

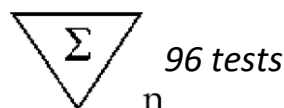


Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Test immunoenzimatico quantitativo ad alta sensibilità per la rilevazione di anticorpi IgG contro la proteina Spike S1 del SARS-CoV-2 in campioni di siero o plasma.

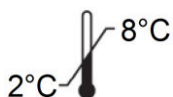
High sensitivity enzyme immunoassay for the quantitative determination of human IgG anti-SARS-CoV-2 Spike protein S1 in human serum or plasma.

ELISA



*Per solo uso diagnostico in vitro
For In Vitro Diagnostic Use Only*

REF ELVI021G



MELVI021G

SOMMARIO/CONTENT

1. DESTINAZIONE D'USO	2
1. INTENDED USE	11
2. INTRODUZIONE	2
2. SUMMARY	11
3. PRINCIPIO DEL TEST	2
3. PRINCIPLE OF THE TEST	11
4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI	3
4. WARNING AND PRECAUTIONS	11
5. COMPONENTI DEL KIT	4
5. KIT COMPONENTS	13
6. PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	5
6. SAMPLES COLLECTION AND STORAGE	14
7. PROCEDURA DEL TEST	5
7. ASSAY PROCEDURE	14
8. CONTROLLO DI QUALITÀ	7
8. QUALITY CONTROL	16
9. CALCOLO DEI RISULTATI	8
9. CALCULATION OF THE RESULTS	16
10. LIMITAZIONI DEL TEST	9
10. LIMITATIONS OF THE TEST	18
11. PERFORMANCE DEL TEST	9
11. PERFORMANCE OF THE TEST	18
12. BIBLIOGRAFIA/REFERENCES	19
13. SIMBOLI/SYMBOLS	19

IMMUNOSAGGIO IN FASE SOLIDA PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI ANTICORPI IgG CONTRO LA PROTEINA SPIKE S1 DEL SARS-CoV-2 (NP) IN SIERO O PLASMA

Solo per uso professionale diagnostico in vitro

1. DESTINAZIONE D'USO

Anti-nCoV19 S1 IgG HS è un immunosaggio enzimatico in fase solida per la determinazione quantitativa di anticorpi di classe IgG diretti contro SARS-CoV-2 Spike protein S1 in campioni di siero o plasma umano. Il kit contiene reagent sufficient per 96 reazioni.

Con questo test è possibile determinare lo stato di protezione immunitaria.

2. INTRODUZIONE

Nel dicembre 2019, un nuovo coronavirus, ora ufficialmente chiamato coronavirus SARS-CoV-2, è stato identificato a Wuhan in Cina ed è stato immediatamente collegato al sorgimento di una malattia respiratoria acuta associata chiamata malattia coronavirus 19 (COVID19). Segni e sintomi di COVID-19 possono verificarsi da 2 a 14 giorni dopo l'infezione, tra cui febbre, tosse, mancanza di respiro o difficoltà respiratorie, dolore ai muscoli e stanchezza. Nei casi più gravi, l'infezione può portare a polmonite, sindrome respiratoria acuta grave (SARS), insufficienza renale e morte.

La proteina nucleocapside (NP) è la proteina più abbondante sul nucleocapside elicoidale dei coronavirus, essa avvolge l'intero RNA genomico. NP interagisce anche con altre proteine strutturali virali per svolgere ruoli importanti durante l'ingresso nelle cellule ospiti e l'assemblaggio e il rilascio delle particelle virali. Gli anticorpi anti-NP hanno dimostrato di essere i primi e sono i predominanti anticorpi rilevabili nei campioni di sangue del paziente dopo l'infezione da coronavirus.

3. PRINCIPIO DEL TEST

Anti-nCoV19 S1 IgG HS si basa sul principio ELISA ed è un kit immunodosaggio per incubazione in due fasi. La proteina Spike S1 di SARS-CoV-2 pre-rivestita sulle pareti dei micropozzetti può riconoscere specificamente gli anticorpi IgG anti-S1 nei campioni di siero o plasma umani. Dopo un'incubazione, gli anticorpi anti-S1 vengono catturati dalla proteina S1 immobilizzata mentre i componenti non legati vengono lavati via. Successivamente, una soluzione di rilevazione contenente policlonali anti-human IgG coniugate con HRPO viene aggiunta per un'altra incubazione, in cui le anti-human IgG coniugate con HRPO si legano agli anticorpi di classe IgG precedentemente legati alla proteina S1 sulla piastra. Dopo la rimozione di legami non specifici, viene aggiunta una soluzione di substrato contenente 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), con conseguente formazione di un colore blu. La reazione del colore viene arrestata da una soluzione di H₂SO₄, trasformando il colore blu in giallo, l'intensità di questa colorazione viene quantificata da un lettore di micropiastre ad assorbanza ad una lunghezza di onda di 450 nm. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità di anticorpi IgG anti-S1 catturati all'interno dei pozzetti. La quantificazione della concentrazione è ottenuta tramite interpolazione di una curva di calibrazione con punti a concentrazioni note di monoclonale IgG anti-S1.







4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.

Anti-nCoV19 S1 IgG HS può essere impiegato solo da parte di personale specializzato che conosca perfettamente le tecniche di lavoro.

5. COMPONENTI DEL KIT

5.1. Materiali forniti

Cod. colore	DESCRIZIONE	Q.tá	Unitá	Simbolo
	Micropiastra rivestita con proteina S1 di SARS-CoV-2 ricombinante: 12 strip divisibili in 8 pozzetti, dentro una busta d'alluminio richiudibile.	1	Pcs	MT PLATE
 Azzurro	Coniugato anti-IgG (100X): 0,12 ml di soluzione acquosa di anticorpi anti-human IgG diretti contro le IgG del campione, coniugati a perossidasi.	1	Vial	CONJ
 Rosso	Calibratore: 2 ng di Human anti-S1 mAb liofilizzato.	1	Vial	CAL
 Arancione	Tampone di reazione (5X): 40 ml di tampone per diluire i campioni, i calibratori e i controlli.	1	Vial	DIL
 Celeste	Substrato. 12 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso.	1	Vial	SUBS TMB
 Bianco	Tampone di lavaggio (10X): 40 ml di tampone concentrato per il lavaggio dei pozzetti.	1	Vial	WASH BUF
 Grigio	Soluzione stop: 12 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.	1	Vial	SOLN
	Istruzioni per uso (<i>MELVI021G</i>)	1	Pz	-

Separatamente é disponibile alla vendita il controllo positivo (REF. ELVI021G-CTR).

Usare **Tampone di reazione 1X** come controllo negativo.

5.2. Strumenti e materiali necessari ma non forniti

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer.

5.3. Conservazione e stabilitá del Kit

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È possibile analizzare campioni di siero o plasma con EDTA, citrato di sodio o eparina. Non sono raccomandati campioni altamente lipemici, itterici o emolitici. I campioni con contaminazione microbica visibile non devono essere utilizzati.

Se necessario, usare vortex su campioni di siero o plasma a temperatura ambiente per garantire l'omogeneità. Quindi centrifugare i campioni da 10.000 a 15.000 rpm per 5 minuti prima del dosaggio per rimuovere il particolato. Non omettere questa fase di centrifugazione se i campioni sono torbidi e contengono particelle.

6.1. Preparazione (diluizione) dei campioni

Il campione di siero o plasma richiede una diluizione di 100X in **tampone di reazione 1X** preparato secondo quanto qui di seguito descritto. Una diluizione suggerita è quella di aggiungere 2 µl di campione a 198 µl di **tampone di reazione 1X**.

7. PROCEDURA DEL TEST

7.1. Preparazione dei reagenti

- *Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20...25°C) prima dell'uso.*
- I pozzetti della **micropiastra** sono separabili. Contengono proteina *Spike S1 SARS-CoV-2* ricombinante adesa alle pareti interne. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2...8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*
- Il flacone del **Coniugato anti-IgG (100X)** contiene 0,12 ml di una soluzione concentrata di anticorpi anti-human IgG coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti.
Vortexare e centrifugare brevemente la soluzione di **Coniugato anti-IgG (100X)** e diluire la quantità desiderata in ragione 1:100 con **tampone di reazione 1X** preparato secondo quanto di seguito descritto. Sono necessari 100 µl di **Coniugato anti-IgG 1X** per pozzetto. Preparare solo la quantità strettamente necessaria di **Coniugato anti-IgG 1X**. Riportare a 2-8°C la soluzione di **Coniugato anti-IgG (100X)** immediatamente dopo aver rimosso il volume necessario.
- Il flacone del **tampone di reazione (5X)** contiene 20 ml di tampone fosfato concentrato, stabilizzanti, conservanti. La soluzione viene diluita prima della reazione ed è usata per diluire i campioni ed i controlli direttamente nel pozzetto di reazione.
Preparare una soluzione 1X di tampone di reazione mescolando (20 ml) di **tampone di reazione 5x** con 80 ml di acqua distillata o acqua deionizzata. Se si osservano precipitati nel flacone del tampone di reazione, riscaldare il flacone a bagnomaria a 37°C fino a quando i precipitati scompaiono. *Il tampone di reazione 1X ottenuto può essere conservato a 2-8°C per un massimo di un mese.*
- Tampone di lavaggio: il flacone del **tampone di lavaggio (10X)** contiene 40 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua

ELVI021G Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Info: sales@immunospark.com

- deionizzata o distillata. Preparare una soluzione 1X di tampone di lavaggio mescolando 40 ml di **tampone di lavaggio (10X)** con 360 ml di acqua distillata o acqua deionizzata. Se si osservano precipitati nel flacone del **tampone di lavaggio (10X)**, riscaldare il flacone in acqua a 37°C fino a quando i precipitati scompaiono. *Il tampone di lavaggio diluito può essere conservato a 2-8°C per un massimo di un mese*
- Il flacone del **substrato** contiene 12 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*
- Il flacone della **STOP solution** contiene 12 ml di acido solforico, 2M (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*
- **Calibratori:** ricostituire il flacone liofilizzato di calibratore con 450 µl di **tampone di reazione 1X**, per generare il primo punto della curva di calibrazione (10 ng/ml). Preparare diluizioni seriali del primo punto secondo quanto descritto qui di seguito:

Punto della curva di calibrazione	Volume del calibratore	Volume di Tampone di reazione 1X	Concentrazione
5	10,00 ng/ml	-	10,000 ng/ml
4	225 µl of 10,00 ng/ml	225 µl	5,000 ng/ml
3	225 µl of 5,00 ng/ml	225 µl	2,500 ng/ml
2	225 µl of 2,50 ng/ml	225 µl	1,250 ng/ml
1	225 µl of 1,25 ng/ml	225 µl	0,625 ng/ml

Il **tampone di reazione 1X** verrà utilizzato come **blank** (0 ng/ml).

Nota: il calibratore ricostituito deve essere aliquotato e conservato a -20°C per un periodo di massimo un mese. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

7.2. Nota procedurale

Si raccomanda di pipettare tutti i campioni e controlli nel tempo massimo di 3 minuti.

7.3. Procedura del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi di 3 a 5 volte e valutare bene il volume della soluzione da usare per lavare una superficie sufficientemente ampia delle pareti del pozzetto ed evitare così interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli su un foglio di lavoro. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

1. Pipettare **100 µl** di calibratori, controlli e campioni da testare nei relativi pozzetti. Usare il **100 µl** di **tampone di reazione 1X** come bianco-reagente.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora a temperatura ambiente in agitazione a 600 RPM (se l'agitatore non é disponibile prolungare l'incubazione a 2 ore in totale).**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti 4 volte con **300 µl** di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio é una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.

5. Pipettare **100µl** di **Coniugato anti-IgG 1X** in tutti i pozzetti. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 1 ora a temperatura ambiente.**
7. Ripetere il lavaggio come al punto 4.
8. Pipettare **100µl** di **Substrato** in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20°...25°C) al buio.**
10. Pipettare **100µl** di **Soluzione Stop** in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni un'altra volta come descritto in 7.1 e di ripetere il test.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione stop.

Per la misurazione, regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. *Se, per motivi tecnici, non é possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.*

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

É raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

8. CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia di utilizzare campioni di controllo secondo le norme statali e federali. Si consiglia l'uso di campioni di controllo di assicurare il giorno per giorno la validità dei risultati.

Il test deve essere eseguito esattamente secondo le istruzioni del produttore per l'uso. Inoltre l'utente deve attenersi strettamente alle regole del GLP (Good Laboratory Practice) o altre norme federali, statali e le norme e/o le leggi locali. Questo è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. È importante includere sempre, nella procedura di prova, un numero sufficiente di controlli per validare l'accuratezza e precisione del test.

Ogni micropiastra deve essere considerata separatamente nel calcolo e nell'interpretazione dei risultati del dosaggio, indipendentemente dal numero di piastre elaborate contemporaneamente. I risultati vengono calcolati mettendo in relazione il valore di assorbanza di ciascun campione con il valore di Cut-off.

9. CALCOLO DEI RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se il risultato risponde ai seguenti criteri:

- il valore di assorbanza del pozzetto del bianco deve essere $<0,100$ a 450 nm.
- il valore di assorbanza del controllo negativo deve essere $<0,200$ a 450 nm.

Se almeno una di queste due condizioni non risulta soddisfatta, il test non è valido e deve essere ripetuto.

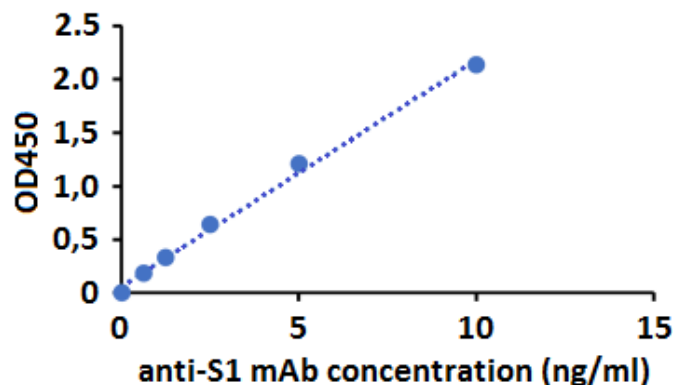
9.1.1. Curva di calibrazione

1. Sottrarre il valore della assorbanza del blank dai valori ottenuti per calibratori, controlli e campioni.

2. Generare una curva di calibrazione con i valori di assorbanza ottenuti sull'asse Y contro i valori delle concentrazioni dei calibratori sull'asse X. La curva con il migliore FIT può essere generata con un sistema di regressione lineare come una log lineare o una 4 parametri.

3. determinare la concentrazione di anticorpo IgG anti-S1 dei campioni usando la curva generata; se il campione è stato prediluito, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Riportiamo qui di seguito un esempio di curva di calibrazione tipica (Attenzione: questa rappresentazione non deve essere usata come criterio di valutazione per le misurazioni nella pratica!!).



9.2. Calcolo e interpretazione dei risultati

Questo é un dosaggio quantitativo che restituisce il valore del titolo di anticorpi IgG anti-S1. Il valore di tale titolo deve essere considerato nell'ambito del quadro clinico perché possa essere definitivamente considerato come un positivo o un negativo. Ma in linea di massima possono essere effettuate le seguenti considerazioni sulla positività e successivamente considerati gli specifici valori del titolo anticorpale:

Il risultato del test é **NEGATIVO** quando il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di assorbanza del primo punto di calibrazione é minore di 0,9. Un risultato negativo indica la assenza di anticorpi IgG anti - SARS-CoV-2 NP.

Il risultato del test é **POSITIVO** quando il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di assorbanza del primo punto di calibrazione é maggiore o uguale a 1,1. Un risultato positivo indica la presenza di anticorpi IgG anti - SARS-CoV-2 NP.

Il risultato del test é considerato **DUBBIO** quanto il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di assorbanza del primo punto di calibrazione ha valore compreso tra 0,9 e 1,1. Il campione non puó essere interpretato al momento del test. In tale caso viene suggerito il test del campione con un altro metodo.

Interpretazione Risultato	RES = OD _{sample} /OD _{ST1}
Negativo	RES < 0,90
Positivo	RES ≥ 1,10
Dubbio	0,90 < RES < 0,90

9.2.1 Valori attesi

Nella tabella seguente sono rappresentati valori di densità ottica tipicamente ottenuti da campioni testati con ELVI021G:

Pazienti con COVID19				Individui sani			
No	OD450	No	OD450	No	OD450	No	OD450
1	0,626	11	0,595	1	0,078	11	0,148
2	0,363	12	2,139	2	0,148	12	0,124
3	0,369	13	1,948	3	0,088	13	0,069
4	3,967	14	2,004	4	0,094	14	0,083
5	2,731	15	0,462	5	0,104	15	0,126
6	1,948	16	0,234	6	0,131	16	0,093
7	0,551	17	1,079	7	0,094	17	0,088
8	1,309	18	3,721	8	0,074	18	0,068
9	0,494	19	0,903	9	0,113	19	0,121
10	1,776	20	3,130	10	0,130	20	0,186

10. LIMITAZIONI DEL TEST

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere basata sul risultato di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

11. PERFORMANCE DEL TEST

11.1. Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici.

Sono stati testati 60 campioni caratterizzati come pazienti COVID19. Di questi 58 sono risultati Anticorpi anti-S1 IgG positivi.

Sono stati inoltre testati 20 campioni di sangue da individui sani e nessuno di questi è risultato con Anticorpi anti-S1 IgG positivi.

La sensibilità diagnostica è risultata quindi **>96%**.

La specificità diagnostica è risultata quindi **>95%**.

11.2. Precisione

Intra-assay: 3 differenti livelli noti di controllo positivo sono stati diluiti in 20 replicati ognuno in **Tampone del campione 1X** come campioni da testare. Tutti i campioni sono stati testati nella stessa micropiastra per valutare la precisione Intra-assay del kit. La **precisione Intra-assay** è risultata avere un coefficiente di variazione inferiore al **5%**.

Inter-assay: 3 differenti livelli noti di controllo positivo sono stati diluiti in 10 replicati in **Tampone del campione 1X** come campioni da testare. Tutti i campioni sono stati testati in 3 saggi separati per valutare la precisione Inter-assay del kit. La **precisione Inter-assay** è risultata avere un coefficiente di variazione inferiore al **7%**.

Intra-assay	n	Media OD	CV (%)
Siero 1	20	0.56	4,73
Siero 2	20	1.24	4,51
Siero 3	20	1.35	4,68
Inter-assay	n	Media OD	CV (%)
Siero 1	10	0.32	5,66
Siero 2	10	0.54	6,75
Siero 3	10	1,23	6,16

11.3. Cross-reattività

7 campioni negativi a nCoV19 provenienti da pazienti con diagnosi positiva di Influenza A/B o RSV sono stati testati con ELVI021G. Non sono stati riscontrati risultati positivi a nCoV19. Eventuali cross-reattività con altri virus della famiglia dei coronavirus sono da escludersi dato l'uso della specifica proteina strutturale S1.

IMMUNOASSAY IN SOLID PHASE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgG ANTIBODIES AGAINST SPIKE S1 PROTEIN OF SARS-CoV-2 (NP) IN SERUM OR PLASMA

For professional in vitro diagnostic use only

1. INTENDED USE

Anti-nCoV19 S1 IgG HS is an enzyme solid phase immunoassay for the quantitative determination of IgG class antibodies directed against SARS-CoV-2 Spike protein S1 in serum or human plasma samples. The kit contains sufficient reagent for 96 reactions.

With this test it is possible to determine the state of immune protection.

2. SUMMARY

In December 2019, a new coronavirus, now officially called the SARS-CoV-2 coronavirus, was identified in Wuhan in China and was immediately linked to the onset of an associated acute respiratory disease called coronavirus 19 disease (COVID19). COVID-19 signs and symptoms may occur 2 to 14 days after infection, including fever, cough, shortness of breath or difficulty breathing, muscle pain and tiredness. In severe cases, the infection can lead to pneumonia, severe acute respiratory syndrome (SARS), kidney failure and death.

The nucleocapsid protein (NP) is the most abundant protein on the helical nucleocapsid of coronaviruses, it envelops the entire genomic RNA. NP also interacts with other viral structural proteins to play important roles when entering host cells and assembling and releasing viral particles. Anti-NP antibodies have been shown to be the first and are the predominant antibodies detectable in patient blood samples after coronavirus infection.

3. TEST PRINCIPLE

Anti-nCoV19 S1 IgG HS is based on the ELISA principle and is a two-phase immunoassay kit for incubation. The SARS-CoV-2 Spike S1 protein pre-coated on the microwell walls can specifically recognize anti-S1 IgG antibodies in human serum or plasma samples. After an incubation, the anti-S1 antibodies are captured by the immobilized S1 protein while the unbound components are washed away. Subsequently, a detection solution containing HRPO-conjugated anti-human IgG polyclonals is added for another incubation, in which the HRPO-conjugated anti-human IgG binds to the IgG class antibodies previously bound to the S1 protein on the plate. After the removal of non-specific bonds, a substrate solution containing 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) is added, resulting in the formation of a blue color. The color reaction is stopped by a solution of H₂SO₄, transforming the blue color into yellow, the intensity of this coloring is quantified by an absorbance microplate reader at a wavelength of 450 nm. The color intensity is proportional to the amount of anti-S1 IgG antibodies captured inside the wells. The quantification of the concentration is obtained by interpolating a calibration curve composed of known concentrations of monoclonal IgG anti-S1.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79 / EC the use of in vitro medical diagnostic is intended by the manufacturer to secure suitability,

ELVI021G Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Info: sales@immunospark.com







performance and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use must be strictly followed. The use of the kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in the purpose, in the project, in the composition or structure and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents that may be caused by these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of patient samples.

- For in vitro diagnostic use only.
- All the human components have been found non reactive for Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nevertheless, all materials should still be considered potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this kit.
- Do not use after the expiration date.
- Use only clean equipment.
- Do not interchange bottle caps.
- Close the bottles immediately after use to avoid evaporation and contamination.
- After first opening and subsequent storage check reagents for microbial contamination before use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense with much precision in the wells.

Anti-nCoV19 S1 IgG HS can only be used by qualified personnel who are thoroughly familiar with the technical work.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Provided materials

Color code	DESCRIPTION	Q.ty	Units	Symbol
	Microplate coated with S1 protein of SARS-CoV-2 recombinant: 12 strips breakable in 8 wells, inside an aluminium resealable bag.	1	Pcs	MT PLATE
 Azzurro	Conjugate anti-IgG (100X): 0,12 ml of aqueous solution of anti-human IgG antibodies directed against the sample IgG, conjugated to peroxidase.	1	Vial	CONJ
 Rosso	Calibrator: 2 ng of Human anti-S1 mAb lyophilized.	1	Vial	CAL
 Arancione	Reaction buffer (5X): 40 ml of buffer to dilute the samples, the calibrators and the controls.	1	Vial	DIL
 Celeste	Substrate. 12 ml of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB); ready to use.	1	Vial	SUBS TMB
 Bianco	Wash buffer (10X): 40 ml of concentrated buffer to wash the wells.	1	Vial	WASH BUF
 Grigio	Stop solution: 12 ml of sulphuric acid, 0.2 mol/l, ready to use.	1	Vial	SOLN
	Instructions for users (<i>MELVI021G</i>)	1	Pc	-

Positive control is available for sale separately (REF. ELVI021G-CTR).

Use **Tampone di reazione 1X** as negative control.

5.2. Tools and materials needed but not provided

- Photometer for microplates with 450/620 nm filters
- Incubator at 37 ° C
- Microplate washer
- Micropipettes with disposable tips (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Disposable test tubes
- Support for test tubes
- Deionized or distilled water.
- Timer.

5.3. Storage and stability of the Kit

The reagents should be stored between 2-8 ° C. Do not use reagents after the expiration date. The expiry date is printed on the label of each component and on the outer label of the package.

6. COLLECTION AND STORAGE OF SAMPLES

Serum or plasma samples can be analyzed with EDTA, sodium citrate or heparin. Highly lipemic, icteric or hemolytic specimens are not recommended. Samples with visible microbial contamination should not be used.

If necessary, use vortex on serum or plasma samples at room temperature to ensure homogeneity. Then centrifuge the samples at 10,000 to 15,000 rpm for 5 minutes before assaying to remove the particulate matter. Do not omit this centrifugation step if the samples are cloudy and contain particles.

6.1. Preparation (dilution) of the samples

The serum or plasma sample requires a dilution of 100X in **reaction buffer 1X** prepared as described below. A suggested dilution is to add 2 µl of sample to 198 µl of **reaction buffer 1X**.

7. TEST PROCEDURE

7.1. Reagents preparation

- *Bring all reagents to room temperature (20 ... 25 ° C) before use.*
- The microplate wells are separable. They contain recombinant Spike S1 SARS-CoV-2 protein attached to the inner walls. The wells, ready for use, must be stored between 2 ... 8 ° C. Place the unused wells in the pouch with the silica desiccant gel. The product is stable until the expiration date if stored between 2-8°C.
- The vial of **Conjugate anti-IgG (100X)** contains 0,12 ml of a concentrated solution of anti-human IgG antibodies conjugated to HRPO, stabilizers, preservatives. Vortex and centrifuge briefly the solution of **Conjugate anti-IgG (100X)** and dilute the desired quantity in a 1: 100 ratio with **reaction buffer 1X** prepared as described below. 100 µl of **Conjugate anti-IgG 1X** are needed for each well. Prepare only the strictly necessary quantity of **Conjugate anti-IgG 1X**. Bring **Conjugate anti-IgG (100X)** to 2-8°C immediately after removing the necessary volume.
- The vial of **reaction buffer (5X)** contains 20 ml of concentrated phosphate buffer, stabilizers, preservatives. The solution is diluted before the reaction and is used to dilute the samples and controls directly in the reaction well. Prepare 1X solution of reaction buffer by mixing (20 ml) of **reaction buffer 5x** with 80 ml of distilled water or deionized water. If precipitates are observed in the **reaction buffer** bottle, heat the bottle in a water bath at 37°C until the precipitates disappear. The 1X reaction buffer obtained can be stored at 2-8°C for a maximum of one month.
- Wash buffer: the vial of **wash buffer (10X)** contains 40 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. The content is diluted with deionized or distilled water. Prepare a 1X solution of washing buffer by mixing 40 ml of **wash buffer (10X)** with 360 ml of distilled water or deionized water. If precipitates are observed in the **wash**

- **buffer (10X)**, heat the bottle in a water bath at 37°C until the precipitates disappear. The **1X wash buffer** obtained can be stored at 2-8°C for a maximum of one month.
- The vial of **substrate** contains 12 ml of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and ready-to-use hydrogen peroxide. Store in the dark. The solution is colorless or light blue. If it turns blue, it means it is contaminated and can no longer be used. Once opened, the product is stable until the expiration date if stored between 2-8 ° C.
- The vial of the **STOP solution** contains 12 ml of sulphuric acid, 2M (R36/38, S26), ready to use. *Once open, the product is stable until the expiration date if stored between 2-8 ° C.*
- **Calibrator**: reconstitute the lyophilized calibrator bottle with 450 µl of **reaction buffer 1X**, to generate the first point of the calibration curve (10 ng / ml). Prepare serial dilutions of the first point as described below:

Calibration curve point	Calibrator volume	Reaction buffer 1X volume	Concentration
5	10,00 ng/ml	-	10,000 ng/ml
4	225 µl of 10,00 ng/ml	225 µl	5,000 ng/ml
3	225 µl of 5,00 ng/ml	225 µl	2,500 ng/ml
2	225 µl of 2,50 ng/ml	225 µl	1,250 ng/ml
1	225 µl of 1,25 ng/ml	225 µl	0,625 ng/ml

Reaction buffer 1X will be used as blank (0 ng/ml).

Note: the reconstituted calibrator must be aliquoted and stored at -20°C for a maximum period of one month. Avoid repeated freeze / thaw cycles.

7.2. Procedure note

It is recommended to pipette all samples and controls within the maximum time of 3 minutes.

7.3. Test procedure

Read the instructions carefully before starting the dosage. To obtain valid results it is essential to follow the instructions exactly. The following procedure has been validated for manual execution. For an execution on automatic instrumentation it is recommended to increase the number of washes by 3 to 5 times and to properly evaluate the volume of the solution to be used to wash a sufficiently large surface of the walls of the well and thus avoid interference. First establish the distribution and identification plan of the samples and controls on a worksheet. Insert the required wells into the microplate holder

It is recommended to perform each analysis in duplicate.

Perform the test in the order established by the instructions, without pauses.

Use new, clean tips for each sample and control.

1. Pipette **100 µl** of calibrators, controls and samples to be tested in the relative wells. Use **100 µl** of **reaction buffer 1X** as blank.
2. Cover the wells with adhesive film.

- 3. Incubate 1 hour at room temperature under stirring at 600 RPM (if the agitator is not available, extend the incubation to 2 hours in total).**
- 4.** At the end of the incubation, remove the film and aspirate the liquid from the wells. Then wash the wells 4 times with **300 µl** of wash buffer. Prevent the solution from overflowing from the wells. The interval between washing and suction must be at least 5 sec. After washing, gently tap the wells with the opening downwards on an absorbent paper to completely remove the liquid.
Warning: Washing is a critical phase. An inaccurate washing determines poor test accuracy and a distorted increase in optical densities.
- 5.** Pipette **100µl** of **Conjugate anti-IgG 1X** in all the wells. Cover the wells with adhesive film.
- 6. Incubate 1 hour at room temperature.**
- 7.** Repeat the step 4.
- 8.** Pipette **100µl** of **Substrate** in all the wells.
- 9. Incubate exactly for 15 min at RT (20°...25°C) in the dark.**
- 10.** Pipette **100µl** of **Stop solution** in all the wells, in the same order as the TMB solution.
During incubation the color changes from blue to yellow.
Warning: Samples with a very high positive result can cause precipitates dark chromogen! These precipitates influence the reading of the optical densities. It's recommended to dilute the samples one more time as described in 7.1 and to repeat the test.

Measure the absorbance of all the wells at 450/620 nm immediately after adding the stop solution.

For measurement, adjust the microplate photometer (ELISA-Reader) to zero using the blank substrate **in A1**. If, for technical reasons, it is not possible to adjust the photometer, subtract the absorbance of the white substrate from all the values of the other absorbances.

8. QUALITY CONTROL

We recommend that you use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is recommended to ensure the validity of the results day by day.

The test must be performed exactly according to the manufacturer's instructions for use. In addition, the user must strictly adhere to the rules of the GLP (Good Laboratory Practice) or other federal, state and local rules and / or laws. This is particularly relevant for the use of control reagents. It is important to always include enough checks in the test procedure to validate the accuracy and precision of the test.

Each microplate must be considered separately in the calculation and interpretation of the assay results, regardless of the number of plates processed simultaneously. The results are calculated by relating the absorbance value of each sample to the value of Cut-off.

9. RESULTS ANALISYS

9.1. Assay validation

The test is valid if the result meets the following criteria:

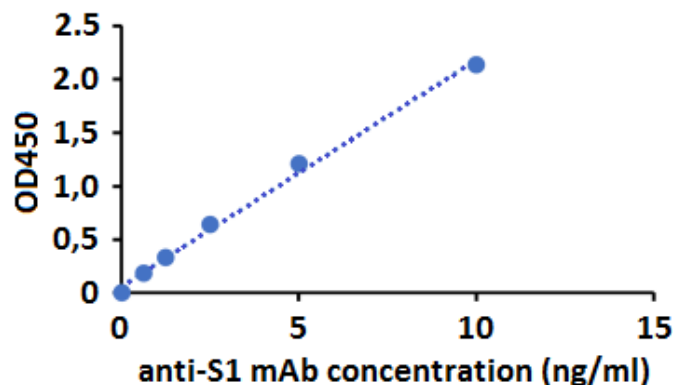
- The absorbance value of the blank well must be $<0,100$ to 450 nm.
- The absorbance value of the negative control must be $<0,200$ to 450 nm.

If at least one of these two conditions is not satisfied, the test is not valid and must be repeated.

9.1.1. Calibration curve

1. Subtract the absorbance value of the blank from the values obtained for calibrators, controls and samples.
2. Generate a calibration curve with the absorbance values obtained on the Y axis against the values of the concentrations of the calibrators on the X axis. The curve with the best FIT can be generated with a linear regression system such as a linear log or a 4 parameters.
3. determine the concentration of anti-S1 IgG antibody of the samples using the generated curve; if the sample has been prediluted, multiply the result by the dilution factor.

Here is an example of a typical calibration curve (Attention: this representation should not be used as an evaluation criterion for measurements in practice!!).



9.2. Calculation and interpretation of the results

This is a quantitative assay that returns the titer value of anti-S1 IgG antibodies. The value of this title must be considered within the clinical framework in order to be definitively considered as a positive or negative. But in principle, the following considerations on positivity can be made and the specific antibody titer values can subsequently be considered:

The test result is **NEGATIVE** when the ratio between the absorbance of the sample and the absorbance value of the first calibration point is less than 0,9. A negative result indicates the absence of antibodies IgG anti - SARS-CoV-2 NP.

The test result is **POSITIVE** when the ratio between the absorbance of the sample and the absorbance value of the first calibration point is greater than or equal to 1,1. A positive result indicates the presence of antibodies IgG anti - SARS-CoV-2 NP.

ELVI021G Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Info: sales@immunospark.com

The test result is **SUSPICIOUS** when the ratio between the absorbance of the sample and the absorbance value of the first calibration point has a value between 0,9 and 1,1. The sample cannot be interpreted at the time of the test. In this case, testing the sample with another method is suggested.

Interpretation	RES = OD _{sample} /OD _{ST1}
Negative	RES < 0,90
Positive	RES ≥ 1,10
Suspicious	0,90 < RES < 0,90

9.2.1 Attended values

The following table shows the optical density values typically obtained from samples tested with ELVI021G:

Patients with confirmed COVID19				Healthy patients			
No	OD450	No	OD450	No	OD450	No	OD450
1	0,626	11	0,595	1	0,078	11	0,148
2	0,363	12	2,139	2	0,148	12	0,124
3	0,369	13	1,948	3	0,088	13	0,069
4	3,967	14	2,004	4	0,094	14	0,083
5	2,731	15	0,462	5	0,104	15	0,126
6	1,948	16	0,234	6	0,131	16	0,093
7	0,551	17	1,079	7	0,094	17	0,088
8	1,309	18	3,721	8	0,074	18	0,068
9	0,494	19	0,903	9	0,113	19	0,121
10	1,776	20	3,130	10	0,130	20	0,186

10. LIMITATIONS OF THE TEST

Contamination by microorganisms or repeated freeze-thaw cycles can alter the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be based on a single test result. It is also important to consider the patient's medical history and symptoms. Test results from immunosuppressed patients and infants have limited value.

11. PERFORMANCE OF THE TEST

11.1. Diagnostic sensitivity and specificity

Diagnostic sensitivity is the probability of the test to provide a positive result in the presence of specific antibodies.

60 samples characterized as patients were tested COVID19. 58 of these were positives to anti-S1 IgG.

ELVI021G Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Info: sales@immunospark.com

Other than this 20 cablood samples from healthy individuals and none of these resulted with Antibodies anti-S1 IgG.

Diagnostic sensitivity >96%.

Diagnostic specificity >95%.

11.2. Precision

Intra-assay: 3 different known positive control levels were diluted in 20 replicates each in **sample buffer 1X** as samples to be tested. All specimens were tested in the same microplate to evaluate the kit's intra-assay precision. **Precisione Intra-assay** was found to have a CV lower than 5%.

Inter-assay: 3 different known positive control levels were diluted in 10 replicates in **sample buffer 1X** as samples to be tested. All specimens were tested in 3 separate assays to evaluate accuracy Inter-assay. **Precision Inter-assay** was found to have a CV lower than 7%.

Intra-assay	n	Average OD	CV (%)
Serum 1	20	0.56	4,73
Serum 2	20	1.24	4,51
Serum 3	20	1.35	4,68
Inter-assay	n	AverageOD	CV (%)
Serum 1	10	0.32	5,66
Serum 2	10	0.54	6,75
Serum 3	10	1,23	6,16

11.3. Cross-reactivity





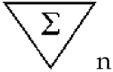







7 negative samples to nCoV19 from patients with a positive influenza diagnosis A/B o RSV were tested with ELVI021G. None was found positive to nCoV19.

Any cross-reactivity with other viruses of the coronavirus family are to be excluded given the use of the specific structural protein S1.

12. BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. World Health Organization (WHO), WHO Statement Regarding Cluster of Pneumonia Cases in Wuhan, China, Beijing: WHO; 9 Jan 2020.
2. World Health Organization (WHO), Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), WHO; 28 Feb 2020.
3. Fan Y, Zhao K, Shi ZL, Zhou P (March 2019). "Bat Coronaviruses in China". *Viruses*. 11 (3): 210. doi:10.3390/v11030210. PMC 6466186. PMID 30832341.
4. De Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, Perlman S, Poon L, Rottier PJ, Talbot PJ, Woo PC, Ziebuhr J (2011). "Family *Coronaviridae*". In King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB, International Committee on Taxonomy of Viruses, International Union of Microbiological Societies. Virology Division (eds.). *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier. pp. 806–28. ISBN 978-0-12-384684-6.
5. Kahn, Jeffrey; McIntosh, Kenneth (November 2005), "*History and recent advances in coronavirus discovery*", *Pediatric Infectious Disease Journal*, 24 (11): s223–s227, doi:10.1097/01.inf.0000188166.17324.60, archived from the original on 2020-02-05. World Health Organization (28 January 2020). "Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected".

13. SIMBOLI/SYMBOLS

	Manufacturer Fabbricante		For in vitro diagnostic use only Per solo uso diagnostico in vitro
	Authorized representative Rappresentante autorizzato		Consult instructions for use Leggere le istruzioni per uso
	Contains sufficient for <n> tests Contiene material per <n> test		Keep dry Mantenere all'asciutto
	Catalogue code Codice di catalogo		Temperature limitations Limiti di temperatura
	Lot number Numero del lotto		Use by Utilizzare entro il
	Compliant to 98/79/EC directive Rispetta la direttiva 98/79/EC		Use only once Usare solo una volta

ELVI021G Anti-nCoV19 S1 IgG HS

Info: sales@immunospark.com

HEADQUARTER: Via lucrino 35 – 00199 – Rome – Italy
phone + 39 06 86324830 - Fax + 39 06 97252287 e-mail: sales@immunospark.com

R&D and MANUFACTURING: Via del mare 187,
00071 - Pomezia – Rome – Italy; e-mail: prod.pomezia@immunospark.com

www.immunospark.com