

ENZY-WELL

SARS-CoV-2 IgM

REF 91401 (96 tests)



DIESSE

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

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Cambios introducidos en la revisión actual Alterações introduzidas na revisão atual	13-14



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

Per la determinazione qualitativa degli anticorpi di classe IgM anti SARS-CoV-2 virus

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Metodo immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi di classe IgM anti SARS-CoV-2 virus nel siero umano.

2. INTRODUZIONE

I coronavirus sono virus a singolo filamento positivo di RNA appartenenti alla famiglia dei Coronaviridae, che sono divisi in quattro generi: Alpha, Beta, Delta e Gammacoronavirus. I CoV si trovano comunemente in molte specie di animali. Occasionalmente, i CoV animali possono acquisire mutazioni genetiche mediante errori durante la replicazione del genoma, che può espandere ulteriormente il loro tropismo all'uomo. Un totale di sei tipi di CoV umani sono stati identificati come responsabili di disturbi respiratori umani, che includono due CoV alfa e quattro CoV beta (i due più recenti sono SARS-CoV e MERS-CoV). In genere, questi CoV causano infezione asintomatica o gravi malattie respiratorie acute, tra cui febbre, tosse e respiro corto. Tuttavia, sono stati segnalati anche altri sintomi come gastroenterite e malattie neurologiche di diversa gravità. Da dicembre 2019, l'Organizzazione mondiale della Sanità ha segnalato il settimo betacoronavirus umano (2019-nCoV) che ha causato un'epidemia di polmonite. Questo nuovo virus è collegato a un focolaio di malattia respiratoria febbrile nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina. Alcuni pazienti con 2019-nCoV hanno sviluppato polmonite grave, edema polmonare, ARDS o insufficienza multipla di organi e sono deceduti. Al momento, le informazioni relative all'epidemiologia e alle caratteristiche cliniche della polmonite causate da 2019-nCoV sono scarse. Il monitoraggio del titolo di anticorpi può servire da indicazione dello stato dell'infezione: durante i primi giorni compaiono IgA e IgM; man mano che la malattia progredisce, le IgG diventano predominanti.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigene viene legato alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti-IgM umane coniugati con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico, la colorazione diventa gialla. Il

colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre.

4. PRECAUZIONI

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati sia per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
4. Le apparecchiature non monouso devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; tutte le apparecchiature monouso devono essere smaltite secondo le norme vigenti.
5. L'acido cloridrico 2M usato per lavare la vetreria è corrosivo; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
6. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
7. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. La D.O. del Cut-Off, dei controlli e dei campioni può essere leggermente diversa fra piastre diverse. Quindi, se si utilizzano nella stessa seduta delle strips da piastre diverse, anche se dello stesso lotto, è necessario ripetere la determinazione del Cut-Off.
2. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso.
3. Aprire la busta contenente le strips dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.

4. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
5. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o di altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
6. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
7. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
8. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
9. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
10. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. È importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso con il substrato e con il coniugato.
11. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato.
12. Non soffiare sulle micropiastre.
13. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate alla temperatura indicata nel procedimento o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
14. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
15. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o di campioni che presentano inquinamento microbico.
16. Evitare la contaminazione dei pozzetti con la polvere da guanti monouso.
17. L'utilizzo del kit con strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.
18. Leggere il Manuale Utente relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 strip

Contenuto: 1 piastra da 96 pozzetti sensibilizzati con antigene nativo inattivato.

CONJ CONIUGATO 1x16 mL

Contenuto: Anticorpi monoclonali anti-IgM umane marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO 1x0.8 mL

Contenuto: Soluzione proteica non contenente anticorpi specifici capaci di legare l'antigene presente sulla micropiastra, e conservante. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x0.8 mL

Contenuto: Soluzione proteica contenente anticorpi specifici capaci di legare l'antigene presente sulla micropiastra, e conservante. Liquido, pronto all'uso.

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

Contenuto: Soluzione proteica contenente anticorpi specifici capaci di legare l'antigene presente sulla micropiastra, e conservante. Liquido, pronto all'uso.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 1x100 mL

(PF93611)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con Sodio Azide 0.09% e colorante (metilarancio).

Uso: Da utilizzare per la diluizione dei campioni. Liquido, pronto all'uso.

SAMPLE SORBENT 4 SAMPLE SORBENT 4 1x7 mL

(PF30401)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con Sodio Azide 0.09% e colorante (metilarancio) ed anticorpi anti-IgG umane.

Uso: Da utilizzare per la diluizione dei campioni (in piastra). Liquido, pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10x 1x100 mL

(PF93603)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO 1x12 mL

(PF93619)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquido, pronto all'uso.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE 1x16 mL

(PF93602)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione di H₂SO₄ 0.3 mol/L. Liquido, pronto all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

ALTRO MATERIALE RICHiesto, MA NON FORNITO.

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2.000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.

- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 μL di soluzione
- Guanti monouso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2-8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

MICROPIASTRA	4 settimane a 2-8°C
CONIUGATO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO NEGATIVO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO CUT-OFF	8 settimane a 2-8°C
DILUENTE 2	fino alla scadenza a 2-8°C
SAMPLE SORBENT 4	fino alla scadenza a 2-8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2-8°C; 1 settimana a 15-30°C; conservare al buio
TAMPONE DI LAVAGGIO	2 settimane a 2-8°C; 5 giorni a 15-30°C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2-8°C

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio.

Non sono conosciute le conseguenze dell'utilizzo di altri liquidi biologici.

Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C. Evitare ripetuti scongelamenti.

Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo lo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio.

L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei.

La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

8. PROCEDIMENTO

PREPARAZIONE

Prima dell'inizio del test, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-30°C).

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Diluire i campioni 1:51 dispensando 10 μL di siero in 0.500 mL di diluente.

ESECUZIONE DEL TEST

1. Distribuzione dei campioni:
Dispensare 100 μL di controllo (positivo, negativo o cut-off).

Dispensare 50 μL di sample sorbent 4 + 50 μL di campione diluito per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).

Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 1 controllo positivo e 2 controlli Cut-Off. (Lasciare un pozzetto della strip per il bianco).

2. Incubazione:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a temperatura ambiente per 60 \pm 5 minuti.
3. Lavaggio:
Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 μL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.
4. Distribuzione del coniugato:
100 μL di coniugato per ciascun pozzetto della piastra.
5. Incubazione del coniugato:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a temperatura ambiente per 60 \pm 5 minuti.
6. Lavaggio:
Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 μL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.
7. Distribuzione del substrato:
Dispensare 100 μL di substrato per ciascun pozzetto della piastra.
8. Incubazione del substrato:
Incubare la piastra a temperatura ambiente per 15 minuti.
9. Arresto della reazione:
Dispensare 100 μL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.
10. Lettura:
Leggere le D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. SCHEMA DEL SAGGIO PER SARS-CoV-2 IgM

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Mettere 100 μL controlli (positivo, negativo e cut-off) e 50 μL di sample sorbent 4 + 50 μL di campione diluito nei pozzetti delle strips. Agitare. |
| - | - |
| - | Incubare 60 \pm 5 min. a temperatura ambiente |
| - | - |
| - | Lavare 4 volte (300 μL) |
| - | - |
| STEP 2 | Mettere 100 μL di coniugato per pozzetto |
| - | - |
| - | Incubare 60 \pm 5 min. a temperatura ambiente |
| - | - |
| - | Lavare 4 volte (300 μL) |
| - | - |
| STEP 3 | Mettere 100 μL di Substrato per pozzetto |
| - | - |
| - | Incubare 15 min. a temperatura ambiente. |
| - | - |
| STEP 4 | Aggiungere 100 μL di Stop Solution |
| - | - |
| - | Leggere la D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. |

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Bianco: < 0.150

Controllo negativo: Il rapporto tra la D.O. del controllo negativo e la D.O. del cut-off deve essere < 0.6.

Controllo positivo: il controllo positivo deve avere una D.O. di almeno 1.5 volte quella del siero cut-off.

Controllo cut-off: la D.O. del cut-off deve essere > 0.2.

Se uno dei risultati dei sieri di controllo non rientra nell'intervallo di accettabilità, ripetere il test. Se il problema persiste contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione e quello del Cut-Off (Index).

Il campione sarà giudicato:

POSITIVO: quando l'Index è > 1.1

DUBBIO: per tutti i valori 0.9-1.1

NEGATIVO: quando l'Index è < 0.9

12. LIMITAZIONI

Tutti i valori ottenuti necessitano di un'attenta interpretazione che non prescinda da altri indicatori relativi allo stesso paziente.

Il test, infatti, non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica ed il risultato ottenuto deve sempre essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 4 campioni (2 Negativi e 2 Positivi) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44 – 220 IU/ml)

Bilirubina (4.5– 45 mg/dl)

Trigliceridi (10– 250 mg/dl)

Emoglobina (5– 30 mg/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate può alterare il risultato del test.

14. CROSS-REATTIVI

128 campioni positivi a:

Mycoplasma p. (5), Citomegalovirus (4), RSV (2), Influenza B (1), Influenza A (5), Adenovirus (3), Fattore Reumatoide (4), ANA (22), SARS- CoV (18), Coronavirus umani (21), Epstein-Barr Virus (13), HIV (10), Rubella (3), Chlamydomphila pneumoniae (5), Parainfluenza (5), Legionella pneumoniae (2) e Bordetella pertussis (5) sono stati testati.

Non sono state rilevate reazioni crociate significative con l'eccezione di Mycoplasma p. (1), Fattore Reumatoide (1), ANA (3), Coronavirus umani (4), SARS- CoV (5) e Epstein-Barr Virus (3).

15. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 625 campioni con il kit Diesse e con un altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	85	10	95
	-	8	522	530
	Totale	93	532	625

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):
91.4% CI95%: 83.9-95.6.

Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):
98.1% CI95%: 96.6-99.0.

L'analisi dei risultati di 29 campioni con data nota di insorgenza dei sintomi ha mostrato che la sensibilità dei test ELISA aumenta 10 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. La sensibilità del 87.5% viene raggiunta dopo 12 giorni.

Giorni di insorgenza dei sintomi	Sensibilità
<10	58.3%
>10	70.6%
>12	87.5%

L'analisi dei risultati su 282 campioni con data nota di prelievo pre-pandemia (precedenti a giugno 2019) ha mostrato una specificità dei test ELISA di 99%.

16. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute		Tra lotti	
	Media Index	CV%	Media Index	CV%	Media Index	CV%
1	1.6	8.8	1.5	13.3	0.2	25.0*
2	0.5	10.0	2.1	11.9	2.0	7.5
3	1.9	2.6	0.8	11.3	0.5	8.0
4	0.6	10.0	0.7	10.0	1.8	10.6

*Artefatto dovuto al noto effetto di Variazione del Coefficiente che diventa estremamente sensibile a variazioni (anche molto piccole) quando il valore di media è vicino a zero.

17. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso). Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido). Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore

	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

18.BIBLIOGRAFIA

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



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





INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

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

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Coronaviruses are single positive-stranded RNA viruses belonging to *Coronaviridae* family, which are divided into four genera: *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-* and *Gammacoronavirus*.

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

Health and Safety Information

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

Analytical Precautions

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

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

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 96 determinations.

- Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE 12x8 strip

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

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

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

CONTROL - NEGATIVE CONTROL 1x0.8ml

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

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1x0.8 mL

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

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

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

SAMP DIL 2 DILUENT 2 1x100 mL

(PF93611)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

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

SAMPLE SORBENT 4 SAMPLE SORBENT 4 1x7 mL

(PF30401)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

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

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X 1x100 mL

(PF93603)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

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

SUBS TMB SUBSTRATE 1x12 mL

(PF93619)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION 1x16 mL

(PF93602)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

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

ADHESIVE FILMS (2).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

- Absorbent tissue

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2-8°C.

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

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

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

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

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

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

Avoid several freeze-thawing cycles.

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

Heat-inactivation can rise to erroneous results.

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

8. ASSAY PROCEDURE

PREPARATION

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

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

PROCEDURE

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

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

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

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

10. TEST VALIDATION

Blank: < 0.150

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

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

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

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

If the problem persists, contact the Scientific Support.

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

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

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

The sample is considered:

POSITIVE: when the Index is > 1.1

DOUBTFUL: for all the values between 0.9 and 1.1

NEGATIVE: when the Index is < 0.9

12. LIMITATIONS

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

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

13. ANALITICAL SPECIFICITY

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

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

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

14. CROSS-REACTIONS

128 samples positive to Mycoplasma p. (5), Cytomegalovirus (4), RSV (2), Influenza B (1), Influenza A (5), Adenovirus (3), Rheumatoid Factor (4), ANA (22), SARS-CoV (18), Human coronaviruses (21), Epstein-Barr Virus (13), HIV (10), Rubella (3), Chlamydomphila pneumoniae (5), Parainfluenza (5), Legionella pneumoniae (2) e Bordetella pertussis (5) were tested.

No significant cross-reactions were found except for Mycoplasma p. (1), Reumatoid Factor (1), ANA (3), Human coronaviruses (4), SARS-CoV (5) e Epstein-Barr Virus (3).

15. METHOD COMPARISON

In an experimentation 625 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit

Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	85	10	95
	-	8	522	530
	Total	93	532	625

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

91.4% CI95%: 83.9-95.6.

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):

98.1% CI95%: 96.6-99.0.

The analysis of the results of 29 samples with known date of symptoms onset showed that the sensitivity of the ELISA tests

increases 10 days after the symptoms onset. 87.5% sensitivity is reached after 12 days.

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

The analysis of the results of 282 samples with known pre-pandemic sampling date (before June 2019), showed that the specificity of the ELISA tests is 99%.

16. PRECISION AND REPEATABILITY

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

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

17. TROUBLESHOOTING

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

18. REFERENCES

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



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





INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

Para la determinación cualitativa de anticuerpos de clase IgM anti SARS-CoV-2.

Solo para uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos de clase IgM anti SARS-CoV-2 en suero humano.

2. INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son virus de ARN monocatenario positivo pertenecientes a la familia Coronaviridae que se dividen en cuatro géneros: alfa, beta, delta y gammacoronavirus. Los CoV están presentes habitualmente en muchas especies de animales. Ocasionalmente, los CoV animales pueden adquirir mutaciones genéticas por errores durante la replicación del genoma, lo que puede expandir aún más su tropismo al ser humano. Se han identificado un total de seis tipos de CoV humanos como responsables de trastornos respiratorios humanos, incluyendo dos CoV alfa y cuatro CoV beta (los dos más recientes son el SARS-CoV y el MERS-CoV). Típicamente, estos CoV causan una infección asintomática o graves enfermedades respiratorias agudas, incluyendo fiebre, tos y dificultad para respirar. Sin embargo, también se ha informado de otros síntomas como la gastroenteritis y enfermedades neurológicas de diferente gravedad. En diciembre de 2019, la Organización Mundial de la Salud informó sobre el séptimo betacoronavirus humano (2019-nCoV) causante de una epidemia de neumonía. Este nuevo virus está vinculado a un brote de enfermedad respiratoria febril en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China. Algunos pacientes con 2019-nCoV desarrollaron neumonía severa, edema pulmonar, SDRA o fallo multiorgánico y fallecieron. En la actualidad, hay poca información sobre la epidemiología y las características clínicas de la neumonía causada por el 2019-nCoV. La monitorización de los títulos de los anticuerpos puede servir como indicación del estado de la infección: durante los primeros días aparecen IgA e IgM; a medida que la enfermedad progresa, predominan las IgG.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El antígeno está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno. Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no hayan reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto por anticuerpos monoclonales anti-IgM humanos conjugados con peroxidasa de rábano. El conjugado que no se ha unido se elimina y se añade el sustrato para la peroxidasa. El color azul que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Cuando la reacción enzimática se interrumpe después de la adición de una solución de ácido sulfúrico, el color se vuelve amarillo. El color, proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero, se puede observar en un lector para microplacas.

4. PRECAUCIONES

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y han dado resultados negativos en métodos aprobados para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una garantía completa sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los reactivos y las muestras deben manipularse según las normas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Advertencias para la seguridad personal

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar guantes desechables y protección para los ojos al manipular las muestras y durante la prueba.
3. Lavarse bien las manos después de terminar el test.
4. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121 °C; todos los aparatos desechables se deben eliminar según las normas vigentes.
5. El ácido clorhídrico 2M usado para limpiar la cristalería es corrosivo; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel o con los ojos, limpiar con mucha agua.
6. Los ácidos neutralizados y los demás residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1 %. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
7. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se deberá eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada se tendrá que limpiar, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de seguir trabajando. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que se haya secado la zona. Todos los materiales empleados para descontaminar la zona en la que se hayan producido derrames accidentales, incluidos guantes, deberán desecharse como si fuesen residuos potencialmente infecciosos. No utilizar el autoclave con materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. La O.D. del Cut-Off, de los controles y de las muestras puede ser ligeramente diferente entre placas diferentes. Por tanto, si se utilizan tiras de diferentes placas en la misma sesión, aunque sean del mismo lote, es necesario repetir la determinación del Cut-Off.
2. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso,

llevar los reactivos a la temperatura de conservación recomendada.

3. Abrir el sobre que contiene las tiras al menos media hora después de que haya estado a temperatura ambiente.
4. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. Se debe evitar la contaminación microbiológica de los reactivos, ya que puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
5. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable entre lotes. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
6. Lavar con ácido hidroclicórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
7. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a vapores de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
8. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
9. Evitar el uso de congeladores con desescarche automático para conservar las muestras.
10. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas específicas para el sustrato y el conjugado.
11. Evitar tocar el borde del pocillo con el conjugado.
12. No soplar sobre las microplacas.
13. En ocasiones, los ensayos inmunoenzimáticos pueden presentar un efecto particular sobre el borde llamado «edge effect» («efecto filo»), que se puede reducir al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a la temperatura indicada en el procedimiento o en baño maría usando un soporte para placas, o en un incubador. Como alternativa, las placas se pueden incubar en un analizador adecuado. Para más información, consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
14. Antes de leer la placa, asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco y de que no haya burbujas en la superficie del líquido.
15. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, lipémicas, ictericas, de suero no coagulado completamente o de muestras que presentan contaminación microbiana.
16. Evitar la contaminación de los pocillos con el polvo de guantes desechables.
17. El uso del kit con equipos automáticos debe ser aprobado por el usuario.
18. Leer el manual de usuario de cada equipo y, especialmente, si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
 - instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
 - mantenimiento y servicio técnico

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

MT PLATE MICROPLACA (12 x 8)

Contenido: 1 placa de 96 pocillos sensibilizados con antígeno nativo inactivado.

CONJ CONJUGADO 1 x 16 mL

Contenido: Anticuerpos monoclonales anti-IgM humanos marcados con peroxidasa, en solución tampón fosfato con fenol al 0.05 % y Bronidox al 0.02 %. Líquido, listo para su uso.

CONTROL - CONTROL NEGATIVO 1 x 0.8 mL

Contenido: Solución proteica libre de anticuerpos específicos capaces de unir el antígeno presente en la microplaca, y conservante. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0.8 mL

Contenido: Solución proteica con anticuerpos específicos capaces de unir el antígeno presente en la microplaca, y conservante. Líquido, listo para su uso.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1 x 0.8 mL

Contenido: Solución proteica con anticuerpos específicos capaces de unir el antígeno presente en la microplaca, y conservante. Líquido, listo para su uso.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 1 x 100 mL

(PF93611)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con azida sódica 0.09 % con adición de metilnaranja como colorante.

Uso: Para la dilución de las muestras. Líquido, listo para su uso.

SAMPLE SORBENT 4 SAMPLE SORBENT 4 1 x 7mL

(PF30401)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con azida sódica 0.09 % con adición de metilnaranja como colorante y anticuerpos anti-IgG humanos.

Uso: Para la dilución de las muestras (en placa). Líquido, listo para su uso.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10x 1 x 100 mL

(PF93603)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución salina tamponada (PBS) concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5 %.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada o desionizada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37 °C antes de diluir.

SUBS TMB SUSTRATO 1 x 12 mL

(PF93619)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01 % estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8). Líquido, listo para su uso.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE 1 x 16 mL

(PF93602)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de H₂SO₄ 0,3 mol/L. Líquido, listo para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm, con linealidades hasta OD ≥ 2.000)
- Lavador de microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 μL
- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 μL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito de sodio al 5 %
- Recipientes para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben conservarse a 2-8 °C.

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada una vez que se abren o preparan:

MICROPLACA	4 semanas a 2-8 °C
CONJUGADO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROL NEGATIVO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROL CUT-OFF	8 semanas a 2-8 °C
DILUYENTE 2	hasta la fecha de
SAMPLE SORBENT 4	caducidad a 2-8 °C
	hasta la fecha de
SUSTRATO	caducidad a 2-8 °C;
	1 semana a 15-30 °C;
	en ambiente oscuro
TAMPÓN DE LAVADO	2 semanas 2-8 °C;
	5 días a 15-30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de
	caducidad a 2-8 °C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio.

No se conocen las consecuencias del uso de otros líquidos biológicos.

El suero fresco se puede conservar a 2/8 °C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20 °C.

Evitar descongelaciones repetidas.

Evitar el uso de congeladores con desescarche automático para conservar las muestras. Después de descongelar la muestra, agitarla con cuidado antes de su uso.

La inactivación por calor puede conducir a resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana, que conduce a resultados erróneos.

8. PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN

Antes de empezar la prueba, llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-30 °C).

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Diluir las muestras 1:51 poniendo 10 μL de suero en 0.500 mL de diluyente.

REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

1. Distribución de las muestras:
Distribuir 100 μL de control (positivo, negativo o cut-off). Distribuir 50 μL de Sample Sorbent 4 y 50 μL de muestra diluida por pocillo (es preferible realizar el análisis por duplicado).
El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 1 control positivo y 2 controles Cut-Off. Dejar un pocillo de la tira para el blanco.
2. Incubación:
Incubar la placa cubierta con hoja adhesiva a temperatura ambiente durante 60 \pm 5 minutos.
3. Lavado:
Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces llenando cada pozo con 300 μL de solución de lavado. Esperar 30 segundos antes de cada lavado.
4. Distribución del conjugado:
Distribuir 100 μL de conjugado para cada pocillo de la placa.
5. Incubación del conjugado:
Incubar la placa cubierta con hoja adhesiva a temperatura ambiente durante 60 \pm 5 minutos.
6. Lavado:
Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces llenando cada pozo con 300 μL de solución de lavado. Esperar 30 segundos antes de cada lavado.
7. Distribución del sustrato:
Distribuir 100 μL de sustrato para cada pocillo de la placa.
8. Incubación del sustrato:
Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Parada de la reacción:
Distribuir 100 μL de solución de bloqueo siguiendo el mismo orden de añadido que en el punto 4.
10. Lectura:
Leer las D.O. a 450 nm o 450/620 nm en 30 min. como máximo. Volver a leer a 405 nm si hay D.O. superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DEL ENSAYO PARA EL SARS-CoV-2 IgM

- PASO 1 Poner 100 μL de control (positivo, negativo y cut-off) y 50 μL de Sample Sorbent 4 + 50 μL de muestra diluida en los pocillos de las tiras. Agitar.
-
- Incubar 60 \pm 5 minutos a temperatura ambiente
-
- Lavar 4 veces (300 μL)

- PASO 2 -
Poner 100 µL de conjugado en cada pocillo
-
Incubar 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente
-
Lavar 4 veces (300 µL)
-
PASO 3 Poner 100 µL de sustrato en cada pocillo
-
Incubar 15 minutos a t.a.
-
PASO 4 Añadir 100 µL de solución bloqueante
-
Leer la D.O a 450 nm o 450/620 nm en 30 min.

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Blanco: <0.150

Control negativo: La relación entre la D.O. del control negativo y la D.O. del cut-off debe ser <0.6.

Control positivo: el control positivo debe tener una D.O. de al menos 1,5 veces la del suero cut-off.

Control cut-off: la D.O. del cut-off debe ser >0.2.

Si uno de los resultados de los sueros de control no entra en el intervalo de aceptabilidad, repetir la prueba. Si el problema persiste, contactar con el Scientific Support.

Tel.: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
e-mail: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y el del Cut-off (Index).

La muestra se considera:

POSITIVA: cuando el Index es >1.1

DUDOSA: para todos los valores 0.9-1.1

NEGATIVA: cuando el Index es <0.9

12. LIMITACIONES

Todos los valores obtenidos deben interpretarse con atención, sin prescindir de otros indicadores del mismo paciente.

Este test, de hecho, no debe ser la única prueba utilizada para el diagnóstico clínico. El resultado de la prueba se debe evaluar junto con los datos clínicos y otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Fueron analizadas 4 muestras (2 Negativas y 2 Positivas) a las que se añadieron los interferentes siguientes:

Factor reumatoide (44 – 220 IU/ml)
Bilirrubina (4.5 – 45 mg/dl)
Triglicéridos (10 – 250 mg/dl)
Hemoglobina (5 – 30 mg/ml)

La presencia de las mencionadas sustancias interferentes en el suero puede alterar el resultado del test.

14. REACCIONES CRUZADAS

Fueron analizadas 128 muestras, positivas en

Mycoplasma p. (5), Citomegalovirus (4), VRS (2), Gripe B (1), Gripe A (5), Adenovirus (3), Factor Reumatoide (4), ANA (22), Coronavirus humanos (21), SARS-CoV (18), virus de Epstein-Barr (13), VIH (10), Rubella Virus (3), Chlamydomphila pneumoniae (5), Virus Parainfluenza (5), Legionella pneumoniae (2) y Bordetella pertussis (5).

No se observaron reacciones cruzadas significativas, excepto Mycoplasma p. (1), Factor Reumatoide (1), ANA (3), Coronavirus humanos (4), SARS-CoV (5) y virus de Epstein-Barr (3).

15. ESTUDIOS COMPARATIVOS

En una prueba, se analizaron 625 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	85	10	95
	-	8	522	530
	Total	93	532	625

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de diagnóstico):

91.4% CI95%: 83.9-95.6.

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de diagnóstico):

98.1% CI95%: 96.6-99.0.

El análisis de los resultados de 29 muestras con fechas conocidas de aparición de síntomas mostró que la sensibilidad de las pruebas ELISA aumenta 10 días después de la aparición de los síntomas. Se alcanza el 87.5% de sensibilidad después de 12 días.

Días desde la aparición de síntomas	Sensibilidad
<10	58.3%
>10	70.6%
>12	87.5%

El análisis de los resultados de 282 muestras con fecha conocida de recogida pre pandemia (antes de junio de 2019), mostró que la especificidad de la prueba ELISA es del 99%

16. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Muestra	Intra-ensayo		Entre ensayos		Entre lotes	
	Media Index	CV %	Media Index	CV %	Media Index	CV %
1	1.6	8.8	1.5	13.3	0.2	25.0*
2	0.5	10.0	2.1	11.9	2.0	7.5
3	1.9	2.6	0.8	11.3	0.5	8.0
4	0.6	10.0	0.7	10.0	1.8	10.6

*Artefacto debido al conocido efecto de Variación del Coeficiente que se vuelve extremadamente sensible a los cambios (incluso a los más pequeños) cuando el valor promedio está cerca de cero.

17. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLES FUENTES DE ERROR	ACCIONES A REALIZAR
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos	Controlar de nuevo el procedimiento. Controlar si no se ha añadido algún reactivo.

	en secuencia errónea.	Repetir la prueba.
	Placa no reactiva.	Controlar el código del envase de la placa (ver información técnica).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido). Repetir la prueba.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato.	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador.
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos.	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador.
	Error de pipeteado.	Controlar el funcionamiento de la pipeta.
	Adición de los reactivos demasiado lenta.	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas.	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea.
	Sistema óptico no limpio.	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad. Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos.	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa.	Controlar el funcionamiento de la pipeta.



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



18. BIBLIOGRAFÍA

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



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZY-WELL SARS-CoV-2 IgM

Para a determinação qualitativa dos anticorpos da classe IgM anti-SRA-CoV-2

Apenas para uso diagnóstico *in vitro*

1. UTILIZAÇÃO

Método imunoenzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos da classe IgM anti-SRA-CoV-2.

2. INTRODUÇÃO

Os coronavírus são vírus de cadeia única de RNA positivo pertencentes à família Coronaviridae, que se dividem em quatro tipos: Coronavirus Alfa, Beta, Delta e Gama. Os CoV são normalmente encontrados em muitas espécies de animais. Ocasionalmente, os CoV em animais podem adquirir mutações genéticas através de erros durante a replicação do genoma, o que pode expandir ainda mais o seu tropismo para os humanos. Um total de seis tipos de CoV humanos foram identificados como responsáveis por doenças respiratórias humanas, incluindo dois CoV alfa e quatro CoV beta (os dois mais recentes são SRA-CoV e MERS-CoV). Tipicamente, estes CoVs causam infecções assintomáticas ou doenças respiratórias agudas graves, incluindo febre, tosse e falta de ar. No entanto, foram também relatados outros sintomas, tais como gastroenterite e doenças neurológicas de diferente gravidade. Desde dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde reportou o sétimo beta-coronavírus humano (2019-nCoV), que causou uma epidemia de pneumonia. Este novo vírus está ligado a um surto de doença respiratória com quadro febril na cidade de Wuhan, província de Hubei, China. Alguns doentes com 2019-nCoV desenvolveram pneumonia grave, edema pulmonar, SDRA ou falência de múltiplos órgãos e acabaram por falecer. Atualmente, há pouca informação sobre a epidemiologia e características clínicas da pneumonia causada por 2019-nCoV. A monitorização do título de anticorpos pode servir como indicação do estado de infecção: durante os primeiros dias aparecem IgA e IgM; à medida que a doença progride, a IgG torna-se predominante.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática). O antigénio liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas específicas são ligadas ao antigénio após a incubação com soro humano diluído. Após lavagens para eliminar as proteínas que não tenham reagido, realiza-se a incubação com o conjugado composto por anticorpos monoclonais anti-IgM humanos conjugados com peroxidase de rábano. Elimina-se o conjugado não ligado e adiciona-se o substrato para a peroxidase. A cor azul que se forma é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes no soro analisado.

Quando a reação enzimática é interrompida com a adição de uma solução de ácido sulfúrico, o soro fica amarelo. A cor,

proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes no soro, pode ser lida num leitor para microplacas.

4. PRECAUÇÕES

Este kit contém materiais de origem humana testados e negativos ao HBsAg e aos anticorpos anti-VIH 1, anti-VIH 2 e anti-VHC. Dado que nenhum teste de diagnóstico pode oferecer garantia total de ausência de agentes infecciosos, qualquer material de origem humana deve ser considerado potencialmente infetado. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizados devem ser tratados como resíduos infetados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.

Advertências para a segurança individual

1. Não pipetar com a boca.
2. Usar luvas descartáveis e uma proteção para os olhos ao manusear as amostras e executar o ensaio.
3. Lavar muito bem as mãos ao terminar o teste.
4. Os aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização de preferência em autoclave durante 1 hora a 121 °C; todos os aparelhos descartáveis devem ser eliminados de acordo com as normas vigentes.
5. O ácido clórico 2M usado na lavagem de recipientes de vidros é corrosivo e deve ser manuseado com cuidado. Em caso de contacto com a pele ou com os olhos, lavar a área abundantemente com água.
6. Ácidos neutralizados e outros resíduos líquidos devem ser desinfetados adicionando um volume de hipoclorito de sódio suficiente para obter a concentração final de, pelo menos, 1%. Exposição a hipoclorito de sódio a 1%, durante 30 minutos, deverá ser suficiente para garantir uma desinfecção eficaz.
7. Eventuais derramamentos de materiais potencialmente infectados devem ser absorvidos imediatamente com papel absorvente e a área afetada deverá ser descontaminada, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, antes de continuar o trabalho. Se houver algum ácido presente, o hipoclorito de sódio não deve ser usado antes da referida área estar seca.
Todos os materiais utilizados para descontaminar eventuais derramamentos acidentais, incluindo luvas, devem ser eliminados como resíduos potencialmente infetados.
Não meter no autoclave material que contenha hipoclorito de sódio.

Advertências analíticas

1. O D.O. do Cut-Off, dos controlos e das amostras pode ser ligeiramente diferente entre placas diferentes. Portanto, se forem utilizadas tiras de placas diferentes na mesma sessão, mesmo que do mesmo lote, é necessário repetir a determinação do Cut-Off.
2. Antes da utilização, deixar que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18-30 °C). Recolocar imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após a utilização.

3. Abrir o saco que contém as tiras pelo menos após 30 minutos que estiver em temperatura ambiente.
4. Não utilizar os reagentes além do prazo de validade. A contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, visto que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
5. Não modificar o Procedimento e não substituir os reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a não ser que sejam classificados como intermutáveis. Não reduzir o tempo de incubação recomendado.
6. Qualquer recipiente de vidro a ser usado no teste deve ser devidamente lavado com ácido clórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada.
7. Não expor reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante as fases de incubação.
8. Não deixar que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
9. Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras.
10. Evitar a contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com o substrato e o conjugado.
11. Evitar tocar a borda do poço com o conjugado.
12. Não "soprar" nas microplacas.
13. Os ensaios de imunoenzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" ("edge effect"). É possível minimizar tal efeito aumentando a humidade durante as fases de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas à temperatura indicada no procedimento ou em banho-maria, usando uma sustentação para as placas, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para maiores informações, consultar o manual específico operacional do instrumento. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
14. Antes de ler a placa, certificar-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas de ar na superfície do líquido.
15. A utilização de amostras altamente hemolisadas, lipémicas, ictericas, de soros coagulados de forma incompleta ou amostras com contaminação microbiana podem gerar resultados errados.
16. Evitar a contaminação dos poços com o talco das luvas descartáveis.
17. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado pelo utilizador.
18. Para cada instrumento utilizado, ler atentamente o Manual de Utilização para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
 - instalação e requisitos especiais
 - princípios de funcionamento, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e assistência técnica.

5. COMPOSIÇÃO DO KIT E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes são suficientes para 96 determinações

Deixar os reagentes a temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA (12x8)

Conteúdo: 1 placa de 96 poços sensibilizados com antígeno nativo inativado.

CONJ CONJUGADO 1x16 ml

Conteúdo: Anticorpos monoclonais anti-IgM humano marcados com peroxidase, em solução tampão de fosfato contendo fenol 0,05% e Bronidox 0,02%. Líquido, pronto a usar.

CONTROL - CONTROLO NEGATIVO 1x0.8 ml

Conteúdo: Solução proteica sem anticorpos específicos capazes de ligar o antígeno presente na microplaca e conservante. Líquido, pronto a usar.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1x0.8 ml

Conteúdo: Solução proteica que contem anticorpos específicos capazes de ligar o antígeno presente na microplaca e conservante. Líquido, pronto a usar.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO CUT-OFF 1x0.8 ml

Conteúdo: Solução proteica que contem anticorpos específicos capazes de ligar o antígeno presente na microplaca e conservante. Líquido, pronto a usar.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 1x100 ml

(PF93611)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com Azida de Sódio a 0,09% e metil-orange como corante.

Uso: Para diluição das amostras. Líquido, pronto a usar.

SAMPLE SORBENT 4 SAMPLE SORBENT 4 1x7 ml

(PF30401)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução proteica em tampão de fosfato com Azida de Sódio 0,09%, corante (metil-orange) e anticorpos anti-IgG humanas.

Uso: Para ser utilizado para diluição das amostras (em placa). Líquido, pronto a usar.

WASH BUF 10x TAMPO DE LAVAGEM 10x 1x100 ml

(PF93603)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução salina tamponada (PBS), concentrada 10 vezes, que contém Brij 0,5%.

Preparação: Diluir o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada ou deionizada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37 °C antes da diluição.

SUBS TMB SUBSTRATO 1x12 ml

(PF93619)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/ml e H₂O₂ 0,01% estabilizados num tampão citrato 0,05 mol/L (pH 3,8). Líquido, pronto a usar.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM 1x16 ml

(PF93602)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução de H₂SO₄ 0.3 mol/L. Líquido, pronta a utilizar.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS QUE NÃO FORAM FORNECIDOS.

- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com linearidade até OD \geq 2.000)
- Sistema de lavagem de microplacas (não indispensável) capaz de fornecer volumes entre 225-375 μ l
- Água destilada ou desionizada
- Vidro normal de laboratório: provetas, tubos, etc..
- Micropipetas capazes de recolher com precisão 10, 100, 1000 μ l de solução
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio a 5%
- Recipientes para recolher materiais potencialmente infetados
- Papel absorvente

6. MODO DE CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados a 2-8 °C.

O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo externo da embalagem.

Após abertura e/ou preparação, os reagentes têm estabilidade limitada:

MICROPLACA	4 semanas a 2-8 °C
CONJUGADO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROLO POSITIVO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROLO NEGATIVO	8 semanas a 2-8 °C
CONTROLO CUT-OFF	8 semanas a 2-8 °C
DILUENTE 2	até ao prazo de validade a
SAMPLE SORBENT 4	2-8 °C
	até ao prazo de validade a
	2-8 °C
SUBSTRATO	até ao prazo de validade a
	2-8 °C;
	1 semana a 15-30 °C;
	guardar ao abrigo da luz
TAMPÃO DE LAVAGEM	2 semanas a 2-8 °C;
	5 dias a 15-30 °C
SOLUÇÃO DE PARAGEM	até ao prazo de validade a
	2-8 °C

7. TIPO DE AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

O tipo de amostra é representado por soro, obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório.

Não são conhecidas as consequências provocadas pelo uso de outros líquidos biológicos.

O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias entre 2 e 8 °C; para períodos de conservação mais prolongados, congelar a -20 °C.

Evitar descongelações repetidas.

Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras. Após a descongelação, agitar a amostra com cuidado antes da dosagem.

A inativação por calor pode levar a resultados errados.

A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação microbiana, que pode gerar resultados errados.

8. PROCEDIMENTO

PREPARAÇÃO

Antes de iniciar o teste, deixar que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18-30 °C).

- Preparar a quantidade necessária de tiras.
- Preparar o tampão de lavagem diluindo o tampão de lavagem 10x (100 ml + 900 ml H₂O).
- Diluir as amostras 1:51 distribuindo 10 μ L de soro em 0,500 ml de diluente.

EXECUÇÃO DO TESTE

1. Distribuição das amostras:
Distribuir 100 μ l de controlo (positivo, negativo ou de cut-off).
Distribuir 50 μ l de sample sorbent 4 + 50 μ l de amostra diluída por poço (é preferível efetuar uma análise dupla).
O requisito mínimo indispensável é 1 controlo negativo, 1 controlo positivo e 2 controlos de cut-off. (Deixar um poço da tira para o branco).
2. Incubação:
Incubar a placa coberta com uma folha adesiva à temperatura ambiente durante 60 \pm 5 minutos.
3. Lavagem:
Remover a folha adesiva, aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar 4 vezes, enchendo cada poço com 300 μ L de solução de lavagem. Aguardar 30 segundos antes de cada lavagem.
4. Distribuição do conjugado:
100 μ L de conjugado para cada poço da placa.
5. Incubação do conjugado:
Incubar a placa coberta com uma folha adesiva à temperatura ambiente durante 60 \pm 5 minutos.
6. Lavagem:
Remover a folha adesiva, aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar 4 vezes, enchendo cada poço com 300 μ L de solução de lavagem. Aguardar 30 segundos antes de cada lavagem.
7. Distribuição do substrato:
Distribuir 100 μ L de substrato para cada poço da placa.
8. Incubação do substrato:
Incubar a placa à temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Paragem da reação:
Distribuir 100 μ L de solução de paragem seguindo a mesma ordem de adição do ponto 4.
10. Leitura:
Ler as D.O. a 450 nm ou 450/620 nm no prazo de 30 min. Efetuar novamente a leitura a 405 nm em caso de D.O. superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DO ENSAIO PARA SARS-CoV-2 IgM

- PASSO 1 Colocar 100 μ L de controlos (positivo, negativo e cut-off) e 50 μ l de sample sorbent 4 + 50 μ l de amostra diluída nos poços das tiras. Agitar.
- - Incubar 60 \pm 5 min. à temperatura ambiente
 -
 - Lavar 4 vezes (300 μ L)
 -
- PASSO 2 Colocar 100 μ L de conjugado por poço

- Incubar 60 ± 5 min. à temperatura ambiente
- Lavar 4 vezes (300 µL)
-
- PASSO 3 Adicionar 100 µL de Substrato por poço
-
- Incubar 15 min. à t.a.
-
- PASSO 4 Adicionar 100 µL de Solução de Paragem
-
- Ler o D.O. a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 minutos.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

Branco: <0,150

Controlo negativo: A relação entre a D.O. do controlo negativo e a D.O. do cut-off deve ser <0,6.

Controlo positivo: o controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1,5 vez aquela do soro de cut-off.

Controlo cut-off: a D.O. do cut-off > 0,2.

Se um dos resultados dos soros de controlo estiver fora do intervalo de aceitação, repetir o teste. Se o problema persistir, contactar o Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Calcular a relação entre o valor DO da amostra e aquela do cut-off (Índice).

A amostra é considerada:

POSITIVO: quando o Índice é > 1,1

DÚVIDA: para todos os valores 0,9-1,1

NEGATIVO: quando o índice é <0,9

12. LIMITAÇÕES

Todos os valores obtidos necessitam de uma interpretação cuidadosa que não prescindida de outros indicadores relativos ao mesmo doente.

O teste, de facto, por si só não pode ser utilizado para um diagnóstico clínico definitivo. O resultado do teste deve ser sempre avaliado em conjunto com os dados provenientes da anamnese do doente e/ou com outros procedimentos diagnósticos.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 4 amostras (2 Negativas e 2 Positivas) às quais foram adicionados os seguintes interferentes:

Fator Reumatoide (44-220 IU/ml)

Bilirrubina (4,5-45 mg/dl)

Triglicéridos (10-250 mg/dl)

Hemoglobina (5-30 mg/ml)

A presença das substâncias interferentes acima referidas no soro examinado pode alterar o resultado do teste.

14. REATIVIDADE CRUZADA

128 amostras positivas a:

Mycoplasma p. (5), Cytomegaloviru (4), RSA (2), Gripe B (1), Gripe A (5), Adenovirus (3), Fator Reumatóide (4), ANA (22), SRA-CoV (18) Coronavírus humanos (21), Epstein-Barr (13), Vírus da Rubéola (3), Chlamydomphila pneumoniae (5), Vírus Parainfluenza (5), Legionella pneumophila (2), Bordetella pertussis (5) e VIH (10) foram testados.

Não foram detetadas reações cruzadas significativas com exceção de Mycoplasma p. (1), Fator Reumatóide (1), ANA (3), Coronavírus humanos (4), SRA-CoV (5), e Vírus Epstein-Barr (3).

15. ESTUDOS DE COMPARAÇÃO

Numa experimentação foram analisadas 625 amostras com o kit Diesse e com um outro kit do mercado.

Esquematizam-se, de seguida, os dados da experimentação:

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	85	10	95
	-	8	522	530
	Total	93	532	625

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade de diagnóstico):

91.4% CI95%: 83.9-95.6.

Percent Negative Agreement (~Especificidade de diagnóstico):

98.1% CI95%: 96.6-99.0.

A análise dos resultados de 29 amostras com data de início dos sintomas conhecida mostrou que a sensibilidade dos testes ELISA aumenta 10 dias após o início dos sintomas. A sensibilidade é de 87.5% após 12 dias.

Dias até o início dos sintomas	Sensibilidade
<10	58.3%
>10	70.6%
>12	87.5%

A análise dos resultados em 282 amostras com data de colheita pré-pandemia conhecida (antes de Junho de 2019) tem mostrado uma especificidade dos testes ELISA de 99%.

16. PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Amostra	Dentro da sessão		Entre sessões		Entre lotes	
	Média Índice	CV%	Média Índice	CV%	Média Índice	CV%
1	1,6	8,8	1,5	13,3	0,2	25,0*
2	0,5	10,0	2,1	11,9	2,0	7,5
3	1,9	2,6	0,8	11,3	0,5	8,0
4	0,6	10,0	0,7	10,0	1,8	10,6

*Artefato resultante do conhecido efeito de Variação do Coeficiente que se torna extremamente sensível a variações (mesmo muito pequenas) quando o valor médio está próximo de zero.

17. GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEIS FONTES DE ERRO	AÇÕES A SEREM ADOTADAS
Sessão inválida (todas negativas)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou foram adicionado numa sequência incorreta	Verificar novamente o procedimento. Verificar se algum reagente não foi utilizado. Repetir o teste.
	Placa não reativa	Verificar o código no saco da placa (ver as instruções de uso).
		Verificar a existência de humidade na placa não utilizada. (O gel de sílica deve estar amarelo claro). Repetir o teste.
Sessão inválida (todas positivas)	Contaminação do substrato	Recolher uma nova quota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certificar-se de que o sistema de lavagem esteja a funcionar corretamente
Pouca precisão	Aspiração inadequada de poços	Certificar-se de que o sistema de lavagem esteja a funcionar corretamente
	Erro de pipetagem	Verificar o funcionamento da pipeta
	A adição de reagente é muito lenta	Evitar a secagem da placa após a lavagem. Adicionar os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas de ar	Evitar a formação de bolhas de ar durante a pipetagem
	A passagem ótica não está limpa	Verificar se existe sujidade na fonte de luz. Limpar o fundo da placa com um lenço de papel.
Desenvolvimento inadequado de cor	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verificar a monitorização da temperatura e o tempo de incubação
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verificar o funcionamento da pipeta.









18. BIBLIOGRAFIA

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



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



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