

ENZY-WELL



DIESSE

SARS-CoV-2 IgM

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Via delle Rose, 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

REF 91401 (96 tests)





INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

Pour la détermination qualitative des anticorps IgM anti-SRAS-CoV-2.

Uniquement pour diagnostic in vitro

1. UTILISATION

Méthode immunoenzymatique pour la détection qualitative des anticorps IgM anti-SRAS-CoV-2 dans le sérum humain.

2. INTRODUCTION

Les coronavirus sont des virus à ARN simple brin positif de la famille des Coronaviridae et sont subdivisés en quatre genres : Alpha, Beta, Delta et Gammacoronavirus. Les CoV sont couramment présents chez de nombreuses espèces animales. Les CoV présents chez les animaux peuvent subir des mutations génétiques dues à des erreurs lors de la réplication de du génome, ce qui peut étendre leur tropisme aux humains. Au total, six types de CoV humains ont été identifiés comme responsables de troubles respiratoires chez l'homme, dont deux CoV alpha et quatre CoV bêta (les deux plus récents sont les SRAS-CoV et les MERS-CoV). En général, ces CoV provoquent une infection asymptomatique ou de graves maladies respiratoires aiguës, accompagnées de fièvre, de toux et d'essoufflement. Cependant, d'autres symptômes tels que des gastro-entérites et des maladies neurologiques plus ou moins sévères ont également été signalés. Depuis décembre 2019, l'Organisation mondiale de la santé a signalé le septième bêtacoronavirus humain (2019-nCoV) responsable d'une épidémie de pneumonie. Ce nouveau virus est lié à un foyer de syndrome respiratoire fébrile dans la ville de Wuhan (province de Hubei) en Chine. Certains patients atteints de 2019-nCoV ont développé une pneumonie sévère, un œdème pulmonaire, un SDRA ou une insuffisance de plusieurs organes et sont décédés. À l'heure actuelle, on dispose de peu d'informations sur l'épidémiologie et les caractéristiques cliniques de la pneumonie causée par le 2019-nCoV. La surveillance des titres des anticorps peut servir d'indication du degré de l'infection : les IgA et les IgM apparaissent au cours des premiers jours puis, les IgG deviennent prédominants à mesure que la maladie progresse.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigène se lie à la phase solide. Les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène après incubation en présence de sérum humain dilué. Après lavage visant à éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, on effectue l'incubation avec le conjugué constitué d'anticorps monoclonaux anti-IgM humains conjugués à de la peroxydase de raifort. Le conjugué non lié est éliminé et le substrat de la peroxydase est ajouté. La coloration bleue qui se développe est proportionnelle à la concentration des anticorps spécifiques présents dans le sérum examiné.

Lorsque la réaction enzymatique est interrompue par ajout d'une solution d'acide sulfurique, la coloration vire au jaune. La couleur, proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans le sérum, peut être lue dans un lecteur de microplaques.

4. PRÉCAUTIONS

Ce kit contient des matières d'origine humaine qui ont été testées et jugées négatives lors de tests approuvés pour la recherche de HbsAg et des anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC. Étant donné qu'aucun test diagnostique ne peut offrir une garantie absolue quant à l'absence d'agents infectieux, toute matière d'origine humaine doit être considérée comme étant potentiellement infectée. Tous les réactifs et les échantillons doivent être manipulés conformément aux normes de sécurité habituellement adoptées par le laboratoire.

Élimination des résidus : les échantillons de sérum et les réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés, puis éliminés conformément à la législation en vigueur.

Avertissements relatifs à la sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche.
2. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et pendant le test.
3. Se laver soigneusement les mains après avoir terminé le test.
4. Le matériel non à usage unique doit être stérilisé après utilisation, de préférence en autoclave à 121 °C pendant 1 h. Tous les produits à usage unique doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.
5. L'acide chlorhydrique 2M utilisé pour laver la verrerie est corrosif ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.
6. Les acides neutralisés et autres déchets liquides doivent être désinfectés en ajoutant de l'hypochlorite de sodium à un volume suffisant pour atteindre une concentration finale d'au moins 1 %. Une exposition à 1% d'hypochlorite de sodium pendant 30 minutes devrait suffire à garantir une désinfection efficace.
7. Tout déversement de substances potentiellement infectées doit être immédiatement éliminé avec du papier absorbant ; la zone contaminée devra être décontaminée, par exemple avec de l'hypochlorite de sodium à 1%, avant de poursuivre le travail. Si un acide est présent, l'hypochlorite de sodium ne doit pas être utilisé avant que la zone ne soit parfaitement sèche. Tout matériel (notamment les gants) utilisé pour décontaminer les zones salies par d'éventuels déversements accidentels, doit être considéré comme potentiellement infecté et éliminé. Ne pas mettre placer de matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium en autoclave.

Précautions analytiques

1. La D.O. du Cut-Off, des contrôles et des échantillons peut légèrement varier d'une plaque à une autre. Par

conséquent, si vous utilisez des barrettes provenant de plaques différentes dans la même session, même si elles proviennent du même lot, il est nécessaire de répéter la détermination du Cut-Off.

2. Attendre que les réactifs aient atteint la température ambiante (18-30 °C) avant leur utilisation. Immédiatement après leur utilisation, remettre les réactifs à la température de stockage recommandée.
3. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé au moins une demi-heure à température ambiante.
4. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption. Éviter toute contamination microbienne des réactifs pour ne pas altérer la validité du produit ce qui pourrait entraîner des résultats erronés.
5. Ne pas modifier la procédure et ne pas remplacer les réactifs par des produits d'autres fabricants ou d'autres lots, sauf s'il est spécifiquement indiqué que le réactif est interchangeable d'un lot à l'autre. Ne pas réduire les temps d'incubation recommandés.
6. Toute verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique 2M et rincée à l'eau distillée ou déminéralisée.
7. Ne pas exposer les réactifs à une forte lumière ou à des vapeurs d'hypochlorite pendant leur stockage ou leur incubation.
8. Ne pas laisser les puits dessécher pendant le test.
9. Ne pas utiliser de congélateurs à dégivrage automatique pour la conservation des échantillons.
10. Éviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « prévues à cet effet » pour l'utilisation avec le substrat et le conjugué.
11. Éviter de toucher le bord du puits avec le conjugué.
12. Ne pas souffler sur les microplaques.
13. Les dosages immunoenzymatiques peuvent parfois présenter un effet de bord particulier (« edge effect ») ; on peut minimiser cet effet en augmentant l'humidité durant les phases d'incubation. Les plaques doivent être recouvertes avec des plaques de couverture et incubées à la température indiquée dans la procédure ou au bain-marie à l'aide d'un porte-plaques ou dans un incubateur. En variante, les plaques peuvent être incubées dans un analyseur approprié. Pour plus de détails, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
14. Avant de lire la plaque, s'assurer que son fond est propre et sec et qu'il n'y a pas de bulles d'air à la surface du liquide.
15. L'utilisation d'échantillons fortement hémolysés, de sérum non complètement coagulé ou d'échantillons présentant une pollution microbienne peut être une source d'erreur.
16. Ne pas contaminer les puits avec la poudre des gants à usage unique.
17. L'utilisation du kit avec des appareils automatiques doit être validée par l'utilisateur.
18. Lire le Manuel d'Utilisation des appareils utilisés, en particulier les chapitres concernant :
 - l'installation et les précautions spécifiques
 - le principe de fonctionnement, les instructions, les précautions et les risques
 - les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument
 - l'entretien et l'assistance technique.

5. COMPOSITION DU KIT ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Les réactifs sont suffisants pour 96 déterminations

Attendre que les réactifs aient atteint la température ambiante avant leur utilisation.

PLAQUE MT MICROPLAQUE (12x8)

Contenu : 1 plaque de 96 puits sensibilisée avec un antigène natif inactivé.

CONJ CONJUGUÉ 1x16 mL

Contenu : Anticorps monoclonaux anti-IgM humains marqués à la peroxydase, dans une solution tampon phosphate contenant 0,05 % de phénol et 0,02 % de Bronidox. Liquide prêt à l'emploi.

CONTROL - CONTRÔLE NÉGATIF 1x0,8 mL

Contenu : Solution protéique ne contenant pas d'anticorps spécifiques capables de fixer l'antigène présent sur la microplaque et le conservateur. Liquide prêt à l'emploi.

CONTROL + CONTRÔLE POSITIF 1x0,8 mL

Contenu : Solution protéique contenant des anticorps spécifiques capables de fixer l'antigène présent sur la microplaque, et un conservateur. Liquide prêt à l'emploi.

CONTROL CUT-OFF CONTRÔLE CUT-OFF 1x0,8 mL

Contenu : Solution protéique contenant des anticorps spécifiques capables de fixer l'antigène présent sur la microplaque, et un conservateur. Liquide prêt à l'emploi.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 1x100 mL

(PF93611)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution protéique dans un tampon phosphate contenant 0,09 % d'azoture de sodium et un colorant (orangé de méthyle).

Usage : À utiliser pour la dilution des échantillons. Liquide prêt à l'emploi.

SAMPLE SORBENT 4 ÉCHANTILLON SORBANT 4 1x7mL

(PF30401)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution protéique dans un tampon phosphate contenant 0,09 % d'azoture de sodium, un colorant (orangé de méthyle) et des anticorps anti-IgG humaines.

Usage : À utiliser pour la dilution des échantillons (en plaque). Liquide prêt à l'emploi.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10x 1x100 mL

(PF93603)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution saline tamponnée (PBS) concentrée 10 fois contenant 0,5 % de Brij.

Préparation : Diluer le volume nécessaire 1:10 avec de l'eau distillée ou déminéralisée pour obtenir le tampon de lavage prêt à l'emploi. Si des cristaux sont présents, les dissoudre à 37 °C avant la dilution.

SUBS TMB SUBSTRAT 1x12 mL
(PF93619)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : 0,26 mg / mL de tétraméthylbenzidine et 0,01% de H₂O₂ stabilisés dans un tampon citrate à 0,05 mol/l (pH 3,8).
Liquide prêt à l'emploi.

H₂SO₄ 0,3 M SOLUTION BLOQUANTE 1x16 mL
(PF93602)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution de H₂SO₄ 0,3 mol/l. Liquide prêt à l'usage.

FILM DE PROTECTION (2).

AUTRE MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI.

- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à OD ≥ 2 000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de fournir des volumes de 225-375 µL
- Eau distillée ou déminéralisée
- Verrerie de laboratoire standard : cylindres, tubes à essai, etc.
- Micropipettes capables de prélever avec précision 10, 100, 1000 µL de solution
- Gants à usage unique
- Minuterie
- Solution à 5 % d'hypochlorite de sodium
- Conteneurs pour la collecte de matériel potentiellement infecté
- Papier absorbant

6. MODE DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à 2-8 °C.

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette extérieure de l'emballage.

Les réactifs ont une stabilité limitée après ouverture et/ou préparation :

MICROPLAQUE	4 semaines à 2-8°C
CONJUGUÉ	8 semaines à 2-8°C
CONTRÔLE POSITIF	8 semaines à 2-8°C
CONTRÔLE NÉGATIF	8 semaines à 2-8°C
CONTRÔLE CUT OFF	8 semaines à 2-8°C
DILUANT 2	jusqu'à péremption à 2-8°C
ÉCHANTILLON SORBANT 4	jusqu'à péremption à 2-8°C
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2-8°C 1 semaine à 15-30°C conserver à l'abri de la lumière
TAMPON DE LAVAGE	2 semaines à 2-8°C 5 jours à 15-30°C
SOLUTION BLOQUANTE	jusqu'à péremption à 2-8°C

7. TYPE D'ÉCHANTILLONS ET CONSERVATION

Les échantillons sont des sérums préparés à partir de prélèvements sanguins obtenus par ponction veineuse et préparés selon les procédures standards de laboratoire.

Les conséquences de l'utilisation d'autres liquides biologiques ne sont pas connues.

Le sérum frais peut être conservé pendant 4 jours entre 2 et 8 °C ; pour des périodes de conservation plus longues, congeler à - 20 °C.

Éviter les décongelations répétées.

Ne pas utiliser de congélateurs à dégivrage automatique pour la conservation des échantillons. Après décongelation, agiter soigneusement l'échantillon avant le dosage.

L'inactivation par chaleur peut induire de faux résultats.

La qualité de l'échantillon peut être fortement compromise par la présence d'une contamination microbienne qui peut induire de faux résultats.

8. PROCÉDURE

PRÉPARATION

Avant le début du test, amener tous les réactifs à température ambiante (18-30 °C).

- Préparer le nombre nécessaire de puits.
- Préparer le tampon de lavage en diluant le Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H₂O).
- Diluer les échantillons au 1:51 en distribuant 10 µL de sérum dans 0,500 ml de diluant.

EXÉCUTION DU TEST

1. Distribution des échantillons :
Distribuer 100 µL de contrôle (positif, négatif ou cut-off).
Distribuer 50 µL de sample sorbent 4 + 50 µL d'échantillon dilué dans chaque puits (une double analyse est préférable).
Le minimum requis est 1 contrôle négatif, 1 contrôle positif et 2 contrôles Cut-Off. (Laisser un puits libre pour le blanc).
2. Incubation :
Incuber pendant 60 ± 5 minutes à température ambiante la plaque recouverte d'un film.
3. Lavage :
Enlever le film de protection, aspirer le contenu de tous les puits et laver 4 fois en remplissant chaque puits avec 300 µL de solution de lavage. Attendre 30 secondes avant chaque lavage.
4. Distribution du conjugué :
100 µL de conjugué dans chaque puits de la plaque.
5. Incubation du conjugué :
Incuber pendant 60 ± 5 minutes à température ambiante la plaque recouverte d'un film.
6. Lavage :
Enlever le film de protection, aspirer le contenu de tous les puits et laver 4 fois en remplissant chaque puits avec 300 µL de solution de lavage. Attendre 30 secondes avant chaque lavage.
7. Distribution du substrat :
Distribuer 100 µL de substrat dans chaque puits de la plaque.
8. Incubation du substrat :
Incuber la plaque à température ambiante pendant 15 minutes.
9. Arrêt de la réaction :
Distribuer 100 µL de solution de blocage dans le même ordre qu'à l'étape 4.
10. Lecture :

Lire les D.O. à 450 nm ou 450/620 nm en 30 minutes. Lire à nouveau à 405 nm si des D.O. sont supérieures à 2 000.

9. PLAN DE L'ESSAI POUR les IgM du SRAS-CoV-2

ÉTAPE 1	Mettre 100 µL de contrôles (positif, négatif et cut-off) et 50 µL de sample sorbent 4 + 50 µL d'échantillon dilué dans les puits. Agiter.
-	-
	Incuber 60 ± 5 min. à température ambiante
-	-
	Laver 4 fois (300 µL)
-	-
ÉTAPE 2	Mettre 100 µL de conjugué dans chaque puits
-	-
	Incuber 60 ± 5 min. à température ambiante
-	-
	Laver 4 fois (300 µL)
-	-
ÉTAPE 3	Ajouter 100 µL de substrat dans chaque puits
-	-
	Incuber 15 min. à température ambiante
-	-
ÉTAPE 4	Ajouter 100 µL de solution bloquante
-	-
	Lire la D.O. à 450 nm ou 450/620 nm dans un délai de 30 min.

10. VALIDATION DU TEST

Blanc : < 0,150

Contrôle négatif : le rapport entre la D.O. du contrôle négatif et la D.O. du cut-off doit être < 0,6.

Contrôle positif : le contrôle positif doit avoir une D.O. d'au moins 1,5 fois celle du sérum cut-off.

Contrôle cut-off : la D.O. du cut-off doit être > 0,2.

Si l'un des résultats des sérums de contrôle n'est pas compris dans la plage d'acceptation, répéter le test. Si le problème persiste, contacter l'assistance scientifique.

Tél. : 0039 0577 319554

Télécopie : 0039 0577 366605

email : scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Calculer le rapport entre la valeur de la D.O. de l'échantillon et celle du Cut-Off (Indice).

L'échantillon est considéré comme :

POSITIF : lorsque l'indice est > 1,1

DOUTEUX : pour toutes les valeurs 0,9-1,1

NÉGATIF : lorsque l'indice est < 0,9

12. LIMITES

Toutes les valeurs obtenues requièrent une interprétation attentive prenant en compte d'autres indicateurs relatifs au patient.

En effet, le test ne peut être utilisé seul pour un diagnostic clinique et le résultat du test doit être évalué avec les données de l'anamnèse du patient et/ou les données d'autres investigations diagnostiques.

13. SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

4 échantillons ont été dosés (2 négatifs et 2 positifs) auxquels ont été ajoutés les substances interférentes suivantes :

Facteur rhumatoïde (44 - 220 IU/ml)

Bilirubine (4,5 - 45 mg/dL)

Triglycérides (10 - 250 mg/dl)

Hémoglobine (5 - 30 mg/ml)

La présence dans le sérum examiné des substances interférentes reportées ci-dessus n'altère pas le résultat du test.

14. RÉACTIONS CROISÉES

77 échantillons positifs à :

Mycoplasma p. (5), le cytomégalovirus (4), le VRS (2), le virus de la grippe B (1), le virus de la grippe A (5), l'adénovirus (3), le facteur rhumatoïde (4), l'ANA (22), le SRAS-CoV (18) et le virus d'Epstein Barr (13) ont été testés.

Aucune réaction croisée significative n'a été observée (à l'exception de Mycoplasma p. (1), le facteur rhumatoïde (1), l'ANA (4), le SRAS-CoV (5) et le virus Epstein-Barr (5).

15. ÉTUDES COMPARATIVES

Au cours d'une étude, 397 échantillons ont été analysés avec le kit Diesse et un test d'immunofluorescence.

Les résultats de l'étude sont résumés ci-dessous :

		Référence		
		+	-	Total
Diesse	+	57	10	67
	-	8	322	330
	Total	65	332	397

Percent Positive Agreement (~Sensibilité Diagnostique) :

87,7% CI 95 % : 77,5-93,6.

Percent Negative Agreement : (~Sensibilité Diagnostique) :

97,0% CI 95 % : 94,5-98,3.

L'analyse des résultats de 29 échantillons dont la date d'apparition des symptômes est connue a montré que la sensibilité des tests ELISA augmente 10 jours après l'apparition des symptômes. Une sensibilité de 87,5 % est atteinte au bout de 12 jours.

Jours écoulés depuis l'apparition des symptômes	Sensibilité
<10	58,3 %
>10	70,6 %
>12	87,5 %

16. PRÉCISION ET REPRODUCTIBILITÉ

Échantillon	Intra-séance		Inter-séances		Inter-lots	
	Moyenne Indice	CV %	Moyenne Indice	CV %	Moyenne Indice	CV %
1	1,6	8,8	1,5	13,3	0,2	25,0*
2	0,5	10,0	2,1	11,9	2,0	7,5
3	1,9	2,6	0,8	11,3	0,5	8,0
4	0,6	10,0	0,7	10,0	1,8	10,6

*Artefact dû à l'effet connu de la variation du coefficient qui devient extrêmement sensible aux variations (même très faibles) lorsque la valeur moyenne est proche de zéro.

17. GUIDE À LA RÉOLUTION DES PROBLÈMES

PROBLÈME	SOURCES D'ERREUR POSSIBLES	MESURES À PRENDRE
Séance non valide (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs dans un ordre incorrect	Contrôler de nouveau la procédure. Contrôler si un réactif n'a pas été ajouté. Répéter le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire le mode d'emploi).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit être jaune pâle). Répéter le test.
Séance non valide (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle aliquote de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
Précision insuffisante	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Erreur de pipetage	Contrôler le fonctionnement de la pipette
	Ajout des réactifs trop lent	Éviter le dessèchement de la plaque après le lavage. Ajouter immédiatement les réactifs
	Présence de bulles d'air	Éviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage
	Chemin optique pas limpide	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec un mouchoir en papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
	Substrat ajouté en volume inadéquat	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

Syndrome-Associated Coronavirus" Journal of clinical microbiology-vol 43 n8 (p.3718-37296); august 2005

- Woo at al. "Detection of specific antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia" Journal of clinical microbiology - vol 42 n5 (2306-2309); May 2004



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy



18. BIBLIOGRAPHIE

- Xintian et al. "Evolution of the novel coronavirus from ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission" Science China Life sciences; January 2020
- Chen et al "Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study". The Lancet, Vol 395 (507-513) February 15, 2020
- Huang et al "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China". The Lancet, Vol 395 (497-506) February 15, 2020
- Yuxian et al. "Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of Severe Acute Respiratory



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

**ENZY-WELL
SARS-CoV-2 IgM**

**Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των
αντισωμάτων κλάσης IgM έναντι του ιού SARS-
CoV-2**

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro

1. ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ανοσοενζυμική μέθοδος για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κλάσης IgM έναντι του ιού SARS-CoV-2 στον ανθρώπινο ορό.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κορωνοϊοί (CoV) είναι ιοί με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Coronaviridae και χωρίζονται σε τέσσερα γένη: Άλφα, βήτα, γάμμα και δέλτα κορωνοϊοί. Οι CoV απαντώνται συνήθως σε πολλά είδη ζώων. Περιστασιακά, οι ζωικοί CoV μπορεί να αποκτήσουν γενετικές μεταλλάξεις μέσω λαθών κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού, γεγονός που μπορεί να διευρύνει περαιτέρω τον τροπισμό του ιού στον άνθρωπο. Συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί έξι τύποι ανθρώπινων CoV που προκαλούν αναπνευστικές διαταραχές στον άνθρωπο. Σε αυτούς περιλαμβάνονται δύο άλφα-CoV και τέσσερις βήτα-CoV (οι δύο πιο πρόσφατοι είναι οι ιοί SARS-CoV και MERS-CoV). Τυπικά, αυτοί οι CoV προκαλούν ασυμπτωματική λοίμωξη ή βαριά οξεία αναπνευστική νόσο, περιλαμβανομένου πυρετού, βήχα και δύσπνοιας. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και άλλα συμπτώματα όπως γαστρεντερίτιδες και νευρολογικές νόσοι ποικίλης βαρύτητας. Τον Δεκέμβριο του 2019, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ανακοίνωσε την ταυτοποίηση του έβδομου ανθρώπινου βήτα-κορωνοϊού (2019-nCoV), ο οποίος προκάλεσε επιδημία πνευμονίας. Ο νέος αυτός ιός συνδέεται με μια εστία εμπύρετης αναπνευστικής νόσου στην πόλη Γουχάν, στην επαρχία Χουμπέ της Κίνας. Ορισμένοι ασθενείς με 2019-nCoV ανέπτυξαν βαριά πνευμονία, πνευμονικό οίδημα, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) ή πολυοργανική ανεπάρκεια και απεβίωσαν. Μέχρι στιγμής, υπάρχουν λιγοστές πληροφορίες για την επιδημιολογία και τα κλινικά χαρακτηριστικά της πνευμονίας που προκαλεί ο 2019-nCoV. Η παρακολούθηση του τίτλου αντισωμάτων μπορεί να δώσει μια ένδειξη για την κατάσταση της λοίμωξης: τις πρώτες ημέρες εμφανίζονται αντισώματα IgA και IgM, ενώ καθώς εξελίσσεται η νόσος, επικρατούν τα αντισώματα IgG.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στη μέθοδο ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Το αντιγόνο ακινητοποιείται στη στερεά φάση. Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες δεσμεύονται στο αντιγόνο μετά από επώαση με αραιωμένο ανθρώπινο ορό. Μετά από πλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το σύζευγμα, που αποτελείται

από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM συζευγμένα με υπεροξειδάση ραφανιδών. Απομακρύνεται το σύζευγμα που δεν δεσμεύθηκε και προστίθεται το υπόστρωμα για την υπεροξειδάση. Το μπλε χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων στον ορό υπό εξέταση.

Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος, και το χρώμα γίνεται κίτρινο. Το χρώμα είναι ανάλογο με την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που υπάρχουν στον ορό και μπορεί να μετρηθεί σε συσκευή ανάγνωσης για μικροπλάκες.

4. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Αυτό το κιτ περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν ελεγχθεί με εγκεκριμένα τεστ και έχουν βρεθεί αρνητικά για HBsAg και για αντισώματα έναντι HIV-1, HIV-2 και HCV. Ωστόσο, επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτα την απουσία μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται δυνητικά μολυσματικό. Ο χειρισμός όλων των αντιδραστηρίων και όλων των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τα πρότυπα ασφαλείας που συνήθως εφαρμόζονται στο εργαστήριο.

Απόρριψη υπολειμμάτων: τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί πρέπει να αντιμετωπίζονται ως μολυσματικά απόβλητα και επομένως να απορρίπτονται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

Οδηγίες για την προσωπική ασφάλεια

1. Μην κάνετε αναρρόφηση από πιπέτα με το στόμα.
2. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά για τα μάτια όταν χειρίζεστε τα δείγματα και κατά τη δοκιμασία.
3. Πλένετε σχολαστικά τα χέρια αφού ολοκληρωθεί το τεστ.
4. Οι επαναχρησιμοποιήσιμες συσκευές πρέπει να αποστειρώνονται μετά τη χρήση. Η προτιμώμενη μέθοδος είναι η αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 1 ώρα στους 121°C. Όλες οι συσκευές μίας χρήσης πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.
5. Το υδροχλωρικό οξύ 2M που χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των γυάλινων σκευών είναι διαβρωτικό. Αυτές οι ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή με τα μάτια, πλύνετε με άφθονο νερό.
6. Τα εξουδετερωμένα οξέα και τα άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται με προσθήκη επαρκούς όγκου υποχλωριώδους νατρίου, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Η έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά θεωρείται επαρκής για να διασφαλιστεί αποτελεσματική απολύμανση.
7. Εάν χυθούν υλικά που ενδέχεται να είναι μολυσμένα, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί, και η μολυσμένη περιοχή πρέπει να απολυμαίνεται, π.χ., με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν συνεχιστεί η εργασία. Εάν τα υλικά που θα χυθούν περιέχουν οξύ, δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί υποχλωριώδες νάτριο πριν στεγνώσει η περιοχή. Όλα τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν για να απολυμανθούν χυμένα υγρά, μαζί με τα γάντια, θα πρέπει να απορριφθούν ως δυνητικά μολυσμένα απόβλητα. Μην τοποθετείτε στο αυτόκαυστο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Προειδοποιήσεις για την αναλυτική διαδικασία

1. Η οπτική πυκνότητα (O.D.) του διαχωριστικού ορίου (Cut-Off), των μαρτύρων και των δειγμάτων μπορεί να διαφέρει ελαφρώς μεταξύ διαφορετικών πλακών. Επομένως, αν χρησιμοποιηθούν στον ίδιο κύκλο αναλύσεων σειρές κυψελίδων (strips) από διαφορετικές πλάκες, ακόμα κι αν ανήκουν στην ίδια παρτίδα, είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο προσδιορισμός του Cut-Off.
2. Πριν από τη χρήση, φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C). Επιτρέψτε τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία συντήρησης αμέσως μετά τη χρήση.
3. Ανοίξτε τη συσκευασία που περιέχει τα strip αφού θα έχουν μείνει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης. Αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι θα μειωθεί η αξιοπιστία του προϊόντος και μπορεί να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα.
5. Μην τροποποιείτε τη διαδικασία και μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια από άλλους κατασκευαστές ή άλλες παρτίδες, εκτός εάν αναφέρεται ρητά ότι το αντιδραστήριο είναι εναλλάξιμο μεταξύ παρτίδων. Μη μειώνετε τους συνιστώμενους χρόνους επώασης.
6. Όλα τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιούνται στο τεστ πρέπει να πλένονται σχολαστικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένονται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.
7. Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να εκτίθενται σε δυνατό φως ούτε σε ατμούς υποχλωριώδους κατά τη συντήρηση και κατά τα στάδια επώασης.
8. Αποφύγετε την ξήρανση των κυψελίδων κατά τη διεξαγωγή του τεστ.
9. Αποφύγετε τη χρήση καταψυκτών αυτόματης απόψυξης για τη συντήρηση των δειγμάτων.
10. Αποφύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείτε συγκεκριμένες πιπέτες αποκλειστικά για το υπόστρωμα και το σύζευγμα.
11. Μην αγγίζετε το χείλος της κυψελίδας με το σύζευγμα.
12. Μη φυσάτε πάνω στις μικροπλάκες.
13. Οι ανοσοενζυμικές δοκιμασίες παρουσιάζουν ορισμένες φορές το φαινόμενο των παρυφών ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας την υγρασία κατά τα στάδια επώασης. Οι πλάκες πρέπει να καλύπτονται με τις καλύπτρες και να επωάζονται στη θερμοκρασία που αναφέρεται στη διαδικασία ή σε υδατόλουτρο τοποθετημένες σε ειδικό φορέα για πλάκες, ή σε επωαστήρα. Εναλλακτικά, οι πλάκες μπορούν να επωαστούν σε κατάλληλο αναλυτή. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο λειτουργίας της αντίστοιχης συσκευής. Δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν επωαστήρες που λειτουργούν με CO₂.
14. Πριν από τη μέτρηση της πλάκας, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας της πλάκας είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες στην επιφάνεια του υγρού.
15. Εάν χρησιμοποιηθούν έντονα αιμολυμένα, λιπαιμικά ή ικτερικά δείγματα, ή δείγματα ορού που δεν έχει πήξει τελείως, ή δείγματα με μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα.
16. Αποφύγετε τη μόλυνση των κυψελίδων με σκόνη από τα γάντια μίας χρήσης.

17. Η χρήση του kit με αυτοματοποιημένα όργανα πρέπει να επικυρωθεί από τον χρήστη.
18. Για κάθε όργανο που θα χρησιμοποιηθεί, διαβάστε το αντίστοιχο Εγχειρίδιο Χρήστη, ειδικά όσον αφορά τα ακόλουθα σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές απαιτήσεις
 - αρχή λειτουργίας, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και απόδοση της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

5. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥ KIT ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια επαρκούν για 96 δοκιμασίες προσδιορισμού.

Πριν από τη χρήση, φέρετε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ (12x8)

Περιεχόμενο: 1 πλάκα με 96 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με αδρανισμένο εγγενές αντιγόνο.

CONJ ΣΥΖΕΥΓΜΑ 1x16 mL

Περιεχόμενο: Ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM σημασμένα με υπεροξειδάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

CONTROL - ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ 1x0.8 mL

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα που δεν περιέχει ειδικά αντισώματα ικανά να δεσμεύσουν το αντιγόνο που υπάρχει στην μικροπλάκα, και συντηρητικό. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

CONTROL + ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ 1x0.8 mL

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα που περιέχει ειδικά αντισώματα ικανά να δεσμεύσουν το αντιγόνο που υπάρχει στην μικροπλάκα, και συντηρητικό. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

CONTROL CUT-OFF ΜΑΡΤΥΡΑΣ CUT-OFF 1x0.8 mL

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα που περιέχει ειδικά αντισώματα ικανά να δεσμεύσουν το αντιγόνο που υπάρχει στην μικροπλάκα, και συντηρητικό. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

SAMP DIL 2 ΑΡΑΙΩΤΙΚΟ 2 1x100 mL (PF93611)**ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ**

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, με αζίδιο του νατρίου 0,09% και χρωστική (πορτοκαλλόχρουν του μεθυλίου).

Χρήση: Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

SAMPLE SORBENT 4 ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 4 1x7mL (PF30401)**ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ**

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, με αζίδιο του νατρίου 0,09% και χρωστική (πορτοκαλλόχρουν του μεθυλίου), και ανθρώπινα αντισώματα αντι-IgG.

Χρήση: Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων (στην πλάκα). Υγρό, έτοιμο για χρήση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ 10x 1x100 mL
(PF93603)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, περιέχει Brij 0,5%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο κατά 1:10 με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψει το έτοιμο για χρήση ρυθμιστικό διάλυμα πλήσης. Αν υπάρχουν κρύσταλλοι, διαλύστε τους σε θερμοκρασία 37°C πριν από την αραιώση.

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 1x12 mL
(PF93619)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού 0,05 mol/L (pH 3,8). Υγρό, έτοιμο για χρήση.

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ 1x16 mL
(PF93602)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Διάλυμα H₂SO₄ 0,3 mol/L. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ (2).

ΑΛΛΑ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ.

- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm, με γραμμικότητα έως O.D. ≥2.000)
- Συσκευή πλήσης μικροπλακών (μη απαραίτητη) με ικανότητα χειρισμού όγκων μεταξύ 225-375 μl
- Αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Συνήθης γυάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες κ.λπ.
- Μικροπιπέτες που μπορούν να αναρροφήσουν με ακρίβεια 10, 100, 1000 μl διαλύματος
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Περιέκτες για την περισυλλογή δυνητικά μολυσματικών υλικών
- Απορροφητικό χαρτί

6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C.

Η ημερομηνία λήξης αναγράφεται σε κάθε επιμέρους υλικό και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη σταθερότητα μετά το άνοιγμα ή/και μετά την προετοιμασία:

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ	4 εβδομάδες στους 2-8°C
ΣΥΖΕΥΓΜΑ	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΜΑΡΤΥΡΑΣ CUT-OFF	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΑΡΑΙΩΤΙΚΟ 2	μέχρι την ημ/νία λήξης
ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	4 στους 2-8°C
4	μέχρι την ημ/νία λήξης
	στους 2-8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

μέχρι την ημ/νία λήξης στους 2-8°C, 1 εβδομάδα στους 15-30°C,

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ

φυλάσσεται στο σκοτάδι 2 εβδομάδες στους 2-8°C, 5 ημέρες στους 15-30°C μέχρι την ημ/νία λήξης στους 2-8°C

7. ΤΥΠΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Ο ενδεδειγμένος τύπος δείγματος είναι ορός που λαμβάνεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με τυπική φλεβοπαράκνηση και έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με τις τυπικές εργαστηριακές διαδικασίες.

Δεν είναι γνωστές οι επιπτώσεις εάν χρησιμοποιηθούν άλλα βιολογικά υγρά.

Ο φρέσκος ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C. Για μεγαλύτερα διαστήματα συντήρησης, να καταψύχεται στους -20°C.

Να αποφεύγεται η επανειλημμένη απόψυξη.

Αποφύγετε τη χρήση καταψυκτών αυτόματης απόψυξης για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά την απόψυξη, ανακινήστε το δείγμα προσεκτικά πριν από τη δοσομέτρηση.

Η αδρανοποίηση με θερμότητα μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα του δείγματος, με αποτέλεσμα να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Πριν από την έναρξη του τεστ, φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C).

- Ετοιμάστε τα απαιτούμενα strip.
- Ετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλήσης, αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Αραιώστε τα δείγματα κατά 1:51, με προσθήκη 10 μL ορού σε 0,500 mL αραιωτικού.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

1. Προσθήκη των δειγμάτων:
Προσθέστε 100 μl μάρτυρα (θετικού, αρνητικού ή cut-off). Προσθέστε 50 μl από το προσροφητικό δείγματος 4 + 50 μl αραιωμένου δείγματος σε κάθε κυψελίδα (συνιστάται ανάλυση εις διπλούν).
Η ελάχιστη απαίτηση είναι 1 αρνητικός μάρτυρας, 1 θετικός μάρτυρας και 2 μάρτυρες Cut-Off. (Αφήστε ελεύθερη μία κυψελίδα του strip για το τυφλό δείγμα.)
2. Επώαση:
Επώαση την πλάκα, καλυμμένη με αυτοκόλλητη προστατευτική μεμβράνη, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60 ± 5 λεπτά.
3. Πλύση:
Αφαιρέστε την αυτοκόλλητη μεμβράνη, αναρροφήστε το περιεχόμενο από όλες τις κυψελίδες και πλύνετε 4 φορές, γεμίζοντας κάθε κυψελίδα με 300 μL διαλύματος πλήσης. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα ανάμεσα σε κάθε πλύση.
4. Προσθήκη του συζεύγματος:
100 μL συζεύγματος σε κάθε κυψελίδα της πλάκας.
5. Επώαση του συζεύγματος:

Επώαστε την πλάκα, καλυμμένη με αυτοκόλλητη προστατευτική μεμβράνη, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60 ± 5 λεπτά.

6. Πλύση:
Αφαιρέστε την αυτοκόλλητη μεμβράνη, αναρροφήστε το περιεχόμενο από όλες τις κυψελίδες και πλύνετε 4 φορές, γεμίζοντας κάθε κυψελίδα με 300 μ L διαλύματος πλύσης. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα ανάμεσα σε κάθε πλύση.
7. Προσθήκη του υποστρώματος:
Προσθέστε 100 μ L υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα της πλάκας.
8. Επώαση του υποστρώματος:
Επώαστε την πλάκα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
9. Τερματισμός της αντίδρασης:
Προσθέστε 100 μ L διαλύματος τερματισμού, ακολουθώντας την ίδια σειρά προσθήκης όπως και στο βήμα 4.
10. Μέτρηση:
Μετρήστε την O.D. στα 450 nm ή στα 450/620 nm εντός 30 λεπτών. Μετρήστε ξανά στα 405 nm, αν υπάρχουν τιμές O.D. άνω των 2.000.

9. ΒΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΓΙΑ SARS-CoV-2 IgM

- ΒΗΜΑ 1** Προσθέστε 100 μ L μαρτύρων (θετικού, αρνητικού και cut-off) και 50 μ l από το προσροφητικό δείγματος 4 + 50 μ l αραιωμένου δείγματος στις κυψελίδες των strip. Ανακινήστε.
-
- Επώαστε για 60 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
-
- Πλύνετε 4 φορές (300 μ L).
-
- ΒΗΜΑ 2** Προσθέστε 100 μ L συζεύγματος σε κάθε κυψελίδα.
-
- Επώαστε για 60 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
-
- Πλύνετε 4 φορές (300 μ L).
-
- ΒΗΜΑ 3** Προσθέστε 100 μ L υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
-
- Επώαστε για 15 λεπτά σε θερμ. περιβάλλοντος.
-
- ΒΗΜΑ 4** Προσθέστε 100 μ L διαλύματος τερματισμού.
-
- Μετρήστε την O.D. στα 450 nm ή 450/620 nm εντός 30 λεπτών.

10. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Τυφλό: <0,150

Αρνητικός μάρτυρας: Ο λόγος μεταξύ τιμής O.D. του αρνητικού μάρτυρα και τιμής O.D. του cut-off πρέπει να είναι <0,6.

Θετικός μάρτυρας: η τιμή O.D. του θετικού μάρτυρα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1,5 φορά μεγαλύτερη από την O.D. του ορού cut-off.

Μάρτυρας cut-off: η τιμή O.D. του cut-off πρέπει να είναι >0,2.

Αν ένα από τα αποτελέσματα των ορών ελέγχου δεν βρίσκεται μέσα στα αποδεκτά όρια, επαναλάβετε το τεστ. Αν το πρόβλημα επιμένει, επικοινωνήστε το τμήμα επιστημονικής υποστήριξης.

Τηλ.: 0039 0577 319554

Φαξ: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε τον λόγο της τιμής O.D. του δείγματος και της τιμής O.D. του Cut-Off (δείκτης).

Το δείγμα χαρακτηρίζεται:

ΘΕΤΙΚΟ: όταν ο δείκτης είναι >1,1

ΑΜΦΙΒΟΛΟ: για όλες τις τιμές μεταξύ 0,9-1,1

ΑΡΝΗΤΙΚΟ: όταν ο δείκτης είναι <0,9

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Κάθε τιμή που λαμβάνεται πρέπει να ερμηνεύεται προσεκτικά, λαμβάνοντας υπ' όψιν και άλλους δείκτες που σχετίζονται με τον εκάστοτε ασθενή.

Η κλινική διάγνωση δεν μπορεί να βασίζεται αποκλειστικά στο αποτέλεσμα του τεστ, το οποίο θα πρέπει πάντα αξιολογείται σε συνδυασμό με δεδομένα από το ιστορικό του ασθενή ή/και από άλλες διαγνωστικές εξετάσεις.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Εξετάστηκαν 4 δείγματα (2 αρνητικά και 2 θετικά), στα οποία προστέθηκαν οι ακόλουθες ουσίες παρεμβολής:

Ρευματοειδής παράγων (44 – 220 IU/ml)

Χολερυθρίνη (4,5 – 45 mg/dl)

Τριγλυκερίδια (10 – 250 mg/dl)

Αιμοσφαιρίνη (5 – 30 mg/ml)

Η παρουσία των ανωτέρω ουσιών παρεμβολής στον εξεταζόμενο ορό μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα του τεστ.

14. ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Εξετάστηκαν 77 δείγματα, θετικά για:

μυκόπλασμα πνευμονίας (5), κυτταρομεγαλοϊό (4), RSV (2), ιό γρίπης τύπου B (1), ιό γρίπης τύπου A (5), αδενοϊό (3), ρευματοειδή παράγοντα (4), ANA (22), SARS-CoV (18) και ιό Epstein Barr (13).

Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διασταυρούμενες αντιδράσεις, με εξαίρεση τα εξής: μυκόπλασμα πνευμονίας (1), ρευματοειδής παράγων (1), ANA (4), SARS-CoV (5) και ιός Epstein-Barr (5).

15. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Στο πλαίσιο πειραματικής μελέτης, αναλύθηκαν 397 δείγματα με το kit της Diesse και ένα τεστ ανοσοφθορισμού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται παρακάτω:

		Δοκιμασία αναφοράς		
		+	-	Σύνολο
Diesse	+	57	10	67
	-	8	322	330
	Σύνολο	65	332	397

Ποσοστό θετικής συμφωνίας (~διαγνωστική ευαισθησία):

87,7% CI95%: 77.5 – 93.6

Ποσοστό αρνητικής συμφωνίας: (~διαγνωστική ειδικότητα):

97,0% CI95%: 94.5 – 98.3

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων 29 δειγμάτων με γνωστή ημερομηνία έναρξης των συμπτωμάτων έδειξε ότι η ευαισθησία των τεστ με τη μέθοδο ELISA αυξάνεται 10 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. 87,5% ευαισθησία επιτυγχάνεται μετά από 12 ημέρες.

Ημέρες από έναρξη συμπτωμάτων	Ευαισθησία
<10	58,3%
>10	70,6%
>12	87,5%

16. ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Δείγμα	Εντός κύκλου αναλύσεων		Μεταξύ κύκλων αναλύσεων		Μεταξύ παρτίδων	
	Μέσος Δείκτης	CV%	Μέσος δείκτης	CV%	Μέσος δείκτης	CV%
1	1,6	8,8	1,5	13,3	0,2	25,0*
2	0,5	10,0	2,1	11,9	2,0	7,5
3	1,9	2,6	0,8	11,3	0,5	8,0
4	0,6	10,0	0,7	10,0	1,8	10,6

*Σφάλμα που οφείλεται σε γνωστή επίδραση του συντελεστή μεταβλητότητας που εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία σε διακυμάνσεις (ακόμα και πολύ μικρές) όταν η μέση τιμή προσεγγίζει το μηδέν.

17. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ
Μη έγκυρος κύκλος αναλύσεων (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκε ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια, ή προστέθηκε με λάθος σειρά.	Ελέγξτε ξανά τη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν προστέθηκε κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Μη αντιδρώσα πλάκα	Ελέγξτε τον κωδικό στη συσκευασία της πλάκας (βλ. οδηγίες χρήσης).
		Ελέγξτε την παρουσία υγρασίας στην πλάκα που δεν χρησιμοποιήθηκε. (Η πυριτική γέλη πρέπει να είναι ωχροκίτρινη). Επαναλάβετε το τεστ.
Μη έγκυρος κύκλος αναλύσεων (όλα θετικά)	Επιμόλυνση του υποστρώματος	Χρησιμοποιήστε νέο κλάσμα του υποστρώματος.
	Ανεπαρκής πλύση	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλύσης λειτουργεί σωστά.
Μη επαρκής πιστότητα	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλύσης λειτουργεί σωστά.
	Σφάλμα κατά την αναρρόφηση με πιπέτα	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.

	Πολύ αργή προσθήκη των αντιδραστηρίων	Αποφύγετε την ξήρανση της πλάκας μετά την πλύση. Προσθέστε τα αντιδραστήρια αμέσως.
	Παρουσία φυσαλίδων αέρα	Αποφύγετε τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση με πιπέτα.
	Ακαθαρσίες στο οπτικό κύκλωμα	Ελέγξτε τη φωτεινή πηγή για ακαθαρσίες. Καθαρίστε τον πυθμένα της πλάκας με χαρτομάνηλο.
Ανεπαρκής χρωματισμός	Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία επώασης	Ελέγξτε τα όργανα παρακολούθησης της θερμοκρασίας και του χρόνου επώασης.
	Προστέθηκε μη επαρκής όγκος υποστρώματος.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.

18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Xintian et al. "Evolution of the novel coronavirus from ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission" Science China Life sciences; January 2020
- Chen et al "Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study". The Lancet, Vol 395 (507-513) February 15, 2020
- Huang et al "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China". The Lancet, Vol 395 (497-506) February 15, 2020
- Yuxian et al. "Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus" Journal of clinical microbiology-vol 43 n8 (p.3718-37296); August 2005
- Woo et al. "Detection of specific antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia" Journal of clinical microbiology - vol 42 n5 (2306-2309); May 2004



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

For the qualitative determination of IgM class antibodies to SARS-CoV-2 virus

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic method for the qualitative determination of IgM class antibodies to SARS-CoV-2 virus in human serum.

2. INTRODUCTION

Coronaviruses are single positive-stranded RNA viruses belonging to *Coronaviridae* family, which are divided into four genera: *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-* and *Gammacoronavirus*. CoVs are commonly found in many species of animals. Occasionally, the animal CoVs can acquire genetic mutations by errors during genome replication or recombination mechanism, which can further expand their tropism to humans. A total of six human CoV types were identified to be responsible for causing human respiratory ailments, which include two alpha CoVs and four beta CoVs (the most recent two are SARS-CoV and MERS-CoV). Typically, these CoVs cause asymptomatic infection or severe acute respiratory illness, including fever, cough, and shortness of breath. However, other symptoms such as gastroenteritis and neurological diseases of varying severity have also been reported. Since December 2019, the seventh novel human betacoronavirus (2019-nCoV) causing pneumonia outbreak was reported by the World Health Organization. This novel virus is linked with an outbreak of febrile respiratory illness in the city of Wuhan, Hubei Province, China. Some patients with 2019-nCoV have developed severe pneumonia, pulmonary oedema, ARDS, or multiple organ failure and have died. At present, information regarding the epidemiology and clinical features of pneumonia caused by 2019-nCoV is scarce. The monitoring of antibodies' titer can serve as an indication of the status of infection: during the first days, IgA and IgM appear; as the disease progresses, IgG becomes predominant.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum. After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of anti-human IgM monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added. The blue color which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, a yellow coloring develops. The color, proportional to the quantity of specific antibodies present in the serum, can be easily read using a microplate reader.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by methods for the presence of HBsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling reagents and samples.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay.
3. Wash hands thoroughly when finished.
4. Non-disposable apparatus should be sterilized after use, the preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C. All the disposable apparatus should be eliminated according to law.
5. 2M hydrochloric acid, used for washing glassware, is corrosive and should be handled with appropriate care. In case of contact with skin or eyes, wash thoroughly with water.
6. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1%. A 30 minutes exposure to 1% sodium hypochlorite may be sufficient to ensure effective decontamination.
7. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

1. The OD of Cut-Off, controls and samples can be slightly different among different plates. For such reason if during the same run strips from different plates are used, even if the lot is the same, it is necessary to repeat the determination of the Cut-Off.
2. Allow all reagents to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
3. Open the package containing the strips after 30 minutes at room temperature at least.
4. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
5. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent

is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.

6. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or deionized water.
7. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
8. Do not allow wells to become dry during the test.
9. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers.
10. Care should be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the substrate and conjugate.
11. Care should be taken to avoid touching the rim of the well with conjugate.
12. Do not "blow-out" from microplates.
13. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at the temperature indicated in the procedure either in a water bath with a rack to support the plates, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate Operating Manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
14. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
15. The use of strongly hemolyzed, lipemic, icteric samples, of serum not completely coagulated or of samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
16. Care should be taken to avoid contaminating the microplate wells with disposable gloves powder.
17. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
18. For each instrument used, read the Operating Manual, in particular to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performances
 - technical servicing and maintenance

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 96 determinations.

- Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE (12x8)

Content: 1 microplate (96 wells) coated with inactivated native antigen.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

Content: anti-human IgM monoclonal antibodies, labeled with peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Liquid, ready for use.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL 1x0.8mL

Content: Proteic solution not containing specific antibodies capable of binding the antigen present on the microplate, and preservative. Liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1x0.8 mL

Content: Proteic solution containing specific antibodies capable of binding the antigen present on the microplate and preservative. Liquid, ready for use.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1x0.8 mL

Content: Proteic solution containing specific antibodies capable of binding the antigen present on the microplate, and preservative. Liquid, ready for use.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 1x100 mL

(PF93611)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Proteic solution in phosphate buffer with Sodium Azide 0.09% and methyl orange as dye.

Use: To be used to dilute samples. Liquid, ready for use.

SAMPLE SORBENT 4 SAMPLE SORBENT 4 1x7 mL

(PF30401)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Proteic solution in phosphate buffer with Sodium Azide 0.09%, methyl orange as dye and anti-human IgG antibodies.

Use: To be used to dilute samples (in the microwell). Liquid, ready for use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X 1x100 mL

(PF93603)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Phosphate buffered saline (PBS), concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.

Preparation: Dilute the required volume 1:10 with distilled or deionized water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SUBS TMB SUBSTRATE 1x12 mL

(PF93619)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H₂O₂ 0.01% stabilized in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquid, ready for use.

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION 1x16 mL

(PF93602)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: H₂SO₄ 0.3 mol/L. Liquid, ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader (wavelength 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD ≥ 2.000)
- Microplate washer (optional) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl of solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials

- Absorbent tissue

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2-8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation:

MICROPLATE	4 weeks at 2-8°C
CONJUGATE	8 weeks at 2-8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
NEGATIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
CUT-OFF CONTROL	8 weeks at 2-8°C
DILUENT 2	up to the expiry date at 2-8°C
SAMPLE SORBENT 4	up to the expiry date at 2-8°C
SUBSTRATE	up to the expiry date at 2-8°C; 1 week at 15-30°C; store in the dark
WASHING BUFFER	2 weeks at 2-8°C; 5 days at 15-30°C
STOP SOLUTION	up to the expiry date at 2-8°C

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice.

Possible consequences, in case of use of other biological liquids, are not known.

The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C.

Avoid several freeze-thawing cycles.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use.

Heat-inactivation can rise to erroneous results.

The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

8. ASSAY PROCEDURE

PREPARATION

Bring all the reagents to room temperature (18-30°C) before use.

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Dilute samples 1:51 distributing 10 µL of serum into 0.500 mL of diluent and incubate at room temperature for 1 hour.

PROCEDURE

1. Distribution of the samples:
Dispense 100 µL of control (positive, negative or cut-off).
Dispense 50 µL of sample sorbent 4 + 50 µL diluted sample per well (duplicate testing is recommended).
The minimum requisite is 1 negative control, 1 positive control and 2 cut-off controls. Leave one well for the blank
2. Incubation:
Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 60 ± 5 minutes at room temperature.
3. Washing:

Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.

4. Distribution of the conjugate:
Dispense 100 µL of conjugate in each well.
5. Conjugate Incubation:
Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 60 ± 5 minutes at room temperature.
6. Washing:
Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.
7. Distribution of the substrate:
Dispense 100 µL of substrate in each well.
8. Substrate incubation:
Incubate the plate for 15 minutes at room temperature.
9. Interruption of the reaction:
Dispense 100 µL of stop solution, in the same order as that followed for point 4.
10. Reading:
Read the O.D. at 450 nm or 450/620 nm within 30 minutes. Repeat the reading at 405 nm in case of O.D. > 2.000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE FOR SARS-CoV-2 IgM

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Place 100 µL of controls (positive, negative and cut-off) and 50 µL of sample sorbent 4 + 50 µL diluted sample in the wells of the strips. Mix well. |
| - | - |
| - | Incubate for 60 ± 5 min. at R.T. |
| - | - |
| - | Wash 4 times (300 µL) |
| STEP 2 | Add 100 µL of conjugate to each well |
| - | - |
| - | Incubate for 60 ± 5 min. at R.T. |
| - | - |
| - | Wash 4 times (300 µL) |
| STEP 3 | Add 100 µL of Substrate to each well |
| - | - |
| - | Incubate for 15 min. at R.T. |
| STEP 4 | Add 100 µL of Stop Solution |
| - | - |
| - | Read the O.D. at 450 nm or 450/620 nm within 30 min |

10. TEST VALIDATION

Blank: < 0.150

Negative control: the ratio between the negative control OD and cut-off OD must be < 0.6.

Positive control: the positive control must have an OD at least 1.5 times higher than the cut-off.

Cut-off control: the OD of the cut-off must be > 0.2.

Repeat the test, if one of the results of the control sera is not within the acceptability range.

If the problem persists contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculate the ratio between the OD value of the sample and that of the Cut-off (Index).

The sample is considered:

POSITIVE: when the Index is > 1.1

DOUBTFUL: for all the values between 0.9 and 1.1

NEGATIVE: when the Index is < 0.9

12. LIMITATIONS

All the values obtained require a careful interpretation that must consider other indicators relative to the patient.

The test, indeed, can not be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

13. ANALITICAL SPECIFICITY

4 samples (2 Negative and 2 Positive) were spiked with the following potentially interfering factors and then tested:

Rheumatoid factor (44-220 IU/ml)
 Bilirubin (4.5-45 mg/dl)
 Triglycerides (10-250 mg/dl)
 Hemoglobin (5-30 mg/ml)

The presence in the serum sample of the interfering substances described above may affect the test result.

14. CROSS-REACTIONS

77 samples positive to Mycoplasma p. (5), Cytomegalovirus (4), RSV (2), FLU B (1), FLU A (5), Adenovirus (3), Rheumatoid Factor (4), ANA (22), SARS- CoV (18) and Epstein-Barr Virus (13) were tested.

No significant cross-reactions were found except for Mycoplasma p. (1), Reumatoid Factor (1), ANA (4), SARS- CoV (5), Epstein-Barr Virus (5).

15. METHOD COMPARISON

In an experimentation 397 samples have been tested with Diesse kit and with an immunofluorescent test.

Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	57	10	67
	-	8	322	330
	Total	65	332	397

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):
 87.7% CI95%: 77.5-93.6.

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):
 97.0% CI95%: 94.5-98.3.

The analysis of the results of 29 samples with known date of symptoms onset showed that the sensitivity of the ELISA tests increases 10 days after the symptoms onset. 87.5% sensitivity is reached after 12 days.

Days for symptoms onset	Sensitivity
<10	58.3%
>10	70.6%
>12	87.5%

16. PRECISION AND REPEATABILITY

Sample	Within-run Precision		Between-run precision		Precision between batches	
	Mean Index	CV%	Mean Index	CV%	Mean Index	CV%
1	1.6	8.8	1.5	13.3	0.2	25.0*
2	0.5	10.0	2.1	11.9	2.0	7.5
3	1.9	2.6	0.8	11.3	0.5	8.0
4	0.6	10.0	0.7	10.0	1.8	10.6

* Artifact caused by the known fault of Variation Coefficient which becomes extremely sensitive to even very small changes in the mean when the mean value is near zero.

17. TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE ERROR	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure. Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel desiccant must be pale yellow). Repeat test.
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Collect new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that plate washer works well
Poor precision	Inadequate aspiration of wells	Ensure that plate washer works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Addition of reagents too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of air-bubbles	Avoid air-bubbles formation during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
	Inadequate volume of substrate added	Check pipette function

18. REFERECES









- Xintian et al. "Evolution of the novel coronavirus from ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission" Science China Life sciences; January 2020

2. Chen et al "Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study". The Lancet, Vol 395 (507-513) February 15, 2020
3. Huang et al "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China". The Lancet, Vol 395 (497-506) February 15, 2020
4. Yuxian et al. "Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus" Journal of clinical microbiology-vol 43 n8 (p.3718-37296); august 2005
5. Woo at al. "Detection of specific antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia" Journal of clinical microbiology - vol 42 n5 (2306-2309); May 2004



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italia



	EN ES IT DE	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro Verwendbar bis	FR GR PT CZ	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade Použijte do
	EN ES IT DE	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso Achtung, die Gebrauchsanleitung lesen	FR GR PT CZ	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída Pozor, řiďte se návodem k použití
	EN ES IT DE	Manufacturer Fabricante Fabbicante Hersteller	FR GR PT CZ	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante Výrobce
	EN ES IT DE	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi Inhalt reicht für „n“ Tests	FR GR PT CZ	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios Obsah stačí na < n > testů
	EN ES IT DE	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura Temperaturgrenzwerte	FR GR PT CZ	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura Teplotní omezení
	EN ES IT DE	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Die Gebrauchsanleitung lesen	FR GR PT CZ	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização Čtěte návod k použití
	EN ES IT DE	Biological risks Riesgo biológico Rischio biológico Biologisches Risiko	FR GR PT CZ	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico Biologická rizika
	EN ES IT DE	Batch code Código de lote Codice del lotto Chargennummer	FR GR PT CZ	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote Kód šarže