

EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgM ELISA Kit

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum qualitativen Nachweis von COVID-19 IgM in Serum.

REF KT-1033 IVD CE    

VERWENDUNGSZWECK

Dieses Kit ist ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt. Das Kit weist den neuartigen COVID-19 IgM-Antikörper in Humanserum nach. Er ist für ein Screening oder als Hilfsmittel zur Diagnose von COVID-19 vorgesehen. Bei Patienten mit Verdacht auf Cluster-Infektion ist die Diagnose oder Differentialdiagnose der neuartigen Coronavirus-Infektion erforderlich. Der Assay wird manuell validiert, kann aber an ein automatisiertes Gerät angepasst werden. Der Assay ist nur für den qualitativen Nachweis bestimmt.

VORGESEHENE ANWENDER

Dieses Kit ist für Laborfachkräfte und medizinisches Fachpersonal bestimmt.

ÜBERBLICK ÜBER DIE PHYSIOLOGIE

Das 2019 aufgetretene neuartige Coronavirus (COVID-19) ist ein einzelsträngiges RNA-Coronavirus.² Vergleiche der genetischen Sequenzen dieses Virus haben Ähnlichkeiten mit SARS-CoV und Fledermaus-Coronaviren gezeigt.⁷ Beim Menschen verursachen Coronaviren Atemwegsinfektionen.³ Coronaviren setzen sich aus mehreren Proteinen zusammen, darunter Spike(S)-, Envelope(E)-, Membran(M)- und Nukleokapsid(N)-Protein.⁴ Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Spike-Protein eine ausreichende Affinität zum Angiotensin-Converting-Enzym-2(ACE2)-Rezeptor behält, um ihn als Mechanismus für den Zelleintritt zu nutzen.⁶ Es wird angenommen, dass die Übertragung der Coronaviren von Mensch zu Mensch hauptsächlich bei engen Kontakten über Atemtröpfchen erfolgt, die durch Niesen und Husten erzeugt werden.¹ IgM ist das erste Immunglobulin, das als Reaktion auf ein Antigen produziert wird und ist vor allem während des frühen Krankheitsbeginns nachweisbar.⁵

TESTPRINZIP

Dieses ELISA-Kit wurde für die qualitative Messung des COVID-19 IgM-Antikörpers in Serum konzipiert, entwickelt und hergestellt. Dieser Assay verwendet die „IgM-Capture“-Methode mittels Mikroplatten-basierter Enzymimmunoassay-Technik.

Assay-Kontrollen und Proben werden in die Mikrotitervertiefungen einer Mikroplatte gegeben, die mit einem Anti-Human IgM-spezifischen Antikörper beschichtet wurde. Nach der ersten Inkubationszeit wird die ungebundene Proteinmatrix mit einem anschließenden Waschschriff entfernt. Ein Meerrettichperoxidase(HRP)-markiertes rekombinantes COVID-19 Antigen wird in jede Vertiefung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit bildet sich ein Immunkomplex aus "Anti-IgM-Antikörper – humanem COVID-19 IgM-Antikörper – HRP-markiertem COVID-19 Antigen", wenn der neuartige Coronavirus IgM-Antikörper im getesteten Material vorliegt. Das ungebundene Tracer-Antigen wird durch den anschließenden Waschschriff entfernt. An die Vertiefung gebundenes HRP-markiertes COVID-19 Tracer-Antigen wird dann mit einer Substratlösung in einer zeitlich genau festgelegten Reaktion inkubiert und anschließend in einem spektrophotometrischen Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die enzymatische Aktivität des Tracer-Antigens, das an das Coronavirus-IgM an der Wand der Mikrotitervertiefung gebunden ist, ist proportional zur Höhe des Coronavirus IgM-Antikörperspiegels im getesteten Material.

REAGENZILIEN: ZUBEREITUNG UND LAGERUNG

Nach Erhalt muss dieses Test-Kit bei 2 – 8 °C gelagert werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett der Kit-Box vermerkt. Alle Komponenten sind bis zu diesem Verfallsdatum stabil.

1. COVID-19 IgM Mikroplatte (31223)

Mikroplatte, beschichtet mit Anti-Human IgM-spezifischem Antikörper.

Quantität: 1 x 96-Well-Mikroplatte

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

2. COVID-19 IgM Probendiluent (31224)

Gebrauchsfertiger Probenverdünnungspuffer.

Quantität: 1 x 15 ml

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

3. HRP-markiertes COVID-19 Antigen (31226)

HRP-markiertes COVID-19 Antigen in einer stabilisierten Proteinmatrix.

Quantität: 1 x 11 ml

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

4. ELISA Waschkonzentrat (10010)

Tensid in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung mit nicht-azidem Konservierungsmittel.

Quantität: 1 x 30 ml

Lagerung: 2 – 25 °C

Zubereitung: 30-faches Konzentrat. Der Inhalt muss mit 870 ml destilliertem Wasser verdünnt und vor Gebrauch gut gemischt werden.

5. ELISA HRP Substrat (10020)

Tetramethylbenzidin (TMB) mit stabilisiertem Wasserstoffperoxid.

Quantität: 1 x 15 ml

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

6. ELISA Stopplösung (10030)

0,5 M Schwefelsäure.

Quantität: 1 x 15 ml

Lagerung: 2 – 25 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

7. COVID-19 IgM Negativkontrolle (31228)

Negativkontrolle mit einer auf bovinem Serumalbumin basierenden Matrix mit nicht-azidem Konservierungsmittel. Kontrollprodukte enthalten kein Serum von Patienten mit neuem Typ der Coronavirus-Infektion.

Quantität: 1 x 1 ml

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

8. COVID-19 IgM Positivkontrolle (31229)

Positivkontrolle mit einer auf bovinem Serumalbumin basierenden Matrix mit nicht-azidem Konservierungsmittel. Kontrollprodukte enthalten kein Serum von Patienten mit neuem Typ der Coronavirus-Infektion.

Quantität: 1 x 0,5 ml

Lagerung: 2 – 8 °C

Zubereitung: Gebrauchsfertig.

SICHERHEITSHINWEISE

Die Reagenzien sind nur für die In-vitro-Diagnostik bestimmt. Das Ausgangsmaterial für Reagenzien, die bovines Serumalbumin enthalten, stammt aus 48 zusammenhängenden US-Bundesstaaten. Es wurde ausschließlich von gesunden Spendertieren unter Veterinärüberwachung gewonnen und ist frei von übertragbaren Krankheiten. Bei der Testdurchführung Handschuhe tragen und Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandeln. Kontakt mit Reagenzien, die Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Nicht in die Augen, auf die Haut oder Kleidung gelangen lassen. Nicht einnehmen oder Dämpfe inhalieren. Bei Kontakt mindestens 15 Minuten mit reichlich Wasser spülen. Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

1. Einkanal-Präzisionspipetten für Volumen von 20 µl, 25 µl, 100 µl, und 1000 µl etc.
2. Repetier-Dispenser für Volumen von 100 µl.
3. Einweg-Pipettenspitzen für das Dispensieren o. a. Volumen.
4. Einweg-Glasröhrchen, 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm.
5. Einweg-Kunststoffflaschen mit Deckel, 1000 ml.
6. Aluminiumfolie.
7. Entionisiertes oder destilliertes Wasser.
8. Abdeckung für Mikroplatte aus Kunststoff oder Polyethylenfolie.
9. ELISA-Multikanal-Waschflasche oder automatisches (halbautomatisches) Waschsysteem.
10. Spektrophotometrisches Mikroplatten-Lesegerät zur Ablesung der Extinktion bei 450 nm.
11. Inkubator, der die Temperatur auf 37 °C halten kann.

PROBENGEWINNUNG & -LAGERUNG

Nur 20 µl Humanserum sind für die Messung als Doppelbestimmung erforderlich. Proben sollten nur am Tag der Entnahme verwendet werden. Stark hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Zubereitung der Reagenzien

1. Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Reagenzien mit unterschiedlichen Kit-Chargennummern sollten nicht kombiniert oder untereinander ausgetauscht werden.
2. Das ELISA Waschkonzentrat (10010) muss vor Gebrauch zu einer Arbeitslösung verdünnt werden. Siehe Einzelheiten dazu im Abschnitt REAGENZIEN.

2. Testverfahren

1. Eine ausreichende Anzahl an Mikrotiterplattenstreifen (31223) in einen Halterahmen legen, um die Kontrollen (31228, 31229) und Proben als Doppelbestimmung zu testen.
2. Testkonfiguration

Reihe	Streifen 1	Streifen 2	Streifen 3
A	Negativkontrolle	PROBE 3	PROBE 7
B	Negativkontrolle	PROBE 3	PROBE 7
C	Negativkontrolle	PROBE 4	PROBE 8
D	Positivkontrolle	PROBE 4	PROBE 8
E	PROBE 1	PROBE 5	PROBE 9
F	PROBE 1	PROBE 5	PROBE 9
G	PROBE 2	PROBE 6	PROBE 10
H	PROBE 2	PROBE 6	PROBE 10

3. **100 µl** Kontrollen (31228, 31229) in die vorgesehenen Mikrotitervertiefungen hinzugeben.
4. **10 µl** Proben in die vorgesehenen Mikrotitervertiefungen hinzugeben.
5. **100 µl** COVID-19 IgM Probendiluent (31224) in die Mikrotitervertiefungen mit den Proben hinzugeben. *Hinweis: Keinen Probendiluent in die Vertiefungen, die die Kontrollen enthalten, hinzugeben!*
6. Behutsam mischen und die Platte mit einer Plattenversiegelung und Aluminiumfolie abdecken. Bei **37 °C 30 Minuten** inkubieren.
7. Die Plattenversiegelung entfernen. Den Inhalt jeder Vertiefung absaugen. Jede Vertiefung **5-mal** waschen, indem Sie **350 µl verdünnte** Waschlösung (10010) in jede Vertiefung dispensieren und anschließend den Inhalt vollständig absaugen. Alternativ kann ein automatisches Mikroplatten-Waschsysteem verwendet werden.
8. **100 µl** HRP-markiertes COVID-19 Antigen (31226) in die Mikrotitervertiefungen hinzugeben.
9. Behutsam mischen und die Platte mit einer Plattenversiegelung und Aluminiumfolie abdecken. Bei **37 °C 30 Minuten** inkubieren.
10. Die Plattenversiegelung entfernen. Den Inhalt jeder Vertiefung absaugen. Jede Vertiefung **5-mal** waschen, indem Sie **350 µl verdünnte** Waschlösung (10010) in jede Vertiefung dispensieren und anschließend den Inhalt vollständig absaugen. Alternativ kann ein automatisches Mikroplatten-Waschsysteem verwendet werden.
11. **100 µl** Substrat (10020) in die Mikrotitervertiefungen hinzugeben.
12. Behutsam mischen und die Platte mit Aluminiumfolie abdecken. Bei **Raumtemperatur (20-25 °C) 20 Minuten** inkubieren.
13. Die Aluminiumfolie entfernen und **100 µl** Stopplösung (10030) in jede Mikrotitervertiefung hinzugeben. Durch leichtes Klopfen der Platte mischen.
14. Extinktion bei **450 nm** innerhalb von **10 Minuten** mit einem Mikroplatten-Lesegerät ablesen.

ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

1. Es wird empfohlen, alle Proben als Doppelbestimmung zu testen. Der mittlere Extinktionswert jeder Doppelmessung sollte zur Datenreduktion und zur Berechnung der Ergebnisse verwendet werden.
2. Lichtempfindliche Reagenzien in den Originalflaschen aufbewahren und unnötige Lichteinwirkung vermeiden.
3. Nicht verwendete Antikörper-beschichtete Streifen im Ziplock-Beutel mit Trockenmittel lagern, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.
4. Eine sorgfältige Technik und die Verwendung von ordnungsgemäß kalibrierten Pipettiergeräten sind notwendig, um die Reproduzierbarkeit des Tests sicherzustellen.
5. Andere Inkubationszeiten oder Temperaturen als die in dieser Beilage angegebenen können die Ergebnisse beeinflussen.
6. Luftbläschen in den Mikrotitervertiefungen vermeiden, da dies zu einer geringeren Bindungseffizienz und einem höheren Variationskoeffizienten bei der Doppelmessung führen kann.
7. Alle Reagenzien sollten behutsam und gründlich vor Gebrauch gemischt werden. Schaumbildung vermeiden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Um die Gültigkeit der Ergebnisse sicherzustellen müssen mit jedem Assay sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen mitgeführt werden. Der Mittelwert der Extinktionswerte der Negativkontrollen ist niedriger als 0,25 und der Extinktionswert der Positivkontrolle nicht niedriger als 0,50. Wir empfehlen zudem, zusätzlich zu den Kontrollen, die mit diesem Kit mitgeliefert werden, weitere laboreigene Kontrollen mitzuführen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

- Den mittleren Wert der Extinktion der Negativkontrolle (xNC) berechnen.
- Die Cut-off-Werte mit folgenden Formeln berechnen:
 - Positiver Cut-off = $1,1 \times (xNC + 0,10)$
 - Negativer Cut-off = $0,9 \times (xNC + 0,10)$
- Die Auswertung des Probenergebnisses erfolgt, indem die OD mit der nachfolgenden Tabelle verglichen wird:

Interpretation	Intervall	Ergebnisse
Negativ	Gemessener Wert \leq negativer Cut-off	Die Probe enthält nicht den neuen Coronavirus (COVID-19) IgM-Antikörper.
Positiv	Gemessener Wert \geq positiver Cut-off	Die Probe enthält neuartige Coronavirus (COVID-19) IgM-Antikörper.
Grenzbereich	Negativer Cut-off $<$ gemessener Wert $<$ positiver Cut-off	Die Probe in Verbindung mit anderen klinischen Tests erneut testen.

ERWARTETE WERTE

Die Proben der klinischen Prüfung zeigten OD von 0,164 – 0,661 für die positiven Werte und 0,000 – 0,151 für die negativen Werte. Diese Werte sollten die Interpretation der Ergebnisberechnung nicht ersetzen.

GRENZEN DER METHODE

- Dieser Test ist ausschließlich für den qualitativen Nachweis bestimmt. Die Testergebnisse sollten nicht die alleinige Grundlage für die klinische Diagnose und Behandlung sein. Die Bestätigung der Infektion mit dem neuartigen Coronavirus (COVID-19) muss zusammen mit den klinischen Symptomen des Patienten und weiteren Tests erfolgen.
- In der ersten Woche des Krankheitsbeginns oder nach vierwöchiger Infektion mit dem neuartigen Coronavirus (COVID-19) können Patienten negativ für IgM sein. Darüber hinaus kann bei Patienten mit geringer Immunität oder anderen Krankheiten, die die Immunfunktion beeinträchtigen, bei Versagen wichtiger systemischer Organe und bei der Verwendung von Medikamenten, die die Immunfunktion unterdrücken, ebenfalls das Ergebnis für das neue Coronavirus IgM negativ sein.
- Eine Bakterien- oder Pilzkontamination von Serumproben oder Reagenzien oder eine Kreuzkontamination zwischen Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Mit Polyesterharzen entionisiertes Wasser kann das Meerrettichperoxidase-Enzym inaktivieren.

LEISTUNGSMERKMALE

Nachweisgrenze

Für COVID-19 sind keine international standardisierten Einheiten verfügbar. Eine positive Probe wurde seriell verdünnt, und die Nachweisgrenze wurde als nicht höher als 5 U/ml festgelegt.

Wiederholbarkeit

Die Assay-Kontrolle wurde in 10 Wiederholungen getestet. Der Variationskoeffizient der OD-Werte lag unter 15 %.

Reproduzierbarkeit

Drei Chargen wurden mit denselben Proben 10-mal getestet. Der Variationskoeffizient lag unter 20 %.

Kreuzreaktivität

Panels mit einem Minimum von fünf Proben bestätigter Krankheitsfälle wurden untersucht. Bei den folgenden Krankheiten oder Infektionserregern wurden keine Interferenzen beobachtet

- Anti-Influenza A
- Anti-Influenza B
- Hepatitis C (HCV)
- Antinukleäre Antikörper (ANA)
- Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV)

KLINISCHE ERPROBUNG

Serumproben von zwei Patientenkohorten wurden mit dem IgM-ELISA-Kit im Jiaying City Center for Disease Control and Prevention und im Zhejiang University Hospital getestet. Die kombinierte Kohorte bestand aus normalen gesunden Patienten mit Proben, die vor dem Ausbruch der COVID-19-Krankheit [3. Dezember 2019] (n =43) gesammelt wurden, und aus mit RT-PCR bestätigten positiven Patienten nach der

zweiten Woche des Krankheitsbeginns (n = 20). Die Ergebnisse lauten wie folgt:

	Positiv bestätigt	Negativ bestätigt
Test positiv	9	0
Test negativ	10	42
Test im Grenzbereich	1	1

Die diagnostische Sensitivität ist 45 %.

Die diagnostische Spezifität ist 97,7 %.

Der negative prädiktive Wert ist 79,3 %.

Der positive prädiktive Wert ist 90 %.

IgM ist das erste Immunglobulin, das als Reaktion auf ein Antigen produziert wird und ist vor allem während des frühen Krankheitsbeginns nachweisbar. Die Nationale Gesundheitskommission der Volksrepublik China gibt an, dass IgM-Antikörper nach 3-5 Tagen des Ausbruchs von COVID-19 nachweisbar werden. Die Serumproben für den klinischen Test stammten von Patienten, die zwei Wochen nach Ausbruch der Krankheit gewonnen wurden. Daher kann eine geringe klinische Sensitivität für IgM auf das Entnahmedatum der positiven Kohorte zurückgeführt werden, bei der niedrigere IgM-Spiegel zu erwarten sind.

GEWÄHRLEISTUNG

Für dieses Produkt wird gewährleistet, dass es die in seiner Kennzeichnung und Literatur beschriebene Leistung erbringt, wenn es in Übereinstimmung mit allen Anweisungen verwendet wird. Epitope Diagnostics, Inc. LEHNT JEDE IMPLIZITE GEWÄHRLEISTUNG DER MARKTGÄNGIGKEIT ODER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK AB, und Epitope Diagnostics, Inc. ist in keinem Fall für Folgeschäden haftbar. Der Ersatz des Produkts oder die Rückerstattung des Kaufpreises ist das ausschließliche Rechtsmittel für den Käufer. Diese Gewährleistung gibt Ihnen bestimmte gesetzliche Rechte, und Sie können weitere Rechte haben, die von Staat zu Staat unterschiedlich sind.

LITERATURHINWEISE

- CDC (2020). Transmission of Novel Coronavirus (COVID-19).
- ChenJia Yuan , Shi Jinsong , Qiudong An , Liu Chang , LiXin, Qiang , Ruanji Shou , mountains . Wuhan 2019 Bioinformatics coronavirus genome analysis [/ OL]. Bioinformatics : 1-10 [2020-02-10] .
- 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
- Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. (2005). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with its receptor. doi: 10.2210/pdb2ajf/pdb
- 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
- 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
- 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

TECHNISCHER SERVICE UND KUNDENSERVICE

Für technische Unterstützung oder eine Bestellung wenden Sie sich bitte an Epitope Diagnostics, Inc. unter der Nr. (858) 693-7877 oder senden Sie ein Fax an (858) 693-7678.

Dieses Produkt wird hergestellt von



Epitope Diagnostics, Inc.
7110 Carroll Road
San Diego, CA 92121, US

EC	REP
----	-----

MDSS GmbH
Schiffgraben 41,
30175 Hannover, Germany

SYMBOLGLOSSAR (EN 980/ISO 15223)



In-vitro-
Diagnostikum



Europäische
Konformität



Chargen-
bezeichnung



Bestellnummer



Gebrauchsanweisung
beachten



Anzahl der Tests



Lagertemperatur



Verfallsdatum



Vor Hitze und
direkter
Sonneneinstrahlung
schützen



Hersteller



Bevollmächtigter
Vertreter in
Europa