

# COVID-19

# IgM

**Enzyme Immunoassay  
for the determination of  
IgM antibodies to COVID-19  
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



**DIA.PRO**  
**Diagnostic Bioprobes Srl**  
**Via G. Carducci n° 27**  
**20099 Sesto San Giovanni**  
**(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF COV19M.CE  
96, 192 Tests

## COVID-19 IgM

### A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM antibodies to COVID19 in human plasma and sera.

The kit is intended for the monitoring of the immune response to COVID-19 in the early stage of the infection as an additional marker to PCR.

For "in vitro" diagnostic use only.

### B. INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which was first identified amid an outbreak of respiratory illness cases in Wuhan City, Hubei Province, China and has since then caused a global pandemic. SARS-CoV-2 is a positive-sense single-stranded RNA virus and belongs to the Betacoronavirus Genus, which also includes SARS CoV (2003) and MERS CoV (2012). Same as all other coronaviruses, the genome of SARS-CoV-2 (2019-nCoV) encodes the spike protein, the envelope protein, the membrane protein, and the nucleocapsid protein. Those who are infected with COVID-19 may have little to no symptoms. Symptoms of COVID-19 are similar to a cold or flu and may take up to 14 days to appear after exposure to SARS-CoV-2. Symptoms have included: fever, cough, difficulty breathing, pneumonia in both lungs.

In severe cases, infection can lead to death. Current tests for SARS-CoV-2 look for genetic material of the virus in oral swabs, using the polymerase chain reaction (PCR). PCR only give a positive result when the virus RNA is still present.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are more rapid, easily automatable and simple tests respect PCR, providing additional markers of early COVID-19 infection.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with recombinant Nucleocapsid and Spike antigens specific to COVID-19

The solid phase is first treated with the diluted sample in presence of a RF blocking reagent; IgM are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2<sup>nd</sup> incubation bound antibodies are detected by the addition of polyclonal specific anti hIgM antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti COVID-19 IgM present in the sample. A cut-off value let optical densities be interpreted into COVID-19 IgM negative and positive results.

Neutralization of IgG anti-Covid and RF, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block such kind of interferences.

### D. COMPONENTS

Code COV19M.CE contains reagents for 96 tests.

#### Microplate MICROPLATE

n° 1 microplate. 12 strips of 8 microwells coated with recombinant COVID-19 Nucleocapsid and Spike antigens. Plates are sealed into a bag with desiccant.

#### Negative Control CONTROL -

1x2.0ml/vial. Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is **yellow color coded**.

#### Positive Control CONTROL +

1x2.0ml/vial. Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, human IgM, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Positive Control is **green color coded**.

#### Enzyme Conjugate CONJ

1x16ml/vial. Ready to use and **pink/red color coded** reagent. It contains Horseradish Peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgM, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

#### Chromogen/Substrate SUBS TMB

1x16ml/vial. Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.**

#### Sample Diluent: DILSPE

2x50ml/bottle. It contains 1% goat serum proteins, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

**Note: The diluent changes color from olive green to dark bluish green in the presence of sample.**

#### Neutralizing Reagent SOLN NEUT

1x8.0ml/vial. Ready to use reagent. It contains goat anti hIgG, 10 mM tris buffered solution pH 8.0 +/-0.1 containing 0.045% ProClin 300. For blocking interference due to RF.

#### Wash buffer concentrate WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

#### Sulphuric Acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15ml/bottle. It contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

#### Plate sealing foils n° 2

#### Package insert n° 1

**Important note:** Only upon specific request, Dia.Pro can supply reagents for 192 tests, as reported below:

1.Microplate	n°2
2.NegativeControl	1x4.0ml/vial
3.PositiveControl	1x4.0ml/vial
4.Enz. Conjugate	2x16ml/vial
5.Chromog/Subs	2x16ml/vial
6.Sample Diluent	3x60ml/vial
8.Neutralizing Reagent	1x15ml/vial
5.Wash buff conc	2x60ml/bottle
9.Sulphuric Acid	1x32ml/vial
10.Plate seal foils	n° 4
11.Pack. insert	n° 1
<b>Number of tests</b>	<b>192</b>
<b>Code</b>	<b>COV19M.CE.192</b>

### E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200ul and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionized, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minutes range or higher.

4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blinking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

#### F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and

then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

**16.** The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

**17.** Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

#### G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMANDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.
7. As the Sample Diluent (DILSPE) contains a strong virus-inactivating substance, diluted samples may be stored at +2..8°C only for 48 hrs.

#### H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-use of the device and up to 6 months.

##### Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing. In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

##### Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

##### Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

##### Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

**Note:** Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

#### Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.  
Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.  
If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

#### Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.  
Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.  
Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.  
If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container.

#### Neutralizing Reagent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

#### Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

#### Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.  
Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

#### Legenda:

##### Warning H statements:

**H315** – Causes skin irritation.

**H319** – Causes serious eye irritation.

##### Precautionary P statements:

**P280** – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

**P302 + P352** – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

**P332 + P313** – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

**P305 + P351 + P338** – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

**P337 + P313** – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

**P362 + P363** – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

### I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

- 1. Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
- The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
- The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).  
**5 washing cycles** (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances.  
If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The **ELISA microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; (d) repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
6. The use of **ELISA automated work stations** is recommended when screening a quite high number of samples (> 50 samples).  
When using an ELISA automated workstation, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing.  
This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells.  
When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to 2.8°C, firmly capped.  
Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

### L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
5. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
6. Turn on the ELISA reader at least 20 minutes before the reading operation.
7. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
8. Check that the micropipettes are set to the required volume.
9. Check that all the other equipment is available and ready to use.
10. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

### M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

#### AUTOMATED ASSAY:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, follow the instruction below for programming the instrument:

1. Dilute samples 1:41 in a proper tube according to the instruction of use of the instrument. As an example: 10 ul sample + 400 ul DILSPE). Mix by aspiration&dispensation.
2. The well A1 is used for blanking operations.
3. Dispense 50 ul of Neutralizing Reagent (SOL NEUT) in all the wells of the microplate except A1 for blanking.

**Important note:** The Neutralizing Reagent is able to block false positive reactions due to RF. Positive samples in internal QC panels might be detected negative if such samples were tested positive with an IVD that does not carry out any RF blocking reaction.

4. Dispense 200 ul Negative Control in triplicate and 200 ul Positive Control in single in the appropriate control wells (ex.: B1+C1+D1 for the negative control and E1 for the positive control). Do not dilute Controls as they are pre-diluted, ready to use!
5. Dispense 200 ul of the prediluted samples in the proper sample wells.
6. For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

**Important Note:** Visually monitor that samples have been dispensed into appropriate wells. This is simply achieved by checking that the color of the well turns to intense blue.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

#### MANUAL ASSAY

1. In proper test tubes dispense 400 ul of sample diluent (DILSPE); then add 10 ul sample to have a final dilution of 1:41. Mix the sample on vortex. Check that the color turns from light green to bluish green.
2. Place the required number of wells in the microwell holder. Leave the 1<sup>st</sup> well empty for the operation of blanking.
3. Add 50 ul of Neutralizing Reagent (SOL NEUT) in each well of the plate, except in A1.
4. Dispense 200 ul of Negative Control in triplicate and 200 ul Positive Control in single in properly identified control wells. Do not dilute Controls as they are pre-diluted, ready to use!
5. Finally dispense 200 ul of diluted samples to all the sample wells.

**Important note:** Check that the color of the well turns upon addition of the diluted sample from bluish green to dark blue.

6. Mix gently the plate manually, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells.
7. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.

**Important note:** Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

8. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350ul/well of diluted washing solution as reported previously (section I.3).
9. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the 1<sup>st</sup> blanking well, and cover with the sealer. Check that this pink/red colored component has been dispensed in all the wells, except A1.

**Important note:** Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

10. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
11. Wash microwells as in step 6.
12. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 15 minutes**.

**Important note:** Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

13. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow/brown.
14. Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 (mandatory).

#### Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

### N. ASSAY SCHEME

An example of dispensation scheme is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S4											
B	NC	S5											
C	NC	S6											
D	NC	S7											
E	PC	S8											
F	S1	S9											
G	S2	S10											
H	S3	S11											

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control PC = Positive Control  
S = Sample

In the table below the volumes and the procedures are summarized for the Manual Method.

Manual Method	Operations
Samples + DILSPE	10 ul + 400 ul (dilution 1:41)
Neutralizing Reagent	50 ul
Controls	200 ul
Diluted samples	200 ul
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 ul
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>45 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 ul
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>15 min</b>
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

### O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether their OD450nm/620-630nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.150 mean OD450nm value after blanking
Positive Control	S/Co > 1.1

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further as data are invalid.

### P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula on the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC):

$$NC + 0.250 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

**Important note:** When the calculation of results is done by the operative system of an ELISA automated work station be sure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the right interpretations of results.

### Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm/620-630nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table.

In the follow-up of COVID-19 **suspected infections** the following interpretation applies:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Gray-zone
> 1.1	Positive

A **negative** result indicates that the subject has not developed IgM to COVID-19.

Any subject showing an **equivocal** result (Gray zone) should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later.

A **positive** result is indicative of presence of IgM to COVID-19.

#### Important notes:

- The right interpretation of results should be done anyway under the supervision of the responsible of the laboratory looking in addition at other clinical parameters to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.**
- Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect IgM antibodies (example: confirmation/typing test Dia.Pro) before a diagnosis is formulated. The presence of IgM cannot be used when alone to formulate a diagnosis of COVID-19 infection.**
- In the exceptional case the kit is used for the screening of Health Care Workers at risk of COVID-19 infection or for the evaluation of the acquired immune status of individuals from normal population, the following interpretation applies:**

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Gray-zone
1.1 – 2.0	Low Positive
> 2.0	Positive

and a "Confidence Index" (or grade of reliability) is used in the interpretation of data, as follows:

a) for values in the range  $1.1 < S/Co < 2$ , positivity has a low index of confidence. If however IgG antibodies, when tested in combination to IgM, show a positive or equivocal result, further diagnostic investigations are suggested on a sample collected after 7-10 days from the first.

b) for  $S/Co > 2$ , at contrary, the confidence index is high and in this case it is suggested to submit the sample to the DiaPro's Confirmatory Assay, as reported already. If IgG antibodies, when tested in combination, are positive as well, the person should be tested for COVID-19 RNA, and/or submitted to a computed tomography (CAT).

- When test results are transmitted from the laboratory to an informatics Centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

### R. PERFORMANCES

Whole performances are still under evaluation considering the difficulty to evaluate in particular specimens coming from infected hospitalized patients.

#### Diagnostic specificity:

The assay was tested on hundreds of samples collected before the outbreak of COVID-19. A value of  $\geq 98\%$  was found.

No crossreactions were observed by other respiratory infective microbes and viruses including influenza (tested on 2019-2020 vaccinated individuals) and none were observed by IgM antibodies to the following common infective agents: Herpes Viruses (CMV, EBV and HSV), Toxoplasma and Rubella, H.pylori. No false positive results were observed with antibodies to HCV, HIV, HBsAg, Syphilis, Plasmodium species, and minor others.

Common autoantibodies (thyroid, liver, ANA and ENA mostly) in Autoimmune Diseases did not generate false positive results.

No interferences were observed in pregnant women, abnormal levels of liver enzymes and other common organ-specific pathologies.

Past infections of SARS-CoV-1 may cause interference and IgM response due to the high level of genetic homology between the two viruses. Other Coronavirus strain may cause a light IgM response in view of similarity of different strains.

Well-known potentially interfering samples in EIA were studied. Results are reported in the table below:

Substances	Concentrations	Score
Haemoglobin	Up to 500 mg/dl	negative
Bilirubin	Up to 20 mg/dl	negative
Triglyceride (milky samples)	Up to 3000 mg/dl	negative
Serum proteins	Up to 15g/dl	negative
RF+	Up to 2500 U/ml (Cobas)	negative
Anti E-Coli Ab+	Highly positive	negative

No false reactivity due to the method of analysis was found.

The same potential interfering samples were spiked with a specimen highly positive for IgM to COVID-19 Nucleocapsid Core. No false negative result was found assuring no interference of such substances in positive samples testing.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera were used to determine the value of specificity. Frozen specimens were tested, as well, to check for interferences due to collection and storage. No interference was observed provided that the sample was clear and free of particles/aggregates.

Interferences were seen when fibrin aggregates, visible particles and lipid layers were present in the sample, giving usually a false positive result. These samples have to be cleared by filtration on a 0.22  $\mu$  filter (lipid layers) or centrifuged for 30 min

at 4000 rpm (aggregates) before testing, or discarded as not suitable for testing.

#### Diagnostic Sensitivity

A multicentric international study (several COVID-19 hospitals in Italy, UK, France, Spain, Ecuador), was carried out in the context of the Public Health Emergency.

Samples from a cohort of infected patients, some followed up to recovery, showed a sensitivity better than 98%.

A good correlation of IgM positivity in PCR+ patients tested at the offset of symptoms was observed.

In some cases IgM were revealed later than IgG, as reported by the specific Literature for COVID-19 seroconversions.

Such correlation reached almost 100% respect to PCR+ results in the course of follow-up of the patient. Some cases are present in the study of PCR- patients having symptoms of infection that showed up a COVID-19 specific seroconversion.

The whole study is available upon request; its results are briefly summarized below.

In internal studies, all the samples that were detected positive for IgM were confirmed positive in the DiaPro's Confirmatory Assay for IgM to Nucleocapsid Core. In some cases IgM were also positive to Spike antigens but none was positive only to them, confirming that seroconversion to antibodies starts up first to Nucleocapsid Core.

When COVID-19 IgM patients were tested later in the course of infection and after full recovery IgM antibodies show the tendency to remain positive even for several weeks after recovery, but with tendency to decrease in their S/Co; IgG at contrary have the tendency to increase in such values.

#### Precision:

It has been calculated on two samples, one negative and one low positive, examined in 16 replicates in three separate runs.

The variability found of 5-20 % depending on the sample (low-neg) did not lead in sample misclassification.

#### S. LIMITATIONS

As reported in the proper section highly lipemic ("milky") and haemolyzed ("red") samples may generate false positive reactions.

Very high titers of Rheumatoid Factor over 2500 U/ml might lead to a false positive result.

Others are under evaluation.

#### REFERENCES

1. Wu, A. et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe* <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001> (2020).
2. Lu, R. et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574 (2020).
3. Zhou, P. et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
4. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733 (2020).
5. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
6. Li, Q. et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316> (2020).
7. Liu, Y., Gayle, A. A., Wilder-Smith, A. & Rocklöv, J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to

SARS coronavirus. *J. Travel Med.* <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021> (2020).

8. Tang, B. et al. Estimation of the transmission risk of the 2019-nCoV and its implication for public health interventions. *J. Clin. Med.* 9, 462 (2020).

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

#### Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) - Italy







# COVID-19 IgM

**Ensayo inmunoenzimático  
para la determinación  
de anticuerpos IgM frente al COVID-19  
en suero y plasma humanos**

- uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

Correo electrónico: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF COV19M.CE  
96, 192 pruebas

## IgM de COVID-19

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM frente al COVID-19 en plasma y suero humanos.

El kit está destinado a la monitorización de la respuesta inmune al COVID-19 en la etapa temprana de la infección como un marcador adicional para la PCR.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) está provocada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), que se identificó por primera vez en medio de un brote de casos de enfermedades respiratorias en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China y desde entonces ha causado una pandemia mundial. El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario positivo perteneciente al género Betacoronavirus, que también incluye el SARS CoV (2003) y el MERS CoV (2012). Al igual que todos los demás coronavirus, el genoma del SARS-CoV-2 (2019-nCoV) codifica la proteína de espiga, la proteína de la envoltura, la proteína de la membrana y la proteína de la nucleocápside. Las personas infectadas con COVID-19 pueden tener pocos o ningún síntoma. Los síntomas del COVID-19 son similares a los de un resfriado o gripe y pueden tardar hasta 14 días en aparecer después de la exposición al SARS-CoV-2. Los síntomas han incluido: fiebre, tos, dificultad para respirar, neumonía en ambos pulmones.

En casos graves, la infección puede provocar la muerte. Las pruebas actuales para el SARS-CoV-2 buscan material genético del virus en hisopos orales, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR solo arroja un resultado positivo cuando el ARN del virus todavía está presente.

Los ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) son pruebas serológicas más rápidas, fácilmente automatizables, simples en comparación con la PCR, proporcionando marcadores adicionales de infección temprana con COVID-19.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con antígenos recombinantes Nucleocápside y Spike específicos para COVID-19.

La fase sólida se trata primero con la muestra diluida en presencia de un reactivo de bloqueo de RF; se capturan los anticuerpos IgM, si existen, mediante los antígenos. Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan los anticuerpos, mediante la adición de anticuerpos policlonales específicos contra hIgM, marcado con peroxidasa (HRP). La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anti COVID-19 IgM presentes en la muestra. Un valor de corte permite interpretar las densidades ópticas en resultados negativos y positivos de anticuerpos de COVID-19 IgM.

La neutralización de IgG anti-Covid y RF, realizada directamente en el pocillo, se realiza en la prueba para bloquear este tipo de interferencia.

### D. COMPONENTES

Cada código COV19M.CE contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca MICROPLATE

1 microplaca. 12 tiras de 8 micropocillos recubiertos antígenos recombinantes COVID-19 Nucleocápside y Spike. Las placas están en una bolsa sellada con desecante.

#### 2. Control negativo CONTROL -

1x2,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de proteínas de suero de cabra, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0 +/-0,1, 0,5% de Tween 20, además de azida sódica al 0,09% y Proclin-300 al 0,045% como conservantes. El control negativo está codificado con el **color amarillo**.

#### 3. Control positivo CONTROL +

1x2,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de proteínas de suero de cabra, IgM humana, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0 +/-0,1, 0,5% de Tween 20, además de azida sódica al 0,09% y Proclin-300 al 0,045% como conservantes. El control positivo está codificado con el **color verde**.

#### 4. Conjugado CONJ

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con reactivo **color rosa/rojo**. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgM humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10 mM a pH 6,8 +/-0,1, ProClin 300 al 0,045 % y sulfato de gentamicina 0.02% como conservantes.

#### 5. Cromógeno/sustrato SUBS TMB

1x16 ml/vial. Componente listo para el uso. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4 %, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03 % y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,02 %.

**Nota: Evitar la exposición a la luz; la sustancia es fotosensible.**

#### 6. Diluyente de muestras: DILSPE

2x50 ml/botella. Contiene 1% de proteínas de suero de cabra, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0 +/-0,1, 0,5% de Tween 20, además de azida sódica al 0,09% y Proclin-300 al 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

**Nota: El diluyente cambia de color de verde oliva a verde azulado oscuro en presencia de la muestra.**

#### 7. Reactivo neutralizante SOLN NEUT

1x8,0 ml/vial. Reactivo listo para el uso. Contiene anti IgG humana de capra, solución tamponada con Tris 10 mM pH 8,0 +/-0,1 que contiene 0,045 % ProClin 300. Para bloquear la interferencia debida a RF.

#### 8. Solución de lavado concentrada WASHBUF 20X

1x60 ml/botella. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7,0 +/-0,2, Tween 20 al 0,05% y Proclin 300 al 0,045%.

#### 9. Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15 ml/botella. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M. Atención: Irritante (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

#### 10. Sellador adhesivo N.º 2

#### 11. Manual de instrucciones, n.º 1

**Nota importante:** solo a pedido específico, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 192 pruebas, como se indica a continuación:

1. Microplaca	nº2
2. Control Negativo	1x4.0ml/vial
3. Control Positivo	1x4.0ml/vial
4. Enz. Conjugado	2x16ml/vial
5. Cromógeno/sustrato	2x16ml/vial
6. Diluyente muestras	3x60ml/botella
7. Reactivo Neutralizante	1x15ml/vial
8. Solución de lavado conc.	2x60ml/botella
9. Ácido sulfúrico	1x32ml/botella
10. Sellador adhesivo	nº 4
11. Manual de instrucciones	nº 1
<b>Número de pruebas</b>	<b>192</b>
<b>Código</b>	<b>COV19M.CE.192</b>

#### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (200 µl y 10 µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA: (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA, calibrada, capaz de proporcionar una temperatura de +37 °C.
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

#### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. Cuando el equipo se utiliza para el cribado de unidades de sangre y componentes sanguíneos, debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar dicho tipo de análisis.
3. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/ substrato a la luz intensa y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.
7. No intercambiar componentes de lotes distintos. ni tampoco de dos equipos del mismo lote.
8. Comprobar que los reactivos estén limpios y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.
9. Evitar la contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. Evitar la contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
11. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben manipularse de acuerdo con el nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU., de conformidad con lo publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados a fin de evitar la contaminación cruzada.
14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben eliminarse según lo establecido por las directivas nacionales

y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y de muestras deben tratarse como potencialmente infecciosos e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10 % durante 16 a 18 horas o el uso de autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

15. En caso de derrame accidental de algún producto, debe utilizarse papel absorbente empapado en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
16. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua
17. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo, puntas usadas en las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como si se tratase de fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes relativas al tratamiento de residuos de laboratorio.

#### G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o el plasma según la técnica estándar para preparación de muestras del laboratorio de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.
2. Evitar la adición de conservantes a las muestras, en particular azida sódica, ya que podría afectar a la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado de unidades de sangre, se recomienda utilizar el código de barras y la lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) y visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados. Al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recogida principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recogida principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20 °C durante al menos 12 meses. Evitar congelar/descongelar cualquier muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.
7. Como el Diluyente de Muestra (DILSPE) contiene una sustancia fuertemente inactivadora de virus, las muestras diluidas pueden almacenarse a + 2..8 ° C solo durante 48 horas.

#### H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

En un estudio realizado con un equipo abierto no se ha detectado pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 6 meses.

##### Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Comprobar que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación.

Doc.:	INS COV19M.CE/Esp	Página	4 de 7	Rev.:	5c	Fecha:	2020/05
-------	-------------------	--------	--------	-------	----	--------	---------

De ser así, llamar al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras no utilizadas deben guardarse en la bolsa de aluminio, en presencia de desecante, herméticamente cerrada a una temperatura de 2 a 8 °C.

Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad incluido en la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

#### Control negativo:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

#### Control positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

#### Solución de lavado concentrada:

La solución concentrada 20x debe diluirse con agua de calidad EIA hasta 1200 ml y mezclarse con cuidado antes del uso. Dado que pueden existir algunos cristales de sal en el vial, debe prestarse atención a que todo el contenido quede disuelto al preparar la solución.

Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

**Nota:** Una vez diluida, la solución de lavado es estable durante 1 semana a temperaturas entre 2 y 8 °C.

#### Conjugado enzimático:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Cromógeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

#### Reactivo neutralizante:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

#### Diluyente de muestras:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

#### Ácido sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

#### Leyenda:

**Frases H** de advertencia:

**H315** – Provoca irritación cutánea.

**H319** – Provoca irritación ocular grave.

#### Consejos P de prudencia:

**P280** – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

**P302 + P352** – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón.

**P332 + P313** – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

**P305 + P351 + P338** – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

**P337 + P313** – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

**P362 + P363** – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

## I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar el volumen correcto requerido en el ensayo y deben someterse a una descontaminación periódica de las partes que

podrían entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/-2%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.

2. La **incubadora ELISA** debe ajustarse a 37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia) y controlarse periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua, siempre que estén homologados para la incubación de pruebas ELISA.

3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales del lavador con agua desionizada al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0,1 M).

Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con **5 ciclos de lavado** (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo).

Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional.

Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5 %.

5. El **lector de microplacas ELISA** debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro (620-630nm) obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 nm; b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2,0; c) Linealidad ≥ 2,0; d) Reproducibilidad ≥ 1%. La lectura del blanco se lleva a cabo en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente, debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.

6. Se recomienda el uso de **sistemas automatizados ELISA** cuando se analiza un número bastante elevado de muestras (> 50 muestras).

En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente establecidos, calibrados, controlados y periódicamente ajustados para garantizar los valores indicados en la sección O "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe instalarse en el sistema operativo de la unidad y corroborarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe homologarse y configurarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre causado por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminar los pocillos adyacentes.

Cuando se utilizan instrumentos automáticos, en caso de que los contenedores para viales del instrumento no se ajusten a los viales del equipo, debe transferirse la solución a contenedores adecuados y marcarlos con la misma etiqueta despegada del vial original. Esta operación es importante para evitar la falta de coincidencia de los contenidos de los viales al transferirlos. Cuando termine la prueba, guardar los contenedores secundarios etiquetados a una temperatura de 2 a 8 °C, firmemente cerrados.

El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece

apoyo para instalar nuevos instrumentos que se van a usar con el equipo.

#### L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista. Comprobar que el cromógeno/substrato sea incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico transparente. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
4. Esperar hasta que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y, a continuación, mezclar como se indica.
5. Ajustar la incubadora ELISA a 37 °C y cargar el lavador ELISA con la solución de lavado diluida según las instrucciones del fabricante. Establecer el número correcto de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
6. Encender el lector ELISA al menos 20 minutos antes de realizar la operación de lectura.
7. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar los ajustes y asegurarse de que se use el protocolo de ensayo correcto.
8. Comprobar que las micropipetas estén ajustadas en el volumen requerido.
9. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
10. En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

#### M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

##### ENSAYO AUTOMATIZADO:

En caso de que el ensayo se realice automáticamente con un sistema ELISA, seguir las instrucciones indicadas para programar el instrumento:

1. Diluya las muestras 1:41 en un tubo adecuado de conformidad con las instrucciones de uso del instrumento. Por ejemplo: 10 ul muestra + 400 ul DILSPE. Mezclar por aspiración y dispensación.
2. El pocillo A1 se usa para operaciones de blanco.
3. Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante (NEUTR) en todos los pocillos de la microplaca, excepto A1, usado para operaciones de blanco.

**Nota importante:** El reactivo neutralizante puede bloquear falsas reacciones positivas debido a RF. Las muestras positivas en paneles de control de calidad internos podrían ser detectadas como negativas si estas muestras se analizaron como positivas con un IVD que no realiza ninguna reacción de bloqueo de RF.

4. Dispensar 200 µl de control negativo por triplicado y 200 µl de control positivo individual en los pocillos de control adecuados (por ejemplo, B1+C1+D1 para el control negativo y E1 para el control positivo). No diluir los controles, ya que están diluidos previamente, ¡listos para el uso!
5. Dispensar 200 µl de muestras diluidas previamente en cada pocillo adecuado.
6. Para las operaciones siguientes, consultar las instrucciones que aparecen abajo para el Ensayo manual.

**Nota importante:** Comprobar visualmente que las muestras se hayan dispensado en los pocillos correspondientes. Esto se logra

simplemente comprobando que el color del pocillo haya virado a azul oscuro.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

#### ENSAYO MANUAL

1. En los tubos de ensayo apropiados, dispensar 400 ul de diluyente de muestra (DILSPE); luego añadir 10 ul de muestra para tener una dilución final de 1:41. Mezclar la muestra en un vórtex. Comprobar que el color cambia de color verde claro a verde azulado.
2. Poner el número de pocillos necesarios en el soporte de micropocillos. Dejar el primer pocillo vacío para la operación de blanco.
3. Añadir 50 µl de reactivo neutralizante (NEUTR) en todos los pocillos de la placa, excepto A1.
4. Dispensar 200 µl de control negativo por triplicado y 200 µl de control positivo individual en los pocillos de control adecuadamente identificados. No diluir los controles, ya que están diluidos previamente, ¡listos para el uso!
5. Dispensar finalmente 200 µl de muestras diluidas en todos los pocillos de muestra.

**Nota importante:** Comprobar que el color del pocillo cambia de verde azulado a azul oscuro tras la adición de la muestra diluida.

6. Mezclar con suavidad la placa manualmente, evitando que se derrame y contamine pocillos adyacentes.
7. Incubar la microplaca durante **45 minutos a 37 °C**.

**Nota importante:** las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se empleen instrumentos automatizados ELISA.

8. Lavar la microplaca con el lavador automático, dispensando y aspirando 350 µl/pocillo de solución de lavado diluida como se indicó anteriormente (sección I.3).
9. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el primer pocillo de blanco, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo/rosa se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

**Nota importante:** tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

10. Incubar la microplaca durante **45 minutos a 37 °C**.
11. Lavar los micropocillos del mismo modo que en el paso 6.
12. Dispensar 100 µl de la mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo para el blanco. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 15 minutos**.

**Nota importante:** no exponer directamente a fuerte iluminación. De lo contrario, se puede generar una actividad de fondo excesiva.

13. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usando la misma secuencia que en el paso 10. La adición del ácido cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo/marrón.
14. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (obligatorio).

#### Notas importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de interrupción y, en cualquier caso, nunca trans-

curridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir auto-oxidación del cromógeno causando una elevada actividad de fondo.

#### N. ESQUEMA DEL ENSAYO

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensación:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M4											
B	CN	M5											
C	CN	M6											
D	CN	M7											
E	CP	M8											
F	M1	M9											
G	M2	M10											
H	M3	M11											

Leyenda: BLK = Blanco CN = Control negativo CP = Control positivo  
M = Muestra

En la siguiente tabla se resumen los volúmenes y los procedimientos para el Método manual.

Método manual	Operaciones
Muestras + DILSPE	10 ul + 400 ul (dilución 1:41)
Reactivo neutralizante	50 µl
Controles	200 µl
Muestras diluidas	200 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20 segundos de remojo O 6 ciclos sin remojo
Conjugado enzimático	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>45 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20 segundos de remojo O 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>15 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm / 620-630 nm

#### O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se realiza una comprobación en los controles siempre que se utiliza el equipo, para verificar si los valores de DO 450 nm/620-630 nm son los esperados e indicados en la siguiente tabla.

Comprobar	Requisitos
Pocillo de blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
Control negativo (CN)	Valor medio < 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco
Control positivo	M/Co > 1,1

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección.  
En caso contrario, no continuar, ya que los datos son inválidos.

#### P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE

Los resultados de las pruebas se calculan a partir de un valor de corte determinado con la fórmula siguiente sobre el valor medio de DO 450 nm/620-630 nm del control negativo (CN):

$$\text{CN} + 0,250 = \text{Valor de corte (Co)}$$

El valor encontrado en la prueba se utiliza para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

**Nota importante:** Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un sistema automatizado ELISA, es necesario asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte y para la interpretación de los resultados sea correcta.

#### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza como la relación entre el valor de DO 450 nm/620-630 nm de la muestra y el valor de corte (M/Co). Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

En el seguimiento de sospecha infección COVID-19, se utiliza lo siguiente interpretación:

M/Co	Interpretación
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Zona gris
> 1,1	Positiva

Un resultado **negativo** indica que el sujeto no ha desarrollado IgM para COVID-19.

Los sujetos cuya muestra resulte **equivoca** debe analizarse nuevamente en una segunda muestra tomada 1-2 semanas después.

Un resultado **positivo** es indicativo de la presencia de IgM a COVID-19.

#### Notas importantes:

1. La interpretación correcta de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio además de otros parámetros clínicos para reducir el riesgo de errores de juicio e interpretación.
2. Cualquier resultado positivo debe confirmarse mediante un método alternativo capaz de detectar anticuerpos IgM (por ejemplo, prueba de confirmación/tipificación) antes de formular un diagnóstico.  
**La sola presencia de IgM no puede usarse para formular un diagnóstico de infección por COVID-19.**
3. En el caso excepcional que el kit se use para la detección de trabajadores de la salud con riesgo de infección por COVID-19 o para la evaluación del estado inmune de individuos de la población normal se utiliza lo siguiente interpretación:

M/Co	Interpretación
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Zona gris
0,1 – 2,0	Bajo Positivo
> 2,0	Positivo

y un "índice de confianza" (o grado de confiabilidad) en la interpretación de los datos, como sigue:

- a) para valores en el rango  $1.1 < M/Co < 2$ , la positividad tiene un bajo índice de confianza. Sin embargo, si los anticuerpos IgG, cuando se prueban en combinación con IgM, muestran un resultado positivo o equivoco, se sugieren investigaciones de diagnóstico adicionales en una muestra recogida después de 7-10 días a partir de la primera muestra.
- b) para  $M/Co > 2$ , por el contrario, el índice de confianza es alto y en este caso se sugiere enviar la muestra al Ensayo confirmatorio de DiaPro, como ya se informó. Si los anticuerpos IgG, cuando se prueban en combinación, también son positivos, la persona debe hacerse la prueba de ARN de COVID-19 y / o someterse a una tomografía computarizada (CAT).
4. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

## R. RENDIMIENTO

Aún se está evaluando el rendimiento completo considerando la dificultad para evaluar muestras concretas procedentes de pacientes infectados y hospitalizados.

### Especificidad diagnóstica:

El ensayo se probó en cientos de muestras recogidas antes del brote de Covid-19. Se encontró un valor  $\geq 98\%$ .

No se observaron reacciones cruzadas por otros microbios y virus infecciosos respiratorios, incluida la influenza (probado en individuos vacunados 2019-2020) y ninguno se observó por los anticuerpos IgM a los siguientes agentes infecciosos comunes: virus del Herpes (CMV, EBV y HSV), Toxoplasma y Rubéola, H.pylori, VHC, VIH, HBsAg, Sífilis, especies de Plasmodium y otras.

Los autoanticuerpos comunes (tiroideos, hígado, ANA y ENA principalmente) en las enfermedades autoinmunes no generaron ningún resultado falso positivo.

No se observaron interferencias en mujeres embarazadas, niveles anormales de enzimas hepáticas y otras patologías específicas de órganos comunes.

Las infecciones anteriores de SARS-CoV-1 pueden causar interferencia y respuesta de IgM debido al alto nivel de homología genética entre los dos virus. Otras cepas de Coronavirus pueden causar una ligera respuesta de IgM en vista de la similitud de diferentes cepas.

Se estudiaron muestras potencialmente interferentes bien conocidas en EIA. Los resultados se informan en la tabla a continuación:

Sustancias	Concentraciones	Score
Hemoglobina	Hasta 500 mg/dl	negativo
Bilirubina	Hasta 20 mg/dl	negativo
Triglicéridos (muestras lechosas)	Hasta 3000 mg/dl	negativo
Proteínas séricas	Hasta 15g/dl	negativo
RF+	Hasta 2500 U/ml (Cobas)	negativo
Anti-E-Coli Ab+	Altamente positivo	negativo

No se encontró falsa reactividad debido al método de análisis.

Las mismas sustancias potenciales que interfieren se añadieron con una muestra altamente positiva para IgM a COVID-19 Nucleocápside ("Core"). No se encontraron resultados falsos negativos, asegurando que no hay interferencia de tales sustancias en las pruebas de muestras positivas.

Tanto el plasma, derivado con diferentes técnicas estándar de preparación (citrato, EDTA y heparina), como los sueros se usaron para determinar el valor de especificidad. Las muestras congeladas también se probaron para verificar si hay interferencias debido a la recogida y el almacenamiento. No se observó interferencia siempre que la muestra fuera clara y libre de partículas / agregados.

Se observaron interferencias cuando los agregados de fibrina, las partículas visibles y las capas de lípidos estaban presentes en la muestra, generalmente dando un resultado falso positivo. Estas muestras deben limpiarse por filtración en un filtro de 0.22 u (capas de lípidos) o centrifugarse durante 30 minutos a 4000 rpm (agregados) antes de la prueba, o descartarse como no adecuado para la prueba.

### Sensibilidad diagnóstica

Se realizó un estudio internacional multicéntrico (varios hospitales covid-19 en Italia, Reino Unido, Francia, España, Ecuador), en el contexto de la Emergencia de Salud Pública. Las muestras de una cohorte de pacientes infectados, algunas seguidas hasta la recuperación del paciente, mostraron una sensibilidad superior al 98%. Se observó una buena correlación de la positividad de IgM en pacientes con PCR + y la compensación de sus síntomas clínicos.

En algunos casos, la IgM se reveló más tarde que la IgG, según se recoge en la literatura específica para las seroconversiones COVID-19.

Dicha correlación alcanzó casi el 100% con respecto a los resultados de PCR + en el curso del seguimiento del paciente. Algunos casos están presentes en el estudio de pacientes con PCR que presentan síntomas de infección que mostraron una seroconversión específica de COVID-19. Todo el estudio está disponible previa solicitud; Sus resultados se resumen brevemente a continuación.

En estudios internos, todas las muestras que se detectaron positivas para IgM se confirmaron positivas en el Ensayo confirmatorio de DiaPro para IgM al núcleo de nucleocápside. En algunos casos, la IgM también fue positiva para los antígenos Spike, pero ninguno fue positivo solo para ellos, lo que confirma que la seroconversión a anticuerpos comienza primero frente al antígeno Nucleocápside Core. Cuando los pacientes con IgM de COVID-19 se analizaron más tarde en el curso de la infección y después de la recuperación completa, los anticuerpos IgM muestran la tendencia a permanecer positivos incluso durante varias semanas después de la superación de la enfermedad, pero con tendencia a disminuir su valor de M/Co; Los anticuerpos IgG, por el contrario, presentan una tendencia a aumentar en tales valores.

### Precisión:

Ha sido calculada a partir de dos muestras, una negativa y una positiva débil, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas. La variabilidad encontrada del 5-20%, dependiendo de la muestra (positividad débil-neg) no condujo a una clasificación errónea de la muestra.

## S. LIMITACIONES

Tal como se indicó en el apartado adecuado, las muestras altamente lipémicas ("lechosas") y hemolizadas ("rojas") pueden generar reacciones falsas positivas.

Los títulos muy altos de Factor reumatoide también pueden derivar en un resultado falso positivo.

Otras están siendo evaluadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Wu, A. et al. Composición del genoma y divergencia del nuevo coronavirus (2019-nCoV) originario de China. *Cell Host Microbe* <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001> (2020).
- Lu, R. et al. Caracterización genómica y epidemiología del nuevo coronavirus 2019: implicaciones para los orígenes del virus y la unión del receptor. *Lancet* 395, 565–574 (2020).
- Zhou, P. et al. Descubrimiento de un nuevo coronavirus asociado con el reciente brote de neumonía en humanos y su posible origen en murciélagos. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
- Zhu, N. et al. Un nuevo coronavirus de pacientes con neumonía en China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733 (2020).
- Huang, C. et al. Características clínicas de pacientes infectados con el nuevo coronavirus 2019 en Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020).
- Li, Q. et al. Dinámica de transmisión temprana en Wuhan, China, de una nueva neumonía infectada por coronavirus. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001316> (2020).
- Liu, Y., Gayle, A. A., Wilder-Smith, A. & Rocklöv, J. El número reproductivo del COVID-19 es superior en comparación con el coronavirus del SARS. *J. Travel Med.* <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa021> (2020).
- Tang, B. et al. Estimación del riesgo de transmisión del 2019-nCoV y sus implicaciones para las intervenciones de salud pública. *J. Clin. Med.* 9, 462 (2020).

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:  
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.  
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italia



