

GSD NovaLisa®

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

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	11
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía	22
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	22
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	23
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	24

Product Number: CVGQ0970 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

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

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

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

The clinical manifestations of SARS-CoV-2-related COVID-19 disease include fever, cough, respiratory problems and fatigue. In most patients the infection manifests with symptoms of a mild febrile illness with irregular lung infiltrates. The initial clinical sign of COVID-19 which allowed case detection was pneumonia. But it turned out that the course of the disease is non-specific and varies widely, from asymptomatic courses to severe pneumonia with lung failure and death.

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

Treatment focuses on supportive measures depending on the severity of the clinical picture (e.g. oxygen administration, fluid balance management, etc.) as well as the treatment of relevant underlying diseases. Various specific therapeutic approaches (directly antiviral effective, immunomodulatory effective) have been and are being investigated in studies during the course of the SARS-CoV-2 pandemic.

The SARS-CoV-2 surface spike glycoprotein (S) is an important target for prophylactic measures because it is critical in the viral life cycle and is the primary target of neutralizing antibodies. Therefore, the trimeric spike protein is the focus of most vaccine design and development efforts.

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

Infection or presence of pathogen may be identified by:

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

2. INTENDED USE

The test is designed for the quantitative and qualitative detection of specific IgG-class antibodies to the spike protein of SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) in human serum (venous, capillary) or plasma (citrate, heparin, EDTA). It is intended to aid in the diagnosis of patients suspected of having COVID-19 disease or asymptomatic infection with SARS-CoV-2, to monitor antibody levels during and after a COVID-19 disease, and to determine antibody levels before and after a COVID-19 vaccination.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative or 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. Acidic stopping solution is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **MTP, Microtiterplate:** 12 break apart 8-well snap-off strips coated with trimeric SARS-CoV-2 Spike antigen (derived from human cell culture); in resealable aluminium foil.
- **SAMPLE DIL, Sample Dilution Buffer:** 2 bottles, each containing 50 mL phosphate buffer (10 mM) for sample dilution, with Tween 20; pH 7.2 ± 0.2; coloured blue; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **STOP CITRATE, Stopping Solution:** 1 bottle containing 7.5 mL citric acid (1 M); < 1 % hydrochloric acid; < 2 % sulfuric acid; pH < 1.2; ready to use; red cap.
- **WASH CONC 20x, Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.16 M); pH 7.0 – 7.5; for washing the wells; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **CONJ IgG, Conjugate:** 1 bottle containing 13.5 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in buffer solution; with protein stabilizer; coloured green; ready to use; green cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **TMB SOLN, TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 13.5 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution; ready to use; black cap.
- **STD 1-5, Standards:** 5 vials, each containing 2 mL standard; ready to use.
 - **STD 1** light pink cap
 - **STD 2** light blue cap
 - **STD 3** blue cap
 - **STD 4** dark blue cap
 - **STD 5** red cap

For the concentrations of **STD 1-5** in AU/mL and their correlation to 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, please refer to the **CoA**.

- **CTR NEG, Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; ready to use; light green cap. Concentration and target range are indicated on the **CoA**.
- **CTR POS, Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; ready to use; green cap. Concentration and target range are indicated on the **CoA**.

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 3 Cover foils
- 1 Instruction for use (IFU)
- Certificate of Analysis, **CoA** with information about concentrations and target values of **STD 1-5**, **CTR NEG**, and **CTR POS**

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm (reference wavelength 620 – 690 nm)
- Incubator 37 °C
- Cover for ELISA plates (as alternative to cover foil)
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

Store kit and all components at 2...8 °C when not in use.

- The shelf life of the unopened kit is stated on the kit box and on the **CoA**.
- The shelf life of the individual unopened components is indicated on the respective label.
- Store the **CONJ IgG** and the **TMB SOLN** in the dark.
- Withdraw only required volumes of reagents and do not return excess amounts to the respective container.

Component	After first opening	
	Storage	Shelf Life
MTP	2...8 °C (store in the supplied bag with desiccant)	3 months
CTR NEG CTR POS STD 1-5	2...8 °C	
SAMPLE DIL		
STOP CITRATE		
CONJ IgG	2...8 °C (protect from light)	
TMB SOLN		
WASH CONC 20x	2...8 °C	3 months
	2...25 °C Final Dilution (ready to use)	4 weeks

6. REAGENT PREPARATION

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

6.1. Microtiterplate

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

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Fill up **WASH CONC 20x** (50 mL) to 1 L with distilled water to the final dilution of 1:20 (1+19). If the concentrate crystallizes, bring it to room temperature (20...25 °C) before diluting and only then dilute it. Mix the ready to use Washing Solution thoroughly before use.

6.3. TMB Substrate Solution

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

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin, EDTA) samples derived from venous blood (for further sample material refer to 7.1. Additional Sample Material) with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Additional Sample Material

Serum obtained from capillary blood e.g. from the fingertip, collected and processed using the Sarstedt Microvette® 100 Serum (product number 20.1308) device is also suitable as sample material.

Important: Do not use whole blood directly with the test!

7.2. Sample Dilution

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

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, a distribution and identification scheme 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 frame.

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.

For **quantitative** assay procedure, **STD 1-5** (in duplicate), **SAMPLE DIL**, **CTR NEG** and **CTR POS** must be pipetted. Their target ranges are defined in the **CoA**.

For **qualitative** assay procedure, the **SAMPLE DIL**, one standard **STD #** (in duplicate), **CTR NEG**, and **CTR POS** must be pipetted. Their target ranges are defined in the **CoA**.

Quantitative Assay Procedure	Qualitative Assay Procedure
1. Pipette 100 µL of the SAMPLE DIL as the blank value (LW), STD 1-5 , CTR NEG , CTR POS , and diluted samples into their respective wells.	1. Pipette 100 µL of the SAMPLE DIL as the blank value (LW), STD # , CTR NEG , CTR POS , and diluted samples into their respective wells.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.	
3. Incubate for 30 min at 37±1 °C.	
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well four times with 300-350 µL of ready to use washing solution. 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 CONJ IgG into all wells.	
6. Cover wells with the foil supplied in the kit.	
7. Incubate for 30 min at 37±1 °C. Do not expose to direct sunlight.	
8. Repeat step 4.	
9. Dispense 100 µL of the TMB SOLN into all wells.	
10. Cover wells with the foil supplied in the kit.	
11. Incubate for 30 min at 37 °C in the dark. A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.	
12. Dispense 50 µL STOP CITRATE into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB SOLN , thereby a colour change from blue to yellow occurs. Shake plate gently and carefully until liquid is completely mixed and a uniform yellow color is visible.	
13. Measure the absorbance at 450/620 nm (reference wavelength 620-690 nm) within 1 h after addition of the STOP CITRATE .	

8.1. Measurement

Measure the absorbance of all wells at 450 nm.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620-690 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

The OD values of the blank (LW), **CTR NEG**, **CTR POS**, and **STD 1-5** must meet the specifications stated in the **CoA**.

The value of the calculated units of the **CTR NEG** and **CTR POS** must be within the range specified in the **CoA**.

If any of the above requirements for OD values or unit values are not met, the test must be repeated.

9.2. Calculation of Results

9.2.1. Qualitative Results

Calculation of Cut-off

Correction Factor (CF): To differentiate between positive and negative samples a Cut-off value has been defined. This Cut-off value is correlated with the specific standard **STD #** by a lot-specific Correction Factor (refer to **CoA**).

The Cut-off OD value is the mean absorbance value of the **STD #** determinations x Correction Factor (CF):

$$\text{OD Cut-off (}\pm 10 \text{ AU)} = \frac{\text{STD \#} \text{ OD1} + \text{STD \#} \text{ OD2}}{2} \times \text{CF}$$

Results in Arbitrary Units

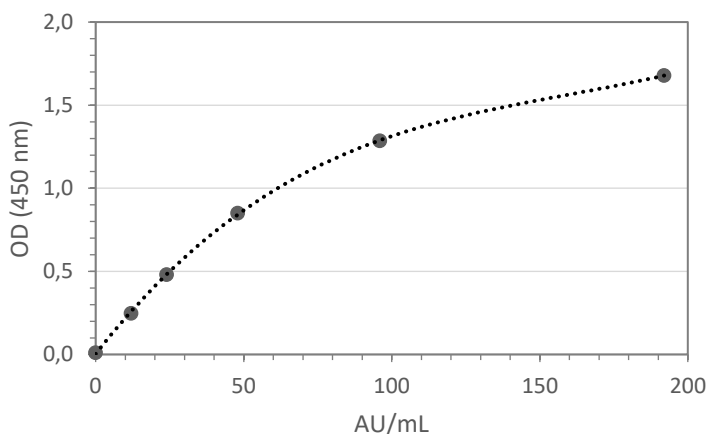
$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = \text{AU (Arbitrary Units)}$$

Example: $\text{OD}_{\text{Sample}} = 1.591$; $\text{OD}_{\text{Cut-off}} = 0.43 \Rightarrow \frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ AU}$

9.2.2. Quantitative Results

In order to obtain **quantitative results in AU/mL or IU/mL** plot the (mean) absorbance values of **STD 1-5** and the blank (LW) on the y-axis against their corresponding concentrations (refer to the **CoA**) on the x-axis and draw the best-fit curve through the plotted points. Read results from this calibration curve employing the (mean) absorbance values of each sample and control.

Typical Calibration Curve



Reporting of Results in International Units (IU/mL)

The SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG has been calibrated against the “First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)”, NIBSC code: 20/136.

Please refer to the **CoA** for the lot specific assignment of International Standard Units (IU/mL) for **STD 1-5**. Perform calculation for the patient specimens as described above using IU/mL for the standards instead of AU/mL.

9.3. Interpretation of Results

qualitativ	quantitativ	Interpretation
< 9 AU	< 9 AU/mL	No significant level of antibodies to SARS-CoV-2 in patient sample. Result does however not exclude infection with SARS-CoV-2. Serological evidence is best obtained by testing of paired acute and convalescent-phase samples obtained several weeks apart.
9 – 11 AU	9 – 11 AU/mL	Equivocal results should only be interpreted as initial evidence for detection of antibodies to SARS-CoV-2. Additional testing is recommended for equivocal test results. Serological evidence is best obtained by testing of paired acute- and convalescent-phase samples obtained 2 to 4 weeks apart. If the result is equivocal again the sample is judged as negative.
> 11 AU	> 11 AU/mL	Antibodies to SARS-CoV-2 presumptively detected in patient sample. Contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) can be assumed.

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.

The SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG has been calibrated against the “First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)”, NIBSC code: 20/136. Quantitative results in IU/mL provide information about the level of IgG antibodies present.

Important: no reliable data are yet available regarding the correlation of an IgG titer and the presence or duration of immune protection after infection or vaccination.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

10.1. Precision

A precision sample panel consisting of a negative, a low positive, a moderate positive and a high positive sample were tested in a total of 11 independent runs over a period of 6 days. Tests were performed individually by three different persons. Within each run, each sample was tested in duplicate. Repeatability (Intra-Assay-Coefficient of variation) & Reproducibility (Inter-Assay-Coefficient of variation) were calculated.

	Mean (AU/mL)	Within-Run (Repeatability)		Between-Run (Reproducibility)	
		SD	%CV	SD	%CV
#1	6.22	0.38	5.93	0.88	14.11
#2	14.40	0.88	6.37	1.65	11.44
#3	21.13	0.78	3.78	1.77	8.37
#4	32.03	1.62	5.00	1.77	5.52

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. SARS-CoV-2 infections emerged in December 2019 in Wuhan, China. The expected prevalence values for blood donors from before December 2019 therefore amount to 0 %.

The diagnostic specificity was determined by testing 392 specimens from asymptomatic individuals without a history of SARS-CoV-2 infection either confirmed by a negative PCR result or based on the time of sampling before emergence of SARS-CoV-2.

Sample Panel	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative	Specificity (Eqv excluded)	95 % CI
Blood donors (Germany)	258	0	1	257	100 %	
Blood donors (US)	134	2	0	132	98.51 %	
Total	392	2	1	389	99.49 %	98.16 - 99.94 %

10.3. Diagnostic Sensitivity

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

A total of 146 samples from patients tested positive for SARS-CoV-2 RNA by RT-PCR were analyzed on the SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG ELISA. Of these, 66 samples were from 48 symptomatic patients and 80 samples were from asymptomatic patients.

To determine the diagnostic sensitivity, the samples were sorted by the timing post symptom onset.

Days post symptom onset	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative	Sensitivity (Eqv excluded)
0-7	12	2	0	10	16.67 %
8-14	20	15	1	4	78.95 %
≥ 15	34	33	1	0	100 %
asymptomatic	80	73	4	3	96.05 %

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.

10.4. Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD), Limit of Quantitation (LoQ)

The LoB, LoD and LoQ were determined according to the approved guideline "CLSI. *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012".

LoB: 2.4 AU/mL

LoD: 3.6 AU/mL

LoQ: 12.3 AU/mL

10.5. Linearity

Evaluation of assay linearity was performed according to the recommendations in "CLSI. *Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures*. 2nd ed." CLSI guideline EP06. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. The SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG shows linearity from **STD 5** to **STD 1** with deviation from linearity within ± 15 %.

10.6. Method Comparison

		CLIA (Spike)			Total
		Positive	Equivocal	Negative	
SARS CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG	Positive	33	0	1	34
	Equivocal	2	0	0	2
	Negative	2	0	34	36
Total		37	0	35	72

Positive Percent Agreement (PPA): 94.29 %
 Negative Percent Agreement (NPA): 97.14 %
 Overall Percent Agreement (OPA): 95.71 %
 (Equivocal samples on both assays excluded from calculation)

		ELISA (Spike)			Total
		Positive	Equivocal	Negative	
SARS CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG	Positive	30	1	3	34
	Equivocal	1	0	1	2
	Negative	0	1	35	36
Total		31	2	39	72

Positive Percent Agreement (PPA): 100 %
 Negative Percent Agreement (NPA): 92.11 %
 Overall Percent Agreement (OPA): 95.59 %
 (Equivocal samples on both assays excluded from calculation)

10.7. Interferences

The SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG ELISA was evaluated for interferences according to guideline EP07-A3 ("Interference Testing in Clinical Chemistry" from the Clinical and Laboratory Standards Institute). Four samples, two equivocal, a moderate positive and a high positive sample were spiked with high levels of interferents and were tested along with the unspiked sample. The following table shows the tested substances added to patient samples at the indicated concentrations. These correspond to the recommendations in the CLSI guideline to represent pathological elevated concentrations in patient samples.

Interferent	Concentration tested
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin	0.4 mg/mL
Cholesterol	4 mg/mL
Hemoglobin	10 mg/mL
Triglycerides	15 mg/mL

No clinically significant interference effect was found for all tested substances in the SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG ELISA.

10.8. Cross Reactivity

65 samples with antibody activities to potentially cross reacting parameters (including antibodies to several members of the Coronaviridae family) were tested to evaluate the cross reactivity of the assay.

Samples positive for antibodies to	Number of samples (n)	Positive	Equivocal	Negative
human coronavirus 229E (HCoV-229E)	5	0	1	4
human coronavirus NL63 (HCoV-NL63)	5	0	1	4
human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1)	5	0	0	5
human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)	5	0	0	5
ANA	5	0	0	5
Haemophilus influenzae	5	1	1	3
hepatitis B virus (HBV)	5	0	0	5
hepatitis C virus (HCV)	5	0	0	5
HIV	10	0	0	10
Influenza A virus	5	0	0	5
Influenza B virus	5	0	0	5
Respiratory syncytial virus (RSV)	5	0	0	5

Cross reactions with antibodies to Haemophilus influenzae cannot be excluded. Cross reactivity with other human coronaviruses should be considered for result interpretation.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 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 additionally use known samples

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

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

WASH	CONC	20x	CONJ	IgG	SAMPLE	DIL
------	------	-----	------	-----	--------	-----



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

STOP	CITRATE
------	---------



Warning	H290 H319 P234 P280 P305+P351+P338 P337+P313 P390	May be corrosive to metals. Causes serious eye irritation. Keep only in original container. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Absorb spillage to prevent material damage.
----------------	---	---

Further information can be found in the safety data sheet

12.2. Disposal Considerations

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

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	CVGQ0970	SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG	(96 Determinations)
------------	----------	--	---------------------

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

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

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

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

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

Zu den klinischen Manifestationen der SARS-CoV-2-assoziierten COVID-19 Erkrankung zählen Fieber, Husten, Atembeschwerden und Müdigkeit. Bei den meisten Patienten manifestiert sich die Infektion mit Symptomen einer leichten fieberhaften Erkrankung mit irregulären Lungeninfiltraten. Das ursprüngliche klinische Anzeichen von COVID-19, das eine Diagnose ermöglichte, war eine Lungenentzündung. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Krankheitsverlauf unspezifisch ist und stark variiert: von asymptomatischen Verläufen bis hin zu einer schweren Lungenentzündung mit Lungenversagen und Tod.

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

Die Behandlung beschränkt sich auf unterstützende Maßnahmen in Abhängigkeit vom Schweregrad des Krankheitsbildes (z.B. Sauerstoffgabe, Flüssigkeitsmanagement etc.) sowie auf die Behandlung relevanter Grunderkrankungen. Verschiedene spezifische Therapieansätze (direkt antiviral, immunmodulatorisch wirksam) wurden und werden im Verlauf der SARS-CoV-2-Pandemie im Rahmen von Studien untersucht.

Das SARS-CoV-2 Oberflächen-Spike-Glykoprotein (S) ist ein wichtiges Ziel für Präventivmaßnahmen, da es im Lebenszyklus des Virus eine entscheidende Rolle spielt und das primäre Ziel von neutralisierenden Antikörpern ist. Daher steht das trimere Spike-Protein im Mittelpunkt der meisten Impfstoffdesign- und Entwicklungsbestrebungen.

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

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT): z.B. RT-PCR
- Serologie: Nachweis von Antikörpern durch z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Test ist bestimmt zum quantitativen und qualitativen Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen das Spike-Protein von SARS-CoV-2 („Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) in humanem Serum (venös, kapillar) oder Plasma (Citrat, Heparin, EDTA). Er dient zur Unterstützung der Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf eine COVID-19 Erkrankung oder eine asymptomatische Infektion mit SARS-CoV-2, zur Überwachung der Antikörperlevel sowohl während und nach einer COVID-19 Erkrankung als auch zur Bestimmung der Antikörperlevel vor und nach einer COVID-19 Impfung.

3. TESTPRINZIP

Die quantitative oder qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschritt wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit säurehaltiger Stopplösung gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **MTP**, Mikrotiterplatte: 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit trimerem SARS-CoV-2 Spike Antigen (gewonnen aus humaner Zellkultur); in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
 - **SAMPLE DIL**, Probenverdünnungspuffer: 2 Flaschen mit je 50 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; enthält Tween 20; pH 7,2 ± 0,2; blau gefärbt; gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
 - **STOP CITRATE**, Stopplösung: 1 Flasche mit 7,5 mL Zitronensäure (1 M); < 1 % Salzsäure; < 2 % Schwefelsäure; pH < 1,2; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
 - **WASH CONC 20x**, Waschpuffer (20x konz.): 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,16 M); pH 7,0 – 7,5; zum Waschen der Kavitäten; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
 - **CONJ IgG**, Konjugat: 1 Flasche mit 13,5 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Pufferlösung; mit Protein stabilisator; grün gefärbt; gebrauchsfertig; grüne Verschlusskappe; ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
 - **TMB SOLN**, TMB-Substratlösung: 1 Flasche mit 13,5 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB); gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
 - **STD 1-5**, Standards: 5 Fläschchen mit jeweils 2 mL Standardlösung; gebrauchsfertig.
 - **STD 1** rosa Verschlusskappe
 - **STD 2** hell-blaue Verschlusskappe
 - **STD 3** blaue Verschlusskappe
 - **STD 4** dunkel-blaue Verschlusskappe
 - **STD 5** rote Verschlusskappe
- Angaben zu den Konzentrationen von **STD 1-5** in AU/mL und deren Korrelation zum „Ersten Internationalen WHO Standard für anti-SARS-CoV-2 Immunglobulin (human)“ NIBSC Nummer: 20/136, des National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, UK, sind dem **CoA** zu entnehmen.
- **CTR NEG**, Negativkontrolle: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gebrauchsfertig; hell-grüne Verschlusskappe. Konzentration und Zielwert sind im **CoA** angeben.
 - **CTR POS**, Positivkontrolle: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gebrauchsfertig; grüne Verschlusskappe. Konzentration und Zielwert sind im **CoA** angeben.

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 3 selbstklebende Abdeckfolien
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Analysezertifikat, **CoA** mit Informationen zu Konzentrationen und Zielwerten von **STD 1-5**, **CTR NEG** und **CTR POS**

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450/620 nm (Referenzwellenlänge 620-690 nm)
- Inkubator 37 °C
- Abdeckung für ELISA-Platten (alternativ zu selbstklebender Abdeckfolie)
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Laborwecker

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Der Kit und alle Komponenten sind bei 2...8 °C zu lagern wenn sie nicht in Gebrauch sind.

- Die Verwendbarkeit des ungeöffneten Kits ist auf der Kitschachtel und im **CoA** angegeben.
- Die Verwendbarkeit der einzelnen ungeöffneten Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.
- Das **CONJ | IgG** und die **TMB | SOLN** sind dunkel zu lagern.
- Nur die benötigten Volumina der Reagenzien entnehmen und überschüssige Mengen nicht in die Gefäße zurückfüllen.

Komponente	Nach dem Anbruch	
	Lagerung	Verwendbarkeit
MTP	2...8 °C (im mitgelieferten Aluminiumbeutel mit Trockenmittel)	3 Monate
CTR NEG CTR POS STD 1-5	2...8 °C	
SAMPLE DIL		
STOP CITRATE		
CONJ IgG	2...8 °C (lichtgeschützt)	
TMB SOLN		
WASH CONC 20X	2...8 °C	3 Monate
	2...25 °C gebrauchsfertiger Ansatz	4 Wochen

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

6.1. Mikrotiterplatte

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

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Füllen Sie das **WASH | CONC | 20x** (50 mL) mit destilliertem Wasser auf 1 L zu einer Endverdünnung von 1:20 (1+19) auf. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur (20...25 °C) bringen und erst dann verdünnen. Vor der Verwendung den gebrauchsfertigen Waschpuffer gut durchmischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die Lösung ist gebrauchsfertig und bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung sollte farblos sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, könnte sie kontaminiert sein und sollte verworfen werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin, EDTA) aus venösem Blut (weiteres Probenmaterial siehe 7.1. Zusätzliches Probenmaterial) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst sollten sie aliquotiert und tiefgefroren (-70...-20 °C) werden. Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Zusätzliches Probenmaterial

Als Probenmaterial eignet sich auch Serum aus Kapillarblut, z.B aus der Fingerbeere, das mit dem Sarstedt Microvette® 100 Serum (Produktnummer 20.1308) gewonnen wurde.

Wichtig: Verwenden Sie Vollblut nicht direkt mit dem Assay!

7.2. Probenverdünnung

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Kapitel 12 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 Rahmen 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.

Für die **quantitative** Testdurchführung müssen **STD 1-5** (in Duplikaten), **CTR NEG** und **CTR POS** pipettiert werden. Deren zugehörige Zielwerte sind im **CoA** spezifiziert.

Für die **qualitative** Testdurchführung müssen **SAMPLE DIL**, Standard **STD #** (als Duplikat), **CTR NEG**, und **CTR POS** pipettiert werden. Deren zugehörige Zielwerte sind im **CoA** spezifiziert.

Quantitative Testdurchführung	Qualitative Testdurchführung
1. Je 100 µL SAMPLE DIL als Leerwert (LW), STD 1-5 , CTR NEG , CTR POS und verdünnte Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.	1. Je 100 µL SAMPLE DIL als Leerwert (LW), STD # , CTR NEG , CTR POS und verdünnte Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken. 3. 30 min bei 37 ± 1 °C inkubieren. 4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend viermal mit 300-350 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt! 5. Zugabe von jeweils 100 µL CONJ IgG in alle Kavitäten. 6. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken. 7. 30 min bei 37 ± 1 °C inkubieren. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen. 8. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen. 9. Zugabe von jeweils 100 µL TMB SOLN in alle Kavitäten. 10. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken. 11. 30 min im Dunkeln bei 37 °C inkubieren. Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt. 12. Zugabe von 50 µL STOP CITRATE in alle Kavitäten in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit wie für das TMB SOLN , dabei findet ein Farbwechsel von blau nach gelb statt. Platte vorsichtig und gründlich schütteln, bis die Flüssigkeit vollständig vermischt ist und eine homogene gelbe Farbe sichtbar ist. 13. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm (Referenzwellenlänge von 620-690 nm) innerhalb von 1 h nach Zugabe von STOP CITRATE messen.	

8.1. Messung

Extinktion aller Kavitäten bei 450 nm messen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620-690 nm wird empfohlen.

Sofern zutreffend, die **Mittelwerte der Extinktionen aller Duplikate** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Die Extinktionswerte des Leerwertes (LW), der **CTR|NEG**, der **CTR|POS** und der **STD|1-5** müssen die Spezifikationen erfüllen, die im **CoA** angegeben sind.

Die berechneten Werte in Units von **CTR|NEG** und **CTR|POS** müssen innerhalb der im **CoA** aufgeführten Bereiche liegen. Wenn eine der oben genannten Anforderungen für OD-Werte oder Unit-Werte nicht erfüllt ist, muss der Test wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

9.2.1. Qualitative Ergebnisse

Cut-off-Berechnung

Korrekturfaktor (CF): Zur Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben wurde ein Cut-off-Wert definiert. Dieser Cut-off-Wert ist mit dem spezifischen Standard **STD|#** durch einen lotspezifischen Korrekturfaktor korreliert (siehe **CoA**).

Der Extinktionswert des Cut-off berechnet sich aus dem Mittelwert der Extinktionswerte des **STD|#** x Korrekturfaktor (CF):

$$\text{OD Cut-off } (\pm 10 \text{ AU}) = \frac{\text{STD|#} \text{ OD1} + \text{STD|#} \text{ OD2}}{2} \times \text{CF}$$

Ergebnisse in Arbitrary Units

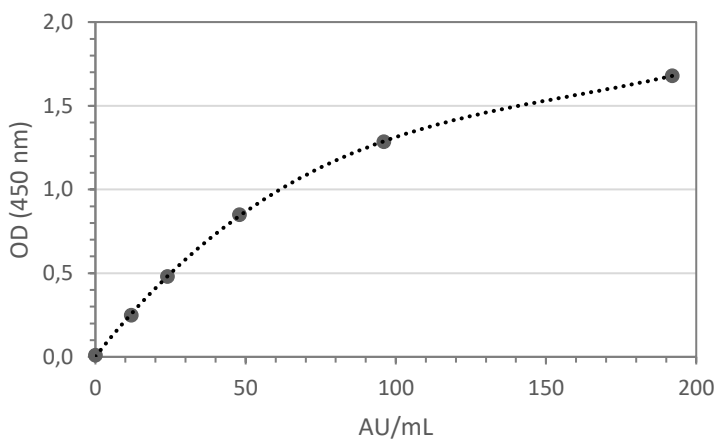
$$\frac{\text{Probe (Mittelwert) Extinktionswert} \times 10}{\text{Cut-off}} = \text{AU (Arbitrary Units)}$$

Beispiel: $\text{OD}_{\text{Probe}} = 1.591; \text{OD}_{\text{Cut-off}} = 0.43 \Rightarrow \frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ AU}$

9.2.2. Quantitative Ergebnisse

Um **quantitative Ergebnisse in AU/mL** oder **IU/mL** zu erhalten, tragen Sie die Extinktionswerte (Mittelwerte) der **STD|1-5** und des Leerwertes (LW) auf der y-Achse gegen ihre entsprechende Konzentration (siehe **CoA**) auf der x-Achse auf und erstellen Sie die am besten an die aufgetragenen Punkte angepasste Kurve. Anhand dieser Kalibrierungskurve/Standardkurve lassen sich die Ergebnisse der gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben und Kontrollen ablesen.

Typische Kalibrierungskurve



Angabe der Ergebnisse in internationalen Einheiten (IU/mL)

Der SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG Test wurde gegen den "First WHO International Standard for anti-SARS CoV-2 immunoglobulin (human)" NIBSC code: 20/136 kalibriert.

Die chargenspezifische Zuordnung der Internationalen Standardeinheiten (IU/mL) für **STD|1-5** entnehmen Sie bitte dem **CoA**. Führen Sie die Berechnung für die Patientenproben wie oben beschrieben durch und verwenden Sie IU/mL für die Standards anstelle von AU/mL.

9.3. Interpretation der Ergebnisse

qualitativ	quantitativ	Interpretation
< 9 AU	< 9 AU/mL	Kein signifikanter Gehalt an Antikörpern gegen SARS-CoV-2 in der Patientenprobe. Das Ergebnis schließt jedoch eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus. Der serologische Nachweis erfolgt am besten durch die Untersuchung von gepaarten Proben aus der Akut- und Rekonvaleszenzphase, die im Abstand von mehreren Wochen gewonnen wurden.
9 – 11 AU	9 – 11 AU/mL	Grenzwertige Ergebnisse sollten nur als erster Hinweis auf den Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 interpretiert werden. Bei grenzwertigen Testergebnissen werden zusätzliche Tests empfohlen. Der serologische Nachweis erfolgt am besten durch die Untersuchung von gepaarten Proben der Akut- und Rekonvaleszenzphase, die im Abstand von 2 bis 4 Wochen gewonnen werden. Ist das Ergebnis erneut grenzwertig, wird die Probe als negativ beurteilt.
> 11 AU	> 11 AU/mL	Antikörper gegen SARS-CoV-2 mutmaßlich in Patientenprobe nachgewiesen. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) kann angenommen werden.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit sollte nicht auf der Grundlage eines einzelnen Testergebnisses gestellt werden. Eine genaue Diagnose sollte sowohl die klinische Anamnese, die Symptomatik als auch serologische Daten mit einbeziehen. Bei immungeschwächten Patienten und Neugeborenen haben serologische Daten nur einen eingeschränkten Wert.

Der SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG wurde gegen den „First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human)“, NIBSC-Code: 20/136, kalibriert. Die quantitativen Ergebnisse in IU/mL liefern Informationen über die Level der vorhandenen IgG-Antikörper.

Wichtig: Es liegen noch keine verlässlichen Daten über den Zusammenhang zwischen IgG-Titer mit dem Vorhandensein oder der Dauer eines Immunschutzes nach Infektion oder Impfung vor.

10. TESTMERKMALE

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

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

10.1. Präzision

Ein Präzisionsproben-Panel, bestehend aus einer negativen, einer schwach positiven, einer mäßig positiven und einer hoch positiven Probe, wurde in insgesamt 11 unabhängigen Läufen über einen Zeitraum von 6 Tagen getestet. Die Tests wurden einzeln von drei verschiedenen Personen durchgeführt. Innerhalb jedes Laufs wurde jede Probe in doppelter Ausführung getestet. Wiederholbarkeit (Intra-Assay-Variationskoeffizient) & Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Variationskoeffizient) wurden berechnet.

	Mittelwert (AU/mL)	Within-Run (Wiederholbarkeit)		Between-Run (Reproduzierbarkeit)	
		SD	%CV	SD	%CV
#1	6,22	0,38	5,93	0,88	14,11
#2	14,40	0,88	6,37	1,65	11,44
#3	21,13	0,78	3,78	1,77	8,37
#4	32,03	1,62	5,00	1,77	5,52

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Infektionen mit SARS-CoV-2 tauchten im Dezember 2019 in Wuhan, China, auf. Die erwarteten Prävalenzwerte für Blutspender von vor Dezember 2019 betragen daher 0 %.

Die diagnostische Spezifität wurde durch die Untersuchung von 392 Proben von asymptomatischen Personen ohne Vorgeschichte einer SARS-CoV-2-Infektion bestimmt, die entweder durch ein negatives PCR-Ergebnis bestätigt wurden oder deren Zeitpunkt der Probenahme vor dem Auftreten von SARS-CoV-2 lag.

Probenpanel	Probenanzahl (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ	Spezifität (GW ausgeschlossen)	95 % CI
Blutspender (Deutschland)	258	0	1	257	100 %	
Blutspender (US)	134	2	0	132	98,51 %	
Total	392	2	1	389	99,49 %	98,16 – 99,94 %

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern.

Insgesamt 146 Proben von Patienten, die mittels RT-PCR positiv auf SARS-CoV-2-RNA getestet wurden, wurden mit dem quantitativen SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA analysiert. Davon stammten 66 Proben von 48 symptomatischen Patienten und 80 Proben von asymptomatischen Patienten.

Um die diagnostische Sensitivität zu bestimmen, wurden die Proben entsprechend des Zeitpunkts nach Auftreten der Symptome sortiert.

Tage nach Symptombeginn	Probenanzahl (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ	Sensitivität (GW ausgeschlossen)
0-7	12	2	0	10	16,67 %
8-14	20	15	1	4	78,95 %
≥ 15	34	33	1	0	100 %
asymptomatisch	80	73	4	3	96,05 %

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

10.4. Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD), Limit of Quantitation (LoQ)

LoB, LoD und LoQ wurden gemäß der Richtlinie "CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012" bestimmt.

LoB: 2,4 AU/mL

LoD: 3,6 AU/mL

LoQ: 12,3 AU/mL

10.5. Linearität

Die Evaluierung der Test-Linearität erfolgte gemäß den Empfehlungen in "CLSI. Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures. 2nd ed." CLSI guideline EP06. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. Der SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG zeigt eine Linearität von **STD 5** bis **STD 1** mit einer maximalen Abweichung von ± 15 %.

10.6. Methoden Vergleich

		CLIA (Spike)			Total
		Positiv	Grenzwertig	Negativ	
SARS CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG	Positiv	33	0	1	34
	Grenzwertig	2	0	0	2
	Negativ	2	0	34	36
	Total	37	0	35	72

Positiv Prozentuale Übereinstimmung (PPA): 94.29 %

Negativ Prozentuale Übereinstimmung (NPA): 97.14 %

Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): 95.71 %

(Grenzwertige Proben bei beiden Testen von der Berechnung ausgeschlossen)

		ELISA (Spike)			Total
		Positiv	Grenzwertig	Negativ	
SARS CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG	Positiv	30	1	3	34
	Grenzwertig	1	0	1	2
	Negativ	0	1	35	36
	Total	31	2	39	72

Positiv Prozentuale Übereinstimmung (PPA): 100 %

Negativ Prozentuale Übereinstimmung (NPA): 92.11 %

Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): 95.59 %

(Grenzwertige Proben bei beiden Testen von der Berechnung ausgeschlossen)

10.7. Interferenzen

Der quantitative SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG-ELISA wurde gemäß der Richtlinie EP07-A3 ("Interference Testing in Clinical Chemistry" des Clinical and Laboratory Standards Institute) auf Interferenzen untersucht. Vier Proben, zwei grenzwertige, eine mäßig positive und eine hoch positive Probe wurden mit hohen Konzentrationen von Störsubstanzen versetzt und zusammen mit der nicht versetzten Probe getestet.

Die folgende Tabelle zeigt die getesteten Substanzen, die den Patientenproben in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Diese entsprechen den Empfehlungen in der CLSI-Richtlinie zur Darstellung pathologisch erhöhter Konzentrationen in Patientenproben.

Interferierende Substanz	Getestete Konzentration
Albumin	60 mg/mL
Bilirubin	0,4 mg/mL
Cholesterin	4 mg/mL
Hämoglobin	10 mg/mL
Triglyceride	15 mg/mL

No clinically significant interference effect was found for all tested substances in the SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG ELISA.

10.8. Kreuzreaktivitäten

65 Proben mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter (einschließlich Antikörper gegen mehrere Mitglieder der Coronaviridae-Familie) wurden getestet, um die Kreuzreaktivität des Assays zu bewerten.

Proben positiv für Antikörper gegen	Probenanzahl (n)	Positiv	Grenzwertig	Negativ
humanes Coronavirus 229E (HCoV-229E)	5	0	1	4
humanes Coronavirus NL63 (HCoV-NL63)	5	0	1	4
humanes Coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1)	5	0	0	5
humanes Coronavirus OC43 (HCoV-OC43)	5	0	0	5
ANA	5	0	0	5
Haemophilus influenzae	5	1	1	3
Hepatitis B Virus (HBV)	5	0	0	5
Hepatitis C Virus (HCV)	5	0	0	5
HIV	10	0	0	10
Influenza A Virus	5	0	0	5
Influenza B Virus	5	0	0	5
Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV)	5	0	0	5

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Haemophilus influenzae können nicht ausgeschlossen werden. Die Kreuzreaktivität mit anderen humanen Coronaviren sollte bei der Ergebnisinterpretation berücksichtigt werden.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung 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.

12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

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

WASH	CONC	20x	CONJ	IgG	SAMPLE	DIL
------	------	-----	------	-----	--------	-----

Achtung



H317
P261
P280
P302+P352
P333+P313
P362+P364

Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Aerosol nicht einatmen.
Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen.
BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

STOP	CITRATE
------	---------

Achtung



H290
H319
P234
P280
P305+P351+P338

P337+P313
P390

Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
Verursacht schwere Augenreizung.
Nur im Originalbehälter aufbewahren.
Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen.
BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.

12.2. Entsorgungshinweise

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

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: CVGQ0970 SARS-CoV-2 (COVID-19) quantitative IgG (96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Alexander E. Gorbalenya; Susan C. Baker; Ralph S. Baric; Raoul J. de Groot; Christian Drosten; Anastasia A. Gulyaeva et al. (2020): The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. In *Nature microbiology* 5 (4), pp. 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.

Amanat, Fatima; Stadlbauer, Daniel; Strohmeier, Shirin; Nguyen, Thi H. O.; Chromikova, Veronika; McMahon, Meagan et al. (2020): A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. In *Nature medicine* 26 (7), pp. 1033–1036. DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5.

Galipeau, Yannick; Greig, Matthew; Liu, George; Driedger, Matt; Langlois, Marc-André (2020): Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. In *Frontiers in immunology* 11, p. 610688. DOI: 10.3389/fimmu.2020.610688.

Liu, Lihong; Wang, Pengfei; Nair, Manoj S.; Yu, Jian; Rapp, Micah; Wang, Qian et al. (2020): Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. In *Nature* 584 (7821), pp. 450–456. DOI: 10.1038/s41586-020-2571-7.

Prévost, Jérémie; Gasser, Romain; Beaudoin-Bussièrès, Guillaume; Richard, Jonathan; Duerr, Ralf; Laumaea, Annemarie et al. (2020): Cross-Sectional Evaluation of Humoral Responses against SARS-CoV-2 Spike. In *Cell Reports. Medicine* 1 (7), p. 100126. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100126.

RKI (Ed.): Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19.

Available online at https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. (accessed: 08.02.2021)

WHO: Clinical management of COVID-19. Interim guidance. 27 May 2020.

Available online at <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>, WHO Reference Number: WHO/2019-nCoV/clinical/2020.5, accessed: 08.02.2021.

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

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

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

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

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
CoA	Certificate of Analysis / Analysezertifikat / Certificat d'Analyse / Certificato di Analisi / Certificado de Análisis / Certificado de Análise
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaques de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulacions / Placa de Microtitulação
CONJ IgG	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
STD 1-5	Standard 1-5 / Standard 1-5 / Standard 1-5 / Standard 1-5 / Estándar 1-5 / Standard 1-5
STD #	Lot-specific Standard for cut-off calculation / Chargenspezifischer Standard für Cut-Off-Berechnung / Norme spécifique au lot pour le calcul du seuil / Standard specifico del lotto per il calcolo del cut-off / Norma específica del lote para el cálculo del corte / Padrão específico do lote para cálculo de corte
CTR NEG	Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle Négatif / Controllo Negativo / Control Negativo / Controle Negativo
CTR POS	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle Positif / Controllo Positivo / Control Positivo / Controle Positivo
SAMPLE DIL	IgG Sample Dilution Buffer / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon IgG / Tampone di Diluizione del Campione IgG / Tampón de dilución de Muestras IgG / Tampão de Diluição de Amostra IgG
STOP CITRATE	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio
TMB SOLN	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução Substrato TMB
WASH CONC 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes
RTU	Ready to use / gebrauchsfertig / prêt à l'emploi / pronto all'uso / listo para usar / pronto para uso

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

SCHEME OF THE ASSAY

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

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

	SAMPLE DIL	STD 1-5	STD #	CTR NEG	CTR POS	Sample (diluted 1+100)
Quantitative Procedure	100 µL	100 µL	-	100 µL	100 µL	100 µL
Qualitative Procedure	100 µL	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Cover wells with foil supplied in the kit
Incubate for 30 min at 37±1 °C

Wash each well four times with 300-350 µL of Washing Buffer

Add 100 µL **CONJ | IgG** to all wells
Cover wells with foil supplied in the kit
Incubate for 30 min at 37±1 °C
Do not expose to direct sunlight

Wash each well four times with 300-350 µL of Washing Buffer

Add 100 µL **TMB | SOLN** to all wells
Cover wells with foil supplied in the kit
Incubate for 30 min at 37±1 °C in the dark

Add 50 µL **STOP | CITRATE**

Photometric measurement at 450/620 nm
(reference wavelength: 620-690 nm)



NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Germany

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

Fax: +49 (0) 6074-487629

CVGQ0970_rev01_2021-02-11