

SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG

SeraSpot® Anti-Parvovirus-5 IgM

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen Parvovirus B19
in humanem Serum oder Plasma

REF SP-012-6 G-S6 ▽ 48 **REF** SP-012-6 G-S12 ▽ 96 **REF** SP-012-6 G-S24 ▽ 2x 96
IVD *In-vitro*- Diagnostikum **CE**
REF SP-012-5 M-S6 ▽ 48 **REF** SP-012-5 M-S12 ▽ 96 **REF** SP-012-5 M-S24 ▽ 2x 96
IVD *In-vitro*- Diagnostikum **CE**



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

1975 wurde das humane Parvovirus B19 durch Zufall bei einer Blutspendenserentestung entdeckt. Die Bezeichnung B19 ist ein Resultat der bei diesem Screening verwendeten Nomenklatur. Die entsprechende Probe war das 19. Serum in der Reihe B (1, 2). 1983 wurde das Virus bei Patienten nachgewiesen, welche grippe-ähnliche Symptome oder aplastische Krisen aufwiesen. Seither ist das humane Parvovirus B19-Virus als Erreger der Ringelröteln (Erythema infectiosum; auch als Morbus quintus oder Fifth Disease bezeichnet) bekannt (1, 3). Mittlerweile ist erwiesen, dass zahlreiche weitere Krankheitsbilder mit einer Parvovirus B19-Infektion in Verbindung stehen können. Dazu zählen unter anderem Arthritis und Arthralgie (bei 8 % der infizierten Kinder und 80 % bei Erwachsenen), chronische Anämie (bei Patienten mit Leukämie und immunsupprimierten Patienten), kongenitale Anämie sowie seltene Formen von Myokarditis, Vaskulitis und Glomerulonephritis (1). Eine Parvovirus B19-Infektion während der Schwangerschaft kann bei Frauen ohne Immunschutz zu Komplikationen führen. Fetale Todesfälle oder Hydrops fetalis (Flüssigkeitsansammlungen in Kompartimenten des Fetus) können die Folge sein (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Parvovirus-Infektionen bei Kindern laufen zu 30 % asymptomatisch ab (6). Auch bei gesunden Erwachsenen verläuft eine Infektion häufig ohne erkennbare Symptome (5).

Das humane Parvovirus B19 ist der Familie der Parvoviridae zuzuordnen. Es ist das einzige bekannte human-pathogene Parvovirus (10). Das Virus vermehrt sich vornehmlich in erythroiden Zellen. Es handelt sich um ein Virus, welches keine Lipidhülle besitzt und einen Durchmesser von 18 bis 26 nm aufweist. Die Viruspartikel bestehen aus 60 Kopien des Kapsidproteins und einsträngiger DNA (5.596 Nukleotide). Das Kapsidprotein setzt sich aus den Strukturproteinen VP-1 und VP-2 zusammen. Teilabschnitte dieser Strukturproteine werden als VP-C und VP-N bezeichnet. Zudem kodiert die Virus-DNA für Nichtstrukturproteine. Das Haupt-Nichtstrukturprotein wird als NS-1 bezeichnet (1). Dieses spielt eine Rolle bei der Virusreplikation und -vermehrung (12, 13).

Eine Parvovirus-Übertragung erfolgt in der Regel über Tröpfcheninfektionen, aber auch Infektionswege über Blut oder Blutprodukte sind möglich (1, 5). Im Zuge einer Infektion bilden sich Antikörper gegen

die Strukturproteine VP-1 und VP-2 zum Teil auch gegen das Nichtstrukturprotein NS-1 (11, 12, 13). IgM-Antikörper sind nur in einem frühen Infektionsstadium präsent, Parvovirus-IgG-Antikörper hingegen bleiben ein Leben lang erhalten (5). Die Durchseuchungsrate in Deutschland ist sehr hoch und liegt beispielsweise bei Kindern im Alter von 4 bis 6 Jahren bei schon 35 %, bei jungen Erwachsenen (18-25 Jahre) bei 65 % und im Alter (65-75 Jahre) bei 80 % (4).

Labordiagnostische Tests zum Nachweis einer Parvovirus B19-Infektion finden unter anderem im Zuge von Schwangerschaftsuntersuchungen statt, um den Immunstatus der Frauen zu bestimmen. Vor allem Schwangere, die berufsbedingt Kontakt zu Kindern haben oder mit Kindern unter sechs Jahren im Haushalt leben, sollten in einem frühen Schwangerschaftsstadium den Immunstatus bestimmen lassen. Seronegative Schwangere sollten ein striktes Hygienemanagement einhalten, um eine Infektion während einer Schwangerschaft zu vermeiden (mögliche Folgen einer Infektion: Abort, Hydrodrops fetalis).

Die 2014 veröffentlichte S2k-Leitlinie der Gesellschaft für Virologie (GfV) zur Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen (AWMF Registernummer 0093/001; C.II.7 Ringelröteln) (4) empfiehlt für die Bestimmung akuter und/oder kürzlich erfolgter Parvovirus-B19-Infektionen molekularbiologische (z. B. PCR) oder serologische Methoden oder eine Kombination derer. IgM-Antikörper können ca. 10 Tage nach erfolgter Infektion nachgewiesen werden. Nach 30 bis 60 Tagen ist diese Immunglobulinklasse nicht mehr präsent. Der Infektionszeitpunkt kann durch Anwendung von Western bzw. Immunoblots eingegrenzt werden indem gegen lineare und denaturierte Epitope von VP2-Proteinen getestet wird. Weiterhin kann eine Aviditätsbestimmung einen Hinweis auf den Infektionszeitraum geben. Niedrig avide Antikörper weisen auf eine kürzlich erfolgte Infektion hin.

Zur Bestimmung der Immunität wird der Nachweis von Parvovirus-IgG-Antikörpern empfohlen. Ein negativer Parvovirus-IgM-Nachweis bestätigt eine länger zurückliegende Infektion (4).

Als Testmethode stehen z. B. ELISA-Systeme mit rekombinanten VP-1- und VP-2-Polypeptiden verschiedener Hersteller zur Verfügung. Der Infektionsstatus kann anschließend mit einem Line-Immunoassay interpretiert werden. Hier sind unterschiedliche rekombinante Peptidsequenzabschnitte der VP-1- und VP-2-Proteine (VP-C, VP-N, VP-2r – lineares Epitop, VP-2p – Konformationsepitop) sowie das Protein NS-1 enthalten, um den Verlauf einer Infektion durch den Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen die unterschiedlichen Virusproteine zu charakterisieren.

Literatur:

1. Bundesministerium für Gesundheit (2010). Parvovirus B19 - Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, Bundesgesundheitsblatt, Springer Verlag, 53: 944-956.
2. Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B., Widdows, D. (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1(7898):72-73.
3. Anderson, M. J., Jones, S. E., Fisher-Hoch S. P., Lewis, E., Hall, S. M., Bartlett, C. L. R. Cohen, B. J. Mortimer, P. P., Pereira, M. S. (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)?, *Lancet*, 1(8338):1378.
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (2014). Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen – Sk2-Leitlinie, AWMF Registernummer 0093/001, Kapitel C.II.7 Ringelröteln, S.161-173.
5. Schleunig (1996). Parvovirus-B19-Infektionen – Sind es nur harmlose Ringelröteln?, *Deutsches Ärzteblatt*, 93(43): A-2781-284.
6. Modrow, S., Gärtner, B. (2006). Parvovirus-B-19-Infektion in der Schwangerschaft. *Deutsches Ärzteblatt*, 103(43): A-2869-2876.
7. Servey, J. T., Reamy, B. V., Hodge, J. (2007). Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician*, 75(3):373-376.
8. Giorgio, E., de Oronzo, M. A., Iozza, I., di Natale, A., Cianci, S., Garofalo, G., Giacobbe, A. M., Politi, S. (2010). Parvovirus B19 during pregnancy: a review.
9. Staroselsky, A., Klieger-Grossmann, C., Garcia-Bournissen, F., Koren, G. (2009). Exposure to fifth disease in pregnancy. *Can Fam Physician*. 55(12):1195-8.
10. Kaufmann, B., Simpson, A.A., Rossmann, M.G. (2004). The structure of human parvovirus B19. *PNAS*, 101(32):11628-11633
11. Zhi, N., Mills, I. P., Lu J., Wong, S., Filippone, Brown, K. E. (2006). Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11- Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity. *J Virol*, 80(12):5941-5950.

12. Heegaard, E. D.; Rasksen, C. J. & Christensen, J. (2002). Detection of parvovirus B19 NS1-specific antibodies by ELISA and western blotting employing recombinant NS1 protein as antigen. *J Med Virol*, 67(3):375-383.
13. Von Poblitzki, A., Gigler, A., Lang, B., Wolf, H., Modrow, S. (1995). Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J Gen Virol*, 76:519-527.
14. Hemauer A., Gigler A., Searle K., Beckenlehner K., Raab U., Broliden K., Wolf H., Enders G., Modrow S. (2000). Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J Med Virol*, 60(1):48-55.
15. Dembinski J., Eis-Hübinger A.M., Maar J., Schild R., Bartmann P. (2003). Long term follow up of serostatus after maternofetal parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child*, 88:219-221.

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG / SeraSpot® Anti-Parvovirus-5 IgM Test** ist ein **In-vitro-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von Parvovirus B19-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma.**

Testprinzip

Der **SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG / SeraSpot® Anti-Parvovirus-5 IgM Test** ist ein Festphasen-immunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter Parvovirus-Antigene, die in Array-anordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Antikörper gegen Parvovirus-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgM-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbtintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgM-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung **SeramunBlau®** spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern **Seramun SpotSight® plate** oder **Seramun SpotSight® strip** Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software **Seramun SpotSight® scan** quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Parvovirus Antigene

Bezeichnung		Epitopstruktur	Herkunft
NS-1	C-Terminus des Nicht-Kapsidproteins NS-1 (aa 403 - 671)	linear	rekombinant
VP-2p	Kapsidprotein VP2 (aa 1 - 554)	Konformation	rekombinant
VP-2r	Kapsidprotein VP2 (aa 1 - 554)	linear	rekombinant
VP-1S	N-Terminus des Kapsidproteins VP1 (aa 1 - 227)	linear	rekombinant
VP-N	N-Terminus des Kapsidproteins VP1 (aa 1 - 486)	linear	rekombinant
VP-C	C-Terminus des Kapsidproteins VP2 (aa 150 - 554)	linear	rekombinant

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen	
1	WELLS	Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
IgG-Bestimmung: Farbmarkierung dunkellila; IgM-Bestimmung: Farbmarkierung helllila					
2	WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL	Probenverdünnungs- puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
	CONJ HRP IgM	Anti-human IgM- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe
5	SUBSTR TMB	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB	Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fusselfreies Filterpapier
- Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung
- Becherglas und Messzylinder
- Stoppuhr
- Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional)
- Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- Seramun *SpotSight*® plate oder Seramun *SpotSight*® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBU CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBU CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln, mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer **DIL**.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgM** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun *SpotSight*® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun *SpotSight*® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun *SpotSight*® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

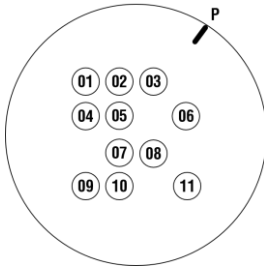
Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout IgG Nachweis

SP-012-6 G



Parameter

04 NS-1
05 VP-2p
06 VP-2r
07 VP-1S
08 VP-C
09 VP-N

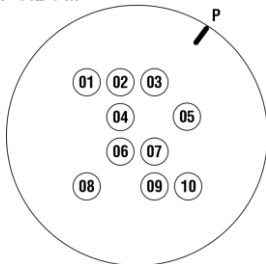
Kontrollen

01 Positivkontrolle (PC)
02 Cut-off Kontrolle (CO)
03 Negativkontrolle (NC)
10 IgG Konjugatkontrolle (GC)
11 Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Arraylayout IgM Nachweis

SP-012-5 M



Parameter

04 VP-2p
05 VP-2r
06 VP-1S
07 VP-C
08 VP-N

Kontrollen

01 Positivkontrolle (PC)
02 Cut-off Kontrolle (CO)
03 Negativkontrolle (NC)
09 IgM Konjugatkontrolle (MC)
10 Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Konjugatkontrolle (GC, MC; IgG-, IgM-Funktionskontrolle). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgM-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befunden hat. Ein Ausbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Bewertung	IgG*	IgM
negativ	kein Antigen-Spot > Cut-off Kontrolle oder VP-1S isoliert > Cut-off Kontrolle	kein Antigen-Spot > Cut-off Kontrolle oder VP-2p isoliert > Cut-off Kontrolle
grenzwertig	VP-N oder VP-2r oder VP-C > Cut-off Kontrolle	VP-N oder VP-1S oder VP-2r oder VP-C > Cut-off Kontrolle
positiv	VP-2p isoliert oder zwei oder mehrere Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle	zwei oder mehrere Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle

* Der Parameter NS-1 wird nicht bewertet. Eine vorhandene NS-1-Reaktivität im IgG-Nachweis spricht für eine zurückliegende Infektion (6 Wochen). Dies trifft aber nur auf etwa 20% der Fälle zu. Im Zusammenhang mit der entsprechenden Symptomatik und klinischen Vorbefunden kann ein NS-1-Titer einen Hinweis auf eine mögliche Persistenz dieses Virus geben (12 - 15). Die Diagnose „persistierende Parvovirus B19-Infektion“ darf aber nie allein aufgrund des serologischen Befunds gestellt werden.

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontaminationen der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Sensitivität und Spezifität

1. Vergleichende Untersuchung serologisch vorcharakterisierter Proben

Serologisch vorcharakterisierte Proben von Patienten mit Verdacht auf eine Parvovirus-Infektion (n = 111 (IgG-Nachweis), n = 91 (IgM-Nachweis) wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM Test untersucht.

IgG	n = 111	Referenztest		
		positiv (n = 62)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 49)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Parvovirus-6 IgG	positiv	60	0	0
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	2	0	49

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Sensitivität: **97 %**

Spezifität: **100 %**

IgM	n = 91	Referenztest		
		positiv (n = 24)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 67)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti- Parvovirus-5 IgM	positiv	23	0	1
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	1	0	66

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Sensitivität: **96 %**

Spezifität: **99 %**

2. Bestimmung der Sensitivität mittels WHO-Standard

Der *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG Test wurde unter Verwendung des WHO International Standard (2nd International Standard for Anti-Parvovirus B19 plasma, human, NIBSC 01/602, 77 IU/ml) vergleichend mit einem Referenztest (IgG-Nachweis) untersucht. Die Verdünnung des WHO-Standards auf 19,25 IU/ml zeigte bei beiden Testen deutlich positive Signale für IgG-Antikörper gegen VP-1S und VP-2p.

3. Untersuchung von Seren von Frauen in der Schwangerschaft

In einem Vergleichs-ELISA vorbefundene IgG-positive (n = 53) und IgG-negative Proben (n = 75), sowie IgM-positive (n = 2) und IgM-negative (n = 100) Proben wurden mit dem *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM Test untersucht. Dabei ergab sich eine Sensitivität von 100 % im IgG- und IgM-Nachweis, sowie eine Spezifität von 99 % im IgG-Nachweis und von 98 % im IgM-Nachweis.

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM Test untersucht und das Verhältnis von Farbintensitäten der Antigenspots zur Cut-off Kontrolle (Ratio) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten (Mittelwert) wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio \bar{x} n = 48	VK [%]	Ratio \bar{x} n = 80	VK [%]	Ratio \bar{x} n = 240	VK [%]
NS-1	1,67	8,00	1,70	7,38	1,71	10,82
VP-2p	1,37	4,45	1,30	7,54	1,31	9,80
VP-2r	1,52	4,88	1,53	8,72	1,54	7,22
VP-1S	1,23	6,31	1,33	8,92	1,29	9,70
VP-C	1,36	6,14	1,37	7,37	1,37	7,11
VP-N	1,53	8,05	1,58	8,68	1,55	8,10
Durchführung	1 Bearbeiter, 48x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 3 Chargen	

IgM-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio \bar{x} n = 48	VK [%]	Ratio \bar{x} n = 80	VK [%]	Ratio \bar{x} n = 240	VK [%]
VP-2p	1,83	6,59	1,67	11,47	1,64	8,93
VP-2r	1,82	7,20	1,88	12,79	1,74	13,53
VP-1S	1,47	8,66	1,59	11,70	1,49	12,89
VP-C	1,43	5,87	1,52	11,85	1,67	14,96
VP-N	1,41	8,08	1,28	11,22	1,20	13,91
Durchführung	1 Bearbeiter, 48x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 20 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit den Mikrotiterplatten-Processor DS2® (Dynex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) abgearbeitet. Aus dem Verhältnis der Farbintensitäten der Antigenspots zur Cut-off Kontrolle (Ratio) wurde der Korrelationskoeffizient r für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dynex DS2® vs. manuelle Abarbeitung	
	r IgG [n = 96]	r IgM [n = 88]
NS-1	0,92	./.
VP-2p	0,98	0,97
VP-2r	0,98	0,97
VP-1S	0,97	0,93
VP-C	0,99	0,98
VP-N	0,96	0,95

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *In-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:







- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**













Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-06-XX	Allgemein	Generelle Überarbeitung

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG / Anti-Parvovirus-5 IgM

- | | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | 
100 µl
30 min

3 x Waschen | Verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 2. | 
50 µl
30 min

3 x Waschen | Konjugat CONJ HRP IgG oder CONJ HRP IgM
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 3. | 
50 µl
30 min

Absaugen | Substratlösung SUBSTR TMB
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| 4. | Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse | Scanner Seramun <i>SpotSight</i> ® plate / Seramun
<i>SpotSight</i> ® strip und Software Seramun
<i>SpotSight</i> ® scan |

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG SeraSpot® Anti-Parvovirus-5 IgM

Spotimmunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to Parvovirus B19
in human serum or plasma

REF SP-012-6 G-S6 ▽ 48 **REF** SP-012-6 G-S12 ▽ 96 **REF** SP-012-6 G-S24 ▽ 2x 96

IVD *In-vitro*-diagnostic device **CE**

REF SP-012-5 M-S6 ▽ 48 **REF** SP-012-5 M-S12 ▽ 96 **REF** SP-012-5 M-S24 ▽ 2x 96

IVD *In-vitro*-diagnostic device **CE**



Seramun Diagnostics GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

In 1975, the human parvovirus B19 was discovered by chance in a blood donor test. The designation B19 is a result of the nomenclature used in this screening: the corresponding sample was the 19th serum in row B (1, 2). In 1983, the virus was detected in patients who had flu-like symptoms or aplastic crises. Since then, the human parvovirus B19 virus has been known to cause ringworm (Erythema infectiosum, also called Quintus disease or Fifth disease) (1, 3). It has now been proven that numerous other conditions may be associated with parvovirus B19 infection. These include arthritis and arthralgia (in 8% of infected children and 80% in adults), chronic anemia (in patients with leukemia and immunosuppressed patients), congenital anemia and rare forms of myocarditis, vasculitis and glomerulonephritis (1).

Parvovirus B19 infection during pregnancy can cause complications in women without immune protection. Fetal deaths or hydrops fetalis (accumulation of fluid in compartments of the fetus) may be the result (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Parvovirus infections in children are 30% asymptomatic (6). Even in healthy adults, infection often has no apparent symptoms (5).

The human parvovirus B19 belongs to the family Parvoviridae. It is the only known human pathogenic parvovirus (10). The virus proliferates primarily in erythroid cells. It is a virus that has no lipid envelope and a diameter of 18 to 26 nm. The virus particles consist of 60 copies of the capsid protein and single-stranded DNA (5,596 nucleotides). The capsid protein is composed of the structural proteins VP-1 and VP-2. Portions of these structural proteins are referred to as VP-C and VP-N. In addition, the viral DNA encodes non-structural proteins. The major non-structural protein is designated NS-1 (1). This plays a role in viral replication and replication (12, 13).

Parvovirus transmission usually takes place via droplet infections, but infection routes via blood or blood products are also possible (1, 5). In the course of an infection, antibodies against the structural proteins VP-1 and VP-2 partly also form against the nonstructural protein NS-1 (11, 12, 13). IgM antibodies are present only at an early stage of infection, while parvovirus IgG antibodies are maintained throughout their lifetime (5). The prevalence rate in Germany is very high and is for example

already 35 % in children aged 4 to 6 years, 65 % in young adults (18-25 years) and 80 % in the elderly (65-75 years) (4).

Laboratory diagnostic tests for the detection of parvovirus B19 infection take place among other things in the course of pregnancy examinations in order to determine the immune status of the women. Especially pregnant women, who are in contact with children due to their job or who live in the household with children under the age of six, should have their immune status determined at an early stage of pregnancy. Seronegative pregnant women should follow strict hygiene management to avoid infection during pregnancy (possible consequences of infection: abortion, hydrodrops fetalis).

The S2k guideline published by the Society for Virology (GVF) for the laboratory diagnosis of pregnancy-related viral infections (AWMF registry number 0093/001; C.II.7 ring rubella) (4) recommends molecular biology methods (PCR) or serological methods or a combination of these for the determination of acute and / or recent parvovirus B19 infections. IgM antibodies can be detected approximately 10 days after infection. After 30 to 60 days, this immunoglobulin class is no longer present. The time of infection can be narrowed down by application of Western or immunoblots by testing antibody reactivity against linear and denatured epitopes of VP2 proteins. Furthermore, an avidity determination can give an indication of the infection period. Low avidity antibodies indicate a recent infection.

To determine immunity, the detection of parvovirus IgG antibodies is recommended. Negative parvovirus IgM detection confirms a recent infection (4).

Several test methods, e.g. ELISA tests, based on the use of recombinant VP-1 and VP-2 polypeptides, are available. The infection status can then be interpreted with a line immunoassay. These use different recombinant polypeptides derived from sequence sections of the viral proteins VP-1 and VP-2 (VP-C, VP-N, VP-2r - linear epitope, VP-2p - conformational epitope), and the protein NS-1 in order to characterize the course of the infection by detecting IgG or IgM antibodies.

Literature:

1. Bundesministerium für Gesundheit (2010). Parvovirus B19 - Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, Bundesgesundheitsblatt, Springer Verlag, 53: 944-956.
2. Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B., Widdows, D. (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*, 1(7898):72-73.
3. Anderson, M. J., Jones, S. E., Fisher-Hoch S. P., Lewis, E., Hall, S. M., Bartlett, C. L. R. Cohen, B. J. Mortimer, P. P., Pereira, M. S. (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)?, *Lancet*, 1(8338):1378.
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (2014). Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen – Sk2-Leitlinie, AWMF Registernummer 0093/001, Kapitel C.II.7 Ringelröteln, S.161-173.
5. Schleunig (1996). Parvovirus-B19-Infektionen – Sind es nur harmlose Ringelröteln?, *Deutsches Ärzteblatt*, 93(43): A-2781-284.
6. Modrow, S., Gärtner, B. (2006). Parvovirus-B-19-Infektion in der Schwangerschaft. *Deutsches Ärzteblatt*, 103(43): A-2869-2876.
7. Servey, J. T., Reamy, B. V., Hodge, J. (2007). Clinical presentations of parvovirus B19 infection. *Am Fam Physician*, 75(3):373-376.
8. Giorgio, E., de Oronzo, M. A., Iozza, I., di Natale, A., Cianci, S., Garofalo, G., Giacobbe, A. M., Politi, S. (2010). Parvovirus B19 during pregnancy: a review.
9. Staroselsky, A., Klieger-Grossmann, C., Garcia-Bournissen, F., Koren, G. (2009). Exposure to fifth disease in pregnancy. *Can Fam Physician*. 55(12):1195-8.
10. Kaufmann, B., Simpson, A.A., Rossmann, M.G. (2004). The structure of human parvovirus B19. *PNAS* 101(32):11628-11633
11. Zhi, N., Mills, I. P., Lu J., Womg, S., Filippone, Brown, K. E. (2006). Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrate essential roles for NS1, VP1, and the 11- Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity. *J Virol*, 80(12):5941-5950.
12. Heegaard, E. D.; Rasksen, C. J. & Christensen, J. (2002). Detection of parvovirus B19 NS1-specific antibodies by ELISA and western blotting employing recombinant NS1 protein as antigen. *J Med Virol*, 67(3):375-383.
13. Von Poblitzki, A., Gigler, A., Lang, B., Wolf, H., Modrow, S. (1995). Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J Gen Virol*, 76:519-527.
14. Hemaier A., Gigler A., Searle K., Beckenlehner K., Raab U., Broliden K., Wolf H., Enders G., Modrow S. (2000). Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J Med Virol*, 60(1):48-55.
15. Dembinski J., Eis-Hübinger A.M., Maar J., Schild R., Bartmann P. (2003). Long term follow up of serostatus after maternofetal parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child*, 88:219-221.

Intended use

The *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM test is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of *Parvovirus*-specific IgG or IgM antibodies in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant Parvovirus B19 proteins as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96well-microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against Parvovirus B19 antigens. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgM-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity correlates to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the anti-human IgG- or IgM-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau[®] spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*[®] scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Parvovirus antigens

Nomenclature		Epitope structure	Origin
NS-1	C-terminus of non-capsid protein NS-1 (aa 403 - 671)	linear	recombinant
VP-2p	capsid protein VP2 (aa 1 - 554)	conformation	recombinant
VP-2r	capsid protein VP2 (aa 1 - 554)	linear	recombinant
VP-1S	N-terminus of capsid protein VP1 (aa 1 - 227)	linear	recombinant
VP-N	N-terminus of capsid protein VP1 (aa 1 - 486)	linear	recombinant
VP-C	C-terminus of capsid protein VP2 (aa 150 - 554)	linear	recombinant

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12- single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
IqG detection: color coding dark purple; IgM detection: color coding light purple					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
	CONJ HRP IgM	Anti-human IgM-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cap	8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cap
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (10 µl sample and 1000 µl sample dilution buffer) with the ready to use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash buffer by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or de-ionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 ° C) and at the specified incubation times.

For the handling of *SeraSpot*[®] tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer **DIL**.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent.
11. Clean bottom of wells with Swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*[®] plate or the Seramun *SpotSight*[®] strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*[®] scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*[®] strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

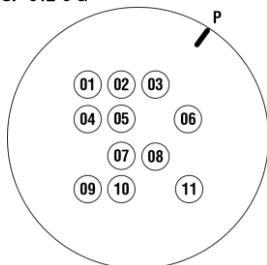
Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark.

Test evaluation

Arraylayout IgG detection

SP-012-6 G



Parameter

04	NS-1
05	VP-2p
06	VP-2r
07	VP-1S
08	VP-C
09	VP-N

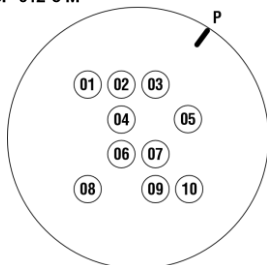
Controls

01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
10	IgG conjugate control (GC)
11	Serum control (SC)

P Well position marker

Arraylayout IgM detection

SP-012-5 M



Parameter

04	VP-2p
05	VP-2r
06	VP-1S
07	VP-C
08	VP-N

Controls

01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
09	IgM conjugate control (MC)
10	Serum control (SC)

P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than Cut-off control
4. IgG, IgM conjugate control (GC, MC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgM antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed according to the following classification:

Result Interpretation	IgG*	IgM
negative	no antigen spot > Cut-off control or VP-1S isolated > Cut-off control	no antigen spot > Cut-off control or VP-2p isolated > Cut-off control
borderline	VP-N or VP-2r or VP-C > Cut-off control	VP-N or VP-1S or VP-2r or VP-C > Cut-off control
positive	VP-2p isolated or two or more antigen spots > Cut-off control	two or more antigen spots > Cut-off control

* The parameter NS-1 is not evaluated. An existing NS-1 reactivity in IgG detection indicates a past infection (6 weeks). However, this only applies to about 20% of the cases. In conjunction with the corresponding symptoms and clinical findings, an NS-1 titer may indicate a possible persistence of this virus (12-15). However, the diagnosis "persistent parvovirus B19 infection" must never be made solely on the basis of the serological findings.

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) and rheumatoid factors (500 IU/ml) do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Sensitivity and specificity

1. Comparative testing of serologically pre-characterized samples

Serologically pre-determined samples of patients with suspect of Parvovirus B19 infection (n = 111 (IgG detection), n = 91 (IgM detection) were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM test.

IgG	n = 111	Reference test		
		positive (n = 62)	borderline (n = 0)	negative (n = 49)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Parvovirus-6 IgG	positive	60	0	0
	borderline	0	0	0
	negative	2	0	49

Borderline samples were valued positive.

Sensitivity: **97 %**

Specificity: **100 %**

IgM	n = 91	Reference test 1		
		positive (n = 24)	borderline (n = 0)	negative (n = 67)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-Parvovirus-5 IgM	positive	23	0	1
	borderline	0	0	0
	negative	1	0	66

Borderline samples were valued positive.

Sensitivity: **96 %**

Specificity: **99 %**

2. Determination of sensitivity by means of the WHO standard

The *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG assay was compared to a reference test (IgG detection) by use of the WHO International Standard (2nd International Standard for Anti-Parvovirus B 19 plasma, human, NIBSC 01/602, 77 IU/ml). The dilution of the WHO standard to 19.25 IU / ml in both tests showed clearly positive signals for IgG antibodies against VP-1s and VP-2p.

3. Examination of sera of women in pregnancy

IgG-positive (n = 53) and IgG-negative samples (n = 75) pre-determined in a comparative ELISA, as well as IgM-positive (n = 2) and IgM-negative (n = 100) samples were tested with the *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM assay. This resulted in a sensitivity of 100% in IgG and IgM detection, as well as a specificity of 99% in IgG detection and 98% in IgM detection.

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-6 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Parvovirus-5 IgM test. Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the cut-off control (Ratio) was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
NS-1	1.67	8.00	1.70	7.38	1.71	10.82
VP-2p	1.37	4.45	1.30	7.54	1.31	9.80
VP-2r	1.52	4.88	1.53	8.72	1.54	7.22
VP-1S	1.23	6.31	1.33	8.92	1.29	9.70
VP-C	1.36	6.14	1.37	7.37	1.37	7.11
VP-N	1.53	8.05	1.58	8.68	1.55	8.10
Procedure	1 operator, 48x determination, 1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days,1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days,3 batches	

IgM detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
VP-2p	1.83	6.59	1.67	11.47	1.64	8.93
VP-2r	1.82	7.20	1.88	12.79	1.74	13.53
VP-1S	1.47	8.66	1.59	11.70	1.49	12.89
VP-C	1.43	5.87	1.52	11.85	1.67	14.96
VP-N	1.41	8.08	1.28	11.22	1.20	13.91
Procedure	1 operator, 48x determination, 1 batch		5 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days,1 batch		5 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days,3 batches	

Automation

Samples of known antibody titer were assayed manually or by use of the microplate processors DS2® (Dynex Technologies; manual sample dilution). Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the cut-off spot (Ratio) was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig-isotype detection	Dynex DS2® vs. manual processing	
	r IgG [n = 96]	r IgM [n = 88]
NS-1	0.92	./.
VP-2p	0.98	0.97
VP-2r	0.98	0.97
VP-1S	0.97	0.93
VP-C	0.99	0.98
VP-N	0.96	0.95

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:


- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**







History of changes


Version	Section	Modifications
2019-06-XX	General	General revision











Incubation scheme **SeraSpot® Anti-Parvovirus-6 IgG / Anti-Parvovirus 5 IgM**

1.  100 µl diluted sample (1 : 101)
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with washing solution, each 400 µl per well
2.  50 µl conjugate **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM**
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with washing solution, each 400 µl per well
3.  50 µl substrate **SUBSTR TMB**
30 min incubation (room temperature, protected from light)

 aspiration
4. imaging of wells and image analysis scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun *SpotSight*® strip and software Seramun *SpotSight*® scan

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun *SpotSight*® are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.