

Product information

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



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



DECOV1902



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel
Germany

CONTENTS

1.	INTENDED USE	4
2.	PRINCIPLE OF THE ASSAY	4
3.	MATERIALS	4
4.	STABILITY AND STORAGE	5
5.	REAGENT PREPARATION	5
6.	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION	5
7.	ASSAY PROCEDURE	6
8.	RESULTS	6
9.	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10.	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	9
11.	PRECAUTIONS AND WARNINGS	10
1.	VERWENDUNGSZWECK	12
2.	TESTPRINZIP	12
3.	MATERIALIEN	12
4.	STABILITÄT UND LAGERUNG	13
5.	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	13
6.	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	13
7.	TESTDURCHFÜHRUNG	14
8.	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
9.	TESTMERKMALE	15
10.	GRENZEN DES VERFAHRENS	17
11.	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	17
1.	INDICATION D'UTILISATION	19
2.	PRINCIPE DU TEST	19
3.	MATERIEL	19
4.	STABILITE ET CONSERVATION	20
5.	PREPARATION DES REACTIFS	20
6.	PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	20
7.	PROCEDE DE TEST	21
8.	RESULTATS	22
9.	PERFORMANCES DU TEST	23
10.	LIMITES DE LA TECHNIQUE	24
11.	PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS	25
1.	USO PREVISTO	27
2.	PRINCIPIO DEL TEST	27
3.	MATERIALI	27
4.	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE	28
5.	PREPARAZIONE DEI REAGENTI	28
6.	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	28
7.	PROCEDIMENTO	29
8.	RISULTATI	30
9.	CARATTERISTICHE DEL TEST	31
10.	LIMITAZIONI	32
11.	PRECAUZIONI E AVVERTENZA	33
1.	USO PREVISTO	34
2.	PRINCIPIO DEL ENSAYO	34
3.	MATERIALES	34
4.	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE	35
5.	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	35
6.	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	35
7.	PROCEDIMIENTO	36
8.	CALCULO DE LOS RESULTADOS	37
9.	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	38
10.	LIMITACIONES DEL ENSAYO	39
11.	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	40

1.	UTILIZAÇÃO PRETENDIDA	42
2.	PRINCÍPIO DO ENSAIO	42
3.	MATERIAIS	42
4.	ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO	43
5.	PREPARAÇÃO DOS REAGENTES	43
6.	COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	43
7.	PROCEDIMENTO DO ENSAIO	44
8.	RESULTADOS	45
9.	CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS	46
10.	LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	47
11.	PRECAUÇÕES E AVISOS	48

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS	50
--	----

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE	51
--	----

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	52
--	----

1. INTENDED USE

The COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA ELISA is intended for the qualitative determination of IgA 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.

2. 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.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- SORB** **MT** **Microtiterplate**: 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with SARS-CoV-2 nucleocapsid antigens; in resealable aluminium foil.
- SAM** **DIL** **IgA 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** **SOLN** **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- WASH** **SOLN** **20x** **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; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- ENZ** **CONJ** **Conjugate**: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgA in phosphate buffer (10 mM); coloured violet; ready to use; black cap.
- SUB** **TMB** **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- CAL** **C** **Positive Control**: 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- CAL** **B** **Cut-off Control**: 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- CAL** **A** **Negative Control**: 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

As the First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human), NIBSC code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, does not yet provide an established cut-off for a qualitative result in a nucleocapsid based assay Controls are currently adjusted using internal predefined quality control specimens.

For hazard and precautionary statements see 11.1

3.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. 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

4. 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.

5. 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!

5.1. 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.

5.2. WASH SOLN 20x

Dilute WASH SOLN 20x 1 + 19; e. g. 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL distilled water. The diluted buffer (WASH SOLN 1x) 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.

5.3. SUB TMB

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

6. 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.

6.1. Sample Dilution

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

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions 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 **WASH SOLN 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. 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 \pm 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 **WASH SOLN 1x**. 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 **SUB TMB** 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 SOLN** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB TMB**, 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 SOLN**.

7.1. 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. Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended. Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and 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.

8.2. 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

8.2.1. Results in Units [U]

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

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ U}$

8.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 U	-
Positive	> 11 U	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 U	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.
Negative	< 9 U	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.

8.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
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

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	1.065	5.19
#2	24	0.675	6.14
#3	24	0.246	10.56
Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	20.51	5.26
#2	12	16.25	4.80
#3	12	5.61	8.28

9.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. SARS-CoV-2 infections emerged in December 2019 in Wuhan, China. The expected prevalence values for German and US blood donors from before December 2019 therefore amount to 0 %. In addition, 29 samples from pregnant women (Germany) collected before the pandemic outbreak were tested.

The determined positive results correspond to a specificity of 98.76 % (95 %-confidence interval: 95.58 % - 99.85 %).

Sample Panel	Number of samples (n)	Positive	Equiv-ocal	Negative	Specificity (Eqv excluded)	95 % CI
Blood donors Germany	83	0	0	66	100 %	
Blood donors US	50	2	1	47	95.92 %	
Pregnant women Germany	29	0	0	29	100 %	
Total	162	2	1	159	98.76 %	95.58 % - 99.85 %

9.3. Diagnostic Sensitivity

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

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	1	5	44.44 %
9-11	10	4	1	5	44.44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Only with increasing duration of infection the antibody production starts to rise to a detectable level. Individually, this can vary from a few days up to 2 weeks. At the beginning of an infection a negative test result is therefore not a criterion for exclusion of an acute SARS-CoV-2 infection.

9.4. 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

9.5. Cross Reactivity

138 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
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, other than SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adenovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Respiratory syncytial virus	10	0	0	10
Rheumatoid Factor	22	0	0	22

Cross reactions with antibodies to adenovirus and influenzavirus cannot be excluded. Cross reactivity with other human coronaviruses should be considered for result interpretation.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 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 Microtiterplates 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 following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control, each laboratory should use additional known samples that comply with applicable national standards/laws.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
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 clothing and wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. 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.

1. VERWENDUNGSZWECK

Der COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgA-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.

2. 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 Waschschriff 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.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

1. **SORB** **MIT** **Mikrotiterplatte**: 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit SARS-CoV-2 Nukleokapsid Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
2. **SAM** **DIL** **IgA-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).
3. **STOP** **SOLN** **Stopplösung**: 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
4. **WASH** **SOLN** **20x** **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; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
5. **ENZ** **CONJ** **Konjugat**: 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgA in Phosphatpuffer (10 mM); violett gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
6. **SUB** **TMB** **TMB-Substratlösung**: 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
7. **CAL** **C** **Positivkontrolle**: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig. ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
8. **CAL** **B** **Cut-off Kontrolle**: 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig. ≤ 0,02 % (v/v) MIT.
9. **CAL** **A** **Negativkontrolle**: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Da der First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2-Immunglobulin (human), NIBSC-Code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, noch keinen festgelegten Cut-off für ein qualitatives Ergebnis in einem Nukleokapsid-basierten Test vorsieht, werden die Kontrollen derzeit anhand von internen vordefinierten Qualitätskontrollproben angepasst. Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

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

4. 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.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

5.1. 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.

5.2. WASH SOLN 20x

WASH SOLN 20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer (WASH SOLN 1x) 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.

5.3. SUB TMB

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

6. 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.

6.1. Probenverdünnung

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

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung 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 **WASH SOLN 1x**-Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn 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 **WASH SOLN 1x** 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 **SUB TMB** 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 **STOP SOLN** in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe von **SUB TMB** 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 von **STOP SOLN** messen.

7.1. 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 notieren. Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen. Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------|
| • 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.

8.2. Messwertberechnung

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

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0,86 : 2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

8.2.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Einheiten} = \text{U}]$

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

8.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 U	-
Positiv	> 11 U	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 U	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.
Negativ	< 9 U	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.

8.3.1. Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
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

9. TESTMERKMALE

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

9.1. Präzision

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (E)</u>	<u>Vk (%)</u>
#1	24	1,065	5,19
#2	24	0,675	6,14
#3	24	0,246	10,56
<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (NTU)</u>	<u>Vk (%)</u>
#1	12	20,51	5,26
#2	12	16,25	4,80
#3	12	5,61	8,28

9.2. 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 aus der Zeit vor Dezember 2019 betragen daher 0 %. Zusätzlich wurden 29 Proben von schwangeren Frauen (Deutschland) untersucht, die vor dem Ausbruch der Pandemie gesammelt worden waren. Die ermittelten positiven Ergebnisse entsprechen einer Spezifität von 98,76 % (95 %-Konfidenzintervall: 95,58 % - 99,85 %).

Probenkollektiv	Anzahl Proben (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ	Spezifität (Gw. ausgeschlossen)	95 % KI
Blutspender Deutschland	83	0	0	66	100 %	
Blutspender USA	50	2	1	47	95,92 %	
Schwangere Deutschland	29	0	0	29	100 %	
Total	162	2	1	159	98,76 %	95,58 % - 99,85 %

9.3. 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	1	5	44,44 %
9-11	10	4	1	5	44,44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Erst mit zunehmender Infektionsdauer beginnt die Antikörperproduktion auf ein nachweisbares Niveau anzusteigen. Individuell kann das von wenigen Tagen bis hin zu 2 Wochen variieren. Zu Beginn einer Infektion ist ein negatives Testergebnis daher kein Ausschlusskriterium für eine akute SARS-CoV-2 Infektion.

9.4. 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

9.5. Kreuzreaktivität

138 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
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, nicht SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adenovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Respiratorisches Synzytial-Virus	10	0	0	10
Rheumafaktor	22	0	0	22

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Adenovirus und Influenzavirus können nicht ausgeschlossen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte eine Kreuzreaktivität mit anderen humanen Coronaviren in Betracht gezogen werden.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind 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 qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden, die den geltenden nationalen Normen/Gesetzen entsprechen.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1).
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

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

1. INDICATION D'UTILISATION

La trousse COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgA 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.

2. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur 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.

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

1. **SORB MT Plaque de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène nucléocapside du SARS-CoV-2; en sachets d'aluminium refermables.
2. **SAM DIL Tampon de Dilution d'Échantillon IgA:** 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).
3. **STOP SOLN Solution d'Arrêt:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
4. **WASH SOLN 20x 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 ; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
5. **ENZ CONJ Conjugué:** 1 flacon contenant 20 mL d'anticorps IgA anti-humaines conjuguées à peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur violette, bouchon noir.
6. **SUB TMB Solution de Substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
7. **CAL C Contrôle Positif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
8. **CAL B Contrôle Cut-off:** 1 flacon contenant 3 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
9. **CAL A Contrôle Négatif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Comme la First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2-Immunglobulin (human), NIBSC-Code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, ne fournit pas encore de seuil établi pour un résultat qualitatif dans un test basé sur la nucléocapside les contrôles sont actuellement ajustés en utilisant des échantillons de contrôle de qualité internes pré-définis. Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 11.1

3.2. Matériel fourni

- 1 Couvercle autocollante
- 1 Notice d'utilisation

3.3. 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

4. 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.

5. 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!

5.1. 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 scellées le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

5.2. WASH SOLN 20x

Diluer WASH SOLN 20x 1+19; par exemple 10mL WASH SOLN 20x + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon diluée (WASH SOLN 1x) est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

5.3. SUB TMB

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

6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrates, 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.

6.1. Dilution de l'échantillon

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

7. PROCÉDE DE TEST

Lire attentivement les notice 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 **WASH SOLN 1x** de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 11. 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. 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 **WASH SOLN 1x**. 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 **SUB 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 **STOP SOLN** dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la **SUB 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 **STOP SOLN**.

7.1. 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.

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**.

8. RESULTATS

8.1. Critères de Validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ce notice d'utilisation doivent être strictement suivies, et 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.

8.2. Calcul des Résultats

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

Exemple: $0,44 \text{ DO Contrôle Cut-off} + 0,42 \text{ DO Contrôle Cut-off} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

8.2.1. Résultats en Unités [U]

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

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

8.3. Interprétation des Résultats

Cut-off	10 U	-
Positif	> 11 U	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il y a eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 U	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.
Négatif	< 9 U	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.		

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

Sérologie	Signification
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

9. PERFORMANCES DU TEST

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

9.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	1,065	5,19
#2	24	0,675	6,14
#3	24	0,246	10,56
Inter-essai	n	moyenne (NTU)	CV (%)
#1	12	20,51	5,26
#2	12	16,25	4,80
#3	12	5,61	8,28

9.2. 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 %. En outre, 29 échantillons de femmes enceintes (Allemagne) prélevés avant l'apparition de la pandémie ont été testés. Les résultats positifs déterminés correspondent à une spécificité de 98,76 % (95 % Intervalle de confiance: 95,58 % - 99,85 %).

Échantillon collectif	Nombre d'échantillons (n)	Positif	Zone grise	Négatif	Spécificité (Z.g. exclus)	95 % IC
Donneurs de sang Allemagne	83	0	0	66	100 %	95,58 % - 99,85 %
Donneurs de sang USA	50	2	1	47	95,92 %	
Femmes enceintes Allemagne	29	0	0	29	100 %	
Total	162	2	1	159	98,76 %	

9.3. 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	Négatif	Sensibilité (Z.g. exclus)
0-5	13	1	0	12	7,69 %
6-8	10	4	1	5	44,44 %
9-11	10	4	1	5	44,44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Ce n'est qu'avec l'augmentation de la durée de l'infection que la production d'anticorps commence à atteindre un niveau détectable. Individuellement, cela peut varier de quelques jours à deux semaines. Au début d'une infection, un résultat de test négatif n'est donc pas un critère d'exclusion d'une infection aiguë par le CoV-2 du SARS.

9.4. 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 interférent 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

9.5. Réaction croisée

138 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.

Échantillons positifs pour (anticorps contre)	Nombre d'échantillons (n)	Positif	Zone grise	Négatif
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, autre que SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adénovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Virus respiratoire syncytial	10	0	0	10
Facteur Rhumatoïde	22	0	0	22

Des réactions croisées avec des anticorps à l'adénovirus et au virus de l'influenza ne peuvent être exclues. Une réactivité croisée avec d'autres coronavirus humains doit être envisagée pour l'interprétation des résultats.

10. LIMITES DE LA TECHNIQUE


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

11. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS


- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse 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 Plaques 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.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit utiliser des échantillons supplémentaires connus qui sont conformes aux normes/lois nationales applicables.

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

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention 	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.

Les réactifs peuvent contenir du 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention 	H315	Provoque une irritation cutanée.
	H319	Provoque une sévère irritation des yeux
	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.
	P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
	P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin.

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

11.2. Elimination des déchets

Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux. Contactez les autorités locales ou les entreprises de gestion des déchets qui vous donneront des conseils sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

1. USO PREVISTO

Il COVID-19 (SARS-CoV-2) 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.

2. 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.

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

- SORB** **MT** **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigeni nucleocapside del SARS-CoV-2; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- SAM** **DIL** **Tampone di Diluizione del Campione IgA:** 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).
- STOP** **SOLN** **Soluzione Bloccante:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- WASH** **SOLN** **20x** **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; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- ENZ** **CONJ** **Coniugato:** 1 flacone contenente 20 mL di anticorpi IgA antiumani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore violetto; pronto all'uso; tappo nero.
- SUB** **TMB** **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- CAL** **C** **Controllo Positivo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- CAL** **B** **Controllo Cut-off:** 1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- CAL** **A** **Controllo Negativo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Poiché il First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2-Immunglobulin (human), NIBSC-Code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, non fornisce ancora un cut-off stabilito per un risultato qualitativo in un test basato sul nucleocapside i Controlli sono attualmente regolati utilizzando campioni interni di controllo di qualità predefiniti.

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

3.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

3.3. 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

4. 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.

5. 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.

5.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite antigene 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.

5.2. WASH SOLN 20x

Diluire WASH SOLN 20x 1+19; per esempio: 10mL WASH SOLN 20x + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone diluito (WASH SOLN 1x) è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

5.3. SUB TMB

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

6. 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.

6.1. Diluizione dei campioni

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

7. 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 da 3 a 5 volte e il volume del **WASH SOLN 1x** da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). 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 \pm 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL **WASH SOLN 1x**. 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 **SUB 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 **STOP SOLN** in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della **SUB 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 **STOP SOLN**.

7.1. 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 dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili! **Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione. 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**.

8. RISULTATI

8.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti 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.

8.2. 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

8.2.1. Risultati in Unità [U]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità} = \text{U}]$

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

8.3. Interpretazione dei Risultati

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zona grigia	9 – 11 U	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane.
Negativo	< 9 U	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.

8.3.1. Isotipi degli Anticorpi e Stato dell'Infezione

Sierologia	Significato
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

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

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

9.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	1,065	5,19
#2	24	0,675	6,14
#3	24	0,246	10,56
Interdosaggio	n	Media (NTU)	CV (%)
#1	12	20,51	5,26
#2	12	16,25	4,80
#3	12	5,61	8,28

9.2. 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 %. Inoltre, sono stati analizzati 29 campioni di donne incinte (Germania) raccolti prima dello scoppio della pandemia.

I risultati positivi determinati corrispondono a una specificità del 98,76 % (95% Intervallo di confidenza: 95,58 % - 99,85 %).

Collettivo Campione	Numero di campioni (n)	Positivo	Zona grigia	Negativo	Specificità (Z.g. esclusi)	95 % IC
Donatore di sangue Germania	83	0	0	66	100 %	95,58 % - 99,85 %
Donatore di sangue USA	50	2	1	47	95,92 %	
Donne incinte Germania	29	0	0	29	100 %	
Totale	162	2	1	159	98,76 %	

9.3. 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	1	5	44,44 %
9-11	10	4	1	5	44,44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Solo con l'aumentare della durata dell'infezione la produzione di anticorpi inizia a salire ad un livello rilevabile. Individualmente, questo può variare da pochi giorni fino a 2 settimane. All'inizio di un'infezione il risultato negativo del test non è quindi un criterio per escludere un'infezione acuta da SARS-CoV-2.

9.4. 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

9.5. Reattività Crociata

Sono stati testati 138 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 per (anti-corpi contro)	Numero di campioni (n)	Positivo	Zona grigia	Negativo
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, diverso da SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adenovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Virus sinciziale respiratorio	10	0	0	10
Fattore Reumatoide	22	0	0	22

Non si possono escludere reazioni incrociate con anticorpi contro adenovirus e influenzavirus. La reattività crociata con altri coronavirus umani deve essere presa in considerazione per l'interpretazione dei risultati.

10. LIMITAZIONI


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

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZA


- 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.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno, ogni laboratorio dovrebbe utilizzare ulteriori campioni noti che siano conformi alle norme/leggi nazionali applicabili.

11.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1).
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.

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

	Attenzione H315	Provoca irritazione cutanea.
	H319	Provoca grave irritazione oculare
	P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
	P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
	P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
	P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

11.2. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

1. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgA 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.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática 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 visualiza añadiendo sustrato 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.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

1. **SORB MT Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de la nucleocápside del SARS-CoV-2, en bolsa de aluminio.
2. **SAM DIL Tampón de Dilución de Muestras IgA:** 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).
3. **STOP SOLN Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
4. **WASH SOLN 20x 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; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
5. **ENZ CONJ Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgA anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
6. **SUB TMB Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
7. **CAL C Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
8. **CAL B Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
9. **CAL A Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Como la First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2-Immunglobulin (human), NIBSC-Code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, todavía no proporciona un punto de corte establecido para un resultado cualitativo en un ensayo basado en la nucleocápside los controles se ajustan actualmente utilizando muestras internas predefinidas de Control de calidad.

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3. 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

4. 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.

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. 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 dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

5.2. WASH SOLN 20x

Diluir WASH SOLN 20x 1+19; por ejemplo 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL de agua destilada. El Tampó diluido (WASH SOLN 1x) es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2...8 °C. En caso aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3. SUB TMB

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

6. 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 entre 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas 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.

6.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con SAM DIL, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL SAM DIL, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. 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 lavados de 3 hasta 5 veces y el volumen de **WASH SOLN 1x** de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavados. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos 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 \pm 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 **WASH SOLN 1x**. 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 antes del siguiente paso.
Nota: ¡El lavado es muy importante! ¡Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de Conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato 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 número 4.
8. Pipetear 100 µL de **SUB 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 **STOP SOLN** en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el **SUB 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 **STOP SOLN**.

7.1. 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 puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este 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.

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.

8. CALCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de Validez del Ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse 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 válida y deberá repetirse.

8.2. Cálculo del Valor de la Medición

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

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86:2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados en Unidades [U]

$$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades} = \text{U}]$$

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

8.3. Interpretación de los Resultados

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

8.3.1. Isotipos de Anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgG	Sigue la producción de IgM Característica de la respuesta secundaria 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

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

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

9.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	1,065	5,19
#2	24	0,675	6,14
#3	24	0,246	10,56
Inter ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
#1	12	20,51	5,26
#2	12	16,25	4,80
#3	12	5,61	8,28

9.2. Especificidad 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 %. Además, se analizaron 29 muestras de mujeres embarazadas (Alemania) recogidas antes del brote pandémico. Los resultados positivos determinados corresponden a una especificidad del 98,76 % (95 % Intervalo de confianza: 95,58 % - 99,85 %).

Colectivo de especímenes	Número de muestras (n)	Positivo	Zona intermedia	Negativo	Especificidad (Z.i. excluidas)	95 % IC
Donante de sangre Alemania	83	0	0	66	100 %	
Donante de sangre USA	50	2	1	47	95,92 %	
Mujeres embarazadas Alemania	29	0	0	29	100 %	
Total	162	2	1	159	98,76 %	95,58 % - 99,85 %

9.3. 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	1	5	44,44 %
9-11	10	4	1	5	44,44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Sólo cuando la duración de la infección aumenta, la producción de anticuerpos comienza a aumentar hasta un nivel detectable. Individualmente, esto puede variar desde unos pocos días hasta 2 semanas. Por consiguiente, al principio de una infección, un resultado negativo en una prueba no es un criterio de exclusión de una infección aguda de SARS-CoV-2.

9.4. 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

9.5. Reactividad Cruzada

Se probaron 138 muestras con actividades de anticuerpos a parámetros de reacción cruzada potencial (incluidos anticuerpos a varios patógenos respiratorios) para evaluar la reactividad cruzada del ensayo.

Muestras positivas para (anticuerpos contra)	Número de muestras (n)	Positivo	Zona intermedia	Negativo
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, excepto el SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adenovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Cándida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
El virus de la gripe A	9	0	0	9
El virus de la gripe B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Virus sincitial respiratorio	10	0	0	10
Factor Reumatoide	22	0	0	22

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

10. 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.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- 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 diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán 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 sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio debe utilizar muestras adicionales conocidas que cumplan con las normas/leyes nacionales aplicables.

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

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención

H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	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.

Los reactivos pueden contener 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención

H315	Provoca irritación cutánea.
H319	Provoca irritación ocular grave.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P337+P313	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

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

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA ELISA destina-se à determinação qualitativa de anticorpos da classe IgA contra a síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 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.

2. 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 antígenos 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.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

1. **SORB MT Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antígeno nucleocapsidos do vírus SARS-CoV-2, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
2. **SAM DIL Tampão de Diluição de Amostra IgA:** 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).
3. **STOP SOLN Solução de Bloqueio:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
4. **WASH SOLN 20x 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; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
5. **ENZ CONJ Conjugado:** 1 frasco contendo 20 mL de anticorpo IgA anti-humana marcados com peroxidase no tampão fosfato (10 mM); de cor violeta, pronto a usar; tampa preta.
6. **SUB TMB Solução Substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
7. **CAL C Controle Positivo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
8. **CAL B Controle Cut-off:** 1 frasco contendo 3 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
9. **CAL A Controle Negativo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Como a First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2-Immunglobulin (human), NIBSC-Code: 20/136, of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, ainda não fornece um Cut-off estabelecido para um resultado qualitativo em um ensaio baseado em nucleocapsidos Os Controles são ajustados atualmente usando amostras internas de controle de qualidade pré-definidos.

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 11.1.

3.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de utilização

3.3. 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

4. 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.

5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

5.1. Placa de Microtitulação

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

5.2. WASH SOLN 20x

Diluir WASH SOLN 20x 1+19; por exemplo: 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL de água destilada. O Tampão diluído (WASH SOLN 1x) é estável 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.

5.3. SUB TMB

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

6. 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 inativação por calor das amostras.

6.1. Diluição das amostras

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

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de utilização **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao as instruções de utilização, 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 **WASH SOLN 1x** de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 11. 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. 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 \pm 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 **WASH SOLN 1x**. 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 **SUB 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 **STOP SOLN** em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a **SUB 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 **STOP SOLN**.

7.1. Medição

Ajustar o fotómetro 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 subtraído 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.

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**.

8. RESULTADOS

8.1. Critérios de Validação do Ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **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.

8.2. 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

8.2.1. Resultados em Unidades [U]

Valor da absorvância (média) da amostra x 10 = [Unidades = U]
Cut-off

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

8.3. Interpretação dos Resultados

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Os anticorpos contra o agente patogênico estão presente. Houve um contacto com o antigénio (patógeno resp vacina).
Zona cinzenta	9 – 11 U	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.
Negativo	< 9 U	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.

8.3.1. Isotipos de anticorpos e Estado da Infecção

Sorologia	Significado
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 produzidas no início infecção

9. CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

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

9.1. Precisão

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
#1	24	1,065	5,19
#2	24	0,675	6,14
#3	24	0,246	10,56
Inter ensaio	n	Média (NTU)	CV (%)
#1	12	20,51	5,26
#2	12	16,25	4,80
#3	12	5,61	8,28

9.2. 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 %. Além disso, 29 amostras de mulheres grávidas (Alemanha) coletadas antes do surto pandêmico foram testadas. Os resultados positivos determinados correspondem a uma especificidade de 98,76 % (95 %-Intervalo de confiança: 95,58 % - 99,85 %).

Coletivo de Amostra	Número de amostras (n)	Positivo	Zona cinzenta	Negativo	Especificidade (Z.c. excluídas)	95 % IC
Doador de sangue Alemanha	83	0	0	66	100 %	95,58 % - 99,85 %
Doador de sangue USA	50	2	1	47	95,92 %	
Mulheres grávidas Alemanha	29	0	0	29	100 %	
Total	162	2	1	159	98,76 %	

9.3. 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	1	5	44,44 %
9-11	10	4	1	5	44,44 %
≥ 12	9	8	1	0	100 %

Somente com o aumento da duração da infecção é que a produção de anticorpos começa a subir a um nível detectável. Individualmente, isto pode variar de alguns dias até 2 semanas. No início de uma infecção um resultado negativo do teste não é, portanto, um critério de exclusão de uma infecção aguda pelo SARS-CoV-2.

9.4. 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

9.5. Reacção Cruzada

Foram testadas 138 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 contra)	Número de amostras (n)	Positivo	Zona cinzenta	Negativo
Coronavirus HCoV-229E	6	0	0	6
Coronavirus HCoV-NL63	5	0	0	5
Coronavirus, exceto o SARS-CoV-2	1	0	0	1
Adenovirus	10	0	1	9
Bordetella pertussis	9	0	0	9
Candida albicans	8	0	0	8
Chlamydia pneumoniae	9	0	0	9
Enterovirus	10	0	0	10
Haemophilus influenzae	3	0	0	3
Influenzavirus A	9	0	0	9
Influenzavirus B	10	0	1	9
Legionella pneumophila	8	0	0	8
Mycoplasma pneumoniae	9	0	0	9
Parainfluenzavirus	9	0	0	9
Vírus sincítico respiratório	10	0	0	10
Fator Reumatóide	22	0	0	22

Reações cruzadas com anticorpos para adenovírus e influenzavírus não podem ser excluídas. A reatividade cruzada com outros coronavírus humanos deve ser considerada para a interpretação dos resultados.

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções de 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 é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo os padrões de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para um controle de qualidade interno adicional, cada laboratório deve utilizar amostras adicionais conhecidas que cumpram as normas/leis nacionais aplicáveis.

11.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 3.1)

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.

Os reagentes podem conter 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (ver capítulo 3.1)

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

**Atenção**

H315	Provoca irritação cutânea.
H319	Provoca irritação ocular grave.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P337+P313	Caso a irritação ocular persista: Consulte um médico.

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

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

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

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
COVID-19 (SARS-CoV-2) IgA














Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
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 µL of WASH SOLN 1x					
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 WASH SOLN 1x					
SUB TMB	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 SOLN	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

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