



**NovaLisa™**

# Parvovirus B19

## IgM – ELISA



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Parvovirus B19 in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Parvovirus B19 in Humanserum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination qualitative des anticorps IgM dirigés contre Parvovirus B19 dans le sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Parvovirus B19 nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgM contra Parvovirus B19 en suero o plasma humano

Teste imunoenzimático para a determinação qualitativa de anticorpos da classe IgM contra o Parvovirus B19 em soro humano ou plasma

### Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 11
Français:	Page	12 à 16
Italiano:	da Pagina	17 a 21
Espanol:	Página	22 a 26
Português:	Página	27 a 31

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía/ Bibliografia	Page / Seite / Page / Pagina / Página / Pagina	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Explicação dos símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página / Pagina	35
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica/ Resumo do procedimento do teste	Page / Seite / Page/ Pagina / Página/ Pagina	36

---

Product Number: PARM0370 (96 Determinations)

---

## 1. INTRODUCTION

Parvoviruses are cubic single-stranded DNA viruses of about 18-32 nm lacking an envelope. Parvovirus B19 infects only humans, and since there are no crossreactivities between animal parvoviruses and B19, transmission between pets and humans is not possible. Parvovirus B19 is the causative agent of Erythema infectiosum, the so-called “fifth disease”, a mild rash illness that occurs most commonly in children. Infected persons are contagious during the early part of the illness before the rash appears so in adults the rate of epidemia amounts to about 60%. About 20% of adults and children who are infected with parvovirus B19 do not develop any symptoms. Persons infected with the virus, however, do develop lasting immunity that protects them against infection in the future. Parvovirus B19 infection may cause a serious illness in persons with sickle-cell disease or similar types of chronic anemia as well as in persons who have problems with their immune system (people with leukemia or cancer, who are born with immune deficiencies, who have received an organ transplant, or who have HIV infection). Occasionally (less than 5% of all pregnant women infected with parvovirus B19) serious complications may develop during pregnancy: risk of Morbus haemolyticus fetalis.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
Parvovirus B19	Erythema infectiosum acutum (fifth disease) Complications: Aplastic cirrosis, M. haemolyticus fetalis	“slapped-cheek” rash on the face and a lacy red rash on the trunk and limbs in kids adults may develop joint pain or swelling (hands, wrists, and knees)	Person-to-Person transmission: Virus is spread by direct contact with respiratory secretions (e.g. saliva, sputum, or nasal mucus)

The presence of virus resp. infection may be identified by:

- Serology: Detection of antibodies by ELISA

## 2. INTENDED USE

The **recombinant** NovaTec Parvovirus B19 IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Parvovirus B19 in human serum or plasma (citrate). It offers increased diagnostic specificity and sensitivity by employing the highly purified recombinant antigens.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against Parvovirus B19 is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with Parvovirus B19 antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured Parvovirus B19 specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Parvovirus B19 specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **Parvovirus B19 Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Parvovirus B19 antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent \*\*\*:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Parvovirus B19 anti-IgM conjugate\*\*:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Parvovirus B19 IgM Positive Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Parvovirus B19 IgM Cut-off Control\*\*\*:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Parvovirus B19 IgM Negative Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

\* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

\*\* contains 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!*

### 6.1. Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Parvovirus B19 antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. Parvovirus B19 anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

### 6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or cloud have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date.*

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

## 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

*It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*

5. Dispense 100µl Parvovirus B19 anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*

*Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.*

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

*If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!*

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

*Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.*

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

### 9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

#### 9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example:  $\frac{1.551 \times 10}{0.38} = 41 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off: 10 NTU  
Grey zone: 9-11 NTU  
Negative: <9 NTU  
Positive: >11 NTU

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	21	50.2	3.6
<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	7	1.76	2.4

### 10.2. Diagnostic specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is >95 %.

### 10.3. Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is >95 %.

### 10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

<b>Note:</b> The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. We recommend to confirm positive or grey zone results in another test system (BLOT). In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
----------	---

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
----------	--

### 12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.:                    PARM0370                    Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

Parvovirus B19 ist ein unbehülltes, kubisches Einzelstrang DNA Virus mit einem Durchmesser von 18-25 nm. Das Virus kapsid setzt sich aus den zwei Strukturproteinen VP1 (83 kDa) und VP2 (53 kDa) zusammen. Das Virus ist weltweit verbreitet und ausschließlich humanpathogen. Es besteht keine Kreuzreaktivität mit tierpathogenen Parvoviren. Die Infektion wird in der Regel in der Kindheit aerogen über Tröpfcheninfektion bzw. Speichelkontakt erworben. Im frühen Erwachsenenalter liegt die Durchseuchung etwa bei 50 %

Parvovirus B19 ist der Verursacher des Erythema infectiosum. Es kann schwere aplastische Krisen bei chronischen Anämien auslösen und bei Infektionen in der Schwangerschaft zu Fruchtschäden führen. Das Virus dringt in die Zellen über das P-Antigen ein, welches in hoher Konzentration vor allem auf knochenmarkständigen erythropoiden Vorläuferzellen zu finden ist. Durch Auslösung lytischer Reaktionen mit Zellzerstörung führt es zu einer transienten Anämie. Nach einer Inkubationszeit von 6-16 Tagen treten ohne wesentliche Prodromi charakteristisches ring- und girlandenförmige Exanthem an den Streckseiten der Extremitäten auf, die in Form und Farbe fast täglich wechseln. Arthralgien, Pseudoappendizitis, Enteritis, influenzaartige Symptome und asymptomatische Infektionen sind im Zusammenhang mit Parvovirus B19 Infektionen beschrieben worden. Infektionen während der Schwangerschaft führen in etwa 15 % der Fälle zur Infektion des Feten. Erythroblastolytisch bedingter Sauerstoffmangel führt vor allem im 2. und 3. Trimenon häufig zu Fehlgeburt und Hydrops fetalis.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Infektionsmodus
Parvovirus B19	Erythema infectiosum	keine wesentlichen Prodromi, charakteristisches ring- oder girlandenförmiges Exanthem vor allem an den Streckseiten der Extremitäten Komplikationen: aplastische Krise, Hydrops fetalis	aerogen durch Tröpfchen

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- PCR
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Parvovirus B19 IgM ELISA (rekombinant) ist für den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Parvovirus B19 in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt. Durch die Verwendung hoch gereinigter, rekombinanter Antigene bietet er verbesserte diagnostische Sensitivität und Spezifität.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen das Parvovirus B19 beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit rekombinanten Parvovirus B19 spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgM Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Parvovirus B19 beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Parvovirus B19 Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; enthält anti-human-IgG-Antikörper; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):\*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Parvovirus B19 anti-IgM-Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Parvovirus B19 IgM Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Parvovirus B19 IgM Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Parvovirus B19 IgM Negativkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

\* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

\*\* enthält 0.2 % Bronidox L

\*\*\* enthält 0.1 % Kathon

## 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

## 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!*

### 6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Parvovirus B19 Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

### 6.2. Parvovirus B19 anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht bläulich. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

### 6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*  
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

### 7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschstufen von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

*Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl Parvovirus B19 anti-IgM-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

*Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

## 8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

*Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!*

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

---

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200** und < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

*Beispiel:*  $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

#### 9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

*Beispiel:*  $\frac{1.551 \times 10}{0.38} = 41 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

## 10. TESTMERKMALE

---

### 10.1. Präzision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Vk (%)</b>
Pos. Serum	21	50.2	3.6

<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Vk (%)</b>
Pos. Serum	8	1.76	2.4

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >95 %.

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. . Sie ist >95 %.

## 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Es wird empfohlen positive sowie nicht eindeutige Ergebnisse (Grauzone) mit einem zweiten Testsystem (z.B. BLOT) zu bestätigen. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

**WARNUNG:** Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

**WARNUNG:** Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

### 12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: PARM0370 Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUCTION

Le Parvovirus est un virus ARN monocaténaire cubique d'environ 18-32 nm qui n'a pas d'enveloppe. Parvovirus B19 infecte seulement les humains, et puisqu'il n'y a aucune réaction croisée entre les parvovirus des animaux et le B19, la transmission entre les animaux domestiques et les humains n'est pas possible. Parvovirus B19 est l'agent causatif d'Erythema infectiosum, la prétendue "cinquième maladie", une maladie douce qui se produit surtout chez les enfants. Les personnes infectées sont contagieuses pendant la phase précoce de la maladie avant que l'éruption apparaisse, de sorte que dans les adultes le taux d'épidémie s'élève à environ 60%. Environ 20% des adultes et des enfants qui sont atteints du Parvovirus B19 ne développent aucun symptôme. Cependant, les personnes atteintes du virus développent une immunité durable qui les protège contre l'infection dans l'avenir.

L'infection de Parvovirus B19 peut causer une maladie sérieuse chez les personnes avec une anémie falciforme ou des types semblables d'anémie chronique aussi bien que chez les personnes qui ont des problèmes avec leur système immunitaire (des gens avec la leucémie ou le cancer, des gens qui sont nés avec des insuffisances immunisées, des gens qui ont reçu une greffe d'organe, ou ceux qui ont l'infection à HIV). De temps en temps (moins de 5% de toutes les femmes enceintes infectées avec Parvovirus B19), des complications sérieuses, peuvent se développer pendant la grossesse : risque de Morbus haemolyticus fetalis.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
Parvovirus B19	Erythema infectiosum acutum (la cinquième maladie)  Complications : Crise aplastique, Morbus haemolyticus fetalis.	éruption sur le visage, une éruption rouge sur le tronc et membres chez les enfants, les adultes peuvent développer des douleurs locales ou des gonflements (mains, poignets, et genoux)	Transmission de personne en personne : Le virus est distribué par le contact direct avec des sécrétions respiratoires (par exemple salive, ou mucus nasal)

La présence d'une infection peut être identifiée par :

Sérologie : Détection des anticorps par ELISA

## 2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Parvovirus B19 IgM ELISA de NovaTec est prévue pour la détermination qualitative des anticorps IgM anti-Parvovirus B19 dans le sérum humain ou plasma (citrate).

## 3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgM anti-Parvovirus B19 est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes d'Parvovirus B19 pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué anti-IgM humaines marquées à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés spécifiques de l'Parvovirus B19. Le complexe immun constitué par le conjugué lié est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques de Parvovirus B19 dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

## 4. MATERIEL

### 4.1. Réactifs fournis

- **Puits revêtus d'Parvovirus B19 (IgM) :** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'Parvovirus B19; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgM \*\*\* :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré vert; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution d'arrêt :** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à l'emploi ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (concentrée x 20.) \* :** 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
- **Conjugué IgM anti-Parvovirus B19 \*\* :** 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps de lapin anti-IgM humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur rouge, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
- **Contrôle positif IgM Parvovirus B19 \*\*\* :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.
- **Contrôle seuil (cut-off) IgM Parvovirus B19\*\*\* :** 1 flacon contenant 3 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.

- **Contrôle négatif IgM Parvovirus B19 \*\*\*** : 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.
- \* contient 0,1 % de Bronidox L après dilution
- \*\* contient 0,2 % de Bronidox L
- \*\*\* contient 0,1 % de Kathon

## 4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

## 4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

## 5. STABILITE ET CONSERVATION

---

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C.

## 6. PREPARATION DES REACTIFS

---

*Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer le dosage !*

### 6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de Parvovirus B19 et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

### 6.2. Conjugué IgM anti-Parvovirus B19

Le flacon contient 20 ml d'une solution d'anti-IgM humaines avec de la peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

### 6.3. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Elle contient 0,1% de Kathon et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C*

### 6.4. Diluant pour échantillon IgM

La bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, d'IgG anti-humain, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant vert inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. La solution contient des anticorps IgG anti-humains pour éliminer l'inhibition compétitive des anticorps IgG spécifiques pour ainsi enlever le facteur rhumatoïde. Cette solution prête à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

### 6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20<sup>ème</sup> ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C. *Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

### 6.6. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

## 6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.*

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

---

Utiliser des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

### 7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101<sup>ème</sup> avec le diluant pour échantillon IgM.

Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101<sup>ème</sup> et mélanger soigneusement sur un Vortex.

## 8. PROCEDE DE DOSAGE

---

### 8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

*Il est conseillé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.*

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipeter 100 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**

4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !

*Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.*

5. Pipeter 100µl du conjugué IgM anti-Parvovirus B19 dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.** *Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.*
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.

9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**

10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.

*La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.*

*Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101<sup>ème</sup> avec le tampon et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.*

11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

## 8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

*Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !*

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaire.

## 9. RESULTATS

---

### 9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200** et < **cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

### 9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple :  $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

### 9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorbance est supérieure de 10% à la valeur seuil.

Des échantillons avec une valeur d'absorbance comprise entre +10% et -10% autour de la valeur « seuil » ne peuvent pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est conseillé de refaire le dosage 2 à 4 semaines après, avec un échantillon frais. Si les résultats du deuxième dosage sont encore dans la zone grise, l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorbance est inférieure de 10% à la valeur « seuil ».

#### 9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorbance du patient x 10 = [ unités NovaTec = NovaTec units= NTU ]

« seuil »

Exemple :  $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ NTU}$

« Seuil » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

## 10. PERFORMANCES DU DOSAGE

---

### 10.1. Précision

<u>Inter-essais</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos.	21	50.2	3.6
<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>CV (%)</u>
Sérum pos.	7	1,76	2.4

### 10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

### 10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

## 10.4. Interférences

Des sérums hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,2 mg/ml de bilirubine.

**Attention:** Les résultats concernent des groupes d'échantillons testés ; ces spécifications ne sont pas garanties.

## 11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorbance. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait tenir compte de l'historique clinique, de la symptomatologie ainsi que des données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

## 12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

### 12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

## 13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence : PARM0370 Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 déterminations)

## 1. INTRODUZIONE

Il Parvovirus B19 è senza involucro, cubico, contiene DNA a singola elica con un diametro di 18-25 nm. Il capsido è formato da due proteine strutturali dotate di attività immunogena, denominate VP1 (83kDa) e VP2 (53 kDa). L'infezione da Parvovirus B19 tipica dell'età infantile è molto diffusa, infatti il 60% della popolazione adulta risulta sieropositiva. La via naturale di trasmissione è quella aerea, tuttavia, anche se raramente, il virus può essere trasmesso tramite sangue ed emoderivati. In molti casi si tratta di infezioni acute, asintomatiche o accompagnate da sintomi aspecifici, con scarsa febbre e lieve interessamento delle prime vie respiratorie. Il megaloeritema è la più tipica e comune manifestazione clinica dell'infezione da B19, consistente in un esantema eritemato-maculo-papuloso localizzato alle guance, al tronco e alle estremità. Il periodo dell'incubazione è generalmente compreso tra 4 e 14 giorni anche se talora può prolungarsi fino a 20 giorni. La crisi aplastica transitoria è stata la prima manifestazione clinica associata all'infezione da B19 riscontrata in pazienti con anemia falciforme; la patologia si è verificata a seguito di una brusca comparsa di anemia grave con assenza di reticolociti. Successivamente è stata osservata in tutti i soggetti che presentano una vita eritrocitaria media inferiore alla norma (circa 120 giorni).

Il 15 % circa delle infezioni durante la gravidanza si trasmettono anche al feto e ciò può causare aborto soprattutto nel secondo e terzo trimestre.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
Parvovirus B19	Megaloeritema	spesso asintomatica o sintomi aspecifici; esantema eritemato-maculo-papuloso	Trasmissione: aerea; sangue

### Diagnosi

- PCR
- Sierologia: ELISA

## 2. USO PREVISTO

Il NovaTec Parvovirus B19 IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per Parvovirus B19 nel siero o plasma (citrato) umano.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per Parvovirus B19 si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del Parvovirus B19. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il Parvovirus B19 di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

## 4. MATERIALI

### 4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del Parvovirus B19 (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del Parvovirus B19; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM\*\*\*:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH  $7.2 \pm 0.2$ ; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH  $7.2 \pm 0.2$ ; tappo bianco.
- **Coniugato Parvovirus B19 anti IgM\*\*:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Parvovirus B19 IgM Controllo positivo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Parvovirus B19 IgM Controllo Cut-off\*\*\*:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Parvovirus B19 IgM Controllo negativo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

\* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

\*\* contiene 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1 % Kathon

## 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

## 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

## 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

## 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!*

### 6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del Parvovirus B19. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.2. Coniugato Parvovirus B19 IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.4. Tampone diluente IgM

*Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dai campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

## 7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

*È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.*

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

*Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Parvovirus B19 anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$ ).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

*Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgM. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.*

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

### 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

*È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.*

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e< cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza >**Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38  
Cut-Off = 0.38

### 9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

#### 9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

Esempio:  $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

---

### 10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Siero pos.	21	50.2	3.6

Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Siero pos.	7	1.76	2.4

### 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a >95 %.

### 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >95 %.

### 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed iterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.
--

## 11. LIMITAZIONI

---

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

---

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

**ATTENZIONE:** Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

**ATTENZIONE:** L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto:        PARM0370        Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 determinazioni)

## 1. INTRODUCCIÓN

El parvovirus B 19 es un virus sin envoltura de A.D.N. cadena simple de forma cubica con un diámetro de 18 a 25nm. La cápside del virus esta formada por dos proteínas estructurales, el VP1 (83kDa) y VP2 (53 kDa). El virus es de manifestación mundial afectando sólo a los seres humanos. No existe una reactividad cruzada con los Parvovirus que infectan a los animales. La infección se produce por regla general durante la infancia por contacto con fluido contaminado (por el aire o por la saliva). El índice de infección es de 50% en la edad temprana de los adultos. El Parvovirus es el causante del erytema infeccioso. El virus puede producir graves crisis aplásticas con anemias crónicas y durante el embarazo daños fetales. El virus entra en las células a través del antígeno P lo cual se encuentra sobre todo sobre células precursoras eritroides en la médula ósea. Al provocar la destrucción de estas células resulta una anemia transiente. Tras el período de incubación de 6 a 16 días se presenta una primera fase que dura de 3 a 10 días y cuyos síntomas clínicos son inespecíficos y están relacionados con la viremia. Una segunda fase, que aparece pasados de 7 a 15 días de la primera, se caracteriza por la presencia de una erupción maculo-papular pruriginosa que cambia de color casi diariamente. Se han descrito los siguientes síntomas en infecciones con Parvovirus B19: artralgias, pseudoappendicitis, enteritis, síntomas parecidos a la infección con Influenzavirus e infecciones asintomáticas. Las infecciones durante el embarazo provocan en el 15% de los casos una infección del feto. Una falta de oxígeno por la lisis de los eritroblastos produce sobre todo en el segundo o tercer trimestre una perdida del feto o una hidropesía fetal.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Vía de transmisión
Parvovirus B19	Eritema infeccioso	primera fase con síntomas clínicos inespecíficos, erupción maculo-papular pruriginosa sobre todo en la cara extensora de las extremidades  Complicaciones: crisis aplasiaca, hidropesía fetal.	aérogena, por gotitas de fluido contaminado

Las infecciones pueden ser detectadas por:

- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos específicos a través ELISA

## 2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo de Nova Tec es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra los Parvovirus B19 en suero o plasma (citrato) humano.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimatica cualitativa de anticuerpos específicos contra los Parvovirus B19 se basa en la tecnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos del Parvovirus B19. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmobilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno de Parvovirus B19:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos del Parvovirus B19, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente de muestra IgM:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; contiene IgG anti-humana; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para el uso; tapón blanco.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgM anti-humano (Parvovirus B19)\*\*:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (Parvovirus B19)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgM (Parvovirus B19)\*\*\*:** 1 botella de 3 ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado

- **Control negativo de IgM (Parvovirus B19)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.
- \* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir
- \*\* contiene 0.2% Bronidox L
- \*\*\* contiene 0.1% Catón

#### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

#### 4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

### 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

---

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

### 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

---

*Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!*

#### 6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno del Parvovirus B19 están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

#### 6.2. Conjugado de IgM anti-humano (Parvovirus B19)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.4. Diluyente de muestra IgM

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante verde inerte se utiliza para la dilución de la muestra del paciente. La solución contiene anticuerpos del tipo IgG anti-humanos para eliminar la inhibición competitiva de los anticuerpos de la clase IgG específicos y para retirar el factor reumatoide. Esta solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

#### 6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

## 6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-70...-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. *Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas!*

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

---

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(p. ej. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(p. ej. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(p. ej. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(p. ej. E1)	para el control positivo

*Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.*

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h  $\pm$  5 min a 37°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

*Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!*

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgM (Parvovirus B19) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

*Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

## 8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

---

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200** y < **cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción > **cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = \underline{0,43}$$

### 9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción  $\pm 10\%$  del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

#### 9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-Einheiten = NTU]  
*Cut-Off*

Ejemplo:  $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec unidades)}$

Cut-Off:	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

---

### 10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
Serum pos.	21	50.2	3.6
Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
Serum pos.	7	1.76	2.4

### 10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de > 95%.

### 10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de >95%.

### 10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

*Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones*

## 11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

## 12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron **no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG**. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

**ADVERTENCIA:** Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

**ADVERTENCIA:** El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

## 13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: PARM0370 Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 determinaciones)

## 1. INTRODUÇÃO

Os Parvovírus são vírus sem invólucro de ADN de cadeia simples cúbica de cerca de 18-32 nm de diâmetro. O Parvovírus B19 infecta apenas os humanos, e uma vez que não há nenhuma reacção cruzada entre os parvovírus dos animais e o B19, a transmissão entre os animais domésticos e os humanos não é possível. O Parvovírus B19 é o agente causador da Eritema infeccioso, a também chamada “quinta doença”, uma doença doce que geralmente ocorre em crianças. As pessoas infectadas são contagiosas durante a fase precoce da doença antes do aparecimento da erupção, de modo que a taxa de epidemia nos adultos eleva-se a cerca de 60%. Cerca de 20% dos adultos e crianças infectados com Parvovírus B19 não desenvolvem qualquer sintoma. Contudo, as pessoas infectadas com o vírus desenvolvem uma imunidade duradoura que as protege contra a infecção no futuro.

A infecção com o Parvovírus B19 pode provocar uma doença grave em pessoas com anemias falciformes ou outros tipos similares de anemias crónicas bem como em pessoas com problemas no seu sistema imunitário (pessoas com leucemia ou cancro, que nasceram com deficiências imunitárias, que receberam um transplante de um órgão, ou que tenham infecção de HIV). Ocasionalmente (menos de 5% de todas as mulheres grávidas infectadas com parvovírus B19) podem desenvolver complicações graves durante a gravidez: risco de Morbus haemolyticus fetalis.

Espécies	Doenças	Sintomas	Mecanismo da Infecção
Parvovírus B19	Erythema infectiosum acutum (quinta doença) Complicações: Aplastic crisis, M. haemolyticus fetalis	Erupção na cara, uma erupção vermelha no tronco e membros nas crianças, os adultos podem desenvolver dores locais ou inchaços nas mãos, pulsos e joelhos.	Transmissão de pessoa para pessoa: Vírus é transmitido através das secreções respiratórias (p. ex. saliva ou mucos nasais)

A presença de uma infecção pelo vírus pode ser identificada por:

- Serologia: Detecção de anticorpos por ELISA

## 2. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O **recombinant NovaTec Parvovírus B19 IgM-ELISA** está previsto para a determinação qualitativa de anticorpos classe IgM contra o Parvovírus B19 em soro humano ou plasma (citrato). Oferece um aumento de especificidade e sensibilidade no diagnóstico pelo emprego de antígenos recombinantes altamente purificados.

## 3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação qualitativa imunoenzimática de anticorpos da classe Ig-M contra o Parvovirus B19 é baseada na técnica ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática).

Os poços das tiras da microplaca são revestidos com antígenos de Parvovírus B19 para ligar aos anticorpos correspondentes da amostra. Após a lavagem dos poços para remover todo o material da amostra não ligado, acrescenta-se o conjugado anti-IgM humano marcado com peroxidase de rábano (HRP). Este conjugado liga-se aos anticorpos capturados específicos do Parvovírus B19. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado acrescentando substrato de Tetrametilbenzidina (TMB) que dá um produto de reacção azul. A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos IgG específicos de Parvovírus B19 na amostra. Acrescenta-se ácido sulfúrico para parar a reacção que produz uma cor amarela. Lê-se a absorvância a 450 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA.

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Reagentes fornecidos

- **Poços revestidos com Parvovírus B19 (IgM):** 12 tiras de 8 poços separáveis revestidas com antígenos de Parvovírus B19; em bolsas de alumínio seláveis.
- **Diluinte de amostra IgM \*\*\*:** 1 frasco contendo 100 ml de solução tampão para diluição da amostra; pH 7.2 ± 0.2; cor verde; pronto a ser usado; tampa branca.
- **Solução de paragem:** 1 frasco contendo 15 ml de ácido sulfúrico, 0.2 mol/l; pronto a ser usado; tampa vermelha.
- **Solução de lavagem (20x conc.):\*** 1 frasco contendo 50 ml de um tampão concentrado 20 vezes (pH 7.2 ± 0.2) para lavagem dos poços; tampa branca.
- **Conjugado anti-IgM Parvovírus B19\*\*:** 1 frasco contendo 20 ml de anticorpos de coelho anti-IgM humano conjugados com peroxidase; de cor vermelha, pronto a ser usado; de tampa preta.
- **Solução de substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 ml de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); pronto a ser usado; tampa amarela.
- **Controlo positivo de Parvovírus B19 IgM\*\*\*:** 1 frasco contendo 2 ml; de cor amarela; pronto a ser usado; tampa vermelha.
- **Controlo Cut-off Parvovírus B19 IgM\*\*\*:** 1 frasco contendo 3 ml; de cor amarela; pronto a ser usado; tampa verde.
- **Controlo negativo de Parvovírus B19 IgM\*\*\*:** 1 frasco contendo 2 ml; de cor amarela; pronto a ser usado; tampa azul.

- \* Contém 0.1 % Bronidox L após diluição
- \*\* Contém 0.2 % Bronidox L
- \*\*\* Contém 0.1 % Kathon

## 4.2. Materiais fornecidos

- 1 Suporte de placas
- 1 Folha de cobertura
- 1 Protocolo do Teste
- 1 Plano de distribuição e identificação

## 4.3. Materiais e Equipamentos necessários

- Leitor de microplacas ELISA, equipado para medir a absorvância a 450/620nm
- Incubador a 37°C
- Equipamento manual ou automático de lavagem de poços.
- Pipetas para medir volumes entre 10 e 1000 µl
- Misturador de tubos Vortex
- Água desionizada ou recentemente destilada.
- Tubos descartáveis
- Cronómetro

## 5. ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO

---

Os reagentes são estáveis até à data de validade indicada no rótulo quando armazenados a 2...8 °C.

## 6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

---

*É muito importante que todos os reagentes, amostras e controlos sejam levados à temperatura ambiente (20...25°C) antes de começar o teste!*

### 6.1. Tiras revestidas separáveis

As tiras separáveis são revestidas com o antigénio Parvovírus B19 e estão prontas a serem utilizadas. Armazenar a 2...8°C. Após a retirada das tiras necessárias, fechar imediatamente as restantes no saco de alumínio com o desumidificante fornecido e armazenar a 2...8 °C; são estáveis até à data de validade.

### 6.2. Conjugado Parvovírus B19 anti-IgM

O frasco contém 20 ml de uma solução de anti-IgM humano com peroxidase de rábano, tampão, estabilizantes conservantes e um corante inerte vermelho. A solução está pronta a ser utilizada. Armazenar a 2...8°C. Após a primeira utilização, a solução é estável até à data de validade se for armazenada a 2...8°C.

### 6.3. Controlos

Os frascos com Controlo positivo, Cut-off e Controlo negativo contem uma solução pronta a ser utilizada. Contém 0.1% Kathon e devem ser armazenados a 2...8°C. Após a primeira utilização são estáveis até à data de validade se armazenados a 2...8°C.

### 6.4. Diluente para amostra IgM

O frasco contém 100 ml de tampão fosfato, IgG anti-humano, estabilizadores, conservantes e um corante inerte verde. É utilizado para a diluição da amostra do doente. A solução contém anticorpos IgG anti-humanos para eliminar a inibição competitiva dos anticorpos IgG específicos para assim remover o factor reumatóide. Esta solução pronta a ser utilizada deve ser armazenada a 2...8°C. Após a primeira utilização é estável até à data de validade se for armazenada a 2...8°C.

### 6.5. Solução de lavagem (conc. x20)

O frasco contém 50 ml de um tampão concentrado, detergentes e conservantes. Diluir a solução 1+19; p. ex. 10 ml de solução de lavagem + 190 ml de água bidestilada recente e livre de germes. O tampão diluído é estável durante 5 dias à temperatura ambiente. Os cristais na solução desaparecem aquecendo a 37 °C em banho-maria. Após a primeira utilização o concentrado é estável até à data de validade.

### 6.6. Solução de substrato TMB

O frasco contém 15 ml de uma mistura de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogénio. O reagente está pronto a ser utilizado e deve ser armazenado a 2...8°C, longe da luz. A solução deve ser incolor ou ter uma leve coloração azulada. Se o substrato ficar azul, pode ter sido contaminado e deve ser substituído. Após a primeira utilização é estável até à data de validade se armazenado entre 2...8°C.

### 6.7. Solução de paragem

O frasco contém 15 ml de solução de ácido sulfúrico 0.2 M (R 36/38, S 26). Esta solução está pronta a ser utilizada e deve ser armazenada a 2...8°C. Após a primeira utilização é estável até à data de validade.

## 7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

---

Utilizar amostras de soro humano ou plasma (citrato) para este ensaio. Se o ensaio for realizado nos 5 dias após a colheita, a amostra deve ser conservada a 2...8°C; de outro modo deve ser dividida em partes iguais e armazenada congelada (-20 a -70°C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de serem utilizadas no ensaio. *Evitar congelações e descongelações repetidas.*

Inactivação a quente das amostras não é recomendado.

### 7.1. Diluição da amostra

Antes do ensaio, todas as amostras devem ser diluídas 1+100 com o diluente para amostra IgM. Diluir 10µl da amostra com 1ml de diluente de amostra IgM em tubos para obter uma diluição de 1+100 e misturar cuidadosamente com um Vortex.

## 8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

---

### 8.1. Preparação do teste

Ler cuidadosamente o protocolo do teste **antes** de realizar o ensaio. A fiabilidade dos resultados depende do seguimento rigoroso do protocolo do teste. Se realizar o teste em sistemas automáticos ELISA recomendamos o aumento do número de etapas de lavagem de três para cinco e o aumento do volume de solução de lavagem de 300µl para 350µl. Antes de começar o doseamento, a distribuição e identificação das amostras e controlos deve ser cuidadosamente estabelecida no plano de resultados fornecido com o kit. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e colocá-los no suporte. Reservar pelo menos:

1 poço	(p. ex. A1)	para o branco do substrato,
1 poço	(p. ex. B1)	para o controlo negativo,
2 poços	(p. ex. C1+D1)	para o controlo cut-off e
1 poço	(p. ex. E1)	para o controlo positivo.

*Recomenda-se determinar os controlos e amostras dos doentes em duplicado, para o caso de ser necessário.*

Realizar todas as etapas do ensaio na ordem determinada e sem grandes atrasos entre as etapas.

Utilizar pontas de pipetas limpas e descartáveis para cada controlo e amostra.

Ajustar a incubadora a 37° ± 1°C.

1. Pipetar 100µl controlos e amostras diluídas para os respectivos poços. Reservar o poço A1 para o branco do substrato.
2. Cobrir os poços com a folha fornecida com o kit.
3. **Incubar durante 1 hora ± 5 min a 37±1°C.**
4. Quando a incubação estiver terminada, remover a folha, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada um deles três vezes com 300µl de Solução de Lavagem. Evitar o transbordar dos poços de reacção. O tempo entre cada ciclo de lavagem deve ser de pelo menos 5 segundos. No final remover cuidadosamente o fluido remanescente batendo as tiras contra para papel de tecido antes da próxima etapa!  
*Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente conduz a uma precisão fraca e a valores de absorvância falsamente elevados.*
5. Pipetar 100µl de Conjugado Parvovírus B19 anti-IgM para todos os poços excepto o poço em branco (p.e. A1). Cobrir com a folha.
6. **Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Não expor directamente à luz solar.**
7. Repetir o passo 4.
8. Pipetar 100µl de Solução de Substrato TMB para os poços.
9. **Incubar durante exactamente 15 minutos à temperatura ambiente no escuro.**
10. Pipetar 100µl Solução Paragem para os poços na mesma ordem e na mesma rapidez que para a Solução de Substrato TMB.  
*Qualquer cor azul desenvolvida durante a incubação transforma-se em amarelo.*  
*Nota: Amostras de doentes altamente positivas podem provocar precipitados escuros do cromogénio! Estes precipitados podem influenciar os valores medidos da densidade óptica. Recomenda-se a diluição prévia da amostra com solução de cloreto de sódio fisiológico por exemplo 1+1. Diluir então a amostra 1+100 com o tampão e multiplicar o resultado em NTU por 2.*
11. Medir a absorvância da amostra a 450/620nm dentro dos 30 minutos após a adição da Solução de Paragem.

### 8.2. Medição

Ajustar o Leitor de Microplacas ELISA a zero utilizando o **branco do substrato no poço A1**.

*Se – por razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero utilizando o substrato em branco do poço A, subtrair o valor da absorvância do poço A1 a todos os outros valores de absorvância medidos de modo a obter resultados fidedéveis!*

**Medir a absorvância** de todos os poços a **450 nm** e registar os valores de absorvância para cada controlo e amostra de doente no plano de distribuição e identificação.

*Recomenda-se uma leitura em duplo comprimento de onda utilizando 620 nm como comprimento de onda de referência.*

Calcular os **valores médios de absorvância** para todos os duplicados, se necessário.

## 9. RESULTADOS

---

### 9.1. Critérios de Validação

Para que um ensaio seja considerado válido, tem que cumprir os seguintes critérios:

- **Branco do Substrato** em A1: Valor de absorvância **menor do que 0.100.**
- **Controlo negativo** em B1: Valor de absorvância **menor do que 0.200 e menor cut-off.**
- **Controlo de Cut-off** em C1 e D1: Valor de absorvância **entre 0.150 e 1.300.**
- **Controlo positivo** em E1: Valor de absorvância **maior do que o valor de cut-off.**

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e tem que ser repetido.

### 9.2. Cálculo dos Resultados

O valor cut-off corresponde à média dos valores de absorvância do controlo Cut-off.

Exemplo: Valor de Absorvância do controlo Cut-off 0.39 + valor de absorvância do controlo Cut-off 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

### 9.3. Interpretação dos Resultados

As amostras são consideradas **POSITIVAS** se o valor da absorvância for maior do que 10% do cut-off.

As amostras com um valor de absorvância entre 10% acima e 10% abaixo do cut-off não devem ser consideradas como claramente positivas ou negativas.

→ **zona cinzenta**

Recomenda-se repetir o teste de novo 2-4 semanas mais tarde com uma amostra fresca. Se o resultado do segundo teste estiver novamente na zona cinzenta a amostra deve ser considerada **NEGATIVA**.

As amostras são consideradas **NEGATIVAS** se o valor da absorvância for inferior a 10% do valor cut-off.

#### 9.3.1. Resultados em Unidades NovaTec

$$\frac{\text{Valor (médio) da absorvância do doente}}{\text{cut-off}} \times 10 = [\text{Unidades-NovaTec} = \text{NTU}]$$

Exemplo: 
$$\frac{1.551 \times 10}{0.38} = 41 \text{ NTU (Unidades NovaTec)}$$

Cut-off:	10	NTU
Zona cinzenta:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

## 10. CARACTERISTICAS DE DESEMPENHO ESPECIFICAS

---

### 10.1. Precisão

Inter-ensaios	n	Média	Cv (%)
Soro Pos.	21	50.2	3.6

Intra-ensaios	n	Média	Cv (%)
Soro Pos.	7	1.76	2.4

### 10.2. Especificidade do Diagnóstico

A especificidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de obter um resultado negativo na ausência do analito específico. É superior a 95 %.

### 10.3. Sensibilidade do Diagnóstico

A sensibilidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de obter um resultado positivo na presença de um analito específico. É superior a 95 %.

### 10.4. Interferências

Interferências com soros hemolíticos, lipémicos ou ictericos não foram observadas para concentrações até 10 mg/ml de hemoglobina, 5 mg/ml de triglicérides e 0.2 mg/ml de bilirrubina.

<b>Nota:</b> Os resultados referem-se a grupos de amostras investigadas; estas especificações não são garantidas
--

## 11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

---

Contaminação bacteriológica ou ciclos repetidos de congelação – a descongelação da amostra podem afectar os valores de absorvância. O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base no resultado de um só teste. Um diagnóstico preciso deve levar em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Recomendamos que os resultados positivos ou na zona cinzenta sejam confirmados com outro sistema de teste (BLOT). Os dados serológicos são de valor limitado no caso de doentes imunocomprometidos e em recém-nascidos.

## 12. PRECAUÇÕES E AVISOS

---

- De acordo com o artigo 1 parágrafo 2b da Directiva Europeia 98/79/EC, a utilização de dispositivos médicos de diagnóstico in-vitro é destinada pelos fabricantes para assegurar adequabilidade, performance e segurança do produto. Assim o procedimento do teste, a informação, as precauções e avisos das instruções para utilização têm de ser rigorosamente seguidas. A utilização de kits de teste com analisadores e equipamentos similares tem de ser validada. Não está autorizada qualquer alteração no conceito, composição e procedimento do teste bem como a utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante; o utilizador é o único responsável por tais alterações. O fabricante não é responsável por falsos resultados e incidentes devidos a estas razões. O fabricante não é responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos doentes.
- Unicamente para diagnóstico in-vitro.
- Todos os componentes de origem humana utilizados na produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e considerados não reactivos. Contudo, todos os materiais devem ser considerados e manipulados como potencialmente infecciosos.
- Não misturar reagentes ou tiras de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes quando estiver a utilizar reagentes deste kit.
- Não utilizar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Utilizar apenas pontas de pipetas, distribuidores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar bem os frascos dos reagentes logo após a sua utilização para evitar perdas por evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira utilização e subsequente armazenagem verificar possíveis contaminações nos frascos de conjugado e controlos antes de os voltar a utilizar.
- Para evitar contaminação cruzada e resultados falsamente elevados, introduzir as amostras de doentes e o conjugado exactamente no fundo dos poços e sem salpicar.
- O NovaLisa™ ELISA é unicamente destinado a ser utilizado por pessoal qualificado, familiarizado com as boas práticas laboratoriais.

AVISO:	Na concentração utilizada o Bronidox L não constitui qualquer risco toxicológico em caso de contacto com a pele e membranas mucosas!
AVISO:	O ácido sulfúrico irrita os olhos e a pele. Conservá-lo longe do alcance das crianças. Em caso de contacto com os olhos, lavar abundantemente com água e consultar um médico!

### 12.1. Considerações sobre a eliminação dos resíduos

Os resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulada por leis e regulamentos nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de resíduos para obter informações para a eliminação destes resíduos.

## 13. INFORMAÇÃO PARA ENCOMENDAR

---

Prod. No.:                    PARM0370                    Parvovirus B19 IgM-ELISA (96 Determinações)





## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**



















Andreas von Pöbltzki, Andreas Gigler, Bernhard Lang, Hans Wolf and Susanne Modrow: Antibodies to Parvovirus B 19 NS-1 protein in infected individuals. *J. Gen. Virology* 1995, 76, 519-527

Maria Söderlund, Caroline S. Brown, Willy J. M. Spaan, Lea Hedman and Klaus Hedman, Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases* 1995, 72, 1431-1436

Tino F. Schwarz and Gundula Jäger: A recombinant immunoblot and Elisa for detection of acute Parvovirus B 19 infection *Zbl. Bakt.* 1994, 280, 526-533

P. Cassinotti, Human Parvovirus B19 infections and their diagnosis *Alpe Adria Microbiology Journal* 1995, 4, 235-246

M. Schleuning, Parvovirus B19 Infektionen *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 43, (Oktober 1996), B2182-B2185

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro/ Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote/ Número do Lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento/ Temperatura de Armazenamento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE/ Marca CE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo/ Referência de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso/ Consultar as Instruções de Utilização
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado/ Conjugado
	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo/ Soro de controle positivo
	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off/ Soro de controle cut-off
	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM/ Solução de tampão IgM para amostras
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada/ Solução de bloqueio
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB/ Solução substrato TMB
	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20/ Solução de lavagem concentrado 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests/ Conteúdo suficiente para "n" testes

# SCHEME OF THE ASSAY

Parvovirus B19 IgM-ELISA

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 30 min at room temperature</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

### Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6  
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: [www.NovaTec-ID.com](http://www.NovaTec-ID.com)

PARM0370engl,dt,fr,it,es,port31082010-CR