

## Pilne zawiadomienie dotycząca bezpieczeństwa

Data: 21 czerwca 2013

Temat: **GARLPA007\_2012-03** (wszystkie języki)

Instrukcja użycia (IFU), zawarta w:

recomLine Parvovirus B19 IgM (nr art. 4473) oraz

recomLine Parvovirus B19 IgG [Awidność] (nr art. 4472)

### Ostrzeżenie: **Poprawki w instrukcji użycia (IFU)**

Droży Państwo,

otrzymaliście zestaw recomLine Parvovirus B19 zawierający nieprawidłową instrukcję użycia (IFU). niniejszym firma Mikrogen pragnie wprowadzić ważne poprawki.

Poprzednia wersja IFU (wersja GARLPA007\_2012-03) zawiera nieprawidłowe dane odnośnie ewaluacji wyników IgM (9.3. tabela 3, sekcja „Pozytywny”). Jeżeli pojawi się przynajmniej słaba reaktywność (równa cut-off) dla dwóch z 5 antygenów VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C wynik jest uważany za pozytywny na obecność przeciwciał IgM. Podczas rutynowej kontroli wykryliśmy, iż wśród wymienionych antygenów brakuje VP-2p.

Ewaluacja, która nie bierze pod uwagę VP-2p w niektórych przypadkach może doprowadzić do nieprawidłowej interpretacji wyników. Pozytywne wyniki IgM mogą zostać uznane za wątpliwe jeżeli VP-2p wykazuje reaktywność w kombinacji z jednym z pozostałych 4 antygenów VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C.

### **Działania jakie należy podjąć:**

- Zutilizować nieprawidłową instrukcję IFU (GARLPA007\_2012-03). W załączeniu przesyłamy zaktualizowaną instrukcję (GARLPA008\_2013-06).
- Należy przekazać niniejszą informację do wszystkich osób oraz organów wymagających powiadomienia, a także klientów posiadających nieaktualną instrukcję. W obecnie sprzedawanych zestawach zawarta została notatka o poprawieniu instrukcji użycia.

Prosimy o potwierdzenie otrzymania niniejszego pisma. Przepraszamy za wszelkie niedogodności spowodowane zaistniałą sytuacją i z góry dziękujemy za odpowiedź.

W przypadku jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt. Dział obsługi będzie do dyspozycji.

Christine Reichhuber (+49 89 54801-143, reichhuber@mikrogen.de) lub

Dr Ingrid Albrecht-Walz (+49 89 54801-141, albrecht-walz@mikrogen.de)

Z poważaniem

Dr Ingrid Albrecht-Walz

Product Management

---

**Prosimy o przesyłanie informacji zwrotnych na adres:**

Mikrogen GmbH

Floriansbogen 2-4

82061 Neuried

Niemcy

**Faks: 089/54801-100**

albrecht-walz@mikrogen.de

**Niniejszym potwierdzam otrzymanie pilnego zawiadomienia oraz poprawionej instrukcji użycia GARLPA008\_2013-06-26**

Firma

Imię i nazwisko

Adres

---

data / podpis / pieczęć



## **recomLine Parvovirus B19 IgG [Awidność] recomLine Parvovirus B19 IgM**

producent: MIKROGEN

### **1. Informacje ogólne**

Test recomLine Parvovirus B19 IgG, IgM jest jakościowym testem przeznaczonym do wykrywania przeciwciał klasy IgG lub IgM oraz określania awidności przeciwciał IgG skierowanych przeciwko Parvovirusowi B19 w ludzkiej surowicy lub osoczu.

### **2. Przeznaczenie**

Najczęstszym objawem klinicznym Parwovirusa B19 jest rumień zakaźny. Jeżeli infekcja następuje w okresie ciąży może doprowadzić do samostnego poronienia lub utworzenia się obrzęków płodowych u sero-negatywnych kobiet. Przeciwciała IgG pozostają w organizmie przez całe życie po kontakcie z wirusem. Przeciwciała IgM mogą być wykrywane około 10 dni po kontakcie z wirusem. RecomLine B19 IgG, IgM jest liniowym testem immunoenzymatycznym. Pozwala na identyfikację specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko indywidualnym antygenom Parwovirusa B19. Różne wzorce reakcyjne oraz dodatkowa możliwość oznaczania awidności pozwalają na szczegółowe określenie stanu infekcji.

RecomLine Parvovirus B19 IgG, IgM jest testem potwierdzającym, który może być użyty do potwierdzania nie do końca jasnych wyników testów screeningowych, może także dostarczyć dodatkowych informacji na temat statusu infekcji.

### **3. Zasada testu**

Oczyszczone rekombinowane antygeny są przenoszone na membranę nitrocelulozową. Następnie matryca jest cięta na paski.

Vp-2p	Główny antygen kapsydowy (epitop potwierdzający)
VP-N	N-terminal – część białek strukturalnych VP-1 i VP-2
VP-1S	Specyficzny segment (rozdzielanie od VP-2)
VP-2r	Główny antygen kapsydowy (epitop liniowy)
VP-C	C-terminal – część białek strukturalnych VP-1 i VP-2
NS-1	Niestrukuralne białko

1. W czasie wykrywania przeciwciał specyficznych paski są inkubowane z rozcieńczoną próbką surowicy krwi lub osoczem. W tym procesie przeciwciała wiążą się z antygenami na pasku.
2. Niezwiązane przeciwciała są następnie zmywane.
3. Pasek jest inkubowany w kolejnym etapie z przeciwciałami ludzkimi IgG i/lub IgM sprzężonymi z peroksydazą chrzanową.
4. Niezwiązany koniugat jest następnie usuwany przez płukanie.

- Specyficznie związane przeciwciała są wykrywane w wyniku reakcji barwnej, katalizowanej przez peroksydazę. Jeśli zaszła reakcja przeciw jednemu z białek specyficznych, w odpowiednim miejscu na pasku pojawia się ciemny prążek.

Kontrolne paski są położone obok siebie na górnej części paska testowego:

- Prążek kontrolny znajduje się w górnym końcu paska (poniżej numeru), prążek ten musi się pojawić po reakcji z dowolną surowicą ludzką.
- Pasek kontrolny dla koniugatu IgG oraz IgM. Te paski służą za kontrole dla klas przeciwciał wykrywanych za każdym razem. Dla przykładu, jeśli pasek jest używany do wykrywania przeciwciał IgG, pasek kontrolny koniugatu IgG pokazuje jasno zdefiniowany pasek.
- Kontrola cutoff: dla kontroli procesu barwienia i oceny paska testowego. Intensywność tego prążka daje podstawy do oceny wyniku testu jako pozytywny, wątpliwy lub negatywny.

#### 4. Odczynniki

##### 4.1. Zawartość zestawu

Odczynniki z jednego zestawu wystarczają na 20 oznaczeń.

Każdy zestaw zawiera:

<b>WASHBUF A 10 X</b>	100 ml	Bufor płuczący A (dziesięciokrotnie skoncentrowany) zawiera bufor fosforanowy, NaCl, KCl, detergent i konserwanty MIT (0,1%) oraz Oxypyrion (0,2%)
<b>SUBS TMB</b>	40 ml	Roztwór substratu tetrametylobenzydyny (TMB, gotowy do użycia)
<b>MILKPOW</b>	5 g	Odtłuszczone mleko w proszku
<b>INSTRU</b>	1	Instrukcja obsługi
<b>EVALFORM</b>	1	Arkusze oceny

##### 4.1.1. IgG [Awidność]

Dodatkowo oprócz elementów wymienionych w punkcie 4.1, każdy zestaw zawiera:

<b>TESTSTR</b>	2 sztuki	Probówki, zawierające testy paskowe oznaczone 10 kolejnymi numerami.
<b>CONJ IgG</b>	500 µl	Koniugat przeciw-ludzkim IgG (stukrotne stężenie) (zielona zakrętka), królicze, zawiera NaN <sub>3</sub> (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamid (<0,1%).

##### 4.1.2. Określanie awidności

Na życzenie jest dostępny odczynnik do określania awidności przeciwciał IgG

<b>AVIDI</b> nr 11010	1 saszetka	Odczynnik do określania awidności (substancja stała) do 60 ml gotowego do użycia roztworu.
--------------------------	---------------	--

##### 4.1.3. IgM

<b>TESTSTR</b>	2 sztuki	Probówki, zawierające testy paskowe oznaczone 10 kolejnymi numerami.
<b>CONJ IgM</b>	500 µl	Koniugat przeciw-ludzkim IgM (stukrotne stężenie) (purpurowa zakrętka), królicze, zawiera NaN <sub>3</sub> (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamid (<0,1%).

#### 4.2. Materiały wymagane ale nie dostarczone

- Tace do inkubacji (ich dostawcą jest firma MIKROGEN GmbH),
- Woda dejonizowana,
- Plastikowa pęseta,

- Wytrząsarka,
- Vortex,
- Układ do odsysania płynu z pompą próżniową,
- Cylindry miarowe z podziałką, 50 ml i 1000 ml,
- Mikropipety z jednorazowymi tipsami, 20  $\mu$ l i 1000  $\mu$ l,
- 10 ml pipeta lub dozownik,
- Stoper,
- Ręczniki papierowe,
- Jednorazowe rękawiczki,
- Pojemnik na odpady niebezpieczne.

## 5. Informacje dotyczące pracy z testem i jego przechowywania

- Odczynniki, przed i po wykorzystaniu, należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C, **nie zamrażać**.
- Przed rozpoczęciem wykonywania testu wszystkie składniki należy pozostawić przez przynajmniej 30 minut w temperaturze od 18°C do 25°C (w temperaturze pokojowej). Zarówno test jak i procedurę inkubacji przeprowadza się w temperaturze pokojowej.
- Identyczne odczynniki (zgodnie z nadrukowanymi symbolami) w testach recomLine, recomBlot i ImmunoBlot można używać niezależnie od rodzaju testu i numeru serii. Należy zwrócić uwagę na daty ważności odczynników.
- Przed wykorzystaniem wymieszać dokładnie surowicę kontrolną i stężony koniugat. Unikać tworzenia piany.
- Nie otwierać próbówki zawierającej pasek testowy aż do momentu bezpośrednio przed wykorzystaniem, aby uniknąć skraplania się wody. Paski testowe, które nie są wykorzystywane, muszą być pozostawione w próbówce i muszą być dalej przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C (próbówkę należy ponownie szczelnie zamknąć, pasek testowy nie może ulec zawilgoceniu przed wykorzystaniem).
- Paski są kolejno ponumerowane i oznaczone skróconą nazwą danego testu.
- Gwarancja co do jakości produktu nie może być udzielona po terminie ważności podanym na opakowaniu.
- Należy chronić składniki testu przed bezpośrednim światłem słonecznym.
- Test musi być wykonywany przez dobrze wyszkolony i uprawniony personel.
- W przypadkach istotnej zmiany produktu lub instrukcji użycia, zastosowanie testu może różnić się od celu zamierzonego przez MIKROGEN.
- Krzyżowe zanieczyszczenie próbek lub koniugatów może doprowadzić do pojawienia się nieprawidłowych wyników testu. Próbki, paski i roztwory koniugatów należy dodawać bardzo ostrożnie.
- Paski muszą być całkowicie wilgotne i zanurzone podczas całej procedury.
- Zautomatyzowanie procedury jest możliwe, więcej szczegółów dostępnych jest w firmie MIKROGEN.

## 6. Środki ostrożności

- Tylko do użytku in-vitro.
- Wszystkie produkty zawierające krew muszą być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
- Paski testowe zostały przygotowane za pomocą inaktywowanych, całokomórkowych lizatów, bakteryjnych lub wirusowych antygenów.
- Po dodaniu próbki lub kontroli, pasek musi być traktowany jako potencjalnie zakaźny.
- Odpowiednie rękawiczki jednorazowego użytku muszą być stosowane podczas całej procedury wykonania testu.

- Odczynniki zawierają czynniki antymikrobiologiczne i konserwanty: azydek sodu, MIT, oxyprion, Chloracetamid oraz nadtlenek wodoru. Unikać kontaktu tych substancji ze skórą oraz błonami śluzowymi. Azydek sodu może wchodzić w reakcje z ciężkimi metalami i formować wybuchowe związki.
- Wszystkie odczynniki i materiał skażony próbkami potencjalnie zakaźnymi musi być poddawany działaniu odpowiednich środków dezynfekujących zgodnie z obowiązującymi lokalnymi regulacjami.
- Tacę do inkubacji należy wykorzystywać tylko raz.
- Pasków należy dotykać ostrożnie plastikową pęsetą.
- Nie mieszać i nie zamieniać odczynników na pochodzące od innego producenta.
- Przed przeprowadzeniem testu należy dokładnie zapoznać się z instrukcją obsługi. W czasie pracy należy dokładnie przestrzegać zawartych w niej wskazówek. Odchylenia od procedury mogą prowadzić do otrzymania błędnych wyników.

## 7. Pobieranie próbek i przygotowywanie odczynników

### 7.1. Próbkki

Materiałem do przeprowadzenia testu może być surowica lub osocze krwi (EDTA, cytrynianowe, heparynizowane, CPD), oddzielone od skrzepu, po pobraniu próbki tak szybko jak to możliwe. Za wszelką cenę należy unikać skażenia mikrobiologicznego próbki. Nie rozpuszczone substancje należy usunąć, poprzez wirowanie, przed rozpoczęciem inkubacji. Wykorzystanie próbek lipemicznych, zhemolizowanych lub mętnych może spowodować pojawienie się zaciemnionego tła. Próbki takie mogą również spowodować uzyskanie fałszywych wyników oznaczenia, dlatego nie powinny być wykorzystywane.

#### Ważne!

**Jeśli test nie jest wykonany natychmiast, próbki można przechowywać przez okres do 2 tygodni w temperaturze od 2°C do 8°C. Dłuższe przechowywanie próbek jest możliwe w temperaturze –20°C lub niższej. Powtarzanie cyklu zamrażania i rozmrażania próbki nie jest zalecane, ponieważ może to wpłynąć na jakość oznaczenia.**

### 7.2. Przygotowanie roztworów

#### 7.2.1. Przygotowanie gotowego do wykorzystania buforu przemywającego A

Bufor ten jest wykorzystywany do rozcieńczania koniugatu oraz podczas przemywania. Przed rozcieńczeniem należy ustalić, jaka objętość buforu A jest wymagana dla przeprowadzenia odpowiedniej liczby testów.

Należy rozpuścić odtłuszczone mleko w proszku w koncentracji buforu przemywającego A. Mieszaninę uzupełnia się następnie wodą dejonizowaną do końcowej objętości (rozcieńczenie 1 + 9). Poniższa tabela podaje wzory do obliczania wymaganych objętości:

odczynnik	wzór	przykład: 5 pasków
odtłuszczone mleko (g)	= ilość pasków x 0,1	0,5 g
koncentrat buforu A (ml)	= ilość pasków x 2	10 ml
dejonizowana woda (ml)	= ilość pasków x 18	90 ml
gotowy do użycia bufor A (ml)	= ilość pasków x 20	100 ml

Gotowy do wykorzystania bufor przemywający A może być przechowywany w temperaturze od 2°C do 8°C przez okres czterech tygodni. Gotowy do wykorzystania bufor przemywający A jest lekko mętny i bezwonny.

## 7.2.2. Przygotowanie roztworu koniugatu

Roztwór koniugatu musi być przygotowany bezpośrednio przed wykorzystaniem. Nie można przechowywać gotowego do wykorzystania roztworu koniugatu.

Jedna część stężonego roztworu koniugatu jest rozcieńczana w 100 częściach gotowego do wykorzystania buforu przemywającego A (1 + 100).

Wzory do obliczania potrzebnych ilości są podane w poniższej tabeli:

odczynnik	wzór	przykład: 5 pasków
koncentrat koniugatu ( $\mu$ l)	= ilość pasków x 20	100 $\mu$ l
gotowy do użycia bufor A (ml)	= ilość pasków x 2	10 ml

Objętości należy obliczyć nie uwzględniając martwej objętości. W zależności od tego, jak prowadzona jest analiza (ręcznie czy automatycznie), należy przygotować roztwór koniugatu dla od 1 do 3 testów paskowych więcej.

## 8. Procedura testu

nr	etap	uwagi
1	Przed rozpoczęciem wykonywania testu wszystkie składniki należy pozostawić przez przynajmniej 30 minut w temperaturze od 18°C do 25°C (w temperaturze pokojowej).	Procedurę przeprowadza się w temperaturze pokojowej.
2	<u>Przygotowanie pasków testowych</u> Zanurzyć pasek w 2 ml gotowego do wykorzystania buforu A.	Nie dotykać paska rękami – użyć pęsety. Na każdą próbkę wymagane jest jedno zagłębienie w tacy do inkubacji. Pasek testowy musi być całkowicie wilgotny.
3	<u>Inkubacja próbek</u> a) 20 $\mu$ l nierozcieńczonej próbki (surowica krwi ludzkiej lub osocze krwi ludzkiej), dodać do odpowiedniego zagłębienia (rozcieńczenie 1 + 100). b) Inkubować próbki przez <b>1 godzinę</b> w temperaturze pokojowej, delikatnie wytrząsając tacę.	Proszę upewnić się, że próbka jest dodana na koniec paska testowego zanurzonego w buforze do rozcieńczeń, natychmiast po dodaniu próbki całość należy wymieszać poprzez delikatne wytrząsanie tacy. Przykryć tacę do inkubacji plastikową pokrywą i umieścić na wytrząsarce.
4	<u>Płukanie</u> a) Ostrożnie zdjąć plastikową pokrywą tacy do inkubacji. b) Rozcieńczoną surowicę należy ostrożnie odessać z każdego zagłębienia. c) Do każdego zagłębienia na tacy dodać <b>2 ml</b> gotowego do wykorzystania buforu A i przemyć próbki na wytrząsarce, delikatnie wytrząsając tacę przez <b>5 minut</b> . Następnie, po procedurze przemywania, odessać bufor przemywający A.	Etap przemywania opisany w podpunktach a) do c) należy powtórzyć trzy razy. Unikać krzyżowego zanieczyszczenia. Podczas pracy na automatach należy przestrzegać instrukcji podanych przez producenta sprzętu.
5	<u>Inkubacja z koniugatem</u>	Przykryć tacę do inkubacji

	Dodać do każdego zagłębienia na tacy <b>2 ml</b> odpowiednio przygotowanego roztworu koniugatu i inkubować przez <b>45 minut</b> delikatnie wytrząsając	plastikową pokrywą i umieścić na wytrząsarce.
6	<u>Płukanie</u> (podpunkt 4)	Etap przemywania opisany w podpunktach a) do c) należy powtórzyć trzy razy.
7	<u>Reakcja z substratem</u> Dodać <b>1,5 ml</b> roztworu substratu i inkubować przez <b>8 minut</b> w temperaturze pokojowej, delikatnie wytrząsając tacę	
8	<u>Zatrzymywanie reakcji</u> Przemyć paski <b>trzy razy</b> wodą dejonizowaną.	
9	<u>Osuszanie pasków</u> Wyjąć paski z wody i umieścić między dwoma warstwami bibuły, pozostawić tak do wysuszenia na około 2 godziny.	Wykorzystując plastikową pęsetę należy ostrożnie wyjąć paski z wody. Chronić przed bezpośrednim działaniem światła.
<b>Ważne!</b> Należy upewnić się, że roztwór, w którym prowadzona jest inkubacja nie przeniół się do innych zagłębień na tacy; należy być szczególnie ostrożnym, aby uniknąć rozchlapania roztworu podczas otwierania i zamykania pokrywy.		

## 9. Wyniki

Nie należy stosować automatycznej interpretacji bez wzięcia pod uwagę poniższych wytycznych.

### 9.1. Walidacja – kontrola jakości

Test można oceniać jeśli spełnione są następujące kryteria.

- Prążek kontrolny przebiegu reakcji (górną linią) ma wyraźne zabarwienie, prążek jest ciemny.
- Klasa oznaczanych przeciwciał (prążek drugi): prążek kontrolny koniugatu IgG musi wykazywać wyraźną reakcję barwną.
- Prążek kontrolny cutoff (trzeci): słabe, ale wyraźne zabarwienie

### 9.2. Ocena wyników

Ocena wyników może być dokonana wizualnie lub za pomocą oprogramowania komputerowego recomScan. Dodatkowe informacje i instrukcje są dostępne na zamówienie w firmie MIKROGEN. Poniższe instrukcje odnoszą się do wizualnej oceny wyników.

#### 9.2.1. Ocena intensywności prążków

1. Na załączonym arkuszu służącym do oceniania wyniku testu należy zanotować datę, serię i numer próbki i oznaczane klasy przeciwciał.
2. Numer identyfikacyjny próbki należy umieścić w arkuszu.
3. Przykleić odpowiedni pasek testowy, klejem w sztyfcie, do odpowiedniego pola na arkuszu oceny wyniku testu. Aby to zrobić, należy umieścić pasek testowy z pasmem kontrolnym reakcji na zaznaczonych liniach. Następnie, wykorzystując przezroczystą taśmę klejącą umocować pasek testowy na lewo od zaznaczonej linii. Całkowite przyklejenie paska testowego klejem lub taśmą klejącą może doprowadzić do zmiany zabarwienia.



4. Następnie zidentyfikować pasma na pasku testowym, który był poddany reakcji barwnej w odniesieniu do tych wydrukowanych na pasku kontrolnym arkusza oceny i wprowadzić dane do protokołu (tabela 1). Intensywność prążków ocenia się przez porównanie paska kontrolnego oddzielnie dla każdej klasy immunoglobulin.

**Tabela 1:** Intensywność pasm w odniesieniu do pasma cutoff

Pasma	Intensywność
Brak reakcji	-
Intensywność słabsza niż intensywność pasma odcięcia	±
Taka sama intensywność jak intensywność pasma odcięcia.	+
Silna intensywność (silniejsza intensywność niż intensywność pasma odcięcia)	++
Bardzo silna intensywność	+++

#### **UWAGA!**

Prążki mogą wykazywać różne intensywności w przypadku różnych klas przeciwciał. Możliwe, iż test IgG wykaże wyższą intensywność niż IgM. Intensywność zabarwienia białkowych prążków jest zależna od stężenia specyficznych przeciwciał.

Oznaczenie awidności: rozdział 9.5

### **9.3. Interpretacja wyników**

Kryteria interpretacyjne zawarte są w tabeli 2.

**Tabela 2:** Interpretacja wyników testu IgG (bez reaktywności NS-1)

Wynik testu	Kryteria
Negatywny	• brak reakcji lub inny układ niż poniższe
Wątpliwy	• VP-N <b>lub</b> • VP-2r <b>lub</b> • VP-C
Pozytywny	• VP-2p <b>lub</b> • dwa antygeny spośród VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C

**Tabela 3:** Interpretacja wyników testu IgM (bez reaktywności NS-1)

Wynik testu	Kryteria
Negatywny	• brak reakcji lub inny układ niż poniższe
Wątpliwy	• VP-N <b>lub</b> • VP-1S <b>lub</b> • VP-2r <b>lub</b> • VP-C
Pozytywny	• dwa antygeny spośród VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C

#### **Interpretacja reaktywności NS-1 (IgG)**

Reaktywność NS-1 powinna być rozważana jedynie w przypadku IgG. Nie powinna ona być brana pod uwagę do oceny wyników testu.

Możliwy czas infekcji w przypadku obecności prążka NS-1 w przypadku IgG może zostać określony poprzez założenie, iż infekcja miała miejsce co najmniej 6 tygodni temu. Należy wziąć pod uwagę, iż przeciwciała NS-1 pojawiają się w około 20% przypadków.

Miano NS-1 może dostarczyć informacji o możliwej trwałości wirusa w połączeniu z odpowiednimi objawami oraz wstępnymi badaniami klinicznymi.

Mimo to diagnoza „trwałej infekcji” nie może nigdy bazować jedynie na serologicznych wynikach. Głównym kryterium pozostaje wykrycie antygenów lub DNA parwowirusa. Należy

także wziąć pod uwagę, iż przeciwciała NS-1 są wytwarzane dopiero po pewnym czasie, a DNA wykrywane poprzez PCR może dawać negatywny wynik przez cały okres choroby. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie kilku różnych testów podczas okresu infekcji.

#### 9.4. Typowe profile reakcyjne Parwowirusa B19

Poniższe wzorce reakcyjne mogą dostarczyć informacji na temat statusu infekcji. Należy jednak pamiętać, iż są to wyłącznie typowe wzorce i mogą wystąpić odchylenia.

- Infekcje, które miały miejsce dawno temu często powodują reaktywność IgG przeciwko VP-2p i/lub VP-N (zwykle z VP-1S).
- W przypadku nowej infekcji występuje silna reaktywność IgG przeciwko VP-C i VP-2r w dodatku do VP-2p, VP-N i VP-1S. Silna reaktywność przeciwko VP-C jest przeważnie obecna w przypadku nowej lub niedawnej infekcji (nie dalej niż 6 miesięcy)
- W niektórych przypadkach silna reaktywność przeciwko VP-2r-IgG i brak lub słabo pozytywna reaktywność przeciwko VP-C-IgG może występować w przypadku wczesnej fazy infekcji. Miano VP-C-IgG zachowuje tendencję wzrostową w tych przypadkach.

**Tabela 4:** Status infekcji Parwowirusem B19 i typowe wzorce reakcyjne

IgG	IgM	Możliwy status infekcji
VP-2p, VP-N, VP-2r, VP-C (reaktywności przeważnie $\leq$ prążków cut-off)	VP-2p, VP-N, VP-2r, VP-C	Ostra infekcja, Miano IgG jedynie niskie lub nieobecne
VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C	VP-2p, VP-N, VP-2r (reaktywności przeważnie $\geq$ prążków cut-off)	Status po infekcji (tygodnie lub miesiące), odpowiedź IgM i IgG
VP-2p, VP-N, VP-2r, VP-C, zwykle z VP-1S	Negatywny lub wątpliwy	Status po infekcji (miesiące)
VP-2p i/lub VP-N z VP-1S i VP-2r	Negatywny	Przeszła infekcja (miesiące lub lata)
VP-2p i/lub VP-N z VP-1S	Negatywny	Dawna infekcja (lata)
VP-2p, VP-N i VP-2r (poziom reaktywności przeważnie w okolicy cut-off)	VP-2p, VP-N i/lub VP-2r (możliwy VP-1S) (poziom reaktywności przeważnie w okolicy cut-off)	Niepewny status, test powinien zostać powtórzony w późniejszym czasie
VP-2p, VP-N, VP-1S	VP-N, VP-1S (reaktywności przeważnie $\leq$ prążków cut-off)	Przeszła infekcja określona poprzez obecność IgG z nietypową aktywnością IgM (kombinacja zaobserwowana w przypadku surowic pozytywnych na obecność czynnika reumatoidalnego, test należy powtórzyć w późniejszym czasie)

Przy interpretacji pozytywnego lub wątpliwego wyniku IgM należy zawsze brać pod uwagę reaktywność IgG. Stężenie przeciwciał IgM, a w szczególności przeciwciał skierowanych przeciwko liniowym epitopom spada bardzo szybko u niektórych pacjentów. W niektórych przypadkach pozytywna reaktywność IgM nie może być określona po około 4 tygodniach.

Oznaczanie miana NS-1 w przypadku IgG w celu weryfikacji trwałych infekcji Parwowirusem B19, reaktywnej artopatii, chronicznej anemii lub w obecności innych objawów z podejrzeniem obecności Parwowirusa B19 nie zostało wzięte pod uwagę w tabeli 7 ponieważ występuje zbyt dużo możliwych kombinacji zależnych od czasu trwania, kompetencji szpitala

oraz układu odpornościowego. Miana NS-1 powinny być wliczane do interpretacji tylko w szczególnych przypadkach (9.3).

### **9.5. Rozszerzona diagnoza poprzez oznaczanie awidności**

Określanie awidności może zostać wykorzystane do wspomaganie diagnozy stawianej za pomocą serologii.

#### **9.5.1. Zasada testu**

Do określania awidności można użyć specjalnego odczynnika (nr 11010). Wskazówki odnośnie przeprowadzenia oznaczenia są podane w instrukcji dołączonej do odczynnika.

#### **9.5.2. Awidność**

Awidność przeciwciał skierowanych przeciwko VP-N oraz VP-1S jest badana tylko w przypadku przeciwciał klasy IgG. W wielu przypadkach nie są formowane przeciwciała o wysokiej awidności skierowane przeciwko epitopom liniowym VP-2r i VP-C. Struktura antygeny VP-2p, a co za tym idzie jego właściwości wiążące zmieniają się pod wpływem odczynnika do określania awidności. Z tego powodu oznaczanie awidności przeciwciał VP-2P nie może zostać wykonane.

#### **9.5.3. Oznaczenie i interpretacja awidności**

- Awidność jest określana tylko w przypadku gdy ogólny wynik IgG jest pozytywny.
- Określanie awidności jest możliwe tylko w przypadku przeciwciał anty-VP-N i anty-VP-1s-IgG.
- Prążki na pasku IgG o niższej intensywności niż cut-off nie są brane pod uwagę podczas określania awidności.
- Należy porównać intensywności odpowiednich prążków na dwóch paskach testowych (pasek IgG oraz pasek awidności) inkubowanych z tą samą próbką. Należy zwrócić uwagę na jakąkolwiek zmianę intensywności zabarwienia.
- Zmniejszenie intensywności prążków VP-N i VP-1S o znacznie więcej niż 50% może być interpretowane jako niższa awidność, z kolei zwiększenie o około 50% oznacza średni poziom awidności.
- Gdy awidność jest wysoka, intensywność prążków na pasku awidności nie zmniejsza się lub zmniejsza drastycznie ponieważ przeciwciała IgG są uważane za wysoce awidne.
- Przeciwciała IgG skierowane przeciwko VP-N i VP-1S osiągają wysoką awidność najwcześniej po około 4 tygodniach, a najpóźniej po 6-8 tygodniach od infekcji. Niska lub średnia awidność VP-N lub VP-1S jest wyraźnym znacznikiem ostrej infekcji. Infekcja, która miała miejsce w ciągu ostatnich 4 tygodni może przeważnie zostać wykluczona gdy przeciwciała IgG przeciwko VP-N i VP-1S wykazują wysoką awidność. Jeżeli awidności VP-N i VP-1S różnią się od siebie, awidność VP-1S wiedeńskie prym.
- Ogólnie nie jest możliwe określenie absolutnych zasad dla ewaluacji awidności. Należy wziąć pod uwagę, iż niskie awidności są możliwe po przeszłych infekcjach ponieważ dojrzewanie awidności może być opóźnione. Awidność musi być zawsze interpretowana w kontekście wyników innych badań.

## **10. Ograniczenia procedury**

- Serologiczny test powinien być zawsze interpretowany w połączeniu z obrazem klinicznym.
- Wyniki IgG oraz IgM powinny być zawsze interpretowane razem.
- W przypadku wszystkich interpretacji, zwłaszcza w przypadku słabo pozytywnych lub kwestionowalnych wyników włączenie informacji klinicznych jest kluczowe. Zalecana

jest ścisła współpraca z lekarzem prowadzącym. Pacjenci z wynikami wątpliwymi powinni poddać się badaniu ponownie po dwóch, trzech tygodniach.

- Wynik negatywny nie wyklucza infekcji Parwowirusem B19. Fałszywie negatywne wyniki mogą pojawić się w przypadku pobrania próbek przed wystąpieniem odpowiedzi immunologicznej organizmu.
- Izolowany wynik pozytywny IgM bez pozytywnego wyniku IgG wymaga ostrożnej interpretacji. Wyniki takie mogą oznaczać ostrą infekcję.
- Słaba reaktywność IgM z powodu trwałej obecności przeciwciał IgM może być spowodowana w połączeniu z oczywistymi wynikami IgG infekcją mającą miejsce dawno temu.
- Poliklonalna stymulacja B-limfocytów w przypadku infekcji EBV może spowodować reaktywację przeciwciał IgM przeciwko Parwowirusowi B19 powodując pojawienie się pozytywnego wyniku IgM.
- Wykorzystanie próbek żółtaczkowych może prowadzić do zwiększonej liczby wyników pozytywnych.
- Ciemny pasek testowy Surowica krwi niektórych pacjentów może spowodować ściemnienie, ciągle zabarwienie paska nitrocelulozy lub powstanie na nim wzoru (np. surowica krwi pacjentów cierpiących na alergię na białka mleka). Różne czynniki pochodzące z surowicy krwi pacjenta są odpowiedzialne za powstawanie tego efektu. Ocena takich pasków testowych jest możliwa tylko w ograniczonym stopniu. Na przykład „odwrócone” prążki (białe prążki na ciemnym tle) muszą być oceniane jako negatywne. Taka surowica krwi powinna być w każdym przypadku badana z wykorzystaniem innych metod serologicznych.

## 11. Wydajność testu

W celu określenia wydajności testu oznaczono rutynowe próbki, próbki od kobiet w ciąży, od dzieci z aktywną infekcją Parwowirusem B19 oraz dawców krwi. Dane zostały porównane z innym dostępnym w sprzedaży testem ELISA.

### 11.1. Czulość diagnostyczna

recomLine Parvovirus B19	IgM % (n)	IgG % (n)
negatywny	2,3% (2/87)	0% (0/149)
wątpliwy	0% (0/87)	0% (0/149)
pozytywny	97,7% (85/87)	100% (149/149)
czulość	97,7%	100%

### 11.2. Specyficzność

recomLine Parvovirus B19	IgM % (n)	IgG % (n)
negatywny	97,0% (164/169)	98,4% (60/61)
wątpliwy	1,8% (3/169)	0% (0/61)
pozytywny	1,2% (2/169)	1,6% (1/61)
specyficzność	97,0%	98,4%

### 11.3. Sero-prewalencja

recomLine Parvovirus B19	IgM % (n)	IgG % (n)
negatywny	94,9% (167/176)	33,7% (63/187)
wątpliwy	1,7% (3/176)	0% (0/187)
pozytywny	3,4% (6/176)	66,3% (124/187)
seroprewalencja	3,4%	66%

#### 11.4. Określanie awidności przeciwciał IgG

Przebadano w sumie 67 próbek pochodzących od pacjentów z ostrą, niedawną lub wcześniejszą infekcją. Wyniki badania awidności korelowały z danymi klinicznymi. Badania pokazały, iż przeciwciała IgG przeciwko VP-N i VP-1S osiągały wysoką awidność najwcześniej po 4 tygodniach, a najpóźniej po 6-8 tygodniach. Od tego czasu wykrywane były jedynie wysoce awidne przeciwciała.

Przeprowadzono dodatkowe badania za pomocą 58 wstępnie wybranych próbek pochodzących od dawców, u których wystąpiły wzorce wskazujące na dawną infekcję lub infekcję przeszłą (miesiące). Wykryto 6 próbek (10,3%) z przeciwciałami o średniej awidności i jedną próbkę (1,7%) z przeciwciałami o niskiej awidności. Wszystkie te próbki dały wynik negatywny w badaniu IgM.

#### 11.5. Czulość analityczna

Analityczne oznaczanie czulości ze standardem WHO IgG: Rozcieńczone wersje standardu WHO IgG (100 IU/ml) zostały oznaczone za pomocą recomLine Parvovirus B19 IgG oraz testu porównawczego ELISA. Standard WHO rozcieńczony do 1,5 IU/ml wciąż dawał wątpliwy wynik w teście recomLine (izolowana pozytywna reaktywność VP-N). Test porównawczy również dał wynik wątpliwy.

#### 11.6. Specyficzność analityczna

Specyficzność analityczna jest definiowana jako zdolność testu do określania analitycznej skuteczności w obecności potencjalnie interferujących czynników w próbce lub reakcji krzyżowych z potencjalnie interferencyjnymi przeciwciałami.

- a) interferencje: kontrolowane badania potencjalnie interferencyjnych czynników wykazały, iż wydajność testu nie jest zakłócana przez antykoagulanty (cytrynian sodu, EDTA, heparyna), lipemiczność oraz przez cykle zamrażania i rozmrażania. W przypadku hemolizy (do 1000 mg/dl hemoglobiny), bilirubiczności (do 20 mg/dl bilirubiny) stwierdzono niewielki wzrost liczby pozytywnych wyników IgM.
- b) reaktywność krzyżowa: zbadane zostały potencjalne interferencje innych organizmów dających podobne kliniczne objawy (np. EBV), a także infekcji wywoływanych przez powiązane patogeny. Dodatkowo przetestowano warunki, które są związane z atypową aktywnością systemu odpornościowego (antynuklearne autoprzeciwciała, czynnik reumatoidalny). Nie wykryto żadnych reakcji krzyżowych. Próbki pozytywne na czynnik reumatoidalny wykazały niewielki wzrost liczby pozytywnych wyników IgM.






## 12. Literatura

1. S. Modrow, S. Dorsch: Antibody responses in parvovirus B19 infected patients. *Pathol Biol* (2002), 50, 326 - 31
2. H. W. Lehmann, S. Modrow: Parvovirus B19. *Monatsschr Kinderheilkd* (2004), 152, 203 - 214
3. P. Cassinotti: Human Parvovirus B19 infections and their diagnosis. *Alpe Adria Microbiology Journal* (1995), 4, 235 - 246
4. S. Modrow: Parvovirus-B19. *Deutsches Ärzteblatt* 98, Heft 24, (2001), A1620 - A1624
5. M. Schleuning: Parvovirus-B19-Infektionen. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 43, (Oktober 1996), B2182 - B2185
6. M. Söderlund, C. S. Brown, W. J. M. Spaan, L. Hedman, K. Hedman: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases* 172, (1995), 1431 - 1436
7. T. F. Schwarz, G. Jäger: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B19 infection. *Zbl. Bakt.* 280, (1994), 526-533

8. A. von Poblitzki, A. Gigler, B. Lang, H. Wolf, S. Modrow: Antibodies to Parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. J. Gen. Virology (1995), 76, 519-527
9. A. von Poblitzki, A. Hemnauer, A. Gigler, E. Puchhammer-Stöckl, F.-X. Heinz, J. Pont, K. Laczika, H. Wolf, S. Modrow: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. The Journal of Infectious Diseases (1995), 172, 1356- 1359
10. K.-I. Pfrepper, M. Enders, M. Motz: Human Parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. Journal of Veterinary Medicine Series B (2005), 52, 362-365
11. M. Enders, S. Helbig, A. Hunjet, H. Pfister, C. Reichhuber, M. Motz: Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human Parvovirus B19 infection. J Virol Meth (2007), 146: 409-413

Z przyjemnością prześlemy Państwu dalszą literaturę na temat diagnozy Parwowirusa B19.

### 13. objaśnienia symboli

	Zawiera wystarczającą ilość testów dla przeprowadzenia <n> oznaczeń.
<b>EVAlFORM</b>	Arkusze oceny wyników testu
<b>INSTRU</b>	Instrukcje stosowania
	Skorzystać z instrukcji obsługi
<b>CONT</b>	Dostarczony materiał
<b>IVD</b>	Urządzenie medyczne do diagnostyki <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	Nr serii produktu
	Nie zamrażać
<b>REF</b>	Numer katalogowy
	Wykorzystać przed podaną datą ważności
	Ograniczenia temperatury Przechowywać pomiędzy temperaturą x i y°C

### 14. Producent i informacje o wersji

<b>recomLine Parvovirus B19 IgG [Awidność]</b>	nr art. <b>4472</b>
<b>recomLine Parvovirus B19 IgM</b>	nr art. <b>4473</b>
<b>Instrukcja użycia</b> ważna od	GARLPA008EN czerwiec 2013
<b>MIKROGEN GmbH</b> Floriansbogen 2-4 82061 Neuried Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	