

Parvovirus B19 IgM

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the
qualitative determination of
IgM antibodies to Parvovirus B19
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF PARVOM.CE
96 Tests

Parvovirus B19 IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of IgM antibodies to Parvovirus B19 in human plasma and sera.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The **B19 virus**, generally referred to as **parvovirus B19** was the first (and until 2005 the only) known human virus in the family of parvoviruses, genus erythrovirus. Parvovirus B19 is a non-enveloped, icosahedral virus that contains a single-stranded linear DNA genome. It is classified as erythrovirus because of its capability to invade red blood cell precursors in the bone marrow. Three genotypes (with subtypes) have been recognized. The viral capsid is composed of two structural proteins, namely VP1 (83kD) and VP2 (53 kD). Infection by Parvovirus B19 spreads through respiratory secretions but also through blood or blood products. The infection causes a mild illness characterized by an erythematous maculopapular facial rash called fifth disease or erythema infectiosum. It is typical in childhood and is also seen in adults. A person usually gets sick within 4 to 14 days after getting infected with parvovirus B19 but about 20% of children and adults who get infected with this virus will not have any symptoms. Infection during pregnancy presents the risk of transmission to the fetus that may result in hydrops fetalis. In particular the presence of IgM antibodies is reported to be correlated to the acute phase of illness, while IgG antibodies become present at different titers shortly after primary infections and last in blood for many years. People with weakened immune systems caused by leukemia, cancer, organ transplants, or HIV infection are at risk for serious complications from fifth disease. It can cause chronic anemia that requires medical treatment. Therefore the detection of Parvovirus B19-specific antibodies becomes very important.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with Parvovirus B19 antigens. The solid phase is first treated with the diluted sample and IgM to Parvovirus B19 are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti Parvovirus IgM are detected by the addition of polyclonal specific anti hIgM antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti Parvovirus IgM antibodies present in the sample. The presence of IgM in the sample may therefore be determined by means of a cut-off value able to discriminate between negative and positive samples.

Neutralization of IgG anti-Parvovirus, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class of antibodies in the determination of IgM.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with Parvovirus B19 antigens.

Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 2..8°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human plasma negative to Parvovirus B19, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains human plasma positive to Parvovirus B19, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Positive Control is green yellow color coded.

4. Calibrator: CAL ...

n° 1 vial. Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains bovine serum proteins, human plasma positive to Parvovirus, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.1% Kathon GC as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme conjugate : CONJ

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgM, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

7. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H₂O₂).

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

8. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

9. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.5% NP40, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

10. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. It contains goat anti hIgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

11. Plate sealing foils n°2

12. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000 ul, 100 ul and 10 ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet), set at +37°C (+/-0.5°C tolerance)..
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are

treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing. In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°.8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative Control

Ready to use components. Mix carefully on vortex before use.

Positive Control

Ready to use components. Mix carefully on vortex before use.

Calibrator

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: *The dissolved calibrator is not stable. Store it frozen in aliquots at -20°C.*

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before

use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Neutralizing Reagent

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.

3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Calibrator as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.

8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Controls/Calibrator as they are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Not dispense Neutralizing Reagent in A1 used for blanking operations and in the wells used for the Controls and the Calibrator.
4. Dispense 50 µl Neutralizing Reagent in all the samples wells.

Important note: The Neutralizing Reagent is able to block false positive reactions due to RF. Positive samples in internal QC panels might be detected negative if such samples were tested positive with an IVD that does not carry out any RF blocking reaction.

5. Dispense 100 µl of Negative Control in triplicate, 100 µl of Positive Control in single, 100 µl of Calibrator in duplicate and 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
6. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

7. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
8. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

9. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
10. Wash microwells as in step 6.

11. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

12. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
13. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Controls & Calibrator (*)	100 µl
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

(*) Important Notes:

- The Calibrator (CAL) does not affect the Cut Off calculation, therefore it does not affect the test's results calculation.
- The Calibrator (CAL) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2											
B	NC	S3											
C	NC	S4											
D	NC	S5											
E	CAL(*)	S6											
F	CAL(*)	S7											
G	PC	S8											
H	S1	S9											

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL = Calibrator - Not mandatory PC = Positive Control
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC. Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	OD450nm > 1.000

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Positive Control < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong control) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.
--	---

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

** Note:

If Calibrator has used, verify the following data:

Check	Requirements
Calibrator	S/Co > 1.0

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Calibrator S/Co < 1.0	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong control instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, Negative Control, Positive Control), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

P. RESULTS

If the test turns out to be valid, results are calculated from the mean OD450nm / 620-630nm value of the Negative Control (NC) by means of a cut-off value (Co) determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm / 620-630nm value (S) and the cut-off value (Co), or S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not developed IgM antibodies to Parvovirus.
 Any patient showing an equivocal result should be retested on a second sample taken 1-2 weeks after the initial sample.
 A positive result is indicative of an ongoing Parvovirus infection and therefore the patient should be treated accordingly.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12):

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450nm
 Mean Value: 0.100 OD450nm
 Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.500 OD450nm
 Higher than 0.1000 – Accepted

$Cut-Off = 0.100 + 0.250 = 0.350$

Calibrator: 0.500 – 0.540 OD450nm
 Mean value: 0.520 OD450nm
 S/Co higher than 1.0 – Accepted

Sample 1: 0.080 OD450nm
 Sample 2: 1.800 OD450nm
 Sample 1 S/Co < 1.0 = negative
 Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what suggested in NCCLS's approved guideline C24-A2.

1. Limit of detection

No international standard for Parvovirus B19 IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

I.G.S. Dilution	PARVOM.CE Lot P1	PARVOM.CE Lot P2
1x	1.418	1.219
2x	0.804	0.665
4x	0.407	0.383
8x	0.225	0.212
Negative Control	0.065	0.070

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The Diagnostic **Sensitivity** was calculated on a panel of 50 samples classified positive for the IgM anti Parvovirus B19 by a reference kit CE marked.
 A value of $\geq 98\%$ was observed when referring to the reference device.

The Diagnostic **Specificity** was calculated on a panel of more than 100 samples classified negative with the reference device.
 A value $\geq 98\%$ was observed.
 These findings are summarized in the following table.

Sensitivity	$\geq 98\%$
Specificity	$\geq 98\%$

4. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a positive, examined in 16 replicates in three separate runs for two lots. Results are reported as follows:

PARVOM.CE: lot P1

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.149	0.136	0.136	0.140
Std.Deviation	0.013	0.018	0.018	0.016
CV %	8.5	13.0	13.0	11.5

Low Positive sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.996	0.977	0.950	0.974
Std.Deviation	0.032	0.057	0.056	0.048
CV %	3.2	5.8	5.9	5.0

Positive Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	3.032	2.671	3.362	3.022
Std.Deviation	0.221	0.221	0.184	0.209
CV %	7.3	8.3	5.5	7.0

PARVOM.CE: lot P2

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.101	0.091	0.094	0.095
Std.Deviation	0.013	0.010	0.013	0.012
CV %	12.5	11.2	13.7	12.5

Low Positive sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.227	1.261	0.970	1.153
Std.Deviation	0.085	0.085	0.090	0.087
CV %	6.9	6.7	9.2	7.6

Positive Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	3.350	2.937	3.170	3.152
Std.Deviation	0.174	0.199	0.197	0.190
CV %	5.2	7.0	7.1	6.4

The variability shown in the tables above did not result in sample misclassification.

5. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution and recovery tests.

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

S. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

REFERENCES

1. Erik d. Heegaard, Kevin E. Brown, Clin Microbiol Rev. 2002 July; 15(3): 485-505.
2. Hani O. Ghazi, J Family Community Med. 2007 Jan-Apr, 14(1):15-17.
3. J H Wang, W P Zhang, H X Liu, D Wang, Y F Li, W Q Wang, L Wang, F R He, Z Wang, Q G Yan, L W Chen, G S Huang
Br J Cancer. 2008 February 12; 98(3): 611-618.
4. Ronald F. Lamont, Jack Sobel, Edi Vaisbuch, Juan Pedro Kusanovic, Shali Mazaki-Tovi, Sun Kwon Kim, Niels Uldbjerg, Roberto Romero, 2011 January; 118(2): 175-186
5. Benedikt Weissbrich, Yvonne Süß-Fröhlich, Hermann J Girschick, Arthritis Res Ther. 2007; 9(4): R82

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



Parvovirus B19 IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación cualitativa de
anticuerpos IgM frente al parvovirus B19
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

Correo electrónico: info@diapro.it

Parvovirus B19 IgM

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM frente al parvovirus B19 en plasma y suero humanos.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN

El **virus B19**, normalmente denominado **parvovirus B19**, fue el primer virus humano conocido (y el único hasta 2005) de la familia de parvovirus, género eritrovirus. El parvovirus B19 es un virus icosaédrico no encapsulado que contiene un genoma de ADN lineal monocatenario. Está clasificado como eritrovirus por su capacidad de invadir precursores de glóbulos rojos en la médula ósea. Se han reconocido tres genotipos (con subtipos). La cápside del virus se compone de dos proteínas estructurales, denominadas VP1 (83kD) y VP2 (53 kD). La infección por el parvovirus B19 se propaga a través de secreciones respiratorias, pero también a través de la sangre o productos sanguíneos. La infección causa una enfermedad leve caracterizada por una erupción eritematosa maculopapular facial denominada quinta enfermedad o eritema infeccioso. Es típica en niños y también se observa en adultos. Una persona normalmente se pone enferma en un período de 4 a 14 días tras ser infectada por el parvovirus B19, pero alrededor del 20% de los niños y adultos infectados por este virus no tuvieron ningún síntoma. La infección durante el embarazo presenta riesgo de transmisión al feto, que puede resultar en hidropesía fetal. En particular, se ha indicado que la presencia de anticuerpos IgM está correlacionada con la fase grave de la enfermedad, mientras que los anticuerpos IgG están presentes con distintos títulos poco después de las infecciones primarias y permanecen en la sangre durante muchos años.

Las personas con sistema inmune debilitado a causa de leucemia, cáncer, trasplantes de órganos o infección por VIH están en riesgo de complicaciones graves de la quinta enfermedad. Puede causar anemia crónica que requiere tratamiento médico.

Por lo tanto, la detección de anticuerpos específicos del parvovirus B19 es muy importante.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Se han recubierto las microplacas con antígenos de parvovirus B19.

La fase sólida se trata primero con la muestra diluida y se capturan los IgM frente al parvovirus B19, si existen, mediante los antígenos.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan los IgM anti parvovirus unidos mediante la adición de anticuerpos anti hlgM específicos policlonales, marcados con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla substrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM anti parvovirus presentes en la muestra. La presencia de IgM en la muestra se puede determinar, por lo tanto, mediante un valor de corte capaz de discriminar entre muestras negativas y positivas.

La neutralización de IgG anti parvovirus, que se lleva a cabo directamente en el pocillo, se ejecuta en el ensayo para bloquear interferencias debidas a esta clase de anticuerpos en la determinación de IgM.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: **MICROPLACA**

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con antígenos de parvovirus B19.

Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Dejar las microplacas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar entre 2 y 8 °C.

2. Control negativo: **CONTROL -**

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene plasma humano negativo al parvovirus B19, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 0,045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

3. Control positivo: **CONTROL +**

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene plasma humano positivo al parvovirus B19, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 0,045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde-amarillo.

4. Calibrador: **CAL**

1 vial. Reactivo liofilizado para disolver con agua de calidad EIA, según lo indicado en la etiqueta. Contiene proteínas de suero bovino, plasma humano positivo al parvovirus, 0,2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 al 0,045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial puede variar en cada lote. Usar el volumen correcto indicado en la etiqueta.

5. Solución de lavado concentrada: **WASHBUF 20X**

1x60 ml/botella solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7,0+/-0,2, 0,05% de Tween 20 y Kathon GC al 0,05%.

6. Conjugado: **CONJ**

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti IgM humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino (BSA), tampón Tris 10 mM a pH 6,8+/-0,1, ProClin 300 al 0,045% y sulfato de gentamicina al 0,02% como conservantes.

7. Cromógeno/Substrato: **SUBS TMB**

1x16 ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0,02%.

Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.

8. Ácido sulfúrico: **H2SO4 0,3 M**

1x15 ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0,3 M.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

9. Diluyente de muestras: **DILSPE**

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, 0,5% NP40, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

10. Reactivo neutralizante: **SOLN NEUT**

1x8 ml/vial. Contiene anti hlgG de cabra, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes.

Doc.:	INS PARVOM.CE/Esp	Página	3 de 8	Rev.: 3	Fecha: 2020/02
-------	-------------------	--------	--------	---------	----------------

11. Sellador adhesivo, 2 uds.

12. Manual de instrucciones, 1 ud.

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000 ul, 100 ul y 10 ul) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA calibrada (en seco o húmedo), ajustada a 37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (aguja). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE. UU., y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.
6. No intercambiar componentes de lotes distintos, ni tampoco de dos equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos estén claros y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo. Según estudios realizados en equipos abiertos, no se ha detectado pérdida relevante de actividad hasta 6 usos del dispositivo y hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados, a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y muestras, deben tratarse como potencialmente infecciosos y deben inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores adecuados designados para residuos de laboratorio/hospitalarios.

15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

16. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar del laboratorio de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.
2. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de partículas, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con filtros de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Comprobar que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación.

De ser así, llamar al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8 °C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

Control negativo

Componentes listos para el uso. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Control positivo

Componentes listos para el uso. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Calibrador

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y después mezclar con cuidado en el vórtex.

Nota: El calibrador disuelto no es estable. Se recomienda almacenar congelado en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada y mezclarse con cuidado antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante una semana a temperaturas entre 2 y 8 $^{\circ}\text{C}$.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Reactivo neutralizante

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Ácido sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

- Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
- La incubadora ELISA debe ajustarse a 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ de tolerancia) y controlarse periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua, siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μl /pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro (620-630 nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{ nm}$; b) Rango de absorbancia de 0 a $\geq 2,0$; c) Linealidad $\geq 2,0$; reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente se debe proceder al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y validarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe validarse y fijarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados ELISA cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar

el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos para usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Comprobar que el cromógeno (TMB) sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
4. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte (envase primario). Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté perforada ni dañada.
5. Disolver el contenido del calibrador como se indica.
6. Diluir todo el contenido de la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37 °C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
9. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
10. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
11. Comprobar que las micropipetas estén ajustadas al volumen requerido.
12. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
13. En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

1. Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el calibrador ni los controles, ya que están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
2. Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
3. No dispensar reactivo neutralizante en A1, que se utiliza para operaciones de blanco, ni en los pocillos que se utilizan para los controles y el calibrador.
4. Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante en todos los pocillos de muestras.

Nota importante: El reactivo neutralizante puede bloquear falsas reacciones positivas debido a RF. Las muestras positivas en paneles de control de calidad internos podrían ser detectadas como negativas si estas muestras se analizaron como positivas con un IVD que no realiza ninguna reacción de bloqueo de RF.

5. Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado, 100 µl de control positivo una sola vez, 100 µl de calibrador por duplicado y 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.

6. Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

7. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indica más arriba (sección I.3).

8. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

9. Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.

10. Lavar los micropocillos del mismo modo que en el paso 6.

11. Dispensar 100 µl de la mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo para el blanco. A continuación, incubar la microplaca **a temperatura ambiente (18-24 °C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer a luz intensa directa. De lo contrario, se puede generar un fondo excesivo.

12. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero de control y las muestras positivas de azul a amarillo.

13. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no haya impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Controles y calibrador (*)	100 µl
Reactivo neutralizante (solo para muestras)	50 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm / 620-630 nm

(*) Notas importantes:

- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de las pruebas.
- El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

En la tabla siguiente se muestra un ejemplo del esquema de dispensado:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M2											
B	CN	M3											
C	CN	M4											
D	CN	M5											
E	CAL(*)	M6											
F	CAL(*)	M7											
G	CP	M8											
H	M1	M9											

Leyenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CAL = Calibrador - No obligatorio CP = Control Positivo
M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se hace una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo para verificar si el rendimiento del ensayo es el previsto y exigido por la directiva IVDD 98/79/CE. Controlar que los datos siguientes coinciden:

Comprobar	Requisitos
Pocillo blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
Control negativo	Valor medio < 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Control positivo	DO 450 nm > 1,000

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Comprobar
Pocillo blanco > 0,100 DO 450 nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo;
Control negativo > 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y se ha alimentado con esta el lavador antes del uso; 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo); 4. no ha existido contaminación del control negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas o al conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están bloqueadas o parcialmente obstruidas.
Coeficiente de variación > 30%	
Control positivo < 1,000 DO 450 nm	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (dispensar un control equivocado); 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si se produce alguno de estos problemas, tras la comprobación, informar al responsable para tomar las medidas pertinentes.

** Nota:

Si se ha utilizado calibrador, comprobar los siguientes datos:

Comprobar	Requisitos
Calibrador	M/Co > 1,0

Si los resultados del ensayo no coinciden con los requisitos establecidos anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Comprobar
Calibrador M/Co < 1,0	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (dispensar un control equivocado); 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, control negativo, control positivo) coinciden con los requisitos establecidos, la prueba podría considerarse válida.

Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13.

P. RESULTADOS

Si la prueba es válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO 450 nm / 620-630 nm del control negativo

(CN), mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0,250$$

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo ELISA automático, hay que asegurarse de que la formulación usada para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO 450 nm / 620-630nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), o M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Equívoco
> 1,1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM frente al parvovirus.

Los pacientes cuya muestra resulte equívoca deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada 1 o 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección en curso por parvovirus y, por consiguiente, el paciente debe ser tratado adecuadamente.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13).

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control negativo: 0,100 – 0,120 – 0,080 DO 450 nm

Valor medio: 0,100 DO 450 nm

Menor de 0,150 – Válido

Control positivo: 1,500 DO 450 nm

Mayor de 0,1000 – Válido

Valor de corte = 0,100 + 0,250 = 0,350

Calibrador: 0,500 – 0,540 DO 450 nm

Valor medio: 0,520 DO 450 nm

M/Co mayor de 1,0 – Válido

Muestra 1: 0,080 DO 450 nm

Muestra 2: 1,800 DO 450 nm

Muestra 1 M/Co < 1,0 = negativa

Muestra 2 M/Co > 1,2 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La evaluación de los rendimientos se ha realizado de acuerdo con lo sugerido en la directiva C24-A2 aprobada por el NCCLS.

1. Límite de detección

La Comunidad Europea no ha definido ningún estándar internacional para la prueba de detección de anticuerpos del parvovirus B19 IgM hasta el momento.

Con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, se definió un estándar de oro interno (IGS).

I.G.S. Dilución	PARVOM.CE Lote P1	PARVOM.CE Lote P2
1x	1,418	1,219
2x	0,804	0,665
4x	0,407	0,383
8x	0,225	0,212
Control negativo	0,065	0,070

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La **sensibilidad** diagnóstica se calculó en un panel de 50 muestras clasificadas como positivas para IgM anti parvovirus B19 por un equipo de referencia con marca CE.

Se observó un valor de $\geq 98\%$ en relación con el equipo de referencia.

La **especificidad** diagnóstica se calculó en un panel de más de 100 muestras clasificadas como negativas con un equipo de referencia.

Se observó un valor de $\geq 98\%$.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Sensibilidad	$\geq 98\%$
Especificidad	$\geq 98\%$

4. Precisión:

Ha sido calculada a partir de tres muestras, una negativa, una positiva débil y una positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas para dos lotes. Los resultados son los siguientes:

PARVOM.CE: lote P1

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	0,149	0,136	0,136	0,140
Desviación estándar	0,013	0,018	0,018	0,016
CV %	8,5	13,0	13,0	11,5

Muestra positiva débil (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	0,996	0,977	0,950	0,974
Desviación estándar	0,032	0,057	0,056	0,048
CV %	3,2	5,8	5,9	5,0

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	3,032	2,671	3,362	3,022
Desviación estándar	0,221	0,221	0,184	0,209
CV %	7,3	8,3	5,5	7,0

PARVOM.CE: lote P2

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	0,101	0,091	0,094	0,095
Desviación estándar	0,013	0,010	0,013	0,012
CV %	12,5	11,2	13,7	12,5

Muestra positiva débil (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	1,227	1,261	0,970	1,153
Desviación estándar	0,085	0,085	0,090	0,087
CV %	6,9	6,7	9,2	7,6

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450 nm	3,350	2,937	3,170	3,152
Desviación estándar	0,174	0,199	0,197	0,190
CV %	5,2	7,0	7,1	6,4

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma ISO 13485. Cada lote se somete a control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italia



La variabilidad mostrada en las tablas anteriores no dio como resultado una clasificación errónea de las muestras.

5. Precisión

La precisión del ensayo se ha comprobado mediante las pruebas de dilución y recuperación.

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13.

S. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La contaminación bacteriana o la inactivación por calor de la muestra pueden afectar a los valores de absorbancia de las muestras y, por lo tanto, alterar los niveles del analito.

Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados tras descongelarse pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado. Deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Erik d. Heegaard, Kevin E. Brown, Clin Microbiol Rev. 2002 July; 15(3): 485-505.
2. Hani O. Ghazi, J family community Med. 2007 Jan-Apr, 14(1):15-17.
3. J H Wang, W P Zhang, H X Liu, D Wang, Y F Li, W Q Wang, L Wang, F R He, Z Wang, Q G Yan, L W Chen, G S Huang
Br J Cancer. 2008 February 12; 98(3): 611-618.
4. Ronald F. Lamont, Jack Sobel, Edi Vaisbuch, Juan Pedro Kusanovic, Shali Mazaki-Tovi, Sun Kwon Kim, Niels Ulbjerg, Roberto Romero, 2011 January; 118(2): 175-186
5. Benedikt Weissbrich, Yvonne Süß-Fröhlich, Hermann J Girschick, Arthritis Res Ther. 2007; 9(4): R82

