

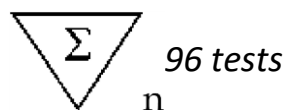


SARS-CoV-2 (NP) Ag HS

Test immunoenzimatico quantitativo ad alta sensibilità per la rilevazione di antigeni di proteina nucleocapside (NP) di SARS-CoV-2 in campioni di siero o plasma.

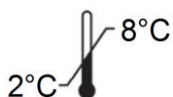
Enzyme high sensitivity immunoassay for the quantitative determination of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) antigens in human serum or plasma.

ELISA



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

REF ELVI021AG



MELVI021AG

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	8
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	10
11. PERFORMANCE OF THE TEST	18
12. BIBLIOGRAFIA/REFERENCES	11
13. SIMBOLI/SYMBOLS	11

IMMUNOSAGGIO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA AD ALTA SENSIBILITÀ DI ANTIGENI DI PROTEINA NUCLEOCAPSIDE (NP) DEL SARS-CoV-2 IN SIERO O PLASMA

Solo per uso professionale diagnostico in vitro

1. DESTINAZIONE D'USO

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS é un immunosaggio enzimatico in fase solida per la determinazione quantitativa di antigeni di *nucleocapsid protein (NP)* di SARS-CoV-2 in campioni di siero o plasma umano. Il kit contiene reagenti sufficienti per 96 reazioni.

2. INTRODUZIONE

Nel dicembre 2019, un nuovo coronavirus, ora ufficialmente chiamato coronavirus SARS-CoV-2, è stato identificato a Wuhan in Cina ed é 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

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS si basa sul principio ELISA ed è un kit immunodosaggio per incubazione in due fasi. Le pareti dei micropozzetti sono rivestite di anticorpi monoclonali human anti-NP, questi anticorpi possono riconoscere la NP potenzialmente presente nei campioni di siero o plasma umani. Il campione viene dispensato nei pozzetti e dopo un'incubazione, gli antigeni di NP potenzialmente presenti nel campione vengono catturati dagli anticorpi anti-proteina NP immobilizzati sulla plastica mentre i componenti non legati vengono lavati via nella successiva fase di lavaggio. Successivamente, una soluzione di rilevazione contenente immunoglobuline monoclonali anti-SARS-CoV-2NP coniugate con HRPO. Il test viene sottoposto ad una altra incubazione. Una successiva fase di lavaggio provvede ad allontanare tutto ciò che non si é legato all'immunocomplesso presente sulla parete del pozzetto. Viene quindi 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 2M 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-NP catturati all'interno dei pozzetti.

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.

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS può essere impiegato solo da parte di personale specializzato e debitamente abilitato 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 anticorpo monoclonale Anti-SARS-CoV-2 NP: 12 strip divisibili in 8 pozzetti, sigillate in una busta d'alluminio richiudibile.	1	Pcs	MT PLATE
● Nero	Coniugato antiNP-HRPO (100X): 0,12 ml di soluzione acquosa di anticorpi anti-SARS-CoV-2 NP coniugati con Perossidasi di rafano.	1	Vial	CONJ
● Rosso	Calibratore: 2 ng di Proteina ricombinante nucleocapside di SARS-CoV-2 in una base proteica tamponata. <i>Liofilizzato.</i>	1	Vial	CAL
● Arancione	Tampone di reazione: 30 ml di tampone per diluire i campioni 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.	1	Vial	SOLN
	Istruzioni per uso (<i>MELVIO21AG</i>)	1	Pz	-

Separatamente é disponibile alla vendita il controllo positivo (*REF. ELVIO21AG-CTR*) per validare il saggio.

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 stabilità 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 non richiede pre-diluizione. Ma qualora si rendesse necessario, questo può essere diluito nel **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 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 antiNP-HRPO (100X)** contiene 0,12 ml di una soluzione concentrata di anticorpi anti-NP coniugati a HRPO, stabilizzanti, conservanti. Vortexare e centrifugare brevemente la soluzione di **antiNP-HRPO (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 antiNP-HRPO 1X** per pozzetto. Preparare solo la quantità strettamente necessaria di **Coniugato antiNP-HRPO 1X**. Riportare a 2-8°C la soluzione di **Coniugato antiNP-HRPO (100X)** immediatamente dopo aver rimosso il volume necessario.
- **Calibratore**: ricostituire il calibratore liofilizzato con 1 ml di **Tampone di reazione 1X** per ottenere il primo punto della curva con concentrazione 2000 pg/ml. Lasciare il ricostituito riposare per 10 minuti e agitare lievemente prima di effettuare le diluizioni seriali. Utilizzando **Tampone di reazione 1X** realizzare le seguenti diluizioni seriali:

Volume del calibratore	Volume di Tampone di reazione 1X	Concentrazione	Punto di calibrazione
2000 pg/ml	-	2000,00 pg/ml	7
250 µl of 2000,00 pg/ml	250 µl	1000,00 pg/ml	6
250 µl of 1000,00 pg/ml	250 µl	500,00 pg/ml	5
250 µl of 500,00 pg/ml	250 µl	250,00 pg/ml	4
250 µl of 250,00 pg/ml	250 µl	125,00 pg/ml	3
250 µl of 125,00 pg/ml	250 µl	62,50 pg/ml	2
250 µl of 62,50 pg/ml	250 µl	31,25 pg/ml	1

Il Tampone di reazione 1X viene utilizzato come Standard 0 (0 ng/ml).

É possibile conservare gli standard ricostituiti a -20°C fino ad un mese. Eventuali cicli di congelamento/scongelo sono da evitarsi.

- Il flacone del **tampone di lavaggio (10X)** contiene 40 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua 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 é incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che é contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto é 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 é stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

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 é 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.

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

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo in caso di applicazione manuale. Se viene utilizzato un processore automatico riferirsi al manuale della strumentazione per quanto riguarda misure contro la contaminazione e la crossreazione tra campioni.

1. Pipettare **100 µl** di calibratori e di campioni da testare.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora a temperatura ambiente.**
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 è 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 antiNP-HRPO 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 entro 10 min dopo l'aggiunta della soluzione stop. Laddove permesso dalle funzionalità dello strumento di lettura usare anche il contributo della assorbanza letta a 405 nm per aumentare la linearità della misurazione.

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 è 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.

È 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 replicato, 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

È possibile validare il test utilizzando un controllo positivo fornito separatamente da Immunospark con il codice *ELVIO21AG-CTR*.

9.2. Calcolo dei risultati

Calcolare la media dei risultati dei replicati (se effettuati) per punti di calibrazione, controlli eventuali e campioni.

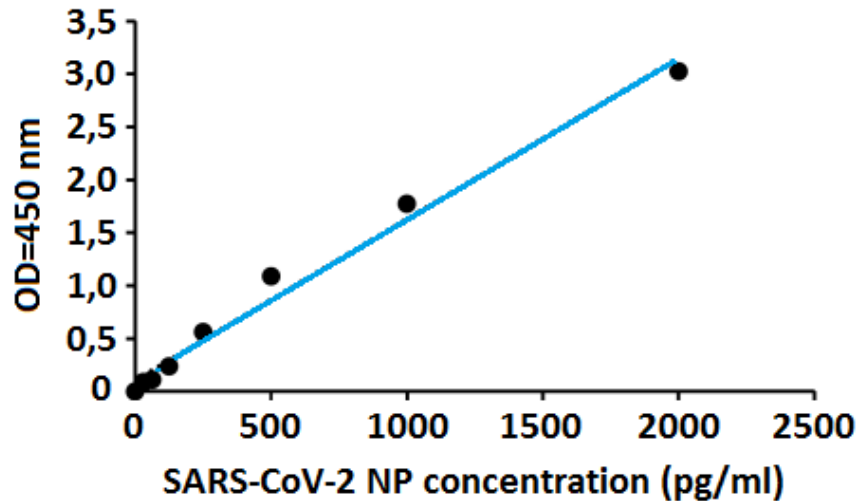
Costruire una curva di calibrazione riportando le assorbanze medie per ogni punto di calibrazione sull'asse delle Y in corrispondenza delle concentrazioni dei rispettivi standard. Si suggerisce di tracciare la curva usando un algoritmo 4 parametri logistico (4PL) per ottenere il miglior fitting.

9.3 Valori attesi

Nella tabella seguente sono rappresentati valori di densità ottica tipicamente ottenuti da campioni testati con ELVIO21AG:

Campioni	OD450	Concentrazione Misurata di NP (pg/ml)	Concentrazione effettiva di NP (pg/ml)
Siero indiluito di soggetto sano	0.112	-	-
Siero diluito 1:10 di soggetto sano	0.126	-	-
Siero diluito 1:10 con 2000 pg/ml di NP	2.974	1831	1831
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°1	0.732	418.267	1673.067
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°2	0.478	248.933	995.733
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°3	0.432	218.267	873.067
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°4	0.694	392.933	1571.733
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°5	0.513	272.267	1089.067

Segue un esempio di curva tipica risultante dall'esecuzione del saggio:



Attenzione: questa rappresentazione non deve essere usata come criterio di valutazione per le misurazioni nella pratica!!

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 analitica

La minima dose rilevabile (**LOD**) di Nucleoproteina di SARS-CoV-2 è stata determinata aggiungendo 3 deviazioni standard alla media delle densità ottiche di 20 replicati dello standard ZERO e calcolando le corrispondenti concentrazioni.

Il valore riscontrato di **LOD** è stato inferiore a **5 pg/ml**.

11.2 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di antigeni. La sensibilità diagnostica è risultata **>95%**.

11.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di antigeni. La specificità diagnostica è **>93%**.

11.3. Precisione

Per calcolare la precisione **Intra-assay** 3 sieri positivi sono stati testati nella stessa sezione replicando ognuno 20 volte. Il saggio há riprodotto i risultati in maniera soddisfacente attestandosi su un CV del **5%**.

Per calcolare la precisione **Inter-assay** 3 sieri positivi sono stati testati in sedute indipendenti replicando 10 volte ognuno. Il saggio há ripetuto i risultati in maniera soddisfacente attestandosi su un CV del **6%**.

11.4. Cross-reattività

7 campioni negativi a nCoV19 provenienti da pazienti con diagnosi positiva di Influenza A/B o RSV sono stati testati con ELVI021AG. Non sono stati riscontrati risultati positivi a nCoV19.

11.5 Spiking e recovery

Differenti concentrazioni di SARS-CoV2 NP sono state spillate nei campioni descritti qui di seguito. I recovery medi sono risultati:

Tipo campione	Media % di recovery	Range %
Siero	91,50	80,00-103,00
Plasma	92,00	83,00-106,00
Mezzo di coltura cellulare	85,40	80,00-90,80

11.6 Calibrazione

Il saggio é calibrato contro una Nucleoproteina SARS-CoV2 ricombinante altamente purificata prodotta in condizioni di estrema qualità.

IMMUNOASSAY FOR THE HIGH SENSITIVITY QUANTITATIVE DETERMINATION OF PROTEIN NUCLEOCAPSID (NP) ANTIGENS OF SARS-CoV-2 IN SERUM OR PLASMA

For in vitro diagnostic professional use only

1. INTENDED USE

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS is a solid phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) antigens in human serum or plasma samples. The kit contains sufficient reagents for 96 reactions.

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. PRINCIPLE OF THE TEST

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS is based on the ELISA principle and is a two-phase immunoassay kit for incubation. The walls of the microwells are coated with human anti-NP monoclonal antibodies, these antibodies can recognize the NP potentially present in human serum or plasma samples. The sample is dispensed into the wells and after an incubation, the NP antigens potentially present in the sample are captured by the anti-protein NP antibodies immobilized on the plastic while the unbound components are washed off in the subsequent washing phase. Next, a detection solution containing HRPO-conjugated anti-SARS-CoV-2NP monoclonal immunoglobulins. The test is subjected to another incubation. A subsequent washing phase removes everything that is not linked to the immunocomplex present on the well wall. A substrate solution containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) is then added, resulting in the formation of a blue color. The color reaction is stopped by a 2M 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 intensity of the color is proportional to the amount of anti-NP IgG antibodies captured within the wells.

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, 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

ELVI021AG SARS-nCoV2 (NP) Ag HS

Info: sales@immunospark.com

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.

SARS-CoV-2 (NP) Ag HS can only be used by qualified personnel who are thoroughly familiar with the technical work.

5. COMPONENTS OF THE KIT

5.1. Provided materials

Color code	DESCRIPTION	Q.ty	Units	Symbol
-	Microplate coated with monoclonal Anti-SARS-CoV-2 NP: 12 strips breakable in 8 wells, sealed in aluminium foil bag.	1	Pcs	MT PLATE
● Nero	Conjugate antiNP-HRPO (100X) : 0,12 ml of aqueous solution of antibodies anti-SARS-CoV-2 NP conjugated with HRPO.	1	Vial	CONJ
● Rosso	Calibrator : 2 ng of NP recombinant of SARS-CoV-2 in a buffered base. <i>Lyophilized</i> .	1	Vial	CAL
● Arancione	Reaction buffer : 30 ml of buffer to dilute samples and 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>MELVIO21AG</i>)	1	Pz	-

Positive control is available for sale separately (*REF. ELVIO21AG-CTR*).

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. SAMPLES COLLECTION AND STORAGE

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

It is not needed to predilute the sample. But if necessary, this can be diluted in **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 SARS-CoV-2 protein adhered to the internal 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 antiNP-HRPO (100X)** contained 0,12 ml of a concentrated solution of antibodies anti-NP conjugated to HRPO, stabilizers, preservatives. Vortex and centrifuge briefly the solution of **antiNP-HRPO (100X)** and dilute the needed quantity in 1:100 rate with **reaction buffer 1X**. 100 µl of **Conjugate antiNP-HRPO 1X** for each well. Prepare only the needed quantity of **Conjugate antiNP-HRPO 1X**. Bring again to 2-8°C the solution of **Conjugate antiNP-HRPO (100X)** immediately after having used the needed quantity.
- **Calibrator**: reconstitute the lyophilized calibrator with 1 ml of **reaction buffer 1X** reconstitute the to obtain the last point of the curve with concentration with 2000 pg/ml. Leave the reconstituted to stand for 10 minutes and shake gently before making the serial dilutions. Using **reaction buffer 1X** perform the following serial dilutions:

Calibrator volume	Reaction buffer 1X volume	Concentration	Calibration point
2000 pg/ml	-	2000,00 pg/ml	7
250 µl of 2000,00 pg/ml	250 µl	1000,00 pg/ml	6
250 µl of 1000,00 pg/ml	250 µl	500,00 pg/ml	5
250 µl of 500,00 pg/ml	250 µl	250,00 pg/ml	4
250 µl of 250,00 pg/ml	250 µl	125,00 pg/ml	3
250 µl of 125,00 pg/ml	250 µl	62,50 pg/ml	2
250 µl of 62,50 pg/ml	250 µl	31,25 pg/ml	1

Reaction buffer 1X is used as Standard 0 (0 ng/ml).

Reconstituted standards can be stored at -20 ° C for up to one month. Any freeze / thaw cycles are to be avoided.

- 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 solution 1X of wash buffer mixing 40 ml of **wash buffer (10X)** with 360 ml of distilled water or deionized water. If precipitates are observed in the bottle of **wash buffer (10X)**, heat the bottle in water to 37 ° C until the precipitates disappear. The diluted wash buffer can be stored at 2-8 ° C for up to 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 **STOP solution** contains 12 ml of sulphuric acid, 2M (R36/38, S26), ready to use. Once opened, the product is stable until the expiration date if stored between 2-8 ° C.

7.2. Procedure note

It is recommended to pipette all samples and controls within a 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.

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

Use new, clean tips for each sample and check for manual application. If an automatic processor is used, refer to the instrumentation manual for measures against contamination and cross-reaction between samples.

1. Pipette **100 µl** of calibrators and samples to be tested.
2. Cover the wells with adhesive film.
3. **Incubate 1 hour at room temperature.**
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 one

poor test accuracy and a distorted increase in optical densities.

5. Pipette **100µl** of **Conjugate antiNP-HRPO 1X** in each well. Cover the wells with adhesive film.
6. **Incubate 1 hour at room temperature.**
7. Repeat the step 4.
8. Pipette **100µl** of **Substrate** in each well.
9. **Incubate exactly for 15 min at room temperature (20°...25°C) in the dark.**
10. Pipette **100µl** of **Stop solution** in each well, 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. IS recommended to dilute the samples one more time as described in 7.1 and to repeat the test.*

For measurement, adjust the photometer for the microplates **to zero** using the substrate-blankco (blank) **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.*

Measure the absorbance of all the wells at **450 nm** and enter all the measured values in the worksheet. Where permitted by the functionality of the reading instrument, also use the contribution of the absorbance read at **405 nm** to increase the linearity of the measurement. It is recommended to make a measurement of the dual wavelength optical densities using **620 nm** as the reference length.

Where they were measured in replicate, calculate the average of the 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 Cut-off value.

9. RESULTS CALCULATION

9.1. Test validation

The test can be validated using a positive control supplied separately from Immunospark with REF *ELVI021AG-CTR*.

9.2. Results calculation

Calculate the average of the results of the replicates (if carried out) for calibration points, possible checks and samples.

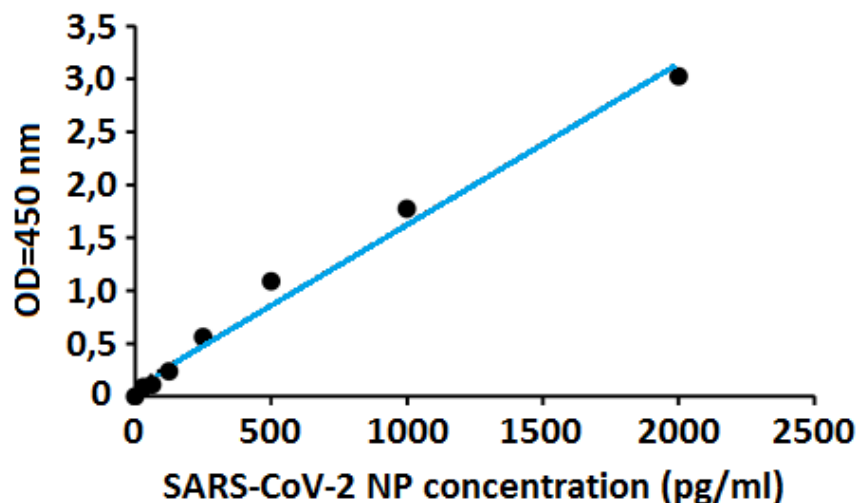
Build a calibration curve by reporting the average absorbances for each calibration point on the Y axis at the concentrations of the respective standards. It is suggested to trace the curve using a 4-parameter logistic algorithm (4PL) to obtain the best fitting.

9.3 Attended values

The following table shows the optical density values typically obtained from samples tested with ELVI021AG:

Samples	OD450	Concrtations measured of NP (pg/ml)	Concrtations actual of NP (pg/ml)
Siero indiluito di soggetto sano	0.112	-	-
Siero diluito 1:10 di soggetto sano	0.126	-	-
Siero diluito 1:10 con 2000 pg/ml di NP	2.974	1831	1831
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°1	0.732	418.267	1673.067
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°2	0.478	248.933	995.733
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°3	0.432	218.267	873.067
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°4	0.694	392.933	1571.733
Siero diluito 1:4 con COVID19 severa n°5	0.513	272.267	1089.067

Below is an example of a typical curve resulting from the test:



Warning: this representation should not be used as an evaluation criterion for measurements in practice!!

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

11.2 Analytical sensitivity

The limit of detection (LOD) of Nucleoprotein of SARS-CoV-2 was determined by adding 3 standard deviations to the average of the optical densities of 20 replicates of the ZERO standard and calculating the corresponding concentrations.

The found value of LOD has been lower than **5 pg/ml**.

11.2 Diagnostic sensitivity

Diagnostic sensitivity is the probability of the test to provide a positive result in the presence of antigens. Diagnostic sensitivity was found **>95%**.

11.2. Diagnostic specificity

Diagnostic specificity is the probability of the test to provide a negative result in the absence of antigens. The diagnostic specificity is **>93%**.

11.3. Accuracy

To calculate accuracy **Intra-assay** 3 positive sera were tested in the same section by replicating each 20 times. The test reproduced the results in a satisfactory way, attesting to the CV of the **5%**.

To calculate accuracy **Inter-assay** 3 positive sera were tested in independent sessions replicating 10 times each. The test repeated the results in satisfactory maneira, settling on the CV of the **6%**.

11.4. Cross-reactivity

7 nCoV19 negative samples from patients with a positive diagnosis of Influenza A / B or RSV were tested with ELVI021AG. No positive results for nCoV19 were found.

11.5 Spiking e recovery

Different concentrations of SARS-CoV2 NP were tapped into the samples described below. Average recoveries have turned out:

Sample type	Average % recovery	Range %
Serum	91,50	80,00-103,00
Plasma	92,00	83,00-106,00
Cel culture medium	85,40	80,00-90,80





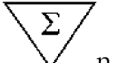







11.6 Calibration

The assay is calibrated against a highly purified recombinant SARS-CoV2 Nucleoprotein produced under conditions of extreme quality.

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.
6. 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 temperature
	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

ELVI021AG SARS-nCoV2 (NP) Ag 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