

**Latviešu valoda**  
**Kataloga numurs: V619IM**  
**Iepakojuma veids: 12 x 8**  
**Dokumenta kods: PEMIV-465-02 11/09**



**Parvovīrusa B19**  
**IgM imūnfermentatīvā analīze**

Imūnfermentatīvā analīze parvovīrusa B19 IgM antivielu kvalitatīvai noteikšanai cilvēka asins serumā un plazmā.



## Saturs

Pielietojums	3
Ievads	3
Analīzes princips	4
Piesardzība	4
Drošība	4
Procedūras	5
Komplekta sastāvdaļas	6
Piegādātie materiāli	6
Nepieciešamie papildu materiāli	7
Automātiskie vai pusautomātiskie EIA analizatori	8
Uzglabāšana un stabilitāte	8
Paraugu savākšana un uzglabāšana	8
Reaģentu un paraugu sagatavošana	8
Analīzes procedūra	9
Rezultātu interpretācija	11
Kvalitātes kontroles kritēriji	11
Lietošanas ierobežojumi	12
Darbības raksturojums	13
Parvovīrusa IgM procedūras kopsavilkums	16
Simbolu skaidrojums	17
Bibliogrāfija	18

## Pielietojums

Parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvā analīze ir paredzēta parvovīrusa B19 IgM antivielu kvalitatīvai noteikšanai cilvēka asins serumā un plazmā. Tests ir indicēts visām sievietēm, ja ir aizdomas par saskarsmi ar parvovīrusu B19, lai noteiktu nesen pārslimotu vai šobrīd norītošu infekciju. Kombinācijā ar Biotrin parvovīrusa B19 IgG imūnfermentatīvo analīzi šis tests var palīdzēt noteikt hydrops fetalis vai augļa nāves risku.

## Ievads

Parvovīrusu B19 kā cilvēka patogēnu pirmo reizi atklāja 1975. gadā, un vēlāk tika konstatēta tā cēloniskā saistība ar vairākiem klīniskiem simptomiem, piemēram, izsitumiem, artralģijām un augļa bojājumu.<sup>1,2,3</sup> Parvovīrusa B19 infekcija pieaugušajiem, jo īpaši sievietēm, var izraisīt akūtu artrītu, kas kādu laiku saglabājas.<sup>4</sup> Infekcija var izraisīt dzīvībai bīstamu anēmiju imūnkompromitētiem pacientiem un cilvēkiem ar hemolītiskām slimībām, piemēram, sirpjveida šūnu anēmiju.<sup>5,6</sup> Vīruss ir ikosaedrisks, bez apvalka, 18-25 nm diametrā un satur lineāru, vienpavediena DNS genomu (5,5 kb), ko ietver ārējais kapsīds.<sup>7,8</sup> Vīrusa kapsīds sastāv no diviem strukturāliem proteīniem – VP1 (83 kDA) un VP2 (53 kDA). Parasti inficēšanās ar parvovīrusu B19 notiek tieša kontakta ceļā ar elpošanas ceļu sekrētiem, ko visbiežāk novēro ziemas un pavasara mēnešos.<sup>8</sup>

Pastāv uzskats, ka seronegatīvas sievietes ir uzņēmīgas pret parvovīrusa B19 infekciju.<sup>9,10</sup> Lielākoties grūtniecības, kuru laikā attīstās parvovīrusa B19 infekcija, beidzas ar savlaicīgām dzemdībām un vesela bērna piedzimšanu.<sup>10,11,12</sup> Taču infekcija grūtniecības laikā rada augļa inficēšanās risku, kas var izraisīt hydrops fetalis vai intrauterīnu augļa nāvi. Literatūras dati liecina, ka ~1-11% gadījumu mātes infekcija izraisa augļa nāvi.<sup>10,13,14,17</sup>

Pastāv uzskats, ka, tā kā parvovīruss B19 galvenokārt replicējas eritrocītu priekštečos, infekcija grūtniecības laikā var izraisīt augļa nāvi sakarā ar smagu augļa anēmiju. Uzskata, ka šī smagā anēmija, kuras gadījumā hemoglobīna līmenis ir mazāks par 2 g/dl, ir primārais hydrops fetalis cēlonis.<sup>15,16</sup> Jaunākā pētījuma dati liecina, ka augļa nāve ir lielā mērā saistīta ar mātes inficēšanos ar parvovīrusu B19 pirmajās 20 grūtniecības nedēļās.<sup>17</sup> Jaunākās literatūras dati norāda, ka gada laikā apmēram 3000 augļa nāves gadījumu rodas B19 infekcijas dēļ.<sup>18</sup>

Ar parvovīrusu B19 saistītie simptomi parādās tikai pēc virēmijas fāzes, kuras laikā pacients ir kontagiozs.<sup>10</sup> Turklāt ir zināms, ka inficēšanās risks ir augstāks, ja starp indivīdiem pastāv ciešs kontakts, piemēram, skolās, dienas aprūpes centros un slimnīcās. Slimību kontroles centrs (Centres for Disease Control) neiesaka izolēt cilvēkus ar parvovīrusa infekcijas simptomiem (piemēram, infekciozo eritēmu) no šādām vietām. Taču ieteicams informēt visus iesaistītos cilvēkus par inficēšanās iespēju.<sup>10</sup>

Tādēļ ir svarīgi noteikt parvovīrusa B19 antivielas cilvēkiem, kuriem pastāv inficēšanās risks vai kuri ir bijuši inficēti ar parvovīrusu B19.

## Analīzes princips

Biotrin parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvā analīze ir mjū noteikšanas (*mu-capture*) daudzslāņu imūnfermentatīvā analīze IgM klases antivielu pret parvovīrusu B19 noteikšanai cilvēka asins serumā un plazmā. Ja serumā vai plazmā būs specifiskās IgM antivielas, tās saistīsies pie iedobēm, kas pārklātas ar truša pret cilvēka IgM. Pēc skalošanas pievieno parvovīrusa B19 biotinilēto rekombinanto VP2 proteīnu, kas saistās ar iedobēs esošo cilvēka parvovīrusa B19 IgM. Vēl pēc vienas skalošanas tiek pievienota streptavidīna peroksidāze, kas saistās ar iedobēs esošo biotinilēto VP2. Pēc tam visu kompleksu nosaka, pievienojot tetrametilbenzidīna (TMB) substrātu, kas peroksidāzes klātbūtnē iekrāsojas zils. Beigās, pievienojot bloķējošu reaģentu, tiek iegūts stabili dzeltens galaprodukts.

## Piesardzība

### Drošība

- Izmantošanai tikai *in vitro* diagnostikai.
- Reaģenti, kas apzīmēti ar \*\*, tiek uzskatīti par POTENCIĀLI BIOLOĢISKI BĪSTAMIEM MATERIĀLIEM. Katra pozitīvās kontroles, negatīvās kontroles un kalibratora (robežvērtības kontroles) sagatavošanā izmantotā donora vienība tika testēta ar FDA atļautu metodi, lai noteiktu HBsAg, antivielas pret HIV un HCV, un rezultāts bija negatīvs. Taču, tā kā neviena metode nevar absolūti garantēt infekciju ierosinātāju neesamību, visus šos reaģentus un visus pacienta paraugus jāapstrādā 2. biodrošības līmenī, kā ieteikts apstrādāt jebkuru potenciāli inficēto cilvēka asins serumu vai asins paraugu *CDC/NIH* rokasgrāmatā „Biodrošība mikrobioloģijas un biomedicīnas laboratorijās”, 1988. gads (“*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,*” 1988).
- Daži reaģenti satur ProClin 950, ProClin 300 un Bronidox L, kas var būt toksiski, ja nokļūst kuņģa-zarnu traktā.
- Bloķējošais šķīdums satur sērskābi, kurai ir korozīva iedarbība. Jāizvairās no saskares ar ādu un acīm. Ja notikusi saskare, nekavējoties jānoskalo ar ūdeni un jāmeklē medicīniskā palīdzība.
- Substrāts satur TMB, kas var izraisīt ādas vai gļotādu kairinājumu. Jebkurš substrāts, kas saskaras ar ādu, ir jānoskalo ar ūdeni.
- Biotin VP2 koncentrāts un Biotin VP2 atšķaidītājs satur nātrija azīdu, kas, mijiedarbojoties ar svina un vara caurulēm, var veidot potenciāli sprādzienbīstamus metālu azīdus. Lai novērstu azīdu uzkrāšanos, izlejot reaģentu, tas jānoskalo ar lielu daudzumu ūdens.
- Visus klīniskos paraugus, inficētos vai potenciāli inficētos materiālus jāiznīcina saskaņā ar labas laboratorijas prakses prasībām. Ar visiem šāda veida materiāliem jāstrādā un tie jāiznīcina tā, it kā tie būtu potenciāli inficēti.
- Strādājot ar paraugiem un veicot testēšanu, jālieto aizsargtērps, vienreizējās lietošanas gumijas cimdi un acu aizsargi. Pēc darba rūpīgi jānomazgā rokas.
- Neizmantojiet muti materiāla iesūkšanai pipetē un nekad neēdiet vai nedzeriet pie laboratorijas darba galda.

- Ķīmikāliju atliekas, paraugi un komplekta sastāvdaļas parasti tiek uzskatīti par bīstamiem atkritumiem. Visus šāda veida materiālus jālikvidē saskaņā ar vispāratzītām drošības procedūrām.
- Komplekts ir paredzēts tikai kvalificēta laboratorijas personāla lietošanai.

### *Procedūras*

- Ja, veicot analīzi, netiek ievērots atļautais laiks un temperatūras režīms, iespējami nepareizi rezultāti. Šādā gadījumā analīze ir jāatkārto.
- Nelietojiet komplektu vai atsevišķus reaģentus pēc to derīguma termiņa beigām.
- Nesajauciet vai neizvietojiet reaģentus, kuriem ir atšķirīgi komplekta sērijas numuri, izņemot skalošanas koncentrātu, parauga atšķaidītāju un bloķējošo šķīdumu.
- Protokola neievērošana var radīt kļūdainus rezultātus.
- Visiem reaģentiem inkubatorā jāsasilst līdz istabas temperatūrai (20 – 25°C), un tie pirms lietošanas labi jāsamaisa.
- Reaģentus nedrīkst ilgstoši atstāt tiešos saules staros un /vai temperatūrā, kas pārsniedz 2 – 8°C .
- Skalošanas šķīdumam nepieciešams augstas kvalitātes destilēts vai dejonizēts ūdens. Zemas kvalitātes vai kontaminēta ūdens lietošana var mainīt analīzes pamatkrāsu.
- Visu reaģentu sagatavošanai vienmēr izmantojiet tīrus, ieteicams, vienreizējās lietošanas, stikla traukus.
- Jāievēro piesardzība, lai izvairītos no sastāvdaļu kontaminēšanas, un katram paraugam un katrai sastāvdaļai vienmēr jālieto jauns pipetes uzgalis.
- Paņemiet tikai testēšanai nepieciešamo konjugāta tilpumu. Nelejiet neizlietos reaģentus atpakaļ pudelē vai pipetē tieši no pudeles, lai izvairītos no kontaminācijas.
- Tā kā konjugāts ir gaismas jutīgs, jāizvairās no pārāk ilgas tā uzglabāšanas gaismā.
- Iepildot reaģentu, pipete jāvērs pret iedobes sānu sienas viduspunktu, un jāuzmanās, lai tā netiktu saskrāpēta ar pipetes uzgali.
- Nedrīkst pieļaut iedobju izžūšanu nevienā no analīzes stadijām.
- Vienmēr nodrošiniet, lai uz iedobju augšējās virsmas nebūtu pilienu. Pabeidzot procedūras soli, pilienus uzmanīgi jānosusina.
- Jānodrošina, lai pirms rezultātu nolasīšanas plates apakšējā virsma būtu tīra un sausa.
- Pirms testēšanas uzsākšanas jāizstrādā identifikācijas un sadales plāns.
- Lietojot automātisko vai pusautomātisko analizatoru, ir svarīgi nodrošināt sakritību ar Biotrin parvovīrusa B19 IgM EIA produkta manuālo testēšanas metodi.

## Komplekta sastāvdaļas

### Piegādātie materiāli

1. Apvalkota ELISA plate

12 x 8 iedobes, pārklātas ar truša pret cilvēka IgM atkārtoti noslēdzamā maisiņā.

PLA	IgM
-----	-----

Sarkana apmale

2. Pozitīvā kontrole\*\*

1 x 3 ml pozitīva seruma/plazmu stabilizējošā buferšķīdumā ar ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

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

Sarkans vāciņš

3. Negatīvā kontrole\*\*

1 x 3 ml negatīva seruma stabilizējošā buferšķīdumā ar ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

CONTROL	-	IgM
---------	---	-----

Zaļš vāciņš

4. Kalibrators (robežvērtības kontrole\*\*)

1 x 3 ml pozitīva seruma stabilizējošā buferšķīdumā ar ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

CAL
-----

Brūns vāciņš

5. Biotin VP2 koncentrāts

1 x 1,7 ml koncentrēta (10x) biotinilēta VP2 šķīduma buferšķīdumā, kas satur stabilizatorus un nātrija azīdu (0,01%).

BVP2	10X
------	-----

Balts vāciņš

6. Biotin VP2 atšķaidītājs

1 x 17 ml buferšķīduma atšķaidīšanai, kas satur stabilizatorus, ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

BVP2	DIL
------	-----

Balts vāciņš

7. Fermentu konjugāta koncentrāts

1 x 1,7 ml streptavidīna-HRP konjugāta (10x) stabilizējošā buferšķīdumā ar ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

CONJ	ENZ	10X
------	-----	-----

Zils vāciņš

8. Fermentu konjugāta atšķaidītājs

1 x 17 ml buferšķīdums atšķaidīšanai, kas satur stabilizatorus, ProClin 950 (0,05%) un Bronidox L (0,02%).

CONJ	ENZ	DIL
------	-----	-----

Zils vāciņš

9. Parauga atšķaidītājs – gatavs lietošanai  
1 x 110 ml PBS buferšķīduma ar stabilizatoriem un ProClin 300 (0,05%).

DIL	SPE	1X
-----	-----	----

Caurspīdīgs vāciņš

10. Skalošanas koncentrāts

1 x 55 ml koncentrēta (25X) TBS buferšķīduma ar Tween 20 un ProClin 950 (0,15%).

BUF	WASH	25X
-----	------	-----

Caurspīdīgs vāciņš

11. Substrāts

1x17ml ml tetrametilbenzidīna (TMB) šķīduma.

SUBS	TMB
------	-----

Brūns vāciņš

12. Bloķējošais šķīdums

1 x 17 ml 0,5mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

SOLN	STP
------	-----

Caurspīdīgs vāciņš

13. Norādījumi lietošanai.



\*\* Potenciāli bioloģiski bīstams materiāls.

### ***Nepieciešamie papildmateriāli manuālai apstrādei***

- Aprīkojums seruma savākšanai.
- Augstas kvalitātes destilēts vai dejonizēts ūdens.
- Precīzas pipetes, mikropipetes un vienreizējās lietošanas uzgaļi ar 10 µl, 100 µl, 1 ml un 5 ml tilpumu.
- Testa stobriņi vai to ekvivalenti paraugu sagatavošanai.
- Tīri laboratorijas trauki ar tilpuma atzīmēm.
- Graduēti cilindri.
- Plastmasas vāciņš vai izolācijas lente mikroiedobju platei.
- Papīra dvieļi vai absorbējošs papīrs.
- Taimeris.
- Manuāla vai automātiska skalošanas ierīce.
- ELISA plates lasītāji ierīce ar 450 nm filtru (papildu 630 nm filtrs ir izvēles iespēja, bet tā izmantošana ir ieteicama).
- 37°C inkubators.

## **Automātiskie vai pusautomātiskie EIA analizatori**

Biotrin parvovīrusa IgM EIA var lietot kopā ar dažādiem automātiskiem vai pusautomātiskiem ELISA analizatoriem. Svarīgi, lai ar Biotrin parvovīrusa IgM EIA iegūtie rezultāti, lietojot automātisko analizatoru, atbilstu rezultātiem, ko iegūst tiem pašiem paraugiem, izmantojot manuālu testa metodi.

### **Uzglabāšana un stabilitāte**

- Komplekts ir stabils līdz derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz ārējās kastītes marķējuma, ja tas tiek uzglabāts 2 – 8°C temperatūrā.
- 8 iedobju sloksnes jāuzglabā atkārtoti noslēdzamā maisiņā kopā ar desikanta maisiņu.
- Visas neizlietotās sastāvdaļas pēc lietošanas nekavējoties jāuzglabā 2 – 8°C temperatūrā.
- Izšķīdinātais Biotin VP2 un skalošanas šķīdums ir stabili 1 mēnesi, ja tiek uzglabāti 2 – 8°C temperatūrā.
- Izšķīdināts skalošanas šķīdums ir stabils arī 2 nedēļas, ja tiek uzglabāts istabas temperatūrā.
- Izšķīdināts fermentu konjugāts ir stabils vienu mēnesi, ja tiek uzglabāts stikla konteinerā 2 – 8°C temperatūrā.

### **Paraugu savākšana un uzglabāšana**

Biotrin parvovīrusa B19 IgM EIA var izmantot gan cilvēka asins plazmu, gan serumu. Asinīm, kas tiek iegūtas, punktējot vēnu, jāļauj sarecēt istabas temperatūrā (20 – 25°C), pēc tam tās 10 minūtes jācentrifugē, izmantojot ātrumu 1500 x g. Ja serumu vai plazmu neanalizē nekavējoties pirmo 8 stundu laikā, tos var uzglabāt 2 – 8°C temperatūrā 2 – 3 dienas vai sasaldēt -20°C temperatūrā, ja nepieciešama ilgstoša uzglabāšana vai transportēšana (paraugi ir stabili -20°C vismaz 1 gadu). Litija heparīna, EDTA un citrētas plazmas lietošana ir pieļaujama, veicot šo testēšanas procedūru. Testēšanai nav ieteicams izmantot hemolizētu, ikterisku, hlozu vai ar mikrobiem inficētu serumu. Testa paraugus nedrīkst pakļaut arī atkārtotai sasaldēšanai un atkausēšanai.

**Piezīme:** kopējā visu plazmas komponentu koncentrācija var būt nedaudz samazināta citrētā plazmā sakarā ar citrāta buferšķīduma tilpumu, ko izmanto koagulācijas novēršanai.

### **Reaģentu un paraugu sagatavošana**

#### ***Reaģentu sagatavošana***

- Reaģentu tilpumi pamatojas uz paraugu dublikātu testēšanu.
- Skalošanas šķīdums  
Katrai 8 iedobju sloksnei pievieno 4 ml skalošanas koncentrāta ar 96 ml dejonizēta ūdens.  
Sagatavotais reaģents ir stabils 1 mēnesi, ja tiek uzglabāts 2 – 8°C temperatūrā.  
Sagatavotais reaģents ir stabils arī 2 nedēļas, ja tiek uzglabāts istabas temperatūrā.

- Biotin VP2  
Katrai izmantotai 8 iedobju sloksnei pievieno 100 µl Biotin VP2 koncentrāta ar 900 µl Biotin VP2 atšķaidītāja.
- Fermentu konjugāts  
Katrai 8 iedobju sloksnei pievieno 100 µl fermentu konjugāta koncentrāta ar 900 µl fermentu konjugāta atšķaidītāja.  
Sagatavotais reaģents ir stabils 1 mēnesi, ja tiek uzglabāts 2 – 8°C temperatūrā.

Visi pārējie reaģenti ir gatavi lietošanai, un tiem ir atbilstoša atšķaidījuma pakāpe.

### ***Paraugu sagatavošana***


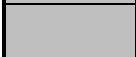

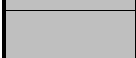

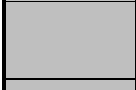

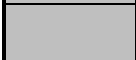
Katram paraugam marķētā stobriņā vai tā ekvivalentā iepilda 1 ml parauga atšķaidītāja. Pievieno 10 µl seruma vai plazmas parauga un sajauc.

**Piezīme:** atšķaidītos paraugus nedrīkst uzglabāt. Ja nepieciešama atkārtota testēšana, nepieciešams pagatavot svaigu paraugu.

### **Analīzes procedūra**

**Piezīme:** ja lieto automātisku instrumentu:

- plastmasas vāciņš/izolācijas lente nav nepieciešama;
  - pēc skalošanas nav nepieciešams stingri pasist plati pret absorbējošā papīra dvieli.
1. Pirms lietošanas visiem reaģentiem un paraugiem inkubatorā jāļauj sasniegt istabas temperatūru (20 – 25°C).
  2. Jānosaka 8 iedobju slokšņu skaits. Jāizveido kontroļu un paraugu identifikācijas un sadales plāns, kā norādīts 1. attēlā. Pirmā sloksne ir paredzēta viena pacienta parauga testēšanai, katra papildus sloksne ļauj testēt papildus 4 pacientu paraugus.

	1. attēls	1. Sloksne
<b>A</b>		Negatīvā kontrole
<b>B</b>		Negatīvā kontrole
<b>C</b>		Pozitīvā kontrole
<b>D</b>		Pozitīvā kontrole
<b>E</b>		Kalibrators (robežvērtības kontrole)
<b>F</b>		Kalibrators (robežvērtības kontrole)
<b>G</b>		Pacients nr. 1
<b>H</b>		Pacients nr. 1

Reaģentu tilpumi pamatojas uz paraugu dublikātu testēšanu. Lietotājiem ir ieteicams iepazīties ar darbības raksturojumu un validēt analīzi savā laboratorijā pirms testēšanas uzsākšanas.

3. Izņemiet izvēlēto 8 iedobju slokšņu daudzumu, ievietojiet tās plastmasas rāmī un pārklājiet ar plastmasas vāciņu/izolācijas lenti. Neizmantojās sloksnes ielieciet atpakaļ maisiņā un noslēdziet kopā ar desikantu.
4. Sagatavojiet skalošanas šķīdumu (skatīt „Reaģentu un paraugu sagatavošana”).
5. Sagatavojiet pacienta serumu (skatīt „Reaģentu un paraugu sagatavošana”).
6. Noņemiet no sloksnēm vāciņu un ar pipeti iepiliniet iedobēs dublikātā 100 µl lietošanai gatavās negatīvās kontroles, lietošanai gatavās pozitīvās kontroles, lietošanai gatavā kalibratora (robežvērtības kontroles) un sagatavotos pacientu paraugus.
7. Nosedziet iedobes ar plastmasas vāciņu/izolācijas lenti un inkubējiet 60 minūtes (+/- 5 minūtes) istabas temperatūrā (20 – 25°C) inkubatorā.
8. Noņemiet vāciņu un skalojiet katru iedobi 4 reizes ar skalošanas šķīdumu (250 – 320 µl). Pēc skalošanas stingri pasitiet plati pret absorbējošā papīra dvieli.
9. Sagatavojiet Biotin VP2 (skatīt „Reaģentu un paraugu sagatavošana”).
10. Pēc skalošanas soļa nekavējoties iepiliniet ar pipeti visās iedobēs 100 µl sagatavotā Biotin VP2.
11. Nosedziet iedobes ar plastmasas vāciņu/izolācijas lenti un inkubējiet 30 minūtes (+/- 5 minūtes) 35 – 39°C inkubatorā.
12. Noņemiet vāciņu un skalojiet katru iedobi 4 reizes ar skalošanas šķīdumu (250 – 320 µl). Pēc skalošanas stingri pasitiet plati pret absorbējošā papīra dvieli.
13. Sagatavojiet fermenta konjugātu (skatīt „Reaģentu un paraugu sagatavošana”).
14. Pēc skalošanas soļa nekavējoties iepiliniet ar pipeti katrā iedobē 100 µl IgM fermenta konjugāta.
15. Nosedziet iedobes ar plastmasas vāciņu/izolācijas lenti un inkubējiet 30 minūtes (+/- 5 minūtes) 35 – 39°C inkubatorā.
16. Noņemiet vāciņu un skalojiet katru iedobi 4 reizes ar skalošanas šķīdumu (250 – 320 µl). Pēc skalošanas stingri pasitiet plati pret absorbējošā papīra dvieli.
17. Pēc skalošanas soļa nekavējoties iepiliniet ar pipeti visās iedobēs 100 µl substrāta.
18. Inkubējiet 30 minūtes (+/- 2 minūtes) 35 – 39°C inkubatorā.
19. Ar pipeti iepiliniet 100 µl bloķējošā šķīduma visās iedobēs un sajauciet. Katra pievienošana ir jāveic tādā pašā secībā un laika intervālā kā substrāta pievienošana.
20. Nolasiet rezultātus 30 minūšu laikā ar ELISA plates lasītājiem.

**Piezīme:** ieteicama duāla viļņa garuma nolasīšana – pie 450 nm un 630 nm, pēdējo izmantojot kā atsauces viļņa garumu (630 nm filtram kā nulles vērtību izmantojiet gaisa vērtību). Ja šī funkcija ELISA plates lasītājerīcē nav pieejama, izmantojiet viena viļņa garuma nolasījumu pie 450 nm.

## Rezultātu interpretācija

Parvovīrusa IgM esamība vai neesamība tiek noteikta attiecībā pret aprēķināto robežvērtību (*Cut Off Value (COV)*).

### *COV aprēķināšana*

$COV =$  kalibratora (robežvērtības kontroles) vidējais  $OD$

### *Interpretācija (1): absorbcija*

Paraugi ar vidējo absorbcijas nolasījumu lielāku kā  $COV \times 1,1$  tiek uzskatīti par reaktīviem (pozitīviem) pret parvovīrusa B19 IgM.

Paraugi ar vidējo absorbcijas nolasījumu mazāku kā  $COV \times 0,9$  tiek uzskatīti par nereaktīviem (negatīviem) pret parvovīrusa B19 IgM.

Paraugi ar vidējo absorbcijas nolasījumu lielāku vai vienādu ar  $COV \times 0,9$  vai mazāku vai vienādu ar  $COV \times 1,1$  tiek uzskatīti par pretrunīgiem.

Piezīme: ja tiek izmantoti automātiskie instrumenti, vienas analīzes rezultāti ar citas analīzes rezultātiem jāsalīdzina, izmantojot tikai indeksa vērtības (skatīt 2. interpretāciju).

### *Interpretācija (2): indeksa vērtība*

Dažādu analīžu datu salīdzināšanu atvieglo indeksa vērtības izmantošana, kas atspoguļo parauga absorbcijas un analīzes robežvērtības attiecību. Šajā gadījumā indeksa vērtība  $<0,9$  vai  $>1,1$  liecina par attiecīgi negatīvu vai pozitīvu paraugu. Par pretrunīgu rezultātu liecina indeksa vērtība robežās no 0,9 līdz 1,1 (ieskaitot).

$$\text{Indekss} = \frac{\text{parauga absorbcija}}{\text{robežvērtība (COV)}}$$

Paraugi, kuri nav ne reaktīvi (pozitīvi), ne nereaktīvi (negatīvi) tiek uzskatīti par pretrunīgiem un ir jāanalizē atkārtoti. Ja atkārtotas testēšanas rezultāti ir pretrunīgi, tad pēc vienas nedēļas ir jāpaņem otrs paraugs. Ja arī otrais paraugs uzrāda pretrunīgu rezultātu, to var uzskatīt par nereaktīvu (negatīvu) pret parvovīrusa B19 IgM.

### **Kvalitātes kontroles kritēriji**

Pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un kalibrators (robežvērtības kontrole) vienmēr jāiekļauj testa rezultātu ticamības izvērtēšanā. Testēšanas rezultātus uzskata par ticamiem, ja tie atbilst šādiem kritērijiem.

1. Pozitīvās kontroles vidējā absorbcija ir lielāka vai vienāda ar 0,8 optiskā blīvuma vienībām.
2. Negatīvās kontroles vidējā absorbcija ir mazāka vai vienāda ar 0,15 optiskā blīvuma vienībām un mazāka par  $COV \times 0,9$ .

Ja rezultāti neatbilst iepriekš minētiem kritērijiem, testu uzskata par nederīgu un to nepieciešams atkārtot.

## Lietošanas ierobežojumi

- Lai uzstādītu parvovīrusa B19 infekcijas diagnozi, rezultāti jāizvērtē kopā ar pacienta klīniskajiem un epidemioloģiskajiem rādītājiem un citiem klīniski laboratoriskajiem rezultātiem.
- Nereaktīvi (negatīvi) rezultāti neizslēdz parvovīrusa B19 infekciju. Ja pastāv aizdomas par parvovīrusa B19 infekciju, negatīva rezultāta gadījumā testēšana ir jāatkārto pēc 2 nedēļām.
- Nav pietiekamu datu citu bioloģisko šķidrumu vai serumu testēšanas izvērtēšanai.
- Testa veikspēju var ietekmēt procedūras, rezultātu interpretācijas un ieteicamo piesardzības pasākumu neievērošana.
- Ja paraugu, kas satur antinukleārās antivielas, analīzei tiek izmantota Biotrin parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvā analīze, var iegūt pretrunīgu vai pozitīvu testa rezultātu (skatīt nodaļu „Darbības raksturojums”).
- Pozitīvu vai pretrunīgu testa rezultātu var iegūt arī EBV IgM pozitīviem paraugiem, ja to analīzei izmanto Biotrin parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvo analīzi (skatīt nodaļu „Darbības raksturojums”).
- Imūnkompromitētu pacientu testa rezultāti var būt grūti interpretējami.
- Analīzes veikspēja ir validēta, pamatojoties uz paraugu dublikātu testēšanu. Laboratorijas personālam ir ieteicams iepazīties ar darbības raksturojumu un tikai tad izvērtēt vienas kopijas pacienta paraugus.

## Darbības raksturojums

### *Jutība un specifiskums*

Kopumā 184 paraugi tika testēti ar trīs dažādām Biotrin 4. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA sērijām. Paraugi tika sadalīti pozitīvajos un negatīvajos, izmantojot Biotrin 3. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA. Pozitīvie paraugi sākotnēji tika raksturoti pēc klīniskajiem simptomiem, kas saistīti ar parvovīrusa B19 infekciju un/vai PCR. Rezultātu, kas iegūti ar Biotrin 3. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA un Biotrin 4. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA, salīdzinājums ir parādīts 1. tabulā.

Biotrin parvovīrusa B19 3. paaudzes IgM EIA					
Biotrin parvovīrusa B19 4. paaudzes IgM EIA		Pozitīvs	Negatīvs	Pretrunīgs	Kopā
	Pozitīvs	100	0	0	100
	Negatīvs	0	84	0	84
	Pretrunīgs	0	0	0	0
	Kopā	100	84	0	184

**1. tabula.** Jutības un specifiskuma aprēķini Biotrin 4. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA salīdzinājumā ar Biotrin 3. paaudzes parvovīrusa B19 IgM EIA.

Saskaņā ar FDA vadlīnijām šajā aprēķinā tika iekļauti arī pretrunīgie rezultāti. Jutības un specifiskuma procentuālā attiecība tika aprēķināta pēc šādas formulas.

Jutība = patiesi pozitīvie rezultāti (true positives – TP) dalīti ar (TP + viltus negatīvie rezultāti + pretrunīgie rezultāti) x 100

$$\text{Jutība \%} = (100/100) \cdot 100 = 100\%$$

Specifiskums = patiesi negatīvie rezultāti (true negatives – TN) dalīti ar (TN + viltus pozitīvie rezultāti + pretrunīgie rezultāti) x 100

$$\text{Specifiskums \%} = (84/84) \cdot 100 = 100\%$$

## Analīzes iekšējā reproducējamība

Vairākas seruma paraugu sērijas, kuru parvovīrusa B19 IgM koncentrācija bija diapazonā no nereaktīvas līdz izteikti reaktīvai, katra tika analizēta kopumā trīsdesmit reizes. Kopijas tika testētas uz vienas ELISA plates. Tika saskaitītas iegūtās OD vērtības un aprēķināts vidējais OD, standarta novirze (SD) un variācijas koeficienta procentuālā attiecība (%CV), skatīt 2. tabulu. Šie rezultāti ir attēloti arī kā indeksa vērtības 3. tabulā. CV procentuālā attiecība, izteikta kā OD (rādītājs), bija diapazonā no 9,6% nereaktīvam paraugam (negatīvs 2) līdz 4,7% izteikti reaktīvam paraugam.

Testa paraugs	Vidējais OD	SD	%CV	N
SR-A	1,452	0,068	4,7	30
MR-B	0,606	0,038	6,4	30
WR-C	0,453	0,022	4,8	30
UR-D	0,022	0,002	8,1	30
UR-E	0,022	0,002	9,6	30

**2. tabula.** Analīzes iekšējā reproducējamība, izteikta kā OD 30 kopiju sērijām, kas katra iegūta no 5 dažādiem seruma paraugiem, kuru parvovīrusa B19 IgM koncentrācija bija diapazonā no nereaktīvas līdz izteikti reaktīvai.

Testa paraugs	Vidējais	SD	%CV	N
CLB 14	7,3	0,344	4,7	30
CLB 74	3,04	0,193	6,4	30
CLB 17	2,28	0,110	4,8	30
CLB 36	0,15	0,012	8,1	30
CLB 34	0,15	0,015	9,6	30

**3. tabula.** Analīzes iekšējā reproducējamība izteikta kā indeksa vērtības 30 kopiju sērijām, kas katra iegūta no 5 dažādiem seruma paraugiem, kuru parvovīrusa B19 IgM koncentrācija bija diapazonā no nereaktīvas līdz izteikti reaktīvai.

## Analīžu savstarpējā reproducējamība

Analīžu savstarpējā reproducējamība tika analizēta, izmantojot 3 Biotrin parvovīrusa B19 IgM EIA sērijas (4. paaudzes). Paraugu panelis, kas ietvēra izteikti reaktīvus (5), vidēji reaktīvus (2), vāji reaktīvus (6) un nereaktīvus (7) paraugus, tika analizēts ar katru sēriju kopumā 10 reizes. Rezultātā katram paraugam tika iegūts galīgais paraugu kopas lielums (n) 30 paraugi. Analizējot šos datus, lai noteiktu analīžu un sēriju savstarpējo reproducējamību, Biotrin parvovīrusa B19 IgM EIA parādīja ļoti labu testa rezultātu korelāciju starp dažādām analīzēm un dažādām sērijām. Visu 6 analīžu paraugu reproducējamības dati parādīti 4. tabulā.

Parauga veids	Testa paraugs	Vidējais indekss	SD	%CV	N
Nereaktīvs	CLB 80	0,1	0,01978	20%	30
Nereaktīvs	CLB36	0,1	0,025944	24%	30
Vāji reaktīvs	2908	2,0	0,301846	15%	30
Vāji reaktīvs	4923	1,5	0,246982	16%	30
Vidēji reaktīvs	CLB 82	3,4	0,44587	13%	30
Izteikti reaktīvs	CLB 75	7,3	1,205097	17%	30

**4. tabula.** Kopējā analīžu savstarpējā reproducējamība. Dati (rādītāji) apkopoti no Biotrin parvovīrusa B19 IgM EIA 3 sērijām.

#### *Analīzes specifiskums*

Biotrin parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvās analīzes specifiskums tika novērtēts, analizējot paraugus, kas iegūti no pacientiem ar vīrusa infekcijām vai slimībām, kuru simptomi līdzīgi parvovīrusa B19 klīniskajiem simptomiem (5. tabula).

Testētie paraugi	Pozitīvo paraugu skaits
Antinukleārās antivielas (ANA)	1/10†
Autoimūna slimība	0/4
Citomegalovīruss (CMV)	0/16
Epšteina-Barra vīruss (EBV)	1/32†
Hemolizēts paraugs	0/3
Herpes simplex vīruss (HSV)	0/2
B gripa	0/5
Hilozs paraugs	0/3
Lupus erythematosus	0/6
Cūciņu vīruss	0/1
Mikoplazma	1/5†
Paragripa	0/1
Reimatoīdais faktors (RF)	0/15
Masaliņu vīruss	0/10
Toxoplasma gondii	0/14
Varicella zoster vīruss (VZV)	0/3

**5. tabula.** Parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvās analīzes specifiskums.

† EBV IgM, mikoplazmas IgM un ANA paraugi, kas bija reaktīvi, veicot Biotrin 4. paaudzes parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvo analīzi, bija reaktīvi arī, veicot Biotrin 3. paaudzes parvovīrusa B19 IgM imūnfermentatīvo analīzi. Tādējādi nevar izslēgt īstas parvovīrusa B19 IgM reaktivitātes varbūtību.

## Parvovīrusa B19 IgM EIA procedūras kopsavilkums

Lūdzu, izlasiet visu produkta lietošanas instrukciju pirms analīzes lietošanas. Šis kopsavilkums sniedz tikai īsu ieskatu.

Sagatavojiet skalošanas buferšķīdumu.



Atšķaidiet paraugus attiecībā 1 pret 101 ar paraugu atšķaidītāju.



Ar pipeti iepilniet iedobēs dublikātā 100 µl (lietošanai gatavas) negatīvās kontroles, 100µl (lietošanai gatavas) pozitīvās kontroles, 100 µl (lietošanai gatava) kalibratora (robežvērtības kontroles) un 100 µl sagatavotos paraugus.



Inkubējiet 60 minūtes istabas temperatūrā (20 – 25)°C inkubatorā.



Skalojiet sloksnes 4 reizes.



Sagatavojiet Biotin VP2.



Pievienojiet 100 µl sagatavotā Biotin VP2.



Inkubējiet 30 minūtes 35– 39°C inkubatorā.



Skalojiet sloksnes 4 reizes.



Sagatavojiet fermenta konjugātu.



Pievienojiet 100 µl IgM konjugāta.



Inkubējiet 30 minūtes 35 – 39°C inkubatorā.



Skalojiet sloksnes 4 reizes.



Pievienojiet 100 µl substrāta.



Inkubējiet 30 minūtes 35– 39°C inkubatorā.



Pievienojiet 100 µl bloķējošā šķīduma.



Nolasiet pie 450 nm Ar 630 nm atsauci vai bez tās.

## Simbolu skaidrojums

- *In vitro* diagnostikas medicīniskā ierīce



- Temperatūras ierobežojums



- Ražotājs



- Izlietot līdz



- Partijas kods



- Kataloga numurs



- Norādījumi lietošanai.



## Irodalomjegyzék

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, et al.: Parvovirus – Like Particles in Human Sera. *The Lancet*, 1: 72 – 73, 1975.
2. Anderson MJ, Higgins 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, Khouzam MN, Maxwell DJ, et al.: Human Parvovirus B19 and Hydrops Fetalis. Lancet 1: 535,1988.
17. Enders M, Weidner A, Zoellner I, Searle K, Enders G : Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. Prenatal Diagnosis 24: 513-518, 2004
18. Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host – pathogen interactions of Parvovirus B19, Journal of Medical Microbiology 53: 459 – 475, 2004



**Biotrin International Ltd.**  
**93 The Rise, Mount Merrion**  
**Co Dublin**  
**Ireland**  
**Tel: + 353 (01) 2831166**  
**Fax: + 353 (01) 2831232**  
**e-mail: [info@biotrin.ie](mailto:info@biotrin.ie)**  
**[www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)**

**Dokumenta kods: PEMIV-465-02 11/09**