

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Parvovirus B19 IgG ELISA



REF DE3503

 96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS	5
5	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE	7
7	RESULTS.....	8
8	QUALITY CONTROL	8
9	ASSAY CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	10
11	LEGAL ASPECTS.....	10
1	ZWECKBESTIMMUNG.....	11
2	TESTPRINZIP	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	11
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	12
5	PROBENVORBEREITUNG	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG	13
7	ERGEBNISSE.....	15
8	QUALITÄTSKONTROLLE	15
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	16
10	GRENZEN DES TESTES	16
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	16
1	DESTINAZIONE D'USO	17
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	17
3	PRECAUZIONI.....	17
4	COMPONENTI DEL KIT	18
5	CAMPIONI	19
6	ATTUAZIONE DEL TEST	19
7	RESULTATI	21
8	CONTROLLO QUALITÀ	21
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	22
10	LIMITAZIONI.....	22
11	ASPETTI LEGALI.....	22
12	REFERENCES / LITERATURE	23
	SHORT INSTRUCTIONS FOR USE.....	24

1 INTENDED USE

The DEMEDITEC Parvovirus B19 IgG (Recombinant) Enzyme Immunoassay Kit provides materials for the qualitative and semi-quantitative determination of IgG-class antibodies to Parvovirus B19 in human serum and plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

1.1 Summary and Explanation

Parvoviruses are cubic single-stranded DNA viruses of about 18-32 nm lacking an envelope. Parvovirus B19 infects only humans, and since there are no cross-reactivities between animal parvoviruses and B19, transmission between pets and humans is not possible. Parvovirus B19 is the causative agent of Erythema infectiosum, the so-called "fifth disease", a mild rash illness that occurs most commonly in children. Infected persons are contagious during the early part of the illness before the rash appears so in adults the rate of epidemics amounts to about 60 %. About 20 % of adults and children who are infected with parvovirus B19 do not develop any symptoms. Persons infected with the virus, however, do develop lasting immunity that protects them against infection in the future.

Parvovirus B19 infection may cause a serious illness in persons with sickle-cell disease or similar types of chronic anemia as well as in persons who have problems with their immune system (people with leukemia or cancer, who are born with immune deficiencies, who have received an organ transplant, or who have HIV infection). Occasionally (less than 5 % of all pregnant women infected with parvovirus B19) serious complications may develop during pregnancy: risk of Morbus haemolyticus fetalis.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **Parvovirus B19 IgG ELISA** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Microtiter wells as a solid phase are coated with recombinant Parvovirus B19 antigen (VP1-s and VP2-s proteins).

Diluted patient samples and **ready-for-use controls** are pipetted into these wells. During incubation Parvovirus B19-specific antibodies of positive samples and controls are bound to the immobilized antigens.

After a washing step to remove unbound sample and control material horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgG conjugate binds specifically to IgG antibodies resulting in the formation of enzyme-linked immune complexes.

After a second washing step to remove unbound conjugate the immune complexes formed (in case of positive results) are detected by incubation with TMB substrate and development of a blue color. The blue color turns into yellow by stopping the enzymatic indicator reaction with sulfuric acid.

The intensity of this color is directly proportional to the amount of Parvovirus B19-specific IgG antibody in the patient sample. Optical density at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.2 mol/L H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 25 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling samples and reagents. Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with recombinant Parvovirus B19 antigen (VP1-s and VP2-s protein). (incl. 1 cover foil)
2. **SAM DIL Sample Diluent** *, 1 vial, 100 mL, ready to use, colored yellow; pH 7.2 ± 0.2 .
3. **CAL C Pos. Control** *, 1 vial, 1.0 mL, ready to use; colored yellow, red cap.
4. **CAL A Neg. Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, yellow cap.
5. **CAL B Cut-off Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, black cap.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** *, 1 vial, 20 mL, ready to use, colored red, antibody to human IgG conjugated to horseradish peroxidase.
7. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.2 mol/L H_2SO_4 , Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **WASH SOLN 20x Wash Solution** *, 1 vial, 30 mL (20X concentrated for 600 mL), pH 6.5 ± 0.1 see „Preparation of Reagents“.

* contain non-mercury preservative

4.1.1 Material required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm/620 nm ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Vortex tube mixer
- Freshly distilled water
- Timer
- Absorbent paper

4.2 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.3 Reagent Preparation

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution

Add fresh and germ-free distilled water to the 20X concentrated Wash Solution.

Dilute the complete content of the vial **1 + 19** (30 mL *Wash Solution* + 570 mL distilled water) to a final volume of 600 mL.

If crystals have formed in the wash solution concentrate, ensure that they are completely transferred into the solution.

This diluted wash solution has a pH value of 7.2 ± 0.2 .

Consumption: ~ 5 mL per determination.

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at 2 °C to 8 °C.

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheets.

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) can be used in this assay.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric or lipaemic samples. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

5.1 Sample Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Sample Storage

Samples should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Samples held for a longer time (up to 18 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Sample Dilution

Prior to assaying dilute each patient sample **1+100** with *Sample Diluent*;

e.g. 10 µL of sample + 1 mL of *Sample Diluent*, **mix well, let stand for 15 minutes, mix well again.**

Please note: Controls are ready for use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- **It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature before starting the test run!**
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- During incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

6.2 Test Procedure

Prior to commencing the assay, dilute Wash Solution, **prepare patient samples as described in point 5.3**, mix well before pipetting. Carefully establish the **plate layout sheet** supplied in the kit for all samples and controls.

1. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.
Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the <i>Neg. Control</i> ,
2 wells	(e.g. B1 + C1)	for the <i>Cut-off Control</i> and
1 well	(e.g. D1)	for the <i>Pos. Control</i> .

 It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate.
2. Dispense

100 µL	of <i>Neg. Control</i>	into well	A1
100 µL	of <i>Cut-off Control</i>	into wells	B1 + C1
100 µL	of <i>Pos. Control</i>	into well	D1

 and
100 µL of each diluted sample with new disposable tips into appropriate wells.
3. Cover wells with foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at 37 °C**.
4. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (**300 µL per well**). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C)**.
Do not expose to direct sun light!
7. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **100 µL** of *Substrate Solution* into all wells.
9. Incubate for **exactly 15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.
10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
Any blue color developed during the incubation turns into yellow.
Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen!
11. Read the optical density at **450/620 nm** with a microtiter plate reader **within 30 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Measurement

Measure the optical density (OD) of all wells **at 450 nm** and record the OD values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

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

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

7 RESULTS

7.1 Validation of the Test Run

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

Neg. Control in A1:	OD value lower than 0.200
Cut-off Control in B1/C1:	OD value between 0.350 – 0.850
Pos. Control in D1:	OD value between 0.650 – 3.000

The OD value of the Pos. Control should be higher than the OD value of the Cut-off Control.

(OD Pos. Control > OD Cut-off Control).

7.2 Calculation

Mean OD value of Cut-off Control [CO]

Calculate the mean OD value of the two (2) Cut-off Control determinations (e.g. in B1/C1).

Example: $(0.40 + 0.45) / 2 = 0.425 = CO$

7.3 Interpretation

POSITIVE	Patient (mean) OD values more than 20 % above CO (Mean OD _{patient} > 1.2 × CO)
GREY ZONE	Patient (mean) OD values from 20 % above to 10 % below CO repeat test 2 - 4 weeks later - with <u>new</u> patient samples (0.90 × CO ≤ Mean OD _{patient} ≤ 1.2 × CO)
NEGATIVE	Results in the second test again in the grey zone ⇒ NEGATIVE Patient (mean) OD values more than 10 % below CO (Mean OD _{patient} < 0.90 × CO)

7.3.1 Results in DEMEDITEC Units [DU]

$\frac{\text{Patient (mean) OD value} \times 10}{CO} = [\text{DEMEDITEC Units} = \text{DU}]$

Example: $\frac{1.210 \times 10}{0.47} = 25 \text{ DU}$

Interpretation of Results

Cut-off value:	10	DU
Grey zone:	9 - 12	DU
Negative:	< 9	DU
Positive:	> 12	DU

8 QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean OD of 20 replicate analyses of the negative control and was found to be 0.59 DU/mL (OD 450 nm = 0.034).

9.2 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 100 %.

9.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100 %.

9.4 Method Comparison

The DEMEDITEC ELISA was compared with the Mikrogen Parvovirus B19 IgG . 74 serum samples are assayed.

		Reference Assay	
		pos.	neg.
n = 74			
DEMEDITEC ELISA	pos.	49	0
	neg.	0	25

Agreement: 100 %

9.5 Reproducibility

9.5.1 Intra-assay

The intra-assay (within-run) precision of the DEMEDITEC ELISA was determined by 20x measurements of 12 samples covering the measuring range of the ELISA.

Sample	n	Mean OD	Intra-Assay CV (%)
1	20	0.03	9.7
2	20	0.26	5.7
3	20	0.07	6.0
4	20	0.99	8.8
5	20	0.76	5.9
6	20	0.71	9.9
7	20	1.23	6.8
8	20	1.37	3.7
9	20	1.25	3.4
10	20	1.54	3.9
11	20	2.00	3.6
12	20	2.03	1.7

9.5.2 Inter-assay

The inter-assay variation of the DEMEDITEC ELISA was determined in 20 independent runs with 2 replicates per run.

Sample	n	Mean OD	Intra-Assay CV (%)
1	20	2.26	7.2
2	20	1.75	9.9
3	20	2.32	9.3

10 LIMITATIONS OF USE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the OD values. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

10.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **Parvovirus B19 IgG ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Parvovirus B19 in humanem Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der **Parvovirus B19 IgG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit rekombinanten Parvovirus B19-Antigen (VP1-s- und VP2-s-Proteinen) beschichtet. In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert.

Während der darauf folgenden Inkubation werden Parvovirus B19-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgG-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt.

Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt.

Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sicht- und messbar gemacht.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Parvovirus B19-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional.

Die Messung der optischen Dichte bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,2 mol/L H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den EU-Verordnungen.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** *Microtiterwells*, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit rekombinantem Parvovirus B19-Antigen (VP1-s- und VP2-s-Protein) beschichtet; (inkl. 1 Abdeckfolie)
 2. **SAM** **DIL** *Sample Diluent* * (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt; pH $7,2 \pm 0,2$
 3. **CAL** **C** *Pos. Control* * (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 1,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, rote Kappe.
 4. **CAL** **A** *Neg. Control* * (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, gelbe Kappe.
 5. **CAL** **B** *Cut-off Control* * (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, schwarze Kappe.
 6. **ENZ** **CONJ** *Enzyme Conjugate* * (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig; rot gefärbt, Antikörper gegen humanes IgG, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
 7. **SUB** **TMB** *Substrate Solution* (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidin (TMB).
 8. **STOP** **SOLN** *Stop Solution* (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,2 mol/L H_2SO_4 ; Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
 9. **WASH** **SOLN** **20x** *Wash Solution* * (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH $6,5 \pm 0,1$; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
- * Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm/620 nm ± 10 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Vortex-Mischer
- Frisches destilliertes Wasser
- Kurzzeitwecker
- Saugfähiges Papier

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 20-fach konzentrierte Waschlösung mit frischem und keimfreiem destilliertem Wasser auffüllen. Den gesamten Inhalt des Fläschchens **1 + 19** (30 mL Waschlösung + 570 mL destilliertes Wasser) auf ein Endvolumen von 600 mL verdünnen. Falls sich in dem Waschlösungskonzentrat Kristalle gebildet haben, stellen Sie sicher, dass diese vollständig aufgelöst wurden.

Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,2$.

Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung.

Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 1 Woche stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen zu diesem Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDI-TEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 18 Monate) sollten die Proben eingefroren, bei -20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn müssen die Patientenproben **1 + 100** mit *Sample Diluent* verdünnt werden; z.B. 10 µL Probe + 1 mL *Sample Diluent*, **gut mischen, 15 Minuten stehen lassen, nochmals gut mischen**.

Achtung: Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- **Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien, Proben und Kontrollen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen!**
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Reagenzfläschchen sofort nach Gebrauch wieder sorgfältig verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu verhindern.
- Die Patientenproben bzw. das Konjugat sorgfältig auf den Boden der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren (ohne den Rand zu benetzen!), um Kreuzkontaminationen und fälschlich erhöhte Ergebnisse zu vermeiden.
- *Microtiterwells* während der Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung die *Wash Solution* verdünnen, die **Patientenproben vorbereiten, wie unter Punkt 5.3 beschrieben, vor dem Pipettieren gut mischen**. Auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

1. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen. Hierbei mindestens
 - 1 Vertiefung (z.B. A1) für die *Neg. Control*
 - 2 Vertiefungen (z.B. B1 + C1) für die *Cut-off Control* und
 - 1 Vertiefung (z.B. D1) für die *Pos. Control* vorsehen.
 Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.
2. **100 µL *Neg. Control*** in Vertiefung A1 je
100 µL *Cut-off Control* in die Vertiefungen B1 + C1
100 µL *Pos. Control* in Vertiefung D1 und
100 µL jeder verdünnten Patientenprobe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken. **60 Minuten bei 37 °C** inkubieren.
4. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen. **Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Testes wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **100 µL *Enzyme-Conjugate*** in jede Vertiefung geben.
6. Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren. *Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!*
7. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 µL *Substrate Solution*** in jede Vertiefung geben.
9. Die Mikrotiterstreifen **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL *Stop Solution*** in jede Vertiefung abstoppen. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um. **Hinweis:** Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen!
11. Die Optische Dichte (OD) bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Messung

Die Optische Dichte aller Vertiefungen bei 450 nm messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen. Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen. Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den OD-Mittelwert berechnen.

7 ERGEBNISSE

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Neg. Control in A1:	OD-Wert niedriger als 0,200
Cut-off Control in B1 + C1:	OD-Werte zwischen 0,350 und 0,850
Pos. Control in D1:	OD-Wert zwischen 0,650 und 3,000

Der OD-Wert der Pos. Control muss größer sein als der OD-Wert für die Cut-off Control.

(OD Pos. Control > OD Cut-off Control).

7.2 Testauswertung

OD-Mittelwert der Grenzwert-Kontrolle (Cut-off Control) [CO]

Den OD-Mittelwert der 2 Grenzwert-Kontroll-Bestimmungen (z.B. in B1/C1) berechnen.

Beispiel: $(0,40 + 0,45) / 2 = 0,425 = CO$

7.3 Interpretation

POSITIV	OD-(Mittel)werte des Patienten mehr als 20 % oberhalb des CO. (Mittlere OD _{Probe} > 1,2 × CO)
GRAUZONE	OD-(Mittel)werte des Patienten von 20 % oberhalb bis zu 10 % unterhalb des CO. Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe. (0,9 × CO ≤ Mittlere OD _{Probe} ≤ 1,2 × CO)
NEGATIV	Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone ⇒ NEGATIV . OD-(Mittel)werte des Patienten mehr als 10 % unterhalb des CO (Mittlere OD _{Probe} < 0,9 × CO)

7.3.1 Ergebnisse in DEMEDITEC Units [DU]

$\frac{\text{OD-(Mittel)wert des Patienten} \times 10}{CO} = [\text{DEMEDITEC Units} = \text{DU}]$

Example: $\frac{1,210 \times 10}{0,47} = 25 \text{ DU}$

Interpretation der Ergebnisse

Cut-off-Wert:	10	DU
Grauzone:	9 - 12	DU
Negativ:	< 9	DU
Positiv:	> 12	DU

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Wenn die Ergebnisse des Testes nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als OD-Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der Negativkontrolle (n = 20), beträgt 0,59 DU/mL (OD 450 nm = 0,034).

9.2 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100 %.

9.3 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100 %.

Die Daten zu:

9.4 Methodenvergleich

9.5 Reproduzierbarkeit (Präzision)

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTES

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 20 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 DESTINAZIONE D'USO

L'immunoassay enzimatico **DEMEDIATEC Parvovirus B19 IgG (Recombinant)** fornisce materiale per la determinazione **qualitativa e semiquantitativa** di anticorpi della classe IgG per Parvovirus B19 nel siero e plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato).

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit **DEMEDIATEC Parvovirus B19 IgG ELISA (Recombinant)** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati.

Micropozzetti come fase solida sono ricoperti con l'antigene Parvovirus B19 ricombinante (proteina VP1-s e VP2-s).

Campioni diluiti di pazienti e **controlli pronti all'uso** sono pipettati in questi micropozzetti.

Durante l'incubazione gli anticorpi specifici contro Parvovirus B19 di campioni positivi e dei controlli si legano agli antigeni immobilizzati. Dopo i passaggi di lavaggio per rimuovere materiali dei campioni e controlli non legati, anticorpi anti-IgG umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti.

Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgG si legano in maniera specifica agli IgG anticorpi, risultando nella formazione di complessi immunologici-enzimatici.

Dopo un secondo passaggio di lavaggio per rimuovere coniugati non legati, i complessi immunologici formati (nel caso di risultati positivi) sono evidenziati dalla incubazione del substrato TMB e da conseguente sviluppo di un colore blu. Il colore blu vira nel giallo dopo l'arresto della reazione enzimatica indicatore con acido sulfidrico.

L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgG Parvovirus B19-specifico nel campione del paziente. La densità ottica a 450 nm viene determinata con un spettrofotometro ELISA per micropozzetti.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'insero del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,2 mol/L H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti. Pozzetti ricoperti con Parvovirus B19 antigene (recombinante) (proteina VP1-s e VP2-s), (include 1 fogli di copertura)
2. **SAM DIL Sample Diluent** * (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso, colore giallo, pH 7,2± 0,2.
3. **CAL C Pos. Control** * (Controllo positivo), 1 flacone, 1,0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo rosso.
4. **CAL A Neg. Control** * (Controllo negativo), 1 flacone, 2,0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo giallo.
5. **CAL B Cut-off Control** * (Controllo valore limite), 1 flacone, 2,0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo nero.
6. **ENZ CONJ Enzyme Coniugate** * (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso; colore rosso, anticorpo a IgG umano coniugato alla perossidasi di rafano.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso TMB (benzidine tetrametilico).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 0,2 mol/L H₂SO₄. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **WASH SOLN 20x Wash Solution** * (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL), pH 6,5 ± 0,1: vedi „Preparazione dei reagenti“.

* Contiene conservante senza mercurio

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 nm/620 nm ± 10 nm)
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a 37 °C
- Materiale per il lavaggio automatico o manuale
- Agitatore vortex
- Acqua appena distillata
- Cronometro
- Carta assorbente

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kit aperti rimangono attivi per 8 settimane se magazzinati come descritto sopra.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Aggiungere acqua distillata fresca e priva di germi alla soluzione di lavaggio concentrata 20X. Diluire il contenuto completo della fiala **1 + 19** (30 mL di soluzione di lavaggio + 570 mL di acqua distillata) fino ad un volume finale di 600 mL.

Se nella soluzione di lavaggio concentrata si sono formati dei cristalli, assicurarsi che vengano trasferiti completamente nella soluzione.

Questa soluzione di lavaggio diluita deve avere un valore di pH di 7,2 ± 0,2.

Consumo: ~ 5 mL per determinazione.

I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a 37 °C in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissolti prima dell'uso.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a 2 °C a 8 °C.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere immagazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato) può essere usato per questo test.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test. In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anti-coagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere immagazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo. Campioni immagazzinati per un periodo più lungo (fino a 18 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'utilizzo diluire ogni campione dei pazienti **1 + 100** con il *Sample Diluent*;

P.es. 10 µL del campione + 1 mL del *Sample Diluent* **agitare bene; lasciare stare per 15 minuti, agitare bene.**

Nota bene: Controlli sono pronti all'uso e non devono essere diluiti!

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- **È molto importante portare tutti i reagenti, campioni e controlli a temperatura ambiente prima dell'esecuzione del test!**
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Chiudere bene i flaconi dei reagenti immediatamente dopo l'uso per evitare l'evaporazione e la contaminazione microbica.
- Per evitare contaminazioni incrociate e risultati falsi pipettare i campioni e il tracciante sul fondo del pozzetto.
- Durante l'incubazione coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

6.2 Esecuzione del test

Prima di iniziare il test, diluire la soluzione di lavaggio, **preparare i campioni del paziente come descritto nella sezione 5.3** e mescolare bene prima di pipettare.

Documentare attentamente le posizioni dei controlli e dei campioni nel foglio di disposizione delle piastre fornito nel kit.

Per tutti i campioni e controlli documentare attentamente le posizioni nel foglio di disposizione delle piastre fornito nel kit.

1. Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno.
Si prega di collocare almeno:
 - 1 pozzetto (p.es. A1) per il *Neg. Control*
 - 2 pozzetti (p.es. B1 + C1) per il *Cut-off Control* e
 - 1 pozzetto (p.es. D1) per il *Pos. Control*.
 È lasciato all'operator di determinare i controlli e i campioni in doppio.
2. Aggiungere
 - 100 µL** del *Neg. Control* nei pozzetto A1
 - 100 µL** del *Cut-off Control* nei pozzetti B1 + C1
 - 100 µL** del *Pos. Control* nel pozzetto D1 e
 - 100 µL** di ogni campione diluito con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
3. Coprire i pozzetti con la foglia fornita nel kit. Incubare per **60 minuti a 37 °C**.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (**300 µL in ogni pozzetto**). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
5. Aggiungere **100 µL** del *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto.
6. Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)**. *Non esporre alla luce solare diretta!*
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Aggiungere **100 µL** di *Substrate Solution* in ogni pozzetti.
9. Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) al buio**.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* in ogni pozzetto.
Il colore blu sviluppato vira al giallo. **Nota:** Nei campioni fortemente positivi si può formare un precipitato scuro del cromogeno!
11. Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Misure fotometriche

Misurare la densità ottica (DO) di tutti i pozzetti **a 450 nm** e riportare i valori di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.

Determinazione a doppio raggio usando 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento è raccomandabile.

Dove possibile calcolare il **valore medio DO** per tutti i campioni in doppio.

7 RESULTATI

7.1 Convalidazione del test

Il test può essere considerato valido se i seguenti criteri sono realizzati:

Neg. Control in A1: Valore DO inferiore a **0,200**
Cut-off Control in B1/C1: Valori DO tra **0,350 – 0,850**
Pos. Control in D1: Valore DO tra **0,650 – 3,000**

Il valore DO del controllo positivo deve essere superiore al valore DO del controllo Cut-off.

(DO Pos. Control > DO Cut-off Control)

7.2 Calcolo

Il valore medio del Controllo valore limite [CO]

Calcolare il valore medio di DO dei due (2) Controlli valore limite (p.es. In B1/C1).

Esempio: $(0,40 + 0,45) / 2 = 0,425 = CO$

7.3 Interpretazione

POSITIVI Valori (medi) DO dei pazienti almeno 20 % sopra il CO
(Medio DO_{paziente} > 1,2 × CO)

ZONA GRIGIA Valori (medi) di DO da 20 % sopra a 10 % sotto il valore CO
ripetere il test 2-4 settimane dopo - con nuovi campioni dei pazienti.
 $(0,9 \times CO \leq DO_{\text{medio paziente}} \leq 1,2 \times CO)$

Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia ⇒ **NEGATIVI**

NEGATIVI Valori (medi) DO almeno 10 % inferiore a CO
(Medio DO_{paziente} < 0,9 × CO)

7.3.1 Risultati in unità DEMEDITEC [DU]

$\frac{\text{Valori (medi) DO dei pazienti} \times 10}{CO} = [\text{DEMEDITEC Units} = \text{DU}]$

Esempio: $\frac{1,210 \times 10}{0,47} = 25 \text{ DU}$

Interpretazione dei risultati

Valore di soglia: 10 DU
Zona grigia: 9 - 12 DU
Negativi: < 9 DU
Positivi: > 12 DU

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge.

Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno.

Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

È consigliabile di utilizzare programmi di valutazione di qualità nazionali o internazionali per assicurarsi la precisione dei risultati.

Se i risultati del test non entrano nel campo dei controlli stabiliti, i risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere considerati invalidi.

In questo caso si prega di controllare i seguenti parametri tecnici: calibrazione delle micropipette e dei cronometri; spettrofotometro, date di scadenze dei reagenti, magazzinaggio e condizione di incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dal valore medio della DO più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Neg. Control* ed erano 0,59 DU/mL (OD 450 nm = 0,034).

9.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati negativi con l'assenza del reagente analitico. È 100 %.

9.3 Sensitività diagnostica

La sensitività diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati positivi con la presenza del reagente specifico. È 100 %.

Dati dettagliati su

9.4 Comparazione dei metodi

9.5 Precisione

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONI

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori della DO. Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 20 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. La diagnosi di una malattia infettiva non dovrebbe essere fondata sulla base di un solo risultato del test. La diagnosi precisa dovrebbe considerare la storia clinica, la simptomatologia e i dati sierologici.

Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali



Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

















12 REFERENCES / LITERATURE

1. Tino F. Schwarz and Gundula Jäger: A recombinant immunoblot and Elisa for detection of acute Parvovirus B 19 infection
Zbl. Bakt. 1994, 280, 526-533
2. Maria Söderlund, Caroline S. Brown, Willy J. M. Spaan, Lea Hedman and Klaus Hedman, Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B19.
The Journal of infectious Diseases 1995, 72, 1431-1436
3. P. Cassinotti, Human Parvovirus B19 infections and their diagnosis
Alpe Adria Microbiology Journal 1995, 4, 235-246
4. M. Schleuning, Parvovirus B19 Infektionen
Deutsches Ärzteblatt 93, Heft 43, (Oktober 1996), B2182-B2185
5. A von Poblitzki , A Gigler, B Lang, H Wolf, S Modrow: Antibodies to Parvovirus B 19 NS-1 protein in infected individuals.
J. Gen. Virology 1995, 76, 519-527

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	<p>All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (18 °C - 25 °C) before use.</p>
	<p>Dispense 100 µL of Controls into appropriate wells.</p>
	<p>Dispense 100 µL of sample into selected wells. (Please note special sample treatment, point 5.3!)</p>
	<p>Cover wells with foil. Incubate for 60 minutes at 37 °C.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Dispense 100 µL of Enzyme-Conjugate into each well.</p>
	<p>Incubate for 30 minutes at room temperature.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Add 100 µL of Substrate Solution to each well.</p>
	<p>Incubate for 15 minutes at room temperature.</p>
	<p>Stop the reaction by adding 100 µL of Stop Solution to each well.</p>
	<p>Determine the optical density of each well at 450/620 nm.</p>