

Anti-SARS-CoV-2 ELISA

Enzymimmunoassay für den qualitativen Nachweis von IgG Antikörpern gegen

SARS-CoV-2 S1 (RBD)

Deutsch

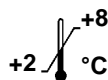
Enzyme Immunoassay for Qualitative Detection of IgG Antibodies against

SARS-CoV-2 S1 (RBD)

English

Europäische Union / European Union,
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



h **E111-IVD**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany













Phone: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10

E-mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SI/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμσκυυρπἀεϋ/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vå rugām sā respectați instrucțiunile de utilizare/ Uroštevajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnostikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentinummer/ Referencenummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген номер/ Tellimnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazena entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilätä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostatečný pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi

DILU BUF X	Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ Verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ Späd i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufru X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Laimennetaan x puskuriin
DET	Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam- en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsyymi konjugaatti
DIL	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Puffer/ Puffer/ Буфер/ Puhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri
PC	Control Serum + / Kontrollserum + / Contôle sérique +/ Siero di controllo +/ Suero de control +/ Soro de Controlo +/ controleserum +/ Kontrolserum +/ Kontrollserum +/ Serum kontrolne +/ Ellenőrző szérum +/ Kontrolné sérum +/ Kontrolní sérum +/ Контролен сeрyм +/ Kontrollseerum +/ Ορός ελέγχου +/Ser de control +/ Kontrolni serum +/ Kontrolli seerumi +
NC	Control Serum - / Kontrollserum - / Contôle sérique -/ Siero di controllo -/ Suero de control -/ Soro de Controlo - / controleserum -/ Kontrolserum -/ Kontrollserum -/ Serum kontrolne -/ Ellenőrző szérum -/ Kontrolné sérum -/ Kontrolní sérum -/ Контролен сeрyм -/ Kontrollseerum -/ Ορός ελέγχου -/Ser de control -/ Kontrolni serum - /Kontrolli seerumi -
WP	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesuruhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stoppløsning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиратц разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Solutje de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	tape/ Platte abkleben/ bande adhésive/ nastro adesivo/ cinta adhesiva/ fita adesiva/ tape/ tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleerlindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aorepiti plasa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Measure lábsorbance en l'espacce de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mál plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Měřtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)

INHALTSVERZEICHNIS, DEUTSCH

1.	ZWECKBESTIMMUNG.....	5
2.	EINLEITUNG.....	5
3.	TESTPRINZIP	6
4.	KIT-KOMPONENTEN	6
5.	BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN.....	7
6.	PROBEN	7
7.	LAGERUNG und STABILITÄT	7
8.	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	7
9.	TESTDURCHFÜHRUNG	8
10.	BEISPIEL ERGEBNISSE.....	9
11.	EINSCHRÄNKUNGEN.....	10
12.	LEISTUNGSBEWERTUNG	10
13.	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	14

TABLE OF CONTENTS, ENGLISH

1.	INTENDED USE.....	16
2.	INTRODUCTION	16
3.	ASSAY PRINCIPLE	17
4.	KIT COMPONENTS	17
5.	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	18
6.	SAMPLES	18
7.	STORAGE and STABILITY	18
8.	PREPARATION of REAGENTS	18
9.	ASSAY PROCEDURE	19
10.	TYPICAL RESULTS	20
11.	LIMITATION OF PROCEDURE	21
12.	PERFORMANCE EVALUATION	21
13.	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	25
14.	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	26

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der Mediagnost Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD ist ein hochspezifischer Enzymimmunoassay zum Nachweis von humanen IgG-Antikörpern in Blut gegen die SARS-CoV-2-S1-Rezeptorbindungsdomäne (RBD). Der Anti-SARS-CoV-2-ELISA E111-IVD ist für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik vorgesehen und kann nur von Fachpersonal durchgeführt werden.

○ Registrierungscode: DE/CA40/00809/30

2. EINLEITUNG

Im Dezember 2019 wurde in Wuhan, China, ein neuartiges Coronavirus SARS-CoV-2 identifiziert, das die Atemwegserkrankung COVID-19 verursacht. Die Inkubationszeit der Krankheit beträgt 2-14 Tage. Zu den Symptomen von COVID-19 gehören u.a. Fieber, Müdigkeit und Husten, Atemnot, Muskelschmerzen und Erschöpfung. Die meisten Patienten haben eine gute Prognose, einige schwere Fälle können eine Lungenentzündung entwickeln, schwere akute Atemnot haben oder sogar der Krankheit erliegen.

Die Aufnahme von SARS-CoV-2 in die Wirtszelle erfolgt durch das auf der Oberfläche lokalisierte Spike-Glykoprotein S. Das Protein wird durch Wirtsproteasen in die S1- und S2-Untereinheiten gespalten, die für die Rezeptorerkennung und Membranfusion verantwortlich sind¹.

Die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des SARS-CoV-2 S1-Proteins, das an den ACE2-Rezeptor bindet, wird als Zielantigen im Assay verwendet.

Die Verwendung von RBD erhöht die Spezifität des Assays, da die Bindungsdomäne mit SARS-CoV identisch ist, jedoch nicht beispielsweise mit MERS-CoV. Antikörper gegen die RBD neutralisieren beide Virusstämme, SARS-CoV und SARS-CoV-2².

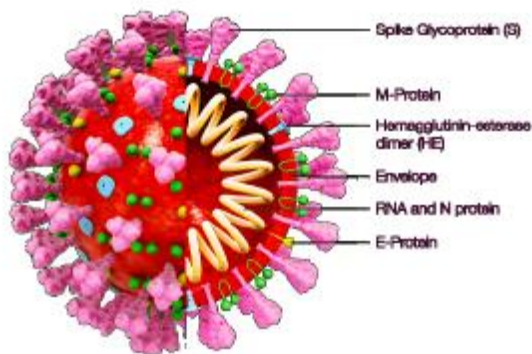


Abb. 1: Strukturmerkmale des Coronavirus³

Bis heute sind sieben humanpathogene Coronaviren beschrieben, zwei Alpha-Coronaviren (229E, NL63) und fünf Beta-Coronaviren (OC43, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2)⁴.

¹Wang et al., Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2, Cell (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>

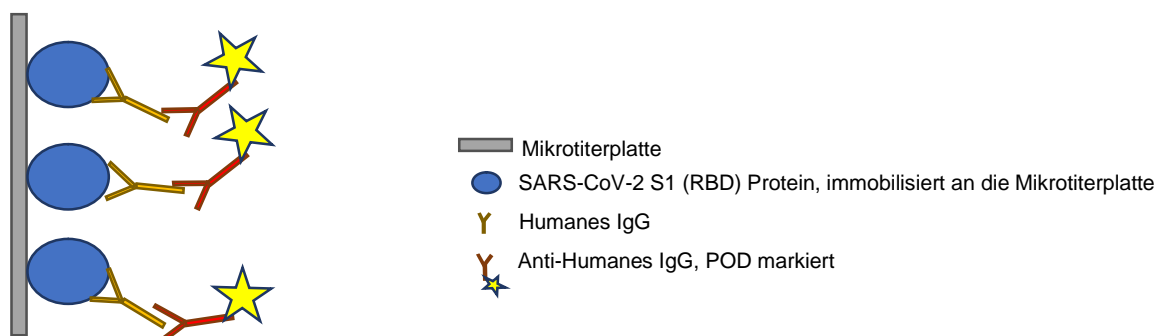
²Wu et al.: Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications (2020), medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>

³Jean-Yves Sgro (2020): https://static-bcrf.biochem.wisc.edu/tutorials/booklets/SARS-COV-2_COVID-19_A_Coloring_Book-v1.0.pdf

⁴CDC: National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases

3. TESTPRINZIP

Der Mediagnost-Anti-SARS-CoV-2-ELISA E111-IVD ist ein zweistufiger Enzymimmunoassay. Die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte sind mit rekombinantem SARS-CoV-2-Spike-Protein S1 (RBD) beschichtet. Nach Zugabe von humanen Serum- oder Plasmaproben binden Anti-S1-IgG-Antikörper aus der Probe während einer zweistündigen Inkubation an das immobilisierte Antigen. Es folgen mehrere Waschschrte, durch die ungebundene Komponenten entfernt werden. Die gebundenen Anti-SARS-CoV-2-IgG-Antikörper werden 30 Minuten mit Peroxidase (POD)-konjugiertem Anti-Human-IgG inkubiert. Die Zugabe einer POD-Substratlösung mit 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) führt zur Bildung einer blauen Farbe. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0,2 M H₂SO₄ beendet, wobei die blaue Farbe in gelbe Signale umgewandelt wird, die mit einem ELISA Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm gemessen werden. Die Höhe der Extinktion ist dabei proportional zu der Menge der an das Ziel-Antigen SARS-CoV-2-S1 (RBD) gebundenen Antikörper aus den Patienten-Proben.



4. KIT-KOMPONENTEN

MTP	Mikrotiterplatte, beschichtet mit SARS-CoV-2-S1 (RBD), die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar, gebrauchsfertig	12x8 Vertiefungen
DET	Antikörper-POD-Konjugat, Ziege-anti-human IgG-Antikörper Peroxidase-Konjugat, gebrauchsfertig	14 mL
PC	Positivkontrolle: Anti-SARS-CoV-2 positives Kontrollserum, Humanes Serum, gebrauchsfertig	1 mL
NC	Negativkontrolle: Anti-SARS-CoV-2 negatives Kontrollserum, Humanes Serum, gebrauchsfertig	1 mL
DIL	Verdünnungspuffer, gebrauchsfertig	100 mL
WP	Waschpuffer, 20fach konzentrierte Lösung	50 mL
S	Substratlösung (TMB), POD Substrat, gebrauchsfertig	14 mL
SL	Stopplösung, gebrauchsfertig 0,2 M H ₂ SO ₄ , gebrauchsfertig	14 mL
	Abdeckfolie zum Abdecken der Mikrotiterplatte	2
	Gebrauchsanleitung	1

5. BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Destilliertes Wasser (Aqua destillata) oder entmineralisiertes Wasser zur Verdünnung des Waschpuffers

Präzisionspipetten mit auswechselbaren Einweg-Kunststoffspitzen

Einmalröhrchen, Puffer- und Reagenzgefäße

Inkubator 37°C

Vortex-Mixer

Mikrotiterplattenwasher empfohlen, alternativ manuelles Waschen

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ³ 590 nm

6. PROBEN

Serum, EDTA- und Heparin Plasma

Mehrfache Einfrier-Auftau-Zyklen sollten vermieden werden. Die Verwendung von hämolytischen, lipämischen oder ikterischen Proben sollte vom Benutzer validiert werden.

7. LAGERUNG und STABILITÄT

Nach Erhalt bitte das Kit bei 2-8°C lagern.

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt **4 Wochen**. Nicht verwendete Streifen der Mikrotiterplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2-8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden.

Der 1:20 verdünnte Waschpuffer **WP** ist 4 Wochen bei 2-8°C stabil.

8. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur, 20-25°C, bringen.

8.1. Waschpuffer WP

Waschpuffer WP 1:20 mit Aqua dest. verdünnen, z.B. 50 mL WP + 950 mL Aqua dest.

8.2. Proben

Proben 1:201 mit Verdünnungspuffer DIL verdünnen, z.B. 5 µL Probe + 1 mL DIL.

8 verdünnte Proben wurden 3 Stunden und 15 Stunden bei 4°C, bei Raumtemperatur (20–25°C) und gefroren bei -20°C gelagert. Im Vergleich zu den direkt nach der Verdünnung gemessenen Werten wurde kein Einfluss auf die Extinktionswerte gefunden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Präparation der Reagenzien		Verdünnung
WP	Waschpuffer	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Verdünnungspuffer DIL 1:201 verdünnen, z.B. 5 µL Probe + 1 mL DIL, sofort mischen, davon 100 µL pro Bestimmung einsetzen.		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.		

Testdurchführung		
Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µL	Verdünnungspuffer DIL (Leerwert)	A1/B1
100 µL	Positivkontrolle PC	C1/D1/E1
100 µL	Negativkontrolle NC	F1/G1/H1
100 µL	Probe (1:201 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 2 h bei 37°C		
3 x 300 µL	Absaugen und die Platte 3 x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen .	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat DET	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 30 Minuten bei 37°C		
3 x 300 µL	Absaugen und die Platte 3 x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen .	In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S	In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 10 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C		
100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

10. BEISPIEL ERGEBNISSE

Probe	OD 450 - ≥590 nm Mittelwert	Interpretation der Ergebnisse
Blank	0.008	Sollte die Werte der Negativkontrollen nicht überschreiten
Positivkontrolle	3.007	positiv
Negativkontrolle	0.166	negativ
Probe 1	2.806	positiv
Probe 2	0.117	negativ
Probe 3	0.586	grenzwertig

BEISPIEL: BERECHNUNG P/N-Verhältnis

$$\text{P/N-Verhältnis: } \frac{\text{Mittelwert Positivkontrolle } 3,007}{\text{Mittelwert Negativkontrolle } 0,166} = 18,11$$

BEISPIEL: Berechnung CUT-OFF

Cut-Off: 3 x 0,166 Mittelwert der Negativkontrolle = 0,498

Cut-Off: 5 x 0,166 Mittelwert der Negativkontrolle = 0,830

Die in der obigen Tabelle angegebenen Werte resultieren in einem Cut-Off Wert (3 x) von 0,498 und einem Cut-Off Wert (5 x) von 0,830.

Proben > 5 x Cut-Off

Alle Proben, deren Signale höher sind als OD 0,830 sind positiv, d.h. sie enthalten IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2-S1 (RBD).

Proben < 3 x Cut-Off

Alle Proben, deren Signale niedriger sind als OD 0,498 sind negativ, d.h. in diesen Proben sind keine IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2-S1 (RBD) nachweisbar.

Proben zwischen 3 x Cut-Off und 5 x Cut Off

Alle Proben, deren Werte zwischen den beiden Cut-Off Werten liegen sind grenzwertig.

Die Berechnung des Cut-Offs wurde so gewählt, dass falsch positive Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können.

Da IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2 erst zwischen dem 10. und 14. Tag nach einer Infektion nachweisbar werden, können die grenzwertigen Proben eine Serokonversion anzeigen, d.h. der Patient entwickelt möglicherweise Antikörper. Deshalb wird es sehr empfohlen, 14 Tage nach der ersten Probenahme eine weitere zu entnehmen und einen Test durchzuführen.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse sollten in Zusammenhang mit der Anamnese, weiteren klinischen Beobachtungen und Ergebnissen anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden.

Negative Ergebnisse schließen eine akute SARS-CoV-2-Infektion nicht aus. Wenn eine akute Infektion vermutet wird, ist der direkte Erregernachweis von SARS-CoV-2 notwendig.

Die Ergebnisse des Tests zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen SARS-CoV-2-S1 (RBD) dürfen nicht zur Diagnose oder dem Ausschluss einer SARS-CoV-2-Infektion verwendet werden.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Einfluss von heterophilen Antikörpern, Rheumafaktoren und Anti-Spezies-Antikörpern wird durch das Assay-Design reduziert, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Rheumafaktoren bis zu 600 International Units/mL zeigten keinen Einfluss auf das Testergebnis (es wurden Konzentrationen zwischen 10 und 600 IU/mL gemessen).

12. LEISTUNGSBEWERTUNG

Diagnostische Spezifität und Sensitivität

Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD					
Proben von Personen mit positiven PCR Ergebnissen und / oder COVID-19 Erkrankung	n	pos.	grenzwertig	neg.	Sensitivität
0 - 12 d*	36	23	2	11	69,4%
13 - 21 d*	42	34	4	4	90,5%
≥ 22 d*	85	70	11	4	95,3%
					Spezifität
Blutspender	502	1**	6	495	98,6%
gesamt	665	128	23	514	
Richtigkeit (Anzahl korrekter Bestimmungen : 645) / (Anzahl 665) = 96,99%					

*Tage nach Beginn der Symptome oder positiven PCR Ergebnissen.

**Die Blutprobe stammt von einem Pneumonie-Patienten mit schweren ARDS Symptomen aber mit einem negativen PCR Ergebnis für SARS-CoV-2.

Bis heute ist noch kein standardisiertes Referenzmaterial für SARS-CoV-2 Antigen oder anti-SARS-CoV-2 Antikörper erhältlich, folglich kann keine absolute analytische Sensitivität bestimmt werden.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wird als der Mittelwert der OD der negativen Kontrollen NC plus die zweifache entsprechende Standardabweichung SA definiert. Die Analytische Sensitivität wurde durch **Inter-Assay Messungen** von 6 verschiedenen Lots E111-IVD berechnet.

Probe	Anzahl Bestimmungen	450 - ≥590 nm Mittelwerte OD	Standardabweichung OD	VK (%)	Analytische Sensitivität: Mittelwert NC + 2SA OD
NC:	26	0,144	0,04	28	0,224
(3fach NC):	26	0,433	Theoretischer Cut-Off Negative/ Grenzwertige		
(5fach NC):	26	0,722	Theoretischer Cut-Off Grenzwertige/ Positive		

Die berechnete analytische Sensitivität, die sich aus dem Mittelwert der OD der negativen Kontrolle NC + 2SD ergibt, beträgt 0,224.

Analytische Spezifität

Die Analytische Spezifität wird durch die Verwendung des S1-RBD Proteins als Antigen im Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD aufgrund geringer Homologien (62%-74%) der S1-RBD Proteine der anderen humanpathogenen Coronaviren erhöht⁵. Kreuzreaktionen zwischen SARS-CoV-2 und SARS-CoV können jedoch wegen ihrer engen Verwandtschaft nicht ausgeschlossen werden.

⁵Wan et al. (2020) Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections, Emerging Microbes & Infections, 9:1, 1497-1505, DOI: 10.1080/22221751.2020.1780951

Die **Kreuzreaktivität** von nicht-SARS-CoV-2 spezifischen Antikörpern gegen das SARS-CoV-2-S1 RBD Protein wurde mit dem Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD untersucht, indem Antikörper-positive Seren gegen bestätigte frühere Infektionen mit anderen Viren getestet wurden.

Antikörper positive Seren gegen	Anzahl der Bestimmungen	Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD
Beta Corona HKU1*	1	negativ
SARS-CoV**	1	negativ
VZV	4	negativ
HCV	5	negativ
HAV	4	negativ
HBV	3	negativ
EBV	4	negativ
CMV	5	negativ
HSV	5	negativ

*Der Patient wurde PCR positiv auf Beta Corona HKU1 getestet und PCR negativ auf SARS-CoV-2. Vier Wochen nach dem PCR Nachweis wurde eine Serumprobe des Patienten abgenommen und negativ im Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD getestet.

**Der Patient war 2009 mit SARS-CoV infiziert.

Präzision

Intra-Assay Varianz

Zu dieser Bestimmung wurden 3 Serumproben 10 mal in einem Assay gemessen.

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert OD	Standardabweichung OD	VK (%)
Probe 1	10	0,346	0,025	7,3
Probe 2	10	0,939	0,038	4,1
Probe 3	10	2,257	0,066	2,9

Inter-Assay Varianz

Für diese Bestimmung wurden 6 Serumproben in verschiedenen Assays mit 3 verschiedenen Lots gemessen.

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert OD/PC OD	Standardabweichung OD	VK (%)
Probe 1	9	1,05	0,0382	3,6
Probe 2	10	0,32	0,0369	11,7
Probe 3	10	0,74	0,0409	5,5
Probe 4	8	0,22	0,0254	11,7
Probe 5	10	0,21	0,0215	10,3
Probe 6	6	0,12	0,0141	11,6

Vergleich mit Test-Kits anderer Hersteller

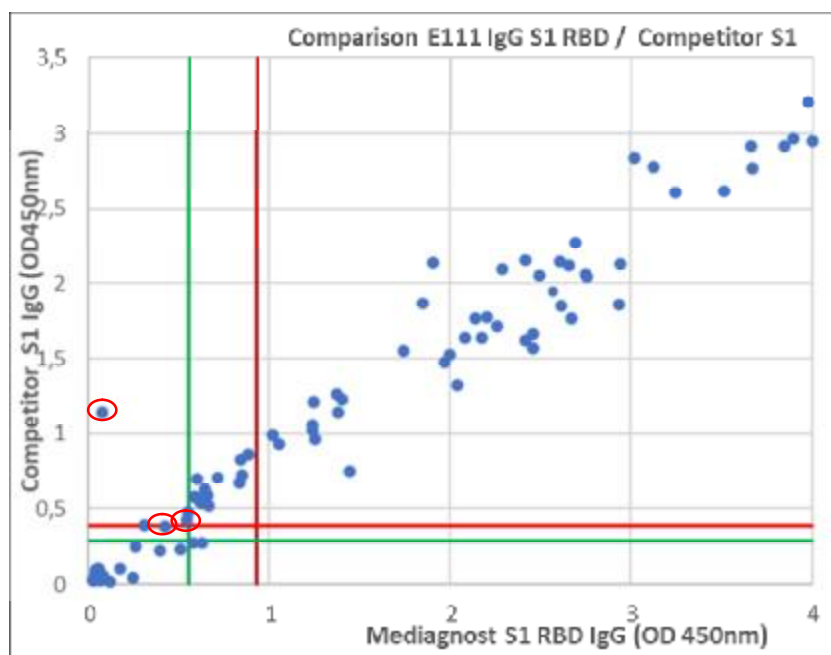
Der Mediagnost E111-IVD ist im Vergleich zu Enzymimmunoassays von Mitbewerbern gut dazu geeignet, anti-SARS-CoV-2-IgG-Antikörper nachzuweisen.

Das gewählte Virusantigen, die S1 Rezeptorbindungsdomäne (S1 RBD), das den Antikörpern als Bindungsstelle dient, ist dem kompletten Spike-Protein und dem Nukleocapsid-Protein überlegen, da diese beiden Antigene zu einer höheren Rate falscher Ergebnisse führen, wie Messungen mit Assays von Mitbewerbern im Vergleich zeigten.

Die Assays wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und berechnet.

In der Abbildung 2 sind die entsprechenden **Kit-spezifischen Cut-Offs**, mit denen die Klassifikation vorgenommen wurde, mit einer **roten und grünen Linie** dargestellt. Für jeden Assay wurden die Werte der gemessenen OD oberhalb der roten Linie als **positiv**, die gemessenen Werte unterhalb der grünen Linie als **negativ** und die Werte zwischen beiden Linien als **grenzwertig** bewertet.

Abb. 2: Vergleich Mediagnost E111-IVD (verwendetes Antigen: Rezeptorbindungsdomäne des S1 Proteins S1 RBD) mit einem Mitbewerber anti-SARS-CoV-2 IgG-Antikörper ELISA S1 (verwendetes Antigen: das komplette S1 Protein).



Beide Tests korrelieren sehr gut. Auffallend ist jedoch die höhere Anzahl falsch positiver Proben im Vergleichstest, bei dem das S1-Protein als Antigen verwendet wird. Es werden 3 falsch positive Proben gefunden (mit einem roten Ring markiert), während der Mediagnost E111-IVD nur eine Probe als grenzwertig misst. Die mit dem Vergleichstest sehr hoch falsch positiv gemessene Probe stammt von einem 4-jährigen Kind mit einer nachgewiesenen HHV-7 Infektion, aber keiner nachgewiesenen SARS-CoV-2-Infektion.

Proben

Der Einfluss von Antikoagulanzen auf die Messungen wurde in 6 korrespondierenden Proben aus Serum, EDTA- und Heparin- Plasma untersucht. Im Vergleich zu den ODs der Serumproben lag die Wiederfindung in den gemessenen EDTA- und Heparin-Plasmaproben im Mittel bei 97,8 % und 102,0 %.

	Serum OD	%	EDTA-Plasma OD	%	Heparin-Plasma OD	%
Probe 1	3,601	100,0	3,677	102,1	3,496	97,1
Probe 2	0,410	100,0	0,385	93,9	0,389	94,9
Probe 3	2,946	100,0	2,918	99,0	3,084	104,7
Probe 4	0,501	100,0	0,458	91,4	0,517	103,2
Probe 5	1,242	100,0	1,218	98,1	1,284	103,4
Probe 6	0,129	100,0	0,132	102,3	0,14	108,5
Mittelwert	-	-	-	97,8	-	102,0

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der IgG-Antikörperentwicklung gegen SARS-CoV-2-S1 (RBD) Protein von drei klinisch kranken Patienten⁶

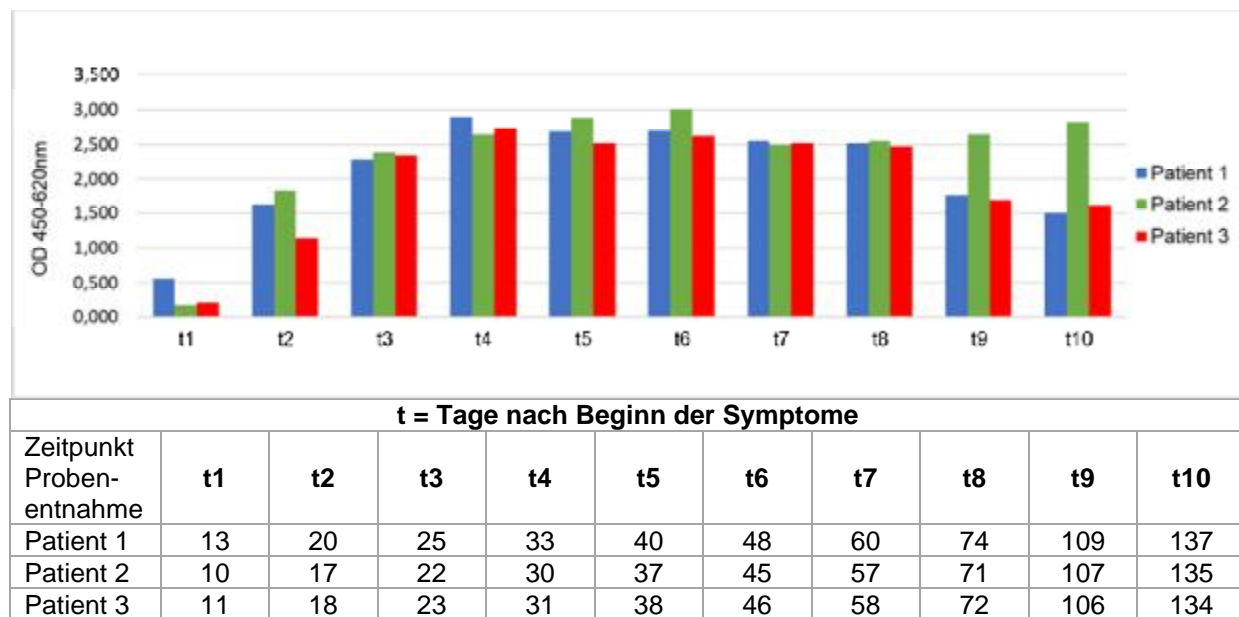


Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Antikörperentwicklung von drei klinisch kranken COVID-19-Patienten. Die erste Messung (t1 nach Beginn der Symptome) zeigte ein negatives Testergebnis. Zum Zeitpunkt t2 wurden bei allen drei Patienten IgG-Antikörper gegen SARS-CoV-2-S1 (RBD) nachgewiesen, wobei ein Anstieg bis zu t4 – t6 erfolgte. Bei t9 und t10 zeigt sich eine Abnahme der Antikörper bei Patient 1 und 3, während sie bei Patient 2 unverändert hoch bleiben. Der Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD ist daher geeignet, IgG-Antikörper von niedrigen Konzentrationen, wie sie zu Beginn einer Immunantwort auftreten, bis zu hohen Konzentrationen nachzuweisen.

⁶Die Ergebnisse sind veröffentlicht in:

Longitudinal analysis of virus load, serum antibody levels and virus neutralizing activity in vitro in cases with less severe COVID-19

Bertram Flehmig et al.: medRxiv 2020.08.20.20174912;

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.20174912>

13. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Nur für in-vitro Anwendungen. Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Der Mediagnost Kit ist nur zum In-vitro-Gebrauch und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Bitte stellen Sie sicher, dass diese Gebrauchsanleitung gelesen und vollständig verstanden wurde. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

VORSICHT: Dieser Test enthält Material tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Tests sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Nachfrage verfügbar.

Die Testplatte MTP ist mit rekombinatem Antigen beschichtet.

Human Serum

Die folgenden Komponenten enthalten humanes Material: **PC, NC**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien: NC, PC, DIL, DET, WP

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (< 0,015 %)

- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- P280 Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P261 Einatmen von Dampf vermeiden.
- P333+P313 Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P302+P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P501 Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substrate Solution (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (< 0.05 %)

- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H335 Kann Atemwege reizen.
- P261 Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
- P305+P351+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopping Solution (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H314 Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
- P280 Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
- P301+P330+ P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P305+P351+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P309+P310 BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFT INFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen

TABLE OF CONTENTS

1.	INTENDED USE.....	16
2.	INTRODUCTION.....	16
3.	ASSAY PRINCIPLE.....	17
4.	KIT COMPONENTS.....	17
5.	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	18
6.	SAMPLES.....	18
7.	STORAGE and STABILITY.....	18
8.	PREPARATION of REAGENTS.....	18
9.	ASSAY PROCEDURE.....	19
10.	TYPICAL RESULTS.....	20
11.	LIMITATION OF PROCEDURE.....	21
12.	PERFORMANCE EVALUATION.....	21
14.	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	25

1. INTENDED USE

Mediagnost Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD is a highly specific enzyme immunoassay for the detection of IgG antibodies directed against SARS-CoV-2-S1 Receptor Binding Domain (RBD) in human blood.

The Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD is For In Vitro Diagnostic Use.

○ Registration Code: DE/CA40/00809/30

The product is intended for use by professional persons only.

2. INTRODUCTION

In December 2019 a novel coronavirus SARS-CoV-2 was identified in Wuhan, China and was announced as the causative agent for COVID-19 disease. The incubation period of the disease is 2-14 days. Symptoms of COVID-19 include i.a. fever, fatigue and cough, shortness of breath, muscle pain and tiredness. Most patients have a good prognosis; some severe cases may develop pneumonia, have severe acute shortness of breath, or even succumb to the disease.

The entry process of SARS-CoV-2 to the host cell is mediated by the envelope-embedded surface-located spike glycoprotein S. The protein is cleaved by host proteases into the S1 and S2 subunits, which are responsible for receptor recognition and membrane fusion, respectively¹.

As target antigen of the assay the recombinant Receptor Binding Domain (RBD) of SARS-CoV-2 S1 spike protein, which binds the ACE2 receptor, is used. The use of RBD increases the specificity of the assay since the domain is identical with SARS-CoV but not with MERS-CoV for example. Antibodies directed against the RBD neutralize both virus strains SARS-CoV and SARS-CoV-2².

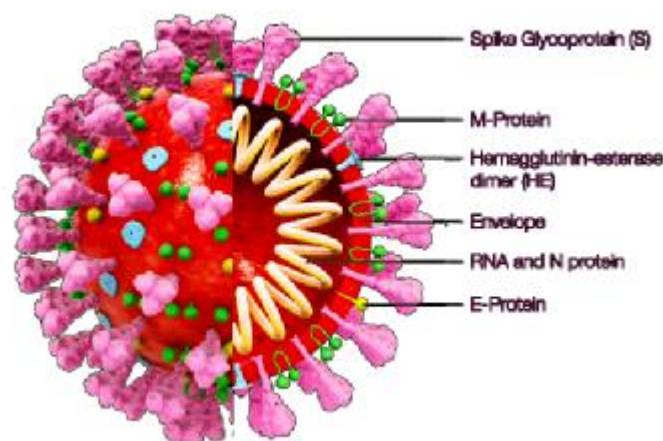


Fig.1: Structural features of Coronavirus³

Up to now there are seven coronaviruses described which can infect humans. Two of them are alpha coronaviruses (229E, NL63) and five are beta coronaviruses (OC43, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2)⁴.

¹Wang et al., Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2, Cell (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>

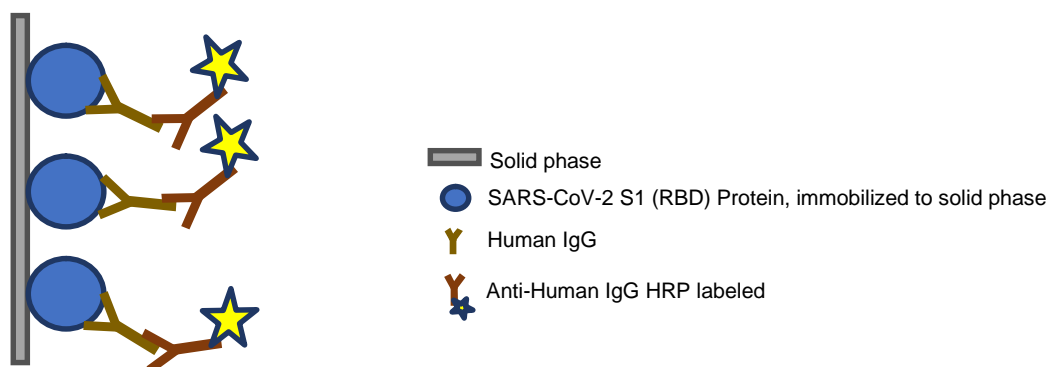
²Tai et al. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>

³Jean-Yves Sgro (2020): https://static-bcrf.biochem.wisc.edu/tutorials/booklets/SARS-COV-2_COVID-19_A_Coloring_Book-v1.0.pdf

⁴CDC: National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases

3. ASSAY PRINCIPLE

Mediagnost Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD is a two-step enzyme-linked immunosorbent assay. Wells of a 96-well microtiter plate are coated with recombinant SARS-CoV-2-S1 Receptor Binding Domain (RBD). After addition of human serum or plasma samples anti-S1 IgG antibodies from the sample bind to the immobilized antigen during a two hours incubation followed by several washing steps in order to remove unbound components. The bound anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies are detected by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human IgG for 30 minutes. Subsequently, a HRP substrate solution containing 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) is added resulting in the formation of a blue colour. The reaction is terminated by the addition of 0.2 M H₂SO₄ changing the blue colour into yellow signals which are measured by an absorbance microtiter plate reader at 450 nm. The extinction increases with the amount of the captured antibodies directed against SARS-CoV-2-S1 (RBD) from the patient's sera.



4. KIT COMPONENTS

MTP	Microtiter Plate, coated with SARS-CoV-2 S1(RBD) protein, wells are separately breakable, ready for use	8 x 12 wells
DET	Antibody-HRP-Conjugate, goat anti-human IgG-antibody, ready for use	14 mL
PC	Positive Control: anti-SARS-CoV-2 positive control serum, human serum, ready for use	1 mL
NC	Negative Control: anti-SARS-CoV-2 negative control serum, human serum, ready for use	1 mL
DIL	Dilution Buffer, ready for use	100 mL
WP	Washing Buffer, 20-fold concentrated solution	50 mL
S	Substrate Solution (TMB), HRP substrate, ready for use	14 mL
SL	Stopping Solution, 0.2 M H ₂ SO ₄ , ready for use	14 mL
	Sealing Tape for covering microtiter plate	2
	Instructions for use	1

5. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Aqua dest. or deionized water for dilution of Washing Buffer WP
Precision pipettes with disposable plastic tips
Microtubes, buffer and reagent reservoirs
Incubator 37°C
Vortex-Mixer
Microtiter plate washer, alternatively manual washing
Microtiter plate reader capable of reading absorbency of 450 nm
(reference filter \geq 590 nm)

6. SAMPLES

Serum, EDTA- and Heparin Plasma
Multiple freeze-thaw cycles should be avoided.
The use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

7. STORAGE and STABILITY

Upon receipt store the kit at 2-8°C.
The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is stable at 2-8°C for 4 weeks.

8. PREPARATION of REAGENTS

Before use bring all reagents to room temperature 20-25°C.

8.1. Washing Buffer WP

Dilute WP 1:20 in Aqua dest., i.e. 50 mL WP + 950 mL Aqua dest.

8.2. Samples

Dilute samples 1:201 in Dilution Buffer DIL, e.g. 5 μ L Sample + 1 mL DIL.

8 diluted samples were stored 3 h and 15 h at +4°C, at room temperature (20 -25°C) or frozen at -20°C: No influence on absorbance values was shown in comparison to the values measured directly after the dilution.

9. ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Dilution
WP	Washing Buffer	1:20 with Aqua dest.
Dilute samples in Dilution Buffer DIL 1:201 , i.e. 5µL Probe + 1 mL DIL, mix immediately. Use 100 µl for each well in the assay.		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20-25°C) .		

Assay Procedure		
Pipette	Reagents	Position
100 µL	Dilution Buffer DIL (blank)	A1/B1
100 µL	Positive Control PC	C1/D1/E1
100 µL	Negative Control NC	F1/G1/H1
100 µL	Sample (1:201 diluted)	in the rest of the wells according to the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample Incubation: 2 h at 37°C		
3 x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash each well 3 x with 300 µL Washing Buffer WP .	in each well
100 µL	Antibody-HRP-Conjugate DET	in each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 30 Minutes at 37°C		
3 x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash each well 3 x with 300 µL Washing Buffer WP .	in each well
100 µL	Substrate Solution S	in each well
Substrate S Incubation: 10 Minutes in the dark at 20 - 25°C		
100 µL	Stopping Solution SL	in each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm (Reference filter ≥ 590 nm).		

10. TYPICAL RESULTS

Sample	OD 450 - ≥590 nm mean	Interpretation of results
Blank	0.008	should not exceed values of the Negative Control
Positive Control	3.007	positive
Negative Control	0.166	negative
Sample 1	2.806	positive
Sample 2	0.117	negative
Sample 3	0.586	borderline

EXAMPLE: CALCULATION P/N RATIO

$$\text{P/N Ratio: } \frac{\text{mean Positive Control } 3.007}{\text{mean Negative Control } 0.166} = 18.11$$

EXAMPLE: CALCULATION CUT-OFF

cut-off: 3 x mean negative control = 0.498

cut-off: 5 x mean negative control = 0.830

The values shown in the table above result in the cut-off (3x) of 0.498 and cut-off (5x) value of 0.830.

Samples > 5 x cut-off

All samples of which signals are higher than OD 0.830 are positive, i.e. contain anti-SARS-CoV-2-S1 (RBD) antibodies.

Samples < 3 x cut-off

All samples of which signals are lower than OD 0.498 are negative, i.e. anti-SARS-CoV-2-S1 (RBD) antibodies are not detectable in the sample.

Samples in between 3 x cut-off and 5 x cut-off

All samples which show OD values in between are borderline.

The calculation of the cut-off was selected in that way that false positive results are excluded with a high probability. Since IgG antibodies to SARS-CoV-2 generally become detectable beginning 10-14 days following infection the borderline samples may indicate the beginning of seroconversion, i.e. the patient is possibly developing antibodies. Therefore, it is strongly recommended to repeat sample drawing and testing around 14 days after the first sample drawing.

Interpretation of results

The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations.

Negative results do not preclude acute SARS-CoV-2 infection. If acute infection is suspected, direct testing for SARS-CoV-2 is necessary.

Results from antibody testing should not be used to diagnose or exclude acute SARS-CoV-2 infection.

11. LIMITATION OF PROCEDURE

The influence of the heterophilic antibodies, rheumatoid factors and anti-species antibodies is reduced, but cannot be completely excluded. Rheumatoid factors were inconspicuously up to 600 International Units/mL (measured concentrations between 10 to 600 IU/mL).

12. PERFORMANCE EVALUATION

Diagnostic Specificity and Sensitivity

	Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD				
Serum samples of persons with positive PCR results and / or Covid-19 disease	n	pos	border-line	neg	Sensitivity
0 - 12 d*	36	23	2	11	69.4%
13 - 21 d*	42	34	4	4	90.5%
≥ 22 d*	85	70	11	4	95.3%
					Specificity
Blood donors	502	1**	6	495	98,6%
total	665	128	23	514	
Accuracy (no of correct assessments : 645) / (no. of all assessments 665) = 96,99%					

*days after onset of symptoms or positive PCR results.

**The blood donor sample derived from a pneumonia patient with heavy ARDS symptoms but with a negative PCR result for SARS-CoV-2.

To date there are no reference standard SARS-CoV-2 antigen or anti-SARS-CoV-2 antibodies available, accordingly absolute analytical sensitivity cannot be calculated.

Analytical Sensitivity

Analytical Sensitivity defined as mean OD of the Negative Control NC plus 2 times the respective standard deviation. Analytical Sensitivity was here calculated by use of **Inter-Assay measurements** of 6 different lots.

The calculated analytical sensitivity, which results from the mean value of the OD of the negative control NC + 2SD, is 0.224.

Sample	Number of determinations	450 - ≥590 nm Mean value OD	Standard deviation OD	VC (%)	Analytical Sensitivity: Mean NC + 2SD OD
NC	26	0.144	0.04	28	0.224
(3fold NC):	26	0.433	Theoretical cut off Negative/ Borderline		
(5fold NC):	26	0.722	Theoretical cut off Borderline/ Positive		

Analytical Specificity

Due to the use of S1-RBD protein as antigen in the Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD the analytical specificity is increased since the S1-RBD proteins of the other human pathogen Coronaviruses share only 62%-74% identity⁵. However, due to close relationship between SARS-CoV-2 and SARS-CoV, cross-reactions cannot be excluded.

⁵Wan et al. (2020) Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections, Emerging Microbes & Infections, 9:1, 1497-1505, DOI: 10.1080/22221751.2020.1780951

Cross-reactivity of non-SARS-CoV-2 specific antibodies against SARS-CoV-2-S1 RBD protein in Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD was examined using sera with known antibodies against confirmed past infections with other viruses.

Antibody positive sera	Number of determinations	Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD
Beta Corona HKU1*	1	Negative
SARS-CoV**	1	Negative
VZV	4	Negative
HCV	5	Negative
HAV	4	Negative
HBV	3	Negative
EBV	4	Negative
CMV	5	Negative
HSV	5	Negative

*The patient was tested PCR positive for Beta Corona HKU1 and PCR negative for SARS-CoV-2. Four weeks after PCR testing a serum sample was drawn from the patient and found to be negative in the Anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD.

**The patient was SARS-CoV infected in 2009.

Precision

Intra-Assay Variance

3 Serum samples were measured 10-fold within one assay.

Mean variance was < 10%.

	Number of determinations	Mean value OD	Standard deviation OD	VC (%)
Sample 1	10	0.346	0.025	7.3
Sample 2	10	0.939	0.038	4.1
Sample 3	10	2.257	0.066	2.9

Inter-Assay Variance

6 Serum samples were measured in independent assays, in 3 different lots.

	Number of determinations	Mean Sample OD/PC OD	Standard deviation	VC (%)
Sample 1	9	1.05	0.0382	3.6
Sample 2	10	0.32	0.0369	11.7
Sample 3	10	0.74	0.0409	5.5
Sample 4	8	0.22	0.0254	11.7
Sample 5	10	0.21	0.0215	10.3
Sample 6	6	0.12	0.0141	11.6

Assay Comparison

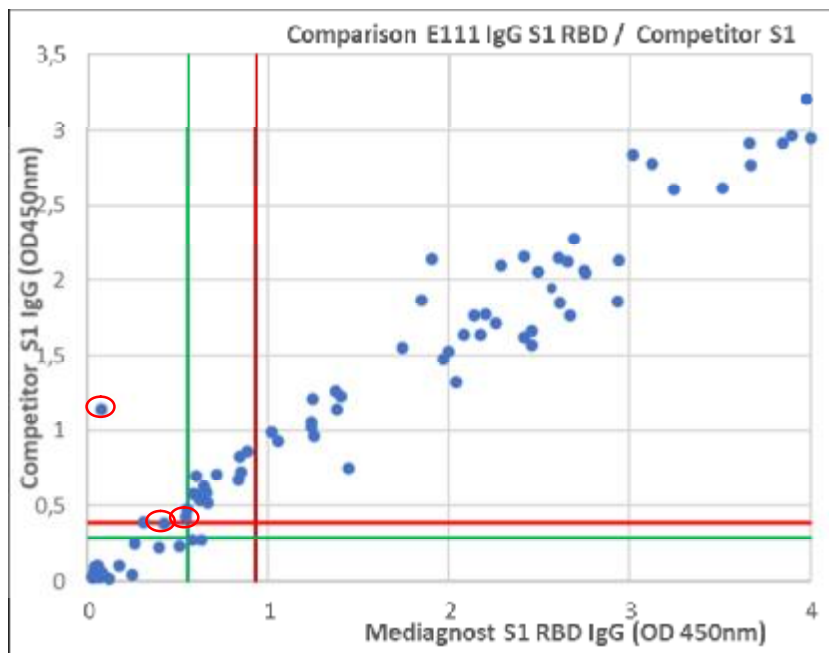
Mediagnost E111-IVD is, in comparison with competitor assays, well suited to detect anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies.

The chosen virus antigen S1 RBD, which serves as binding target for the antibodies, the S1 Receptor Binding Domain, seems to be superior to the complete Spike protein S1 or the Nucleoprotein NCP, both generating higher rates of false results as measured with the competitor assays.

Assays were performed and results calculated according to the manufacturer instructions.

In the figure 2, the respective **kit run specific cut offs**, with which the classification was carried out, are indicated either with a **red or green line**, respectively. For each assay, measured Optical Density (OD) values above the red line were judged as **positive**, below the green line as **negative**, and falling in between both line as **borderline**.

Fig. 2: Comparison of Mediagnost E111-IVD (uses the Receptor Binding Domain of Spike protein S1) with competitor anti-SARS-CoV-2 antibody IgG ELISA S1 (kit uses the complete Spike protein S1 of SARS-CoV-2 virus as antigen).



The correlation between both assays is relatively strong. Obvious is the higher degree of false positive samples with the competitor S1 assay, 3 instead of only one borderline with E111-IVD (marked with a red circle in the figure). The high false positive sample with competitor S1 for instance is a 4-year-old child with HHV-7 infection, however no SARS-CoV-2.

Samples

The influences of anti-coagulants on measurements were investigated in 6 corresponding serum, EDTA and Heparin plasma samples. In comparison to the ODs of the serum samples recovery was measured for Heparin and EDTA plasma samples on average 97.8% and 102.0 %, respectively.

	Serum OD	%	EDTA-Plasma OD	%	Heparin-Plasma OD	%
Sample 1	3.601	100.0	3.677	102.1	3.496	97.1
Sample 2	0.410	100.0	0.385	93.9	0.389	94.9
Sample 3	2.946	100.0	2.918	99.0	3.084	104.7
Sample 4	0.501	100.0	0.458	91.4	0.517	103.2
Sample 5	1.242	100.0	1.218	98.1	1.284	103.4
Sample 6	0.129	100.0	0.132	102.3	0.14	108.5
mean	-	-	-	97.8	-	102.0

Fig. 3: Time course of IgG-antibody development against SARS-CoV-2-S1 (RBD) protein of three clinically ill patients⁶

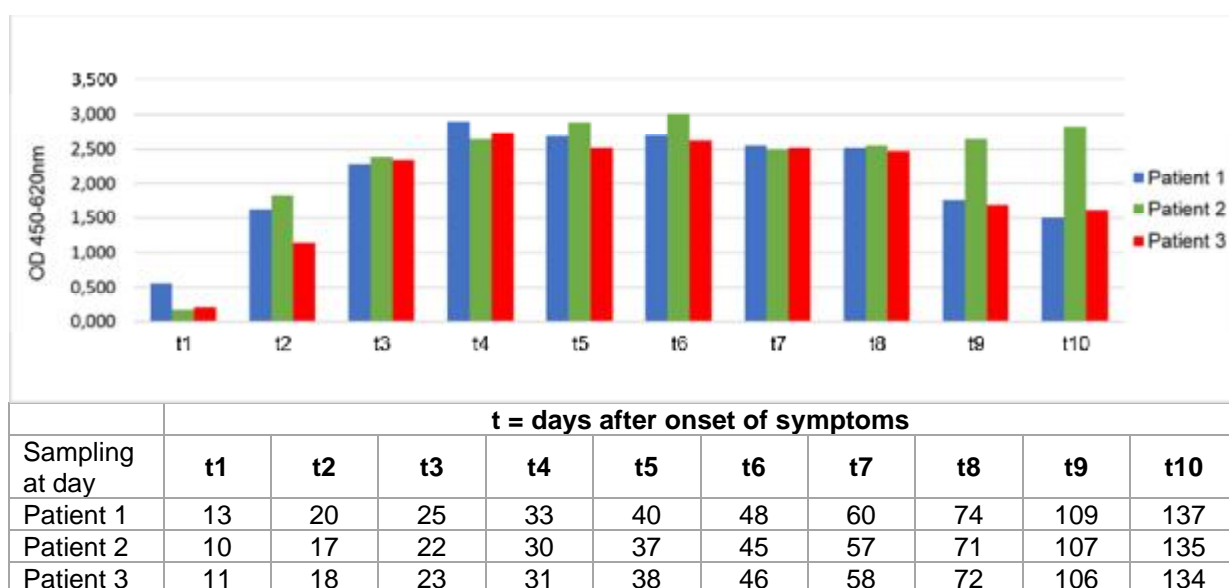


Figure 3 shows the time course of antibody development of three clinically ill COVID-19 patients. The presence of IgG antibodies, following previously negative testing at t1 become detectable beginning at t2 and are increasing up t4 and t6. In patient 1 and 3 they are decreasing at t9 and t10, whereas the level in patient 2 is still high. Therefore, the anti-SARS-CoV-2 ELISA E111-IVD is qualified to detect the entire existing antibody concentration range, even low levels at the onset of an immune response can be detected.

⁶The results have been published in:

Longitudinal analysis of virus load, serum antibody levels and virus neutralizing activity in vitro in cases with less severe COVID-19

Bertram Flehmig et al.: medRxiv 2020.08.20.20174912;

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.20.20174912>

13. WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro use only. For Professional use only. For In Vitro Diagnostic Use.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro use and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents and samples. Follow the general practice of serology for sample storage and collection.

The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

The test plate MTP is coated with recombinant Antigen.

Human Serum

Following components contain human material: **PC, NC**

Source human serum for the Control Sera provided in this kit was tested by recommended methods and found negative for Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Reagents: NC, PC, DIL, DET, WP

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

- | | |
|-----------|---|
| H317 | May cause an allergic skin reaction. |
| P280 | Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection. |
| P272 | Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace. |
| P261 | Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray. |
| P333+P313 | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention. |
| P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| P501 | Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations. |

Substrate Solution (S)

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (<0.05%)

- | | |
|------------|---|
| H315 | Causes skin irritation. |
| H319 | Causes serious eye irritation. |
| H335 | May cause respiratory irritation. |
| P261 | Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray. |
| P305+P351+ | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. |
| P338 | Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |

Stopping Solution (SL)

The Stopping solution contains 0.2 M, Sulphur acid (H₂SO₄)

- | | |
|------------|---|
| H290 | May be corrosive to metals. |
| H314 | Causes severe skin burns and eye damage. |
| P280 | Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection. |
| P301+P330+ | IF SWALLOWED: rinse mouth. |
| P331 | Do NOT induce vomiting. |
| P305+P351+ | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. |
| P338 | Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| P309+P310 | IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician. |

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing, spread the eyelids.

14. INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

WP	WASHBUF 20x	1:20 DILU A. dest.
	SPE 1:201 DILU BUF DIL «	
	°C 20-25 °C	
100 µL	BUF DIL	A1/B1
100 µL	CONTROL POS PC	C1/D1/E1
100 µL	CONTROL NEG NC	F1/G1/H1
100 µL	SPE 1:201 DILU BUF DIL	
TAPE		
A 2 h °C 37°C		
3 x 300 µL	3 x WASHBUF WP	
100 µL	DET	
TAPE		
A 0.5 h °C 37°C		
3 x 300 µL	3 x WASHBUF WP	
100 µL	SUBST TMB S	
A 10 min °C 20-25°C 		
H ₂ SO ₄ SL		
MEASURE		