muestra se asigna al intervalo de valores adecuado y, a continuación, se lee el título en U/ml de la segunda columna a la izquierda en la tabla.

Por ejemplo, la absorbancia del control estándar para una medición determinada es 1,02. En este caso, se utiliza la columna de la tabla que tiene el intervalo 1,00 - 1,05 para determinar el resultado. Por lo tanto, una muestra de paciente que tenga una absorbancia de 1,38 tendrá un título dentro del intervalo de 50,1 - 100,0 UI/ml. (Los valores anteriores deben considerarse únicamente ejemplos y pueden diferir de los valores existentes en la hoja de datos).

La evaluación de los resultados determinados (positivo [+], negativo [-] o ambiguo [?]) debe obtenerse de la primera columna de la tabla de valores.

	UI/ml	Intervalo de valores para el control estándar	
			1,00 - 1,05
-	< 3,0		< 0,11
?	3,0 - 5,0		0,11 - 0,17
	5,1 - 10,0		0,18 - 0,31
	10,1 - 30,0		0,32 - 0,68
+	30,1 - 50,0		0,69 - 0,95
	50,1 - 100,0		0,96 - 1,42
	100,1 - 200,0		1,43 - 2,09
	> 200,0		> 2,09

Figura 1: Ejemplo de una determinación de IgG (extraído de una hoja de datos específica del lote)

11.3. Evaluación matemática

Los valores necesarios para la evaluación matemática según el método de 4 parámetros o el método α se registran en la hoja de datos adjunta.

11.4. Resultados del ensayo

Tabla 3: Evaluación de las unidades determinadas

	IgG	IgM
negativo	< 3 UI/ml	< 10 U/ml
ambiguo	3 - 5 UI/ml	10 - 12 U/ml
positivo	> 5 UI/ml	> 12 U/ml

12. Limitaciones del método

RIDASCREEN® Parvovirus B19 EIA detecta anticuerpos IgG o IgM contra parvovirus B19. El ensayo no se puede usar para derivar una relación entre la extinción determinada y la aparición de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico.

Un resultado negativo no significa necesariamente que no haya infección. Durante las primeras etapas de la infección, el número de anticuerpos puede ser todavía tan reducido que no se detecten. Por lo tanto, si se sospecha que existe un caso clínico, debería realizarse un ensayo en suero de seguimiento.

En mujeres embarazadas, la prueba de IgM también puede dar en ocasiones resultados positivos debido a la estimulación policlonal del sistema inmunitario, sin que haya una infección. Por este motivo, los resultados positivos deben confirmarse por Line Blot (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, ref. LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, ref. LB6033 (LB6023 y LB6033 se distribuyen en todo el mundo, con excepción de EE. UU., Canadá, Australia e Israel).

Este método permite realizar afirmaciones más exactas sobre una infección pasada (aguda o de corto plazo) o de un estado inmunitario, identificando anticuerpos contra epítomos individuales del antígeno viral.

Siempre deben obtenerse dos muestras de suero consecutivas de un paciente y someterse a las pruebas serológicas para mejorar la calidad del diagnóstico. El progreso del título es importante para interpretar los hallazgos.

Un resultado positivo no descarta la presencia de otro patógeno infeccioso como causa de la enfermedad.

13. Características de rendimiento

Tabla 4: Variación interensayo (n = 30)

Variación interensayo	IgG		IgM	
	DO	CV	DO	CV
Suero 1	0,210	9,3 %	0,394	5,8 %
Suero 2	0,469	8,6 %	1,455	4,3 %
Suero 3	0,718	7,5 %	1,698	3,6 %

Tabla 5: Variación intraensayo (n = 24)

Variación interensayo	IgG		IgM	
	DO	CV	DO	CV
Suero 1	0,212	9,3 %	0,365	2,4 %
Suero 2	0,442	8,2 %	1,268	2,5 %
Suero 3	1,098	8,5 %	1,580	4,5 %

Tabla 6: Sensibilidad y especificidad en comparación con otros dos ELISA comerciales

	IgG	IgM
Sensibilidad	100,0 %	100,0 %
Especificidad	100,0 %	100,0 %

Tabla 7: Resultados del ensayo de 200 sueros de donantes de sangre obtenidos de un centro de donación de sangre en Alemania










Sueros de 200 donantes de sangre	IgG	IgM
negativo	22,5 %	99,5 %
ambiguo	4,5 %	0 %
positivo	73,0 %	0,5 %

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-02-20	Revisión general

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos de prueba

Plate	Placa de micropocillos
SeroPP	Búfer de dilución de muestras
SeroWP	Búfer de lavado 10x
Control IgG +	Control estándar de IgG
Control IgM +	Control estándar de IgM
Control IgG -	Control negativo de IgG
Control IgM -	Control negativo de IgM
Control IgG A	Control de calidad A de IgG
Control IgM A	Control de calidad A de IgM
Control IgG B	Control de calidad B de IgG
Control IgM B	Control de calidad B de IgM
SeroG HD	Conjugado de anti-IgG humana
SeroM HD	Conjugado de anti-IgM humana
SeroSC	Substrato TMB
Stop	Reactivo de parada

16. Bibliografía

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484–7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician.* 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology.* 189:456–61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblozki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Les tests RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 sont des tests immunoenzymatiques destinés à la détection quantitative des anticorps IgG ou IgM dirigés contre Parvovirus B19 dans le sérum humain.

Les tests doivent être utilisés à des fins de confirmation en cas de suspicion d'infection par Parvovirus B19 ou pour clarifier l'état immunitaire.

2. Résumé et explication du test

Le Parvovirus B19 est un virus à simple brin d'ADN de petite taille, sans enveloppe lipidique. Il constitue l'agent pathogène le plus important de la famille des Parvoviridae. En plus de l'induction de processus inflammatoires, sa pathogénicité est due à une inhibition de l'érythropoïèse par répllication sélective du virus dans les cellules progénitrices érythroïdes¹⁰. Les infections par le Parvovirus B19 se rencontrent dans le monde entier. La transmission s'effectue de façon prédominante par les voies respiratoires, par l'intermédiaire de particules liquides en suspension dans l'air. Les infections aiguës à parvovirus se retrouvent dans toutes les tranches d'âge mais sont le plus couramment observées chez les enfants âgés de 6 à 15 ans. La durée d'incubation est de 1 à 3 semaines⁶. Le pourcentage de la population adulte infectée est d'environ 60 à 70 %⁷. Dans un grand nombre de cas, les infections à Parvovirus B19 sont asymptomatiques ou présentent de faibles symptômes de type grippal. Cependant, les infections à parvovirus sont également associées à des tableaux cliniques différents. Le mégalérythème épidémique, également appelé cinquième maladie, présente la prévalence la plus importante et affecte généralement l'enfant âgé de 4 à 10 ans⁸. Des complications peuvent se produire chez la femme enceinte séronégative du fait d'un risque de transmission au fœtus de 30 %⁵. Les infections fœtales peuvent entraîner des fausses couches spontanées ou des malformations fœtales sévères comme l'anasarque fœtoplacentaire. L'infection de la mère pendant le premier ou le deuxième trimestre de grossesse peut entraîner une augmentation du risque de fausse couche. Dans l'ensemble, il est estimé que 5 à 10 % des cas d'infection fœtale aboutissent à une mort fœtale⁵. Lors d'une infection par le Parvovirus B19, les patients souffrant d'une anémie hémolytique chronique présentent un risque important de crise aplasique du fait de l'inhibition de l'érythropoïèse⁸.

Après une infection par des parvovirus, des anticorps spécifiques de l'agent pathogène sont produits par réponse du système immunitaire. Grâce aux tests immunologiques, il est possible de déterminer les anticorps dans le sérum. Tant le choix de l'antigène spécifique adapté à l'agent pathogène et de la méthode de test sélectionné ont une incidence importante sur la pertinence du test. Le test ELISA est particulièrement adapté comme méthode de dépistage pour tirer des conclusions quant à l'état immunologique d'un patient. Un résultat positif peut ensuite être mieux différencié par buvardage et attribué aux différentes phases d'une infection telles que la persistance du virus (voir RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, réf. LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, réf. LB6033 [LB6023 et LB6033 sont distribués dans le monde entier sauf aux États-Unis, au Canada, en Australie et en Israël]).

3. Principe du test

Des antigènes recombinants sont revêtus sur la surface de plaques de microtitrage. En cas de détection par IgG, il est utilisé, au titre d'antigène de Parvovirus B19, un mélange de VP1 et de VP2, tandis que pour la détection IgM, c'est VP2 seul qui est employé. Les anticorps présents dans les échantillons du patient se lient aux antigènes et sont détectés pendant la deuxième phase d'incubation à l'aide d'anti-anticorps humains marqués par une enzyme (le conjugué). Le substrat incolore (H₂O₂/TMB) est transformé par l'enzyme en un produit final de couleur bleue. La réaction de l'enzyme est arrêtée en ajoutant de l'acide sulfurique et la couleur du mélange passe simultanément du bleu au jaune. La mesure finale est relevée sur un photomètre à 450 nm avec une longueur d'onde de référence de ≥ 620 nm.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis permettent de réaliser 96 tests)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 dét.	Microplaque ; 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support ; revêtue d'antigènes recombinants de Parvovirus B19 ; test IgG et IgM : antigènes exprimés par des eucaryotes	X	X
SeroPP	110 ml	Tampon de dilution d'échantillon, prêt à l'emploi ; solution de NaCl tamponnée au phosphate ; jaune ;	X	X
SeroWP	100 ml	Tampon de lavage, concentré 10 fois ; solution de NaCl tamponnée au Tris ;	X	X
Control IgG + bouchon vert	2,5 ml	Contrôle standard IgG, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué ; vert ;	X	
Control IgM + bouchon rouge	2,5 ml	Contrôle standard IgM, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué ; rouge ;		X
Control IgG - bouchon incolore	1,2 ml	Contrôle négatif IgG, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué ;	X	
Control IgM - bouchon incolore	1,2 ml	Contrôle négatif IgM, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué ;		X
Control IgG A bouchon vert	1,2 ml	Contrôle qualité IgG A, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué	X	
Control IgG B bouchon vert	1,2 ml	Contrôle qualité IgG B, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué	X	
Control IgM A bouchon rouge	1,2 ml	Contrôle qualité IgM A, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué		X
Control IgM B bouchon rouge	1,2 ml	Contrôle qualité IgM B, prêt à l'emploi ; sérum humain dilué		X
SeroG HD bouchon vert	12 ml	Conjugué anti-IgG humaine HD (chèvre), prêt à l'emploi ; anticorps conjugués à de la peroxydase dans une solution protéique stabilisée ;	X	
SeroM HD bouchon rouge	12 ml	Conjugué anti-IgM humaine HD (chèvre), prêt à l'emploi ; anticorps conjugués à de la peroxydase dans une solution protéique stabilisée ;		X
SeroSC	12 ml	Substrat ; H ₂ O ₂ /tétraméthylbenzidine ; prêt à l'emploi	X	X
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt Acide sulfurique 0,5 M ; prêt à l'emploi	X	X

Informations sur les substances dangereuses selon les exigences d'étiquetage. Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com

5. Instructions de conservation des réactifs

La trousse de test doit être conservée entre 2 et 8 °C et peut être utilisée jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. La durée de conservation du tampon de lavage dilué est de 4 semaines maximum à une température comprise entre 2 et 8 °C ou d'une semaine lorsqu'il est conservé à température ambiante (20 à 25 °C). Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.

Le sachet en aluminium contenant la microplaque doit être ouvert sans arracher le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C. Les réactifs ne doivent pas être contaminés et le substrat incolore doit être protégé de toute exposition directe à la lumière.

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

6.1. Réactifs

- eau distillée ou désionisée

6.2. Accessoires

- Incubateur à 37 °C
- Tubes à essai
- Agitateur-mélangeur vortex
- Micropipettes d'une capacité de 10 à 100 µl et 100 à 1 000 µl
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Laveur de microplaque ou pipette multicanaux
- Lecteur de microplaque (450 nm, longueur d'onde de référence \geq 620 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com

Les sérums de contrôle de la trousse (contrôle standard, contrôle négatif, contrôle de qualité A et contrôle de qualité B) ont été testés négatifs pour les anticorps du VIH et du VHC, ainsi que pour l'antigène HBs. Cependant, ils doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux et manipulés conformément aux règlements nationaux applicables en matière de sécurité, tout comme les échantillons de patients et tous les matériaux avec lesquels ils sont entrés en contact. Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Le test a été développé dans le but de tester des échantillons de sérum humain. Après prélèvement, le sang doit être séparé des caillots dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les échantillons doivent être conservés dans un endroit frais ou congelés jusqu'à ce qu'ils soient soumis à un test. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois et éviter absolument toute contamination microbienne. L'utilisation d'échantillons inactivés par la chaleur, lipémiques, hémolytiques, ictériques ou troubles risque de donner lieu à des résultats erronés.

Tableau 2 : Conservation des échantillons

Sérum non dilué		Sérum dilué
2 à 8 °C	-20 °C	2 à 8 °C
1 semaine	> 1 semaine	7 heures

9. Réalisation du test

9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, la trousse doit immédiatement être conservée entre 2 et 8 °C.

Prélever uniquement le volume de réactifs nécessaire à la procédure de test. Ne pas remettre les réactifs dans les flacons pour éviter tout risque de contamination. Ne pas remettre les réactifs dans les flacons au risque d'entraîner une contamination. Les barrettes à micropuits ne doivent être utilisées qu'une seule fois. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Certains des réactifs du kit ne sont pas spécifiques au test. Les réactifs portant la mention Sero (par ex., **SeroPP**) peuvent aussi être utilisés pour d'autres tests RIDASCREEN® Sero ELISA avec les réactifs correspondants.

Les sérums de contrôle sont liés au lot. Les sérums de contrôle provenant de trousse portant des numéros de lot différents ne doivent pas être échangés.

Les contrôles RIDASCREEN® Sero ELISA A et B sont fournis en tant que composants supplémentaires aux trousse de test RIDASCREEN® Sero ELISA correspondantes. Il s'agit de contrôles à des fins de contrôles qualité supplémentaires pouvant être utilisés en option. Ils contiennent du sérum de contrôle humain ayant diverses concentrations en anticorps.

9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **SeroWP** avec 9 volumes d'eau distillée. Pour ce faire, mettre 100 ml de concentré dans une éprouvette graduée de 1 000 ml et compléter la solution jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Les cristaux présents dans le concentré doivent être préalablement dissous à chaud dans un bain-marie à 37 °C. Le tampon de lavage dilué peut être utilisé pendant 4 semaines maximum s'il est conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C ou pendant une semaine s'il est conservé à température ambiante (20 à 25 °C).

9.3. Préparation des échantillons

Avant de commencer le test, diluer les échantillons de sérum avec le tampon de dilution d'échantillon **SeroPP** à 1:50.

Par ex. 10 µl de sérum + 490 µl de **SeroPP**.

Pour les déterminations d'IgM, il est recommandé de réaliser avant le test une absorption IgG sérique (par ex., avec RIDA® RF Absorbens, réf. Z0202).

Remarque :

Le contrôle négatif, le contrôle standard et les contrôles qualités A et B sont prêts à l'emploi et ne doivent PAS être dilués ni absorbés.

9.4. Première incubation

Après insertion d'un nombre suffisant de puits sur le support, pipeter 100 µl des sérums dilués et 100 µl du contrôle prêt à l'emploi dans chacun des puits correspondants en laissant vide la Position A1 (valeur du blanc réactif). Ajouter le contrôle négatif **Control IgG -** ou **Control IgM -** une fois, et le contrôle standard **Control IgG +** ou **Control IgM +** en double. Ajouter les contrôles qualité **Control IgG A** et **Control IgG B** ou les contrôles qualité **Control IgM A** et **Control IgM B** une fois. Recouvrir la plaque et l'incuber à 37 °C pendant 30 minutes dans un incubateur. Pendant ce processus, le fond des puits ne doit pas entrer en contact avec des matériaux thermoconducteurs. La microplaque doit être recouverte pendant l'incubation.

Il est nécessaire d'utiliser les contrôles qui correspondent à la détermination (IgG ou IgM).

A1	Valeur du blanc réactif
B1	Contrôle négatif
C1	Contrôle standard
D1	Contrôle standard
E1	Contrôle qualité A
F1	Contrôle qualité B
G1, H1	Sérum du patient 1, 2, etc.

Remarque :

la microplaque ne doit pas être placée dans un récipient d'incubation froid amené à 37 °C pendant l'incubation. La température du récipient doit être préalablement amenée à 37 °C.

9.5. Lavage

Les puits doivent être vidés dans un conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Puis laver la plaque 4 fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant inutilisé.

Lorsqu'un laveur de microplaques est utilisé, s'assurer qu'il est correctement réglé par rapport au type de plaque utilisé. Après le lavage, retourner la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle.

9.6. Seconde incubation

Ajouter 100 µl du conjugué anti-IgG humaine HD ou du conjugué anti-IgM humaine HD dans les puits correspondants (y compris A1). Ensuite, recouvrir la plaque et l'incuber à 37 °C pendant 30 minutes dans un incubateur (voir section 9.4).

9.7. Lavage

Laver 4 fois conformément à la section 9.5.

9.8. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat dans chaque puits. Puis, recouvrir la plaque et l'incuber à 37 °C pendant 30 minutes dans un incubateur. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de réactif d'arrêt dans chaque puits. Après un mélange soigneux (en tapotant légèrement le côté de la plaque), mesurer l'absorbance à 450 nm (longueur d'onde de référence ≥ 620 nm) avec un photomètre pour plaques. Étalonner la valeur du blanc réactif (position A1) sur zéro.

10. Contrôle qualité et signes d'instabilité ou de détérioration

À des fins de contrôle qualité, il est nécessaire d'utiliser le contrôle standard (en double) et le contrôle négatif chaque fois que le test est réalisé. Le test s'est bien déroulé si l'absorbance moyenne du contrôle standard à 450/620 nm se situe dans la plage indiquée sur la fiche technique jointe. Si deux mesures s'écartent de plus de 20 % de la moyenne, il est nécessaire de recommencer le test. L'absorbance du contrôle négatif à 450/620 nm doit être $< 0,3$.

Les contrôles qualité RIDASCREEN® Sero ELISA A et B sont des contrôles supplémentaires à des fins d'assurance qualité ; ils sont facultatifs.

Les valeurs cibles sont indiquées dans le certificat d'assurance qualité spécifique au lot joint. Les valeurs obtenues (U/ml, UI/ml ou mUI/ml) sont recommandées comme valeurs de référence pour l'assurance qualité des laboratoires agréés.

Si les valeurs diffèrent des valeurs requises, si le réactif est trouble ou le substrat a viré au bleu avant d'être ajouté dans les puits, cela peut indiquer que les réactifs sont périmés.

En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (p. ex. étalonnage)
- Réalisation correcte du test
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; toute solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après le renouvellement du test, contacter un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

Le test IgG peut être évalué en unités internationales (UI/ml) en ajustant la courbe standard à celle de la norme internationale de l'OMS (NIBSC 93/724). Le test peut être interprété selon trois méthodes différentes :

10. En utilisant la courbe standard fournie dans la trousse
11. En utilisant le tableau de valeurs (voir la fiche de données fournie dans la trousse)
12. Mathématiquement, avec la méthode des 4 paramètres ou la méthode α .

La valeur du blanc réactif doit être soustraite de chaque valeur mesurée avant l'évaluation.

11.1. Évaluation à l'aide de la courbe standard fournie dans la trousse

Pour réaliser l'évaluation à l'aide de la courbe standard, commencer par corriger la valeur moyenne du contrôle standard afin de prendre en compte les éventuelles fluctuations susceptibles de se produire d'un jour à l'autre. Le facteur de correction F est calculé à partir de la valeur moyenne actuelle mesurée pour le contrôle standard

et sa valeur cible La valeur cible, qui dépend du lot, est indiquée sur la fiche technique jointe.

$$F = \frac{\text{valeur cible du contrôle standard}}{\text{valeur moyenne mesurée du contrôle standard}}$$

Toutes les valeurs de DO des échantillons doivent être multipliées par le facteur F. Les valeurs UI/ml (IgG) ou U/ml (IgM) correspondantes sont ensuite lues sur la courbe standard à l'aide de ces valeurs corrigées.

11.2. Évaluation à l'aide des tableaux de valeurs

L'absorbance du contrôle standard est utilisée pour identifier la colonne du tableau avec la plage de valeurs qui s'applique à la mesure actuelle. L'absorbance mesurée pour l'échantillon est affectée à la plage de valeurs adéquate, puis le titre en U/ml est lu dans la deuxième colonne sur la gauche du tableau.

Par exemple, pour une mesure donnée, l'absorbance du contrôle standard est de 1,02. Dans ce cas, la colonne du tableau comportant la plage 1,00 à 1,05 est celle qu'il faut utiliser pour déterminer les résultats. Un échantillon de patient avec une absorbance de 1,38 correspond donc à la plage de titres allant de 50,1 à 100,0 UI/ml. (Les valeurs mentionnées sont données à titre d'exemples et peuvent être différentes des valeurs figurant sur la fiche technique).

L'évaluation des résultats déterminés (positifs (+), négatifs (-) ou équivoques (?)) doit être relevée dans la première colonne du tableau de valeurs.

	UI/ml	Plage des valeurs pour le contrôle standard	
			1,00 à 1,05
-	< 3,0		< 0,11
?	3,0 à 5,0		0,11 à 0,17
	5,1 à 10,0		0,18 à 0,31
	10,1 à 30,0		0,32 à 0,68
+	30,1 à 50,0		0,69 à 0,95
	50,1 à 100,0		0,96 à 1,42
	100,1 à 200,0		1,43 à 2,09
	> 200,0		> 2,09

Figure 1 : Exemple d'une détermination d'IgG (tiré d'une fiche technique spécifique à un lot)

11.3. Évaluation mathématique

Les valeurs nécessaires pour l'évaluation mathématique selon la méthode des 4 paramètres ou la méthode α sont indiquées dans la fiche technique fournie.

11.4. Résultats du test

Tableau 3 : Évaluation des unités déterminées

	IgG	IgM
négatif	< 3 UI/ml	< 10 U/ml
équivoque	3 à 5 UI/ml	10 à 12 U/ml
positif	> 5 UI/ml	> 12 U/ml

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Parvovirus B19 EIA détecte des anticorps IgG ou IgM dirigés contre le Parvovirus B19. Le test ne peut pas servir à établir une relation entre l'extinction déterminée et la survenue de graves symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés en rapport au tableau clinique.

Un résultat négatif ne signifie pas nécessairement l'absence d'infection. Pendant les premières étapes de l'infection, le nombre d'anticorps est encore si faible que la recherche de ces anticorps peut rendre un résultat négatif. En cas de suspicion de cas clinique, il faut donc aussi faire un test sur le sérum.

Chez les femmes enceintes, le test IgM peut parfois donner des résultats positifs en raison de la stimulation polyclonale du système immunitaire sans qu'il n'y ait eu d'infection. C'est la raison pour laquelle, les résultats positifs doivent être confirmés à l'aide d'un test de buvardage (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, réf. LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, réf. LB6033 [LB6023 et LB6033 sont distribués dans le monde entier sauf aux États-Unis, au Canada, en Australie et en Israël]). Identifiant les anticorps dirigés contre les épitopes de l'antigène du virus, cette méthode permet d'affirmer de façon plus précise l'existence d'une infection passée, aiguë ou de courte durée, ou d'un état immunitaire.

Deux échantillons consécutifs de sérum doivent toujours être prélevés sur le patient et soumis à des tests sérologiques afin d'améliorer la qualité du diagnostic.

L'évolution du titre est essentielle à l'interprétation des résultats.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'un autre pathogène infectieux à l'origine de la maladie.

13. Performances

Tableau 4 : Variation inter-essais(n = 30)

Variation inter-essais	IgG		IgM	
	DO	CV	DO	CV
Sérum 1	0,210	9,3 %	0,394	5,8 %
Sérum 2	0,469	8,6 %	1,455	4,3 %
Sérum 3	0,718	7,5 %	1,698	3,6 %

Tableau 5 : Variation inter-essais (n = 24)

Variation inter-essais	IgG		IgM	
	DO	CV	DO	CV
Sérum 1	0,212	9,3 %	0,365	2,4 %
Sérum 2	0,442	8,2 %	1,268	2,5 %
Sérum 3	1,098	8,5 %	1,580	4,5 %

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité par rapport à deux autres tests ELISA du commerce

	IgG	IgM
Sensibilité	100,0 %	100,0 %
Spécificité	100,0 %	100,0 %

Tableau 7 : Résultats des tests de sérums de 200 donneurs de sang provenant d'un centre de don du sang en Allemagne










Sérums de 200 donneurs de sang	IgG	IgM
négatif	22,5 %	99,5 %
équivoque	4,5 %	0 %
positif	73,0 %	0,5 %

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-02-20	Révision générale

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Plate	Microplaque
SeroPP	Tampon de dilution d'échantillon
SeroWP	Tampon de lavage 10x
Control IgG +	Contrôle IgG standard
Control IgM +	Contrôle IgM standard
Control IgG -	Contrôle IgG négatif
Control IgM -	Contrôle IgM négatif
Control IgG A	Contrôle qualité IgG A
Control IgM A	Contrôle qualité IgM A
Control IgG B	Contrôle qualité IgG B
Control IgM B	Contrôle qualité IgM B
SeroG HD	Conjugué anti-IgG humaine
SeroM HD	Conjugué anti-IgM humaine
SeroSC	Substrat TMB
Stop	Réactif stop

16. Bibliographie

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484–7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician.* 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 189:456–61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblocki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. I test RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 sono dosaggi immunoenzimatici per la determinazione quantitativa degli anticorpi IgG o IgM contro Parvovirus B19 nel siero umano.

I test devono essere utilizzati a scopo di conferma quando vi è un caso sospetto di infezione da Parvovirus B19 o per chiarire lo stato immunitario.

2. Sintesi e spiegazione del test

Parvovirus B19 è un piccolo virus a DNA a singolo filamento, privo di involucro lipidico, e rappresenta il patogeno più importante nella famiglia dei Parvoviridae. Oltre all'induzione di processi infiammatori, la patogenicità è causata da un'eritropoiesi soppressa dovuta a una replicazione selettiva del virus nelle cellule eritroidi progenitrici.¹⁰ Infezioni da parvovirus B19 si verificano in tutto il mondo e la trasmissione avviene prevalentemente tramite goccioline aeree infette attraverso il tratto respiratorio. Le infezioni acute da parvovirus si verificano in tutte le fasce d'età, tuttavia vengono osservate più spesso nei fanciulli di età compresa tra 6 e 15 anni. Il periodo di incubazione è di 1-3 settimane.⁶ La percentuale della popolazione adulta infetta è di circa 60 - 70 %.⁷

Le infezioni da parvovirus B19 sono spesso asintomatiche o mostrano deboli sintomi simil-influenzali. Tuttavia, le infezioni parvovirali sono anche associate a quadri clinici differenti. L'eritema infettivo, detto anche quinta malattia, mostra la massima prevalenza, colpendo generalmente bambini di età compresa tra i 4 e 10 anni.⁸ Nelle donne in gravidanza sieronegative si possono avere complicanze dovute a una probabilità del 30% di trasmissione fetale.⁵ Le infezioni fetali possono causare aborti spontanei o gravi deformità come l'idrope fetale. L'infezione materna durante il primo e il secondo trimestre di gravidanza può causare un aumento del rischio di aborto. Complessivamente, si stima che la morte fetale si verifichi nel 5 - 10 % dei casi di infezione fetale.⁵ In caso di infezione da parvovirus B19, i pazienti affetti da anemia emolitica cronica sono ad alto rischio di sviluppare una crisi aplastica dovuta alla soppressione dell'eritropoiesi.⁸

In seguito all'infezione da parvovirus, il sistema immunitario reagisce formando anticorpi specifici contro il patogeno. Utilizzando metodi immunologici, è possibile determinare questi anticorpi nel siero. Sia la scelta dell'antigene patogeno-specifico, sia il metodo analitico utilizzato hanno un'influenza significativa sul risultato del test. Il test ELISA è molto adatto come metodo di screening per trarre conclusioni sullo stato immunologico di un paziente. Successivamente, un risultato positivo può essere ulteriormente differenziato con un line blot e associato alle diverse fasi dell'infezione come ad esempio la persistenza del virus (vedere RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, art. n. LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, art. n. LB6033) (LB6023 e LB6033 sono distribuiti in tutto il mondo eccetto USA, Canada, Australia e Israele).

3. Principio del test

Gli antigeni ricombinanti rivestono la superficie delle piastre da microtitolazione. Per la rilevazione delle IgG viene utilizzata una miscela di VP1 e VP2 come antigene di parvovirus B19, mentre per la rilevazione delle IgM viene utilizzato VP2. Gli anticorpi presenti nei campioni dei pazienti si legano agli antigeni e vengono determinati durante la seconda fase di incubazione utilizzando anticorpi anti-umani marcati con l'enzima (il coniugato). L'enzima converte il substrato incolore (H_2O_2/TMB) in un prodotto finale blu. La reazione enzimatica viene interrotta aggiungendo acido solforico; contemporaneamente il colore della miscela vira da blu a giallo. La misurazione finale viene eseguita a 450 nm su un fotometro usando la lunghezza d'onda di riferimento di ≥ 620 nm.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: contenuto della confezione (una confezione include reagenti sufficienti per 96 determinazioni)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 test	Piastra di micropozzetti; 12 strisce di micropozzetti (separabili) in telaio di fissaggio, rivestiti con antigene di parvovirus B19 ricombinante; test per IgG e IgM: antigeni eucariotici espressi	X	X
SeroPP	110 ml	Tampone del campione, pronto per l'uso; soluzione di NaCl tamponata con fosfato, di colore giallo	X	X
SeroWP	100 ml	Tampone di lavaggio, concentrato 10 volte; soluzione NaCl tamponata con Tris	X	X
Control IgG + Tappo verde	2,5 ml	IgG controllo standard, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore verde	X	
Control IgM + Tappo rosso	2,5 ml	IgM controllo standard, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore rosso		X
Control IgG - Tappo incolore	1,2 ml	IgG controllo negativo, pronto all'uso; siero umano diluito	X	
Control IgM - Tappo incolore	1,2 ml	IgM controllo negativo, pronto all'uso; siero umano diluito		X
Control IgG A Tappo verde	1,2 ml	IgG controllo di qualità A, pronto all'uso; siero umano diluito	X	
Control IgG B Tappo verde	1,2 ml	IgG controllo di qualità B, pronto all'uso; siero umano diluito	X	
Control IgM A Tappo rosso	1,2 ml	IgM controllo di qualità A, pronto all'uso; siero umano diluito		X
Control IgM B Tappo rosso	1,2 ml	IgM controllo di qualità B, pronto all'uso; siero umano diluito		X
SeroG HD Tappo verde	12 ml	Coniugato HD di anti-IgG umane (capra), pronto per l'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata	X	
SeroM HD Tappo rosso	12 ml	Coniugato HD di anti-IgM umane (capra), pronto per l'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata		X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto per l'uso	X	X
Stop	12 ml	Reagente bloccante acido solforico 0,5 M; pronto per l'uso	X	X

I dettagli sulle sostanze pericolose sono conformi ai requisiti di etichettatura. Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com

5. Istruzioni di conservazione

Il kit del test deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito può essere usato per un massimo di 4 settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o per una settimana se conservato a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C). Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.

La busta in alluminio contenente la piastra di micropozzetti deve essere aperta in modo tale da non strappare la chiusura a clip. Le strisce di micropozzetti inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Inoltre i reagenti non devono essere contaminati e il substrato incolore deve essere protetto dall'esposizione alla luce diretta.

6. Reagenti aggiuntivi necessari e dispositivi accessori

6.1. Reagenti

- acqua distillata o deionizzata

6.2. Accessori

- Incubatore a 37 °C
- Provette
- Vorticatore
- Micropipette con volume da 10 - 100 µl e 100 - 1000 µl
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per micropiastre o pipetta multicanale
- Lettore di micropiastre (450 nm, lunghezza d'onda di riferimento \geq 620 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5 %

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com

I sieri di controllo presenti nel kit (controllo standard, controllo negativo, controllo di qualità A e controllo di qualità B) sono stati testati per HIV-Ab, HCV-Ab e HbsAg con risultati negativi. Tuttavia, devono essere trattati come potenzialmente infettivi analogamente ai campioni dei pazienti e a tutti gli altri materiali con cui vengono a contatto e devono essere maneggiati secondo le disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Il test è stato sviluppato per testare campioni di siero umano. Dopo il prelievo di sangue, questo deve essere separato il prima possibile dai coaguli per evitare l'emolisi. I campioni devono essere conservati refrigerati o congelati fino al momento di eseguire il test. Evitare in ogni modo il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni e la contaminazione microbica. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può causare risultati errati.

Tabella 2: conservazione del campione

Siero non diluito		Siero diluito
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 settimana	> 1 settimana	7 ore

9. Esecuzione del test

9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra di micropozzetti devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce di micropozzetti devono essere estratte dalla busta in alluminio solo dopo aver raggiunto la temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, il kit deve essere immediatamente riportato alla temperatura di conservazione di 2 - 8 °C. Prendere solo il volume di reagenti necessario per l'esecuzione del test. Non rimettere i reagenti nei flaconcini perché potrebbe verificarsi una contaminazione del reagente. Non rimettere i reagenti nei flaconcini perché questa operazione potrebbe comportarne la contaminazione.

Le strisce di micropozzetti non devono essere utilizzate più di una volta. I reagenti e le strisce di micropozzetti non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o se i flaconcini non sono ermetici.

Alcuni dei reagenti nel kit non sono specifici di questo test. I reagenti con etichetta Sero (come **SeroPP**) possono essere utilizzati anche con altri test ELISA RIDASCREEN® Sero con i reagenti corrispondenti.

I sieri di controllo sono correlati al lotto. I sieri di controllo di kit con codice identificativo diverso non devono essere scambiati.

I controlli A e B RIDASCREEN® Sero ELISA sono forniti come componenti aggiuntivi ai kit del test ELISA RIDASCREEN® Sero specifico. Servono per ulteriori controlli di qualità da effettuare facoltativamente. Contengono siero umano di controllo con diverse concentrazioni di anticorpi.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **SeroWP** viene miscelata con 9 parti di acqua distillata. Per compiere questa operazione, versare 100 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1000 ml e aggiungere acqua distillata fino a ottenere 1000 ml. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente disciolti riscaldandoli in un bagnomaria a 37 °C. Il tampone di lavaggio diluito può essere utilizzato per un massimo di 4 settimane purché conservato da 2 °C a 8 °C o per una settimana se conservato a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).

9.3. Preparazione dei campioni

Diluire i campioni di siero da testare con il tampone del campione **SeroPP** 1:50 prima di iniziare il test.

Per esempio 10 µl di siero + 490 µl di **SeroPP**

Per le determinazioni degli anticorpi IgM, si raccomanda di sottoporre i sieri all'assorbimento delle IgG (per esempio con RIDA® RF-Absorbens, articolo n. Z0202) prima del test.

Avvertenze:

il controllo negativo, il controllo standard, e il controllo di qualità A e B sono pronti all'uso e NON devono essere diluiti o assorbiti.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, pipettare 100 µl di siero diluito e 100 µl di controllo pronto all'uso in ciascuno dei pozzetti corrispondenti lasciando vuota la Posizione A1 (valore del bianco del reagente). Aggiungere il controllo negativo **Control IgG -** o **Control IgM -** una sola volta, e il controllo standard **Control IgG +** o **Control IgM +** in duplicato. Aggiungere i controlli di qualità **Control IgG A** e **Control IgG B** o i controlli di qualità **Control IgM A** e **Control IgM B** una sola volta. Coprire la piastra e incubarla a 37 °C per 30 minuti in un incubatore. Durante questo processo, il fondo dei pozzetti non deve entrare a contatto con materiali termococonduttivi. La piastra di micropozzetti deve essere coperta durante l'incubazione. Devono essere utilizzati i controlli che corrispondono alla determinazione (IgG o IgM).

A1 Valore del bianco del reagente

B1	Controllo negativo
C1	Controllo standard
D1	Controllo standard
E1	Controllo di qualità A
F1	Controllo di qualità B
G1, H1	Siero del paziente 1 e 2 ecc.

Avvertenze:

La piastra di micropozzetti non deve essere collocata in un contenitore di incubazione freddo che raggiunga i 37 °C durante l'incubazione. La temperatura del contenitore deve essere preventivamente regolata a 37 °C.

9.5. Lavaggio

I pozzetti devono essere svuotati in un contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi, picchiettare la piastra su carta assorbente per eliminare l'umidità residua. In seguito, lavare la piastra 4 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio. Dopo ciascun lavaggio, assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio per micropiastre, accertarsi che la macchina sia regolata correttamente sul tipo di piastra impiegato. Dopo il lavaggio, picchiettare la piastra su un foglio di carta assorbente pulito per eliminare l'eventuale umidità residua.

9.6. Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato HD di anti-IgG umane **SeroG HD** o di coniugato HD di anti-IgM umane **SeroM HD** ai pozzetti corrispondenti (compreso A1). Quindi, coprire la piastra e incubarla a 37 °C per 30 minuti in un incubatore (vedere Sezione 9.4).

9.7. Lavaggio

Lavare 4 volte in conformità con la Sezione 9.5.

9.8. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **SeroSC** a ogni pozzetto. Quindi, coprire la piastra e incubarla a 37 °C per 30 minuti in un incubatore. Arrestare quindi la reazione aggiungendo 100 µl di reagente bloccante **Stop** a ogni pozzetto. Dopo avere miscelato con attenzione (picchiettando leggermente il lato della piastra) misurare l'assorbanza a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento ≥ 620 nm) in un fotometro per piastre. Calibrare il valore del bianco del reagente (posizione A1) a zero.

10. Controllo di qualità e indicazioni di instabilità o deterioramento

Per il controllo di qualità, ogni volta che si effettua il test, devono essere utilizzati il controllo standard (in duplicato) e il controllo negativo. Il test è stato eseguito correttamente quando l'assorbanza media per il controllo standard a 450/620 nm rientra nell'intervallo indicato nella scheda tecnica allegata. Se le due singole misurazioni si discostano di oltre il 20 % dalla media, il test deve essere ripetuto. L'assorbanza per il controllo negativo a 450/620 nm deve essere $<0,3$.

I controlli A e B del test ELISA RIDASCREEN[®] Sero servono per il controllo di qualità e possono essere utilizzati facoltativamente.

I valori target sono indicati nel certificato di garanzia di qualità allegato, specifico per il lotto. I valori ottenuti (U/ml, UI/ml o mUI/ml) sono raccomandati come valori di riferimento per la garanzia della qualità nei laboratori accreditati.

Se i valori differiscono da quelli richiesti, se il reagente è torbido o il substrato è diventato blu prima dell'aggiunta ai pozzetti, questo può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori fissati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (per esempio calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test
- Controllo visivo dei componenti del kit per verificare che non presentino contaminazione o perdite; una soluzione di substrato che sia diventata blu non deve essere utilizzata.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

Il test IgG può essere valutato in unità internazionali (UI/ml) adeguando la curva standard allo standard internazionale dell'OMS (NIBSC 93/724). I test possono essere valutati utilizzando tre metodi differenti:

13. Utilizzando la curva standard fornita nel kit
14. Utilizzando la tabella dei valori (consultare la scheda tecnica fornita nel kit)
15. Matematicamente, mediante il metodo a 4 parametri o il metodo α

Prima della valutazione, il valore del bianco del reagente deve essere sottratto da ogni valore misurato.

11.1. Valutazione mediante la curva standard fornita nel kit:

Per poter effettuare la valutazione mediante la curva standard, è necessario innanzitutto correggere il valore medio del controllo standard per tener conto di eventuali fluttuazioni che possono verificarsi da un giorno all'altro. Il fattore di correzione F viene calcolato utilizzando il valore medio attuale misurato per il

controllo standard e il suo valore target. Il valore target, che dipende dal lotto, viene registrato sulla scheda tecnica allegata.

$$F = \frac{\text{valore target del controllo standard}}{\text{valore medio misurato del controllo standard}}$$

Tutti i valori OD dei campioni devono essere moltiplicati per il fattore F. I valori UI/ml (IgG) o U/ml (IgM) corrispondenti vengono quindi letti dalla curva standard utilizzando questi valori corretti.

11.2. Valutazione utilizzando la tabella dei valori

L'assorbanza per il controllo standard viene utilizzata per identificare la colonna nella tabella con l'intervallo di valori applicabile alla misurazione corrente. L'assorbanza misurata per il campione viene assegnata all'intervallo di valori appropriato e quindi il titolo in U/ml viene letto dalla seconda colonna a sinistra nella tabella.

Ad esempio, l'assorbanza per il controllo standard per una determinata misurazione è pari a 1,02. In questo caso, per determinare i risultati viene utilizzata la colonna con l'intervallo da 1,00 a 1,05 nella tabella. Un campione del paziente con un'assorbanza di 1,38 corrisponde quindi all'intervallo del titolo da 50,1 a 100,0 UI/ml. (I valori citati sono da considerare semplicemente come esempi e possono differire dai valori effettivi sulla scheda tecnica).

La valutazione dei risultati determinati (positivo [+], negativo [-] o dubbio [?]) deve essere ricavata dalla prima colonna della tabella dei valori.

	UI/ml	Intervallo di valori per il controllo standard	
		1,00 - 1,05	
-	< 3,0	< 0,11	
?	3,0 - 5,0	0,11 - 0,17	
	5,1 - 10,0	0,18 - 0,31	
	10,1 - 30,0	0,32 - 0,68	
+	30,1 - 50,0	0,69 - 0,95	
	50,1 - 100,0	0,96 - 1,42	
	100,1 - 200,0	1,43 - 2,09	
	> 200,0	> 2,09	

Figura 1. Esempio di determinazione delle IgG (estratto da una scheda tecnica specifica di un lotto)

11.3. Valutazione matematica

I valori richiesti per la valutazione matematica con metodo a 4 parametri o con metodo α sono registrati nella scheda tecnica allegata.

11.4. Risultato del test

Tabella 3: Valutazione delle unità determinate

	IgG	IgM
Negativo	<3 UI/ml	<10 U/ml
dubbio	3 - 5 UI/ml	10 - 12 U/ml
Positivo	>5 UI/ml	>12 U/ml

12. Limiti del metodo

RIDASCREEN® Parvovirus B19 EIA rileva anticorpi IgG o IgM diretti contro il parvovirus B19. Il test non può essere utilizzato per derivare una relazione tra l'estinzione determinata e l'insorgenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati nel contesto del quadro clinico.

Un risultato negativo non significa necessariamente che non ci sia un'infezione. Durante le prime fasi dell'infezione, il numero di anticorpi può essere molto ridotto, al punto che il test produce un risultato negativo. In caso di sospetto clinico, si deve quindi testare un campione di siero di follow-up.

Nelle donne in gravidanza, il test IgM può in alcuni casi dare risultati positivi dovuti alla stimolazione policlonale del sistema immunitario senza che vi sia un'infezione. Per questo motivo, i risultati positivi dovrebbero essere confermati usando un line blot (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, art. n. LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, art. n. LB6033) (LB6023 e LB6033 sono distribuiti in tutto il mondo eccetto USA, Canada, Australia e Israele).

Questo metodo, identificando gli anticorpi diretti contro singoli epitopi dell'antigene virale, consente determinazioni più accurate sull'infezione acuta o pregressa da breve tempo o sullo stato immunitario.

Al fine di migliorare la qualità della diagnostica, per ogni paziente è sempre necessario prelevare e sottoporre a test sierologici due campioni consecutivi di siero. L'evoluzione del titolo è importante per interpretare i risultati.

Un risultato positivo non esclude la presenza di un altro patogeno infettivo come causa della malattia.

13. Prestazioni e caratteristiche

Tabella 4: variazione inter-dosaggio (n = 30)

Variazione inter-dosaggio	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Siero 1	0,210	9,3 %	0,394	5,8 %
Siero 2	0,469	8,6 %	1,455	4,3 %
Siero 3	0,718	7,5 %	1,698	3,6 %

Tabella 5: variazione intra-dosaggio (n = 24)

Variazione inter-dosaggio	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Siero 1	0,212	9,3 %	0,365	2,4 %
Siero 2	0,442	8,2 %	1,268	2,5 %
Siero 3	1,098	8,5 %	1,580	4,5 %

Tabella 6: Sensibilità e specificità rispetto a due altri dosaggi ELISA disponibili in commercio

	IgG	IgM
Sensibilità	100,0 %	100,0 %
Specificità	100,0 %	100,0 %

Tabella 7: Risultati dai test condotti su 200 sieri di donatori di sangue prelevati da un centro donatori di sangue in Germania










200 sieri di donatori di sangue	IgG	IgM
Negativo	22,5 %	99,5 %
dubbio	4,5 %	0 %
Positivo	73,0 %	0,5 %

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-02-20	Revisione generale

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Plate	Piastra di micropozzetti
SeroPP	Tampone di diluizione del campione
SeroWP	Tampone di lavaggio 10x
Control IgG +	IgG controllo standard
Control IgM +	IgM controllo standard
Control IgG -	IgG controllo negativo
Control IgM -	IgM controllo negativo
Control IgG A	IgG controllo di qualità A
Control IgM A	IgM controllo di qualità A
Control IgG B	IgG controllo di qualità B
Control IgM B	IgM controllo di qualità B
SeroG HD	Coniugato di anti-IgG umane
SeroM HD	Coniugato di anti-IgM umane
SeroSC	Substrato TMB
Stop	Reagente bloccante

16. Bibliografia

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvoviru-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484–7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician*. 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 189:456–61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblozki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgG

RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 IgM

REF K6021 (IgG)
K6031 (IgM)

1. Uso previsto

Apenas para utilização em diagnóstico *in-vitro*. Os testes RIDASCREEN[®] Parvovirus B19 são ensaios imunoenzimáticos para a determinação quantitativa de anticorpos IgG ou IgM contra o Parvovirus B19 em soro humano.

Os testes devem ser usados para propósitos de confirmação quando há caso suspeito de infecção por Parvovirus B19 ou para esclarecer o estado imunológico.

2. Sumário e explicação do teste

O Parvovirus B19 é um pequeno vírus de DNA de fita simples que não possui um envelope lipídico e representa o patógeno mais importante dentro da família dos Parvoviridae. Além da indução de processos inflamatórios, a patogenicidade é causada por uma eritropoese suprimida devido a uma replicação seletiva do vírus em células progenitoras eritróides.¹⁰ Infecções por Parvovirus B19 ocorrem em todo o mundo e a transmissão ocorre predominantemente por infecção por gotículas *via* trato respiratório. As infecções agudas por parvovirus ocorrem em todas as faixas etárias, porém são mais frequentemente observadas em crianças entre 6 e 15 anos de idade. O período de incubação é de 1 a 3 semanas.⁶ A porcentagem da população adulta infectada é de cerca de 60 a 70 %.⁷

As infecções por parvovirus B19 são frequentemente assintomáticas ou apresentam sintomas semelhantes aos da gripe. No entanto, as infecções por parvovirus também estão associadas a diferentes quadros clínicos. O eritema infeccioso, também chamado de quinta doença, apresenta a maior prevalência que geralmente afeta crianças entre 4 e 10 anos de idade.⁸ As complicações podem ocorrer em gestantes soronegativas, devido a uma chance de 30% de transmissão fetal.⁵ As infecções fetais podem levar a doenças espontâneas abortos ou deformidades fetais graves como hidropisia fetal. A infecção materna durante o primeiro e segundo trimestres da gravidez pode levar a um aumento do risco de perda de gravidez. Em geral, estima-se que a morte fetal ocorra em 5 a 10 % dos casos de infecção fetal.⁵ Na infecção por parvovirus B19, os pacientes que sofrem de anemia hemolítica crônica apresentam alto risco de desenvolver uma crise aplástica devido a uma eritropoiese reprimida.⁸

Após a infecção por parvovírus, anticorpos específicos contra os patógenos são formados devido à resposta do sistema imunológico. A utilização de métodos metodológicos permite determinar a presença desses anticorpos no soro. Tanto a escolha do antígeno patogênico específico quanto o método de teste selecionado têm uma influência significativa no resultado do teste. O ELISA é muito adequado como método de triagem para obter conclusões sobre o estado imunológico de um paciente. Subsequentemente, um resultado positivo pode ainda ser diferenciado por “Line Blot” e pode ser atribuído às diferentes fases de uma infecção, como a persistência do vírus (ver RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgG, Art. N^o LB6023, RIDA[®]LINE Parvovirus B19 IgM, Art. N^o LB6033 (LB6023 e LB6033 distribuídas em todo o mundo, exceto EUA, Canadá, Austrália e Israel).

3. Princípio do teste

Os antígenos recombinantes são revestidos na superfície das placas de microtitulação. No caso da detecção de IgG, uma mistura de VP1 e VP2 é usada como antígeno do Parvovírus B19, enquanto que para detecção de IgM, a mistura VP2 é usada. Os anticorpos nas amostras do paciente são ligados aos antígenos e determinados durante a segunda etapa de incubação utilizando anticorpos anti-humanos (o conjugado) marcados pelas enzimas. A enzima transforma um substrato incolor (H₂O₂/TMB) em um produto final azul. A reação da enzima é interrompida adicionando ácido sulfúrico, e a cor da mistura muda, ao mesmo tempo, de azul para amarelo. A medição final é realizada em um fotômetro a 450 nm empregando um comprimento de onda de referência de ≥ 620 nm.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Conteúdo da embalagem (existem, na embalagem, reagentes suficientes para 96 determinações)

			K6021 IgG	K6031 IgM
Plate	96 det.	Placa de micropoços; 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestidas com antígeno para Parvovírus B19 recombinante; teste IgG e IgM: antígenos expressos eucarióticos	X	X
SeroPP	110 ml	Tampão de amostra, pronto para uso; solução fosfato tamponada NaCl; de cor amarela;	X	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem em concentrações de 10 vezes; solução tamponada de Tris-NaCl;	X	X
Control IgG + Tampa verde	2,5 ml	Controle padrão IgG, pronto para uso; diluído em soro humano; cor verde;	X	
Control IgM + tampa vermelha	2,5 ml	Controle padrão IgM, pronto para uso; diluído em soro humano; cor vermelha		X
Control IgG - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgG, pronto para uso; diluído em soro humano;	X	
Control IgM - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgM, pronto para uso; diluído em soro humano;		X
Control IgG A Tampa verde	1,2 ml	Controle de qualidade A IgG, pronto para uso; diluído em soro humano;	X	
Control IgG B Tampa verde	1,2 ml	Controle de qualidade B IgG, pronto para uso; diluído em soro humano;	X	
Control IgM A tampa vermelha	1,2 ml	Controle de qualidade A IgM, pronto para uso; diluído em soro humano		X
Control IgM B tampa vermelha	1,2 ml	Controle de qualidade B IgM, pronto para uso; diluído em soro humano		X
SeroG HD Tampa verde	12 ml	Conjugado anti-humano IgG HD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução de proteína estabilizada;	X	
SeroM HD tampa vermelha	12 ml	Conjugado anti-humano IgM HD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução de proteína estabilizada;		X
SeroSC	12 ml	Substrato; H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto para uso	X	X
Stop	12 ml	Reagente bloqueador ácido sulfúrico 0,5 M; pronto para uso	X	X

Detalhes de substâncias de risco de acordo com as obrigatoriedades de marcação.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em

www.r-biopharm.com

5. Instruções de armazenamento

O kit de teste deve ser armazenado entre 2 e 8 °C e pode ser usado até a data impressa no rótulo. O tampão de lavagem diluído pode ser usado por no máximo 4 semanas quando armazenado a 2 - 8 °C, ou por uma semana quando armazenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C). A garantia de qualidade expirará após o término do prazo de validade.

A embalagem de alumínio contendo a placa de micropoços deve ser aberta sem danificar o fecho de vedação. As tiras de micropoços que não forem necessárias devem ser devolvidas à embalagem de alumínio e armazenadas imediatamente à temperatura entre 2 e 8 °C.

Os reagentes também não devem ser contaminados e o substrato incolor precisa ser protegido contra a exposição a luz direta.

6. Reagentes adicionais necessários – e equipamento necessário

6.1. Reagentes

- água destilada ou deionizada

6.2. Acessórios

- Incubadora a 37 °C
- Tubos de teste
- Misturador vórtice
- Micropipetas para 10 - 100 µl e 100 - 1000 µl de capacidade
- Cilindro de medição (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora de microplacas ou pipeta multicanal
- Leitor de microplaca (450 nm, comprimento da onda de referência \geq 620 nm)
- Papel filtro (toalhas de laboratório)
- Recipiente de descarte contendo solução de hipoclorito de sódio de 0,5 %

7. Medidas preventivas

Apenas para uso em Diagnóstico *in-vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em www.r-biopharm.com

Os soros de controle (controle padrão, controle negativo, controle de qualidade A e controle de qualidade B) do kit foram testados para HIV e HCV-Ab, bem como HbsAg com resultados negativos. Apesar disto, devem ser tratados como potencialmente infecciosos, do mesmo modo que as amostras de pacientes e todos os outros materiais com que entram em contato, devendo ser tratados de acordo com as regulamentações nacionais de segurança aplicáveis.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

8. Coleta e armazenamento de amostra

O teste foi desenvolvido para testar amostras de soro humano. Após a coleta do sangue, para evitar hemólise, o soro deve ser separado do sangue coagulado com a maior rapidez possível. As amostras devem ser armazenadas a frio ou congeladas, até que sejam testadas. Deve-se evitar a todo custo o congelamento e descongelamento repetidos das amostras. A utilização de espécimes inativados por calor, lipêmicos, hemolíticos, icteríticos ou opacos podem levar a resultados falsos.

Tabela 2: Armazenamento de amostras

Soro não diluído		Soro diluído
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 semana	>1 semana	7 horas

9. Realização do teste

9.1. Geral

Todos os reagentes e a placa de micropoços devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da embalagem de alumínio até que tenham chegado à temperatura ambiente. Os reagentes devem ser completamente misturados imediatamente antes do uso. Após o uso, o kit deve ser armazenado imediatamente de novo a 2 e 8 °C.

Utilize apenas o volume de reagentes que seja necessário para a realização do teste. Não despeje os reagentes de volta nos frascos, devido ao risco de contaminação do reagente. Não despeje os reagentes de volta nos frascos devido ao risco de contaminar o reagente.

As tiras de microtitulação não podem ser utilizadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou se os frascos estiverem vazando.

Alguns dos reagentes no kit não são específicos do teste. Os reagentes marcados com Sero (tal como **SeroPP**) podem também ser utilizados com outro RIDASCREEN® Sero ELISA com os reagentes correspondentes.

O soro de controle está relacionados ao lote. O soro de controle dos kits com diferentes números de lote não devem ser trocados.

Os controles RIDASCREEN® Sero ELISA A e B são fornecidos como componentes adicionais aos respectivos kits de teste RIDASCREEN® Sero ELISA. Estes são controles para fins de controle de qualidade adicionais que podem ser usados como opcionais. Eles contêm soro de controle humano com diferentes concentrações de anticorpos.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte de concentrado de tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para isto, coloque 100 ml do concentrado em um cilindro de medição de 1000 ml e prepare a solução completando até 1000 ml com água destilada. Quaisquer cristais presentes no concentrado devem ser dissolvidos antes por aquecimento em banho-maria a 37 °C. O tampão de lavagem diluído pode ser usado por no máximo 4 semanas quando armazenado a 2 a 8 °C ou por uma semana quando armazenado à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

Antes de começar o teste, dilua as amostras de soro a serem testadas com tampão de amostra **SeroPP** 1:50.

Exemplo: 10 µl Soro + 490 µl **SeroPP**

Para as determinações de IgM, recomenda-se sujeitar o soro à absorção de IgG (por exemplo, com RIDA® RF Absorbens, artigo nº Z0202) antes do teste.

Indicação:

O controle negativo, controle padrão, controles de qualidade A e B estão prontos para uso e NÃO devem ser diluídos ou absorvidos.

9.4. Primeira incubação

Após inserção de um número suficiente de poços na estrutura, pipete 100 µl de soro diluído e 100 µl de controle pronto para uso em cada uma das cavidades correspondentes, deixando a posição A1 (valor em branco do reagente) vazia. Adicione o controle negativo **Control IgG -** ou **Control IgM -** uma vez e o controle padrão **Control IgG +** ou **Control IgM +** duas vezes. Adicione os controles de qualidade **Control IgG A** e **Control IgG B** ou os controles de qualidade **Control IgM A** e **Control IgM B** uma vez. Cubra a placa e incube a 37 °C por 30 minutos em uma incubadora. Durante este processo, os fundos dos

poços não devem estar em contato com materiais condutores de calor. A placa de micropoços deve ser coberta durante a incubação.

Os controles que correspondem à determinação (IgG ou IgM) devem ser usados.

A1	Valor em branco do reagente
B1	Controle negativo
C1	Controle padrão
D1	Controle padrão
E1	Controle de qualidade A
F1	Controle de qualidade B
G1, H1	Soro de paciente 1 e 2 etc.

Indicação:

A placa de micropoços não deve ser colocada em um recipiente de incubação a frio, atingindo 37 °C durante a incubação. A temperatura do recipiente deve ser ajustada previamente a 37 °C.

9.5. Lavagem

Para a desinfecção, os poços devem ser esvaziados em um recipiente de descarte que contenha solução de hipoclorito. Depois, bata a placa em papel absorvente para remover a umidade residual. A seguir, lave a placa 4 vezes empregando usando 300 µl de tampão de lavagem a cada vez. Após cada lavagem, para se certificar de que os poços estão totalmente vazios, bata-os em uma parte não usada de papel absorvente.

Em caso de utilização de uma lavadora de microplacas, verifique se a máquina está ajustada corretamente para o tipo de placa a ser usada. Depois da lavagem, bata a placa em papel absorvente para remover a umidade residual.

9.6. Segunda incubação

Adicione 100 µl de conjugado anti-humano IgG HD SeroG HD ou conjugado anti-humano IgM HD SeroM HD aos poços correspondentes (incluindo A1). Em seguida, cubra a placa e incube a 37 °C por 30 minutos em uma incubadora (consulte a Seção 9.4).

9.7. Lavagem

Lave 4 vezes conforme descrito na Seção 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adicione 100 µl de substrato SeroSC em cada poço. Depois, cubra a placa e incube a 37 °C por 30 minutos em uma incubadora. Depois disso, pare a reação adicionando 100 µl do reagente de parada Stop a cada poço. Depois de misturar cuidadosamente (batendo levemente na lateral da placa), meça a absorbância a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm) em um fotômetro de placa. Calibre o valor em branco do reagente (posição A1) para zero.

10. Controle de qualidade e indicações de instabilidade ou deterioração

Para fins de controle de qualidade, o controle padrão (duplo) e o controle negativo devem ser usados toda vez que o teste for realizado. O teste foi realizado corretamente se a absorbância média para o controle padrão a 450/620 nm estiver dentro da faixa indicada na folha de dados fornecida. Se as duas medições individuais se desviarem da média em mais de 20 %, o teste deve ser repetido. A absorbância para o controle negativo a 450/620 nm deve ser $< 0,3$.

Os controles RIDASCREEN® Sero ELISA A e B são controles adicionais para fins de controle de qualidade que podem ser usados opcionalmente.

Os valores-alvo são indicados no certificado de garantia de qualidade específico do lote. Os valores obtidos (U/ml, IU/ml ou mIU/ml) são recomendados como valores de referência para a garantia de qualidade em laboratórios acreditados.

Se os valores divergirem daqueles exigidos, se o reagente estiver opaco ou o substrato ficar azul antes de ser adicionado aos poços, isto pode ser indicação de que os reagentes estão fora do prazo de validade.

Se os valores estipulados não forem obtidos, os seguintes pontos devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (por ex., calibração)
- Execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos – uma solução de substrato que ficou azul não deve ser usada.

Se as condições ainda não tiverem sido atingidas após a repetição do teste, consulte o seu distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

O teste de IgG pode ser avaliado em unidades internacionais (IU/ml) ajustando a curva padrão ao padrão internacional da OMS (NIBSC 93/724). O teste pode ser avaliado usando três métodos diferentes:

17. Usando a curva padrão fornecida no kit
18. Usando a tabela de valores (consulte a folha de dados fornecida no kit)
19. Matematicamente usando o método de 4 parâmetros ou o método α

O valor em branco do reagente deve ser subtraído de cada valor medido antes da avaliação.

11.1. Avaliação usando a curva padrão fornecida no kit

Para realizar a avaliação usando a curva padrão, uma correção deve ser feita para o valor médio do controle padrão primeiro, a fim de levar em consideração quaisquer flutuações que possam ocorrer de um dia para o outro. O fator de correção F é calculado a partir do valor médio atual medido para o controle padrão e seu valor alvo. O valor alvo, que depende do lote, é registrado na folha de dados anexa.

$$F = \frac{\text{valor alvo de controle padrão}}{\text{controle padrão medido} - \text{valor médio medido}}$$

Todos os valores de OD para as amostras devem ser multiplicados pelo fator F. Os valores de IU/ml (IgG) ou U/ml (IgM) correspondentes são então lidos da curva padrão usando esses valores corrigidos.

11.2. Avaliação usando a tabela de valores

A absorbância para o controle padrão é usada para identificar a coluna na tabela com o intervalo de valores que se aplica à medição atual. A absorbância medida para a amostra é atribuída ao intervalo apropriado de valores e, em seguida, a titulação em U/ml é lida da segunda coluna para a esquerda na tabela.

Por exemplo, a absorbância para o controle padrão para uma determinada medição é 1,02. Nesse caso, a coluna na tabela com o intervalo de 1,00 a 1,05 é a usada para determinar os resultados. Uma amostra de paciente com uma absorvência de 1,38 corresponde portanto ao intervalo de titulação 50,1 - 100,0 IU/ml. (Os valores citados são meramente considerados como exemplos e podem diferir dos valores atuais na folha de dados.)

A avaliação para os resultados determinados (positivo (+), negativo (-) ou equívoco (?)) deve ser feita a partir da primeira coluna da tabela de valores.

	IU/ml	Faixa de valores para o controle padrão	
		1,00 - 1,05	
-	< 3,0	< 0,11	
?	3,0 - 5,0	0,11 - 0,17	
	5,1 - 10,0	0,18 - 0,31	
	10,1 - 30,0	0,32 - 0,68	
+	30,1 - 50,0	0,69 - 0,95	
	50,1 - 100,0	0,96 - 1,42	
	100,1 - 200,0	1,43 - 2,09	
	> 200,0	> 2,09	

Figura 1: Exemplo de determinação de IgG (extraído de uma folha de dados específica do lote)

11.3. Avaliação matemática

Os valores necessários para avaliação matemática de acordo com o método de 4 parâmetros ou o método α são registrados na folha de dados anexa.

11.4. Resultado do teste

Tabela 3: Avaliação das unidades determinadas

	IgG	IgM
negativo	< 3 IU/ml	< 10 U/ml
equívoco	3 - 5 IU/ml	10 - 12 U/ml
positivo	> 5 IU/ml	> 12 U/ml

12. Limitações do método

O RIDASCREEN® Parvovirus B19 EIA detecta anticorpos IgG ou IgM contra Parvovírus B19. O teste não pode ser usado para derivar uma relação entre a extinção determinada e a ocorrência de sintomas clínicos graves. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com a situação clínica. Um resultado negativo não significa necessariamente que não haja infecção. Durante os primeiros estágios da infecção, o número de anticorpos ainda pode ser tão pequeno que procurá-los pode resultar em um resultado negativo. Se houver um caso clínico suspeito, portanto, um soro de acompanhamento também deve ser testado. Com mulheres grávidas, o teste de IgM também pode, por vezes, produzir resultados positivos devido à estimulação policlonal do sistema imunológico sem que haja uma infecção. Por esta razão, os resultados positivos devem ser confirmados usando o Line Blot (RIDA®LINE Parvovirus B19 IgG, Art. nº LB6023, RIDA®LINE Parvovirus B19 IgM, Art. nº LB6033 (LB6023 e LB6033 distribuído mundialmente, exceto para os EUA, Canadá, Austrália e Israel). Com este método, podem ser feitas afirmações mais precisas sobre uma infecção aguda ou de curto prazo no passado ou um estado imunológico pela identificação de anticorpos contra epitopos individuais do antígeno do vírus. Duas amostras consecutivas de soro devem sempre ser coletadas de um paciente e submetidas a testes sorológicos para melhorar a qualidade do diagnóstico. O progresso da titulação é importante para interpretar os resultados. Um resultado positivo não exclui a presença de outro patógeno infeccioso como causa da doença.

13. Características de desempenho

Tabela 4: Variação interensaio (n = 30)

Variação interensaio	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Soro 1	0,210	9,3 %	0,394	5,8 %
Soro 2	0,469	8,6 %	1,455	4,3 %
Soro 3	0,718	7,5 %	1,698	3,6 %

Tabela 5: Variação intraensaio (n = 24)

Variação interensaio	IgG		IgM	
	OD	CV	OD	CV
Soro 1	0,212	9,3 %	0,365	2,4 %
Soro 2	0,442	8,2 %	1,268	2,5 %
Soro 3	1,098	8,5 %	1,580	4,5 %

Tabela 6: Sensibilidade e especificidade em comparação com dois outros ELISAs comerciais

	IgG	IgM
Sensibilidade	100,0 %	100,0 %
Especificidade	100,0 %	100,0 %

Tabela 7: Resultados de teste de 200 soros de doadores de sangue em um centro de doação na Alemanha










200 soros de doadores de sangue	IgG	IgM
negativo	22,5 %	99,5 %
equivoco	4,5 %	0 %
positivo	73,0 %	0,5 %

14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação
2019-02-20	Revisão geral

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote:
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos de teste

Plate	Placa de micropoço
SeroPP	Tampão de diluição de amostras
SeroWP	Tampão de lavagem 10x
Control IgG +	Controle padrão IgG
Control IgM +	Controle padrão IgM
Control IgG -	Controle negativo IgG
Control IgM -	Controle negativo IgM
Control IgG A	Controle de qualidade A IgG
Control IgM A	Controle de qualidade A IgM
Control IgG B	Controle de qualidade B IgG
Control IgM B	Controle de qualidade B IgM
SeroG HD	Conjugado anti-humano IgG
SeroM HD	Conjugado anti-humano IgM
SeroSC	Substrato TMB
Stop	Reagente bloqueador

16. Referências

1. Anderson, M. et al.: Human Parvovirus, the Cause of Erythema infectiosum (Fifth Disease). *Lancet* 1: 1378 (1983)
2. Brede, H. D.: Das Parvovirus B 19. *Notabene medici* 10: 445-448 (1989)
3. Enders, G., Biber, M.: Ringelröteln bei Schwangeren - oft Todesurteil für das Ungeborene. *Ärztl. Praxis* 72: 14 (1990)
4. Joseph, P.R.: Incubation period of fifth disease. *Lancet* 2: 1390-1391 (1986)
5. Lamont R.F., Sobel J.D., Vaisbuch E., Kusanovic J.P., Mazaki-Tovi S., Kim S.K., Uldbjerg N., Romero R.: Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *BJOG*. 118: 175-86 (2011)
6. Manaresi, E., Gallinella, G., Gentilomi, G., Venturoli, S., Zuffi, E., Bonvicini, F., Cricca, M., Zerbini, M., Musiani, M.: Humoral Immune Response to Parvovirus B19 and Serological Diagnosis of B19 Infection. *Clin. Lab.* 48: 201-205 (2002)
7. Modrow S., Gärtner B.: Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch. Arztebl.* 103:43 (2006)
8. Pickering L.K., Baker, C.J., Long S.S., McMillanassociate J.A.: Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). *AAP*. 484–7 (2006).
9. Schwarz, T. F., Jäger, G.: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B 19 infection. *Zbl. Bakt.* 280: 526-533 (1994)
10. Servey J.T., Reamy B.V., Hodge J.: Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician.* 75:373-6 (2007)
11. Siegl, G., Bates, R. C., Berus, K.J. et al.: Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23: 61-73 (1985)
12. Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A.: Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology*. 189:456–61 (1992)
13. Söderlund, M., Brown, C. S., Spaan, W. J. M., Hedman, L., Hedman, K.: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B 19. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1431-1436 (1995)
14. von Poblocki, A., Hemnauer, A., Gigler, A., Puchhammer-Stöckl, E., Heinz, F.-X., Pont, J., Laczika, K., Wolf, H., Modrow, S.: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B 19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1356-1359 (1995)