



**Parvovirus B19
Immunofluorescent Assay**

An immunofluorescence assay for the detection of anti-Parvovirus B19 IgG and IgM antibodies.

Table of Contents

Intended Use	3	Specimen and Reagent Preparation	9
Introduction	3	Assay Procedure	10
Assay Principle	5	Interpretation of Results	11
Kit Components	5	Limitations of Use	13
Materials Provided	5	Performance Characteristics	14
Additional Materials Required	6	Summary of Parvovirus IFA Procedure	22
Precautions	7	Interpretation of symbols	22
Safety	7	Bibliography	165
Procedural	8		
Storage and Stability	9		
Specimen Collection and Storage	9		

Intended Use

The Parvovirus B19 Immunofluorescent Assay is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of anti-Parvovirus B19 IgG and IgM antibodies in human serum. The test is indicated for use in all women where there is a suspicion of exposure to Parvovirus B19 to determine the presence of a recent or current infection.

Introduction

Parvovirus B19 was first identified as a human pathogen in 1975 and has subsequently been shown to be the causative agent of a number of clinical conditions such as rash, arthralgia and foetal damage.^{1,2,3} Parvovirus B19 infection in adults, especially women, may cause acute arthritis which can persist for some time.⁴ Infection can lead to life threatening anaemia in immunocompromised patients and individuals with underlying haemolytic disorders such as sickle cell disease.^{5,6} The virus is an icosahedral, non-enveloped virus of 18 – 25nm

diameter and comprises a linear single stranded DNA genome (5.5kb) which is encapsulated within an outer capsid.^{7,8} The viral capsid is composed of two structural proteins, namely VP1 (83kDA) and VP2 (53kDA). Parvovirus B19 infection is normally acquired by direct contact with respiratory secretions and normally occurs in localised outbreaks during the winter and spring months.⁸

It is now accepted that seronegative women are susceptible to Parvovirus B19 infection.^{9,10} The majority of pregnancies during which Parvovirus B19 infection occurs result in delivery of a healthy foetus at term.^{10,11,12} However, infection during pregnancy presents the risk of transmission to the foetus which may result in hydrops foetalis or intrauterine death. Estimates in the literature, for the rate of foetal death following maternal infection range between 1 and 9%.^{10,13,14} It has been suggested that because Parvovirus B19 replicates predominantly in red blood cell precursors, infection during pregnancy can lead to foetal death due to severe foetal anaemia. It is thought that this

severe anaemia, whereby haemoglobin levels fall to less than 2g/dl, is the primary cause of foetal hydrops.^{15,16}

The symptoms associated with Parvovirus B19 infection only become apparent after the viraemic (contagious) stage has terminated¹⁰. Furthermore, it is known that there is an increased risk of transmission in situations where close contact between individuals is likely, such as schools, day care centres and hospitals. Centres for Disease Control (CDC) do not recommend that persons exhibiting signs of Parvoviral infection (e.g. erythema infectiosum) be excluded from such environments. It is, however, recommended that all relevant individuals are made aware of the possibility of disease transmission.¹⁰

Consequently, it is important to identify the Parvovirus B19 antibody status in individuals who may be at risk of infection from, or who have been infected with, Parvovirus B19.

Serological assays are the mainstay of B19 diagnosis and Biotrin International offers a unique portfolio of Parvovirus B19 assays suitable for routine laboratory diagnosis.

- Parvovirus B19 IgG and IgM IFA
Catalogue No. V119IF
- Parvovirus B19 IgM EIA
Catalogue No. V619IM
- Parvovirus B19 IgM EIA (Automate)
Catalogue No. V619IMAUT
- Parvovirus B19 IgG EIA
Catalogue No. V519IG
- Parvovirus B19 IgG EIA (Automate)
Catalogue No. V519IGAUT

Assay Principle

The Biotrin Parvovirus B19 Immunofluorescent Assay utilises the indirect immunofluorescence antibody technique first described by Coons et al.¹⁷ Patient serum is incubated with Parvovirus B19 recombinant VP1 antigen in insect cells stabilised on a glass slide.^{18,19} If anti-Parvovirus B19 antibodies are present in the sample, a stable complex is formed with the antigen. Bound antibody is then reacted with a fluorescently-labelled anti-human IgG or IgM antibody and this three-part complex is visualised with the aid of a fluorescence microscope. To prevent interference from rheumatoid factors (Rf) and to reduce IgG competition in the IgM test, samples should be pre-treated with a suitable adsorbent reagent.

Kit Components

Materials Provided

1. Slides – 6 x10 well slides

SLIDE

On which recombinant Parvovirus B19 antigen expressed in insect cells has been stabilised. Foil pouch.

2. IgM Positive Control**

CONTROL + IgM

1 x 250µl positive sera containing specific anti-Parvovirus B19 antibodies. Contains thiomersal (0.01%). Green Cap.

3. IgG Positive Control**

CONTROL + IgG

1 x 250µl positive sera containing specific anti-Parvovirus B19 antibodies. Contains thiomersal (0.01%). Blue cap

4. Negative Control**

CONTROL -

1 x 250µl negative control sera containing no detectable anti-Parvovirus B19 antibodies. Contains thiomersal (0.01%).

Red cap

5. Fluorescent anti-IgM Conjugate

CONJ IgM

1 x 2ml Rabbit anti-human IgM antibody conjugated to fluorescent isothiocyanate (FITC). Contains Evans Blue counterstain and thiomersal (0.01%).

Purple cap

6. Fluorescent anti-IgG Conjugate

CONJ IgG

1 x 2ml Rabbit anti-human IgG antibody conjugated to fluorescent isothiocyanate (FITC). Contains Evans Blue counterstain and thiomersal (0.01%).

Yellow cap.

7. Wash Buffer Concentrate

BUF WASH 25X

1 x 45ml of concentrated (25x) Tris buffered saline with Tween 20 (0.25%) and thiomersal (0.01%).

Clear cap

8. Mounting Media

MM

1 x 2ml Tris – glycerol buffer. Contains thiomersal (0.001%).

Orange cap

9. Product Insert

INS

Instructions for use.

** Potentially Biohazardous Material

Additional Materials Required

- High quality distilled or deionised water.
- Accurate pipettes, micropipettes and

disposable tips to deliver 5µl to 50µl, 50µl to 200µl.

- Serum collection equipment
- Timer
- Clean volumetric laboratory glassware.
- A suitable Rf and IgG adsorbent reagent with a minimum IgG binding capacity of 18mg/ml.
- 1L beaker
- Dilution tubes and minifuge tubes (0.5ml).
- Benchtop minifuge.
- Incubation tray containing moistened tissue paper.
- Wash bottles and wash tray.
- 37°C incubator.
- No. 1 coverslips (22 x 50mm).
- Fluorescence microscope with appropriate filter combination for FITC (excitation filter 495nm, barrier filter 515nm), a halogen light source is recommended.
- Wax pencil
- Fan

Precautions

Safety

- For *in vitro* use only.
- The kit is intended for use by qualified laboratory staff only.
- All reagents derived from human origin are considered POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIAL. The Positive and Negative Control sera were tested by FDA-cleared methods for HBsAg and antibodies to HIV 1/2 and HCV and found to be negative. However, since no test can provide complete assurance of the absence of virus, treat all controls as potentially infectious.
- Some reagents contain thiomersal which may be toxic if ingested.
- Avoid contact with Evans Blue (in FITC IgM and IgG conjugates) as it is a potential carcinogen. If skin contact occurs, flush with large volumes of water.

- Dispose of all clinical specimens, infected or potentially infected material in accordance with good laboratory practice. All such materials should be handled and disposed of as though potentially infectious.
- Residues of chemicals, preparations and kit components are generally considered as hazardous waste. All such materials should be handled and disposed of as though potentially infectious.
- Wear protective clothing, disposable latex gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- Do not pipette materials by the mouth and never eat or drink at the laboratory workbench.

Procedural

- Do not use kit or individual reagents past their expiry date.

- Do not mix or substitute reagents from different kit lot numbers.
- Deviation from the protocol provided may cause erroneous results.
- Allow all reagents to come to room temperature (20 – 25°C) and mix well prior to use.
- Avoid leaving reagents in direct sunlight and/or outside 2-8°C for extended periods.
- When staining multiple samples on a slide avoid cross contamination between samples by marking between wells with a wax pencil.
- Application of excess mounting media may cause blurred fluorescence.
- Always use clean, preferably disposable, glassware for all reagent preparation.
- Care must be taken not to contaminate components and always use fresh pipette tips for each sample and component.

- Do not scratch the well with the pipette tip or dropper.
- Before commencing the assay an identification and distribution plan should be established.

Storage and Stability

- The kit is stable until the expiry date indicated on the outer box label provided it is stored between 2 – 8°C.
- Diluted Wash Buffer is stable for 6 months when stored at 2 – 8°C. Discard immediately if microbial contamination occurs.
- All unused components should be returned to 2-8°C storage immediately after use.

Specimen Collection and Storage

Serum samples should be obtained using aseptic laboratory techniques. These samples can be stored for up to 24 hours at 2-8°C and at –20°C or lower for longer periods. Fresh or fresh-frozen serum samples may be used, however, care should be taken to avoid repeated freeze-thawing.

Specimen and Reagent Preparation

Reagent Preparation

The Wash Buffer is supplied as liquid concentrate (25x). Prepare Wash Buffer for use by diluting 40ml of Wash Buffer Concentrate in 960ml of distilled water. Store in a clean closed container at 2-8°C for up to 6 months.

All remaining reagents are supplied ready to use and are at working dilution.

Specimen Preparation and Adsorption

- Qualitative Test:

For an IgG test dilute the patient serum sample 1:64 in Wash Buffer.

For IgM tests, samples should be adsorbed with suitable adsorbent for IgG and Rheumatoid factor (with a minimum binding capacity of 18 mg/ml). A final serum dilution of 1:16 should be prepared before use.

- Semi Quantitative Test:

For IgG tests, the sample 'titre' can be determined by serially diluting the patient sample 1:64, 1:256, 1:1024 in wash buffer or until a '+ 1' grade of fluorescence is achieved (see "Interpretation of Results").

For IgM tests, the sample 'titre' can be determined by serially diluting the 1:16 adsorbed patient sample to 1:64, 1:256 in Wash

Buffer or until a '+1' grade of fluorescence is achieved (see "Interpretation of Results").

Note: The 'titre' of the sample is the dilution used to achieve a '+1' grade of fluorescence

Note: Diluted samples should not be stored. If a repeat test is needed a fresh preparation should be used.

Assay Procedure

1. Allow all components to equilibrate to room temperature (20-25°C) before use.
2. Remove the desired number of slides from their sachets.
3. Mark between wells with a wax pencil to avoid cross contamination.

4. Dispense 20µl of each diluted sample and 20µl of the ready to use positive and negative controls onto numbered wells.

5. Incubate slides in an incubation tray for 3 hours at 35-39°C and 100% humidity.

6. Rinse slides briefly along the edge with Wash Buffer using a wash bottle. Place slides in a wash tray containing Wash Buffer (20ml/slide) for 10 minutes at room temperature (20-25°C). Rinse with Wash Buffer from wash bottle and fan dry slides.

7. For an IgM test dispense one drop (40µl) of anti-IgM FITC conjugate to each well. For an IgG test dispense one drop (40µl) of anti-IgG FITC conjugate to each well.

8. Incubate slides in the incubation tray in the dark for 30 minutes at 35-39°C and 100% humidity.

9. Repeat the washing procedure described in step 6 above.

10. Add one small drop of mounting media to the centre of each well and apply a coverslip.

11. Examine under a fluorescence microscope using 400 x magnification.

Interpretation of results

Negative: A sample is considered to be negative for Parvovirus B19 IgM and IgG antibodies if there are no visible fluorescence of the VP1 aggregates ('Bunch of Grapes' morphology).

Positive: A sample can be considered positive for Parvovirus B19 IgM and IgG antibodies if a positive fluorescent result is obtained at a dilution of $\geq 1:16$ and $\geq 1:64$, respectively. Positive fluorescence is indicated by staining of the distinct VP1 protein aggregates ('Bunch of Grapes' morphology) and can be graded as follows:

+4 = Brilliant green fluorescence indicating very high titre Parvovirus B19 antibody response.

+3 = Bright green fluorescence indicating high titre Parvovirus B19 antibody response.

+2 = Green fluorescence indicating medium titre Parvovirus B19 antibody response.

+1 = Dull green fluorescence indicating weak titre Parvovirus B19 antibody response. This also indicates the end point dilution or 'titre' of the sample.

+/- = Faint green fluorescence indicating possible Parvovirus B19 antibody response – confirm using available clinical information and other detection methods.

Cells which do not contain VP1 protein are included in each well to allow comparison of positive and negative cells. These stain blood red with Evans Blue counterstain.

Aspecific: Some individuals may exhibit an aspecific IgM reaction which is shown by a weak

fluorescence with a poorly defined staining pattern at a 1:16 serum dilution. This result should be verified by an alternative method (e.g. EIA, Immunoblot).

Quality Control Criteria

The Calibrator (Positive Control) and Negative Control must always be included to determine the validity of test results. Results of an assay are considered valid if the following criteria are met.

1. The IgG and/or IgM Positive Control yields a fluorescence greater than or equal to +2.
2. The Negative Control yields no visible fluorescence of the VP1 aggregates ('Bunch of Grapes' morphology)

If the above criteria are not met the assay is considered invalid and must be repeated.

Limitations of Use

- Results must be correlated with the patient's clinical and epidemiological profile and other clinical laboratory results in making the diagnosis of Parvovirus B19 infection.
- A negative result does not exclude the possibility of Parvovirus B19 infection. The development of a detectable antibody response may occur some days after infection. In the case of suspected Parvovirus B19 infection a negative result should be followed up with a repeat test two weeks later.
- Test performance may be affected by deviation from the procedure, interpretation or recommended precautions.
- Test results of specimens from immunocompromised patients may be difficult to interpret.

Performance Characteristics

Clinical Evaluation

The following results were obtained when sera from patients with symptoms of recent B19 infection (seroconversion panels) were tested using the Biotrin IgM IFA and a RIA method.¹⁷

Table 1 Clinical evaluation results

Days after onset	Biotrin IgM IFA		IgM RIA	
	No. of IgM Positives	%IgM Positive	No. of IgM Positives	%IgM Positive
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

NT = Not Tested.

Seroprevalence

A total of 201 samples from randomly selected healthy blood donors were tested using the Biotrin Parvovirus B19 Immunofluorescent Assay for Parvovirus B19 IgG and IgM antibodies (IgG=201, IgM=200). 138 serum samples were IgG positive, representing 68.7% of samples screened, while only 2 samples (1%) were IgM positive. These findings are in agreement with seroprevalence studies reported in the literature.^{20, 21}

Sensitivity and Specificity

STUDY 1

The Centres for Disease Control and Prevention (CDC), maintain a panel of Parvovirus B19 sera which serves as an internal control and reference for their testing program for Parvovirus B19. The samples were characterised by clinical symptoms associated with a Parvovirus B19 infection. The majority of these patients were women with

household exposures to symptomatic children, or teachers at elementary schools with outbreaks of erythema infectiosum. This panel has also been tested using the CDC Parvovirus B19 native virus EIA²², Biotrin's Parvovirus B19 IgG EIA and Biotrin's Parvovirus B19 IgM EIA. A selection of sera from the well characterised CDC panel (n=30) were tested using the Biotrin Parvovirus B19 IgG and IgM IFA. A comparison of the results from the different methods is provided in Tables 2 & 3.

Table 2 Comparison of Biotrin IgG & IgM IFA with CDC native virus assay.

		CDC native virus assay*							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG & IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

Only 27 of the 30 samples were tested on the CDC native virus assay.

Table 3 Comparison of Biotrin IgG & IgM IFA with Biotrin Parvovirus B19 IgG & IgM EIA assays.

		Biotrin's Parvovirus B19 EIA							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG & IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positive

Neg = negative

Equiv = equivocal

Sensitivity = True Positives divided by (True Positives + False Negatives + Equivocals) x 100

% Sensitivity = 100%

Specificity = True Negatives divided by (True Negatives + False Positives + Equivocals) x 100

% Specificity = 100%

STUDY 2

76 samples were evaluated for the presence of IgG & IgM antibodies using 4 separate screening methods – Hillcrest Biologicals Parvovirus IgG & IgM EIA assay (EIA), Microbiology Reference Lab Western Blot assay (WB), VRL Colindale RIA assay (RIA) and Biotrin IFA assay (IFA). The 4 screening methods for each antibody (IgG & IgM) were compared. An average result was considered when the screening of at least 3 out of 4 methods agreed or when at least 2 out of 3 methods agreed (when the other method was equivocal).

For Parvovirus B19 IgG antibodies, 53 samples were determined to be positive and 23 samples negative. The Biotrin IgG IFA correctly identified the 53 positive samples, yielding a sensitivity of 100%, however the IFA incorrectly identified 2 of the negative samples yielding a specificity of 92%.

For Parvovirus B19 IgM antibodies, 26 samples were determined to be positive and 50 samples negative. The Biotrin IgM IFA correctly identified the 50 negative samples, yielding a specificity of 100%, however the IFA incorrectly identified 1 of the positive samples yielding a sensitivity of 96%.

Cross Reactivity

100 serum samples were screened in order to establish the specificity of the Biotrin IgM IFA. All the samples were obtained from patients with the following diseases:

Table 4 Cross-reactive studies

Virus	Number of Positives
Varicella Zoster Virus	0/5
Rheumatoid Factor	0/5
Mumps	0/5
Rubella	0/9
Rubeola	0/5
CMV	0/13
EBV	0/12
Herpes Simplex virus - 1	0/5
Herpes Simplex virus - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Lyme	0/5
Thyroiditis	0/5
Lupus	0/5
Rheumatoid Arthritis (RA)	0/5
ANA	1/5*

* This sample also produced a positive result using Biotrin's Parvovirus B19 IgM EIA & Parvoblot IgM Westernblot assay.

Reproducibility

• Intra – assay reproducibility

The following results were obtained when negative, low and high titre IgG and IgM samples were screened in three kits from one production lot.

Table 5 Intra-assay reproducibility

DEGREE OF FLUORESCENCE

	Slide No.	IgG Positive	IgG Cut Off	Negative	IgM Cut Off	IgM Positive
Kit 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+/-	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• **Inter – site reproducibility**

The following results were obtained when negative, low, medium and high titre IgG (Table 6) and IgM (Table 7) samples were screened in triplicate on 3 separate days at two independent evaluation sites

Table 6 Inter – site reproducibility (IgG)

IgG Sample	Site 1			Site 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	Wk pos	Wk pos	Wk pos	pos	pos	pos
5	Wk pos	Wk pos	Wk pos	pos	Wk pos	pos
5	Wk pos	Wk pos	Wk pos	pos	pos	pos
6	pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos
6	pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos
6	pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos	Wk pos
7	Wk pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Positive Control	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Negative Control	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Wk Pos =weak positive

Pos = positive

Neg = negative

Table 7 Inter – site reproducibility (IgM)

IgM Sample	Site 1			Site 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	Wk pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	Wk pos	Wk pos	pos	Wk pos	pos	pos
4	Wk pos	Wk pos	pos	Wk pos	pos	Wk pos
4	Wk pos	Wk pos	pos	Wk pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	Wk pos	Wk pos	neg	neg	neg
7	neg	Wk pos	Wk pos	neg	neg	neg
7	neg	Wk pos	Wk pos	neg	Wk pos	neg
Positive Control	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Negative Control	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Wk Pos = weak positive

Pos = positive

Neg = negative

Summary of Parvovirus B19 IF IgG & IgM Procedure

Important Note:







Please read the entire product instruction leaflet before starting the assay.

This summary is for quick reference only.

- For an IgG test dilute patient serum samples 1 in 64 in Wash Buffer
- For an IgM test adsorbed samples should be diluted to final dilution of 1 in 16
- Pipette 20µl of Positive Control (ready to use), 20µl Negative Control (ready to use) and 20µl of prepared samples onto wells
- Incubate for 3 hours @ 35-39°C, 100% humidity
- Wash slides with Wash Buffer
- For IgG test add 40µl IgG conjugate to each well

- For IgM test add 40µl IgM conjugate to each well
- Incubate for 30 min in the dark @ 35-39°C, 100% humidity
- Wash slides with Wash Buffer
- Add mounting media to each well
- Examine under a fluorescence microscope

Interpretation of Symbols

	- In vitro diagnostic medical device		- Use by end of
	- Temperature limitation		- Batch code
	- Manufacturer		- Catalogue Number



Deutsch

Parvovirus B19 Immunfluoreszenzassay

Ein Immunfluoreszenztest für den Nachweis von anti-Parvovirus B19 IgG und IgM Antikörpern

Inhaltsverzeichnis

Anwendungsbereich	25	Probensammlung	32
Erläuterungen	25	Proben- und Reagenzienvorbereitung	32
Testprinzip	27	Testdurchführung	33
Packungsinhalt	27	Interpretation der Ergebnisse	34
Mitgelieferte Materialien	27	Limitationen für den Gebrauch	36
Zusätzlich benötigte Materialien	29	Charakteristische Daten	37
Vorsichtsmassnahmen	30	Zusammenfassung der Testdurchführung	45
Sicherheit	30	Interpretation der Symbolen	46
Prozedur	31	Literaturverzeichnis	165
Lagerung und Stabilität	32		

Anwendungsbereich

Der Parvovirus B19-Immunfluoreszenztest dient der qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern gegen Parvovirus B19 in humanem Serum. Dieser Test sollte bei allen Frauen durchgeführt werden, bei denen Verdacht auf Parvovirus-Kontakt besteht, um eine zurückliegende oder aktuelle Infektion nachweisen zu können.

Erläuterungen

Parvovirus B19 wurde erst 1975 als humanes Pathogen entdeckt und wurde später als Erreger einer Reihe von klinischen Erkrankungen wie dem Erythema infectiosum und Arthralgie nachgewiesen und kann fötale Schäden verursachen.^{1,2,3} Eine Infektion mit Parvovirus B19 bei Erwachsenen, insbesondere bei Frauen, kann zu akuten Arthralgien führen, die einige Zeit anhalten können.⁴ Die Infektion kann bei immunsupprimierten Patienten und Individuen mit

grundsätzlichen hämolytischen Störungen wie Sichelzellanämie zu lebensbedrohlichen Anämien führen.^{5,6} Parvovirus B19 ist ein ikosahedrisches, nicht eingehülltes Virus mit einem Durchmesser von 18 bis 25 nm und besteht aus einem linearen einsträngigen DNA-Genom (5,5 kb), das in einem äußeren Kapsid eingeschlossen ist.^{7,8} Das Viruskapsid setzt sich aus den zwei Strukturproteinen VP1 (83 kDa) und VP2 (53 kDa) zusammen. Die Übertragung des Parvovirus B19 erfolgt in der Regel durch direkten Kontakt mit Atemwegssekreten und tritt normalerweise in räumlich begrenzten Ausbrüchen im Winter und im Frühjahr auf.⁸

Es besteht mittlerweile allgemeine Übereinstimmung darüber, daß seronegative Frauen für eine Infektion mit Parvovirus B19 anfällig sind.^{9,10} Bei den meisten Schwangerschaften, in deren Verlauf eine Infektion mit Parvovirus B19 auftritt, verläuft die Geburt fristgerecht und ohne Komplikationen.^{10,11,12} Bei einer Infektion während der Schwangerschaft

besteht allerdings das Risiko einer Übertragung auf den Fötus, der entweder zur spontanen Fehlgeburt oder zur Ausbildung eines Hydrops fetalis führen kann. Die Literatur gibt für die fötale Todesrate nach Infektion der Mutter einen Schätzwert im Bereich zwischen 1 und 9 Prozent an.^{10,13,14} Es wurde vermutet, daß die Infektion während der Schwangerschaft zum fötalen Tode aufgrund schwerer fötaler Anämie führen kann, weil Parvovirus B19 sich vorwiegend in Vorläuferzellen der Erythrozyten repliziert. Es wird angenommen, daß diese schwere Anämie, bei der der Hämoglobinspiegel auf unter 2 g/dl abfällt, die primäre Ursache für den Hydrops fetalis ist.^{15,16}

Die mit der Infektion mit Parvovirus B19 assoziierten Symptome werden erst offensichtlich, nachdem das virämische (ansteckende) Stadium abgeschlossen ist.¹⁰ Darüber hinaus ist bekannt, daß in Situationen, in denen ein enger zwischenmenschlicher Kontakt gewährleistet ist, wie in Schulen, in Kindertagesstätten und in Krankenhäusern, ein erhöhtes Übertragungsrisiko besteht.

Die Centres for Disease Control (CDC) empfehlen nicht, daß Personen, die Anzeichen einer Parvovirus-Infektion ausweisen (z.B. Erythema infectiosum) aus solchen Umgebungen ausgeschlossen werden sollten. Es wird allerdings empfohlen, alle entsprechenden Personen auf die Möglichkeit der Krankheitsübertragung hinzuweisen.¹⁰

Daher ist es wichtig, den Parvovirus-B19-Antikörperstatus bei Personen festzustellen, bei denen ein Risiko für eine Infektion mit Parvovirus B19 besteht bzw. die eine solche Infektion durchgemacht haben.

Serologische Assays sind das wichtigste Mittel zur Diagnose von B19, und Biotrin International bietet eine einzigartige Palette von Parvovirus B19 Assays für die Routinelabor-diagnose an.

- Parvovirus B19 IgG und IgM IFT
Katalognr. V119IF
- Parvovirus B19 IgM EIA
Katalognr. V619IM

- Parvovirus B19 IgM EIA (Automatenpackung)
Katalognr. V619IMAUT
- Parvovirus B19 IgG EIA
Katalognr. V519IG
- Parvovirus B19 IgG EIA (Automatenpackung)
Katalognr. V519IGAUT

Testprinzip

Der Biotrin Parvovirus B19 Immunfluoreszenz Assay basiert auf der indirekten Immunfluoreszenz Antikörpertechnik, wie sie zuerst von Coons et al.¹⁷ beschrieben wurde. Patientenserum wird mit rekombinantem VP1-Antigen inkubiert, das in Insektenzellen auf einem Objektträger stabilisiert wurde^{18, 19}. Sind anti-Parvovirus B19 Antikörper in der Probe

vorhanden, bildet sich ein stabiler Komplex mit dem Antigen. Gebundene Antikörper reagieren dann mit anti-humanem IgG oder IgM Antikörper, die mit Fluoreszin markiert wurden. Dieser dreiteilige Komplex wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht. Um Interferenzen mit Rheumafaktoren (Rf) zu vermeiden und die IgG-Kompetition in den IgM-Tests zu reduzieren, sollten die Proben mit einem entsprechenden Adsorbens vorbehandelt werden.

Packungsinhalt

Mitgelieferte Materialien

1. Objektträger

SLIDE

6 Objektträger mit jeweils 10 Auftragsstellen, auf denen in Insektenzellen exprimiertes rekombinantes Parvovirus B19-Antigen stabilisiert wurde. Folienbeutel.

2. IgM Positivkontrolle **

CONTROL + IgM

1 x 250µl positives Serum enthält spezifische Anti-Parvovirus B19 Antikörper. Enthält Thiomersal (0.01%).
Grüne Verschlusskappe.

3. IgG Positivkontrolle **

CONTROL + IgG

1 x 250µl positives Serum enthält spezifische Anti-Parvovirus B19 Antikörper. Enthält Thiomersal (0.01%).
Blaue Verschlusskappe

4. Negativkontrolle **

CONTROL -

1 x 250µl negatives Kontrollserum enthält keine nachweisbaren Anti-Parvovirus B19 Antikörper. Enthält Thiomersal (0.01%).
Rote Verschlusskappe.

5. Fluoreszenz Anti-IgM-Konjugat

CONJ IgM

1 x 2ml Kaninchen Anti-human IgM-Antikörper verbunden mit Fluoreszin-isothiocyanat (FITC). Enthält Evans Blau als Gegenfärbung und Thiomersal (0.01%).
Purpurfarbene Verschlusskappe.

6. Fluoreszenz Anti-IgG-Konjugat

CONJ IgG

1 x 2ml Kaninchen Anti-human IgG-Antikörper verbunden mit Fluoreszin-isothiocyanat (FITC). Enthält Evans Blau als Gegenfärbung und Thiomersal (0.01%).
Gelbe Verschlusskappe.

7. Waschpuffer-Konzentrat

BUF WASH 25X

1 x 45ml von 25fach konzentriertem TBS (Tris buffered saline) mit Tween 20 (0.25%) und Thiomersal (0.01%).
Farblose Verschlusskappe

8. Eindeckmedium

MM

1 x 2ml Tris-Glycerol-Puffer
Orangefarbene Verschlusskappe

9. Produktbeschreibung

INS

Gebrauchsanweisung

** Potentiell biologisch gefährdendes Material

Zusätzlich benötigte Materialien

- Hochwertiges destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Akkurate Pipetten, Mikropipetten und austauschbare Spitzen für Volumen von 5µl bis 50µl, 50µl bis 200µl.
- Equipment zur Serumgewinnung.
- Stoppuhr.
- Saubere Glasgefäße und Meßzylinder.
- Ein passendes Rf und IgG- und Adsorbens mit einer minimalen IgG Bindungskapazität von 18 mg/ml.

- 1L Glasgefäß.
- Verdünnungsröhrchen und Minizentrifugen-Röhrchen (0.5ml).
- Minitischzentrifuge.
- Inkubationskammer mit feuchtem saugfähigem Papier.
- Waschflaschen und Waschtrog.
- 37°C Inkubator.
- Nr. 1 Deckgläschen (22 x 50 mm).
- Fluoreszenzmikroskop mit einer passenden Filterkombination für FITC (Exzitationsfilter 495nm, Barrierefilter 515 nm), eine Halogenlichtquelle wird empfohlen.
- Wachsstift.
- Gebläse.

Vorsichtsmassnahmen

Sicherheit

- Nur für den *in vitro* Gebrauch.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Alle Reagenzien humanen Ursprungs sind als potentiell infektiös zu betrachten. Die positiven und negativen Kontrollseren wurden zwar nach FDA-Vorschriften auf Antikörper gegen HbsAg, HIV-1 und HIV-2 sowie Hepatitis C getestet und für negativ befunden, da es aber keine absolut sichere Testmethode zum Ausschluss von Infektionsträgern gibt, müssen alle Kontrollen als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, was bei Verzehr Vergiftungen hervorrufen kann.
- Vermeiden Sie den Kontakt mit Evans Blau (im FITC IgM- und IgG-Konjugat), da es ein

potentielles Karzinogen ist. Bei Hautkontakt mit viel Wasser abspülen.

- Alle klinischen Proben, infiziertes oder potentiell infiziertes Material, sollte nach den Regeln von "Good laboratory practice" beseitigt werden. Alle diese Materialien sollten wie stark infektiöses Material gehandhabt und entsorgt werden.
- Reste an Chemikalien oder an Präparations- bzw. Kitbestandteilen sind grundsätzlich als gefährlicher Abfall anzusehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen gehandhabt und entsorgt werden.
- Während der Handhabung der Proben und der Testdurchführung Schutzkleidung, wegwerfbare Handschuhe und eine Schutzbrille tragen. Anschließend kräftig die Hände waschen.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen und trinken Sie nicht in den Laborräumen

Prozedur

- Den Kit oder einzelne Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.
- Ersetzen Sie Reagenzien nicht durch solche mit verschiedenen Kit-Lotnummern. Mischen Sie Reagenzien mit verschiedenen Kit-Lotnummern nicht.
- Abweichungen von diesem Protokoll können fehlerhafte Resultate hervorrufen.
- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 – 25°C) kommen lassen und gut mischen.
- Reagenzien nicht für längere Zeiträume bei direkter Sonneneinstrahlung oder bei Temperaturen über 2-8°C stehenlassen.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serumproben vermeiden.
- Beim Anfärben mehrerer Proben auf einem

Objektträger Kreuzkontaminationen durch Markieren der Auftragsstellen mit einem Wachsstift vermeiden.

- Das Auftragen von überschüssigem Eindeckmedium kann zu verschwommenen Fluoreszenzbildern führen.
- Immer saubere Glassachen für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Jegliche Kontamination muss mit äußerster Vorsicht vermieden und für jede Probe und Komponente eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Die Auftragsstelle darf weder mit einer Pipettenspitze noch einer Tropfflasche zerkratzt werden.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipetierplan mit Schema erstellt werden.

Lagerung und Stabilität

- Bei Lagerung zwischen 2-8°C ist der Kit bis zum auf dem äußeren Aufkleber angegebenen Verfallsdatum stabil.
- Verdünnter Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2-8°C bis zu 6 Monaten haltbar. Sobald sich mikrobieller Bewuchs einstellt, muß die Lösung verworfen werden.
- Alle für die Testdurchführung nicht verbrauchten Komponenten sollten direkt nach Entnahme der nötigen Mengen wieder bei 2-8°C gelagert werden.

Probensammlung

Sterile Serumproben sollten durch aseptische Labortechniken gewonnen werden. Diese Proben können bis zu 24h bei 2-8°C und bei -20°C oder weniger für längere Zeiträume gelagert werden. Frische oder eingefrorene Proben können benutzt

werden, jedoch sollte wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben vermieden werden.

Proben- und Reagenzienvorbereitung

Reagenzienvorbereitung

Der Waschpuffer wird als flüssiges Konzentrat (25fach) geliefert. Zur Vorbereitung des Waschpuffers 40ml Waschpuffer-Konzentrat zu 960ml destilliertem Wasser geben. Der Waschpuffer kann in einem geschlossenen Behälter bei 2-8°C bis zu 6 Monate gelagert werden.

Alle übrigen Reagenzien werden als gebrauchsfertige Lösungen in Arbeitsverdünnung geliefert.

Probenvorbereitung und Adsorption

Qualitativer test:

Für einen IgG-Test muß das Patientenserum 1:64 in Waschpuffer verdünnt werden.

Für IgM-Tests sollten die Proben mit einem passenden Adsorbens für IgG und Rheumafaktor (mit einer minimalen Bindungskapazität von 18 mg/ml) vorbehandelt werden. Vor Gebrauch sollten die Proben eine Endverdünnung von 1:16 haben.

Semi Quantitativer Test:

Bei einem IgG-Test kann der "Probentiter" durch eine serielle Verdünnung ermittelt werden, indem man die Probe 1:64, 1:256, 1:1024 mit Waschpuffer, oder bis eine "+1" Einordnung der Fluoreszenz erreicht ist (siehe "Interpretation Der Ergebnisse") verdünnt.

Bei IgM-Tests kann der "Probentiter" durch serielle Verdünnung ermittelt werden, indem man die 1:16

adsorbierte Patientenprobe mit Waschpuffer auf 1:64, 1:256, usw. verdünnt, bis eine "+1" Einordnung der Fluoreszenz erreicht ist (siehe "Interpretation Der Ergebnisse").

Bemerkung: Der "Titer" der Probe entspricht der Verdünnung die benötigt wurde, um eine "+1" Einordnung der Fluoreszenz zu erreichen.

HINWEIS: Verdünnte Proben sollten nicht aufbewahrt werden. Bei erforderlicher Testwiederholung muss eine frisch verdünnte Probe eingesetzt werden.

Testdurchführung

1. Alle Komponenten vor Gebrauch auf Raumtemperatur kommen lassen (20-25°C).
2. Gewünschte Anzahl von Objektträgern aus ihrem Beutel nehmen.

3. Um Kreuzkontaminationen zwischen den Feldern zu vermeiden, sollten mit einem Wachsstift Trennlinien zwischen den Feldern gezogen werden.
4. Von jeder verdünnten Probe 20µl und jeweils 20µl gebrauchsfertige Positivkontrolle und Negativkontrolle auf jeweils ein nummeriertes Objektträgerfeld geben.
5. Die Objektträger in einer Inkubationskammer bei 35-39°C und 100%iger Luftfeuchtigkeit für 3h inkubieren.
6. Die Objektträger vorsichtig mit Waschpuffer vom Rand her mit einer Waschflasche abspülen. Anschließend die Objektträger bei Raumtemperatur für 10 Minuten in eine Kammer mit Waschpuffer (20ml/Objektträger) legen. Anschließend die Objektträger nochmals mit Waschpuffer aus der Waschflasche abspülen und die Objektträger mit einem Gebläse trocknen.

7. Bei einem IgG-Test zu jedem Feld einen Tropfen (40µl) vom anti-IgG FITC Konjugat zugeben.
8. Die Objektträger in einer Kammer für 30 Minuten bei 100%iger Luftfeuchtigkeit im Dunkeln inkubieren.
9. Waschvorgang wie zuvor unter 6. Beschrieben wiederholen.
10. Ins Zentrum jedes Feldes einen kleinen Tropfen Eindeckmedium zugeben und mit einem Deckglas abdecken.
11. Präparat unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung untersuchen.

Interpretation Der Ergebnisse

Negativ: Eine Probe wird als negativ für Parvovirus B19 IgM- und IgG-Antikörper betrachtet, wenn keine Fluoreszenz der VP1-Aggregate („Weintrauben-Morphologie“) erkennbar ist.

Positiv: Eine probe wird als positiv für Parvovirus B19 IgM- und IgG-Antikörper betrachtet wenn ein positives Fluoreszenzergebnis bei einem Titer von $\geq 1:16$ bzw. $\geq 1:64$ erhalten wird. Positive Fluoreszenz wird durch leuchtende Grünfärbung unterschiedlicher VP1 Proteinaggregate („Bund von Weintrauben“ Morphologie) angezeigt und kann wie folgt eingeordnet werden.

+4 = Brilliant leuchtende, grüne Fluoreszenz, die sehr hohe Titer von Parvovirus B19 Antikörper Bildung anzeigt.

+3 = Leuchtende grüne Fluoreszenz, die hohe Titer von Parvovirus B19 Antikörperbildung anzeigt.

+2 = Grüne Fluoreszenz, die mittlere Titer von Parvovirus B19 Antikörperbildung anzeigt.

+1 = Matte grüne Fluoreszenz, die niedrige Titer von Parvovirus B19 Antikörperbildung anzeigt. Bei quantitativen Bestimmungen zeigt eine +1 Fluoreszenz den "Endpunkttiter" an.

+/- = Schwache grüne Fluoreszenz die eine mögliche Parvovirus B19 Antikörperbildung anzeigt. Zur Bestätigung sollten erhätliche klinische Informationen und andere Nachweismethoden hinzugezogen werden.

Um einen Vergleich von positiven und negativen Zellen zu ermöglichen sind in jedem beschichteten Feld auch nicht-infizierte Zellen, die kein VP1 Protein enthalten, eingeschlossen. Diese Zellen färben sich durch die Gegenfärbung mit Evans Blau matt rot.

Unspezifisch: Einige Individuen können eine unspezifische IgM-Reaktion hervorrufen. Welche sich durch eine schwache Fluoreszenz mit einem wenig definierten Färbungsmuster bei einer 1:16 Serumverdünnung zeigen. Dieses Ergebnis sollte durch eine alternative Methode (z.B. EIA, Immunoblot) überprüft werden:

Qualitätskontrollkriterien

Bei jedem Test müssen Kalibrator (Positivkontrolle) und Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Validität der Testergebnisse sicherzustellen. Die Ergebnisse eines Tests gelten dann als richtig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Mit der IgG- und/oder IgM-Positivkontrolle wird eine Fluoreszenzintensität von +2 oder größer erzielt.
2. Die Negativ-Kontrolle ergibt keine sichtbare Fluoreszenz der VP1-Aggregate („Weintrauben-Morphologie“).

Werden diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Limitationen Für Den Gebrauch

- Beim Erstellen der Diagnose einer Parvovirus

B19 Infektion müssen die Ergebnisse mit dem klinischen Bild des Patienten, dem epidemiologischen Profil und den Ergebnissen anderer klinischer Laboratorien korrelieren.

- Ein nicht reaktives (negatives) Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Parvovirus B19 Infektion nicht aus. Die Entwicklung einer nachweisbaren Immunantwort kann erst einige Tage nach einer Infektion erfolgen. Im Falle einer vermuteten Parvovirus B19 Infektion sollte ein negatives Ergebnis nach zwei Wochen mit einem erneuten Test überprüft werden.
- Die Leistungsfähigkeit des Tests kann durch Abweichungen in Durchführung, Interpretation oder empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen beeinflusst werden.
- Die Interpretation der Testergebnisse von Proben immunsupprimierter Patienten kann schwierig sein.

Charakteristische Daten

Klinische Evaluation

Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten, wenn Seren von Patienten mit Symptomen einer kürzlich durchgemachten B19 Infektion (Serokonversions Panels) mit dem IgM-Immunfluoreszenztest von Biotrin und mit einer RIA-Methode getestet wurden.¹⁷

Tabelle 1 Klinische Evaluationsergebnisse

Tage nach Beginn	Biotrin IgM IFA		IgM RIA	
	Anzahl von IgM Positiven	%IgM Positiven	Anzahl von IgM Positiven	%IgM Positiven
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

Seroprävalenz

Insgesamt 201 Proben von zufällig ausgewählten gesunden Blutspendern wurden mit dem Parvovirus B19-Immunfluoreszenztest von Biotrin auf IgG- und IgM-Antikörper gegen Parvovirus B19 getestet (IgG=201; IgM=200). 138 Serumproben, also 68,7% der gescreenten Proben, waren IgG-positiv und nur 2 Proben (1%) IgM-positiv. Diese Befunde stimmen mit den Daten der in der Literatur beschriebenen Seroprävalenzstudien überein.

Sensitivität und Spezifität

Das Zentrum zur Gesundheitsüberwachung (CDC) hält ein Panel an Parvovirus B19-Seren bereit, das als interne Kontrolle und Referenz für ihr Untersuchungsprogramm auf Parvovirus B19 dient. Die Proben wurden anhand von klinischen Symptomen, die mit einer Parvovirus B19-Infektion einhergehen, charakterisiert. Die meisten dieser Patienten waren Frauen, die mit symptomatischen Kindern im Haushalt leben,

oder Lehrer, an deren Grundschule Erythema infectiosum-Epidemien ausgebrochen waren. Dieses Panel wurde außer mit dem CDC Parvovirus B19-Nativvirus-EIA²², auch mit dem Parvovirus B19-IgG- und Parvovirus B19-IgM-EIA von Biotrin getestet. Darüber hinaus wurde eine Auswahl an Seren des gut-charakterisierten CDC-Panels (n=30) mit dem Parvovirus B19-IgG- und IgM-IFT von Biotrin getestet. In den Tabellen 2 und 3 werden die mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse miteinander verglichen.

Tabelle 2 Vergleich zwischen dem IgG % IgM-IFT von Biotrin mit dem CDC Nativvirus-Test.

		Nativvirustest der CDC*							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Mehrd	Gesamt	Pos	Neg	Mehrd	Gesamt
Parvovirus B19 IgG & IgM IFT von Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Mehrd	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	22	5	0	27	12	15	0	27

Nur 27 der 30 Proben wurden mit dem Nativvirustest der CDC getestet.

Tabelle 3 Vergleich zwischen dem IgG & IgM-IFT von Biotrin mit dem Parvovirus B19 IgG & IgM-EIA von Biotrin.

		Parvovirus B19 EIA von Biotrin							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Mehrd	Gesamt	Pos	Neg	Mehrd	Gesamt
Parvovirus B19 IgG & IgM IFT von Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Mehrd	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positiv

Neg = negativ

Mehrd= mehrdeutig

Sensitivität = tatsächlich positive Proben dividiert durch die Summe aus (positiven + falsch-negativen + mehrdeutigen) Proben multipliziert mit 100

% Sensitivität = 100 %

Spezifität = tatsächlich negative Proben dividiert durch die Summe aus (negativen + falsch-positiven + mehrdeutigen) Proben multipliziert mit 100

% Spezifität = 100%

Am Virusreferenzlabor wurden 76 Proben mit vier unterschiedlichen Screeningtests auf die Anwesenheit von IgG & IgM-Antikörper untersucht. Es handelte sich dabei um den Hillcrest Biologicals Parvovirus IgG & IgM-EIA (EIA), den Microbiology Reference Lab Western Blot (WB), den VRL Colindale RIA (RIA) und den Biotrin IFT (IFT). Die vier Testmethoden wurden in bezug auf jeden Antikörper (IgG & IgM) miteinander verglichen. Ein Mittelwert des Ergebnisses wurde festgelegt, wenn entweder mindesten 3 der 4 Methoden Übereinstimmungen

zeigten oder mindestens 2 von 3 Methoden (bei Mehrdeutigkeit der mit den anderen Methoden erzielten Ergebnissen übereinstimmend waren.

In bezug auf Parvovirus B19 IgG-Antikörper wurden 53 Proben positiv und 23 Proben negativ bewertet. Mit dem Biotrin IgG-IFT wurden alle 53 positiven Proben korrekt identifiziert, was einer Sensitivität von 100% entspricht; von den negativen Proben wurden jedoch 2 mit dem IFT nicht korrekt erkannt, was einer Spezifität von 92% entspricht.

In bezug auf Parvovirus B19 IgM-Antikörper wurden 26 Proben positiv und 50 Proben negativ bewertet. Mit dem Biotrin IgG-IFT wurden alle 50 negativen Proben korrekt identifiziert, was einer Spezifität von 100% entspricht; 1 positive Probe dagegen wurde mit dem IFT nicht korrekt erkannt, was einer Sensitivität von 96% entspricht.

Kreuzreaktivität

Um die Spezifität des IgM-IFT von Biotrin zu ermitteln, wurden 100 Serumproben gescreent. Alle Proben stammten von Patienten mit den folgenden Infektionskrankheiten:

Tabelle 4 Studien zur Kreuzreaktivität

Virus	Anzahl der positiven Proben
Varicella Zoster Virus	0/5
Rheumafaktor	0/5
Mumps	0/5
Röteln	0/9
Masern	0/5
CMV	0/13
EBV	0/12
Herpes Simplex virus - 1	0/5
Herpes Simplex virus - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Lyme	0/5
Thyroiditis	0/5
Lupus	0/5
Chronische Polyarthritis (PCP)	0/5
ANA	1/5*

* Diese Probe zeigte auch mit dem Parvovirus B19-IgM-EIA und dem Parvoblot IgM Westernblot von Biotrin ein positives Ergebnis.

Reproduzierbarkeit

• Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

Die folgenden Ergebnisse wurden beim Screenen von negativen, niedrigtitrigen und hochtitrigen IgG- und IgM-Proben mit drei Kits derselben Produktionscharge erzielt.

Tabelle 5 Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

GRAD DER FLUORESZENZ

Objektträger Nr.	IgG Positiv	IgG Cut Off	Negativ	IgM Cut Off	IgM Positiv	
Kit 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+/-	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• Inter-Site-Reproduzierbarkeit

Die folgenden Ergebnisse wurden beim Screenen von negativen sowie niedrig-, mittel- und hochtitrigen IgG- und IgM-Proben erzielt, die an drei verschiedenen Tagen von zwei unabhängigen Evaluierungseinrichtungen jeweils in Dreifachbestimmung untersucht wurden.

Tabelle 6 Inter-site-Reproduzierbarkeit (IgG)

IgG Sample	Einrichtung 1			Einrichtung 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	Schw pos	Schw pos	Schw pos	pos	pos	pos
5	Schw pos	Schw pos	Schw pos	pos	Schw pos	pos
5	Schw pos	Schw pos	Schw pos	pos	pos	pos
6	pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos
6	pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos
6	pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos	Schw pos
7	Schw pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Positiv Kontrolle	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Negativ Kontrolle	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Schw. pos = schwach positiv pos = positiv neg = negativ

Tabelle 7 Inter-site-Reproduzierbarkeit (IgM)

IgM Probe	Einrichtung 1			Einrichtung 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	Schw pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	Schw pos	Schw pos	pos	Schw pos	pos	pos
4	Schw pos	Schw pos	pos	Schw pos	pos	Schw pos
4	Schw pos	Schw pos	pos	Schw pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	Schw pos	Schw pos	neg	neg	neg
7	neg	Schw pos	Schw pos	neg	neg	neg
7	neg	Schw pos	Schw pos	neg	Schw pos	neg
7 Positiv Kontrolle	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7 Negativ Kontrolle	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Schw. pos = schwach positiv

pos = positiv

neg = negativ







Zusammenfassung von Parvovirus B19 IgG und IgM IFT Prozedur

Bitte vor der Durchführung des Assays die gesamte Arbeitsanleitung durchlesen. Diese Zusammenfassung dient nur als Überblick.

- Für einen IgG- Test Patientenserum 1 zu 64 in Waschpuffer verdünnen
- Für einen IgM-Test adsorbierte Proben sollten auf eine Endkonzentration von 1 zu 16 verdünnt werden.
- 20µl der gebrauchsfertigen Positivkontrolle, 20µl gebrauchsfertige Negativkontrolle und 20µl gebrauchsfertige Proben zu je einem Objektträgerfeld geben.
- für 3 Stunden bei 35-39°C, und 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubieren
- Objektträger mit Waschpuffer waschen
- Für den IgG-Test 40µl IgG- Konjugat zu jeder Auftragsstelle geben.

- Für den IgM-Test 40µl IgM- Konjugat zu jeder Auftragsstelle geben
- Für 30 min bei 35-39°C im Dunkeln und bei 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubieren
- Objektträger mit Waschpuffer waschen
- Eindeckmedium zu jeder Auftragsstelle geben
- Unter einem Fluoreszenzmikroskop untersuchen

Interpretation der Symbole

	- Gerät für die <i>in vitro</i> diagnostik Testung		- Haltbar bis
	- Die Temperaturspanne		- Lot Nr.
	- Hersteller		- Kat. Nr.



Parvovirus B19 **Technique d'immunofluorescence**

Français

Un test d'immunofluorescence pour la détection des IgG et des IgM dirigées contre le Parvovirus B19.

TABLE DES MATIERES

Objet	49	Prélèvement et conservation des échantillons	56
Introduction	49	Préparation des réactifs et des échantillons	56
Principe du dosage	51	Mode opératoire	57
Composition du coffret	51	Interprétation des résultats	58
Matériel fourni	51	Contrôle de qualité	59
Matériel nécessaire non fourni	53	Limites du test	60
Précautions d'emploi	53	Performances du test	60
Sécurité	53	Résumé du mode opératoire	69
Procédure	54	Signification des symboles	70
Conditions de conservation	55	Bibliographie	165

Objet

Le test immunofluorescent Parvovirus B19 est destiné à la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps IgG et IgM anti-Parvovirus dans le sérum humain. Chez les femmes pour lesquelles il existe une suspicion d'exposition au Parvovirus B19, le dosage permet d'identifier une infection récente ou actuelle.

Introduction

Le Parvovirus B19 a été identifié en tant qu'agent pathogène de l'homme en 1975 et a ensuite été reconnu responsable d'une série d'états cliniques comme l'érythème, l'arthralgie et les lésions foetales^{1,2,3}. Chez l'adulte, et particulièrement chez la femme, l'infection par le Parvovirus B19 cause parfois une arthrite aiguë qui peut persister pendant un certain temps⁴. L'infection peut aussi entraîner une anémie létale chez les patients immunodéprimés et chez les personnes atteintes de maladies hémolytiques latentes, telle la drépanocytose^{5,6}. Ce virus est de type icosaédrique

non enveloppé, d'un diamètre de 18-25 nm, et possède un génome à ADN monocaténaire linéaire (5,5 kb) encapsulé dans une capsid externe^{7,8}. La capsid virale est composée de deux protéines structurales, nommées VP1 (83 kDa) et VP2 (53 kDa). L'infection par le Parvovirus B19 s'acquiert généralement par contact direct avec des sécrétions respiratoires, et se produit normalement lors d'épidémies localisées au cours des mois d'hiver et de printemps⁸.

Il est maintenant reconnu que les femmes séronégatives sont sensibles à l'infection par le Parvovirus B19^{9,10}. La plupart des grossesses au cours desquelles une infection par le Parvovirus B19 se produit aboutissent à un fœtus en bonne santé, né à terme^{10,11,12}. Toutefois, l'infection pendant la grossesse fait courir des risques de transmission au fœtus, ce qui peut entraîner l'anasarque foetoplacentaire ou la mort intra-utérine. Dans la littérature, on estime que le taux de morts foetales suite à l'infection de la mère atteint 1 à 9%^{10,13,14}. Etant donné que le Parvovirus B19 se réplique principalement dans les

précurseurs des globules rouges, il a été suggéré qu'une infection pendant la grossesse pouvait entraîner la mort du fœtus en raison d'une grave anémie foetale. On pense que cette anémie sévère, où se produit une baisse de l'hémoglobine en dessous de 2g/dl, est la cause principale de l'anasarque foetoplacentaire^{15,16}.

Les symptômes associés à l'infection par le Parvovirus B19 ne sont apparents qu'après la fin de la phase de virémie (contagion)¹⁰. De plus, on sait qu'il existe un risque accru de transmission dans les cas où des contacts étroits entre individus sont courants, comme dans les écoles, les crèches et les hôpitaux. Les centres épidémiologiques ne recommandent cependant pas que les personnes présentant des signes d'infection par le Parvovirus (par ex. érythème infectieux) soient exclues de ces milieux. Il est toutefois souhaitable que toutes les personnes concernées soient informées de la possibilité d'une transmission de la maladie¹⁰.

Par conséquent, il est important d'identifier le statut immunitaire vis-à-vis du Parvovirus B19

chez les sujets à risque, ou qui ont déjà contracté l'infection par le Parvovirus B19.

Les tests sérologiques sont un élément fondamental du diagnostic de base du B19. Biotrin International vous offre une gamme unique de dosages Parvovirus B19, adaptés à un diagnostic sérologique de routine:

- Parvovirus B19 IgG et IgM IFA
Référence catalogue : V119IF
- Parvovirus B19 IgM EIA
Référence catalogue : V619IM
- Parvovirus B19 IgM EIA (Pour Automate)
Référence catalogue : V619IMAUT
- Parvovirus B19 IgG EIA
Référence catalogue : V519IG
- Parvovirus B19 IgG EIA (Pour Automate)
Référence catalogue : V519IGAUT

Principe du dosage

Le kit Biotrin Parvovirus B19 IgG/IgM IFA est basé sur la technique d'immunofluorescence indirecte initialement décrite par Coons et al¹⁴. Le sérum du patient est incubé en présence de l'antigène recombinant VP1 Parvovirus B19 qui se trouve dans des cellules d'insectes immobilisées sur une lame de verre^{15,16}. Si des anticorps spécifiques anti-Parvovirus B19 sont présents dans le sérum, ils forment un complexe stable avec cet antigène. L'anticorps spécifique complexé est à son tour reconnu par un second anticorps anti IgG ou IgM humaines marqué à la fluorescéine. Le complexe final formé est alors visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. Pour prévenir les interférences dues au facteur rhumatoïde, et réduire l'effet de compétition des IgG lors des tests de recherche des IgM, il est nécessaire de pré-traiter l'échantillon avec un adsorbant adéquat.

Composition du coffret

Matériel fourni

1. Lames

SLIDE

Lames sur lesquelles l'antigène recombinant Parvovirus B19 exprimé dans des cellules d'insectes a été fixé.

Lames 6 x 10 puits
2. Contrôle positif IgM**

CONTROL	+	IgM
---------	---	-----

1 x 250µl de sérum positif contenant des anticorps spécifiques anti-Parvovirus B19. Contient du thiomersal (0,01%).

(bouchon vert)
3. Contrôle positif IgG**

CONTROL	+	IgG
---------	---	-----

1 x 250µl de sérum humain contenant des anticorps spécifiques anti-Parvovirus B19.

Contient du thiomersal (0,01%).

(bouchon bleu)

4. Contrôle négatif**

CONTROL -

1 x 250µl de sérum humain négatif sans anticorps anti-Parvovirus B19 détectables. Contient du thiomersal (0,01%).

(bouchon rouge)

5. Conjugué fluorescent anti-IgM

CONJ IgM

1 x 2ml d'anticorps de lapin anti-IgM humaines conjugués à du fluoro-isothiocyanate (FITC). Contient du Bleu Evans et du thiomersal (0,01%).

(bouchon violet)

6. Conjugué fluorescent anti-IgG

CONJ IgG

1 x 2ml d'anticorps de lapin anti-IgG humaines conjugués à du fluoro-isothiocyanate (FITC).

Contient du Bleu Evans et du thiomersal (0,01%).

(bouchon jaune)

7. Tampon de lavage concentré

BUF WASH 25X

1 x 45ml de tampon TBS concentré (25x) contenant du Tween 20 (0,25%) et du thiomersal (0,01%).

(bouchon transparent)

8. Milieu de montage

MM

1 x 2ml de tampon Tris – glycérol. Contient du thiomersal (0,001%).

(bouchon orange)

9. Notice d'utilisation

INS

** Produits potentiellement biodangereux.

Matériel nécessaire non fourni

- Eau distillée ou désionisée de bonne qualité
- Pipettes automatiques, micropipettes et pointes à usage unique (pour pipeter 5µl à 50µl et 50µl à 200µl)
- Tubes adaptés au prélèvement des échantillons de sérum
- Chronomètre
- Eprouvettes graduées
- Equipement adapté pour le prétraitement des échantillons et réactif adsorbant ayant une capacité de liaison des IgG de 18 mg/ml au minimum
- Récipient d'1 litre
- Tubes adaptés à la dilution des échantillons et microtubes (0,5ml)
- Système d'incubation de lames contenant du papier humide

- Système de lavage de lames et pissette de laboratoire
- Incubateur à 37°C
- Lamelles de microscope (22 x 50mm)
- Microscope à fluorescence comprenant un système de filtres adapté au FITC (filtre d'excitation 495 nm, filtre d'émission 515 nm)
- Stylo hydrophobe
- Ventilateur

Précautions d'emploi

Sécurité

- Pour usage diagnostique in vitro seulement.
- L'utilisation du kit est uniquement destinée au personnel de laboratoire qualifié.

- Tous les réactifs d'origine humaine doivent être considérés comme POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Les sérums de contrôle positif et négatif ont été testés et trouvés négatifs aux antigènes HBs, aux anticorps anti-VIH 1, VIH 2 et VHC avec des méthodes approuvées FDA. Cependant, comme aucune méthode de test ne peut fournir une certitude totale d'absence de virus, tous les contrôles doivent être utilisés comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent du thiomersal (toxique par ingestion).
- Eviter tout contact avec le bleu Evans (contenu dans les solutions de conjugué FITC) qui est potentiellement carcinogène. En cas de contact avec la peau, rincer abondamment à l'eau.
- Eliminer tous les échantillons cliniques ainsi que le matériel contaminé ou potentiellement contaminé en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Tout élément doit

être manipulé comme potentiellement infectieux.

- Les résidus de réactifs, préparations et produits chimiques doivent être considérés comme des déchets dangereux. Il est indispensable de les manipuler et de les éliminer comme potentiellement infectieux.
- Porter des vêtements protecteurs, des gants jetables stériles en latex, et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et de la réalisation du test. Se laver les mains après l'utilisation des réactifs.
- Ne pas pipeter avec la bouche, et ne jamais manger ou boire à la paille de laboratoire.

Procédure

- Ne pas utiliser de kit ou de réactif après la date de péremption.
- Ne pas utiliser ensemble des réactifs de lots différents.

- Des modifications du protocole peuvent conduire à des résultats erronés.
- Laisser les réactifs atteindre la température ambiante (20-25°C) et bien mélanger avant usage.
- Eviter de laisser les réactifs sous une lumière forte et/ou à une température > 2-8°C pendant une longue période.
- En cas de test de plusieurs échantillons sur la même lame, éviter les contaminations croisées entre échantillons en traçant un trait entre les puits avec un stylo hydrophobe.
- L'application de milieu de montage en excès peut être la cause d'une fluorescence parasite diffuse.
- N'utiliser que des tubes et pipettes de laboratoire propres, et de préférence à usage unique pour chaque préparation de réactif.
- N'utiliser que des tubes et pipettes de laboratoire propres, et de préférence à usage

unique pour chaque préparation de réactif.

- Ne pas érafler les puits avec les embouts des pipettes
- Etablir un plan d'identification et de distribution avant de commencer la manipulation.

Conditions de conservation

- Le kit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, à condition qu'il soit conservé à 2-8°C.
- Le tampon de lavage dilué est stable pendant 6 mois s'il est conservé à 2-8°C. L'éliminer immédiatement en cas de contamination microbienne.
- Immédiatement après utilisation, conserver les réactifs restants à 2-8°C.

Prélèvement et conservation des échantillons

Prélever les échantillons de sérum selon les techniques d'asepsie habituelles. Avant dosage, ils peuvent être conservés à 2-8°C pendant 24 heures ou à -20°C pendant une durée plus longue (dans ce cas, congeler les échantillons immédiatement après le prélèvement). Ils ne doivent cependant pas être soumis à plusieurs cycles de congélation-décongélation.

Préparation des réactifs et des échantillons

Préparation des réactifs

Le tampon de lavage est fourni sous forme concentrée liquide (25x). Pour le préparer, diluer 40ml de tampon concentré dans 960ml d'eau distillée. Conserver dans un récipient propre fermé. Le tampon dilué doit être conservé à 2-8°C et reste ainsi stable pendant 6 mois.

Tous les autres réactifs sont fournis prêts à l'emploi.

Préparation des échantillons et adsorption

Test Qualitatif

Pour une détection des IgG, diluer les échantillons de sérum au 1:64 dans le tampon de lavage.

Pour une détection des IgM, les échantillons doivent être pré-traités avec un adsorbant adéquat pour les IgG et le facteur rhumatoïde (possédant une capacité de liaison de 18 mg/ml). Une dilution finale de l'échantillon au 1:16 doit être réalisée avant l'usage.

Test Semi-Quantitatif

Pour les IgG, le "titre" en anticorps peut être déterminé en effectuant une gamme de dilution de l'échantillon à tester dans le tampon de lavage à 1:64, 1:256, 1:1024 ou jusqu'à ce qu'une fluorescence de "+1" soit obtenue (voir "Interprétation des résultats").

Pour les IgM, le titre en anticorps peut être déterminé en effectuant une gamme de dilution de l'échantillon. Diluer l'échantillon absorbé (à 1:16) dans le tampon de lavage à 1:64, 1:256 ou jusqu'à l'obtention d'une fluorescence de « +1 » (Voir Interprétation des résultats).

Note: Le "titre" de l'échantillon est la dilution nécessaire pour atteindre un degré "+1" de fluorescence.

Note: Les échantillons dilués ne doivent pas être conservés. S'il faut refaire le test, une nouvelle préparation devra être effectuée.

Mode opératoire

1. Tous les réactifs doivent être à température ambiante avant usage (20-25°C).
2. Prendre le nombre de lames nécessaires (un puits par contrôle et par échantillon pour chacun des dosages – IgG ou IgM). Conserver les autres lames à 2-8°C dans leur sachet.

3. Faire des marques entre les puits avec un stylo hydrophobe pour éviter d'éventuelles contaminations croisées.
4. Déposer 20µl de chaque échantillon dilué et 20µl des contrôles positifs et négatifs (prêts à l'emploi) dans les puits numérotés.
5. Incuber les lames pendant 3 heures à 35-39°C dans une chambre humide (humidité 100%).
6. Rincer brièvement les lames à l'aide d'une pissette contenant du tampon de lavage. Les immerger ensuite dans ce tampon (20ml par lame) pendant 10 minutes à température ambiante. Sortir les lames et les rincer de nouveau brièvement avec la pissette de tampon de lavage. Laisser sécher à l'air.
7. Pour la recherche d'IgM, déposer une goutte (40µl) de conjugué anti-IgM FITC dans les puits choisis. Pour les IgG, déposer une goutte (40µl) de conjugué anti-IgG FITC dans chaque puits concerné par ce test.

8. Incuber les lames à l'obscurité en chambre humide (100% d'humidité) à 35-39°C pendant 30 minutes.
9. Répéter l'étape 6.
10. Ajouter 1 petite goutte de milieu de montage au centre de chaque puits, et déposer une lamelle en prenant soin de chasser les bulles.
11. Examiner chaque puits au microscope avec un grossissement de 400x. (Filtre d'excitation 495nm, filtre de lecture 515nm).

Interprétation des résultats

Négatif : Un échantillon est considéré comme négatif pour la présence d'IgM et d'IgG anti Parvovirus B19 lorsque aucune fluorescence d'agrégats de protéine VP1 n'est visible (Pouvant être décrit morphologiquement par 'un amas de grappes').

Positif : Un échantillon est considéré comme positif pour les IgM ou les IgG anti-Parvovirus B19 si une fluorescence positive est obtenue à une dilution supérieure ou égale, respectivement, à 1:16 ou 1:64.

Une fluorescence positive se caractérise par la coloration vert brillant des agrégats de protéine VP1 dans les cellules, et les degrés de fluorescence peuvent être notés comme suit:

+4 = Fluorescence vert très brillant indiquant un titre très élevé en anticorps anti-Parvovirus B19.

+3 = Fluorescence vert diffus, indiquant un titre élevé en anticorps anti Parvovirus B19.

+2 = Fluorescence verte indiquant un titre moyen en anticorps anti-Parvovirus B19.

+1 = Fluorescence vert terne indiquant un titre faible en anticorps anti-Parvovirus B19. Cette

fluorescence correspond à la limite de dilution, ou "titre" de l'échantillon.

+/- = Fluorescence verte diffuse, indiquant la possibilité d'une présence d'anticorps anti-Parvovirus B19 et nécessitant une confirmation par les données cliniques ou une autre méthode de dosage.

Des cellules ne contenant pas de protéine VP1 sont incluses dans chaque puits pour permettre la comparaison entre cellules positives et négatives. Elles apparaissent en rouge terne après contre-coloration au Bleu Evans.

Aspécificité : Certains échantillons peuvent montrer une réaction IgM aspécifique, qui se traduit par la présence d'une faible fluorescence au contour flou, à une dilution de 1:16. Ce résultat doit être vérifié par une méthode alternative (ELISA, Immunoblot).

Contrôle de qualité

Les contrôles positif et négatif doivent toujours être inclus au test pour déterminer la validité des résultats. Les résultats d'un dosage sont considérés comme valides s'ils satisfont aux critères suivants :

1. Le contrôle positif IgG et/ou IgM donne une fluorescence supérieure ou égale à +2.
2. Le contrôle négatif ne doit pas présenter de fluorescence visible d'agrégats de protéine VP1 (Pouvant être décrit morphologiquement par 'un amas de grappes').

Si ces deux critères ne sont pas simultanément satisfaits, le test est considéré comme invalidé et il est nécessaire de répéter le dosage.

Limites du test

- Les résultats obtenus doivent être en corrélation avec le profil clinique et épidémiologique du patient avant d'établir un diagnostic d'infection par le Parvovirus B19.
- Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par le Parvovirus B19. Le développement d'une réponse immunitaire détectable peut se manifester quelques jours seulement après l'infection. Si une infection par le Parvovirus B19 est soupçonnée, le test doit être répété après deux semaines.
- Les performances du test peuvent être affectées par des modifications du protocole, de l'interprétation, ou des précautions d'emploi recommandées.
- Les résultats des tests d'échantillons provenant de patients immunodéprimés peuvent être difficiles à interpréter.

Performances du test

Evaluation clinique

Les résultats suivants ont été obtenus sur les échantillons de patients présentant des symptômes d'infection récente par le Parvovirus B19, en utilisant les méthodes IgM IFA de Biotrin et une méthode RIA¹⁷.

Tableau 1 : Résultats de l'évaluation clinique

<i>Nbre de jours après l'infection</i>	<i>Biotrin IgM IFA</i>		<i>IgM RIA</i>	
	<i>Nbre de positifs IgM</i>	<i>% de positifs IgM</i>	<i>Nbre de positifs IgM</i>	<i>% de positifs IgM</i>
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

Séroprévalence

Au total, 201 échantillons provenant de donneurs sains choisis au hasard ont été testés aux anticorps Parvovirus B19 IgG et IgM à l'aide du kit d'immunofluorescence de Biotrin (IgG : 201 et IgM : 200 échantillons). 138 échantillons de sérum étaient positifs en IgG, ce qui représente 68,7% des échantillons testés. Par contre, seuls 2 sérums (c'est-à-dire, 1% des échantillons testés) étaient positifs en IgM. Ces résultats sont en accord avec les études de séroprévalence rapportées dans la littérature.^{20, 21}

Sensibilité et Spécificité

Les centres épidémiologiques de Contrôle et Prévention des maladies (CDC) possèdent un panel de sérums positifs au Parvovirus B19 qui est utilisé comme témoin interne et comme référence dans leur programme de tests du Parvovirus B19. Les échantillons ont été caractérisés par des symptômes cliniques associés à une infection par le Parvovirus B19. La plupart des patients étaient

des femmes exposées chez elles à des enfants symptomatiques et des enseignantes d'écoles primaires où des épidémies d'érythème infectieux avaient eu lieu. Ce panel a été testé en utilisant le test Parvovirus B19 virus natif du CDC²² et les kits Parvovirus B19 IgG et Parvovirus B19 IgM ELISA de Biotrin.

Une sélection de sérums parmi le panel bien caractérisé du CDC (n=30) a été testée en utilisant la technique Parvovirus B19 IgG et IgM IFA de Biotrin. Une comparaison des résultats obtenus entre les différentes méthodes est présentée dans les tableaux 2 & 3.

Tableau 2 : Comparaison entre le kit Parvovirus B19 IgG & IgM IFA de Biotrin et le test Parvovirus B19 virus natif du CDC.

		CDC Parvovirus B19 native virus*							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG & IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

* Seulement 27 des 30 échantillons ont été dosés avec le test Parvovirus B19 virus natif du CDC.

Tableau 3 : Comparaison entre le kit Parvovirus B19 IgG & IgM IFA de Biotrin et les kits Parvovirus B19 IgG et Parvovirus B19 IgM ELISA de Biotrin.

		Biotrin Parvovirus B19 ELISA							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG & IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positif

Neg = négatif

Equiv = équivoque

Sensibilité = Vrais Positifs divisés par (Vrais Positifs + Faux Négatifs + Equivoques) x 100
 Résultats : Sensibilité = 100%

Spécificité = Vrais Négatifs divisés par (Faux Négatifs + Faux Positifs + Equivoques) x 100
 Résultats : Spécificité = 100%

Au Laboratoire de Référence des Virus, 76 échantillons ont été testés en anticorps IgG & IgM en utilisant 4 méthodes de dosages différentes : le test Hillcrest Biologicals Parvovirus IgG & IgM ELISA (EIA), le test Microbiology Reference Lab Western Blot (WB), le test VRL Colindale RIA (RIA) et le test Biotrin IFA (IFA). Les 4 méthodes de dosages pour chaque anticorps (IgG & IgM) ont été comparées. Un résultat est validé lorsque, au moins 3 méthodes sur 4 ont des conclusions semblables ou, au moins 2 méthodes sur 3 (dans le cas où l'une donne un résultat équivoque).

Pour les anticorps Parvovirus B19 IgG, 53 échantillons ont été déterminés positifs et 23 échantillons négatifs. Le test Biotrin IgG IFA a

identifié correctement les 53 positifs, ce qui correspond à une sensibilité de 100%. Cependant, le test IFA n'a pas correctement identifié 2 des échantillons négatifs, ce qui correspond à une spécificité de 92%.

Pour les anticorps Parvovirus B19 IgM, 26 échantillons ont été déterminés positifs et 50 échantillons négatifs. Le test Biotrin IgM IFA a identifié correctement les 50 négatifs, ce qui correspond à une spécificité de 100%. Cependant, le test IFA n'a pas correctement identifié 1 des échantillons positifs, ce qui correspond à une sensibilité de 96%.

Réactions Croisées

100 échantillons de sérums ont été dosés pour définir la spécificité du test Biotrin IgM IFA. Ces échantillons proviennent de patients atteints des maladies suivantes :

Tableau 4 : Etudes des réactions croisées.

Maladies Virales	Nombre de résultats positifs
Virus Zona-Varicella (VZV)	0/5
Facteur Rhumatoïde	0/5
Virus des Oreillons	0/5
Virus de la Rubéole	0/9
Rubéole Scarlatiniforme	0/5
Cytomégalovirus (CMV)	0/13
Virus Epstein-Barr (EBV)	0/12
Virus Herpès Simplex - 1	0/5
Virus Herpès Simplex - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Maladie de Lyme	0/5
Thyroïdite	0/5
Lupus	0/5
Polyarthrite Rhumatoïde (RA)	0/5
Anticorps antinucléaires(ANA)	1/5*

* Cet échantillon a donné des résultats positifs avec le test Biotrin Parvovirus B19 IgM ELISA et le test Parvoblot IgM Westernblot.

Reproductibilité

• Reproductibilité intra-essais

Les résultats suivants ont été obtenus en réalisant le test sur des échantillons à titre positif faible et positif fort en IgG et IgM, avec 3 kits différents d'un même lot de production.

Tableau 5: Reproductibilité intra-essais

DEGRES DE FLUORESCENCE

	Lame N°	IgG Positif	IgG Seuil	Négatif	IgM Seuil	IgM Positif
Kit 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+/-	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• Reproductibilité inter-centres

Les résultats suivants ont été obtenus en testant en triple des échantillons négatifs, positifs faibles, positif modérés, et positifs forts en IgG (tableau 6) et IgM (tableau 7) sur trois jours différents et dans deux centres d'évaluation différents.

Tableau 6 : Reproductibilité inter-centres (IgG)

Enchantillon IgG	Centre 1			Centre 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos faible	pos faible	pos faible	pos	pos	pos
5	pos faible	pos faible	pos faible	pos	pos faible	pos
5	pos faible	pos faible	pos faible	pos	pos	pos
6	pos	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible
6	pos	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible
6	pos	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible	pos faible
7	pos faible	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Contrôle Positif	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Contrôle Négatif	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Pos faible = positif faible

Pos = positif

Neg = négatif

Tableau 7: Reproductibilité inter-centres (IgM)

Échantillon IgM	Centre 1			Centre 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos faible
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos faible	pos faible	pos	pos faible	pos	pos
4	pos faible	pos faible	pos	pos faible	pos	pos faible
4	pos faible	pos faible	pos	pos faible	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	pos faible	pos faible	neg	neg	neg
7	neg	pos faible	pos faible	neg	neg	neg
7	neg	pos faible	pos faible	neg	pos faible	neg
Contrôle Positif	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Contrôle Négatif	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Pos faible = positif faible pos = positif

neg = négatif

Résumé du mode opératoire Parvovirus B19 IFA IgG & IgM

Important:

Lire entièrement la notice avant de commencer le test. Ce résumé n'est qu'un aide-mémoire.

- Pour un test IgG, diluer les échantillons de sérum au 1:64 dans le tampon de lavage.
- Pour un test IgM, faire un prétraitement puis diluer les échantillons à la dilution finale de 1:16.
- Déposer dans les puits 20µl des contrôles positifs et négatifs (prêts à l'emploi) et 20µl de chaque échantillon dilué.
- Incuber les lames à 35-39°C en chambre humide (100% humidité) pendant 3 heures.
- Rincer les lames avec le tampon de lavage
- Pour un test IgG déposer 40µl de conjugué IgG dans chaque puits.

- Pour un test IgM déposer 40µl de conjugué IgM dans chaque puits.
- Incuber à l'obscurité en chambre humide (100% humidité) pendant 30 minutes.
- Laver les lames avec du tampon de lavage.
- Ajouter une goutte de milieu de montage et une lamelle.
- Examiner chaque puits au microscope à fluorescence.

Signification des symboles

IVD

- Matériel médical
pour le diagnostic
in vitro



- Utiliser avant



- Limites de
température

LOT

- Référence du lot



- Fabricant

REF

- Ref. Cat.



Ensayo de inmunofluorescencia para el Parvovirus B19

Un ensayo de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos IgG e IgM frente a Parvovirus B19

Español

Índice De Materias

Uso Al Que Se Destina	73	Conservación y Estabilidad	79
Introducción	73	Recogida y Conservación De Muestras	80
Principio Del Ensayo	75	Preparación De Reactivos y Muestras	80
Componentes Del Kit	75	Procedimiento De Ensayo	81
Materiales suministrados	75	Interpretación De Los Resultados	82
Materiales adicionales no suministrados	77	Límites De Uso	84
Precauciones	77	Características De Rendimiento	84
Seguridad	77	Resumen Del Procedimiento Del IFA Del Parvovirus B19	93
Procedimiento	78	Interpretación de los Símbolos	94
		Bibliografía	165

Uso Al Que Se Destina

El análisis inmunofluorescente para el parvovirus B19 tiene por objeto la detección cualitativa y semicuantitativa de los anticuerpos IgG e IgM anti-parvovirus B19 en el suero humano. La prueba está indicada para utilizarla en todas las mujeres cuando se sospecha la exposición a parvovirus B19 con el fin de determinar la presencia de una infección reciente o actual.

Introducción

El Parvovirus B19 se identificó por primera vez como patógeno humano en 1975. Desde esa fecha, se ha demostrado que el Parvovirus es el agente causante de una serie de afecciones clínicas, como exantema, artralgia y lesiones fetales.^{1,2,3} La infección por Parvovirus B19 en el adulto y en especial en la mujer, puede causar artritis aguda, que puede persistir durante algún tiempo⁴. La infección puede conducir a anemia terminal en pacientes inmunodeprimidos e individuos con

trastornos hemolíticos subyacentes, como enfermedad de células falciformes.^{5,6} El virus es un virus icosaédrico, sin envoltura, de 18 a 25nm de diámetro y compromete un genoma ADN lineal monocatenario (5,5kb), encapsulado en una cápsida externa.^{7,8} La cápsida viral se compone de dos proteínas estructurales: VP1 (83kDa) y VP2 (53kDa). La infección por Parvovirus B19 se adquiere por lo general por contacto directo con secreciones respiratorias, y se produce normalmente en brotes localizados en los meses de invierno y primavera.⁸

En la actualidad, es comúnmente aceptado que las mujeres seronegativas corren el riesgo de verse infectadas por Parvovirus B19.^{9,10} La mayor parte de los embarazos durante los cuales se produce una infección por Parvovirus B19 resultan en un parto con un niño sano;^{10,11,12} sin embargo, la infección durante el embarazo presenta el riesgo de transmisión al feto, lo cual puede resultar en hidropsia fetal o muerte intrauterina. Las estimaciones recogidas en la bibliografía de la tasa

de muerte fetal tras infección maternal varían entre el 1 y el 9%.^{10,13,14} Se ha sugerido que, debido a que el Parvovirus B19 replica predominantemente en las células precursoras de la serie roja, la infección durante el embarazo puede conducir a una muerte fetal por causa de anemia fetal grave. Se piensa que esta anemia grave, que ocasiona un descenso de los niveles de hemoglobina por debajo de 2g/dl, es la causa primaria de la hidropsia fetal.^{15,16}

Los síntomas asociados con la infección por Parvovirus B19 sólo resultan aparentes tras la conclusión de la fase virémica (contagiosa).¹⁰ Se sabe además que en las situaciones en las cuales el contacto estrecho entre individuos es probable, como en ambulatorios y hospitales, el riesgo de transmisión aumenta. Los centros de control de enfermedades (CDC) no recomiendan que las personas que presenten signos de infección parvoviral (p.ej., eritema infeccioso) se excluyan de esos entornos. Sin embargo, se recomienda que se dé a conocer a todos los individuos afectados la posibilidad de transmisión de la enfermedad.¹⁰

Por consiguiente, es importante determinar el estado de los anticuerpos B19 en individuos que pudiesen correr el riesgo de contraer la infección por Parvovirus B19, o que la hayan sufrido con anterioridad.

Los ensayos serológicos son el fundamento del diagnóstico del B19; Biotrin International ofrece una excelente gama de ensayos para el Parvovirus B19 adecuados para las labores regulares de diagnóstico en laboratorio.

- IFA IgG e IgM del Parvovirus B19
Ref. n° V119IF
- EIA IgM del Parvovirus B19
Ref. n° V619IM
- EIA IgM del Parvovirus B19 (Automatizado)
Ref. n° V619IMAUT
- EIA IgG del Parvovirus B19
Ref. n° V519IG
- EIA IgG del Parvovirus B19 (Automatizado)
Ref. n° V519IGAUT

Principio Del Ensayo

El ensayo de inmunofluorescencia para el Parvovirus B19 de Biotrin utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos descrita por primera vez por Coons et al.¹⁷ El suero del paciente se incuba con antígeno recombinante VP1 del Parvovirus B19 en células de insecto estabilizadas en un portaobjetos de vidrio.^{18,19} Si se hallan presentes anticuerpos frente a Parvovirus B19 en la muestra, se forma un complejo estable con el antígeno. El anticuerpo fijado se hace reaccionar entonces con un anticuerpo anti-humano IgG o IgM marcado con fluoresceína y este complejo tripartito se visualiza con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Para evitar interferencias de factores reumatoides y para reducir la competición del IgG en las pruebas IgM, las muestras deberán tratarse previamente con un reactivo absorbente adecuado.

Componentes Del Kit

Materiales suministrados

1. Portaobjetos
Sobre los cuales se ha estabilizado antígeno recombinante del Parvovirus B19 expresado en células de insecto. Bolsa de papel aluminio.
Nº. de ref.: V119 IF Portaobjetos de 6 x 10 pocillos
2. Control positivo** IgM
1 x 250µl de sueros positivos con anticuerpos específicos frente a Parvovirus B19. Contiene tiomersal (0,01%).
Tapón verde.

SLIDE

CONTROL + IgM

3. Control positivo** IgG
1 x 250µl de sueros positivos con anticuerpos específicos frente a Parvovirus B19. Contiene tiomersal (0,01%).

Tapón azul.

CONTROL + IgG

4. Control negativo**
1 x 250µl de sueros de control negativo conteniendo anticuerpos no detectables frente a Parvovirus B19. Contiene tiomersal (0,01%).

Tapón rojo.

CONTROL -

5. Conjugado anti IgM fluorescente
1 x 2ml de anticuerpo IgM anti-humano de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contiene contratinción azul de Evans y tiomersal (0,01%).

Tapón púrpura.

CONJ IgM

6. Conjugado anti IgG fluorescente
1 x 2ml de anticuerpo IgG anti-humano de conejo conjugado a isotiocianato de

fluoresceína (FITC). Contiene contratinción azul de Evans y tiomersal (0,01%).

Tapón amarillo.

CONJ IgG

7. Concentrado de solución tampón de lavado
1 x 45ml de concentrado (25x) Tris de solución tampón salina con Tween 20 (0,25%) y tiomersal (0,01%).

Tapón transparente.

BUF WASH 25X

8. Medio de montaje
1 x 2ml solución tampón Tris-glicerol. Contiene tiomersal (0,001%).

Tapón naranja

MM

9. Prospecto del producto
Instrucciones de empleo.

INS

** Material biológico potencialmente peligroso.

Materiales adicionales no suministrados

- Agua destilada o desionizada de alta calidad.
- Pipetas y micropipetas precisas y puntas desechables, para el manejo de volúmenes de 10µl, 100µl, 1ml y 5ml.
- Equipo para la recogida de suero.
- Cronómetro.
- Material de laboratorio volumétrico limpio.
- Un reactivo absorbente de factor reumatoide e IgG adecuado, con una capacidad mínima de unión a IgG mínima de 18mg/ml.
- Vaso de precipitación de 1L.
- Probetas de dilución y probetas para minicentrífugadora (0,5ml).
- Minicentrífugadora de sobremesa.
- Bandeja de incubación con papel absorbente humedecido.

- Botellas y bandeja de lavado.
- Incubadora a 37°C.
- Cubiertas nº 1 (22 x 50mm).
- Microscopio de fluorescencia con una combinación adecuada de filtros para FITC (filtro de excitación 495nm, filtro barrera 515nm); se recomienda una fuente de luz halógena.
- Marcador de cera.
- Ventilador.

Precauciones

Seguridad

- Para uso únicamente en diagnóstico *in vitro*.
- Está previsto que sólo personal de laboratorio cualificado utilice el equipo.

- Todos los reactivos de origen humano se consideran MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO. Los sueros de control positivos y negativos se analizaron mediante métodos acreditados por la FDA para el HBsAg y los anticuerpos frente al VIH 1/2 y el VHC y se comprobó que eran negativos. Sin embargo, como ninguna prueba puede garantizar completamente la ausencia del virus, hay que tratar a todos los controles como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen timerosal, que puede resultar tóxico si se ingiere.
- Evitar el contacto con el azul de Evans (en conjugados con FITC de IgM e IgG) puesto que se trata de un carcinógeno potencial. Si se produce un contacto con la piel, enjuagar con grandes volúmenes de agua.
- Eliminar todos los especímenes clínicos, el material infectado o potencialmente infectado de acuerdo con las buenas prácticas de

laboratorio. Todos estos materiales deberán manipularse y eliminarse como si se tratase de materiales potencialmente infecciosos.

- Los residuos químicos, así como los componentes del equipo y sus preparaciones generalmente se consideran como nocivos. Todos estos materiales deben eliminarse de acuerdo con las normas de seguridad al uso.
- Durante la manipulación de los especímenes y la realización del ensayo, usar ropas protectoras, guantes desechables de látex y protección para los ojos. Una vez finalizadas las manipulaciones, lavarse concienzudamente las manos.
- No pipetar materiales con la boca y nunca comer ni beber en la superficie de trabajo del laboratorio

Procedimiento

- No utilice el kit ni los reactivos que contiene más allá de su fecha de caducidad.

- No mezcle ni sustituya los reactivos con otros provenientes de kits con diferente número de lote.
- Desviarse del protocolo puede conducir a resultados erróneos.
- Antes de usar los reactivos, deje que alcancen la temperatura ambiente (20 – 25°C) y mézclelos bien.
- Evite exponer los reactivos directamente a la luz solar y/o a temperaturas superiores a 2-8°C durante períodos de tiempo prolongados.
- Evitar la congelación/descongelación repetida de las muestras de suero.
- Cuando se realice la tinción de múltiples muestras en un portaobjetos, evitar la contaminación cruzada entre muestras marcando con un marcador de cera entre los pocillos.
- La aplicación de un exceso de medio de montaje puede ocasionar una fluorescencia borrosa.

- Use siempre recipientes limpios, de preferencia desechables, para cualquier preparación de reactivos.
- Debe poner especial cuidado en no contaminar los componentes y usar siempre puntas de pipeta nuevas para cada muestra y cada componente.
- No arañe el pocillo con la punta de la pipeta o con el cuentagotas.
- Antes de iniciar el ensayo, deberá establecerse un plan de identificación y distribución.

Conservación y Estabilidad

El kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en etiqueta externa de la caja, siempre que se conserve a temperaturas entre 2-8°C.

La solución tampón de lavado diluida es estable durante 6 meses si se almacena a 2-8°C. Desechar inmediatamente si se produce contaminación microbiana.

- Todos los componentes no utilizados deben volver a guardarse a una temperatura de entre 2 y 8°C inmediatamente después del uso del kit.

Recogida y Conservación De Muestras

Las muestras de suero deben obtenerse utilizando técnicas asépticas de laboratorio. Estas muestras podrán conservarse durante un máximo de 24 horas a una temperatura de 2–8°C, y durante períodos más prolongados a una temperatura de –20°C o inferior. Pueden usarse muestras de suero frescas o recientemente congeladas, sin embargo, deberá tenerse cuidado de evitar la congelación/descongelación repetida de las muestras.

Preparación De Reactivos y Muestras

Preparación de reactivos

La solución tampón de lavado se suministra en forma de concentrado líquido (25x). Preparar la solución tampón de lavado para su empleo diluyendo 40 ml de concentrado de solución tampón de lavado en 960ml de agua destilada. Conservar en un recipiente limpio cerrado a 2-8°C, durante un período máximo de seis meses.

El resto de reactivos se ha suministrado listos para su uso y están diluidos al nivel necesario para su utilización.

Preparación y absorción de especímenes

- Prueba cualitativa:

Para una prueba IgG, diluir la muestra de suero del paciente en solución tampón de lavado al 1:64.

Para las pruebas de IgM, las muestras deberán absorberse con un absorbente adecuado para IgG y factor reumatoide (con una capacidad mínima de unión de 18 mg/ml). Preparar una dilución final de suero 1:16 antes de su uso.

- Prueba semicuantitativa:

Para las pruebas IgG, el "título" de la muestra puede determinarse diluyendo serialmente la muestra del paciente en 1:64, 1:256, 1:1024 en solución tampón de lavado o hasta que se consiga una fluorescencia de grado "+1" (ver "Interpretación De Los Resultados").

Para las pruebas IgM, el "título" de la muestra puede determinarse diluyendo serialmente la muestra absorbida del paciente (en 1:16) a 1:64, 1:256 en solución tampón de lavado o hasta que se consiga una fluorescencia de grado "+1" (ver "Interpretación De Los Resultados").

NOTA: La "valoración" de la muestra es la

dilución utilizada para conseguir una fluorescencia de grado '+1'

Nota: las muestras diluidas no deben conservarse. Si fuese necesario repetir una prueba, deberá utilizarse una dilución recién preparada.

Procedimiento De Ensayo

1. Dejar que todos los componentes se equilibren a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarlos.
2. Retirar de sus bolsas el número deseado de portaobjetos.
3. Marcar entre los pocillos con un marcador de cera para evitar la contaminación cruzada.
4. Dispensar 20µl de cada muestra diluida y 20µl de los controles positivos y negativos listos para usar en pocillos numerados.

5. Incubar los portaobjetos en una bandeja de incubación durante 3 horas a 35-39°C y 100% de humedad relativa.
6. Aclarar brevemente el borde de los portaobjetos con solución tampón de lavado usando una botella de lavado. Colocar los portaobjetos en una bandeja de lavado con solución tampón de lavado (20ml/portaobjetos) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Aclarar con la solución tampón de lavado de la botella de lavado y secar los portaobjetos con el ventilador.
7. Para una prueba IgM, dispensar una gota (40µl) de conjugado FITC anti-IgM en cada pocillo. Para una prueba IgG, dispensar una gota (40µl) de conjugado FITC anti-IgM en cada pocillo.
8. Incubar los portaobjetos en la bandeja de incubación en la oscuridad durante 30 minutos a 35-39°C y 100% de humedad relativa.

9. Repetir el procedimiento de lavado descrito anteriormente en el paso 6.
10. Añadir una pequeña gota de medio de montaje al centro de cada pocillo y aplicar una cubierta.
11. Examinar bajo un microscopio de fluorescencia usando un aumento de 400x.

Interpretación De Los Resultados

Negativo : una muestra será considerada negativa para anticuerpos IgG e IgM de Parvovirus B-19 sin no hay fluorescencia visible de los agregados de VP1 (morfología en racimo de uvas).

Positivo: Una muestra puede considerarse positiva para anticuerpos IgM e IgG frente a Parvovirus B19 si se obtiene un resultado fluorescente positivo a una dilución de $\geq 1:16$ y \geq

1:64, respectivamente. La fluorescencia positiva se indica mediante la tinción de los agregados diferenciados de proteína VP1 (morfología de "racimo de uvas"), y puede graduarse como sigue:

+4 = Fluorescencia verde muy brillante: indica una respuesta de anticuerpos del Parvovirus B19 de título muy elevado.

+3 = Fluorescencia verde brillante: indica una respuesta de anticuerpos del Parvovirus B19 de título elevado.

+2 = Fluorescencia verde: indica una respuesta de anticuerpos del Parvovirus B19 de título medio.

+1 = Fluorescencia verde apagado: indica una respuesta de anticuerpos del Parvovirus B19 de título débil. También indica la dilución de punto final o "título" de la muestra.

+/- = Débil fluorescencia verde: indica una posible respuesta de anticuerpos del Parvovirus B19;

confirmar usando la información clínica disponible y otros métodos de detección.

Todos los pocillos incluyen células que no contienen proteína VP1 para permitir la comparación entre células positivas y negativas. Estas células adquieren una tinción roja apagada si se utiliza contratinción azul de Evans.

No específica: Algunos individuos pueden presentar una reacción IgM no específica, que se manifiesta con una débil fluorescencia con un patrón de tinción mal definido a una dilución 1:16 del suero. Este resultado deberá verificarse con un método alternativo (p.ej. EIA, inmunoblot).

Criterios de control de la calidad

Siempre se deben incluir el calibrador (control positivo) y el control negativo para determinar la validez de los resultados del análisis. Se considera que los resultados de un análisis son válidos si se cumplen los siguientes criterios.

1. El control positivo para IgG o IgM produce una fluorescencia superior o igual a +2.
2. El control negativo no da fluorescencia visible de los agregados de VP1 (morfología en racimo de uvas)

Si no se cumplen los criterios mencionados, se considera que el análisis no es válido y se debe repetir.

Límites De Uso

- Para la realización del diagnóstico de infección por Parvovirus B19, los resultados deben corresponderse con el perfil clínico y epidemiológico del paciente y con otros resultados clínicos de laboratorio.
- Un resultado no reactivo (negativo) no excluye la posibilidad de una infección por Parvovirus B19. El desarrollo de una respuesta detectable del anticuerpo puede producirse algunos días después de la infección. En el caso de una

sospecha de infección por Parvovirus B19, un resultado negativo debe seguirse de una repetición de la prueba al cabo de dos semanas.

- La desviación del procedimiento, las instrucciones de interpretación o las precauciones recomendadas puede afectar al rendimiento de la prueba.
- Los resultados de muestras procedentes de pacientes inmunodeprimidos pueden ser difíciles de interpretar.

Características De Rendimiento

Evaluación clínica

Los resultados recogidos en la tabla que figura a continuación se obtuvieron tras someter a prueba sueros de pacientes con síntomas de infección reciente por B19 (paneles de seroconversión) con el IFA IgM de Biotrin y un método RIA.¹⁷

Tabla 1: Resultados de la evaluación clínica

<i>Días después del inicio</i>	<i>IFA del IgM de Biotrin</i>		<i>RIA del IgM</i>	
	<i>Nº de IgM positivos</i>	<i>%IgM positivos</i>	<i>Nº de IgM positivos</i>	<i>%IgM positivos</i>
1 - 5	26/29	89,6	26/29	89,6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22,2	NT	NT

Seroprevalencia

En total, se analizaron 201 muestras de donantes de sangre sanos seleccionados al azar utilizando el análisis inmunofluorescente para parvovirus B19 de Biotrin para los anticuerpos IgG e IgM contra parvovirus B19 (IgG=201, IgM=200). Ciento treinta y ocho muestras de suero fueron positivas para IgG, lo que representa el 68,7% de las muestras analizadas, mientras que sólo 2 muestras (1%) fueron positivas para IgM. Estos resultados concuerdan con estudios de seroprevalencia incluidos en la bibliografía^{20, 21}.

Sensibilidad y especificidad

Los Centres for Disease Control and Prevention (CDC), mantienen un grupo de sueros de parvovirus B19 que sirve como control interno y referencia para su programa de análisis referente al parvovirus B19. Las muestras se caracterizaron por los síntomas clínicos asociados a una

infección por parvovirus B19. La mayoría de estos pacientes eran mujeres con exposiciones domiciliarias a niños sintomáticos, o profesores de escuelas primarias con brotes de eritema infeccioso. Este grupo también se ha analizado utilizando el virus natural de los CDC EIA²² contra el parvovirus B19, IgG EIA contra el parvovirus B19 de Biotrin e IgM EIA contra el parvovirus B19 de Biotrin. Se analizó una selección de sueros del grupo bien caracterizado de los CDC (n=30) utilizando IgG e IgM IFA contra el parvovirus de Biotrin. En las tablas 2 y 3 se muestra una comparación de los resultados de los distintos métodos.

Tabla 2 Comparación de IgG e IgM IFA de Biotrin con el análisis del virus natural de los CDC.

		Análisis del virus natural de los CDC*							
		IgG contra el parvovirus B19				IgM contra el parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IgG e IgM IFA contra el parvovirus B19 de Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

* Solo se analizaron 27 de las 30 muestras con respecto al análisis del virus natural de los CDC.

Tabla 3 Comparación de IgG e IgM IFA de Biotrin con los análisis de IgG e IgM EIA contra el parvovirus B19 de Biotrin.

		EIA contra el Parvovirus B19 de Biotrin							
		IgG contra el parvovirus B19				IgM contra el parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IgG e IgM IFA contra el parvovirus B19 de Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positivo

Neg = negativo

Equív = equívoco

Sensibilidad = Verdaderos positivos dividido por (verdaderos positivos + falsos negativos + equívocos) x 100
 % de sensibilidad = 100%

Especificidad = Verdaderos negativos dividido por (verdaderos negativos + falsos positivos + equívocos) x 100
 % de especificidad = 100%

Se evaluaron 76 muestras en el Laboratorio de referencia para virus para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM empleando 4 métodos de cribado diferentes: análisis de IgG e IgM EIA contra parvovirus de Hillcrest Biologicals (EIA), análisis de transferencia western del Laboratorio de referencia de microbiología (WB), análisis por RIA de VRL Colindale (RIA) y análisis IFA de Biotrin (IFA). Se compararon los 4 métodos de cribado para cada anticuerpo (IgG e IgM). Se consideró un resultado medio cuando el cribado de al menos 3 de los 4 métodos coincidió o cuando al menos 2 de 3 métodos coincidieron (cuando el otro método era equívoco).

En el caso de los anticuerpos IgG contra el parvovirus B19, se determinó que 53 muestras eran positivas y 23, negativas. El IFA para IgG de Biotrin identificó las 53 muestras positivas, arrojando una sensibilidad del 100%; sin embargo, el IFA identificó incorrectamente 2 de las muestras negativas, arrojando una especificidad del 92%.

En el caso de los anticuerpos IgM contra el parvovirus B19, se determinó que 26 muestras eran positivas y 50, negativas. El IFA para IgM de Biotrin identificó correctamente las 50 muestras negativas, arrojando una especificidad del 100%; sin embargo, el IFA identificó incorrectamente de las muestras positivas, arrojando una sensibilidad del 96%.

Reactividad cruzada

Se analizaron 100 muestras de suero para establecer la especificidad del IFA para IgM de Biotrin. Todas las muestras se obtuvieron de pacientes con las siguientes enfermedades:

Tabla 4: Estudios de reactividad cruzada

Virus	Número de positivos
Virus de la varicela-zoster	0/5
Factor reumatoide	0/5
Parotiditis	0/5
Rubéola	0/9
Sarampión	0/5
CMV	0/13
VEB	0/12
Virus del herpes simple 1	0/5
Virus del herpes simple 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Enfermedad de Lyme	0/5
Tiroiditis	0/5
Lupus	0/5
Artritis reumatoide (AR)	0/5
ANA	1/5*

* Esta muestra también dio un resultado positivo utilizando IgM EIA contra el parvovirus de Biotrin y el análisis de transferencia western para IgM Parvoblot.

Reproducibilidad

• Reproducibilidad intra-ensayo

Los siguientes resultados se obtuvieron cuando se examinaron muestras de IgG e IgM de título negativo, bajo, medio y alto con tres kits de un lote de producción.

Tabla 5 Reproducibilidad intra-ensayo

Portaob. nº	IgG positivo	IgG límite	Negativo	IgM límite	IgM positivo
Kit 1					
1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2					
1	+4	+1/2	-	+1	+2
2	+4	+2	-	+/-	+2
3	+4	+1/2	-	+/-	+2
4	+4	+1/2	-	+1	+2
5	+4	+1/2	-	+/-	+2
6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3					
1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
2	+3	+1	-	+/-	+2
3	+3	+1	-	+1	+2
4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
5	+3	+1/2	-	+/-	+2
6	+3	+1	-	+1	+2

• Reproducibilidad intercentros

Los siguientes resultados se obtuvieron al examinar muestras de IgG e IgM de título negativo, bajo, medio y alto por triplicado, en tres días diferentes, en dos centros de evaluación independientes.

Tabla 6 Reproducibilidad intercentros (IgG)

Muestra IgG	Centro 1			Centro 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos débil	pos débil	pos débil	pos	pos	pos
5	pos débil	pos débil	pos débil	pos	pos débil	pos
5	pos débil	pos débil	pos débil	pos	pos	pos
6	pos	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil
6	pos	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil
6	pos	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil	pos débil
7	pos débil	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Control positivo	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Control negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Pos. débil = positivo débil

Pos. = positivo

Neg. = negativo

Tabla 7 Reproducibilidad intercentros (IgM)

Muestra IgM	Centro 1			Centro 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos. débil
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos. débil	pos. débil	pos	pos. débil	pos	pos
4	pos. débil	pos. débil	pos	pos. débil	pos	pos. débil
4	pos. débil	pos. débil	pos	pos. débil	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg.	pos. débil	pos. débil	neg.	neg.	neg.
7	neg.	pos. débil	pos. débil	neg.	neg.	neg.
7	neg.	pos. débil	pos. débil	neg.	pos. débil	neg.
Control Positivo	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Control negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Pos. débil = positivo débil

Pos. = positivo

Neg = negativo

Resumen del procedimiento del ensayo de IF IgG e IgM frente a Parvovirus B19

Nota importante

Por favor, lea el folleto de instrucciones de producto en su totalidad antes de iniciar el ensayo.

Este resumen se incluye únicamente a modo de guía rápida.

- Para una prueba IgG diluir las muestras de suero del paciente en solución tampón de lavado 1 en 64.
- Para una prueba IgM las muestras absorbidas deberán diluirse hasta una dilución final de 1 en 16.
- Pipetar 20µl de control positivo (listo para usar) 20µl de control negativo (listo para usar) y 20µl de muestras preparadas en los pocillos

- Incubar durante 3 horas a 35-39°C, 100% humedad.
- Lavar los portaobjetos con solución tampón de lavado.
- Para una prueba IgG añadir 40µl de conjugado IgG a cada pocillo.
- Para una prueba IgM añadir 40µl de conjugado IgM a cada pocillo.
- Incubar durante 30 min. en la oscuridad a 35-39°C, 100% humedad relativa.
- Lavar los portaobjetos con solución tampón de lavado.
- Añadir medio de montaje a cada pocillo.
- Examinar bajo un microscopio de fluorescencia.

Interpretación de los Símbolos

IVD

- Aparato medico
para diagnostica
in vitro



- User antes de



- Limitación de
temperatura

LOT

- Código de lote



- Fabricante

REF

- No. de catálogo



Parvovirus B19
Immunofluorescensassay

Svenska

Immunofluorescensassay för påvisande av IgG- och IgM-antikroppar mot parvovirus B19.

Innehållsförteckning

Avsedd användning	97	Preparering av prov och reagens	103
Inledning	97	Utförande av assay	104
Assayprincip	99	Tolkning av resultat	105
Komponenter som ingår i satsen	99	Testets begränsningar	107
Material som tillhandahålls	99	Procedurens egenskaper	108
Ytterligare material som krävs	100	Sammanfattning av parvovirus IFA-proceduren	116
Försiktighetsmått	101	Tolkning av symboler	116
Säkerhet	101	Bibliografi	165
Utförande	102		
Förvaring och hållbarhet	103		
Provtagning och -förvaring	103		

Avsedd användning

Parvovirus B19 immunofluorescensassay är avsedd för kvalitativt och semikvantitativt påvisande av IgG- och IgM-antikroppar mot parvovirus B19 i humant serum. Testet är indikerat för användning på alla kvinnor som man misstänker har utsatts för parvovirus B19 för att fastställa närvaro av nyligen inträffad eller pågående infektion.

Inledning

Parvovirus B19 identifierades först som mänskligt patogen år 1975 och har sedan dess visats vara orsaken till ett antal kliniska tillstånd såsom hudutslag, artralgi och fosterskada^{1,2,3}. Infektion med parvovirus B19 hos vuxna, särskilt kvinnor, kan leda till akut artrit som kan bestå en längre tid⁴. Infektion kan även orsaka livshotande anemi hos patienter med nedsatt immunförsvar och personer med underliggande hemolytiska rubbningar såsom sicklecell-sjukdom^{5,6}. Viruset är icosahedralt, saknar hölje, har en diameter på 18 – 25nm och består av

ett linjärt enkeltrådigt DNA-genom (5,5kb) innesluten i en yttre kapsid^{7,8}. Viruskapsiden omfattar två strukturella proteiner nämligen VP1 (83kDA) och VP2 (53kDA). Parvovirus B19-infektion uppstår normalt vid direkt kontakt med respirationssekret och inträffar vanligen vid lokala utbrott under vinter- och vårmånaderna⁸.

Man har nu accepterat att seronegativa kvinnor är mottagliga för parvovirus B19-infektion^{9,10}. De flesta graviditeter under vilka infektion med parvovirus B19 inträffar leder till nedkomst av ett friskt foster vid 40 veckor^{10,11,12}. Infektion under graviditet medför emellertid risk för överföring till fostret vilket kan leda till hydrops foetalis eller intrauterin död. I litteraturen har frekvensen fosterdödsfall efter modersinfektion beräknats ligga mellan 1 och 9%^{10,13,14}. Eftersom replikationen av parvovirus B19 huvudsakligen sker i förelöpare till röda blodkroppar, har man antytt att infektion under graviditet kan leda till fosterdöd på grund av allvarlig fosteranemi. Man tror att denna svåra anemi, vid vilken hemoglobinnivån går ned till

mindre än 2g/dl, är den primära orsaken till hydrops foetalis^{15,16}.

Symptomen som förknippas med parvovirus B19-infektion visar sig först när det viremiska (smittsamma) stadiet är över¹⁰. Dessutom är det känt att en större smittorisk föreligger i situationer där nära kontakt mellan personer är vanlig som till exempel i skolor, på daghem och på sjukhus. Centres for Disease Control (CDC) rekommenderar inte att personer som uppvisar tecken på parvovirusinfektion (t.ex. erythema infectiosum) skall uteslutas från sådana miljöer. Dock rekommenderar man att alla berörda personer skall informeras om möjligheten av överföring av sjukdomen¹⁰.

Det är därför viktigt att identifiera parvovirus B19 antikroppsstatus hos personer som utsätts för risken för infektion eller som har infekterats med parvovirus B19.

Serologiska assays är grundvalen vid diagnos av B19 och Biotrin International erbjuder en unik serie parvovirus B19 assays som är lämpliga för rutinmässig laboratoriediagnostik.

- Parvovirus B19 IgG and IgM IFA
Katalognummer V119IF
- Parvovirus B19 IgM EIA
Katalognummer V619IM
- Parvovirus B19 IgM EIA (Automate)
Katalognummer V619IMAUT
- Parvovirus B19 IgG EIA
Katalognummer V519IG
- Parvovirus B19 IgG EIA (Automate)
Katalognummer V519IGAUT

Assayprincip

Biotrins parvovirus B19 immunofluorescensassay använder den indirekta immunofluorescensstekniken för antikroppar som först beskrevs av Coons et al¹⁷. Patientserum inkuberas med parvovirus B19 rekombinant VP1-antigen i insektsceller som har stabiliserats på objektglas^{18,19}. Om det finns antikroppar mot parvovirus B19 i provet bildas ett stabilt komplex med antigenet. Den bundna antikroppen får därefter reagera med en fluorescensmärkt anti-human IgG-eller IgM-antikropp och detta trekomponentskomplex visualiseras med användning av ett fluorescensmikroskop. Inblandning av reumatoida faktorer (Rf) kan undvikas och IgG-konkurrensen i IgM-testet kan minskas genom att man förbehandlar proverna med ett lämpligt adsorberande reagens.

Komponenter som ingår i satsen

Material som tillhandahålls

1. Objektglas – 6x10 objektglas med brunnar

SLIDE

i vilka rekombinant parvovirus B19-antigen uttryckt i insektsceller har stabiliserats. Foliepåse.
2. IgM Positive Control**

CONTROL	+	IgM
---------	---	-----

1 x 250µl positivt serumprov som innehåller specifika B19-antikroppar mot parvovirus. Innehåller tiomersal (0,01%). Grönt lock.
3. IgG Positive Control**

CONTROL	+	IgG
---------	---	-----

1 x 250µl positivt serumprov som innehåller specifika B19-antikroppar mot parvovirus. Innehåller tiomersal (0,01%). Blått lock.

4. Negative Control**

CONTROL -

1 x 250µl negativt kontrollserumprov som inte innehåller påvisbara B19 antikroppar mot parvovirus. Innehåller tiomersal (0,01%). Rött lock.

5. Fluorescent anti-IgM Conjugate

CONJ IgM

1 x 2ml anti-human IgM-kaninantikropp konjugerad till fluorescerande isotiocyanat (FITC). Innehåller Evans Blue motfärgningsämne och tiomersal (0,01%). Lila lock.

6. Fluorescent anti-IgG Conjugate

CONJ IgG

1 x 2ml anti-human IgG-kaninantikropp konjugerad till fluorescerande isotiocyanat (FITC). Innehåller Evans Blue motfärgningsämne och tiomersal (0,01%). Gult lock.

7. Wash Buffer Concentrate (Koncentrat till tvättvätska)

BUF WASH 25X

1 x 45ml koncentrat (25x) Tris-buffertsaltlösning med Tween 20 (0,25%) och tiomersal (0,01%). Genomskinligt lock.

8. Mounting Media (Monteringsmedium)

MM

1 x 2ml Tris-glycerolbuffert. Innehåller tiomersal (0,001%). Orange lock.

9. Bipacksedel

INS

Bruksanvisningar.

** Möjligt biologiskt farligt material

Ytterligare material som behövs

- Destillerat eller avjoniserat vatten av hög kvalitet.

- Exakta pipetter, mikropipetter och engångsspetsar för 5µl till 50µl, 50µl till 200µl.

- Utrustning för serumprovtagning

- Timer

- Rena volymetriska laboratorieglaskärl

- Lämpligt Rf och IgG adsorberande reagens med IgG-bindningskapacitet på minst 18mg/ml

- Bägare på 1liter

- Utspädningsrör och minicentrifugsrör (0,5ml).

- Minicentrifug, bordsmodell

- Inkubationsenhet med fuktat mjukpapper

- Tvättflaskor och tvättenhet

- 37°C inkubator

- Täckglas, nr 1 (22 x 50mm)

- Fluorescensmikroskop med lämplig filterkombination för FITC (excitationsfilter 495nm, spärrfilter 515nm), halogenljuskälla rekommenderas.

- Vaxpenna

- Fläkt

Försiktighetsmått

Säkerhet

- Avsett endast för in vitro diagnostisk användning.
- Materialet är avsett för användning endast av kvalificerad laboratoriepersonal.
- Alla reagenser av mänskligt ursprung anses vara POTENTIELLT MILJÖFARLIGA MATERIAL. Satsens positiva och negativa kontrollserumprover har testats enligt FDA-godkända metoder med avseende på HBsAg och antikroppar mot HIV 1/2 och HCV och har befunnits vara negativa. Behandla ändå alla kontrollprodukter som potentiellt infektiösa eftersom inget test kan fastställa absolut frånvaro av virus.
- Vissa reagenser innehåller tiomersal som kan vara toxiskt vid förtäring.
- Undvik kontakt med Evans Blue (i FITC IgM- och IgG-konjugat) eftersom medlet är ett potentiellt

karcinogen. Om medlet kommer i kontakt med huden, skölj med stora mängder vatten.

- Kassera alla kliniska prover, infekterat eller eventuellt infekterat material enligt god laboratoriesed. Alla sådana material skall behandlas och kasseras som potentiellt infektiösa.
- Rester av kemikalier, preparat och satskomponenter anses allmänt vara farligt avfall. Alla sådana material skall behandlas och kasseras som potentiellt infektiösa.
- Använd skyddskläder, engångshandskar i gummi och ögonskydd när du hanterar prover och utför en assay. Tvätta händerna noggrant när du är klar.
- Dra inte upp material i en pipett från munnen. Ät och drick inte vid laboratoriebänken.

Utförande

- Använd inte satsen eller enskilda reagenser efter deras utgångsdatum.
- Blanda inte reagenser från satser med olika satsnummer.
- Avvikelse från det tillhandahållna protokollet kan ge felaktiga resultat.
- Låt alla reagenser uppnå rumstemperatur (20 – 25°C) och blanda dem väl före användning.
- Lämna inte reagenser i direkt solljus och/eller vid temperatur utanför området 2-8°C under längre perioder.
- När du färgar flera prover på ett objektglas, förebygg korskontaminering mellan prover genom att märka med en vaxkrita mellan fördjupningarna.
- Applicering av alltför stor buffertmängd kan leda till otydlig fluorescens.
- Använd alltid rena glaskärl, helst av engångstyp, för alla reagenspreparat.

- Försiktighet måste iakttas så att komponenter inte kontamineras. Använd alltid en ny pipettspets för varje prov och komponent.
- Skrapa inte brunnen med pipettspetsen eller droppglaset.
- Innan en assay startas bör en identifierings- och distributionsplan upprättas.

Förvaring och hållbarhet

- Satsen förblir stabil fram till utgångsdatumet som anges på etiketten på den yttre förpackningen förutsatt att den förvaras vid 2 – 8°C.
- Utspädd tvättvätska är stabil i 6 månader vid förvaring vid 2-8°C. Kassera omedelbart om mikrobkontaminering inträffar.
- Alla oanvända komponenter skall återställas till förvaring vid 2-8°C omedelbart efter användning.

Provtagning och -förvaring

Serumprover skall erhållas med användning av aseptisk laboratorieteknik. Dessa prover kan förvaras i upp till 24 timmar vid 2-8°C och över längre perioder vid –20°C eller lägre temperatur. Färsk eller färskfrysta serumprover får användas men proverna bör inte frysas och tinas flera gånger.

Preparering av prov och reagens

Preparering av reagens

Tvättvätska levereras i form av flytande koncentrat (25x). Förbered tvättvätskan för användning genom att späda ut 40ml koncentrat i 960ml destillerat vatten. Förvara i ren, sluten behållare vid 2-8°C i upp till 6 månader.

Alla återstående reagenser är utspädda och klara för användning.

Preparering och absorption av prover

- Kvalitativt test:

För ett IgG-test skall patientens serumprov spädas ut i tvättvätska i förhållandet 1:64.

För IgM-tester skall proverna adsorberas med lämplig adsorbent för IgG och reumatoid faktor (med bindningskapacitet på minst 18 mg/ml). En slutlig serumkoncentration på 1:16 skall förberedas före användningen.

- Semikvantitativt test:

För IgG-tester kan provets titer fastställas genom att patientprovet spädes ut 1:64, 1:256, 1:1024 i turordning i tvättvätska eller tills fluorescens i graden +1 uppnås (se "Tolkning av resultat").

För IgM-tester fastslås provets titer genom att göra en serie spädningar från 1:16 spädningen av det adsorberade patientprovet till 1:64, 1:256 i tvättvätska eller tills fluorescens graden +1 uppnås (se "Tolkning av resultat").

Obs! Provets titer är den koncentration som används för att uppnå fluorescens i graden + 1.

Obs! Utspädda prover bör inte förvaras. Om ett test måste upprepas skall ett färskt preparat användas.

Utförande av assay

1. Låt alla komponenter uppnå rumstemperatur (20-25°C) före användning.
2. Ta fram önskat antal objektglas ur foliepåsarna.
3. Markera mellan brunnarna med en vaxkrita för att undvika korskontaminering.
4. Tillför 20µl av varje utspätt prov och 20µl av de användningsklara positiva och negativa kontrollproverna i de numrerade brunnarna.
5. Inkubera objektglasen i en inkubationsenhet i 3 timmar vid 35-39°C och 100% fuktighet.

6. Tvätta objektglasen snabbt längs kanten med tvättvätska och användning av en tvättflaska. Placera objektglasen i en tvättenhet som innehåller tvättvätska (20ml/objektglas) i 10 minuter vid rumstemperatur (20-25°C). Skölj med tvättvätska från tvättflaskan och fläkttorka objektglasen.
7. För ett IgM-test tillför en droppe (40µl) anti-IgM FITC-konjugat i varje fördjupning. För ett IgG-test tillför en droppe (40µl) anti-IgG FITC-konjugat i varje fördjupning.
8. Inkubera objektglasen i inkubationsenheten i mörker i 30 minuter vid 35-39°C och 100% fuktighet.
9. Upprepa tvätten som beskrivs i steg 6 ovan.
10. Tillför en liten droppe monteringsmedium i mitten av varje fördjupning och lägg på ett täckglas.
11. Undersök proverna i ett fluorescensmikroskop med användning av 400 x förstoring.

Tolkning av resultat

Negativt: Ett prov anses vara negativt med avseende på parvovirus B19 IgM- och IgG antikroppar om det inte finns några synliga fluorescens av VPI aggregaterna på cellytan ("druvklase" morfolgi).

Positivt: Ett prov kan anses positivt med avseende på parvovirus B19 IgM- och IgG- antikroppar om ett positivt fluorescensresultat erhålls vid en koncentration på $\geq 1:16$ respektive $\geq 1:64$. Positiv fluorescens indikeras av färgning av de distinkta VP1- proteinaggregaten ("druvklase"-morfolgi) och kan graderas på följande sätt:

+4 = Starkt grön fluorescens indikerar parvovirus B19 antikroppssvar med mycket hög titer.

+3 = Klart grön fluorescens indikerar parvovirus B19 antikroppssvar med hög titer.

+2 = Grön fluorescens indikerar parvovirus B19 antikroppssvar med medelhög titer.

+1 = Matt grön fluorescens indikerar parvovirus B19 antikroppssvar med svag titer. Anger också slutpunktskoncentrationen eller provets titer.

+/- = Svagt grön fluorescens indikerar potentiellt parvovirus B19 antikroppssvar – bekräftas med tillgänglig klinisk information och andra metoder för påvisande.

Celler som inte innehåller VP1-protein placeras i varje fördjupning för att positiva och negativa celler skall kunna jämföras. Dessa färgas blodröda med Evans Blue motfärgningsämne.

Ospecifikt: Vissa personer kan uppvisa en ospecifik IgM-reaktion som indikeras av svag fluorescens med ett dåligt definierat färgmönster vid serumkoncentrationen 1:16. Ett sådant resultat bör kontrolleras med en alternativ metod (t.ex. EIA, Immunoblot).

Kriterier för kvalitetskontroll

Kalibreraren (positiva kontrollprover) och negativa kontrollprover måste alltid användas när man fastställer testresultatets giltighet. Resultaten av en assay anses giltiga om följande kriterier uppfylls.

1. IgG och/eller IgM positiva kontrollprover ger en fluorescens som är större än eller lika med +2.

2. De negativa kontrollen ger ingen synlig fluorescens av VPI aggregaterna ("druvklase" morfologi).

Om ovanstående kriterier inte uppfylls anses en assay ogiltig och måste upprepas.

Testets begränsningar

- Resultat måste koordineras med patientens kliniska och epidemiologiska profil och andra kliniska laboratorieresultat vid diagnos av parvovirus B19-infektion.
- Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten av parvovirus B19-infektion. Utvecklingen av påvisbart antikroppssvar kan inträffa några dagar efter infektionens debut. I fall av misstänkt infektion med parvovirus B19 skall ett negativt resultat följas upp av ett upprepat test två veckor senare.
- Testets tillförlitlighet kan påverkas av avvikelser från protokollet, tolkning eller rekommenderade försiktighetsmått.
- Testresultaten på prover från patienter med nedsatt immunförsvar kan vara svåra att tolka.

Procedurens egenskaper

Klinisk bedömning

Följande resultat erhöles när serumprover från patienter med symptom på nyligen inträffad B19-infektion (serokonversionsprover) testades med användning av Biotrin IgM IFA och en RIA-metod¹⁷.

Tabell 1 Kliniska bedömningsresultat

Dagar efter debut	Biotrin IgM IFA		IgM RIA	
	Antal IgM positiva	%IgM positiva	Antal IgM positiva	%IgM positiva
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

Seroprevalens

Sammanlagt 201 prover från slumpvis utvalda friska blodgivare testades med användning av Biotrin parvovirus B19 immunofluorescensassay med avseende på parvovirus B19 IgG- och IgM-antikroppar (IgG=201, IgM=200). 138 serumprover var IgG-positiva vilket representerar 68,7% av de screenade proverna, medan endast 2 prover (1%) var IgM-positiva. Resultaten stämmer överens med studier av seroprevalens som har rapporterats i litteraturen.^{20, 21}

Sensitivitet och specificitet

Centres for Disease Control and Prevention (CDC), upprätthåller en samling parvovirus B19-serumprover vilka används som interna kontroll- och referensparametrar för centrets testprogram för parvovirus B19. Proverna kännetecknas av kliniska symptom förknippade med parvovirus B19-infektion. Majoriteten av patienterna var kvinnor som exponerades för symptomatiska barn i hemmet eller lärare vid lågstadieskolor med

utbrott av erythema infectiosum. Samlingen har också testats med användning av CDC Parvovirus B19 naturligt virus EIA²², Biotrins Parvovirus B19 IgG EIA och Biotrins Parvovirus B19 IgM EIA. Ett urval serumprover från den väl kännetecknade CDC-samlingen (n=30) testades med Biotrin Parvovirus B19 IgG och IgM IFA. En jämförelse av resultaten från testerna med de olika metoderna visas i tabeller 2 och 3.

Tabell 2 Jämförelse av Biotrin IgG och IgM IFA med CDC:s assay för nativt virus.

		CDC assay för naturligt virus*							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Tvet	Tot	Pos	Neg	Tvet	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG och IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Tvet	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

Endast 27 av de 30 proverna testades med CDC:s assay för naturligt virus..

Tabell 3 Jämförelse av Biotrin IgG och IgM IFA med Biotrin Parvovirus B19 IgG och IgM EIA assays.

		Biotrins Parvovirus B19 EIA							
		Parvovirus B19 IgG				Parvovirus B19 IgM			
		Pos	Neg	Tvet	Tot	Pos	Neg	Tvet	Tot
Biotrin Parvovirus B19 IgG och IgM IFA	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Tvet	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positivt

Neg = negativt

Tvet = tvetydigt

Sensitivitet = $\frac{\text{Sant positiva}}{\text{Sant positiva} + \text{falskt negativa} + \text{tvetydiga}} \times 100$
Sensitivitet i % = 100%

Specificitet = $\frac{\text{Sant negativa}}{\text{Sant negativa} + \text{falskt positiva} + \text{tvetydiga}} \times 100$
Specificitet i % = 100%

76 prover utvärderades vid Virus Reference Lab Storbritannien med avseende på närvaro av IgG och IgM-antikroppar. 4 olika screening-metoder tillämpades – Hillcrest Biologicals Parvovirus IgG och IgM EIA assay (EIA), Microbiology Reference Lab Western Blot assay (WB), VRL Colindale RIA assay (RIA) och Biotrin IFA assay (IFA). De 4 screening-metoderna för varje antikropp (IgG och IgM) jämfördes. Ett resultat betraktades som genomsnittligt när screening med minst 3 av 4 metoder överensstämde med varandra eller när minst 2 av 3 metoder överensstämde (när den återstående metoden var tvetydig).

För parvovirus B19 IgG-antikroppar fastställdes 53 prover som positiva och 23 prover som negativa. Biotrin IgG IFA identifierade korrekt de 53 positiva proverna vilket uppvisade en sensitivitet på 100%. Dock identifierade IFA 2 av de negativa proverna felaktigt vilket gav en specificitet på 92%.

För parvovirus B19 IgM-antikroppar fastställdes 26 prover som positiva och 50 prover som negativa. Biotrin IgM IFA identifierade korrekt de 50 negativa proverna vilket uppvisade en specificitet på 100%. Dock identifierade IFA 1 av de positiva proverna felaktigt vilket gav en sensitivitet på 96%.

Korsreaktivite

100 serumprov sållades för att man skulle kunna fastställa specificiteten hos Biotrin IgM IFA. Alla prover erhöles från patienter med följande sjukdomar:

Tabell 4 Korsreaktiva studier

Virus	Antalet positiva
Varicella zoster-virus	0/5
Reumatoid faktor	0/5
Påssjuka	0/5
Rubella	0/9
Mässling	0/5
CMV	0/13
EBV	0/12
Herpes simplex virus - 1	0/5
Herpes simplex virus - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Lyme-borrelios	0/5
Tyroidit	0/5
Lupus	0/5
Reumatoid artrit (RA)	0/5
ANA	1/5*

* Provet gav också ett positivt resultat vid användning av Biotrins Parvovirus B19 IgM EIA och Parvoblot IgM Westernblot assay.

Reproducerbarhet

• Reproducerbarhet vid olika assays

Följande resultat erhöles när negativ, låg och hög titer IgG- och IgM-prover undergick screening i tre satser från samma tillverkningsgrupp.

Tabell 5 Reproducerbarhet vid olika assays

FLUORESCENSGRAD

	Objektglas nr.	IgG positiva	IgG bryt-punkt	Negativa	IgM bryt-punkt	IgM positiva
Sats 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Sats 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+/-	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Sats 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• **Reproducerbarhet vid olika platser**

Följande resultat erhöles när negativ, låg, mellanhög och hög titer IgG-prover (tabell 6) och IgM-prover (tabell 7) undergick screening tre gånger på 3 olika dagar vid två oberoende utvärderingsplatser

Tabell 6 Reproducerbarhet vid olika platser (IgG)

IgG prov	Plats 1			Plats 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	Sv pos	Sv pos	Sv pos	pos	pos	pos
5	Sv pos	Sv pos	Sv pos	pos	Sv pos	pos
5	Sv pos	Sv pos	Sv pos	pos	pos	pos
6	pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos
6	pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos
6	pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos
7	Sv pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Positiv kontroll	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Negativ kontroll	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Sv pos = svagt positiv

Pos = positiv

Neg = negativ

Tabell 7 Reproducerbarhet vid olika platser (IgM)

IgM prov	Plats 1			Plats 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	Sv pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	Sv pos	Sv pos	pos	Sv pos	pos	pos
4	Sv pos	Sv pos	pos	Sv pos	pos	Sv pos
4	Sv pos	Sv pos	pos	Sv pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	Sv pos	Sv pos	neg	neg	neg
7	neg	Sv pos	Sv pos	Sv pos	neg	neg
7	neg	Sv pos	Sv pos	Sv pos	Sv pos	neg
Positiv kontroll	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Negativ kontroll	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Sv pos = svagt positiv

Pos = positiv

Neg = negativ

Sammanfattning av parvovirus IFA-proceduren

Viktig anmärkning!







Läs de fullständiga produktanvisningarna innan du startar assay-förloppet.

Denna sammanfattning är endast avsedd som snabbreferens.

- För ett IgG-test späd ut patientens serumprov med tvättvätska i förhållandet 1 till 64
- För ett IgM-test skall adsorberade prover spädas ut till en slutlig koncentration om 1 på 16
- Tillför med pipett 20µl positiv kontroll (klar att använda), 20µl negativ kontroll (klar att använda) och 20µl preparerade prover i fördjupningarna
- Inkubera i 3 timmar vid 35-39°C, 100% fuktighet
- Tvätta objektglaset med tvättvätska
- För ett IgG-test lägg till 40µl IgG-konjugat i varje brunn

- För ett IgM-test lägg till 40µl IgM-konjugat i varje brunn
- Inkubera i 30 min i mörker vid 35-39°C, 100% fuktighet
- Tvätta objektglaset med tvättvätska
- Fyll på monteringsmedium i varje brunn
- Undersök i fluorescensmikroskop

Tolkning av symboler

	- <i>In vitro diagnostiskt medicinskt hjälpmedel</i>		- Använd före
	- Temperaturbegränsning		- Partikod
	- Tillverkare		- Kat. nr



Parvovirus B19 IgG E IgM IFA

Test in immunofluorescenza per la determinazione degli anticorpi IgG e IgM anti-Parvovirus B19

Italiano

Indice

Indicazioni d'Uso	119	Raccolta e Conservazione del Campione	126
Introduzione	119	Preparazione del Reagente e del Campione	126
Principio del Test	121	Procedura del Test	127
Componenti del Kit	121	Interpretazione dei Risultati	128
Materiali Forniti	121	Restrizioni nell'Uso	130
Ulteriori Materiali Richiesti	122	Prestazioni del Test	131
Precauzioni	123	Riassunto della Procedura IFA per IgG e IgM Anti-Parvovirus B19	139
Sicurezza	123	Simboli	140
Procedura	125	Bibliografia	165
Conservazione e Stabilità	126		

Indicazioni d'Uso

Il test in immunofluorescenza per Parvovirus B19 è destinato alla determinazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgG e IgM anti-Parvovirus B19 nel siero umano. Il test può essere utilizzato per determinare l'esistenza di infezione recente o in corso in tutte le donne che presentino una sospetta esposizione a Parvovirus B19.

Introduzione

Parvovirus B19 è stato identificato per la prima volta come agente patogeno umano nel 1975 e successivamente è stato riconosciuto come la causa di diverse condizioni cliniche come eruzioni cutanee, artralgia e danni fetali^{1,2,3}. Negli adulti, e in particolare nelle donne, l'infezione da Parvovirus B19 può provocare artrite acuta, la cui durata può essere prolungata⁴. Nei pazienti immunocompromessi e nei soggetti affetti da disturbi emolitici come anemia falciforme, l'infezione essere causa di anemia letale^{5,6}. Si tratta

di un virus icosaedrico di 18-25 nm di diametro, sprovvisto di envelope, con genoma a DNA a filamento singolo lineare (5,5 kb), circondato da un capsid esterno^{7,8}. Il capsid virale è composto da due proteine strutturali, VP1 (83 kDA) e VP2 (53 kDA). L'infezione da Parvovirus B19 si contrae solitamente per contatto diretto con le secrezioni respiratorie e si manifesta in genere in focolai localizzati, durante i mesi invernali e primaverili⁸.

È attualmente dimostrato che le donne sieronegative sono suscettibili all'infezione da Parvovirus B19^{9,10}. Nella maggior parte delle gravidanze durante le quali si presenta l'infezione da Parvovirus B19, il feto partorito al termine della gravidanza risulta sano^{10,11,12}. Tuttavia l'infezione durante la gravidanza genera il rischio di trasmissione al feto, che può provocare idrope fetale o morte intrauterina. Negli studi sull'argomento, il tasso di morte fetale conseguente all'infezione materna è stimato in un range tra l'1 e il 9%^{10,13,14}. Poiché Parvovirus B19 si replica principalmente nei precursori degli

eritrociti, è stato ipotizzato che l'infezione durante la gravidanza possa provocare la morte del feto a causa di una grave anemia fetale. Si ritiene che tale anemia, provocando un abbassamento dei livelli di emoglobina fino a meno di 2 g/dl, sia la causa principale dell'idrope fetale^{15,16}.

I sintomi associati all'infezione da Parvovirus B19 diventano visibili soltanto al termine della fase viremica (contagiosa)¹⁰. È inoltre accertato che il rischio di trasmissione del virus aumenta nelle situazioni in cui gli individui sono abitualmente a stretto contatto, come nel caso di scuole, asili nido e ospedali. I Centri per il controllo delle malattie (CDC) non raccomandano di allontanare da tali ambienti le persone che presentano segni dell'infezione da Parvovirus (per es., eritema infettivo). Si raccomanda tuttavia di informare tutti i soggetti in questione circa la possibilità di trasmissione della malattia¹⁰.

Di conseguenza, è importante determinare lo stato degli anticorpi anti-Parvovirus B19 nei soggetti che possono essere a rischio di infezione da Parvovirus B19, o che hanno già contratto il virus in passato.

Il dosaggio sierologico è il momento fondamentale nella diagnosi di Parvovirus B19 e la Biotrin International offre una gamma unica di dosaggi per Parvovirus B19, adatti alla diagnosi di routine di laboratorio.

- Parvovirus B19 IgG e IgM IFA
N. catalogo V119IF
- Parvovirus B19 IgM EIA
N. catalogo V619IM
- Parvovirus B19 IgM EIA (automatico)
N. catalogo V619IMAUT
- Parvovirus B19 IgG EIA
N. catalogo V519IG
- Parvovirus B19 IgG EIA (automatico)
N. catalogo V519IGAUT

Principio del test

Il test in immunofluorescenza per Parvovirus B19 della Biotrin si basa sulla tecnica di determinazione degli anticorpi mediante immunofluorescenza indiretta, descritta per la prima volta da Coons et al¹⁷. Il siero del paziente viene incubato con l'antigene VP1 ricombinante di Parvovirus B19 presente nelle cellule di insetti stabilizzate su un vetrino^{18,19}. Se il campione contiene anticorpi anti-Parvovirus B19, essi formano un complesso stabile con l'antigene. L'anticorpo così legato viene quindi fatto reagire con un anticorpo anti-IgG o IgM umane a marcatura fluorescente e il risultante complesso viene visualizzato mediante un microscopio a fluorescenza.

Per evitare l'interferenza del fattore reumatoide (Rf) e per ridurre la competizione delle IgG nel test per le IgM, i campioni devono essere pretrattati con un reagente adsorbente adeguato.

Componenti del kit

Materiali forniti

1. Vetrini – 6 vetrini da 10 pozzetti

SLIDE

su cui è stato stabilizzato l'antigene ricombinante di Parvovirus B19 espresso nelle cellule di insetti. Sigillati singolarmente.

2. Controllo positivo IgM **

CONTROL + IgM

1 x 250 µl di siero positivo contenente anticorpi specifici anti-Parvovirus B19. Contiene timerosal (0,01%). Tappo verde.

3. Controllo positivo IgG **

CONTROL + IgG

1 x 250 µl di siero positivo contenente anticorpi specifici anti-Parvovirus B19. Contiene timerosal (0,01%) Tappo blu

4. Controllo negativo**

CONTROL -

1 x 250 di siero negativo di controllo, privo di anticorpi anti-Parvovirus B19. Contiene timerosal (0,01%). Tappo rosso.

5. Coniugato fluorescente anti-IgM

CONJ IgM

1 x 2 ml di anticorpo di coniglio anti-IgM umane coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC). Contiene colorante di contrasto Evans Blu e timerosal (0,01%). Tappo viola

6. Coniugato fluorescente anti-IgG

CONJ IgG

1 x 2 ml di anticorpo di coniglio anti-IgG umane coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC). Contiene colorante di contrasto Evans Blu e timerosal (0,01%). Tappo giallo

7. Tampone di lavaggio concentrato

BUF WASH 25X

1 x 45 ml di soluzione salina Tris tamponata concentrata (25 x), contenente Tween 20 (0,25%) e timerosal (0,01%). Tappo trasparente

8. Liquido di montaggio

MM

1 x 2 ml di tampone Tris – glicerolo. Contiene timerosal (0,001%). Tappo arancio

9. Foglio illustrativo del prodotto

INS

Istruzioni per l'uso

** Materiale a potenziale rischio biologico

Ulteriori materiali richiesti

- Acqua distillata o deionizzata di alta qualità.
- Pipette, micropipette e puntali monouso di precisione per il trasferimento di volumi di 5 µl, 50 µl, 200 µl.
- Sistema per la raccolta del siero
- Timer
- Attrezzatura da laboratorio per la misura di volumi.
- Reagente adsorbente adeguato per Rf e IgG, con capacità legante minima verso le IgM di 18 mg/ml.
- Contenitore da 1 l

- Provette per diluizione e provette per minicentrifuga (0,5 ml).
- Minicentrifuga da banco.
- Vaschetta per incubazione contenente carta assorbente umidificata.
- Spruzzetta e vaschetta per il lavaggio.
- Incubatore a 37°C.
- Vetrini coprioggetto N. 1 (22 x 50 mm).
- Microscopio a fluorescenza dotato di combinazione di filtri per FITC (filtro di eccitazione 495 nm, filtro barriera 515 nm); si raccomanda l'utilizzo di una fonte luminosa alogena.
- Pastello a cera
- Ventilatore.

Precauzioni

Sicurezza

- Esclusivamente per uso diagnostico in vitro..
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.

- Tutti i reagenti di origine umana sono considerati come **MATERIALE A POTENZIALE RISCHIO BIOLOGICO**. I sieri di controllo positivi e negativi sono stati testati relativamente all'HBsAg e agli anticorpi contro l'HIV 1/2 e l'HCV mediante metodi approvati dalla FDA e sono risultati negativi. Tuttavia, poiché nessun test può fornire la garanzia totale dell'assenza di virus, tutti i campioni di controllo devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono timerosal, una sostanza che può risultare tossica se ingerita.
- Evitare il contatto con l'Evans Blu (nei coniugati a base di FITC, IgM e IgG), poiché si tratta di una sostanza potenzialmente cancerogena. In caso di contatto con la pelle, sciacquare con acqua abbondante.
- Lo smaltimento di tutti i campioni clinici, dei materiali infetti o potenzialmente infetti deve rispettare la buona pratica di laboratorio. Maneggiare e smaltire tali materiali considerandoli come potenzialmente infettivi.
- I residui di sostanze chimiche, di preparati e componenti del kit sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Maneggiare e smaltire tali materiali considerandoli come potenzialmente infettivi.
- Indossare indumenti protettivi, guanti di lattice monouso e una protezione per gli occhi durante il trattamento dei campioni e l'esecuzione del dosaggio. Lavarsi accuratamente le mani alla fine dell'operazione.
- Non pipettare i materiali a bocca ed evitare sempre di mangiare o bere sulla superficie di lavoro in laboratorio

Procedura

- Non utilizzare il kit né i singoli reagenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare e non sostituire reagenti provenienti da kit contrassegnati da numeri di lotto diversi.
- Le modifiche rispetto al protocollo fornito possono dare luogo a risultati erranei.
- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 – 25°C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non lasciare i reagenti a contatto diretto con la luce solare e/o a una temperatura diversa dai 2-8°C per lunghi periodi.
- Al momento della colorazione di campioni multipli su un vetrino, evitare la contaminazione incrociata tra i campioni apponendo un segno tra i pozzetti con il pastello.
- L'impiego di una quantità eccessiva di liquido di montaggio può rendere opaca la fluorescenza.
- Utilizzare sempre attrezzature di vetro trasparenti, preferibilmente monouso, per la preparazione di tutti i reagenti.
- Fare attenzione a non contaminare i componenti e ad utilizzare sempre un nuovo puntale per la pipetta ad ogni campione e per ogni componente.
- Non graffiare il pozzetto con la punta della pipetta o con il contagocce.
- Prima di iniziare il test, definire uno schema di identificazione e distribuzione.

Conservazione e stabilità

- Se conservato a 2-8 °C, il kit si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione esterna.
- Conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio diluito si mantiene stabile per sei mesi. In caso di contaminazione microbica, gettare immediatamente.
- Tutti i componenti inutilizzati devono essere conservati nuovamente a 2-8 °C subito dopo l'uso.

Raccolta e conservazione del campione

I campioni di siero devono essere ottenuti mediante tecniche di laboratorio asettiche. Tali campioni possono essere conservati fino a 24 ore a una temperatura di 2-8 °C e per periodi più lunghi a -20 °C o a una temperatura inferiore.

È possibile utilizzare campioni appena preparati o congelati subito dopo la preparazione, tuttavia occorre evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

Preparazione del reagente e del campione

Preparazione del reagente

Il tampone di lavaggio viene fornito sotto forma di concentrato liquido (25 X). Preparare il tampone di lavaggio diluendo 40 ml di tampone concentrato in 960 ml di acqua distillata. Conservare a 2-8 °C in un contenitore pulito chiuso, fino a 6 mesi.

Tutti gli altri reagenti vengono forniti già pronti per l'uso e adeguatamente diluiti per l'applicazione.

Preparazione del campione e assorbimento

- Test qualitativo:

Per il test IgG diluire il campione di siero del paziente 1:64 nel tampone di lavaggio. Per il test IgM, i campioni devono essere adsorbiti mediante un agente adsorbente delle IgG ed del fattore reumatoide (con capacità legante minima di 18 mg/ml). Prima dell'utilizzo occorre preparare una diluizione finale di siero 1:16.

- Test semiquantitativo:

Per il dosaggio delle IgM, il "titolo" del campione può essere determinato attraverso diluizioni seriali del campione adsorbito (a 1:16) del paziente, a 1:64, 1:256 con tampone di lavaggio, o comunque fino al raggiungimento di un grado di fluorescenza pari a "+1" (si veda "Interpretazione dei risultati").

N.B.: il "titolo" del campione è la diluizione utilizzata per ottenere '+ 1' grado di fluorescenza.

N.B.: i campioni diluiti non possono essere conservati. In caso di ripetizione del test, è necessario utilizzare una nuova diluizione del campione.

Procedura del test

1. Portare tutti i componenti a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.
2. Rimuovere dalle bustine il numero di vetrini necessario.

3. Apporre un segno tra i pozzetti con il pastello a cera per evitare la contaminazione incrociata.
4. Distribuire sui pozzetti numerati 20 µl di ciascun campione diluito e 20 µl dei controlli positivi e negativi pronti per l'uso.
5. Incubare i vetrini per 3 ore in una vaschetta a 35-39 °C e a un tasso di umidità del 100%
6. Sciacquare rapidamente i vetrini lungo il bordo con il tampone di lavaggio, utilizzando una spruzzetta per il lavaggio. Collocare i vetrini in una vaschetta per il lavaggio contenente tampone di lavaggio (20 ml/striscia) per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C). Sciacquare con il tampone di lavaggio contenuto nel flacone per il lavaggio e far asciugare i vetrini mediante il ventilatore.
7. Per il test IgM distribuire una goccia (40 µl) di coniugato FITC anti-IgM in ciascun pozzetto. Per il test IgG distribuire una goccia (40 µl) di coniugato FITC anti-IgG in ciascun pozzetto.

8. Incubare i vetrini nella vaschetta per l'incubazione, al buio per 30 minuti a 35-39°C e a un tasso di umidità del 100%.
9. Ripetere la procedura di lavaggio descritta al punto 6.
10. Aggiungere una goccia di liquido di montaggio al centro di ciascun pozzetto e applicare il vetrino coprioggetto.
11. Esaminare al microscopio a fluorescenza utilizzando un ingrandimento di 400x.

Interpretazione dei risultati

Negativo: un campione deve essere considerato negativo per anticorpi IgM e IgG anti-Parvovirus B19 se non è visibile fluorescenza degli aggregati VP1 (Morfologia a grappolo).

Positivo: un campione può essere considerato positivo per gli anticorpi IgM e IgG anti-Parvovirus B19, se si ottiene un risultato fluorescente positivo a una diluizione rispettivamente di $\geq 1:16$ e $\geq 1:64$. La fluorescenza positiva è indicata dalla colorazione dei diversi aggregati di proteina VP1 (morfologia a "grappolo d'uva") e può essere classificata come segue:

+4 = Fluorescenza verde brillante, indica un titolo molto alto di anticorpi anti-Parvovirus B19.

+3 = Fluorescenza verde intenso, indica un titolo alto di anticorpi anti-Parvovirus B19.

+2 = Fluorescenza verde, indica un titolo medio di anticorpi anti-Parvovirus B19.

+1 = Fluorescenza verde opaco, indica un titolo basso di anticorpi anti-Parvovirus B19. Essa rappresenta inoltre la diluizione limite, o "titolo" del campione.

+/- = Fluorescenza verde chiaro, indica una possibile risposta anticorpale anti-Parvovirus B19 – confermare mediante le informazioni cliniche disponibili e altri metodi di rilevamento.

In ciascun pozzetto sono presenti anche cellule che non contengono la proteina VP1, in modo da consentire il confronto tra cellule positive e negative. Queste ultime assumono un colore rosso sangue grazie al colorante di contrasto Evans Blu.

Non specifico: alcuni soggetti possono presentare una reazione IgM non specifica, rappresentata da una fluorescenza debole, con un tipo di colorazione poco definita ad una diluizione del siero di 1:16. Tale risultato deve essere verificato mediante un metodo alternativo (per es., EIA, Immunoblot)

Criteria del controllo di qualità

Per determinare la validità del risultato del test è necessario utilizzare sempre il calibratore (controllo positivo) e il controllo negativo. I risultati di un test sono considerati validi se rispondono ai seguenti criteri.

1. Il controllo positivo IgG e/o IgM produce una fluorescenza maggiore o uguale a +2.
2. Il controllo negativo non evidenzia fluorescenza degli aggregati VP1 (Morfologia a grappolo).

Se i risultati non rispondono ai suddetti criteri, il test non è considerato valido e deve essere ripetuto.

Restrizioni nell'uso

- Nella formulazione della diagnosi di infezione da Parvovirus B19, i risultati devono essere messi in relazione col profilo clinico ed epidemiologico del paziente e con altri risultati clinici di laboratorio.
- Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da Parvovirus B19. Lo sviluppo di una risposta degli anticorpi rilevabile può avvenire diversi giorni dopo l'infezione. In caso di sospetta infezione da Parvovirus B19, in presenza di un risultato negativo, occorre ripetere il test dopo due settimane.
- La validità del test può essere compromessa da modifiche nella procedura, nell'interpretazione o nelle precauzioni raccomandate.
- I risultati del test di campioni provenienti da pazienti immunocompromessi possono essere difficili da interpretare.

Prestazioni del test

Valutazione clinica

I seguenti risultati sono stati ottenuti analizzando il siero di pazienti che presentavano sintomi di infezione recente da Parvovirus B19 (pannelli di sieroconversione), mediante il metodo IFA IgM della Biotrin e un metodo RIA¹⁷.

Tabella 1 Risultati delle valutazioni cliniche

Giorni successivi all'insorgenza	IFA IgM della Biotrin		RIA IgM	
	N. di IgM positivi	%IgM positivi	N. di IgM positivi	%IgM positivi
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

Sieroprevalenza

Sono stati testati complessivamente 201 campioni provenienti da donatori di sangue sani randomizzati mediante il test in immunofluorescenza per Parvovirus B19 della Biotrin per il rilevamento degli anticorpi IgG e IgM anti-Parvovirus B19 (IgG=201, IgM=200). 138 campioni di siero, corrispondenti al 68,7% dei campioni esaminati, sono risultati positivi alle IgG, mentre solo 2 campioni (1%) sono risultati positivi alle IgM. Tali risultati sono conformi ai dati contenuti negli studi sulla sieroprevalenza pubblicati.^{20, 21}

Sensibilità e specificità

I Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie (CDC) dispongono di un pannello di sieri contenenti Parvovirus B19, utilizzato come controllo e riferimento interno nel loro programma di controllo del Parvovirus B19. I campioni erano caratterizzati da sintomi clinici associati all'infezione da Parvovirus B19. La

maggior parte dei pazienti era costituita da donne abitualmente in contatto con bambini che presentavano sintomi del virus o da insegnanti di scuole elementari affetti da eritema infettivo. Tale pannello è stato inoltre testato mediante un metodo EIA diretto verso l'antigene nativo di Parvovirus B19 utilizzato abitualmente dal CDC²², il metodo Parvovirus B19 IgG EIA e il metodo Parvovirus B19 IgM EIA della Biotrin. Una selezione di sieri proveniente dal pannello caratterizzato del CDC (n=30) è stata testata mediante il metodo Parvovirus B19 IgG e IgM IFA della Biotrin. Le tabelle 2 e 3 presentano un confronto dei risultati ottenuti mediante i diversi metodi.

Tabella 2 Confronto tra il metodo IgG e IgM IFA della Biotrin e il test per il virus nativo del CDC.

		Test per il virus nativo del CDC *							
		IgG anti-Parvovirus B19				IgM anti-Parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IgG e IgM IFA della Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

Soltanto 27 dei 30 campioni sono stati testati mediante il test per il virus nativo del CDC.

Tabella 3 Confronto tra il metodo IgG e IgM IFA della Biotrin e il metodo IgG e IgM EIA della Biotrin.

		IgG e IgM EIA della Biotrin*							
		IgG anti-Parvovirus B19				IgM anti-Parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IgG e IgM IFA della Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positivo Neg = negativo Equiv = equivoco

Sensibilità = positivi reali diviso (positivi reali + falsi negativi + equivoci) x 100
% Sensibilità = 100%

Specificità = Negativi reali diviso (negativi reali + falsi positivi + equivoci) x 100
% Specificità = 100%

76 campioni sono stati esaminati presso il Virus Reference Lab in relazione alla presenza di anticorpi IgG e IgM mediante 4 diversi metodi di analisi – test IgG e IgM EIA anti-Parvovirus della Hillcrest Biologicals, test Western Blot (WB) della Microbiology Reference Lab, test RIA (RIA) della VRL Colindale e test IFA (IFA) della Biotrin. Per ciascun anticorpo (IgG e IgM) sono stati messi a confronto i 4 metodi di analisi. È stato considerato un risultato medio quando i risultati dell'analisi di almeno 3 metodi su 4 coincidevano o quando i risultati di almeno 2 metodi su 3 coincidevano (nel caso in cui l'altro metodo risultava equivoco).

Per quanto riguarda gli anticorpi IgG anti-

Parvovirus, 53 campioni sono risultati positivi e 23 negativi. Il test IgG IFA della Biotrin ha individuato correttamente i 53 campioni positivi, assicurando una sensibilità del 100%, ha individuato erroneamente solo 2 dei campioni negativi, presentando così una specificità del 92%.

Per quanto riguarda gli anticorpi IgM anti-Parvovirus, 26 campioni sono risultati positivi, 50 negativi. Il test IgM IFA della Biotrin ha individuato correttamente i 50 campioni negativi, assicurando una sensibilità del 100%, ha individuato erroneamente solo 1 dei campioni positivi, presentando così una specificità del 96%.

Reattività incrociata

Sono stati analizzati 100 campioni allo scopo di stabilire la specificità del test IgM IFA della Biotrin. Tutti i campioni provenivano da pazienti affetti dai seguenti disturbi:

Tabella 4 Studi sulla reattività incrociata

Virus	Numero di positivi
Virus della varicella Zoster	0/5
Fattore reumatoide	0/5
Parotite epidemica	0/5
Rosolia	0/9
Morbillo	0/5
CMV	0/13
EBV	0/12
Virus dell'herpes simplex - 1	0/5
Virus dell'herpes simplex - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Malattia di Lyme	0/5
Tiroidite	0/5
Lupus	0/5
Artrite reumatoide (RA)	0/5
ANA	1/5*

* Questo campione presentava risultati positivi anche all'analisi mediante il test IgM EIA della Biotrin e mediante Westernblot per le IgM (Parvoblot).

Riproducibilità

• Riproducibilità interdosaggio

I seguenti risultati sono stati ottenuti da campioni negativi, a titolo basso e alto rispetto alle IgG e alle IgM, analizzati con tre kit provenienti dallo stesso lotto di produzione.

Tabella 5 Riproducibilità interdosaggio

GRADO DI FLUORESCENZA

Vetrino n.	Positivo alle IgG	Valore limite IgG	Negativo	Valore limite IgM	Positivo alle IgM	
Kit 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+1	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• Riproducibilità interlaboratorio

I seguenti risultati sono stati ottenuti da campioni negativi, a titolo basso, medio e alto rispetto alle IgG (tabella 6) e alle IgM (tabella 7), analizzati in triplicato in tre giorni diversi in due sedi di analisi indipendenti.

Tabella 6 Riproducibilità interlaboratorio (IgG)

Campione IgG	Sede 1			Sede 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	pos	pos	pos
5	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	pos	Deb Pos	pos
5	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	pos	pos	pos
6	pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos
6	pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos
6	pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos	Deb Pos
7	Deb Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Controllo positivo	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Controllo negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Deb Pos = debolmente positivo pos= positivo neg= negativo

Tabella 7 Riproducibilità interlaboratorio (IgM)

Campione IgM	Sede 1			Sede 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	Deb pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	Deb pos	Deb pos	pos	Deb pos	pos	pos
4	Deb pos	Deb pos	pos	Deb pos	pos	Deb pos
4	Deb pos	Deb pos	pos	Deb pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	Deb pos	Deb pos	neg	neg	neg
7	neg	Deb pos	Deb pos	neg	neg	neg
7	neg	Deb pos	Deb pos	neg	Deb pos	neg
Controllo positivo	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Controllo negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Deb Pos = debolmente positivo pos= positivo neg= negativo

Riassunto della procedura IFA per IgG e IgM anti-Parvovirus B19

N.B. - importante:

- Leggere interamente il foglio illustrativo del prodotto prima di iniziare il dosaggio.
- Questo riassunto è destinato esclusivamente a una consultazione rapida.
- Per un test IgG diluire i campioni di siero del paziente 1:64 in tampone per il lavaggio
 - Per un test IgM, i campioni adsorbiti devono essere diluiti 1:16 (diluizione finale)
 - Pipettare nei pozzetti 20 µl di controllo positivo (pronto per l'uso), 20 µl di controllo negativo (pronto per l'uso) e 20 µl di campioni preparati
 - Incubare per 3 ore a 35-39°C, 100% di umidità
 - Lavare i vetrini con il tampone di lavaggio
- Per il test IgG aggiungere 40 µl di coniugato IgG a ciascun pozzetto
 - Per il test IgM aggiungere 40 µl di coniugato IgM a ciascun pozzetto
 - Incubare per 30 minuti al buio a 35-39°C, 100% di umidità
 - Lavare i vetrini con il tampone di lavaggio
 - Aggiungere il liquido di montaggio in ciascun pozzetto
 - Esaminare al microscopio a fluorescenza

Simboli

IVD

- Dispositivo
medico
diagnostico in
vitro



- Da consumarsi
entro la fine di



- Limite di
temperatura

LOT

- Codice di lotto



- Produttore

REF

- Numero di catalogo



Ensaio imunofluorescente para o Parvovirus B19

Um ensaio por imunofluorescência para a detecção dos anticorpos
IgG e IgM anti-Parvovirus B19

Português

Índice

Utilização indicada	143	Conservação e estabilidade	149
Introdução	143	Colheita e conservação de espécimes	150
Princípio do ensaio	145	Preparação de espécimes e reagentes	150
Componentes do Kit	145	Procedimento de ensaio	151
Materiais fornecidos	145	Interpretação dos resultados	152
Outros materiais necessários	146	Limitações da utilização	154
Precauções	147	Características do desempenho	154
Segurança	147	Resumo do procedimento do ensaio por imunofluorescência para o Parvovirus	163
Durante o procedimento	149	Interpretação dos símbolos	164
98		Bibliografia	165

Utilização indicada

O Ensaio Imunofluorescente para o Parvovirus B19 destina-se à detecção qualitativa e semi-quantitativa dos anticorpos IgG e IgM anti-Parvovirus B19 no soro humano. O ensaio está indicado para ser utilizado em todas as mulheres nas quais existe a suspeita de exposição ao Parvovirus B19 a fim de determinar a presença de uma infecção recente ou corrente.

Introdução

O Parvovirus B19 foi identificado pela primeira vez como patógeno humano em 1975 e demonstrouse, subsequentemente, que era o agente causal de diversas afecções clínicas tais como exantema cutâneo, artralgias e lesão fetal^{1,2,3}. A infecção pelo Parvovirus B19 em adultos, especialmente em mulheres, pode causar artrite aguda que pode persistir durante algum tempo⁴. A infecção pode provocar uma anemia com risco de vida em doentes imunocomprometidos e em indivíduos com perturbações hemolíticas, como seja a

anemia de células falciformes^{5,6}. O vírus é um vírus icosaédrico sem invólucro com um diâmetro de 18 – 25 nm e compromete o genoma do ADN de cadeia simples, linear (5,5 kb) que está encapsulado numa cápside externa^{7,8}. A cápside viral é constituída por duas proteínas estruturais, a VP1 (83kDA) e a VP2 (53kDA). A infecção pelo Parvovirus B19 é normalmente adquirida por contacto directo com as secreções respiratórias e ocorre geralmente em surtos localizados durante os meses de Inverno e Primavera⁸.

Presentemente é facto aceite que as mulheres seronegativas são susceptíveis à infecção por Parvovirus B19^{9,10}. A maioria das gravidezes durante as quais ocorre uma infecção por Parvovirus B19 resulta no parto de um feto saudável de termo^{10,11,12}. Contudo, a infecção durante a gravidez apresenta o risco de transmissão para o feto que pode causar anasarca fetoplacentária ou morte intrauterina. Estimativas citadas na literatura relativas à taxa de morte fetal após infecção materna variam entre 1 e 9%^{10,13,14}.

Sugeriu-se que, como o Parvovirus B19 se replica predominantemente nos precursores dos eritrócitos, a infecção durante a gravidez pode causar a morte fetal devido a anemia fetal grave. Pensa-se que esta anemia grave, pela qual os níveis da hemoglobina baixam para níveis inferiores a 2 g/dl, é a principal causa da anasarca fetoplacentária^{15,16}.

Os sintomas associados à infecção por Parvovirus B19 só são evidentes após ter terminado a fase de viremia (contagiosa)¹⁰. Além disso, sabe-se que existe um risco acrescido de transmissão em situações em que é provável um maior contacto entre indivíduos. Como por exemplo nas escolas, centros de cuidados de dia e hospitais. Os Centros de Controlo de Doenças (Centres for Disease Control - CDC) não recomendam que as pessoas que manifestam sinais de infecção pelo Parvovirus (por ex., eritema infeccioso) sejam excluídas destes ambientes. Contudo, recomenda-se que todos os indivíduos envolvidos sejam informados da possibilidade de transmissão da

doença¹⁰. Em consequência, é importante identificar o estado imunológico de anticorpos anti-Parvovirus B19 em indivíduos que podem estar em risco de infecção ou que foram infectados pelo Parvovirus B19.

Os ensaios serológicos são o pilar do diagnóstico do B19 e a Biotrin International oferece um portfólio de ensaios para detecção do Parvovirus B19 adequado para o diagnóstico laboratorial de rotina.

- Ensaio de imunofluorescência das IgG e IgM anti-Parvovirus B19
N.º de catálogo V119IF
- Imunoenzimologia da IgM anti-Parvovirus B19
N.º de catálogo V619IM
- Imunoenzimologia da IgM anti-Parvovirus B19 (Automatizada)
N.º de catálogo V619IMAUT
- Imunoenzimologia da IgG anti-Parvovirus B19
N.º de catálogo V519IG

- Imunoenzimologia da IgG anti-Parvovirus B19 (Automatizada)
N.º de catálogo V519IGAUT

Princípio do ensaio

O Ensaio Imunofluorescente para o Parvovirus B19 da Biotrin utiliza a técnica de detecção de anticorpos por imunofluorescência indirecta descrita pela primeira vez por Coons et al¹⁷. O soro do doente é incubado com o antigénio VP1 recombinante de Parvovirus B19 em células de insectos, estabilizado numa lâmina de vidro^{18,19}. Se os anticorpos anti-Parvovirus B19 estiverem presentes na amostra, forma-se um complexo com o antigénio. Depois, faz-se reagir o anticorpo ligado com um anticorpo IgG ou IgM anti-humano marcado com fluorescência e este complexo de

três partes é visualizado utilizando um microscópio de fluorescência. Para impedir a interferência de factores reumatóides (Rf) e para

reduzir a competição da IgG no teste da IgM, as amostras devem ser pré-tratadas com um reagente adsorvente adequado

Componentes do Kit

Materiais fornecidos

1. Lâminas – 6 lâminas com 10 poços

SLIDE

Nas quais foi estabilizado o antigénio recombinante de Parvovirus B19 expresso em células de insecto. Bolsa de folha de alumínio

2. Controlo positivo da IgM **

CONTROL + IgM

1 x 250µl de soros positivos contendo anticorpos específicos anti-Parvovirus B19. Contém tiomersal (0,01%). Tampa verde.

3. Controlo positivo da IgG **

CONTROL + IgG

1 x 250µl de soros positivos contendo anticorpos específicos anti-Parvovirus B19. Contém tiomersal (0,01%).
Tampa azul

4. Controlo negativo**

CONTROL -

1 x 250µl de soros de controlo negativos contendo anticorpos anti-Parvovirus B19 não detectáveis. Contém tiomersal (0,01%).
Tampa vermelha

5. Conjugado fluorescente anti-IgM

CONJ IgM

1 x 2ml de anticorpo IgM anti-humano de coelho conjugado com isotiocianato fluorescente (FITC). Contém o corante de contraste Evans Blue e tiomersal a 0,01%.
Tampa roxa

6. Conjugado fluorescente anti-IgG

CONJ IgG

1 x 2ml de anticorpo IgM anti-humano de coelho conjugado com isotiocianato fluorescente (FITC). Contém o corante de contraste Evans Blue e tiomersal a 0,01%.
Tampa amarela

7. Concentrado de lavagem tamponado

BUF WASH 25X

1 x 45ml de solução salina concentrada (25x) tamponada com Tris com Tween 20 (0,25%) e tiomersal (0.01%).
Tampa transparente.

8. Meio de montagem

MM

1 x 2ml de tampão Tris – glicerol. Contém tiomersal (0,001%).
Tampa cor-de-laranja

9. Folheto informativo do produto

INS

Instruções de utilização*

** Material que constitui um potencial biorisco.

Outros materiais necessários

- Água destilada ou desionizada de alta qualidade.
- Pipetas exactas, micropipetas e pontas descartáveis para distribuir 5µl a 50µl e 50µl a 200µl.
- Equipamento para colheita de soro
- Cronómetro
- Material de laboratório de vidro limpo para medição de volumes.
- Um reagente absorvente adequado de Rf e IgG com uma capacidade de ligação mínima à IgG de 18mg/ml.
- Copo graduado de 1l
- Tubos de diluição e tubos de minicentrífugadora (0,5ml).
- Minicentrífugadora de bancada.
- Tabuleiro de incubação contendo papel de seda humedecido.
- Frascos de lavagem e tabuleiro de lavagem.

- Incubador a 37°C.
- Lamelas n.º 1 (22 x 50 mm).
- Microscópio de fluorescência com a combinação de filtros apropriada para FITC (filtro de excitação a 495 nm, filtro de barreira a 515nm), recomenda-se uma fonte de luz de halogénio.
- Lápis de cera
- Ventoinha

Precauções

De segurança

- Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.
- O kit destina-se a ser utilizado apenas por pessoal de laboratório qualificado.
- Todos os reagentes de origem humana são considerados como MATERIAL COM UM POTENCIAL BIORISCO. Os soros de controlo positivo e negativo foram testados de acordo

com métodos aprovados pela FDA quanto à presença de HBsAg e de anticorpos anti-HIV 1/2 e anti-HCV, verificando-se que eram negativos. Contudo, como nenhum teste pode fornecer uma garantia total da ausência de vírus, deve tratar-se todos os controlos como potencialmente infecciosos.

- Alguns reagentes contêm tiomersal, que pode ser tóxico se ingerido.
- Evite o contacto com Evans Blue (em conjugados de IgM e de IgG com FITC) dado que é um carcinogénio potencial. Na ocorrência de contacto com a pele, lave com grandes volumes de água.
- Elimine todos os espécimes clínicos, material infectado ou potencialmente infectado de acordo com as boas práticas laboratoriais. Todos estes materiais devem ser manipulados e eliminados como sendo potencialmente infecciosos.

- Os resíduos de produtos químicos, preparações e componentes do kit devem ser geralmente considerados como lixos perigosos. Todos estes materiais devem ser manipulados e eliminados como sendo potencialmente infecciosos.

- Use vestuário protector, luvas de látex descartáveis e protecção ocular quando estiver a manipular os espécimes e a efectuar o ensaio. Lave muito bem as mãos quanto tiver terminado.

- Não pipete materiais com a boca e nunca coma ou beba na bancada do laboratório.

Durante o procedimento

- Não utilize um kit ou reagentes individuais cujo prazo de validade tenha expirado.
- Não misture ou substitua reagentes de kits com números de lote diferentes.

- O desvio do protocolo fornecido pode produzir resultados errados.

- Deve deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (20 – 25°C), misturando bem antes de utilizar.

- Evite deixar os reagentes expostos à luz solar directa e/ou a 2-8°C no exterior durante períodos prolongados.

- Ao efectuar a coloração de várias amostras numa lâmina evite a contaminação cruzada entre amostras marcando entre os poços com um lápis.

- A aplicação de meio de montagem em excesso pode produzir uma fluorescência pouco nítida.

- Utilize sempre material de vidro limpo, de preferência descartável, para a preparação de todos os reagentes.

- Deve ter-se o cuidado de não contaminar componentes e utilizar sempre pontas de pipeta novas para cada amostra e

componente.

- Não risque o poço com a ponta da pipeta ou com o conta-gotas.
- Antes de iniciar o ensaio, deve ser estabelecido um plano de identificação e de distribuição.

Conservação e estabilidade

- O kit é estável até expirar o prazo de validade indicado no rótulo da caixa exterior desde que seja conservado entre 2 – 8°C.

- O Tampão de Lavagem diluído é estável durante 6 meses quando conservado a 2-8°C. Elimine imediatamente se ocorrer contaminação microbiana.

- Todos os componentes não utilizados devem ser novamente conservados a 2-8°C imediatamente após a utilização.

Colheita e conservação de espécimes

As amostras de soro devem ser obtidas utilizando técnicas laboratoriais assépticas. Estas amostras podem ser conservadas até 24 horas a 2-8°C e a -20°C ou menos durante períodos mais longos. Podem utilizar-se amostras de soro recentes ou que foram imediatamente congeladas, contudo deve evitar-se a congelação-descongelação repetida.

Preparação de espécimes e reagentes

Preparação dos reagentes

O Tampão de Lavagem é fornecido sob a forma de um concentrado líquido (25x). Prepare o Tampão de Lavagem diluindo 40ml do Concentrado do Tampão de Lavagem em 960 ml de água destilada. Conserve num recipiente limpo fechado a 2-8°C durante um período máximo de 6 meses.

Todos os outros reagentes são fornecidos prontos a usar e na diluição de trabalho.

Preparação e absorção dos espécimes

Ensaio qualitativo:

Para um ensaio da IgG faça a diluição da amostra de soro do doente a 1:64 em Tampão de Lavagem.

Para os ensaios da IgM, as amostras devem ser adsorvidas com um adsorvente adequado para a IgG e para o factor reumatóide (com uma capacidade de ligação mínima de 18 mg/ml). Antes da utilização, deve ser preparada uma diluição final do soro de 1:16.

Ensaio semi-quantitativo:

Para os ensaios da IgG, o 'título' da amostra pode ser determinado efectuando a diluição seriada da amostra do doente a 1:64, 1:256, 1:1024 em tampão de lavagem ou até ser atingido um grau de fluorescência de '+1' (ver "Interpretação dos resultados").

Para os ensaios da IgM, o 'título' da amostra pode ser determinado efectuando a diluição seriada da amostra do doente (em 1:16) adsorvido, a 1:64, 1:256 em tampão de lavagem ou até ser atingido um grau de fluorescência de '+1' (ver "Interpretação dos resultados").

Nota: O 'título' da amostra é a diluição utilizada para se atingir o grau de fluorescência de '+ 1'.

Nota: Amostras diluídas não devem ser conservadas. Se for necessário repetir um ensaio deve ser efectuada nova preparação.

Procedimento de ensaio

1. Deixe que todos os componentes atinjam o equilíbrio à temperatura ambiente (20-25°C) antes da sua utilização.
2. Retire o número desejado de lâminas das respectivas saquetas.
3. Marque entre os poços com um lápis de cera

para evitar a contaminação cruzada.

4. Distribua 20 µl de cada amostra diluída e 20µl dos controlos positivo e negativo prontos a usar pelos poços numerados.
5. Incube as lâminas num tabuleiro de incubação durante 3 horas a 35-39°C e a uma humidade de 100%.
6. Passe rapidamente as lâminas por Tampão de Lavagem ao longo dos bordos, utilizando um frasco de lavagem. Coloque as lâminas num tabuleiro de lavagem contendo Tampão de Lavagem (20 ml/lâmina) durante 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Passe por Tampão de Lavagem utilizando o frasco de lavagem e seque as lâminas com a ventoinha.
7. Para um ensaio da IgM, deite uma gota (40µl) do conjugado anti-IgM FITC em cada poço. Para um ensaio da IgG, deite uma gota (40µl) do conjugado anti-IgG FITC em cada poço.

8. Incube as lâminas num tabuleiro de incubação no escuro durante 3 horas a 35-39°C e a uma humidade de 100%.
9. Repita o procedimento de lavagem descrito acima no passo 6.
10. Adicione uma gota de meio de montagem no centro de cada poço e coloque uma lamela.
11. Examine num microscópico de fluorescência utilizando uma ampliação de 400 x.

Interpretação dos resultados

Negativa: Uma amostra deve ser considerada negativa para anticorpos IgG e IgM de Parvovirus B19, se não se observar fluorescência visível nos agregados VP1 (Morfologia Cacho de Uvas).

Positivo: Uma amostra pode ser considerada positiva para os anticorpos IgM e IgG anti-

Parvovirus B19 se for obtido um resultado fluorescente positivo respectivamente numa diluição $\geq 1:16$ e $\geq 1:64$. Uma fluorescência positiva é indicada pela coloração dos agregados nítidos da proteína VP1 (morfologia em 'Cacho de uvas') e pode ser classificada como se segue:

+4 = Fluorescência verde brilhante que indica uma resposta com um título muito alto de anticorpos anti-Parvovirus B19.

+3 = Fluorescência verde viva que indica uma resposta com um título alto de anticorpos anti-Parvovirus B19.

+2 = Fluorescência verde que indica uma resposta com um título médio de anticorpos anti-Parvovirus B19.

+1 = Fluorescência verde sem brilho que indica uma resposta com um título baixo de anticorpos anti-Parvovirus B19. Também indica a diluição do ponto de viragem ou 'título' da amostra.

+/- = Fluorescência verde pálida que indica uma resposta possível de anticorpos anti-Parvovirus B19 – deve ser confirmado através da informação clínica existente e de outros métodos de detecção.

Células que não contêm a proteína VP1 são incluídas em cada poço para permitir a comparação de células positivas e negativas. Estas coram de vermelho com o corante de contraste Evans Blue.

Não específico: Alguns indivíduos podem apresentar uma resposta não específica de IgM que é demonstrada por uma fluorescência fraca com um padrão de coloração mal definido numa diluição do soro de 1:16. Este resultado deve ser verificado utilizando um método alternativo (por exemplo, imunoenzimologia (EIA), Immunoblot).

Crítérios do controlo de qualidade

O Calibrador (Controlo Positivo) e o Controlo Negativo devem ser sempre incluídos para determinar a validade dos resultados do teste. Considera-se que os resultados de um ensaio são válidos se forem satisfeitos os seguintes critérios.

1. O controlo positivo da IgG e/ou da IgM produz uma fluorescência superior ou igual a +2.
2. O controlo negativo não origina fluorescência visível nos agregados VP1 (Morfologia Cacho de Uvas).

Se não forem satisfeitos os critérios acima o ensaio é considerado inválido e dever ser repetido.

Limitações da utilização

- Os resultados devem ser correlacionados com o perfil clínico e epidemiológico do doente e com outros resultados laboratoriais clínicos para se poder fazer o diagnóstico de infecção por Parvovirus B19.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por Parvovirus B19. O desenvolvimento de uma resposta com anticorpos detectáveis pode ocorrer alguns dias depois da infecção. No caso de suspeita de uma infecção por Parvovirus B19, um resultado negativo deve ser seguido efectuando-se a repetição do ensaio duas semanas depois.
- O desempenho do ensaio pode ser afectado por desvio do procedimento, da interpretação ou das precauções recomendadas.

- Os resultados de teste de doentes imunocomprometidos podem ser difíceis de interpretar.

Características do desempenho

Avaliação clínica

Os seguintes resultados foram obtidos quando soros de doentes com sintomas de uma infecção recente por B19 (baterias de seroconversões) foram analisados utilizando o ensaio por imunofluorescência (IFA) da IgM da Biotrin e um método de radioimunoensaio (RIA) da IgM¹⁷.

Quadro 1 Resultados da avaliação clínica

Dias após o início	IFA de IgM da Biotrin		RIA de IgM	
	N.º de IgM positivos	% de IgM positivos	N.º de IgM positivos	% de IgM positivos
1 - 5	26/29	89.6	26/29	89.6
6 - 10	22/22	100	22/22	100
11 - 20	8/8	100	8/8	100
21 - 30	8/8	100	8/8	100
31 - 50	4/4	100	4/4	100
>50	2/9	22.2	NT	NT

Seroprevalência

Foi analisado um total de 201 amostras de dadores de sangue saudáveis seleccionados aleatoriamente utilizando o Ensaio por Imunofluorescência para detecção dos anticorpos IgG e IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin (IgG=201, IgM=200). Cento e trinta oito (138) amostras de sangue eram IgG positivas, o que representa 68,7% das amostras rastreadas, enquanto que apenas 2 amostras (1%) eram IgM positivas. Estes resultados estão de acordo com os estudos de seroprevalência citados na literatura.^{20, 21}

Sensibilidade e especificidade

Os Centros de Controlo de Prevenção de Doenças (CDC) conservam uma bateria de soros com Parvovirus B19 utilizada como controlo interno e como referência para o seu programa de testes relativo ao Parvovirus B19. As amostras foram caracterizadas pelos sintomas clínicos associados a uma infecção por Parvovirus B19. A maioria destes doentes eram mulheres com exposições

no domicílio a crianças sintomáticas ou professores em escolas primárias com surtos de eritema infeccioso. Esta bateria também foi testada utilizando a imunoenzimologia (EIA) do vírus nativo de Parvovirus B19 do CDC²², a imunoenzimologia da IgG anti-Parvovirus B19 da Biotrin e a imunoenzimologia da IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin. Foi testada uma selecção de soros da bateria bem caracterizada do CDC (n=30) utilizando o Ensaio por Imunofluorescência (IFA) para detecção dos anticorpos IgG e IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin. Nos Quadros 2 e 3 apresenta-se uma comparação dos resultados obtidos com os diferentes métodos.

Quadro 2 Comparação da IFA de IgG e IgM da Biotrin com o ensaio do vírus nativo do CDC.

		Ensaio do vírus nativo do CDC *							
		IgG anti-Parvovirus B19				IgM anti-Parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IFA das IgG & IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	5	0	5	0	15	0	15
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	5	0	27	12	15	0	27

* Apenas 27 das 30 amostras foram testadas com o ensaio do vírus nativo do CDC.

Quadro 3 Comparação da IFA das IgG e IgM da Biotrin com os ensaios de EIA das IgG e IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin.

		EIA de Parvovirus B19 da Biotrin							
		IgG anti-Parvovirus B19				IgM anti-Parvovirus B19			
		Pos	Neg	Equiv	Tot	Pos	Neg	Equiv	Tot
IFA das IgG & IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin	Pos	22	0	0	22	12	0	0	12
	Neg	0	8	0	8	0	18	0	18
	Equiv	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tot	22	8	0	30	12	18	0	30

Pos = positivo Neg = negativo Equiv = equívoco

Sensibilidade = Verdadeiros positivos divididos por (Verdadeiros positivos + Falsos negativos + Equívocos) x 100

% de sensibilidade = 100%

Especificidade = Verdadeiros negativos divididos por (Verdadeiros negativos + Falsos positivos + Equívocos) x 100

% de sensibilidade = 100%

Foram avaliadas 76 amostras no Virus Reference Lab, quanto à presença de anticorpos IgG e IgM utilizando 4 métodos de rastreio separados – ensaio por EIA das IgG e IgM anti-Parvovirus da Hillcrest Biologicals (EIA), ensaio por Western Blot do Microbiology Reference Lab (WB), ensaio por RIA de VRL Colindale (RIA) e o ensaio por IFA da Biotrin (IFA). Foram comparados os 4 métodos de rastreio em relação a cada anticorpo (IgG e IgM). Considerava-se um resultado médio quando o rastreio de pelo menos 3 no total dos 4 métodos concordavam ou quando pelo menos 2 de 3 métodos concordavam (quando o outro método era equívoco).

Em relação aos anticorpos IgG anti-Parvovirus B19, determinou-se que 53 amostras eram positivas e 23 amostras eram negativas. A IFA da IgG da Biotrin identificou correctamente as 53 amostras positivas dando uma sensibilidade de 100%, contudo o IFA identificou incorrectamente 2 das amostras negativas dando uma especificidade de 92%.

Em relação aos anticorpos IgM anti-Parvovirus B19, determinou-se que 26 amostras eram positivas e 50 amostras eram negativas. A IFA da IgM da Biotrin identificou correctamente as 50 amostras negativas dando uma especificidade de 100%, contudo o IFA identificou incorrectamente 1 das amostras positivas dando uma sensibilidade de 96%.

Reactividade cruzada

Foram rastreadas 100 amostras de soro para demonstrar a especificidade do ensaio por imunofluorescência das IgM da Biotrin. Todas as amostras foram obtidas de doentes com as seguintes doenças :

Quadro 4 Estudos de reactividade cruzada.

Vírus	Número de positivos
Vírus Varicella zoster	0/5
Factor reumatóide	0/5
Parotidite	0/5
Rubéola	0/9
Sarampo	0/5
CMV	0/13
EBV	0/12
Herpes simplex - 1	0/5
Vírus Herpes simplex - 2	0/5
Toxoplasma gondii	0/11
Doença de Lyme	0/5
Tiroidite	0/5
Lúpus	0/5
Artrite reumatóide (AR)	0/5
Anticorpos antinucleares (ANA)	1/5*

* Esta amostra também produziu um resultado positivo utilizando a EIA da IgM anti-Parvovirus B19 da Biotrin e o ensaio Westernblot Parvoblot da IgM.

Reprodutibilidade

• Reprodutibilidade intra-ensaios

Os seguintes resultados foram obtidos quando foram rastreadas amostras com títulos negativos, baixos e altos de IgG e IgM em três kits de um lote de produção.

Quadro 5 Reprodutibilidade intra-ensaios

GRAU DE FLUORESCÊNCIA

Lâmina N.º	Positiva para IgG	Limiar de IgG	Negativa	Limiar de IgM	Positiva para IgM	
Kit 1	1	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	2	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	3	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	4	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	5	+4	+1/2	-	+1	+2/3
	6	+4	+1/2	-	+1	+2/3
Kit 2	1	+4	+1/2	-	+1	+2
	2	+4	+2	-	+/-	+2
	3	+4	+1/2	-	+/-	+2
	4	+4	+1/2	-	+1	+2
	5	+4	+1/2	-	+/-	+2
	6	+4	+1/2	-	+/-	+2
Kit 3	1	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	2	+3	+1	-	+/-	+2
	3	+3	+1	-	+1	+2
	4	+3/4	+1/2	-	+/-	+2
	5	+3	+1/2	-	+/-	+2
	6	+3	+1	-	+1	+2

• Reprodutibilidade entre centros

Os seguintes resultados foram obtidos quando amostras com títulos negativos, baixos, médios e altos de IgG (Quadro 6) e IgM (Quadro 7) foram rastreadas em triplicado em 3 dias diferentes em dois centros de avaliação independentes.

Quadro 6 Reprodutibilidade entre centros (IgG)

Amostra de IgG	Centro1			Centro 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	pos	pos	pos
5	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	pos	Frac Pos	pos
5	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	pos	pos	pos
6	pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos
6	pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos
6	pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos	Frac Pos
7	Frac Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
7	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Controlo positivo	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos
Controlo negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Frac Pos = Fracamente positivo Pos = positivo Neg = negativo

Quadro 7 Reprodutibilidade entre centros (IgM)

Amostra IgM	Centro 1			Centro 2		
	3.11.94	8.11.94	9.11.94	10.10.94	11.10.94	12.10.94
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
1	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	Frac Pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	Frac Pos	Frac Pos	pos	Frac Pos	pos	pos
4	Frac Pos	Frac Pos	pos	Frac Pos	pos	Frac Pos
4	Frac Pos	Frac Pos	pos	Frac Pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
5	pos	pos	pos	pos	pos	pos
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	Frac Pos	Frac Pos	neg	neg	neg
7	neg	Frac Pos	Frac Pos	neg	neg	neg
7	neg	Frac Pos	Frac Pos	neg	Frac Pos	neg
Controlo positivo	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Controlo negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Frac Pos = Fracamente positivo Pos = positivo Neg = negativo

Resumo do procedimento por imunofluorescência das IgG e IgM anti-Parvovirus B19

Nota importante:

Leia atentamente o folheto de instruções sobre o produto antes de iniciar o ensaio.

Este resumo é apenas para consulta rápida.

- Para um ensaio da IgG, diluir o soro do doente a 1 em 64 em Tampão de lavagem
- Para um ensaio da IgM, as amostras adsorvidas devem ser diluídas até uma diluição final de 1 em 16
- Pipete 20µl de Controlo positivo (pronto a usar), 20µl de Controlo negativo (pronto a usar) e 20µl das amostras preparadas para os poços
- Incube durante 3 horas a 35-39°C, 100% de humidade

- Lave as lâminas com tampão de lavagem
- Para o ensaio da IgG adicione 40 µl de conjugado de IgG em cada poço
- Para o ensaio da IgM adicione 40 µl de conjugado de IgM em cada poço
- Incube durante 3 horas no escuro a 35-39°C, 100% de humidade
- Lave as lâminas com tampão de lavagem
- Adicione meio de montagem em cada poço
- Examine ao microscópio de fluorescência

Interpretação dos símbolos

IVD

- Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



- Utilize até



- Limite de temperatura

LOT

- Código do lote



- Fabricante

REF

- N^oCat.

Bibliography / Literaturverzeichnis / Bibliografía / Bibliografi / Bibliografia / Bibliografia.

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, et al.: Parvovirus – Like Particles in Human Sera. The Lancet, 1: 72 – 73, 1975.
2. Anderson MJ, Higgens PG, Davis LR, et al.: Experimental Parvovirus Infection in humans. J. Infect Dis 152: 257 – 265, 1985.
3. Knott PD, Welply GAC, Anderson MJ, et al.: Serologically proved intrauterine infection with Parvovirus. Br. Med. J. 289: 1660, 1984.
4. Reid DM, Reid TM, Brown T, et al.: Human Parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. Lancet 1: 422 – 425, 1985.
5. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, et al.: Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with Parvovirus-like agent. Lancet 2: 595 –597, 1981.
6. Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, et al.: Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent Parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. N. Engl. J. Med. 321: 519 – 523, 1989.
7. Ozawa K, Ayub J, Yu-Shu H, et al.: Novel Transcription Map for the B19 (human) Pathogenic Parvovirus. J. Virol. 61: 2395 – 2406, 1987
8. Török T. Human Parvovirus B19 in Infectious Diseases of the Fetus and Newborn infant. Eds: Remington JS and Klein JO. 4th ed 668702 ISBN: 0-7216-6782-1.

9. Jordan JA.
Identification of human Parvovirus B19 in idiopathic nonimmune hydrops fetalis.
Am J Obstet Gynecol 174: 37 – 42, 1996.
10. Centres for Disease Control.
Risks Associated with Human Parvovirus B19 Infection.
MMWR CDC Surveill. Summ., 38: 81 – 89, 1989.
11. Woernle CH, Anderson LJ, Tattersall P, et al.:
Human Parvovirus B19 during pregnancy.
J. Infect. Dis. 156: 17-20, 1987.
12. Gratacos E, Torres PJ, Vidal J, et al.:
The incidence of Human Parvovirus B19 infection during pregnancy and its impact on perinatal outcome.
J Infect. Dis. 171: 1360 – 1363, 1995.
13. Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease.
Prospective Study of Human Parvovirus (B19) infection in pregnancy.
Br. Med. J. 300: 1166 – 1170, 1990.
14. Rodis JF, Hovick TJ, Quinn DL, et al.:
Human Parvovirus Infection in pregnancy.
Obstet. Gynecol. 72: 733-738, 1988.
15. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, et al.:
Resistance to Parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (Erythrocyte P Antigen).
N. Eng. J. Med. 330: 1192-1196, 1994.
16. Anderson MJ, Khoussam MN, Maxwell DJ, et al.:
Human Parvovirus B19 and Hydrops Fetalis.
Lancet 1: 535, 1988.
17. Coons AH, Kaplan MM, et al.:
J. Exp. Med. 91: 1-13, 1950.
18. Brown CS, van Bussel MJ, Wassenaar AL, et al.:
An immunofluorescence assay for the detection of Parvovirus B19 IgG and IgM antibodies based on recombinant viral antigen.
J. of Virological Methods 29: 53-62, 1990.
19. Browns CS, Salimans MM, Noteborn MH, et al.:
Antigenic Parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a Baculovirus expression system.
Virus Res. 51: 197-212, 1990.
20. Searle K, Gulliard C, Enders G, et al.:
Parvovirus B19 Diagnosis in Pregnant Women - Quantification of IgG Antibody Levels (IU/ml) with Reference to the International Parvovirus B19 Standard Serum.
Infection 25: 32-34, 1997.
21. Gay NJ, Hesketh LM, Cohen BJ, et al.:
Age specific antibody prevalence to Parvovirus B19: how many women are infected in pregnancy?
Comum. Dis. Rep. CDR Rev. 4(9): R104-107, 1994.
22. Anderson LJ, Tso C, Parker RA, et al.:
Detection of antibodies and antigens of human Parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Clin. Microbiol. 24(4): 522-526, 1986.