

EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgM ELISA Kit

Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) pour la détection qualitative des IgM COVID-19 dans le sérum.



KT-1033



INTÉRÊT DU TEST

Ce kit est destiné à un diagnostic in-vitro seulement. Il permet de détecter les anticorps IgM humains anti-COVID-19 dans le sérum humain. C'est une aide pour la détection ou pour établir le diagnostic du COVID-19. Les patients qui sont suspectés dans les concentrations de cas nécessitent un diagnostic ou un diagnostic différentiel de l'infection par le nouveau coronavirus. Ce test a été validé manuellement, mais il peut être adapté à un automate. Il est seulement destiné à une détection qualitative.

UTILISATEURS

Ce kit est destiné à des professionnels de laboratoire ou de la santé.

RÉSUMÉ DE LA PHYSIOLOGIE

Ce nouveau coronavirus 2019 (COVID-19) est un coronavirus à simple brin d'ARN². Des comparaisons des séquences génétiques de ce virus ont montré des similarités avec le SRAS-CoV et les coronavirus de chauve-souris⁷. Chez l'homme, les coronavirus provoquent des infections respiratoires³. Les coronavirus sont composés de plusieurs protéines y compris la spike (S), l'enveloppe (E), la membrane (M), et la nucléocapside (N)⁴. Des résultats suggèrent que la protéine spike conserve suffisamment d'affinité avec le récepteur de l'enzyme de conversion 2 de l'Angiotensine (ECA2) pour l'utiliser comme mécanisme de pénétration cellulaire⁶. On estime que la transmission d'homme à homme des coronavirus se produit lors de contacts rapprochés par l'intermédiaire de gouttelettes générées par les éternuements et la toux¹. Les IgM sont les premières immunoglobulines générées en réponse à un antigène et elles seront surtout détectées au début de la maladie⁵.

PRINCIPE DU TEST

Ce kit ELISA a été conçu, développé et produit afin de mesurer qualitativement l'anticorps IgM COVID-19 dans des échantillons de sérum. Ce test utilise une méthode de « capture d'IgM » sur microplaque basée sur un dosage immunoenzymatique.

On pipette les contrôles du test et les échantillons dans les puits d'une microplaque coatée avec un anticorps spécifique anti-IgM humain. Après une première période d'incubation, la matrice protéique non liée est éliminée grâce à une étape de lavage. On ajoute dans chaque puits un antigène recombinant COVID-19 marqué par de la peroxydase de raifort (HRP). Après une période d'incubation, on observe la formation d'un immunocomplexe " Anticorps anti-IgM – Anticorps IgM humain COVID-19 – Antigène COVID-19 marqué par HRP" si un anticorps IgM du nouveau coronavirus est présent dans le matériel testé. L'antigène marqué non lié est éliminé grâce à une étape de lavage. L'antigène COVID-19 marqué par HRP fixé dans les puits est alors incubé en présence d'une solution de substrat pendant un certain temps, puis mesuré dans un spectrophotomètre lecteur de microplaques. L'activité enzymatique de l'antigène marqué lié à l'IgM du coronavirus fixé sur la paroi des puits est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM de coronavirus présent dans le matériel testé.

PRÉPARATION ET STOCKAGE DES RÉACTIFS

Conserver ce kit entre 2 – 8°C à réception. Se référer à l'étiquette de la trousse pour connaître sa date de péremption. Tous les composants sont stables jusqu'à cette date.

1. COVID-19 IgM Microplate (31223)

Microplaque coatée par un anticorps anti-IgM humain spécifique.

Quantité : 1 Microplaque de 96 puits

Stockage : 2 – 8°C

Préparation : Prête à l'emploi

KT-1033/IVD/ V6/2020-03

2. COVID-19 IgM Sample Diluent (31224)

Tampon de dilution, prêt à l'emploi.

Volume: 1 x 15 ml

Stockage: 2 – 8°C

Préparation: Prêt à l'emploi.

3. HRP Labeled COVID-19 Antigen (31226)

Antigène COVID-19 marqué par HRP, dans une matrice protéique stabilisée.

Volume: 1 x 11 ml

Stockage: 2 – 8°C

Préparation: Prêt à l'emploi

4. ELISA Wash Concentrate (10010)

Surfactant dans une solution de tampon phosphate salin contenant un conservateur non-azide.

Volume : 1 x 30 ml

Stockage: 2 – 25°C

Préparation: Concentré 30X. Le contenu doit être dilué avant usage à l'aide de 870 ml d'eau distillée et bien mélangé avant utilisation.

5. ELISA HRP Substrate (10020)

Tétraméthylbenzidine (TMB) avec du peroxyde d'hydrogène stabilisé.

Volume: 1 x 15 ml

Stockage: 2 – 8°C

Préparation: Prêt à l'emploi.

6. ELISA Stop Solution (10030)

Acide sulfurique 0.5 M

Volume: 1 x 15 ml

Stockage: 2 – 25°C

Préparation: Prêt à l'emploi.

7. COVID-19 IgM Negative Control (31228)

Contrôle Négatif composé d'une matrice de sérum albumine bovine et d'un conservateur non-azide. Les contrôles ne contiennent pas de sérum de patients atteints du nouveau type d'infection par le coronavirus.

Volume: 1 x 1 ml

Stockage: 2 – 8°C.

Préparation: Prêt à l'emploi.

8. COVID-19 IgM Positive Control (31229)

Contrôle Positif composé d'une matrice de sérum albumine bovine et d'un conservateur non-azide. Les contrôles ne contiennent pas de sérum de patients atteints du nouveau type d'infection par le coronavirus.

Volume: 1 x 0.5 ml

Stockage: 2 – 8°C.

Préparation: Prêt à l'emploi.

ATTENTION

Les réactifs sont destinés à un usage de diagnostic in-vitro seulement. Le sérum albumine bovine contenu dans certains réactifs provient des Etats Unis. Elle a été obtenue seulement à partir d'animaux sains (sous contrôle vétérinaire), qui n'étaient pas atteints de maladies contagieuses. Porter des gants en faisant ce test et manipuler les réactifs comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Eviter tout contact avec les réactifs contenant du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide sulfurique. Eviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. Ne pas ingérer ou inhaler des vapeurs. En cas de contact, laver abondamment à l'eau pendant au moins 15 minutes. Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Pipettes de précision à monocal permettant de pipeter 20 µl, 25 µl, 100 µl et 1000 µl etc
2. Pipette automatique permettant de pipeter 100 µl.
3. Embouts de pipette à usage unique permettant de pipeter les volumes mentionnés ci-dessus.
4. Tubes de verre à usage unique 12 x 75 ou 13 x 100 mm.
5. Bouteilles en plastique à usage unique de 1000 ml avec bouchons.
6. Papier d'aluminium.
7. Eau désionisée ou distillée.
8. Couvercle de plaque en plastique ou film de polyéthylène.
9. Bouteille de lavage ELISA à multicanaux ou système de lavage automatique (semi-automatique).
10. Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire une absorption à 450 nm.
11. Incubateur (37°C).

RECUEIL ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Pour mesurer les échantillons de sérum humain en duplicate on a besoin seulement de 20 µl. Les échantillons doivent être dosés le jour-même. Ne pas utiliser d'échantillon hémolysé.

MODE D'EMPLOI DU TEST

1. Préparation des réactifs

1. Avant utilisation, amener tous les réactifs à température ambiante. Ne pas combiner ou échanger des réactifs ayant des numéros de lots différents.
2. Avant utilisation, on diluera le ELISA Wash Concentrate (10010) pour obtenir la solution de travail. Veuillez-vous reporter à la section RÉACTIFS pour les détails.

2. Test

1. Placer un nombre suffisant de barrettes de puits (31223) dans un support, afin de tester les contrôles (31228, 31229) et les échantillons en double.
2. Configuration du test

Ligne	Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3
A	Contrôle négatif	Echantillon 3	Echantillon 7
B	Contrôle négatif	Echantillon 3	Echantillon 7
C	Contrôle négatif	Echantillon 4	Echantillon 8
D	Contrôle Positif	Echantillon 4	Echantillon 8
E	Echantillon 1	Echantillon 5	Echantillon 9
F	Echantillon 1	Echantillon 5	Echantillon 9
G	Echantillon 2	Echantillon 6	Echantillon 10
H	Echantillon 2	Echantillon 6	Echantillon 10

3. Ajouter **100 µl** de contrôles (31228, 31229) dans les puits correspondants
4. Ajouter **10 µl** d'échantillons dans les puits correspondants.

KT-1033/IVD/ V6/2020-03

5. Ajouter **100 µl** de COVID-19 IgM Sample Diluent (31224) dans les puits contenant les échantillons.

Remarque : Ne pas ajouter le diluent pour échantillon dans les puits contenant les contrôles !

6. Mélanger doucement et couvrir la plaque avec un film de scellage et une feuille d'aluminium. Incuber à **37 °C** pendant **30 minutes**.
7. Retirer le film de scellage. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver à **5 reprises** chaque puits à l'aide de **350 µl** de solution de lavage diluée (10010), puis aspirer complètement le contenu. On peut également utiliser un laveur automatique de microplaques.
8. Ajouter **100 µl** de HRP-labeled COVID-19 antigène (31226) dans les puits.
9. Mélanger doucement et couvrir la plaque avec un film de scellage et une feuille d'aluminium. Incuber à **37 °C** pendant **30 minutes**.
10. Retirer le film de scellage. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver à **5 reprises** chaque puits à l'aide de **350 µl** de solution de lavage diluée (10010), puis aspirer complètement le contenu. On peut également utiliser un laveur automatique de microplaques.
11. Ajouter **100 µl** de substrat (10020) dans les puits.
12. Mélanger doucement et couvrir la plaque à l'aide d'une feuille d'aluminium. Incuber à **température ambiante (20-25 °C)** pendant **20 minutes**.
13. Retirer la feuille d'aluminium et ajouter **100 µl** de solution d'arrêt (10030) dans chacun des puits. Mélanger en tapotant doucement la plaque.
14. Lire l'absorption à **450 nm** dans les **10 minutes** qui suivent à l'aide d'un lecteur de microplaques.

REMARQUES

1. Il est recommandé de doser tous les échantillons en duplicate. On utilisera la moyenne des valeurs d'absorption de chaque duplicate pour réduire et calculer les résultats.
2. Conserver les réactifs sensibles à la lumière dans les bouteilles d'origine et éviter de les exposer inutilement à la lumière.
3. Stocker les barrettes de puits revêtues inutilisées dans le sachet d'aluminium Ziploc contenant le dessiccateur pour les protéger de l'humidité.
4. Une technique soignée et l'utilisation de systèmes de pipetage correctement calibrés sont nécessaires pour avoir une bonne reproductibilité du test.
5. Ne pas respecter les temps ou les températures d'incubation mentionnés dans ce mode d'emploi peut affecter les résultats.
6. Éviter les bulles d'air dans les puits, ce qui pourrait entraîner une diminution de la fixation et des CV% de lecture de duplicate plus élevés.
7. Mélanger doucement tous les réactifs avant leur utilisation. Éviter la formation de mousse.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Pour s'assurer de la validité des résultats, on doit inclure dans chaque test les contrôles positif et négatif. La moyenne des valeurs d'absorption du contrôle négatif doit être < 0.25, et la moyenne de celles du contrôle positif doit être > 0.50. Nous recommandons également aux laboratoires d'inclure leurs propres contrôles en plus de ceux qui sont fournis dans ce kit

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Calculer la valeur moyenne de l'absorption du contrôle négatif (xNC).
2. Calculer les cut-offs de la façon suivante :
 - Cut off positif = $1.1 \times (xNC + 0.10)$
 - Cut off négatif = $0.9 \times (xNC + 0.10)$
3. L'interprétation de l'échantillon sera faite en comparant sa DO aux DOs du tableau suivant :

Interprétation	Intervalle	Résultats
Négatif	Valeur mesurée ≤ cut off négatif	L'échantillon ne contient pas d'anticorps IgM correspondant au nouveau coronavirus (COVID-19)
Positif	Valeur mesurée ≥ cut off positif	L'échantillon contient des anticorps IgM correspondant au nouveau coronavirus (COVID-19).
Douteux	Cut off négatif < Valeur mesurée < cut off positif	Retester l'échantillon en combinaison avec d'autres tests cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Dans l'essai clinique, les échantillons positifs avaient des DOs comprises entre 0.164 et 0.661 et les échantillons négatifs entre 0.000 et 0.151. Ne pas utiliser ces valeurs pour l'interprétation des résultats

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Ce test ne doit être utilisé que pour une détection qualitative et ne doit pas être seul pris en compte pour établir un diagnostic clinique ou un traitement.

L'infection par ce nouveau coronavirus

(COVID-19) doit être confirmée par les signes cliniques présentés par le patient et par d'autres tests.

Les IgM de ce nouveau coronavirus (COVID-19) peuvent être négatifs chez les patients au cours de la 1^{ère} semaine d'infection ou après 4 semaines. De plus, on peut observer des résultats négatifs pour les IgM de ce nouveau coronavirus chez les patients qui ont une faible auto-immunité ou d'autres atteintes qui affectent la fonction auto-immune, une défaillance d'organes systémiques importants ou qui utilisent des médicaments qui diminuent la fonction immunitaire. Une contamination bactérienne ou fongique des échantillons de sérum ou des réactifs ou encore une contamination croisée des réactifs peut entraîner des résultats erronés.

L'eau désionisée à l'aide de résines de polyesters peut inactiver la peroxydase de raifort.

CARACTÉRISTIQUES DU TEST

Limite de Détection

Il n'existe pas d'unités internationales standardisées pour le COVID-19. On a dilué en série un échantillon positif, et on a calculé que la limite de détection n'est pas supérieure à 5 UI/ml.

Répétabilité

Le test a été effectué à 10 reprises. Les CV des DO étaient inférieurs à 15%.

Reproductibilité

On a testé des échantillons à 10 reprises dans 3 lots différents. Les CV étaient inférieurs à 20%.

Réactions croisées

Des panels ont été étudiés avec un minimum de 5 échantillons dont la pathologie était confirmée. On n'a pas observé d'interférence pour les pathologies ou les agents infectieux suivants :

- Anti-grippe A
- Anti-grippe B
- Hépatite C (VHC)
- Anticorps anti-nucléaires (ANA)
- Respiratoire syncytial (VRS)

ESSAI CLINIQUE

On a testé des échantillons de sérum, provenant de 2 cohortes de patients, à l'aide du kit IgM ELISA au Jiaying City Center for Disease Control and Prevention et au Zhejiang University Hospital. Les 2 cohortes étaient composées d'échantillons de patients sains et normaux collectés avant le début du COVID-19 [3 Décembre 2019] (n = 43) et des patients confirmés positifs par RT-PCR deux semaines après le début de l'épidémie (n = 20). Les résultats sont les suivants :

	Confirmé Positif	Confirmé Négatif
Test Positif	9	0
Test Négatif	10	42
Test Doubteux	1	1

La sensibilité diagnostique est égale à 45%

La spécificité diagnostique est égale à 97.7%

La valeur prédictive négative est égale à 79.3%

La valeur prédictive positive est égale à 90%

Les IgM sont les premières immunoglobulines produites en réponse à un antigène et seront surtout détectables au début de la maladie. La « National Health Commission » de la République Populaire de Chine a établi que les anticorps IgM commencent à être positifs 3.5 jours après le début du COVID-19. Les échantillons de sérum de patients ont été prélevés pour l'étude clinique plus de 2 semaines après le début de la maladie. On peut donc estimer que les faibles taux de sensibilité clinique pour les IgM peuvent être attribués à la date de prélèvement de la cohorte positive, quand on s'attend à ce que les taux d'IgM soient faibles.

GARANTIES

Ce produit est garanti pour fonctionner comme décrit dans son étiquetage et sa documentation s'il est utilisé conformément à toutes les instructions. Epitope Diagnostics, Inc. DÉNIE TOUTE GARANTIE IMPLICITE DE VALEUR COMMERCIALE OU DE CONFORMITÉ POUR UN USAGE PARTICULIER. En aucun cas Epitope Diagnostics, Inc. ne pourra être considéré comme responsable des dommages consécutifs. Le remplacement du produit ou le remboursement de son prix d'achat est le seul recours de l'acheteur. Cette garantie vous donne des droits légaux spécifiques. Vous pouvez avoir d'autres droits, variables d'un état à l'autre.

RÉFÉRENCES

1. CDC (2020). Transmission of Novel Coronavirus (COVID- 19).
2. Chenjia Yuan , Shi Jinsong , Qiudong An , Liu Chang , Li Xin , Qiang , Ruanji Shou , mountains . Wuhan 2019 Bioinformatics coronavirus genome analysis [J / OL]. Bioinformatics : 1-10 [2020-02-10].
3. Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses Methods in Molecular Biology*, 1–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1
4. Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. (2005). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with its receptor. doi: 10.2210/pdb2ajif/pdb
5. Wu, L.-P., Wang, N.-C., Chang, Y.-H., Tian, X.-Y., Na, D.-Y., Zhang, L.-Y., ... Liang, G.-D. (2007). Duration of Antibody Responses after Severe Acute Respiratory Syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), 1562–1564. doi: 10.3201/eid1310.070576
6. Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., ... Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*. doi: 10.1007/s11427- 020-1637-5
7. Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020- 2012-7

ASSISTANCE TECHNIQUE ET SERVICE CLIENT

Pour toute question technique ou pour commander en dehors des Etats Unis, veuillez contacter votre distributeur local.



Ce produit est fabriqué par
Epitope Diagnostics, Inc.
7110 Carroll Road
San Diego, CA 92121, US

Sur notre site internet www.epitopediagnostics.com vous trouverez des informations sur nos produits et services.

EC	REP
----	-----

MDSS GmbH
Schiffgraben 41,
30175 Hannover, Allemagne

SYMBOLES (EN 980/ISO 15223)



Diagnostic In Vitro



Référence catalogue



Conserver à



Fabricant



Marquage CE



Lire le Mode d'Emploi avant usage



Utiliser avant



Représentant autorisé en Europe



Numéro de lot



Nombre de tests



Conserver à l'abri de la lumière