

IDK[®] anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA

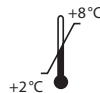
*Zur qualitativen in-vitro-Bestimmung von
humanen IgM-Antikörpern gegen SARS-CoV-2
in EDTA-Plasma und Serum*

*For the qualitative in vitro determination of
human IgM antibodies against SARS-CoV-2
in EDTA plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2021-08-17

REF K 5001

Σ 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. TESTVORBEREITUNG	4
<i>Lagerung der Proben</i>	4
<i>Probenverdünnung</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	6
9. EINSCHRÄNKUNGEN	6
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
11. TESTCHARAKTERISTIKA	7
<i>Kreuzreaktivität</i>	7
<i>Klinische Spezifität und Sensitivität</i>	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die qualitative Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 in humanem Serum und EDTA-Plasma. Das Produkt ist ein *In-vitro*-Diagnostikum und für den Gebrauch durch Fachpersonal geeignet. Die Abarbeitung kann manuell oder mit Hilfe eines ELISA-Automaten erfolgen. Dieser Test dient als Ergänzung der direkten Infektionsdiagnostik und dem Nachweis einer beginnenden Immunreaktion gegen SARS-COV-2.

2. EINLEITUNG

Das Virus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) ist ein behülltes Einzelstrang-RNA-Virus der Familie *Coronaviridae* [1, 2].

Die Vertreter dieser Familie haben mit 4 Strukturproteinen (*Spike* [S]-, *Envelope* [E]-, *Membran* [M]-, und *Nukleokapsid* [N]- Protein) und mehreren Nicht-Strukturproteinen einen ähnlichen Aufbau. Sie verursachen bei verschiedenen Wirbeltierspezies eine Vielzahl von Erkrankungen [6, 8]. Insgesamt sind sieben humanpathogene Coronavirusarten bekannt (Stand Februar 2020): neben SARS-CoV[-1], SARS-CoV-2 und MERS-CoV noch HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 sowie HCoV-229E. Während SARS-CoV[-1], SARS-CoV-2 und MERS-CoV zu schweren respiratorischen und systemischen Erkrankungen führen können, führen Infektionen mit den vier letztgenannten in der Regel zu milden Erkältungssymptomen [3, 8].

Nach einer Infektion mit SARS-CoV-2 dringt das Virus mit Hilfe des Proteins ACE-2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) in Zellen ein und kann zur Erkrankung COVID-19 mit unterschiedlichen Verlaufsformen führen [4, 5, 7]. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 14 Tagen sind sowohl asymptomatische, milde (Fieber, Erkältung, Husten, Müdigkeit, Kurzatmigkeit und Geruchsverlust), schwere und schwerste Verläufe mit Todesfolge beschrieben. Dabei gelten das Alter und verschiedene Komorbiditäten (z.B. Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Lungenerkrankungen) als Risikofaktoren für einen schweren Verlauf [3, 12,13].

Je nach verwendeter Methode und untersuchter Antikörperklasse kann nach einer Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Serokonversion beobachtet werden. Durchschnittlich 7 Tage nach Symptombeginn können bei einem Großteil der Patienten IgM-Antikörper gegen SARS-CoV-2 im Blut nachgewiesen werden. Die Persistenz der anti-SARS-CoV-2-IgM-Antikörper im Blut nimmt über einen Zeitraum von bis zu mehreren Wochen individuell ab [9, 10, 11].

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 5001	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 5001	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 12,5 ml
K 5001	CTRL CUT- OFF	Cut-off-Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 5001	CTRL NEG	Negativkontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 5001	CTRL POS	Positivkontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1 ml
K 5001	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 110 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	3 x

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Pipetten mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Theroschüttler für Mikrotiterplatten für 37 °C (z. B. Modell Shake ID2 erhältlich bei Immundiagnostik AG)
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- **Alle Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur (18–30°C) bringen.**
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100ml WASHBUF + 900ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8°C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8°C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. TESTVORBEREITUNG

Lagerung der Proben

Frisch abgenommenes Serum kann 14 Tage bei Raumtemperatur oder bis zu 4 Wochen bei 2–8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Die Proben sollten maximal drei Einfrier- und Auftauzyklen unterzogen werden.

Verdünnte Proben sind **nicht stabil** und können **nicht gelagert** werden.

Probenverdünnung

Die Proben werden **1:101 mit Probenverdünnungspuffer** weiterverdünnt. Zum Beispiel:

- **10 µl** Probe + **1 000 µl** Probenverdünnungspuffer = **1:101**

100 µl der **Probenverdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient der Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das SARS-CoV-2-Spikeprotein (S1). Die verdünnten Proben werden in eine mit spezifischem Antigen beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Durch die Zugabe des Konjugats (peroxidase-markierter Detektionsantikörper) wird der körpereigene anti-SARS-CoV-2-Antikörper markiert. Der Nachweis erfolgt über die Peroxidase, die das Substrat TMB zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Der entstandene Farbumschlag wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt über die Cut-off-Kontrolle.

Pipettierschema

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit beiliegender Abdeckfolie abgeklebt, zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der wieder verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Je 100 µl der Kontrollen und der verdünnten Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	Streifen abdecken und 1 h unter Schütteln (900 rpm*) bei 37 °C inkubieren.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	100 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und 1 h bei 37 °C unter Schütteln (900 rpm*) inkubieren.

6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
7.	100µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
8.	10–15 Minuten bei Raumtemperatur (18–30°C) inkubieren bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt**.
9.	100µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren und im Mikrotiterplattenphotometer im Schüttelmodus (900 rpm)* kurz mischen.
10.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen.

* Wir empfehlen die Streifen mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Cut-off = OD Cut-off-Kontrolle x 1,2

Proben, die eine höhere mittlere optische Dichte (OD) haben als der **Cut-off**, sind positiv.

Proben, die eine niedrigere mittlere optische Dichte (OD) haben als der **Cut-off**, sind negativ.

Vor jeder automatischen Auswertung stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchführen. Falls dies nicht durch die verwendete Software erfolgt, die Kontrolle manuell durchführen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, welche nicht eindeutig interpretierbar sind (z. B. aufgrund hoher Variationskoeffizienten der Replikate), sollten wiederholt werden.

Negative IgM-Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus: Es kann sich um Serum-/Plasma-Proben eines sehr frühen Infektionszeitpunkts handeln, zu dem der Körper noch keine IgM-Antikörper gebildet hat. Diese werden frühestens 2–3 Tage nach Infektionsbeginn gebildet.

Ebenfalls ist ein negatives Ergebnis nach Abnahme der IgM Antikörper bei einem lange zurückliegenden Infektionsbeginn zu erwarten.

Bei diesem Test handelt es sich um einen indirekten Erregernachweis. Er ersetzt nicht den direkten Erregernachweis.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Kreuzreaktivität

Die Spezifität des IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ELISAs wurde mit Serumproben, die positiv auf Antikörper gegen verschiedene Viren getestet wurden (n = 47), bestätigt. Mit diesen Proben konnte eine Spezifität von 96 % bestätigt werden.

Virus	n	positiv [%]	negativ [%]
Adenovirus	5	20	80
Epstein-Barr-Virus	5	0	100
Influenza A/B	5	0	100
HCoV-229E	5	0	100
HCoV-HKU1	7	0	100
HCoV-NL63	12	8	92
HCoV-OC43	8	0	100
Gesamt	47	4	96

Klinische Spezifität und Sensitivität

Sensitivität; n = 20

Die Bestimmung der Sensitivität erfolgte mit 20 Serumproben von Patienten aus Deutschland mit einer vorangegangenen SARS-CoV-2-Infektion. Der Nachweis der Infektion dieser Patienten mit SARS-CoV-2 erfolgte mittels RT-PCR. Die Blutproben, welche zur Bestimmung der Sensitivität herangezogen wurden, wurden im weiteren Krankheitsverlauf der Patienten gewonnen.

	Anzahl Patienten mit positiver RT-PCR
gesamt	20
Positiver IgM-Antikörper-Nachweis	19
Negativer IgM-Antikörper-Nachweis	1

Daraus ergibt sich für den IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA eine Sensitivität von 95 %.

Spezifität; n = 762

Zur Bestimmung der Spezifität wurden 762 Serumproben von Blutspendern aus den Jahren 2017 und 2018 verwendet.

	Anzahl Blutspende-proben
gesamt	762
Positiver IgM-Antikörper-Nachweis	18
Negativer IgM-Antikörper-Nachweis	744

Daraus ergibt sich für den IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA eine Spezifität von 97,6 %.

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay)

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [OD]	VK [%]
1 (n=90)	2,855	3,49%
2 (n=90)	0,435	4,30%

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay)

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Serumproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [OD]	VK [%]
1 (n=20)	2,071	13,1
2 (n=20)	0,362	16,2

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.
- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.



Achtung: Verursacht schwere Augenreizung

BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2020. "The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2." *Nature Microbiology* **5** (4): 536–44.
2. Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, et al. 2020. "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019." *The New England Journal of Medicine* **382** (8): 727–33.
3. Tian, Wenjie, Wanlin Jiang, Jie Yao, Christopher J Nicholson, Rebecca H Li, Haakon H Sigursslid, Luke Wooster, Jerome I Rotter, Xiuqing Guo, and Rajeev Malhotra. 2020. "Predictors of Mortality in Hospitalized COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Medical Virology*, May.
4. Bourgonje, Arno R, Amaal E Abdulle, Wim Timens, Jan-Luuk Hillebrands, Gerjan J Navis, Sanne J Gordijn, Marieke C Bolling, et al. 2020. "Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the Pathophysiology of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)." *The Journal of Pathology*, May.
5. Yan, Renhong, Yuanyuan Zhang, Yaning Li, Lu Xia, Yingying Guo, and Qiang Zhou. 2020. "Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2." *Science (New York, N.Y.)* **367** (6485): 1444–48.
6. Wu, Aiping, Yousong Peng, Baoying Huang, Xiao Ding, Xianyue Wang, Peihua Niu, Jing Meng, et al. 2020. "Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-NCoV) Originating in China." *Cell Host & Microbe* **27** (3): 325–28.
7. Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S Schiergens, et al. 2020. "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." *Cell* **181** (2): 271-280.e8.
8. Corman, V M, J Lienau, and M Witzenth. 2019. "[Coronaviruses as the Cause of Respiratory Infections]." *Der Internist* **60** (11): 1136–45.
9. Wölfel, Roman, Victor M Corman, Wolfgang Guggemos, Michael Seilmaier, Sabine Zange, Marcel A Müller, Daniela Niemeyer, et al. 2020. "Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019." *Nature* **581** (7809): 465–69.
10. To, Kelvin Kai-Wang, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung, Anthony Raymond Tam, Tak-Chiu Wu, David Christopher Lung, Cyril Chik-Yan Yip, et al. 2020. "Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses during Infection by SARS-CoV-2: An Observational Cohort Study." *The Lancet. Infectious Diseases* **20** (5): 565–74.

11. Xiao, Ai Tang, Chun Gao, and Sheng Zhang. 2020. "Profile of Specific Antibodies to SARS-CoV-2: The First Report." *The Journal of Infection* **81** (1): 147–78.
12. Sheervalilou, Roghayeh, Milad Shirvaliloo, Nahid Dadashzadeh, Sakine Shirvalilou, Omolbanin Shahraki, Younes Pilehvar-Soltanahmadi, Habib Ghaznavi, Samideh Khoei, and Ziba Nazarlou. 2020. "COVID-19 under Spotlight: A Close Look at the Origin, Transmission, Diagnosis, and Treatment of the 2019-NCoV Disease." *Journal of Cellular Physiology*, May.
13. Lotfi, Melika, and Nima Rezaei. 2020. "SARS-CoV-2: A Comprehensive Review from Pathogenicity of the Virus to Clinical Consequences." *Journal of Medical Virology*, June.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

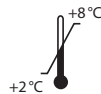
IDK[®] anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA

***For the qualitative in vitro determination of
human IgM antibodies against SARS-CoV-2
in EDTA plasma and serum***

Valid from 2021-08-17

REF K 5001

Σ 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	16
6. PREPARATION OF THE ASSAY	17
<i>Sample storage</i>	17
<i>Dilution of samples</i>	17
7. ASSAY PROCEDURE	17
<i>Principle of the test</i>	17
<i>Test procedure</i>	18
8. RESULTS	19
9. LIMITATIONS	19
10. QUALITY CONTROL	19
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20
<i>Clinical specificity and sensitivity</i>	20
<i>Cross-reactivity</i>	20
<i>Accuracy – Precision</i>	21
12. PRECAUTIONS	21
13. TECHNICAL HINTS	22
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
15. LITERATURE	23

1. INTENDED USE

IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative measurement of IgM antibodies against the novel coronavirus SARS-CoV-2 in human serum or EDTA plasma. The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and is intended to be used by professional users in a laboratory environment. This ELISA can be performed manually or using an automated platform. This test serves as complement to direct infection diagnosis and provides evidence for a beginning immunoreaction against SARS-CoV-2.

2. INTRODUCTION

The virus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) is an enveloped, single stranded RNA virus and is a family member of the coronavirus family *Coronaviridae* [1,2].

Coronaviruses have a similar composition as they are composed of similar structural proteins including the spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) protein and several non-structural proteins. Their members cause a variety of diseases in different vertebrate species [6, 8]. As of February 2020, seven human pathogenic coronaviruses are known: besides SARS-CoV[-1], SARS-CoV-2 and MERS-CoV, there are HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63 and HCoV-229E. While SARS-CoV[-1], SARS-CoV-2 and MERS-CoV can cause severe respiratory and systemic diseases, infections with the last four mentioned usually lead to mild cold symptoms [3, 8].

After an infection with SARS-CoV-2, the virus accesses host cells via the protein ACE2 (angiotensin-converting enzyme) and causes the disease COVID-19. The severity of disease ranges from asymptomatic, mild (fever, cold, cough, tiredness, shortness of breath, and loss of smell), and severe to most severe forms with death [4, 5, 7]. Aging and several co-morbidities (e.g. diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and chronic pulmonary diseases) are described as risk factors for severe progressive forms of COVID-19 [3, 12, 13].

Seroconversion occurs on different time points depending on the used method and the measured class of antibodies. Around 7 days after onset of symptoms, IgM antibodies against SARS-CoV-2 can be detected in the blood of majority of patients. The persistence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the blood decreases individually over a period of up to several weeks [9, 10, 11].

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 5001	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 5001	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 12.5 ml
K 5001	CTRL CUT-OFF	Cut-off control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 5001	CTRL NEG	Negative control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 5001	CTRL POS	Positive control, ready-to-use	1 x 1 ml
K 5001	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 110 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml
	FOL	Foil to cover the microtiter plate	3 x

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl single-use tips
- Microtiter plate thermoshaker at 37 °C (for example model Shake ID2 available at Immundiagnostik AG)
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- **Bring all reagents to room temperature (18–30 °C) prior to use.**
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary**

for each run. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASH-BUF)** should be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100ml WASH-BUF + 900ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. PREPARATION OF THE ASSAY

Sample storage

Freshly collected serum can be stored for 14 days at room temperature or for up to 4 weeks at 2–8 °C. Long-term storage is recommended at -20 °C. More than 3 freeze-thaw cycles should be avoided.

Diluted samples are not stable and cannot be stored.

Dilution of samples

Samples are diluted **1:101 in sample dilution buffer**. For example:

- **10 µl** sample + **1 000 µl** sample dilution buffer, mix well = **1:101**

For analysis, pipet **100 µl diluted sample** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA serves for the determination of IgM antibodies against the spike protein (S1) of SARS-CoV-2. Diluted samples are added to a microtiter plate coated with a specific antigen. By adding the peroxidase conjugate (peroxidase labelled detection antibody), the antibodies against SARS-CoV-2 in the sample are marked. They are detected via the peroxidase conjugate with the peroxidase converting the substrate TMB to a blue product.

The enzymatic reaction is stopped by adding an acidic solution. The samples convert from blue to yellow. The colour change should be measured in a photometer at 450 nm. The interpretation is made using the cut-off control.

Test procedure

Bring all reagents and samples to room temperature (18–30 °C) and mix well.

Mark the positions of controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered with the foil included in the kit together with the desiccant bag in the re-closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details, please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend carrying out the tests in duplicates.

1.	Pipet each 100 µl of controls and diluted samples into the wells of the microtiter plate.
2.	Cover the strips and incubate for 1 hour shaking (900 rpm)* on a horizontal shaker at 37 °C.
3.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 100 µl conjugate (CONJ) into each well.
5.	Cover the strips and incubate for 1 hour shaking (900 rpm)* on a horizontal shaker at 37 °C.
6.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
8.	Incubate for 10–15 minutes at room temperature (18–30 °C) until a sufficiently large difference in colour occurs**.
9.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix shortly by using the shake function (900 rpm)* of the microplate reader.

10.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference.
-----	--

* We recommend shaking the strips with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

Cut-off = OD cut-off control x 1.2

Samples which have a higher average optical density (OD) than the **cut-off** are positive.

Samples which have a lower average optical density (OD) than the **cut-off** are negative.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a manual control of the paired values should be made.

9. LIMITATIONS

Samples which cannot be clearly interpreted (e.g. because of high coefficients of variation of replicates) should be measured again.

Negative IgM results do not rule out an infection with SARS-CoV-2. The serum or plasma samples may be collected at a very early stage of infection when the body has not yet produced IgM antibodies. They are detectable earliest 2-3 days after the start of an infection. A certain time after virus infection, IgM signal starts to decrease and negative results are expected.

This test serves as indirect virus detection method and does not replace a direct virus detection.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical specificity and sensitivity

Sensitivity; n = 20

For determination of clinical sensitivity, 20 samples from patients with previous RT-PCR confirmed SARS-CoV-2 infection were tested. Blood samples, used for determination of sensitivity were collected at later stages of infection.

	Number of patients with positive RT-PCR
total	20
Positive IgM antibody detection	19
Negative IgM antibody detection	1

These results in a sensitivity of 95 % for the IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA.

Specificity; n = 762

For determination of clinical specificity, 762 serum samples from blood donors were tested. All samples were collected in 2017 and 2018.

	Number of blood donors
total	762
Positive IgM antibody detection	18
Negative IgM antibody detection	744

The resulting specificity for the IDK® anti-SARS-CoV-2 IgM ELISA was 97.6 %.

Cross-reactivity

Specificity data were confirmed using serum samples, which have been tested positive for antibodies against different viruses (n=47). These data showed a specificity of 96 % for the IDK® anti-SARS-COV-2 IgM ELISA.

Virus	n	positive [%]	negative [%]
Adenovirus	5	20	80
Epstein-Barr virus	5	0	100
Influenza A/B	5	0	100

Virus	n	positive [%]	negative [%]
HCoV-229E	5	0	100
HCoV-HKU1	7	0	100
HCoV-NL63	12	8	92
HCoV-OC43	8	0	100
Total	47	4	96

Accuracy – Precision

Repeatability (Intra-Assay)

The repeatability was assessed with 2 serum samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [OD]	CV [%]
1 (n=90)	2.855	3.49%
2 (n=90)	0.435	4.30%

Reproducibility (Inter-Assay)

The reproducibility was assessed with 1 serum sample under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [OD]	CV [%]
1 (n=20)	2.071	13.1
2 (n=20)	0.362	16.2

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact



Warning: Causes serious eye irritation

IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.












- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. LITERATURE

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2020. "The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2." *Nature Microbiology* **5** (4): 536–44.
2. Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, et al. 2020. "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019." *The New England Journal of Medicine* **382** (8): 727–33.
3. Tian, Wenjie, Wanlin Jiang, Jie Yao, Christopher J Nicholson, Rebecca H Li, Haakon H Sigurðsson, Luke Wooster, Jerome I Rotter, Xiuqing Guo, and Rajeev Malhotra. 2020. "Predictors of Mortality in Hospitalized COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Medical Virology*, May.
4. Bourgonje, Arno R, Amaal E Abdulle, Wim Timens, Jan-Luuk Hillebrands, Gerjan J Navis, Sanne J Gordijn, Marieke C Bolling, et al. 2020. "Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the Pathophysiology of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)." *The Journal of Pathology*, May.
5. Yan, Renhong, Yuanyuan Zhang, Yaning Li, Lu Xia, Yingying Guo, and Qiang Zhou. 2020. "Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2." *Science (New York, N.Y.)* **367** (6485): 1444–48.
6. Wu, Aiping, Yousong Peng, Baoying Huang, Xiao Ding, Xianyue Wang, Peihua Niu, Jing Meng, et al. 2020. "Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-NCoV) Originating in China." *Cell Host & Microbe* **27** (3): 325–28.
7. Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S Schiergens, et al. 2020. "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." *Cell* **181** (2): 271-280.e8.

8. Corman, V M, J Lienau, and M Witzenth. 2019. "[Coronaviruses as the Cause of Respiratory Infections]." *Der Internist* **60** (11): 1136–45.
9. Wölfel, Roman, Victor M Corman, Wolfgang Guggemos, Michael Seilmaier, Sabine Zange, Marcel A Müller, Daniela Niemeyer, et al. 2020. "Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019." *Nature* **581** (7809): 465–69.
10. To, Kelvin Kai-Wang, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung, Anthony Raymond Tam, Tak-Chiu Wu, David Christopher Lung, Cyril Chik-Yan Yip, et al. 2020. "Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses during Infection by SARS-CoV-2: An Observational Cohort Study." *The Lancet. Infectious Diseases* **20** (5): 565–74.
11. Xiao, Ai Tang, Chun Gao, and Sheng Zhang. 2020. "Profile of Specific Antibodies to SARS-CoV-2: The First Report." *The Journal of Infection* **81** (1): 147–78.
12. Sheervalilou, Roghayeh, Milad Shirvaliloo, Nahid Dadashzadeh, Sakine Shirvalilou, Omolbanin Shahraki, Younes Pilehvar-Soltanahmadi, Habib Ghaznavi, Samideh Khoei, and Ziba Nazarlou. 2020. "COVID-19 under Spotlight: A Close Look at the Origin, Transmission, Diagnosis, and Treatment of the 2019-NCoV Disease." *Journal of Cellular Physiology*, May.
13. Lotfi, Melika, and Nima Rezaei. 2020. "SARS-CoV-2: A Comprehensive Review from Pathogenicity of the Virus to Clinical Consequences." *Journal of Medical Virology*, June.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

