

Česky
Katalogové číslo: V619IM
Formát soupravy: 12 x 8
Kód dokumentu: PEMIV-464-02 11/09



Parvovirus B19 Enzymová imunoanalýza IgM

Enzymová imunoanalýza pro kvalitativní stanovení IgM protilátek proti Parvoviru B19
v lidském séru a plasmě.

CE

Obsah

Použití	3
Úvod	3
Princip metody	4
Bezpečnostní opatření	4
Bezpečnost	4
Postup	5
Součásti sady	6
Dodaný materiál	6
Další potřebný materiál	7
Automatické nebo semiautomatické procesory EIA	8
Skladování a stabilita	8
Odběr a uchování vzorků	8
Příprava reagensů a vzorků	9
Postup analýzy	10
Interpretace výsledků	12
Kritéria kontroly kvality	13
Omezení použití	13
Znaky analytické metody	14
Souhrn postupu při vyšetření IgM proti Parvoviru	18
Vysvětlení symbolů	19
Literatura	20

Použití

Parvovirus B19 enzymová analýza IgM je určena ke kvalitativnímu stanovení IgM protilátek proti Parvoviru B19 v lidském séru a plasmě. Test je určen k použití u všech žen, u nichž je podezření na expozici Parvoviru B19, ke zjištění přítomnosti recentní nebo současné infekce. Spolu s enzymatickou imunoanalýzou Biotrin Parvovirus B19 IgG může být tento test použit jako součást klinického stanovení rizika hydrropsu fétu a odúmrťí fétu.

Úvod

Parvovirus B19 byl poprvé identifikován jako lidský patogen v roce 1975 a poté bylo prokázáno, že je původcem mnoha klinických stavů, jako je vyrážka, artralgie a poškození fétu.^{1,2,3} Infekce Parvovirem B19 u dospělých, především žen, může způsobit akutní artritidu, která může nějakou dobu přetrvávat.⁴ Infekce může vést u pacientů s oslabenou imunitou a u jedinců trpících hemolytickými poruchami, jako je srpkovitá anémie, k život ohrožující anémii.^{5,6} Virus je dvacetistěnný nezabalený virus o průměru 18 – 25 nm a obsahuje genom v lineární jednovláknové DNA (5,5 kb), která je chráněna vnějším obalem.^{7,8} Obal viru se skládá ze dvou strukturálních proteinů, VP1 (83kDA) a VP2 (53kDA). Infekce Parvovirem B19 se obvykle získává přímým kontaktem s respiračním sekretem a běžně k ní dochází v menších lokalizovaných epidemiích během zimních a jarních měsíců.⁸

Dnes se soudí, že seronegativní ženy jsou k infekci Parvovirem B19 náchylné.^{9,10} Většina těhotenství, během nichž dojde k infekci Parvovirem B19, končí porodem zdravého dítěte v termínu.^{10,11,12} Infekce během těhotenství však představuje riziko přenosu na fétus, což může mít za následek hydrrops fétu nebo nitroděložní odúmrťí. Podle odhadů v literatuře dochází k úmrťí fétu po infekci matky mezi 1 a 11 % případů.^{10,13,14,17} Předpokládá se, že vzhledem k tomu, že se Parvovirus B19 replikuje především v prekursorských erythrocytech, může vést infekce během těhotenství k úmrťí fétu následkem těžké anémie fétu. Předpokládá se, že tato těžká anémie s poklesem koncentrace hemoglobinu na méně než 2 g/dl je hlavní příčinou hydrropsu fétu.^{15,16} Nedávná studie ukazuje, že riziko úmrťí fétu je do značné míry omezeno na infekci matky Parvovirem B19 během prvních 20 týdnů těhotenství.¹⁷ V čerstvých literárních pramenech se odhaduje, že následkem infekce B19 dochází k přibližně 3 000 úmrťí fétů za rok.¹⁸

Symptomy spojené s infekcí Parvovirem B19 mohou být patrné až po skončení viremické (nakažlivé) fáze.¹⁰ Je dále známo, že existuje zvýšené riziko přenosu v situacích, kdy je pravděpodobný úzký kontakt mezi jedinci, např. ve školách, zařízeních pečovatelské služby a v nemocnicích. Centra pro kontrolu nemocí (CDC) nedoporučují, aby osoby se známky infekce Parvovirem (např. erythema infectiosum) byly z takového prostředí vylučovány. Doporučuje se však, aby byli příslušní jedinci uvědoměni o možnosti přenosu onemocnění.¹⁰

Rovněž je důležité zjišťovat stav protilátek proti Parvoviru B19 u jedinců, u nichž hrozí riziko onemocnění Parvovirem B19 nebo kteří již byli infikováni.

Princip metody

Enzymová imunoanalýza Biotrin Parvovirus B19 IgM je mu-capture sendvičová enzymová imunoanalýza ke zjištění protilátek třídy IgM proti Parvoviru B19 v lidském séru a plasmě. Specifické protilátky IgM, pokud jsou přítomny v séru nebo plasmě, se vážou na jamky potažené králičím protilidským IgM. Po vymytí je přidán rekombinantní biotinylovaný VP2 protein Parvoviru B19, který se váže k přítomnému lidskému IgM proti Parvoviru B19. Po dalším vymytí je přidána streptavidin-peroxidáza, která se váže k přítomnému biotinylovanému VP2 proteinu. Celý komplex se pak detekuje přidáním substrátu tetramethylbenzidinu (TMB), který v přítomnosti peroxidázy mění barvu na modrou. Přidáním zastavovacího činidla je získán stabilní žlutý konečný produkt.

Bezpečnostní opatření

Bezpečnost

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Reagencie označené ** jsou považovány za POTENCIÁLNĚ BIOLOGICKY NEBEZPEČNÝ MATERIÁL. Každá dárcovská jednotka při přípravě pozitivní kontroly, negativní kontroly a kalibrátoru (kontrola cut-off) byla testována metodou schválenou FDA na HBsAg a na protilátky proti HIV a HCV a byla shledána negativní. Nicméně, protože žádná testovací metoda nemůže úplně zajistit, že infekční agens není přítomno, musí se se všemi těmito reagensy nakládat podle 2. stupně biologické ochrany, jak se doporučuje v příručce CDC/NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1988, pro všechna potenciálně infekční lidská séra a krevní vzorky.
- Některé reagencie obsahují ProClin 950, ProClin 300 a Bronidox L, které mohou být po požití jedovaté.
- Zastavovací roztok obsahuje také kyselinu sírovou, což je žíravina. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě opláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
- Substrát obsahuje TMB, který může dráždit kůži a sliznice. Jakákoli látka, která přijde do kontaktu s kůží, musí být opláchnuta vodou.
- Koncentrát Biotin VP2 a ředící roztok Biotin VP2 obsahují azid sodný, který může s olověným a měděným potrubím tvořit potenciálně výbušné azidy kovů. Při likvidaci musejí být reagencie spláchnuty velkým objemem vody, aby se zabránilo tvorbě azidů.
- Všechny klinické vzorky, infekční a potenciálně infekční materiál likvidujte podle správné laboratorní praxe. S veškerým takovým materiálem musí být nakládáno jako s potenciálně infekčním a musí být likvidován jako potenciálně infekční.
- Při manipulaci se vzorky a při provádění analýzy noste ochranný oděv, jednorázové latexové rukavice a ochranu očí. Po skončení si důkladně umyjte ruce.
- Materiál nepipetujte ústy a u laboratorního stolu nikdy nejezte ani nepijte.
- Zbytky chemikálií, přípravků a součástí sady jsou obecně považovány za nebezpečný odpad. Všechny takové materiály musejí být likvidovány podle stanovených bezpečnostních postupů.
- Tato sada je určena pro použití pouze kvalifikovanými laboratorními pracovníky.

Postup

- Provádění analýzy mimo uvedené časové a teplotní limity může vést k neplatným výsledkům. Analýzy mimo stanovené časové a teplotní limity musejí být opakovány.
- Nepoužívejte sadu ani jednotlivé reagensie po uplynutí jejich data použitelnosti.
- Nesměšujte ani nedoplňujte reagensie ze sad s různými čísly šarže, s výjimkou vymývacího koncentrátu, ředícího roztoku na vzorky a zastavovacího roztoku.
- Odchýlení od dodaného protokolu může způsobit chybné výsledky.
- Před použitím nechejte všechny reagensie a vzorky ohřát v inkubátoru na pokojovou teplotu (20 – 25 °C) a dobře je promíchejte.
- Nevystavujte reagensie na delší dobu přímému slunečnímu záření ani teplotám nad 2 – 8 °C.
- Pro vymývací roztok je potřebná destilovaná nebo deionizovaná voda vysoké jakosti. Použití vody špatné jakosti nebo kontaminované vody může vést při analýze ke zbarvení pozadí.
- Pro všechny reagenční přípravky vždy používejte čisté, nejlépe jednorázové, skleněné nádoby.
- Je nutno dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci komponent; vždy je nutno používat pro každý vzorek a komponentu nové špičky pipet.
- Konjugát odebírejte pouze v množství nezbytném pro analýzu. Nenalévejte nepoužitou reagensii zpět do láhve, ani ji nepipetujte přímo z láhve. Mohlo by totiž dojít ke kontaminaci.
- Protože je konjugát citlivý na světlo, je nutno zabránit déletrvajícímú vystavení světlu.
- Reagensie by měla být dávkována ke středu stěny jamek, přitom je nutno dbát, aby se stěna jamky nepoškrábala špičkou pipety.
- Během žádné fáze analýzy nenechejte jamky vyschnout.
- Na horním povrchu jamek nikdy nesmějí být kapénky. Při dokončení kroku v postupu musejí být kapky jemně vysušeny.
- Zajistěte, aby byl dolní povrch detičsky před odečítáním čistý a suchý.
- Před započítím analýzy by měl být stanoven plán identifikace a distribuce.
- Pokud používáte automatický nebo semiautomatický procesor, je důležité prokázat shodu s manuální testovací metodou pro produkt Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA.

Součásti sady

Dodaný materiál

1. Potažená destička ELISA

12 x 8 jamek potažených králičím protilidským IgM, destička je uložena v obalu, který lze znovu těsně uzavřít.

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

Červený okraj

2. Pozitivní kontrola**

1 x 3 ml pozitivního séra/plasmy ve stabilizačním pufru s ProClin 950 (0,05 %) a Bronidox L (0,02 %).

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

Červený uzávěr

3. Negativní kontrola**

1 x 3 ml negativního séra ve stabilizačním pufru s ProClin 950 (0,05 %) a Bronidox L (0,02 %).

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

Zelený uzávěr

4. Kalibrátor (kontrola cut-off**)

1 x 3 ml pozitivního séra ve stabilizačním pufru s ProClin 950 (0,05 %) a Bronidox L (0,02 %).

CAL

Hnědý uzávěr

5. Koncentrát Biotin VP2

1 x 1,7 ml koncentrovaného roztoku (10x) biotinylovaného VP2 v pufru obsahujícího stabilizátory a azid sodný (0,01 %).

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

Bílý uzávěr

6. Ředící roztok pro Biotin VP2

1 x 17 ml ředícího pufru obsahujícího stabilizátory a ProClin 950 (0,05 %) s Bronidox L (0,02 %).

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

Bílý uzávěr

7. Koncentrát enzymového konjugátu

1 x 1,7 ml konjugátu Streptavidin-HRP (10x) ve stabilizačním pufru s ProClin 950 (0,05 %) a Bronidox L (0,02 %).

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

Modrý uzávěr

8. Ředící roztok pro enzymový konjugát

1 x 17 ml ředícího pufru obsahujícího stabilizátory a ProClin 950 (0,05 %) a Bronidox L (0,02 %).

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

Modrý uzávěr

9. Ředidlo na vzorky – připraveno k použití
1 x 110 ml PBS pufru obsahujícího stabilizátory a
ProClin 300 (0,05 %).

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

Průhledný uzávěr

10. Vymývací koncentrát

1 x 55 ml koncentrovaného (25X) fyziologického roztoku pufrovaného Tris s Tween 20
a ProClin 950 (0,15 %).

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

Průhledný uzávěr

11. Substrát

1 x 17 ml roztoku tetramethylbenzidenu (TMB).

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

Hnědý uzávěr

12. Zastavovací roztok

1 x 17 ml 0,5 mol/l H₂SO₄.

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

Průhledný uzávěr

13. Návod k použití



** Potenciálně biologicky nebezpečný materiál

Další materiál potřebný pro manuální Zpracování

- Zařízení na odběr séra,
- vysoce jakostní destilovaná nebo deionizovaná voda,
- přesné pipety, mikropipety a jednorázové špičky pro objemy 10 µl, 100 µl, 1 ml a 5 ml,
- zkumavky či podobné nádoby pro přípravu vzorků,
- čisté laboratorní volumetrické nádoby,
- odměrné válce
- plastová víčka nebo uzavírací páska pro destičku s mikrojamkami,
- papírové ručníky nebo savý papír,
- časovač,
- manuální nebo automatická myčka,
- čtečka desky ELISA s filtrem 450 nm (další filtr 630 je volitelný, ale doporučuje se),
- inkubátor 37 °C.

Automatické nebo semiautomatické procesory EIA

Biotrin Parvovirus IgM EIA mohou být použity s řadou automatických nebo semiautomatických ELISA procesorů. Je důležité, aby byly výsledky získané z Biotrin Parvovirus IgM EIA za použití automatického procesoru ekvivalentní výsledkům získaným ze stejných vzorků s použitím manuální testovací metody.

Skladování a stabilita

- Sada je stabilní až do data použitelnosti uvedeného na štítku na vnější krabici, pokud je skladována při teplotě mezi 2 – 8 °C.
- Proužky pro 8 jamek by měly být skladovány v obalu, který lze znovu těsně uzavřít, spolu se sáčkem se sušidlem (vysoušecí prostředek).
- Všechny nepoužité součásti by měly být ihned po použití vráceny k uskladnění při teplotě 2 – 8 °C.
- Biotin VP2 a vymývací roztok jsou stabilní po dobu 1 měsíce, jsou-li skladovány při teplotě 2 – 8 °C.
- Vymývací roztok je stabilní také při pokojové teplotě po dobu 2 týdnů.
- Enzymový konjugát je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladován ve skleněných nádobách při teplotě 2 – 8 °C.

Odběr a uchování vzorků

V testu s Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA může být použito sérum nebo plasma. Krev by po odběru měla být ponechána, aby koagulovala, při pokojové teplotě (20 – 25 °C) a poté by měla být centrifugována při 1500 x g po dobu 10 minut. Pokud k testování nedojde během 8 hodin, sérum či plasma mohou být ponechány při 2 – 8 °C po dobu 2 – 3 dnů nebo zmrazeny při teplotě –20 °C, pokud je nutné dlouhodobější skladování nebo odeslání (vzorky jsou stabilní při –20 °C po dobu nejméně 1 roku). Lithium heparin, EDTA a citrátová plasma jsou kompatibilní s testovacím postupem. Doporučuje se, aby pro testování nebyla používána hemolytická, ikterická, lipemická a mikrobiálně kontaminovaná séra. Vzorky pro testování nesmějí být opakovaně zmrazovány a rozmrazovány.

Poznámka: Celková koncentrace všech plasmatických komponent může být lehce snížena v citrátové plasmě kvůli objemu citrátového pufru použitého k prevenci koagulace.

Příprava reagensí a vzorků

Příprava reagensí

- Objemy reagensí jsou založeny na dvojitým testování vzorků.
- Vymývací roztok.
Pro každý proužek na 8 jamek přidejte 4 ml vymývacího koncentrátu k 96 ml deionizované vody. Připravená reagensie je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladována při teplotě 2 – 8 °C. Připravená reagensie je stabilní také při pokojové teplotě po dobu 2 týdnů.
- Biotin VP2.
Na každý použitý proužek pro 8 jamek přidejte 100 µl koncentrátu Biotin VP2 na 900 µl ředícího roztoku pro Biotin VP2.
- Enzymový konjugát.
Na každý proužek pro 8 jamek přidejte 100 µl koncentrátu enzymového konjugátu na 900 µl ředícího roztoku pro enzymový konjugát.
Připravená reagensie je stabilní po dobu 1 měsíce, pokud je skladována teplotě 2 – 8 °C.

Všechny ostatní reagensie jsou dodávány připravené k použití a v pracovním ředění.

Příprava vzorku

Pro každý vzorek přidejte 1 ml ředícího roztoku na vzorky do označené zkumavky či podobné nádobky. Přidejte 10 µl vzorku séra nebo plasmy a promíchejte.

Poznámka: Ředěné vzorky nesmějí být skladovány; pokud je nutné opakovat test, musí být použit čerstvý roztok.

Postup analýzy

Poznámka: Pokud používáte automatický přístroj:

- Plastové víčko/uzavírací páska nejsou nutné.
 - Po vymytí není nutno na desku pevně přitlačit papírový ručník.
1. Před použitím nechejte všechny reagenty a vzorky v inkubátoru ohřát na pokojovou teplotu (20 – 25 °C).
 2. Určete počet potřebných proužků na 8 jamek. Stanovte plán identifikace a distribuce pro kontroly a vzorky, jak je uvedeno na obrázku 1 (naproti). První proužek vyhovuje pro testování vzorku 1 pacienta, každý další proužek umožní testování vzorků dalších 4 pacientů.

Obrázek 1 Proužek 1

A		Negativní kontrola
B		Negativní kontrola
C		Pozitivní kontrola
D		Pozitivní kontrola
E		Kalibrátor (kontrola cut-off)
F		Kalibrátor (kontrola cut-off)
G		Pacient č. 1
H		Pacient č. 1

Objemy reagentů jsou založeny na dvojnásobném testování vzorků. Doporučujeme, aby se uživatelé seznámili se znaky analytické metody a validovali analýzu ve vlastní laboratoři před započítáním samotného testování.

3. Vyjměte potřebný počet proužků na 8 jamek, vložte je do plastového rámečku a zakryjte plastovým víčkem/uzavírací páskou. Zbývající proužky vraťte do obalu a znovu je uzavřete spolu se sušidlem.
4. Připravte vymývací roztok (viz část Příprava reagentů a vzorků).
5. Připravte sérum pacienta (viz část Příprava reagentů a vzorků).

6. Sejměte kryt z proužků a napipetujte 100 μ l (ve dvojím provedení) negativní kontroly připravené k použití, pozitivní kontroly připravené k použití, kalibrátoru (kontroly cut-off) připraveného k použití a připravených vzorků pacientů do jamek.
7. Zakryjte jamky plastovým víčkem/uzavírací páskou a inkubujte po dobu 60 minut (+/-5 minut) v inkubátoru při pokojové teplotě (20 – 25 °C).
8. Sejměte kryt a každou jamku vymyjte 4krát vymývacím roztokem (250 – 320 μ l). Po vymytí vyklepejte zbytky vymývacího roztoku na absorpční papírový ručník nebo na savý papír.
9. Připravte Biotin VP2 (viz část Příprava vzorků a reagensí).
10. Ihned po dokončení vymývání napipetujte 100 μ l připraveného Biotin VP2 do všech jamek.
11. Zakryjte jamky plastovým víčkem/uzavírací páskou a inkubujte po dobu 30 minut (+/-5 minut) v inkubátoru při teplotě 35 – 39 °C.
12. Sejměte kryt a každou jamku vymyjte 4krát vymývacím roztokem (250 – 320 μ l). Po vymytí vyklepejte zbytky vymývacího roztoku na absorpční papírový ručník nebo na savý papír.
13. Připravte enzymový konjugát (viz část Příprava).
14. Ihned po dokončení vymývání napipetujte 100 μ l enzymového konjugátu IgM do všech jamek.
15. Zakryjte jamky plastovým víčkem/uzavírací páskou a inkubujte po dobu 30 minut (+/-5 minut) v inkubátoru při teplotě 35 – 39 °C.
16. Sejměte kryt a každou jamku vymyjte 4krát vymývacím roztokem (250 – 320 μ l). Po vymytí na desku pevně přitlačte ručník ze savého papíru.
17. Ihned po dokončení vymývání napipetujte 100 μ l Substrátu do všech jamek.
18. Inkubujte po dobu 30 minut (+/2 minuty) v inkubátoru při 35 –39 °C.
19. Napipetujte 100 μ l zastavovacího roztoku do všech jamek a promíchejte. Zajistěte, aby přidávání probíhalo ve stejném pořadí a ve stejných časových intervalech jako přidání substrátu.
20. Do 30 minut odečtěte čtečkou desek ELISA.

Poznámka: Doporučujeme odečítání při dvojí vlnové délce, při 450 nm s 630 nm jako referenční vlnovou délkou (jako slepý vzorek použijte pro filtr 630 nm vzduch). Pokud tato funkce není na čtečce desek ELISA dostupná, použijte při odečtu jedinou vlnovou délku 450 nm.

Interpretace výsledků

Přítomnost či nepřítomnost IgM anti-Parvovirus je stanovena ve vztahu k vypočtené hodnotě cut-off (COV).

Výpočet COV

COV = střední OD (optická hustota) kalibrátoru (kontrola cut-off)

Interpretace (1): Absorbance

Vzorky s hodnotou střední absorbance větší než COV x 1,1 jsou považovány za reaktivní (pozitivní) pro anti-Parvovirus B19 IgM.

Vzorky s hodnotou střední absorbance menší než COV x 0,9 jsou považovány za nereaktivní (negativní) pro anti-Parvovirus B19 IgM.

Vzorky s hodnotou střední absorbance větší nebo rovnou COV x 0,9 a menší nebo rovnou COV x 1,1 jsou neprůkazné.

Poznámka: Při použití automatického přístroje by výsledky z různých analýz měly být srovnávány pouze s použitím indexových hodnot (viz interpretace 2).

Interpretace (2): Indexová hodnota

Srovnání dat mezi různými měřeními je usnadněno použitím indexové hodnoty, přičemž je absorbance vzorku vztažena ke cut-off hodnotě analýzy. V tomto případě indexová hodnota < 0,9 nebo > 1,1 znamená negativitu či pozitivitu vzorku v daném pořadí. Vzorek je neprůkazný, pokud je indexová hodnota v rozmezí 0,9 – 1,1 včetně.

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Hodnota cut-off (COV)}}$$

Vzorky, které nejsou ani reaktivní (pozitivní) ani nereaktivní (negativní), jsou považovány za neprůkazné a měly by být testovány znovu. Pokud je výsledek opakovaného testu opět neprůkazný, měl by být po týdnu odebrán druhý vzorek. Neprůkazný výsledek druhého vzorku může být považován u anti-Parvovirus B19 IgM za reaktivní (pozitivní).

Kritéria kontroly kvality

Při stanovení validity výsledků testů musejí být vždy zahrnuta pozitivní kontrola, negativní kontrola a kalibrátor (kontrola cut-off). Výsledky analýzy jsou považovány za validní, pokud jsou splněna následující kritéria.

1. Střední absorbance pozitivní kontroly je větší nebo rovna 0,8 jednotek optické hustoty .
2. Střední absorbance negativní kontroly je menší nebo rovna 0,15 jednotek optické hustoty a také menší než $COV \times 0,9$.

Pokud nejsou výše uvedená kritéria splněna, je analýza pokládána za neplatnou a musí být opakována.

Omezení použití

- Při stanovení diagnózy infekce Parvovirem B19 musejí být výsledky korelovány s klinickým a epidemiologickým profilem pacienta a dalšími klinickými a laboratorními výsledky.
- Nereaktivní (negativní) výsledek nevylučuje možnost infekce Parvovirem B19. V případě podezření na infekci Parvovirem B19 měl by být po negativním výsledku proveden po dvou týdnech opakovaný test.
- Pro interpretaci výsledků provedených v jiných tělesných tekutinách nebo ve směsi sér nejsou k dispozici dostatečné údaje.
- Test může být ovlivněn odchýlením od postupu, interpretace nebo doporučených bezpečnostních opatření.
- Vzorky obsahující antinukleární protilátky mohou dávat v enzymové imunoanalýze Biotrin Parvovirus B19 IgM neprůkazné nebo pozitivní výsledky testu (viz oddíl: Znaky analytické metody).
- Vzorky pozitivní na EBV IgM mohou dávat v enzymové imunoanalýze Biotrin Parvovirus B19 IgM rovněž pozitivní nebo neprůkazné výsledky testu (viz oddíl: Znaky analytické metody).
- Interpretace výsledků testů ze vzorků pacientů s poruchou imunity může být obtížná.
- Výkonnost analýzy byla validována na základě dvojího testování vzorků. Doporučujeme, aby se laboratorní pracovníci před analyzováním patientských vzorků v singletech seznámili se znaky analytické metody.

Znaky analytické metody

Citlivost a specificita

Celkem 184 vzorků bylo testováno na třech samostatných šaržích Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 4. generace. Vzorky byly označeny jako pozitivní nebo negativní s použitím Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 3. generace. Pozitivní vzorky byly původně charakterizovány klinickými příznaky spojenými s infekcí Parvovirem B19 a/nebo PCR. Srovnání výsledků získaných u Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 3. generace a u Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 4. generace je uvedeno v tabulce 1.

Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 3. generace					
Biotrin 4. generace Parvovirus B19 IgM EIA		Pozitivní	Negativní	Neprůkazný	Celkem
	Pozitivní	100	0	0	100
	Negativní	0	84	0	84
	Neprůkazný	0	0	0	0
Celkem	100	84	0	184	

Tabulka 1: Výpočty citlivosti a specificity u Biotrinu Parvovirus B19 IgM EIA 4. generace ve srovnání s výsledky u Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA 3. generace. Do tohoto výpočtu byly zahrnuty neprůkazné výsledky podle doporučení ve směrnici FDA.

Citlivost a specificita v procentech byly vypočteny pomocí následující rovnice:

$\text{citlivost} = \frac{\text{skutečně pozitivní (SP)}}{\text{SP} + \text{falešně negativní} + \text{neprůkazné}} \times 100$

Citlivost v % = $(100/100) \times 100 = 100 \%$

$\text{citlivost} = \frac{\text{skutečně negativní (SN)}}{\text{SN} + \text{falešně pozitivní} + \text{neprůkazné}} \times 100$

Citlivost v % = $(84/84) \times 100 = 100 \%$

Reprodukovatelnost uvnitř stanovení

Série vzorků séra s hladinou IgM proti Parvoviru B19 v rozsahu od nereaktivních po silně reaktivní byla vyšetřena celkem třicetkrát. Replikáty byly testovány na jediné destičce ELISA. Byly sečteny výsledné hodnoty OD a vypočteny střední hodnota OD, směrodatná odchylka (σ , SD) a variační koeficient v procentech (% CV), viz tabulku 2. Tyto výsledky jsou rovněž uvedeny v indexových hodnotách v tabulce 3.

CV v procentech vyjádřený v OD (indexy) byl v rozsahu od 9,6 % v nereaktivním vzorku (negativní 2) do 4,7 % ve vysoce pozitivním vzorku.

Testovaný vzorek	Střední 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

Tabulka 2: Reprodukovatelnost uvnitř stanovení vyjádřená v OD u 30 replikátů z každého z 5 různých vzorků séra s rozsahem hladiny IgM proti Parvoviru B19 od nereaktivních k silně reaktivním.

Testovaný vzorek	Střední index	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

Tabulka 3: Reprodukovatelnost uvnitř stanovení vyjádřená v indexových hodnotách u 30 replikátů z každého z 5 různých vzorků séra s rozsahem hladiny IgM proti Parvoviru B19 od nereaktivních k silně reaktivním.

Reprodukovatelnost mezi stanoveními

Reprodukovatelnost mezi stanoveními byla zjišťována s použitím 3 šarží Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA (4. generace). Panel vzorků obsahující silně reaktivní (5), středně reaktivní (2), slabě reaktivní (6) a nereaktivní (7) vzorky byl testován s každou šarží celkem 10krát. To mělo za následek celkový počet analýz (n) 30 pro každý vzorek.

Když se tyto údaje analyzují z hlediska reprodukovatelnosti mezi stanoveními a mezi šaržemi, vykazuje Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA velmi dobrou korelaci výsledků testů mezi jednotlivými analýzami a jednotlivými šaržemi. Údaje o reprodukovatelnosti u 6 testovaných vzorků jsou uvedeny v tabulce 4.

Typ vzorku	Testované vzorky	Střední index	SD	% CV	n
Nereaktivní	CLB 80	0,1	0,01978	20 %	30
Nereaktivní	CLB 36	0,1	0,025944	24 %	30
Slabě reaktivní	2908	2,0	0,301846	15 %	30
Slabě reaktivní	4923	1,5	0,246982	16 %	30
Středně reaktivní	CLB 82	3,4	0,44587	13 %	30
Silně reaktivní	CLB 75	7,3	1,205097	17 %	30

Tabulka 4: Celková reprodukovatelnost mezi stanoveními. Údaje (indexy) shromážděné ze 3 šarží Biotrin Parvovirus B19 IgM EIA.

Specificita metody

Specificita enzymové imunoanalýzy Biotrin Parvovirus B19 IgM byla zhodnocena na testovaných vzorcích od pacientů s virovou infekcí nebo onemocněním, které mohlo způsobit klinické příznaky podobné Parvoviru 19 (tabulka 5).

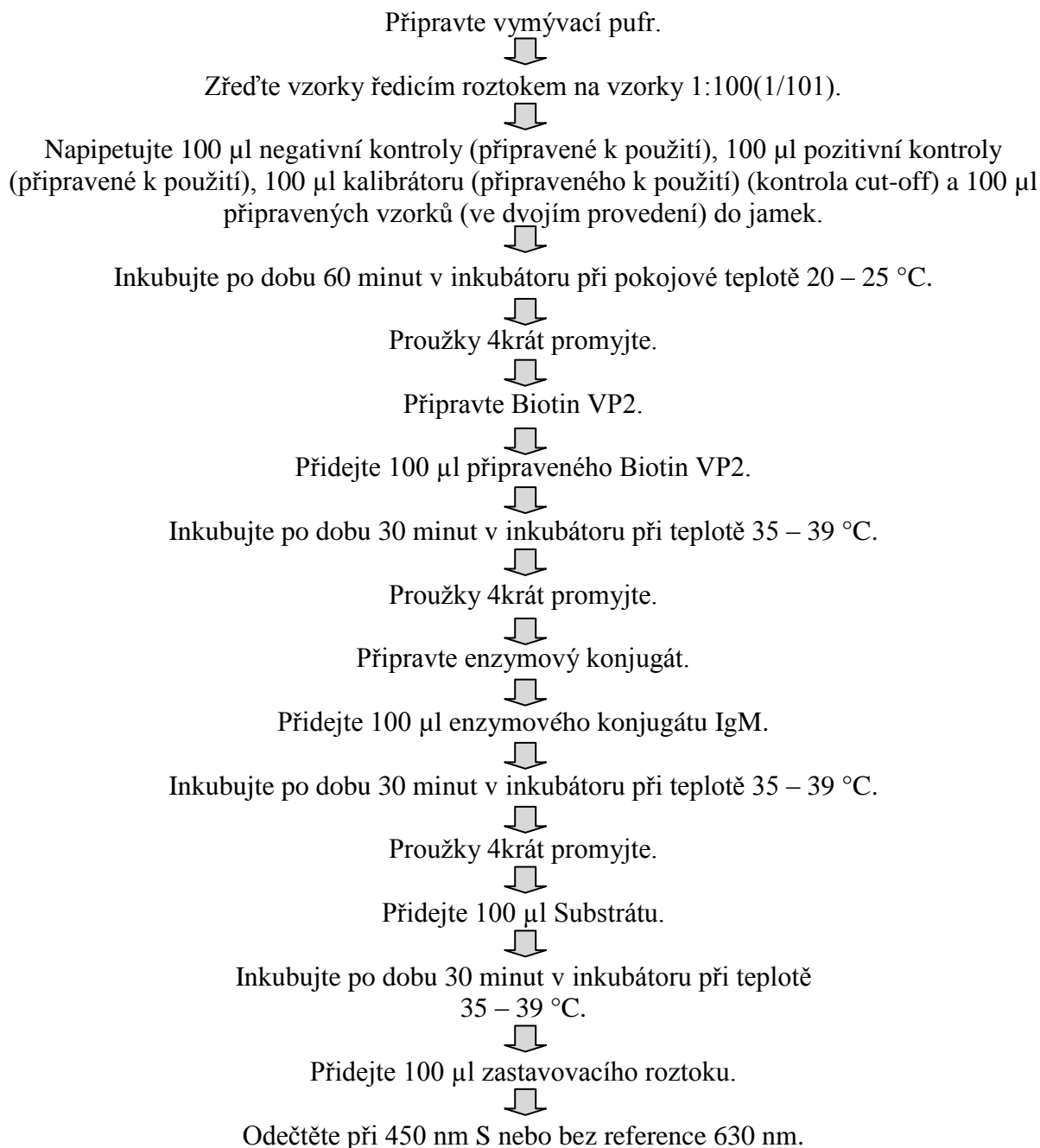
Testované vzorky	Počet pozitivních
Antinukleární protilátky (ANA)	1/10†
Autoimunní onemocnění	0/4
Cytomegalovirus (CMV)	0/16
Virus Epstein-Barrové (EBV)	1/32†
Hemolytický vzorek	0/3
Virus Herpes simplex (HSV)	0/2
Influenza B	0/5
Lipemický vzorek	0/3
Lupus erythematoses	0/6
Virus příušnic	0/1
Mycoplasma	1/5†
Parainfluenza	0/1
Reumatoidní faktor (RF)	0/15
Virus zarděnek	0/10
Toxoplasma gondii	0/14
Virus Varicella zooster (VZV)	0/3

Tabulka 5: Specificita enzymové imunoanalýzy Parvovirus B19 IgM.

† Vzorky s EBV IgM, Mycoplasma IgM a ANA, které byly v enzymatické imunoanalýze Biotrin Parvovirus B19 IgM 4. generace reaktivní, byly rovněž reaktivní v enzymatické imunoanalýze Biotrin Parvovirus B19 IgM 3. generace. Proto nemůže být vyloučena pravděpodobnost pravé reaktivity u Parvovirus B19 IgM.

Souhrn postupu při testování Parvoviru B19 IgM EIA

Než zahájíte analýzu, přečtěte si prosím celý leták s pokyny k produktu. Tento souhrn slouží pouze jako stručná reference.



Vysvětlení symbolů

-*In Vitro* diagnostický zdravotnický prostředek

IVD

-Teplotní rozmezí od do



-Výrobce



-Viz návod k použití



-Použitelné do



-Číslo šarže

LOT

-Katalogové číslo

REF

Literatura

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 – 97, 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 it's 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
www.biotrin.com

Kód dokumentu: PEMIV-464-02 11/09