IBL International GmbH
Flughafenstraße 52 a
D-22335 Hamburg

Tel. +49 (0) 40 53 28 91-0
Fax +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Instructions for Use

COVID-19 (SARS-CoV-2) IgG ELISA

The SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA is intended
for the qualitative determination of IgG class antibodies against SARS-CoV-2
in human serum or plasma (citrate, heparin) to support the diagnosis of COVID-19
disease and constitutes a supplement to direct pathogen detection.
In addition, serology can be used to collect epidemiological information on the
prevalence of SARS-CoV-2.

REF **30177447**

Σ **96**

For illustrative purposes only.
To perform the assay the instructions for use provided with the kit have to be used.

Distributed by: **IBL International GmbH**
Flughafenstrasse 52a
D-22335 Hamburg, Germany

Always there for you

SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English 2
Deutsch 8
Français 14
Italiano 20
Español 26
Português 32
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia 38
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciónes / Abreviaturas 38
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos 39
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste 40

ENGLISH

1. INTRODUCTION

End of 2019, a novel respiratory disease emerged in the city of Wuhan, Hubei Province of the People's Republic of China, and soon spread rapidly within the country and worldwide. The causative agent was identified as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 (2019-nCoV), like the closely related SARS coronavirus (SARS-CoV), belongs to the genus Betacoronavirus within the family of coronaviruses. The zoonotic reservoir of the virus appears to be bats.

Coronaviruses are enveloped, positive single-stranded large RNA viruses that infect humans, but also a wide range of animals. The common human coronaviruses NL63, 229E, OC43 and HKU1 are widespread especially throughout the winter months. They are responsible for up to one third of all acute respiratory diseases, typically with mild symptoms (common cold). More than 80 % of the adult population have antibodies against human coronaviruses. The immunity from previous infections lasts only for a short period of time. Therefore, reinfections with the same pathogen are possible just after one year.

SARS-CoV-2 is predominantly transmitted by droplet infection via coughing or sneezing and through close contact with infected patients. In theory, smear infection and infection through the conjunctiva of the eyes are also possible.
The incubation period is in the median 5–6 days (and up to 14 days maximum).

The clinical manifestations of SARS-CoV-2-related COVID-19 disease include fever, cough, respiratory problems and fatigue. In most patients the infection manifests with symptoms of a mild febrile illness with irregular lung infiltrates.

The initial clinical sign of COVID-19 which allowed case detection was pneumonia. But it turned out that the course of the disease is non-specific and varies widely, from asymptomatic courses to severe pneumonia with lung failure and death. However, based on current knowledge, around 80 % of the illnesses are mild to moderate.

Although severe courses of the disease also occur in in younger patients and people without previous illness, the following groups of people have an increased risk of serious forms of the disease: elderly people (with a steadily increasing risk from around 50-60 years of age), smokers and people with certain diseases of the cardiovascular system or the lungs, patients with chronic liver diseases, diabetes mellitus, cancer, or patients with a weakened immune system (e.g. due to immune deficiencies or by taking drugs that suppress the immune system).

Currently, there is no specific treatment or vaccine available against SARS-CoV-2 infection.

Species	Disease	Symptoms e.g.	Transmission route
SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)	COVID-19	the course of the disease is unspecific, diverse and varies greatly, from asymptomatic courses to severe pneumonia with lung failure and death	primary mode of transmission: droplet infection; smear infections and infections via the conjunctiva of the eyes are theoretically possible

The presence of pathogen or infection may be identified by

- Nucleic acid testing (NAT): e.g. RT-PCR
- Serology: detection of antibodies by e.g. ELISA

2. INTENDED USE

The SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against SARS-CoV-2 in human serum or plasma (citrate, heparin) to support the diagnosis of COVID-19 disease and constitutes a supplement to direct pathogen detection. In addition, serology can be used to collect epidemiological information on the prevalence of SARS-CoV-2.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.
Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.
The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with SARS-CoV-2 antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1
For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20…25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with SARS-CoV-2 antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20…25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70…-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing.
Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

   Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

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

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank**: Absorbance value **< 0.100**
- **Negative Control**: Absorbance value **< 0.200 and < Cut-off**
- **Cut-off Control**: Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control**: Absorbance value **> Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [NTU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = \text{[NovaTec Units = NTU]}$$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37$ NTU (Units)

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as **negative**.
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
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. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer: → suggests a current or very recent infection
IgG	Follows IgM production Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate past infection
IgA	Produced in mucosal linings throughout the body (⇒ protective barrier) Usually produced early in the course of the infection

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.815	4.06
#2	24	0.782	4.28
#3	24	0.362	8.71

Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	16.43	7.37
#2	12	12.76	4.11
#3	12	7.05	8.65

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. SARS-CoV-2 infections emerged in December 2019 in Wuhan, China. The expected prevalence values for German and US blood donor panels from before December 2019 therefore amount to 0 %.
The determined positive results correspond to a specificity of 99.24 % (95 %-confidence interval: 95.82 % - 99.98 %).

Sample Panel	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative	Specificity	95 % CI
Blood donors Germany	83	0	1	82	100 %	
Blood donors US	50	1	0	49	98.00 %	
Total	133	1	1	131	99.24 %	95.82 % - 99.98 %

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.
42 samples from 25 patients tested positive for SARS-CoV-2 RNA by RT-PCR were tested.

Days post symptom onset	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative	Sensitivity (Eqv excluded)
0-5	13	1	0	12	7.69 %
6-8	10	4	0	6	40.00 %
9-11	10	4	0	6	40.00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Interferences

Three clinical samples exhibiting differing reactivities were tested for interference with each substance listed in the Table below: a positive, a negative, and an equivocal sample. All samples exhibited a change of signal less than 15 % when tested with each potential interferant.

Interferant	Concentration tested
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin conjugated	0.4 mg/mL
Bilirubin unconjugated	0.4 mg/mL
Cholesterol	4 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Triglycerides	15 mg/mL

10.5. Cross Reactivity

131 samples with antibody activities to potentially cross reacting parameters (including antibodies to several respiratory pathogens) were tested to evaluate the cross reactivity of the assay.

Samples positive for antibodies to	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative
Adenovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Respiratory syncytial virus	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, other than SARS-CoV-2	1	0	0	1
Rheumatoid Factor positive	26	0	0	26

Cross reactions with antibodies to respiratory syncytial virus cannot be excluded. Cross reactivity with other human coronaviruses should be considered for result interpretation.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplate strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing spray
	P280	Wear protective gloves/protective clothing.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
	P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: COVG0940 SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Ende 2019 trat in der Stadt Wuhan, Provinz Hubei, Volksrepublik China, eine neuartige Atemwegserkrankung auf, die sich schon bald innerhalb des Landes und rasch weltweit ausbreitete. Als Erreger wurde das SARS-CoV-2 ("Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2") identifiziert. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) gehört, wie das eng verwandte SARS-Coronavirus (SARS-CoV), zur Gattung der Betacoronaviren innerhalb der Familie der Coronaviren. Das zoonotische Reservoir des Virus sind anscheinende Fledermäuse.

Coronaviren sind große, von einer Lipidhülle umgebene RNA-Viren mit einzelsträngigem Plus-Strang-Genom, die den Menschen, aber auch eine Vielzahl von Tieren infizieren. Die bekannten humanen Coronaviren NL63, 229E, OC43 und HKU1 sind vor allem in den Wintermonaten weit verbreitet. Sie sind für bis zu ein Drittel aller akuten Atemwegserkrankungen verantwortlich und führen typischerweise zu leichten Symptomen (Erkältung). Bei mehr als 80 % der erwachsenen Bevölkerung lassen sich Antikörper gegen humane Coronaviren nachweisen. Die Immunität gegenüber früheren Infektionen hält nur für eine kurze Zeit an. Reinfektionen mit dem gleichen Erreger sind daher bereits nach einem Jahr möglich.

SARS-CoV-2 wird vorwiegend durch Tröpfcheninfektion über Husten oder Niesen und durch engen Kontakt mit infizierten Personen übertragen. Theoretisch sind auch Schmierinfektionen und Infektionen über die Bindehaut der Augen möglich.

Die Inkubationszeit liegt im Median bei 5-6 Tagen (und maximal bei bis zu 14 Tagen).

Zu den klinischen Manifestationen der SARS-CoV-2-assoziierten COVID-19 Erkrankung zählen Fieber, Husten, Atembeschwerden und Müdigkeit. Bei den meisten Patienten manifestiert sich die Infektion mit Symptomen einer leichten fieberhaften Erkrankung mit irregulären Lungeninfiltraten.

Das ursprüngliche klinische Anzeichen von COVID-19, das eine Diagnose ermöglichte, war Lungenentzündung. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Krankheitsverlauf unspezifisch ist und stark variiert: von asymptomatischen Verläufen bis hin zu einer schweren Lungenentzündung mit Lungenversagen und Tod. Nach heutigem Kenntnisstand sind jedoch etwa 80 % der Erkrankungen leicht bis moderat.

Obwohl schwere Krankheitsverläufe auch bei jüngeren Patienten und Menschen ohne Vorerkrankungen auftreten, haben folgende Personengruppen ein erhöhtes Risiko für schwere Erkrankungsformen: ältere Menschen (mit einem stetig steigenden Risiko ab etwa 50-60 Jahren), Raucher und Menschen mit bestimmten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems oder der Lunge, Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, Krebs oder Patienten mit einem geschwächten Immunsystem (z.B. durch Immunschwäche oder durch die Einnahme von Medikamenten, die das Immunsystem unterdrücken).

Gegenwärtig gibt es keine spezifische Behandlung oder einen Impfstoff gegen eine SARS-CoV-2-Infektion.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
SARS-CoV-2 ("Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2")	COVID-19	Der Krankheitsverlauf ist unspezifisch, vielfältig und variiert stark, von asymptomatischen Verläufen bis hin zu schwerer Lungenentzündung mit Lungenversagen und Tod	Primärer Übertragungsweg: Tröpfcheninfektion; Schmierinfektionen und Infektionen über die Bindehaut der Augen sind theoretisch möglich

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Nukleinsäure-Nachweis: z.B. RT-PCR
- Serologie: Nachweis von Antikörpern durch z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2 in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt, um die Diagnose der COVID-19-Erkrankung zu unterstützen, und stellt eine Ergänzung zum direkten Erregernachweis dar. Darüber hinaus kann die Serologie verwendet werden, um epidemiologische Informationen über die Prävalenz von SARS-CoV-2 zu sammeln.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.
Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschritt wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.
Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit SARS-CoV-2 Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig. ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig. ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.
Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit SARS-CoV-2 Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.
Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20…25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70…-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10 µL Probe und 1 mL IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

   Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert**: Extinktionswert **< 0,100**
- **Negativkontrolle**: Extinktionswert **< 0,200 und < Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle**: Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle**: Extinktionswert **> Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86 : 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe x 10}}{\text{Cut-off}} = \text{[NovaTec Einheiten = NTU]}$$

Beispiel: $\frac{1{,}591 \times 10}{0{,}43} = 37$ NTU

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als **negativ**.
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.
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. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.		

9.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion
IgG	Folgt der IgM Produktion Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach mehreren Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion
IgA	Sezerniert in allen Schleimhäuten (⇒ Schutzbarriere) Meist früh im Verlauf einer Infektion gebildet

10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	0,815	4,06
#2	24	0,782	4,28
#3	24	0,362	8,71

Interassay	n	Mittelwert (NTU)	Vk (%)
#1	12	16,43	7,37
#2	12	12,76	4,11
#3	12	7,05	8,65

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. SARS-CoV-2-Infektionen traten im Dezember 2019 in Wuhan, China, auf. Die erwarteten Prävalenzwerte für deutsche und US-amerikanische Blutspender-Panels aus der Zeit vor Dezember 2019 betragen daher 0 %.
Die ermittelten positiven Ergebnisse entsprechen einer Spezifität von 99,24 % (95 %-Konfidenzintervall: 95,82 % - 99,98 %).

Probenkollektiv	Anzahl Proben (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ	Spezifität (Gw. ausgeschlossen)	95 % KI
Blutspender Deutschland	83	0	1	82	100 %	
Blutspender USA	50	1	0	49	98,00 %	
Total	133	1	1	131	99,24 %	95,82 % - 99,98 %

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. 42 Proben von 25 Patienten, die mittels RT-PCR positiv auf SARS-CoV-2 RNA getestet wurden, wurden getestet.

Tage nach Symptombeginn	Anzahl Proben (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ	Sensitivität (Gw. ausgeschlossen)
0-5	13	1	0	12	7,69 %
6-8	10	4	0	6	40,00 %
9-11	10	4	0	6	40,00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Interferenzen

Drei klinische Proben mit unterschiedlichen Reaktivitäten wurden auf Interferenzen mit jeder in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Interferenzsubstanz getestet: eine positive, eine negative und eine grenzwertige Probe. Alle Proben wiesen eine Signaländerung von weniger als 15 % auf, wenn sie mit der jeweiligen potenziellen Interferenzsubstanz getestet wurden.

Interferenzsubstanz	Getestete Konzentration
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin konjugiert	0,4 mg/mL
Bilirubin unkonjugiert	0,4 mg/mL
Cholesterin	4 mg/mL
Hämoglobin	10 mg/mL
Triglyceride	15 mg/mL

10.5. Kreuzreaktivität

131 Proben mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter (einschließlich Antikörper gegen verschiedene Atemwegserreger) wurden getestet, um die Kreuzreaktivität des Assays zu bewerten.

Proben positiv für Antikörper gegen	n	Positiv	Grenzwertig	Negativ
Adenovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Respiratorisches Synzytial-Virus	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, nicht SARS-CoV-2	1	0	0	1
Rheumafaktor positiv	26	0	0	26

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) können nicht ausgeschlossen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte eine Kreuzreaktivität mit anderen humanen Coronaviren in Betracht gezogen werden.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.

- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: COVG040 SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Fin 2019, une nouvelle maladie respiratoire est apparue dans la ville de Wuhan, dans la province de Hubei de la République populaire de Chine, et s'est rapidement répandue dans le pays et dans le monde. L'agent causal a été identifié comme étant le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Le CoV-2 du SRAS (2019-nCoV), comme le coronavirus du SARS (CoV du SRAS) qui lui est étroitement apparenté, appartient au genre Betacoronavirus dans la famille des coronavirus. Le réservoir zoonotique du virus semble être les chauves-souris.

Les coronavirus sont des grands virus à ARN monocaténaire, de sens positif qui infectent les humains, mais aussi un large éventail d'animaux. Les coronavirus humains communs NL63, 229E, OC43 et HKU1 sont couramment répandus, surtout pendant les mois d'hiver. Ils sont responsables de jusqu'à un tiers de toutes les maladies respiratoires aiguës, généralement accompagnées de symptômes légers (rhume). Plus de 80 % de la population adulte possède des anticorps contre les coronavirus humains. L'immunité contre les infections précédentes ne dure qu'une courte période. Par conséquent, il est possible de réinfecter le même agent pathogène juste après un an.

Le SARS-CoV-2 se transmet principalement par l'infection des gouttelettes par la toux ou les éternuements et par contact étroit avec des patients infectés. En théorie, l'infection par frottis et l'infection par la conjonctive des yeux sont également possibles.

La période d'incubation moyenne est de l'ordre de 5 à 6 jours (et peut aller jusqu'à 14 jours maximum).

Les manifestations cliniques de la maladie COVID-19 liée au SARS-CoV-2 comprennent la fièvre, la toux, les problèmes respiratoires et la fatigue. Chez la plupart des patients, l'infection se manifeste par des symptômes d'une maladie fébrile légère avec des infiltrats pulmonaires irréguliers.

Le premier signe clinique de COVID-19 qui a permis de détecter le cas, était la pneumonie. Mais il s'est avéré que l'évolution de la maladie est non spécifique et très variable, allant d'une évolution asymptomatique à une pneumonie grave avec insuffisance pulmonaire et décès. Cependant, selon les connaissances actuelles, environ 80 % des maladies sont légères à modérées.

Bien que des formes graves de la maladie apparaissent également chez des patients plus jeunes et des personnes sans antécédents de maladie, les groupes de personnes suivants présentent un risque accru de formes graves de la maladie : les personnes âgées (dont le risque augmente régulièrement à partir de 50 à 60 ans environ), les fumeurs et les personnes souffrant de certaines maladies du système cardiovasculaire ou des poumons, les patients souffrant de maladies chroniques du foie, de diabète sucré, de cancer ou les patients dont le système immunitaire est affaibli (par exemple en raison de déficiences immunitaires ou de la prise de médicaments qui suppriment le système immunitaire).

Actuellement, il n'existe pas de traitement ou de vaccin spécifique contre l'infection par le SARS-CoV-2.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
SARS-CoV-2 (syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2)	COVID-19	L'évolution de la maladie est non spécifique, diverse et différents degrés de gravité, elle peut aller d'une évolution asymptomatique à une pneumonie grave avec insuffisance pulmonaire et décès.	Mode de transmission primaire : infection par gouttelettes ; les infections par frottis et les infections par la conjonctive des yeux sont théoriquement possibles

L'identification de l'agent pathogène ou d'une infection par:

- Test d'acide nucléique: p.ex. PCR-RT
- Sérologie: détection des anticorps par p.ex. ELISA

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgG contre syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2 dans le sérum ou plasma (citrate, héparine) humain pour soutenir le diagnostic de la maladie COVID-19 et constitue un complément à la détection directe des agents pathogènes. En outre, la sérologie peut être utilisée pour recueillir des informations épidémiologiques sur la prévalence du CoV-2-SARS.

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur le la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
Plaques de Microtitrage sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.
L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un Photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène du SARS-CoV-2; en sachets d'aluminium refermables.
- **Tampon de Dilution d'Échantillon IgG:** 1 flacon contenant 100 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH 7,2 ± 0,2; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solution d'Arrêt:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de Lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 20 mL d'anticorps IgG anti-humaines conjuguées à peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de Substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle Positif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Cut-off:** 1 flacon contenant 3 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Négatif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 12.1
Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3. Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaque de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20...25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène du SARS-CoV-2. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrettes restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

6.2. Tampon de Lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de Lavage 1+19; par exemple 10 mL du Tampon de Lavage + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon de Lavage est stable pendant 5 jours à la température ambiante ou à 2...8 °C. Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3. Solution de Substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70…-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec Tampon de Dilution d'Échantillon IgG. Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL Tampon de Dilution d'Échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE TEST

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de Lavage de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'Échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL du Tampon de Lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!

   Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats.
5. Pipeter 100 µL du Conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20…25 °C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20…25 °C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µL de la Solution d'Arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la Solution de Substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la Solution d'Arrêt.

8.1. Mesure

Réglez le photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA **à zéro** en utilisant **le Blanc substrat.**
Si - pour des raisons techniques - le photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits **à 450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.
Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance.**

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le test, les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat**: Valeur d'absorbance **< 0,100**
- **Contrôle Négatif**: Valeur d'absorbance **< 0,200 et < Cut-off**
- **Contrôle Cut-off**: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle Positif**: Valeur d'absorbance **> Contrôle Cut-off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du Contrôle cut-off.

Exemple: 0,44 DO Contrôle Cut-off + 0,42 DO Contrôle Cut-off = 0,86 : 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Résultats en unités [NTU]

$$\frac{\text{Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon x 10}}{\text{Cut-off}} = \text{[unités NovaTec = NTU]}$$

Exemple: $\frac{1{,}591 \times 10}{0{,}43} = 37$ NTU

9.3. Interprétation des résultats

Cut-off	10 NTU	-
Positif	> 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé **négatif**.
Negatif	< 9 NTU	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.
Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.		

9.3.1. Isotypes d'anticorps et l'Etat de l'infection

Sérologie	Signification
IgM	Caractéristique de la réponse primaire de l'anticorps Titre élevé d'IgM : → suggère une infection très récente ou aigüe
IgG	Suit la production d'IgM Caractéristique de la réponse secondaire de l'anticorps Peut persister pendant plusieurs années Des titres élevés d'IgG à faible titre d'IgM: → peuvent indiquer une infection ancienne
IgA	Ils sont produits au niveau des muqueuses dans tout le corps (⇒ barrière de protection) Habituellement ils sont produits en début d'infection

10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'Échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	0,815	4,06
#2	24	0,782	4,28
#3	24	0,362	8,71

Inter-essai	n	moyenne (NTU)	CV (%)
#1	12	16,43	7,37
#2	12	12,76	4,11
#3	12	7,05	8,65

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Les infections par le SARS-CoV-2 sont apparues en décembre 2019 à Wuhan, en Chine. Les valeurs de prévalence attendues pour les donneurs de sang allemands et américains avant décembre 2019 s'élèvent donc à 0 %.
Les résultats positifs déterminés correspondent à une spécificité de 99,24 % (Intervalle de confiance à 95 %: 95,82 % - 99,98 %).

Échantillon collectif	Nombre d'échantillons (n)	Positif	Zone grise	Negatif	Spécificité (Z.g. exclus)	95 % IC
Donneurs de sang Allemagne	83	0	1	82	100 %	
Donneurs de sang USA	50	1	0	49	98,00 %	
Total	133	1	1	131	99,24 %	95,82 % - 99,98 %

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. 42 échantillons de 25 patients testés positifs pour l'ARN du SARS-CoV-2 par PCR-RT ont été analysés.

Jours après l'apparition des symptômes	Nombre d'échantillons (n)	Positif	Zone grise	Negatif	Sensibilité (Z.g. exclus)
0-5	13	1	0	12	7.69 %
6-8	10	4	0	6	40,00 %
9-11	10	4	0	6	40,00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Interférences

Trois échantillons cliniques présentant des réactivités différentes ont été testés pour détecter toute interférence avec chacune des substances énumérées dans le tableau ci-dessous: un échantillon positif, un échantillon négatif et un échantillon équivoque. Tous les échantillons ont présenté une variation du signal inférieure à 15 % lors des tests avec chaque interférant potentiel.

Substance interférente	Concentration testée
Albumin	60 mg/mL
Bilirubine conjuguée	0,4 mg/mL
Bilirubine non conjuguée	0,4 mg/mL
Cholestérol	4 mg/mL
Hémoglobine	10 mg/mL
Triglycérides	15 mg/mL

10.5. Réaction croisée

131 échantillons avec des activités d'anticorps pour potentiellement croiser des paramètres de réaction (y compris des anticorps contre plusieurs pathogènes respiratoires) ont été testés pour évaluer la réactivité croisée de l'essai.

Les échantillons positifs pour les anticorps contre	Nombre d'échantillons (n)	Positif	Zone grise	Negatif
Adénovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Virus respiratoire syncytial	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, autre que SARS-CoV-2	1	0	0	1
Facteur rhumatoïde positif	26	0	0	26

Des réactions croisées avec des anticorps à virus respiratoire syncytial ne peuvent être exclues. Une réactivité croisée avec d'autres coronavirus humains doit être envisagée pour l'interprétation des résultats.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l`échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaque de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.

- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le ELISA est uniquement destinée à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

12.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 4.1)
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attenttion	H317	Peut provoquer une allergie cutanée
	P261	Éviter de respirer les aérosols
	P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
	P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau
	P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
	P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

12.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence:	COVG0940	SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 déterminations)

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Alla fine del 2019, una nuova malattia respiratoria è emersa nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei della Repubblica Popolare Cinese, e si è presto diffusa rapidamente nel Paese e in tutto il mondo. L'agente causale è stato identificato come coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2). La SARS-CoV-2 (2019-nCoV), come il coronavirus della SARS strettamente correlato (SARS-CoV), appartiene al genere Betacoronavirus della famiglia dei coronavirus. Il serbatoio zoonotico del virus sembrano essere pipistrelli.

I coronavirus sono virus di RNA grande, di singolo filamento a polarità positiva che infettano l'uomo, ma anche una vasta gamma di animali. I comuni coronavirus umani NL63, 229E, OC43 e HKU1 sono diffusi soprattutto nei mesi invernali. Sono responsabili fino a un terzo di tutte le malattie respiratorie acute, tipicamente con sintomi lievi (comune raffreddore). Più dell'ottanta per cento, 80%, della popolazione adulta ha anticorpi contro i coronavirus umani. L'immunità da precedenti infezioni dura solo per un breve periodo. Pertanto, le reinfezioni con lo stesso agente patogeno sono possibile solo dopo un anno.

La SARS-CoV-2 è trasmessa prevalentemente tramite infezione da goccioline attraverso tosse o starnuti e attraverso il contatto ravvicinato con i pazienti infetti. In teoria, sono possibili anche infezioni da striscio e infezioni attraverso la congiuntiva degli occhi.

Il periodo d'incubazione è nella media 5-6 giorni (e fino a un massimo di 14 giorni).

Le manifestazioni cliniche della malattia COVID-19 correlata alla SARS-CoV-2 includono febbre, tosse, problemi respiratori e affaticamento. Nella maggior parte dei pazienti l'infezione si manifesta con sintomi di una lieve malattia febbrile con infiltrazioni polmonari irregolari.

Il segno clinico iniziale di COVID-19 che ha consentito il rilevamento del caso è stato la polmonite. Ma si è scoperto che il decorso della malattia non è specifico e varia ampiamente, dai decorsi asintomatici alla polmonite grave con insufficienza polmonare e morte. Tuttavia, sulla base delle conoscenze attuali, circa l'ottanta per cento, 80 %, delle malattie sono da lievi a moderate.

Sebbene i decorsi gravi della malattia avvengano anche in pazienti più giovani e in persone senza una precedente malattia, i seguenti gruppi di persone hanno un rischio maggiore di forme gravi della malattia: anziani (con un rischio in costante aumento da circa 50-60 anni di età), fumatori e persone con determinate malattie del sistema cardiovascolare o dei polmoni, pazienti con malattie croniche del fegato, diabete mellito, cancro, o pazienti con un sistema immunitario indebolito (ad esempio a causa di carenze immunitarie o con l'assunzione di farmaci che sopprimono il sistema immunitario).

Attualmente non sono disponibili trattamenti specifici o vaccini contro l'infezione da SARS-CoV-2.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
SARS-CoV-2 (sindrome respiratoria acuta grave del coronavirus 2)	COVID-19	Il decorso della malattia è aspecifico, vario e con diversi gradi di gravità, da decorsi asintomatici a polmonite grave con insufficienza polmonare e morte	Modalità primaria di trasmissione: infezione da goccioline; infezioni da striscio e infezioni attraverso la congiuntiva degli occhi sono teoricamente possibili

La presenza di agenti patogeni o infezione può essere identificata mediante:

- Test di acido nucleico: p.es. RT-PCR
- Sierologia: rilevazione di anticorpi tramite p.es. ELISA

2. USO PREVISTO

Il SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per sindrome respiratoria acuta grave del coronavirus 2 nel siero o plasma (citrato, eparina) umano per sostenere la diagnosi della malattia COVID-19 e costituisce un supplemento alla rilevazione diretta del patogeno. Inoltre, la sierologia può essere utilizzata per raccogliere informazioni epidemiologiche sulla prevalenza della SARS-CoV-2.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).
Piastre di Microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un fotometro per Piastre di Microtitolazione ELISA.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del SARS-CoV-2; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione IgG:** 1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di Lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 20 mL di anticorpi IgG anti-umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3`,5,5`-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo Positivo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:** 1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 12.1.
Per le sostanze potenziali pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20…25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

6.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestiti antigeni del SARS-CoV-2. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessarie, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

6.2. Tampone di Lavaggio (20x conc.)

Diluire il tampone di Lavaggio 1+19; per esempio: 10 mL del Tampone di Lavaggio + 190 mL di acqua distillata. Il campione di tampone diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente o a 2...8 °C. Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70…-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento. L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con Tampone di Diluizione del Campione IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di Tampone di Diluizione del Campione IgG e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso prima di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi fino 3 a 5 volte e il volume del Tampone di Lavaggio da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37 ± 1°C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di Tampone di Lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo!

   Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi.
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (20...25 °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante.

8.1. Misurazione

Regolare il fotometro per le piastre di Microtitolazione ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori di l'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde bichrome (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato Bianco (Blank)**: Valore di assorbanza **< 0,100**
- **Controllo Negativo**: Valore di assorbanza **< 0,200 e < Cut-off**
- **Controllo Cut-off**: Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo Positivo**: Valore di assorbanza **> Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42 = 0,86/2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Risultati in unità [NTU]

$$\frac{\text{Assorbanza media del campione x 10}}{\text{Cut-off}} = \text{[unità NovaTec = NTU]}$$

Esempio: $\frac{1{,}591 \times 10}{0{,}43} = 37$ NTU

9.3. Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zonaq grigia	9 – 11 NTU	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia il campione viene giudicato come **negativo**.
Negativo	< 9 NTU	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.
La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.		

9.3.1. Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

Sierologia	Significato
IgM	Caratteristica della risposta dell'anticorpo primario Titolo IgM elevato: → suggerisce un'infezione attuale o molto recente.
IgG	Segue la produzione di IgM Caratteristica della risposta dell'anticorpo secondario Può persistere per diversi anni Titolo IgG elevato con titolo IgM basso: → può indicare un'infezione passata.
IgA	Sono prodotte a livello delle mucose in tutto il corpo (⇒ barriera protettiva) Solitamente sono prodotte all'inizio dell'infezione

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	0,815	4,06
#2	24	0,782	4,28
#3	24	0,362	8,71

Interdosaggio	n	Media (NTU)	CV (%)
#1	12	16,43	7,37
#2	12	12,76	4,11
#3	12	7,05	8,65

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. Le infezioni da SARS-CoV-2 sono emerse nel dicembre 2019 a Wuhan, China. I valori di prevalenza previsti per i donatori di sangue tedeschi e statunitensi da prima del dicembre 2019 sono quindi pari allo 0 %.
I risultati positivi determinati corrispondono a una specificità del 99,24 % (95% Intervallo di confidenza: 95,82 % - 99,98 %).

Collettivo campione	Numero di campioni (n)	Positivo	Zona grigia	Negativo	Specificità (Z.g. esclusi)	95 % IC
Donatore di sangue Germania	83	0	1	82	100 %	
Donatore di sangue USA	50	1	0	49	98,00 %	
Totale	133	1	1	131	99,24 %	95,82 % - 99,98 %

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. Sono stati analizzati 42 campioni di 25 pazienti risultati positivi al SARS-CoV-2 RNA mediante RT-PCR.

Giorni dopo l'insorgenza dei sintomi	Numero di campioni (n)	Positivo	Zona grigia	Negativo	Sensibilità (Z.g. esclusi)
0-5	13	1	0	12	7.69 %
6-8	10	4	0	6	40,00 %
9-11	10	4	0	6	40,00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Possibili interferenze

Sono stati testati tre campioni clinici che presentavano reattività diverse per verificare la presenza di interferenze con ciascuna delle sostanze elencate nella tabella seguente: un campione positivo, uno negativo e uno equivoco. Tutti i campioni hanno mostrato un cambiamento di segnale inferiore al 15 % quando sono stati testati con ogni potenziale interferente.

Sostanza interferente	Concentrazione testata
Albumina	60 mg/mL
Bilirubina coniugata	0,4 mg/mL
Bilirubina non coniugata	0,4 mg/mL
Colesterolo	4 mg/mL
Emoglobina	10 mg/mL
Trigliceridi	15 mg/mL

10.5. Reattività crociata

Sono stati testati 131 campioni con attività anticorpale per parametri a reazione incrociata potenzialmente (compresi gli anticorpi contro diversi agenti patogeni respiratori) per valutare la reattività incrociata del saggio.

Campioni positivi agli anticorpi per	Numero di campioni (n)	Positivo	Zona grigia	Negativo
Adenovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Virus sinciziale respiratorio	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, diverso da SARS-CoV-2	1	0	0	1
Fattore reumatoide positivo	26	0	0	26

Non si possono escludere reazioni incrociate con anticorpi contro anticorpi contro il virus respiratorio sinciziale. La reattività crociata con altri coronavirus umani deve essere presa in considerazione per l'interpretazione dei risultati.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelamento possono alterare i valori delle assorbanze.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZA

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.

- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

12.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 4.1)
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione

H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

12.2. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto:	COVG0940	SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 determinazioni)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

A finales de 2019 surgió una nueva enfermedad respiratoria en la ciudad de Wuhan, en la provincia de Hubei de la República Popular China, que pronto se propagó rápidamente dentro del país y en todo el mundo. El agente causal se identificó como el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). El SARS-CoV-2 (2019-nCoV), al igual que el coronavirus del SARS estrechamente relacionado (SARS-CoV), pertenece al género Betacoronavirus de la familia de los coronavirus. El reservorio zoonótico del virus parece ser los murciélagos.

Los coronavirus son virus de ARN grandes, monocatenarios, de sentido positivo que infectan a los seres humanos, pero también a una amplia gama de animales. Los coronavirus humanos comunes NL63, 229E, OC43 y HKU1 se propagan comúnmente, especialmente durante los meses de invierno. Son responsables de hasta un tercio de todas las enfermedades respiratorias agudas, típicamente con síntomas leves (resfriado común). Más del 80 % de la población adulta tiene anticuerpos contra los coronavirus humanos. La inmunidad de las infecciones anteriores dura sólo un corto período. Por lo tanto, las reinfecciones con el mismo patógeno son posibles justo después de un año.

El SARS-CoV-2 se transmite predominantemente por infección dor gotitas a través de la tos o los estornudos y por el contacto cercano con pacientes infectados. En teoría, la infección por frotis y la infección a través de la conjuntiva de los ojos también son posibles.

El período de incubación se sitúa en la media de 5-6 días (y puede alcanzar um máximo de 14 días).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad COVID-19 relacionada con el SARS-CoV-2 incluyen fiebre, tos, problemas respiratorios y fatiga. En la mayoría de los pacientes la infección se manifiesta con síntomas de una enfermedad febril leve con infiltraciones pulmonares irregulares.

El signo clínico inicial de COVID-19 que permitió la detección del caso fue la neumonía. Pero resultó que el curso de la enfermedad no es específico y varía ampliamente, desde cursos asintomáticos hasta neumonía severa con insuficiencia pulmonar y muerte. Sin embargo, según los conocimientos actuales, alrededor del 80 % de las enfermedades son leves a moderadas.

Aunque los cursos graves de la enfermedad también se producen en pacientes más jóvenes y en personas sin enfermedad previa, los siguientes grupos de personas tienen un mayor riesgo de padecer formas graves de la enfermedad: personas de edad avanzada (con un riesgo cada vez mayor a partir de los 50-60 años de edad), fumadores y personas con determinadas enfermedades del sistema cardiovascular o los pulmones, pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, diabetes mellitus, cáncer o pacientes con un sistema inmunológico debilitado (por ejemplo, debido a deficiencias inmunológicas o por tomar medicamentos que suprimen el sistema inmunológico).

Actualmente, no existe un tratamiento o vacuna específicos contra la infección por SARS-CoV-2.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo grave del coronavirus 2)	COVID-19	El curso de la enfermedad es inespecífico, diverso y muy variable, desde cursos asintomáticos hasta neumonía grave con insuficiencia pulmonar y muerte	Modo de transmisión primario: infección por gotitas; las infecciones de frotis y las infecciones a través de la conjuntiva de los ojos son teóricamente posibles

Detección de infecciones o de agentes patógenos de:

- Prueba de ácidos nucleicos: p.ex. RT-PCR
- Serología: detección de anticuerpos por p.ex.ELISA

2. USO PREVISTO

El enzimoinmunoensayo SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra síndrome respiratorio agudo grave del coronavirus 2 en suero o plasma (citrato, heparina) humano para apoyar el diagnóstico de la enfermedad COVID-19 y es un complemento para la detección directa de patógenos. Además, la serología puede utilizarse para reunir información epidemiológica sobre la prevalencia del SARS-CoV-2.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimático cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).
Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo substrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.
La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos del SARS-CoV-2, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras IgG:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca.
- **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.
Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar Todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de serem utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígenos del SARS-CoV-2; Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita di dióxio de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL de la Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. La Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2...8 °C. Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario debem ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.
No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras IgG, p. e. 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras IgG, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de 3 hasta 5 veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1 °C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h ± 5 min a 37 ± 1°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL de la Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

   Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de Conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20…25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µL de Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA **al cero** utilizando **el Blanco.**

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se pueder ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia desto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la **esquema de la placa**.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco**: valor de la extinción **< 0,100**
- **Control Negativo**: valor de la extinción **< 0,200 y < Cut-off**
- **Control Cut-off**: valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control Positivo**: valor de la extinción **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es váida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos Controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Control Cut-off + 0,44 OD Control Cut-off = 0,86:2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [NTU]

$$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra x 10}}{\text{Cut-off}} = \text{[NovaTec-unidades = NTU]}$$

Ejemplo: $\frac{1{,}591 \times 10}{0{,}43} = 37$ NTU

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como **negativa**.
Negativo	< 9 NTU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnésis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM → sugieren una infección muy reciente o aguda
IgG	Sigue la producción de IgM Característica de la respuesta secundario del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada
IgA	Producida en el revestimiento mucoso en todo el cuerpo (⇒ Barrera Protectora) Usualmente producida tempranamente en el transcurso de la infección

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo gruppo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,815	4,06
#2	24	0,782	4,28
#3	24	0,362	8,71

Inter ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
#1	12	16,43	7,37
#2	12	12,76	4,11
#3	12	7,05	8,65

10.2. Especificad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Las infecciones por SARS-CoV-2 surgieron en diciembre de 2019 en Wuhan, China. Por lo tanto, los valores de prevalencia esperados para los donantes de sangre alemanes y estadounidenses antes de diciembre de 2019 ascienden a un 0 %.

Los resultados positivos determinados corresponden a una especificidad del 99,24 % (95 % Intervalo de confianza: 95,82 % - 99,98 %).

Colectivo de especímenes	Número de muestras (n)	Positivo	Zona intermedia	Negativo	Especifidad (Z.i. excluidas)	95 % IC
Donante de sangre Alemania	83	0	1	82	100 %	
Donante de sangre USA	50	1	0	49	98,00 %	
Total	133	1	1	131	99,24 %	95,82 % - 99,98 %

10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Se analizaron 42 muestras de 25 pacientes que dieron positivo en el ARN del SARS-CoV-2 por RT-PCR.

Días después de la aparición de los síntomas	Número de muestras (n)	Positivo	Zona intermedia	Negativo	Sensibilidad (Z.i. excluidas)
0-5	13	1	0	12	7.69 %
6-8	10	4	0	6	40,00 %
9-11	10	4	0	6	40,00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Interferencias

Se analizaron tres muestras clínicas que presentaban diferentes reactividades para detectar interferencias con cada una de las sustancias enumeradas en el cuadro que figura a continuación: una muestra positiva, una negativa y una equívoca. Todas las muestras mostraron un cambio de señal inferior al 15 % cuando se probaron con cada interferente potencial.

Sustancias que interfieren	Concentration tested
Albúmina	60 mg/mL
La bilirrubina conjugada	0,4 mg/mL
Bilirrubina no conjugada	0,4 mg/mL
Colesterol	4 mg/mL
Hemoglobina	10 mg/mL
Triglicéridos	15 mg/mL

10.5. Reactividad cruzada

Se probaron 131 muestras con actividades de anticuerpos a parámetros de reacción cruzada potencial (incluidos anticuerpos a varios patógenos respiratorios) para evaluar la reactividad cruzada del ensayo.

Las muestras dan positivo en anticuerpos para	Número de muestras (n)	Positive	Equivocal	Negative
Adenovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Cándida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
El virus de la gripe A	9	0	0	9
El virus de la gripe B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Virus sincitial respiratorio	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, excepto el SARS-CoV-2	1	0	0	1
Factor reumatoide positivo	26	0	0	26

No se pueden excluir las reacciones cruzadas con los anticuerpos del contra el virus sincitial respiratorio. La reactividad cruzada con otros coronavirus humanos debe considerarse para la interpretación de los resultados.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales di origen humana o animal deveram ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención

H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: COVG0940 SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 determinaciones)

PORTUGUÊS

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, uma nova doença respiratória surgiu na cidade de Wuhan, província de Hubei da República Popular da China, e logo se espalhou rapidamente no país e no mundo. O agente causador foi identificado como coronavírus 2 (SRA CoV 2), síndrome respiratória aguda grave. O SRA-CoV-2 (2019-nCoV), tal como o vírus corona da SRA (SRA-CoV), pertence ao gênero Betacoronavirus da família dos coronavírus. O reservatório zoonótico do vírus parece ser um morcego.

Os coronavírus são vírus de RNA grandes, de cadeia simples de senso positivos, que infectam seres humanos, mas também uma grande gama de animais. Os coronavírus humanos comuns NL63, 229E, OC43 e HKU1 são comumente disseminados, especialmente durante os meses de inverno. Eles são responsáveis por até um terço de todas as doenças respiratórias agudas, tipicamente com sintomas leves (resfriado comum). Mais de 80% da população adulta tem anticorpos contra os coronavírus humanos. A imunidade a infecções anteriores dura apenas por um curto período de tempo. Portanto, reinfecções com o mesmo patógeno são possíveis logo após um ano.

A SRA-CoV-2 é predominantemente transmitida por infecção por gotículas através da tosse ou espirros e através do contacto próximo com doentes infectados. Em teoria, a infecção por esfregaço e infecção através da conjuntiva dos olhos também é possível.

O período de incubação é em media de 5-6 dias (e pode chegar até 14 dias no máximo).

As manifestações clínicas da doença COVID-19 relacionada à SRA-CoV-2 incluem febre, tosse, problemas respiratórios e fadiga. Na maioria dos pacientes a infecção manifesta-se com sintomas de uma doença febril leve com infiltrações pulmonares irregulares.

O sinal clínico inicial do COVID-19, que permitiu a detecção de casos, foi a pneumonia. Porém, o curso da doença é inespecífico e varia amplamente, de cursos assintomáticos a pneumonia grave com insuficiência pulmonar e morte. Entretanto, com base no conhecimento atual, cerca de 80% das doenças são de leve a moderada.

Embora cursos graves da doença também ocorram em pacientes mais jovens e pessoas sem doença prévia, os seguintes grupos de pessoas têm um risco aumentado de formas graves da doença: idosos (com um risco cada vez maior a partir dos 50-60 anos de idade), fumantes e pessoas com certas doenças do sistema cardiovascular ou dos pulmões, pacientes com doenças hepáticas crônicas, diabetes mellitus, câncer ou pacientes com o sistema imunológico enfraquecido (por exemplo, devido a deficiências imunológicas ou por tomar medicamentos que suprimem o sistema imunológico).

Atualmente, não há tratamento específico ou vacina disponível contra a infecção pelo SRA-CoV-2.

Espécies	Doença	Sintomas (p.ex.)	Via de transmissão
SARS-CoV-2 (Síndrome respiratória aguda grave do coronavirus 2)	COVID-19	O curso da doença é inespecífico, diverso e de diferentes grau de gravidade, desde cursos assintomáticos a pneumonia grave com insuficiência pulmonar e óbito	Modo primário de transmissão: infecção por gotículas; infecções por esfregaço e infecções através da conjuntiva dos olhos são teoricamente possíveis

A presença de agentes patogênicos ou de infecção pode ser identificada através

- Teste de ácido nucleico: p.ex. PCR-RT
- Serologia: detecção de anticorpos por p.ex. ELISA

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA destina-se à determinação qualitativa de anticorpos da classe IgG contra a síndrome respiratória aguda grave do coronavirus 2 no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos para apoiar o diagnóstico da doença COVID-19 e constitui um suplemento para a detecção direta de agentes patogénicos. Além disso, a serologia pode ser utilizada para recolher informações epidemiológicas sobre a prevalência da SRA-CoV-2.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos específicos é baseado na técnica de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).
As Placas de Microtitulação são revestidas com antigénios específicos que se ligam os anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligada, um conjugado de peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado se liga aos anticorpos capturados. Num segundo passo de lavagem o conjugado não ligado é removido. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado por adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reacção azul.
A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reacção. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antigénio do vírus SARS-CoV-2, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **Tampão de Diluição de Amostra IgG:** 1 frasco contendo 100 mL de tampão fosfato (10 mM) para diluição da amostra, pH 7,2 ± 0,2; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solução de Bloqueio:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Tampão de Lavagem (conc. 20x):** 1 frasco contendo 50 mL de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH 7,2 ± 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 20 mL de anticorpo IgG anti-humana marcados com peroxidase no tampão fosfato (10 mM); de cor azul, pronto a usar; tampa preta.
- **Solução Substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle Positivo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Cut-off:** 1 frasco contendo 3 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Negativo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para advertências de perigo e recomendaçaões de prudência ver capitulo 12.1.
Para substâncias potencialmente perigosas verifique a ficha de dados de segurança.

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de uso
- 1 Layout da placa

4.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem da Placa de Microtitulação
- Pipetas para dispensar volumes entre 10 e 1000 µL
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo quando armazenado a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) e misturálos antes de iniciar o teste!

6.1. Placa de Microtitulação

As tiras quebraveis são revestidas com antigénio do vírus SARS-CoV-2. Imediatamente após a remoção das tiras necessarias, as tiras restantes devem ser lacradas de novo na folha de alumínio juntamente com o saquinho de silicio fornecido e armazenadar a 2...8 °C.

6.2. Tampão de Lavagem (conc. 20x)

Diluir o Tampão de Lavagem 1+19; por exemplo: 10 mL do Tampão de Lavagem + 190 mL de água destilada. O Tampão de Lavagem diluído é estavel durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

6.3. Solução Substrato TMB

A solução está pronta para uso e tem de ser armazenada à 2...8 °C, protegida da luz. A solução deve ser incolor ou poderia ter uma ligeira coloração azul claro. Se o substrato se transforma em azul, pode ter sido contaminado e não pode ser usado no teste.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato, heparina) humanos. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2…8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente. Não é recomendada a inactivação por calor das amostras.

7.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 100 com Tampão de Diluição de Amostra IgG. Dispensar 10 µL de amostra e 1 mL de Tampão de Diluição de Amostra IgG em tubos para obter uma diluição 1 + 100 e misturar meticulosamente com um vortex.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de uso **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao as instruções de uso, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três até cinco e o volume do Tampão de Lavagem de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 12. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido no Layout da placa fornecida no kit. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

1. Dispensar 100 µL dos calibradores/controles e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora ± 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300 µL de Tampão de Lavagem. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!

   Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.
5. Dispensar 100 µL de Conjugado em todos os poços, excepto no poço do Branco substrato A1.
6. **Incubar durante 30 min à temperatura ambiente (20...25 °C).** Não expor diretamente à luz solar.
7. Repetir a etapa 4.
8. Dispensar 100 µL de Solução Substrato TMB em todos os poços.
9. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25 °C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
10. Dispensar 100 µL de Solução de Bloqueio em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a Solução Substrato TMB,desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
11. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição da Solução de Bloqueio.

8.1. Medição

Ajustar o fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA **a zero** usando o **Branco substrato.**

Se - devido à razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero usando o Branco substrato, valor da absorvância deste deve ser subtraido de todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra no Layout da placa.

É recomendado fazer a medição **dicromática** usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular **os valores médios de absorvância**.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios:

- **Branco substrato**: Valor de Absorvância **< 0,100**
- **Controle Negativo**: Valor de Absorvância **< 0,200 e < Cut-off**
- **Controle Cut-off**: Valor de Absorvância **0,150 – 1,300**
- **Controle Positivo**: Valor de Absorvância **> Cut-off**

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

9.2. Cálculo dos Resultados

O Cut-off é o valor médio da absorvância das determinações do Controle Cut-off.

Exemplo: Valor da absorvância do Controle Cut-off 0,44 + valor da absorvância do Controle Cut-off 0,42 = 0,86 : 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados em Unidades [NTU]

$$\frac{\text{Valor da absorvância (média) da amostra x 10}}{\text{Cut-off}} = \text{[Unidades NovaTec = NTU]}$$

Exemplo: $\frac{1{,}591 \times 10}{0{,}43} = 37$ NTU

9.3. Interpretação dos Resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico estão presente. Houve um contacto com o antigénio (patógeno resp vacina).
Zona cinzenta	9 – 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico não puderam ser claramente detectados. Recomenda-se a repetir o teste com uma amostra fresca em 2 a 4 semanas. Se o resultado estiver novamente dentro da zona cinzenta, a amostra é julgada como **negativa**.
Negativo	< 9 NTU	A amostra não contém os anticorpos contra o agente patogênico. Um contato prévio com o antígeno (patógeno resp. vacina) é improvável.
O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.		

9.3.1. Isotipos de anticorpos e Estado da Infecção

Sorologia	Significado
IgM	Característica da resposta primária do anticorpo Alto título de IgM: → sugere uma infecção muito recente ou aguda
IgG	Segue a produção de IgM Característica da resposta secundária do anticorpo Podem persistir por vários anos Alto título de IgG com baixo título de IgM: → pode indicar uma infecção passada
IgA	Eles são produzidos a nível das mucosas em todo o corpo (⇒ barreira protectora) Geralmente são producidas no inicio infecção

10. CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

Para mais informações sobre as características de desempenho específicas, por favor, entre em contato NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisão

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
#1	24	0,815	4,06
#2	24	0,782	4,28
#3	24	0,362	8,71

Inter ensaio	n	Média (NTU)	CV (%)
#1	12	16,43	7,37
#2	12	12,76	4,11
#3	12	7,05	8,65

10.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico.
As infecções pelo SARS-CoV-2 surgiram em dezembro de 2019 em Wuhan, China. Os valores esperados de prevalência para doadores de sangue alemães e americanos antes de dezembro de 2019 são, portanto, de 0 %.
Os resultados positivos determinados correspondem a uma especificidade de 99,24 % (95 %-Intervalo de confiança: 95,82 % - 99,98 %).

Coletivo de Amostra	Número de amostras (n)	Positivo	Zona cinzenta	Negativo	Especificidade (Z.c. excluídas)	95 % IC
Doador de sangue Alemanha	83	0	1	82	100 %	
Doador de sangue USA	50	1	0	49	98,00 %	
Total	133	1	1	131	99,24 %	95,82 % - 99,98 %

10.3. Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser positivo na presença do analito específico. Se analizaron 42 muestras de 25 pacientes que dieron positivo en el ARN del SARS-CoV-2 por PCR-RT.

Dias após o início dos sintomas	Número de amostras (n)	Positivo	Zona cinzenta	Negativo	Sensibilidade (Z.c. excluídas)
0-5	13	1	0	12	7.69 %
6-8	10	4	0	6	40,00 %
9-11	10	4	0	6	40,00 %
≥ 12	9	9	0	0	100 %

10.4. Interferências

Três amostras clínicas exibindo diferentes reatividades foram testadas para interferência com cada substância listada na Tabela abaixo: uma amostra positiva, uma negativa e uma equivocada. Todas as amostras exibiram uma mudança de sinal inferior a 15 % quando testadas com cada interferente potencial.

Substância de Interferência	Concentração testada
Albumina	60 mg/mL
Bilirrubina conjugada	0,4 mg/mL
Bilirrubina não conjugada	0,4 mg/mL
Colesterol	4 mg/mL
Hemoglobina	10 mg/mL
Triglicérides	15 mg/mL

10.5. Reacção cruzada

Foram testadas 131 amostras com atividades de anticorpos a parâmetros potencialmente reativos cruzados (incluindo anticorpos a vários patógenos respiratórios) para avaliar a reatividade cruzada do ensaio.

Amostras positivas para anticorpos para	Número de amostras (n)	Positivo	Zona cinzenta	Negativo
Adenovirus	10	0	0	10
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	0	10
Enterovirus	10	0	0	10
Vírus sincítico respiratório	10	1	0	9
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Coronavirus, exceto o SARS-CoV-2	1	0	0	1
Factor reumatóide positivo	26	0	0	26

Reações cruzadas com anticorpos para vírus sincítico respiratório não podem ser excluídas. A reatividade cruzada com outros coronavírus humanos deve ser considerada para a interpretação dos resultados.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- Em cumprimento com o artigo 1 parágrafo 2b da directiva Europeia 98/79/EC o uso de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro destina-se segundo o fabricante a assegurar adequabilidade, desempenhos e segurança do produto. Portanto o procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções para utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e/ou juntar reagentes ou Placa de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
- Nenhuns reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.

- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
  O ELISA foi desenhado apenas para pessoal qualificado e que esteja familiarizado com boas práticas laboratoriais

12.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capitulo 4.1)
Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção

H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar os aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

12.2. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

Prod. No.:	COVG0940	SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG (96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14). bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862

Gralinski, Lisa E.; Menachery, Vineet D. (2020): Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. In *Viruses* 12 (2). DOI: 10.3390/v12020135.

RKI (Ed.): SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19).
Available online at https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. (accessed: 13.04.2020)

Wang, Guan; Jin, Xian (2020): The progress of 2019 novel coronavirus event in China. In *Journal of medical virology* 92 (5), pp. 468–472. DOI: 10.1002/jmv.25705.

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Interim guidance. 13 March 2020.
Available online at https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected, accessed: 13.04.2020.

Xiao, Shu-Yuan; Wu, Yingjie; Liu, Huan (2020): Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. In *Journal of medical virology* 92 (5), pp. 464–467. DOI: 10.1002/jmv.25702.

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In *Nature* 579 (7798), pp. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIÓNES / ABREVIATURAS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulación / Placa de Microtitulação
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
CONTROL -	Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle Négatif / Controllo Negativo / Control Negativo / Controle Negativo
CONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle Positif / Controllo Positivo / Control Positivo / Controle Positivo
CUT OFF	Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Contrôle Cut-off / Controllo Cut-off / Control Cut-off / Controle Cut-off
DIL G	IgG Sample Dilution Buffer / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon IgG / Tampone di Diluizione del Campione IgG / Tampón de dilución de Muestras IgG / Tampão de Diluição de Amostra IgG
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada /Solução de Bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução Substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
Σ n	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE

SCHEME OF THE ASSAY

SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described. Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of Microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit **Incubate for 1 h at 37±1 °C** Wash each well three times with 300 µLof Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

COVG0940_20200416_EH

Symbols / Symbole / Symbôles / Símbolos / Símbolos / Σύμβολα

REF	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.º Cat.: / N.–Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
LOT	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lote N.º: / Lotto n.: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Usar até: / Da utilizzare entro: / Χρησιμοποιείται από:
Σ	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / N.º de Testes: / Quantità dei tests: / Αριθμός εξετάσεων:
CONC	Concentrate / Konzentrat / Concentré / Concentrar / Concentrado / Concentrato / Συμπύκνωμα
LYO	Lyophilized / Lyophilisat / Lyophilisé / Liofilizado / Liofilizado / Liofilizzato / Λυοφιλιασμένο
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device. / In-vitro-Diagnostikum. / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro. / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro. / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro. / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro. / Ιατρική συσκευή για In-Vitro Διάγνωση.
	Evaluation kit. / Nur für Leistungsbewertungszwecke. / Kit pour évaluation. / Juego de Reactivos para Evaluació. / Kit de avaliação. / Kit di evaluazione. / Κιτ Αξιολόγησης.
	Read instructions before use. / Arbeitsanleitung lesen. / Lire la fiche technique avant emploi. / Lea las instrucciones antes de usar. / Ler as instruções antes de usar. / Leggere le istruzioni prima dell'uso. / Διαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση.
	Keep away from heat or direct sun light. / Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. / Garder à l'abri de la chaleur et de toute exposition lumineuse. / Manténgase alejado del calor o la luz solar directa. / Manter longe do calor ou luz solar directa. / Non esporre ai raggi solari. / Να φυλάσσεται μακριά από θερμότητα και άμεση επαφή με το φως του ηλίου.
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazenar a: / Conservare a: / Αποθήκευση στους:
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabbricante: / Παραγωγός:
	Caution! / Vorsicht! / Attention! / ¡Precaución! / Cuidado! / Attenzione! / Προσοχή!
Symbols of the kit components see MATERIALS SUPPLIED. Die Symbole der Komponenten sind im Kapitel KOMPONENTEN DES KITS beschrieben. Voir MATERIEL FOURNI pour les symbôles des composants du kit. Símbolos de los componentes del juego de reactivos, vea MATERIALES SUMINISTRADOS. Para símbolos dos componentes do kit ver MATERIAIS FORNECIDOS. Per i simboli dei componenti del kit si veda COMPONENTI DEL KIT. Για τα σύμβολα των συστατικών του κιτ συμβουλευτείτε το ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.	

COMPLAINTS: Complaints may be submitted initially written or vocal. Subsequently they need to be filed including the test performance and results in writing in case of analytical reasons.

WARRANTY: The product is warranted to be free from material defects within the specific shelf life and to comply with product specifications delivered with the product. The product must be used according to the Intended use, all instructions given in the instructions for use and within the product specific shelf life. Any modification of the test procedure or exchange or mixing of components of different lots could negatively affect the results. These cases invalidate any claim for replacement.

LIMITATION OF LIABILITY: IN ALL CIRCUMSTANCES THE EXTENT OF MANUFACTURER'S LIABILITY IS LIMITED TO THE PURCHASE PRICE OF THE KIT(S) IN QUESTION. IN NO EVENT SHALL MANUFACTURER BE LIABLE FOR ANY INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING DAMAGES FOR LOST PROFITS, LOST SALES, INJURY TO PERSON OR PROPERTY OR ANY OTHER INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL LOSS.

Distributed by: **IBL International GmbH**
Flughafenstrasse 52a
D-22335 Hamburg, Germany
Phone: +49 (0)40-53 28 91-0
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11
IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Always there for you