

**Instructions for use**  
**COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**REF****ID E-1100****IVD****CE**

**1. Intended Use**

The COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA,  $\mu$ -Capture system is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of IgM antibodies in serum and plasma collected from the individuals suspected with signs and symptoms of COVID 19 infection by their healthcare provider. This test is intended for *In Vitro Diagnostic Use*.

**2. Summary and Explanation**

Coronavirus disease (COVID 19) is an infectious disease caused by a newly discovered coronavirus known as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV2. SARS-CoV2 is genetically similar to other human respiratory coronaviruses, including SARS-CoV and MERS-CoV. Due to the rapid rise in number of cases and uncontrolled and vast worldwide spread, the WHO has declared SARS-CoV2 a pandemic. SARS-CoV2 virus belongs to the family of coronavirus, which owns the name due to crown-like spikes on their surface. Most described coronaviruses are found in birds or mammals, particularly bats<sup>1-2</sup>. The virus can cause mild symptoms to severe respiratory disease (i.e. pneumonia) and death. SARS-CoV2 appeared in Wuhan, China in December 2019. Although health officials are still tracing the exact source of this new coronavirus, early hypotheses thought it may be linked to a seafood market in Wuhan, China. Some people who visited the market developed viral pneumonia caused by the new coronavirus. COVID 19 is now a fast-growing global pandemic.

SARS-CoV2 infection occurs mainly in the respiratory tract. Currently, RT-PCR tests are being used to diagnose the patients worldwide because of its availability. However, RT-PCR based diagnosis has its limitation. Detecting SARS-CoV2 by RT-PCR requires high-quality nasopharyngeal specimens that contain an enough amount of intact viral RNA. The challenges associated with collection of this specimen type has led to many reported high false-negative rates<sup>3-4</sup>.

Antibody production (immune response) is the primary defense mechanism against any virus or bacterial infections. IgM antibody is the first to be produced in response to viral proteins (antigens) and will be primarily detectable during the early onset of the disease. IgG antibody is produced late in response to an antigen and will be maintained in the body for long-term response. The advantage of immunoassays is their ability to detect recent and past infections. IgG antibodies are long-lasting and can persist in the bloodstream for many years after infection. This test has the advantage of detecting not only individuals with active infection, but also those who were previously exposed to the virus and have subsequently developed immunity. In addition, such immunoassays only require well established serum or plasma as sample types, thereby greatly reducing challenges associated with collection of nasopharyngeal specimens<sup>3</sup>.

**3. Principle of the test**

The COVID 19 (SARS-COV-2) IgM ELISA kit is based on the ELISA technique, with the  $\mu$ -capture principle. In the assay, calibrators and unknowns are incubated in microtitration wells coated with an anti-human IgM  $\mu$ -capture antibody. After incubation and washing, the wells are treated with the conjugate, composed of purified SARS-CoV2 recombinant antigens labeled with peroxidase. After a second incubation and washing step, the wells are incubated with the substrate tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added and the degree of enzymatic turnover of the substrate is determined by wavelength absorbance measurement 450 nm as primary test filter and 630 nm as reference filter. The absorbance measured is directly proportional to the concentration of human IgM antibodies present in specimen.

**4. Materials supplied**

**Calibrators** ready to use

Cat. no.	Component	Calibrator	Volume/Vial
<b>ID E-1101</b>	CAL A	Calibrator A	1.2 ml
<b>ID E-1102</b>	CAL B	Calibrator B	1.2 ml
<b>ID E-1103</b>	CAL C	Calibrator C	1.2 ml

Contents: with SARS-CoV2 IgM in phosphate buffer saline with BSA containing sodium azide as a preservative. Refer to the vial label for exact calibrator concentrations.

Storage: Store at 2 - 8 °C until expiration date.

**Note:** *Calibrators are provided ready to use and should not be diluted 1:101 in Sample Diluent.*

**ID E-1131** **96** **Antibody-Coated Microtiterplate**  
Contents: One strip holder containing 12x8 (96) microtitration wells coated with anti-human IgM monoclonal antibody.  
Remove the support and strips to be used from the foil package and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.  
Storage: Store at 2 - 8°C until expiration date.  
Once opened, the product is stable for 4 weeks at 2 - 8 °C.

**ID E-1160** **DILUENT** **IgM Sample Diluent**  
Contents: contains a BSA solution with sodium azide as a preservative.  
Volume: 1 x 100 ml  
Storage: Store at 2 - 8 °C until expiration date.

**ID E-1140** **CONJUGATE-CONC 10x** **SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate** - 10x concentrated  
Contents: Contains antigen labelled with peroxidase, in a buffer solution with Proclin-400.  
Volume: 1 x 1.5 ml  
Storage: Store at 2 - 8 °C until expiration date.

**ID E-1161** **CONJUGATE-DIL** **Enzyme Conjugate Diluent**  
Contents: Protein based buffer solution with Proclin-400.  
Volume: 1 x 12 ml  
Storage: Store at 2 - 8 °C until expiration date.

**ID E-1055** **SUBSTRATE** **TMB Chromogen Solution**  
Contents: Contains a solution of tetramethylbenzidine (TMB) in buffer with hydrogen peroxide.  
Volume: 1 x 12 ml  
Storage: Store at 2 - 8 °C until expiration date.

**ID E-1030** **WASH-CONC 25x** **Wash Concentrate A** - 25x concentrated  
Contents: Contains buffered saline with a nonionic detergent.  
Volume: 1 x 60 ml  
Storage: Store at 2 - 30 °C until expiration date.  
Preparation: Dilute 25-fold with deionized water prior to use.

**ID E-1080** **STOP-SOLN** **Stopping Solution**  
Contents: Contains 0.2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Volume: 1 x 12 ml  
Storage: Store at 2 - 30 °C until expiration date.

## 5. Materials required but not supplied

1. Microtitration plate reader capable of absorbance measurement at 450 nm, 405 nm and 630 nm.
2. Deionized/Distilled water
3. Precision pipette to deliver 10 µl, 100 µl and 1 ml
4. 1.5 ml culture tubes
5. Microplate washer
6. Incubator for microplate incubation at 37 °C temperature
7. Vortex mixer

## 6. Warnings and precautions

***This test is for In Vitro Use Only.*** The following universal Good Laboratory Practices should be observed: Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic material is being handled. Do not pipet by mouth. Wear lab coats and disposable gloves when handling immunodiagnostic materials. Wash hands thoroughly afterwards. Cover working area with disposable absorbent paper. Wipe up spills immediately and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Provide adequate ventilation. Handle and dispose all reagents and materials in compliance with applicable regulations.

### ***WARNING: Potential Biohazardous Material***

This kit may contain some reagents made with human and animal sources material (e.g. serum, plasma or bovine albumin) or used in conjunction with human and animal source material. The material in this kit has been tested by CE recommended methods and found to be non-reactive for HIV-1/2 Antibodies, HCV and HbsAg; the material has no record of any animal infection. No available test method can offer complete assurance of eliminating potential biohazardous risk. Handle all reagents and patient samples at a Biosafety Level 2, as recommended for any potentially infectious human material in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 5th Edition, 2007<sup>5</sup>.

### ***WARNING: Potential Chemical Hazard***

Some of the reagents in this kit contain sodium azide<sup>6</sup> as a preservative at concentrations below the regulatory limit of < 0.1%. Although significantly diluted, concentrated sodium azide is an irritant to skin and mucous membranes and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides, especially if accumulated. Additionally, TMB and Sulfuric Acid, in concentrated amounts are also irritants to skin and mucous membranes. These substances are in diluted form and therefore may minimize exposure risks significantly but not completely. Provide adequate ventilation. Avoid contact with skin, eyes and clothing. In case of contact with any of these reagents, wash thoroughly with water and seek medical advice. Dispose all nonhazardous reagents by flushing with large volumes of water to prevent buildup of chemical hazards in the plumbing system. Sample diluent and calibrators contain diluted BSA. For further information regarding hazardous substances in the kit, please refer to the SDS, by request.

## 7. Sample collection and preparation

Serum is the preferred sample type. Serum, lithium heparin plasma or K<sub>2</sub>EDTA plasma can be used. Usual precautions for venipuncture should be observed. Specimens may be stored at 2 - 8 °C for 2 days. For longer periods, store at -20 °C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

## 8. Procedural notes

A thorough understanding of this package insert is necessary for successful use of the product. Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques and accurately following the package insert. Bring all kit reagents and specimens to room temperature (~25 °C) before use. Thoroughly mix the reagents and samples before use by gentle inversion. Do not mix various lots of any kit component within an individual assay. Do not use any component beyond the expiration date shown on its label. Incomplete washing will adversely affect the outcome and assay precision. To minimize potential assay drift due to variation in the substrate incubation time, care should be taken to add the stopping solution into the wells in the same order and speed to add the *TMB Chromogen Solution*. Avoid microbial contamination of reagents, especially of the conjugate, wash buffer and diluent. Avoid contamination of the *TMB Chromogen Solution* with the conjugate. Use a clean disposable pipette tip for each reagent. Avoid pipettes with metal parts. Containers and semi-automatic pipette tips used for the Conjugate and TMB can be reused provided they are thoroughly rinsed with deionized/distilled water and dried prior to and after each usage. The enzyme used as the label is inactivated by oxygen, and is highly sensitive to microbial contamination, sodium azide, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Use high quality water. Avoid exposure of the reagents to excessive heat or sunlight during storage and incubation.

## 9. Preparation of reagents

### ***Wash Solution:***

Dilute wash concentrate 25-fold with deionized water. The wash solution is stable for one month at room temperature when stored in a tightly sealed bottle.

### ***Microtiterplate:***

Select the number of coated wells required for the assay. The remaining unused wells should be placed in the resealable pouch with a desiccant. The pouch must be resealed to protect from moisture.

### SARS-CoV2 Antigen-Enzyme Conjugate Solution:

The SARS-CoV2 Antigen-Enzyme Conjugate Concentrate should be diluted at a ratio of 1 part into 10 parts of the Enzyme Conjugate Diluent, 1:11, according to the number of wells used. **For an entire plate, pipet exactly 1.2 ml of the SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate into 12 ml of the Enzyme Conjugate Diluent.**

**NOTE:** The SARS-CoV2 Antigen-Enzyme Conjugate concentrate should be freshly diluted 10 – 15 minutes prior to use.

A typical example of plate configuration when testing 96 samples:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL A	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
B	CAL B	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
C	CAL C	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
D	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
E	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90
F	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S91
G	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S92
H	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S93

### 10. Assay procedure

Allow all samples and reagents to reach room temperature. Mix reagents thoroughly by gentle inversion before use.

1.	Mark the microtiter wells to be used.
2.	<b>Dilute</b> serum samples <b>1:101</b> by distributing <b>10 µl of serum into 1 ml</b> of <i>IgM Sample Diluent</i> in a <b>culture tube</b> . Vortex to homogenize the diluted samples and use after <b>10 minutes</b> .
3.	Pipette <b>100 µl</b> of <i>Calibrators</i> and <b>diluted serum samples</b> to the appropriate wells.
4.	Incubate for <b>45 ± 15 minutes</b> at <b>37 °C</b> . <b>No shaking is required</b> .
5.	Aspirate and wash each well <b>5 times</b> by adding 350 µl of the wash solution using a microplate washer.
6.	Prepare the SARS-CoV2 IgM Antigen-Enzyme Conjugate Solution by diluting the <i>SARS-CoV 2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate</i> in the <i>Enzyme Conjugate Diluent</i> as described under the "Preparation of Reagents" section of this instructions for use.
7.	Add <b>100 µl</b> of SARS-CoV2 IgM Antigen-Enzyme Conjugate Solution into each well.
8.	Incubate for <b>45 ± 15 minutes</b> at <b>37 °C</b> . <b>No shaking is required</b> .
9.	Aspirate and wash each well <b>5 times</b> by adding 350 µl of the wash solution using a microplate washer.
10.	Add <b>100 µl</b> of the <i>TMB chromogen solution</i> to each well using a precision pipette. <b>Avoid direct exposure to heat and sunlight</b> . Incubate the wells, for <b>8 - 12 min</b> at <b>room temperature</b> . <b>Do not Incubate at 37 °C</b> <b>NOTE:</b> Visually monitor the color development to optimize the incubation time.
11.	Add <b>100 µl</b> of the <i>stopping solution</i> to each well using a precision pipette.
12.	Read the absorbance of the solution in the wells within <b>5 minutes</b> , using a microplate reader set to 450 nm. <b>NOTE:</b> Set the instrument to dual wavelength measurement at 450 nm with background wavelength correction at 630 nm.

### 11. Results

**NOTE:** The results in this package insert were calculated by plotting the data on a log vs. log scale using a linear regression curve-fit. Other data reduction methods may give slightly different results.

1. Calculate the mean absorbance for each calibrator and unknown samples.
2. Plot the mean absorbance readings for each of the calibrators along the y-axis versus the calibrator concentrations in AU/ml (Arbitrary Unit/ml) along the x-axis, using a linear regression curve fit.
3. Determine the SARS-CoV2 IgM concentrations of the samples from the calibrator curve by matching their mean absorbance readings with the corresponding SARS-CoV2 IgM concentrations.

## Result Interpretation:

### Semi-Quantitative results:

Results are expressed in AU/ml as follows:

#### **Negative or Non-Reactive Results:** Sample concentration < 10 AU/ml.

Individuals with nonreactive results are presumed to be not infected with SARS-CoV2 and susceptible to primary infection.

#### **Positive or Reactive Sample Results:** Sample concentration > 12 AU/ml.

A reactive result is potentially at risk of transmitting SARS-CoV2 virus infection and should be confirmed combined with clinical manifestations or other diagnostic methods.

#### **Equivocal: Sample concentration ranges between 10 and 12 AU/ml.**

If the result is equivocal, repeat the test. If it remains equivocal, collect a new specimen for analysis.

## 12. Limitations

The reagents supplied in this kit are optimized to measure SARS-CoV2 IgM in human serum and plasma. If there is evidence of microbial contamination or excessive turbidity in a reagent, discard the vial. For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the samples<sup>8</sup>.

For a medical diagnosis, the serological test result should always be interpreted together with the clinical symptoms of the patient and other results.

Negative results do not rule out the SARS-CoV2 infection, particularly in those who have been in contact with the virus. Follow-up testing with a molecular diagnostic should be considered as a rule out infection in these individuals.

Results from antibody testing should not be used as a sole basis to diagnose or exclude SARS-CoV2 infection or to inform infection status.

Positive results may be due to past or present infection with non-SARS-CoV2 coronavirus strains, such as coronavirus HKU1, NL63, OC43, or 229E.

## 13. Quality control

Each laboratory should establish acceptable criteria to assure proper performance. Labs controls should fall within established results.

## 14. Analytical characteristics

### **Typical Calibrator curve:**

The curve specification has been generated using 45 independent runs with Calibrator A - C run in singletons.

Calibrator	Mean Absorbance (450 - 630 nm)	Standard Deviation (OD)	Concentration (AU/ml)
Calibrator A	0.142	0.018	2.3
Calibrator B	0.54	0.039	10.6
Calibrator C	1.737	0.080	35

**CAUTION:** The data below must not be employed in lieu of data obtained by the user in the laboratory.

### **Imprecision:**

Precision was determined using SARS-CoV2 reagents on specimens from non-reactive, low reactive and high reactive specimens according to guidance from CLSI EP5-A2. The table below summarizes the 45 run results.

Sample	Mean Conc. (AU/ml)	Within run		Between run		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Sample 1	3.8	0.18	4.8 %	0.26	6.8 %	0.32	8.3 %
Sample 2	8.2	0.27	3.3 %	0.45	5.5 %	0.52	6.4 %
Sample 3	28.3	0.77	2.7 %	1.03	3.6 %	1.29	4.5 %

**Interference:**

Interference was tested according to CLSI EP7-A2. Serum samples with SARS-CoV2 IgM concentrations in the table listed below were evaluated as controls (prior to dosing) and tests with the doses of interferents specified in the table below in replicates of five. Interference was considered significant if the analyte recovery is  $\pm 10\%$  of the value of SARS-CoV2 IgM measured. At the concentrations tested, none of the potential interferents tested showed significant difference in sample measurements.

Interferent Dose	Sample ID	Control Sample SARS-CoV2 IgM (AU/ml)	Test sample SARS-CoV2 IgM (AU/ml)	% Difference to Control
Hemoglobin 1000 mg/dl	1	8.51	7.88	-7.5
	2	16.43	15.49	-5.7
	3	5.20	5.04	-2.9
Intralipids 20 mg/ml	4	7.67	7.93	3.4
	5	16.23	15.97	-1.6
	6	5.63	5.90	4.7
Bilirubin 0.66 mg/ml	7	7.53	7.16	-4.9
	8	16.15	15.65	-3.1
	9	4.73	4.77	0.7
Biotin 200 ng/ml	10	7.07	7.17	1.5
	11	15.97	15.77	-1.3
	12	5.31	5.47	3.1

**Cross-Reactivity:**

Potential cross reactants to antibodies to other viruses and immunoglobulins were tested on COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA using sera from positive subjects. All cross-reactant were non-reactive.

Sample Identification	n	Reactivity
Influenza A	5	Non-Reactive
Influenza B	11	Non-Reactive
Anti-RSV IgG	14	Non-Reactive
ANA	8	Non-Reactive
Anti-HBc IgM	4	Non-Reactive
IgM	5	Non-Reactive
IgG	5	Non-Reactive
HCV	5	Non-Reactive
EBV	5	Non-Reactive
HBV	5	Non-Reactive
Rheumatoid Factors	5	Non-Reactive

**Clinical Study:**

Prevalence: SARS-CoV2 appeared in Wuhan, China in December 2019. The expected SARS-CoV2 IgM prevalence values for the United States population in early 2019 is zero percent. The table below summarizes the prevalence in healthy pediatric, adult donor serums collected between October 2018 to August 2019 and adult donor serum collected in March-April 2020. The positive results observed on these subjects were used to calculate the prevalence. The observed positive results correspond to a COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA specificity of 99%.

Donors	N	POS	NEG	Equivocal	% Positive Results	% Specificity
Pediatric (2018 - 2019)	39	0	39	0	0	100
Adult (2019)	100	0	100	0	0	100
Adult (April 2020, No symptoms)	40	0	40	0	0	100
Adult (March - April 2020, symptomatic)	143	30	111	2	21.3	78.7

### Sensitivity and Specificity:

#### Study-1: Comparison of COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA and commercially available CLIA assay<sup>9-12</sup>.

141 human sera were analyzed by COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA and a commercially available IVD Chemiluminescence assay (CLIA, Test B) as reference method. Out of 141 samples, 9 were positive, 132 were negative for the presence of IgM antibodies by COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA, while 7 samples were positive and 134 were negative by commercial CLIA. COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA had a sensitivity of 100 % and specificity of 98.5 %. The results are summarized below.

Commercial CLIA vs COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA		COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA	
		Positive	Negative
Test B	Positive	7	0
	Negative	2	132
	Total = 141	9	132

#### Study-2: Comparison of COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA to SARS-CoV2 RT-PCR Results.

Matched Plasma and Nasal swab samples were collected from 66 subjects for comparison of COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA results to RT-PCR test results. RT-PCR results showed that 43 subjects were positive, and 23 subjects were negative for SARS-CoV2. The results of these 66 subjects when tested using COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA showed a diagnostic accuracy of 60.6 %. The sensitivity and specificity for COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA was 40 % and 100 %, respectively.

RT-PCR vs COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA		COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA	
		Positive	Negative
RT-PCR	Positive	17	26
	Negative	0	23
	Total = 66	17	49

#### Study-3: Comparison of SARS-CoV2 RT-PCR results to a combination of COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG ELISA and COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA.

Matched Plasma and Nasal swab samples were collected from 66 subjects for comparison of combined COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG ELISA and COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA to RT-PCR test results. The combination of IgG and IgM test results showed a diagnostic accuracy of 84.6 %. The sensitivity and specificity for the combined IgG and IgM results was 81.4 % and 91.3 %, respectively.







			PT-PCR		
			Positive	Negative	Total
COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG / IgM	Positive	IgG+ / IgM+	17	0	17
		IgG- / IgM+	0	0	0
	Negative	IgG+ / IgM-	18	2	20
		IgG- / IgM-	8	21	29
	Total		43	23	66



**15. References**

1. Wang G, et al. The progress of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) event in China. J MedVirol. doi: 10.1002/jmv.25705
2. Xiao SY, et al. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. J Med Virol.2020; 1-4 PMID:32031264 DOI:10.1002/jmv.25702
3. Xie X, et al. Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. Radiology. Published online February 12, 2020. 2020;200343. doi:10.1148/radiol.2020200343PubMedGoogle Scholar
4. WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(2019-nCoV) infection is suspected. Interim guidance, 28 January 2020
5. HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Available <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>
6. DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
7. Approved Guideline – Procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038. PMID:10926879
9. Xu W, et al. The diagnostic value of joint detection of serum IgM and IgG antibodies to 2019-nCoV in 2019-nCoV infection. Chinese J Lab Med. 2020;43(00):E012-E012. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20200223-00109 Google Scholar
10. Liu R, et al. The comparative superiority of IgM-IgG antibody test to real-time reverse transcriptase PCR detection for SARS-CoV-2 infection diagnosis. <https://doi.org/10.1101/2020.03.28.20045765>
11. Wang Z, et al. Elevated serum IgM levels indicate poor outcome in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia: A retrospective case-control study. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20041285>
12. Zheng H, et al. Antibodies in infants born to mothers With COVID 19 pneumonia. JAMA. 2020 Mar 26. doi: 10.1001/jama.2020.4861.

**Symbols:**

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	<b>LOT</b>	Batch code	<b>IVD</b>	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	<b>CONT</b>	Content	<b>CE</b>	CE labelled
	Caution	<b>REF</b>	Catalogue number		

## 1. Verwendungszweck

Das *COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA*,  $\mu$ -Capture System dient dem qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern in Serum und Plasma von Personen, bei denen der Verdacht bzw. Anzeichen und Symptome einer COVID 19-Infektion durch ihren behandelnden Arzt festgestellt wurden. Dieser Test ist für den *in-vitro-diagnostischen* Gebrauch bestimmt.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung

Die Coronavirus-Krankheit (COVID 19) ist eine Infektionskrankheit, die durch ein neu entdecktes Coronavirus verursacht wird, das als schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2, SARS-CoV2, bekannt ist. SARS-CoV2 ist genetisch ähnlich wie andere menschliche respiratorische Coronaviren, einschließlich SARS-CoV und MERS-CoV. Aufgrund des raschen Anstiegs der Fallzahlen und der unkontrollierten und enormen weltweiten Ausbreitung hat die WHO SARS-CoV2 zur Pandemie erklärt. Das SARS-CoV2-Virus gehört zur Familie der Coronaviren, die ihren Namen aufgrund der kronenartigen Stacheln auf ihrer Oberfläche tragen. Die meisten beschriebenen Coronaviren kommen bei Vögeln oder Säugetieren vor, insbesondere bei Fledermäusen<sup>1-2</sup>. Das Virus kann von leichten Symptomen bis hin zu schweren Atemwegserkrankungen (z.B. Lungenentzündung) und zum Tod führen. SARS-CoV2 trat im Dezember 2019 in Wuhan, China, auf. Obwohl Gesundheitsbehörden noch immer die genaue Quelle dieses neuen Coronavirus zurückverfolgen, gingen frühe Hypothesen davon aus, dass der Virus mit einem Markt für Meeresfrüchte in Wuhan, China, in Verbindung gebracht werden könnte. Einige Menschen, die den Markt besuchten, entwickelten eine virale Lungenentzündung, die durch das neue Coronavirus verursacht wurde. COVID 19 ist heute eine schnell wachsende globale Pandemie.

Die Infektion mit SARS-CoV2 erfolgt hauptsächlich in den Atemwegen. Gegenwärtig werden aufgrund seiner Verfügbarkeit weltweit RT-PCR-Tests zur Diagnose der Patienten eingesetzt. Die RT-PCR-basierte Diagnose hat jedoch ihre Grenzen. Der Nachweis von SARS-CoV2 mittels RT-PCR erfordert qualitativ hochwertige Proben aus Nasen-Rachen-Abstrichen, die eine ausreichende Menge intakter viraler RNA enthalten. Die mit der Entnahme dieses Probentyps verbundenen Herausforderungen haben zu vielen Berichten über hohe Falsch-Negativ-Raten geführt<sup>3-4</sup>. Die Produktion von Antikörpern (Immunantwort) ist der primäre Abwehrmechanismus gegen jegliche Virus- oder Bakterieninfektionen. IgM-Antikörper sind die ersten, die als Reaktion auf virale Proteine (Antigene) gebildet werden, und sind vor allem während des frühen Krankheitsbeginns nachweisbar. IgG-Antikörper werden spät als Reaktion auf ein Antigen produziert und bleiben für eine langfristige Reaktion im Körper erhalten. Der Vorteil von Immunoassays ist ihre Fähigkeit, aktuelle und frühere Infektionen zu erkennen. IgG-Antikörper sind langlebig und können im Blutkreislauf noch viele Jahre nach der Infektion persistieren. Dieser Test hat den Vorteil, nicht nur Personen mit einer aktiven Infektion nachzuweisen, sondern auch solche, die dem Virus zuvor ausgesetzt waren und anschließend eine Immunität entwickelt haben. Darüber hinaus erfordern solche Immunoassays lediglich Serum oder Plasma als Probentyp, wodurch die mit der Entnahme von Nasen-Rachen-Abstrichen verbundenen Anforderungen stark reduziert werden<sup>3</sup>.

## 3. Testprinzip

Der *COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA* basiert auf der ELISA-Technik mit dem  $\mu$ -Capture System. Im Assay werden Kalibratoren und Unbekannte in Mikrotiterwells inkubiert, die mit einem anti-humanen IgM  $\mu$ -Capture-Antikörper beschichtet sind. Nach Inkubation und Waschen werden die Wells mit dem Konjugat behandelt, das aus gereinigten, mit Peroxidase markierten rekombinanten SARS-CoV2-Antigenen besteht. Nach einem zweiten Inkubations- und Waschschrift werden die Wells mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine säurehaltige Stopplösung zugegeben, und der Grad des enzymatischen Umsatzes des Substrats wird durch Wellenlängenabsorptionsmessung bei 450 nm als primärer Testfilter und 630 nm als Referenzfilter bestimmt. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen humanen IgM-Antikörper.

#### 4. Enthaltene Materialien

##### Calibrators - gebrauchsfertig

Art.-Nr.	Komponente	Kalibratoren	Volumen/Vial
<b>ID E-1101</b>	<b>CAL A</b>	Kalibrator A	1,2 ml
<b>ID E-1102</b>	<b>CAL B</b>	Kalibrator B	1,2 ml
<b>ID E-1103</b>	<b>CAL C</b>	Kalibrator C	1,2 ml

Inhalt: mit SARS-CoV2 IgM in Phosphatpuffersalzlösung mit BSA; enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Die genauen Kalibratorkonzentrationen sind dem Flaschenetikett zu entnehmen

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

**Hinweis:** *Die Kalibratoren werden gebrauchsfertig geliefert und sollten nicht 1:101 in Sample Diluent verdünnt werden.*

##### **ID E-1131** **96 Antibody-Coated Microtiterplate**

Inhalt: Eine Mikrotiterplatte mit 12x8 (96) Wells, beschichtet mit monoklonalem Anti-Human-IgM Antikörper.

Den Rahmen und die zu verwendeten Streifen aus der Folienverpackung nehmen und die unbenutzten Streifen zurück in den Polyethylenbeutel mit dem Trocknungsmittel geben, die Luft ausstoßen und durch Drücken des Verschlusses verschließen.

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

Nach dem Öffnen ist das Produkt für 4 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

##### **ID E-1160** **DILUENT IgM Sample Diluent**

Inhalt: enthält BSA-Lösung mit Natriumazid als Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 100 ml

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

##### **ID E-1140** **CONJUGATE-CONC 10x SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate** - 10x konzentriert

Inhalt: enthält mit Peroxidase markiertes Antigen in einer Pufferlösung mit Proclin-400.

Volumen: 1 x 1,5 ml

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

##### **ID E-1161** **CONJUGATE-DIL Enzyme Conjugate Diluent**

Inhalt: Pufferlösung auf Proteinbasis mit Proclin-400

Volumen: 1 x 12 ml

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren

##### **ID E-1055** **SUBSTRATE TMB Chromogen Solution**

Inhalt: enthält Tetramethylbenzidin (TMB) in Puffer mit Wasserstoffperoxid.

Volumen: 1 x 12 ml

Lagerung: Bei 2 - 8 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

##### **ID E-1030** **WASH-CONC 25x Wash Concentrate A** - 25x konzentriert

Inhalt: enthält gepufferte Kochsalzlösung mit einem nichtionischen Detergens.

Volumen: 1 x 60 ml

Lagerung: Bei 2 - 30 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren.

Vorbereitung: Vor Gebrauch 25-fach mit deionisiertem Wasser verdünnen

##### **ID E-1080** **STOP-SOLN Stopping Solution**

Inhalt: 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Volumen: 1 x 12 ml

Lagerung: Bei 2 - 30 °C bis zum Verfallsdatum aufbewahren

## 5. Benötigte, aber nicht enthaltene Materialien

1. Mikrotiterplattenphotometer zur Messung der Absorption bei 450 nm, 405 nm und 630 nm
2. Deionisiertes / destilliertes Wasser
3. Präzisionspipette zur Abgabe von 10 µl, 100 µl und 1 ml
4. 1,5 ml Laborröhrchen
5. Mikrotiterplatten-Washer
6. Inkubator für Mikrotiterplatten Inkubation bei 37 °C
7. Vortexer

## 6. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

**Dieser Test ist nur für den *In-vitro*-diagnostischen Gebrauch bestimmt.** Die folgende Good Laboratory Practice sollte eingehalten werden: Beim Umgang mit immundiagnostischem Material nicht essen, trinken, rauchen oder Kosmetika verwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie beim Umgang mit immundiagnostischen Materialien Laborkittel und Einweghandschuhe. Waschen Sie sich anschließend gründlich die Hände. Arbeitsbereich mit absorbierendem Einwegpapier abdecken. Verschüttetes Material sofort aufwischen und die betroffenen Oberflächen dekontaminieren. Vermeiden Sie die Bildung von Aerosolen. Für ausreichende Belüftung sorgen. Alle Reagenzien und Materialien in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften handhaben und entsorgen.

**WARNUNG: Potenziell biologisch gefährliches Material.** Dieser Kit kann einige Reagenzien enthalten, die mit menschlichem und tierischem Ausgangsmaterial (z. B. Serum, Plasma oder Rinderalbumin) hergestellt oder in Verbindung mit menschlichem und tierischem Ausgangsmaterial verwendet werden. Das Material in diesem Kit wurde mit den von der CE empfohlenen Methoden getestet und als nicht reaktiv auf HIV-1/2-Antikörper, HCV und HbsAg befunden; für das Material liegen keine Nachweise über irgendeine Tierinfektion vor. Kein verfügbares Testverfahren kann vollständige Gewissheit bieten, dass ein potenzielles biogefährliches Risiko ausgeschlossen werden kann. Alle Reagenzien und Patientenproben sind auf Biosicherheitsstufe 2 zu handhaben, wie im Handbuch der Centers for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5<sup>th</sup> Edition, 2007<sup>5</sup>, für potenziell infektiöses menschliches Material empfohlen.

**WARNUNG: Potenzielle chemische Gefährdung.** Einige der Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid<sup>6</sup> als Konservierungsmittel in Konzentrationen unterhalb des gesetzlichen Grenzwertes von < 0,1 %. Obwohl stark verdünnt, ist konzentriertes Natriumazid ein Reizstoff für Haut und Schleimhäute und kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und explosive Metallazide bilden, insbesondere wenn es sich anreichert. Zusätzlich sind TMB und Schwefelsäure in konzentrierten Mengen ebenfalls reizend für Haut und Schleimhäute. Diese Substanzen liegen in verdünnter Form vor und können daher das Belastungsrisiko erheblich, aber nicht vollständig minimieren. Für ausreichende Belüftung sorgen. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien gründlich mit Wasser waschen und ärztlichen Rat einholen. Entsorgen Sie alle ungefährlichen Reagenzien durch Spülen mit großen Mengen Wasser, um eine Ansammlung chemischer Gefahrenstoffe im Leitungssystem zu vermeiden. Probenverdünner und Standards enthalten verdünntes BSA.

Weitere Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen finden Sie im SDS, auf Anfrage beim Hersteller erhältlich.

## 7. Probensammlung und -vorbereitung

Serum ist der bevorzugte Probentyp. Es kann Serum, Lithium-Heparin-Plasma oder K<sub>2</sub>EDTA-Plasma verwendet werden. Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Venenpunktion sind zu beachten. Die Proben können bei 2 - 8 °C für 2 Tage gelagert werden. Für längere Zeiträume bei -20 °C lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

## 8. Hinweise zur Testdurchführung

Ein gründliches Verständnis dieses Protokolls ist für eine erfolgreiche Anwendung des Produkts erforderlich. Zuverlässige Ergebnisse werden nur durch die Anwendung präziser Labortechniken und die genaue Befolgung des Protokolls erzielt. Bringen Sie alle Kit-Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (~25 °C). Mischen Sie die Reagenzien und Proben vor Gebrauch gründlich, aber vorsichtig. Mischen Sie keine Kit-Komponenten verschiedener Chargen innerhalb eines einzelnen Assays. Verwenden Sie keine Komponente nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums. Unvollständiges Waschen wirkt sich nachteilig auf das Ergebnis und die Präzision des Assays aus. Um eine mögliche Assay-Drift aufgrund von Schwankungen in der Substratinkubationszeit zu minimieren, sollte darauf geachtet werden, dass die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit in die Wells gegeben wird wie die *TMB Chromogen Solution*. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien, insbesondere des Konjugats, des Waschpuffers und des Verdünnungsmittels, ist zu vermeiden. Vermeiden Sie die Kontamination der *TMB Chromogen Solution* mit dem Konjugat. Verwenden Sie für jedes Reagenz eine saubere Einwegpipettenspitze. Vermeiden Sie Pipetten mit Metallteilen. Behälter und halbautomatische Pipettenspitzen, die für das Konjugat

und das TMB verwendet wurden, können wiederverwendet werden, sofern sie vor und nach jedem Gebrauch gründlich mit deionisiertem/destilliertem Wasser gespült und getrocknet werden. Das Enzymkonjugat wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegenüber mikrobieller Kontamination, Natriumazid, hypochloriger Säure und aromatischen Chlorkohlenwasserstoffen, die häufig in Laborwasservorräten vorkommen. Verwenden Sie Wasser von hoher Qualität. Vermeiden Sie es, die Reagenzien während der Lagerung und Inkubation übermäßiger Hitze oder Sonnenlicht auszusetzen.

**9. Vorbereitung der Reagenzien**

**Waschlösung:**

Waschkonzentrat 25-fach mit deionisiertem Wasser verdünnen. Die Waschlösung ist bei Raumtemperatur einen Monat lang stabil, wenn sie in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt wird.

**Microtiterplate:**

Wählen Sie die Anzahl der beschichteten Wells, die für den Assay benötigt werden. Die verbleibenden unbenutzten Wells sollten in den wiederverschließbaren Beutel mit einem Trockenmittel gegeben werden. Der Beutel muss zum Schutz vor Feuchtigkeit wieder verschlossen werden.

**SARS-CoV2 Antigen-Enzym-Konjugat-Lösung:**

Das SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate sollte im Verhältnis von 1 Teil in 10 Teilen des Enzyme Conjugate Diluent, 1:11, entsprechend der Anzahl der verwendeten Wells verdünnt werden. **Für eine ganze Platte pipettieren Sie genau 1,2 ml des SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate in 12 ml des Enzyme Conjugate Diluent.**

**HINWEIS:** Das SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate-Concentrate sollte 10 - 15 Minuten vor der Verwendung frisch verdünnt werden.

Typisches Beispiel für eine Belegung mit 96 Bestimmungen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	CAL A	P6	P14	P22	P30	P38	P46	P54	P62	P70	P78	P86
<b>B</b>	CAL B	P7	P15	P23	P31	P39	P47	P55	P63	P71	P79	P87
<b>C</b>	CAL C	P8	P16	P24	P32	P40	P48	P56	P64	P72	P80	P88
<b>D</b>	P1	P9	P17	P25	P33	P41	P49	P57	P65	P73	P81	P89
<b>E</b>	P2	P10	P18	P26	P34	P42	P50	P58	P66	P74	P82	P90
<b>F</b>	P3	P11	P19	P27	P35	P43	P51	P59	P67	P75	P83	P91
<b>G</b>	P4	P12	P20	P28	P36	P44	P52	P60	P68	P76	P84	P92
<b>H</b>	P5	P13	P21	P29	P37	P45	P53	P61	P69	P77	P85	P93

## 10. Testdurchführung

Lassen Sie alle Proben und Reagenzien Raumtemperatur erreichen. Mischen Sie die Reagenzien vor Gebrauch gründlich, aber vorsichtig.

1.	Markieren Sie die zu verwendenden Mikrotiterstreifen.
2.	Serumproben <b>1:101</b> in einem <b>Laborröhrchen</b> verdünnen, indem <b>10 µl Serum in 1 ml IgM-Sample Diluent</b> in einem Laborröhrchen gegeben werden. Zur Homogenisierung der verdünnten Proben vortexen und nach <b>10 Minuten</b> verwenden.
3.	Je <b>100 µl</b> der <i>Calibrators</i> und der <b>verdünnten Serumprobe</b> in die entsprechenden Wells pipettieren.
4.	<b>45 ± 15 Minuten bei 37 °C inkubieren.</b> Schütteln ist nicht erforderlich.
5.	Jedes Well absaugen und 5-mal mit 350 µl der Waschlösung unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Washers waschen.
6.	Bereiten Sie die SARS-CoV2 IgM-Antigen-Enzym-Konjugatlösung vor, indem Sie das <i>SARS-CoV2 IgM Enzyme Conjugate Concentrate</i> mit dem <i>Enzyme Conjugate Diluent</i> verdünnen, wie im Abschnitt "Vorbereitung der Reagenzien" dieser Gebrauchsanweisung beschrieben.
7.	Geben Sie <b>100 µl</b> gebrauchsfertige SARS-CoV2 IgM-Enzymkonjugat-Lösung in jedes Well.
8.	<b>45 ± 15 Minuten bei 37 °C inkubieren.</b> Schütteln ist nicht erforderlich.
9.	Jedes Well absaugen und 5-mal mit 350 µl der Waschlösung unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Washers waschen.
10.	Mit einer Präzisionspipette <b>100 µl</b> der <i>TMB-Chromogen Solution</i> in jedes Well geben. <b>Direkte Einwirkung von Hitze und Sonnenlicht vermeiden.</b> Inkubieren Sie die Wells 8 - 12 Minuten lang bei <b>Raumtemperatur. Nicht bei 37 °C inkubieren.</b> <b>HINWEIS:</b> Kontrollieren Sie die Farbentwicklung visuell, um die Inkubationszeit zu optimieren.
11.	Geben Sie mit einer Präzisionspipette <b>100 µl</b> der <i>Stopping Solution</i> in jedes Well.
12.	Lesen Sie die Absorption der Lösung in den Wells innerhalb <b>von 5 Minuten</b> mit einem auf 450 nm eingestellten Mikroplatten-Lesegerät ab. <b>HINWEIS:</b> Stellen Sie das Gerät auf <i>Doppelwellenlängenmessung bei 450 nm mit Hintergrundwellenlängenkorrektur bei 630 nm ein.</i>

## 11. Auswertung

**HINWEIS:** Die Ergebnisse in dieser Packungsbeilage wurden durch Auftragen der Daten auf einer log vs. log-Skala unter Verwendung einer linearen Regressionskurve berechnet. Andere Auswerteverfahren können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

1. Berechnen Sie die mittlere Absorption für jeden Kalibrator und jede Probe.
2. Die mittleren Absorptionsmesswerte für jeden Kalibrator entlang der y-Achse gegen die Kalibratorkonzentrationen in AU/ml (Arbitrary Units/ml) entlang der x-Achse unter Verwendung einer linearen Regressionskurvenanpassung auftragen.
3. Bestimmen Sie die anti-SARS-CoV2-IgM-Konzentrationen der Proben aus der Kalibrierkurve, indem Sie deren mittlere Absorptionswerte mit den entsprechenden anti-SARS-CoV2-IgM-Konzentrationen abgleichen.

### Interpretation der Ergebnisse:

#### Semi-quantitative Ergebnisse:

Die Ergebnisse werden wie folgt in AU/ml ausgedrückt:

#### **Negative oder nicht-reaktive Ergebnisse:** Probenkonzentration **< 10 AU/ml**

Bei Personen mit nicht reaktiven Ergebnissen wird davon ausgegangen, dass sie nicht mit SARS-CoV2 infiziert und anfällig für eine Primärinfektion sind.

#### **Positive oder reaktive Probenergebnisse:** Probenkonzentration **> 12 AU/ml**

Ein reaktives Ergebnis zeigt ein potenzielles Risiko der Übertragung einer SARS-CoV2-Virusinfektion an und sollte in Kombination mit weiteren klinischen - oder anderen diagnostischen Methoden bestätigt werden.

#### **Nicht eindeutig: Die Probenkonzentration liegt zwischen 10 und 12 AU/ml**

Wenn das Ergebnis nicht eindeutig ist, den Test wiederholen. Bleibt das Ergebnis nicht eindeutig, ist eine neue Probe für die Analyse zu entnehmen.

## 12. Grenzen des Tests

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind für die Messung von SARS-CoV2 IgM in Humanserum und Plasma optimiert. Bei Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination oder übermäßiger Trübung eines Reagenzes ist das Fläschchen zu verwerfen. Bei Tests, bei denen Antikörper verwendet werden, besteht die Möglichkeit einer Interferenz durch heterophile Antikörper in den Proben<sup>8</sup>.

Für eine medizinische Diagnose sollte das serologische Testergebnis immer zusammen mit den klinischen Symptomen des Patienten und anderen Ergebnissen interpretiert werden.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV2 nicht aus, insbesondere nicht bei Personen, die mit dem Virus in Kontakt gekommen sind. Folgeuntersuchungen mit einer molekular diagnostischen Untersuchung sollten als Ausschluss einer Infektion bei diesen Personen in Betracht gezogen werden. Ergebnisse von Antikörpertests sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose oder den Ausschluss einer SARS-CoV2-Infektion oder zur Information über den Infektionsstatus verwendet werden.

Positive Ergebnisse können auf eine frühere oder gegenwärtige Infektion mit Nicht-SARS-CoV2-Coronavirustämmen, wie z.B. Coronavirus HKU1, NL63, OC43 oder 229E, zurückzuführen sein.

## 13. Qualitätskontrolle

Jedes Labor sollte akzeptable Kriterien festlegen, um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten. Die Laborkontrollen sollten innerhalb der festgelegten Ergebnisse liegen.

## 14. Analytical characteristics

### Typische Kalibrierkurve:

Die Kurvenspezifikation wurde unter Verwendung von 45 unabhängigen Läufen mit Standard A - C in Einzelbestimmung erstellt.

Kalibrator	Mittlere Absorption (450 - 630 nm)	Standardabweichung (OD)	Konzentration (AU/ml)
Kalibrator A	0,142	0,018	2,3
Kalibrator B	0,54	0,039	10,6
Kalibrator C	1,737	0,080	35

**ACHTUNG:** Die nachstehenden Daten dürfen nicht anstelle von Daten verwendet werden, die der Anwender im Labor erhalten hat.

### Genauigkeit - Präzision:

Die Präzision wurde unter Verwendung von SARS-CoV2-Reagenzien an Proben von nicht reaktiven, schwach reaktiven und hoch reaktiven Proben gemäß den Richtlinien CLSI EP5-A2 bestimmt. Die nachstehende Tabelle fasst die Ergebnisse der 45 Durchläufe zusammen.

Probe	Mittlere Konz. (AU/ml)	Intra Assay		Inter Assay		Total	
		SD	% VK	SD	% VK	SD	% VK
Probe 1	3,8	0,18	4,8 %	0,26	6,8 %	0,32	8,3 %
Probe 2	8,2	0,27	3,3 %	0,45	5,5 %	0,52	6,4 %
Probe 3	28,3	0,77	2,7 %	1,03	3,6 %	1,29	4,5 %

### Interferenzen:

Die Interferenz wurde gemäß CLSI EP7-A2 getestet. Serumproben mit SARS-CoV2 IgM-Konzentrationen in der unten aufgeführten Tabelle wurden als Kontrollen (vor der Dosierung) und Tests mit den in der Tabelle angegebenen Dosen von Interferenzen in fünf Wiederholungen ausgewertet. Die Interferenz wurde als signifikant angesehen, wenn die Analytenwiederfindung  $\pm 10\%$  des gemessenen SARS-CoV2 IgM-Wertes beträgt. Bei den getesteten Konzentrationen zeigte keiner der getesteten potenziellen Störfaktoren einen signifikanten Unterschied in den Probenmessungen.

Substanz	Proben Nr.	Kontrollen SARS-CoV2 IgM (AU/ml)	Testproben SARS-CoV2 IgM (AU/ml)	% Unterschied zur Kontrolle
Hämoglobin 1000 mg/dl	1	8,51	7,88	-7,5
	2	16,43	15,49	-5,7
	3	5,20	5,04	-2,9
Intralipid 20 mg/ml	4	7,67	7,93	3,4
	5	16,23	15,97	-1,6
	6	5,63	5,90	4,7
Bilirubin 0,66 mg/ml	7	7,53	7,16	-4,9
	8	16,15	15,65	-3,1
	9	4,73	4,77	0,7
Biotin 200 ng/ml	10	7,07	7,17	1,5
	11	15,97	15,77	-1,3
	12	5,31	5,47	3,1

### Kreuzreaktion:

Potenzielle Substanzen, die Kreuzreaktionen gegen Antikörper gerichtet gegen andere Viren und Immunglobuline aufweisen könnten wurden im COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM-ELISA unter Verwendung von Seren positiver Probanden getestet. Alle Substanzen waren nicht reaktiv.

Probe	n	Reaktivität
Influenza A	5	nicht-reaktiv
Influenza B	11	nicht-reaktiv
Anti-RSV IgG	14	nicht-reaktiv
ANA	8	nicht-reaktiv
Anti-HBc IgM	4	nicht-reaktiv
IgM	5	nicht-reaktiv
IgG	5	nicht-reaktiv
HCV	5	nicht-reaktiv
EBV	15	nicht-reaktiv
HBV	5	nicht-reaktiv
Rheumatoid Factors	5	nicht-reaktiv

### Klinische Studie:

Prävalenz: SARS-CoV2 trat im Dezember 2019 in Wuhan, China, auf. Die für Anfang 2020 erwarteten SARS-CoV2-IgM-Prävalenzwerte für die Bevölkerung der Vereinigten Staaten liegen bei null Prozent. Die nachstehende Tabelle fasst die Prävalenz in gesunden pädiatrischen Spenderseren für Erwachsene, die zwischen Oktober 2018 und August 2019 gesammelt wurden, und in Spenderseren für Erwachsene, die im März-April 2020 gesammelt wurden, zusammen. Die bei diesen Probanden beobachteten positiven Ergebnisse wurden zur Berechnung der Prävalenz herangezogen. Die beobachteten positiven Ergebnisse entsprechen einer COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA -Spezifität von 99 %.

Spender	N	POS	NEG	Nicht eindeutig	% Positive Ergebnisse	% Spezifität
Pädiatrisch (2018 - 2019)	39	0	39	0	0	100
Erwachsen (2019)	100	0	100	0	0	100
Erwachsen (April 2020, keine Symptome)	40	0	40	0	0	100
Erwachsen (März - April 2020, symptomatisch)	143	30	111	2	21,3	78,7



**Sensitivität and Spezifität:**

**Studie 1: Assay Vergleich COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA und einem erhältlichen CLIA Assay<sup>9-12</sup>**

141 Humanseren wurden mit dem COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA und einem kommerziell erhältlichen IVD-Chemilumineszenz-Assay (CLIA, Test B) als Referenzmethode analysiert. Von 141 Proben waren 9 positiv und 132 negativ für das Vorhandensein von IgM-Antikörpern mit dem COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA während 7 positiv und 134 negativ mit einem kommerziell erhältlichen CLIA Assay waren. Der COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA hat eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,5 %. Die Ergebnisse sind unten zusammengefasst.

kommerzieller CLIA vs COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA		COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA	
		Positiv	Negativ
Test B	Positiv	7	0
	Negativ	2	132
	Total = 141	9	132

**Studie 2: Vergleichsstudie COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA vs. SARS-CoV2 RT-PCR**

Für den Vergleich der COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA-Ergebnisse mit den RT-PCR-Testergebnissen wurden übereinstimmende Plasma- und Nasenabstrichproben von 66 Testpersonen gesammelt. Die RT-PCR-Ergebnisse zeigten, dass 43 Probanden positiv und 23 Probanden negativ für das SARS-CoV2 Virus getestet wurden. Die Ergebnisse dieser 66 Testpersonen mittels dem COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA zeigten eine diagnostische Genauigkeit von 60,6 %. Die Sensitivität und Spezifität für den COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA beträgt 40 % bzw. 100 %.

RT-PCR vs COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA		COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA	
		Positiv	Negativ
RT-PCR	Positiv	17	26
	Negativ	0	23
	Total = 66	17	49

**Studie 3: Vergleichsstudie SARS-CoV2 RT-PCR vs. einer Kombination aus COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG ELISA und COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA.**







Für den Vergleich der kombinierten COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG ELISA und COVID 19 (SARS-CoV-2) IgM ELISA mit dem RT-PCR-Testergebnissen wurden übereinstimmende Plasma- und Nasenabstrichproben von 66 Probanden gesammelt. Die Kombination von IgG- und IgM-Testergebnissen zeigt eine diagnostische Genauigkeit von 84,6 %. Die Sensitivität und Spezifität für die kombinierten IgG- und IgM Ergebnisse beträgt 81,4 % bzw. 91,3 %.

			PT-PCR		
			Positiv	Negativ	Total
COVID 19 (SARS-CoV-2) IgG / IgM	Positiv	IgG+ / IgM+	17	0	17
		IgG- / IgM+	0	0	0
	Negativ	IgG+ / IgM-	18	2	20
		IgG- / IgM-	8	21	29
	Total		43	23	66

## 15. Referenzen

1. Wang G, et al. The progress of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) event in China. J MedVirol. doi: 10.1002/jmv.25705
2. Xiao SY, et al. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. J Med Virol.2020; 1-4 PMID:32031264 DOI:10.1002/jmv.25702
3. Xie X, et al. Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing. Radiology. Published online February 12, 2020. 2020;200343. doi:10.1148/radiol.2020200343PubMedGoogle Scholar
4. WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(2019-nCoV) infection is suspected. Interim guidance, 28 January 2020
5. HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Available <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>
6. DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
7. Approved Guideline – Procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038. PMID:10926879
9. Xu W, et al. The diagnostic value of joint detection of serum IgM and IgG antibodies to 2019-nCoV in 2019-nCoV infection. Chinese J Lab Med. 2020;43(00):E012-E012. doi:10.3760/cma.j.cn114452-20200223-00109 Google Scholar
10. Liu R, et al. The comparative superiority of IgM-IgG antibody test to real-time reverse transcriptase PCR detection for SARS-CoV-2 infection diagnosis. <https://doi.org/10.1101/2020.03.28.20045765>
11. Wang Z, et al. Elevated serum IgM levels indicate poor outcome in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia: A retrospective case-control study. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.20041285>
12. Zheng H, et al. Antibodies in infants born to mothers With COVID 19 pneumonia. JAMA. 2020 Mar 26. doi: 10.1001/jama.2020.4861.

### Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer		