

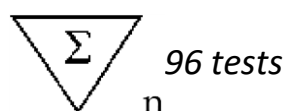


Anti-nCoV19 IgM

Test immunoenzimatico qualitativo per la rilevazione di anticorpi IgM contro SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) in campioni di siero o plasma.

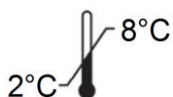
Enzyme immunoassay for the qualitative determination of human anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) ELISA (IgM class antibodies) in human serum or plasma.

ELISA



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

REF ELVI021M



MELVI021M

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 QUALITATIVA DI ANTICORPI IgM CONTRO LA PROTEINA NUCLEOCAPSIDE DEL SARS-CoV-2 (NP) IN SIERO O PLASMA

Solo per uso diagnostico in vitro

1. DESTINAZIONE D'USO

Anti-nCoV19 IgM é un immunosaggio enzimatico in fase solida per la determinazione qualitativa di anticorpi di classe IgM diretti contro SARS-CoV-2 *nucleocapsid protein (NP)* in campioni di siero o plasma umano. Il kit contiene reagent sufficient per 96 reazioni.

Con questo test é 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 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

Anti-nCoV19 IgM si basa sul principio ELISA ed è un kit immunodosaggio per incubazione in due fasi. La proteina nucleocapside ricombinante (NP) di SARS-CoV-2 pre-rivestita sulle pareti dei micropozzetti può riconoscere specificamente gli anticorpi anti-NP nei campioni di siero o plasma umani. Dopo un'incubazione di 1 ora, gli anticorpi anti-NP vengono catturati dalla proteina NP immobilizzata mentre i componenti non legati vengono lavati via. Successivamente, una soluzione di rilevazione contenente anti-human IgM coniugate con HRPO viene aggiunta per un'altra incubazione di 1 ora, in cui le anti-human IgM coniugate con HRPO si legano agli anticorpi di classe IgM precedentemente legati alla proteina NP 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 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 IgM 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.

Anti-nCoV19 IgM 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 NP di SARS-CoV-2 ricombinante: 12 strip divisibili in 8 pozzetti, dentro una busta d'alluminio richiudibile.	1	Pcs	MT PLATE
● Nero	Coniugato anti-IgM (100X) : 0,12 ml di soluzione acquosa di anticorpi anti-human IgM diretti contro le IgM del campione, coniugati a perossidasi.	1	Vial	CONJ
● Celeste	Tampone di reazione (5X) : 20 ml di tampone per diluire i campioni e i controlli.	1	Vial	DIL
● Giallo	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
● Rosso	Soluzione stop : 12 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.	1	Vial	SOLN
	Istruzioni per uso (<i>MELVI021M</i>)	1	Pz	-

Separatamente é disponibile alla vendita il controllo positivo e il controllo negativo (REF. ELVI021M-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 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 richiede una diluizione di 100X nel **tampone di reazione 1X** preparato secondo quanto qui di seguito descritto. Una diluizione suggerita è quella di aggiungere 10 µl di campione a 990 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 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-IgM (100X)** contiene 0,12 ml di una soluzione concentrata di anticorpi anti-human IgM coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti.
Vortexare e centrifugare brevemente la soluzione di **Coniugato anti-IgM (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-IgM 1X** per pozzetto. Preparare solo la quantità strettamente necessaria di **Coniugato anti-IgM 1X**. Riportare a 2-8°C la soluzione di **Coniugato anti-IgM (100X)** immediatamente dopo aver rimosso il volume necessario.
- Il flacone del **tampone di reazione (5X)** contiene 30 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 (30 ml) di tampone di reazione 5x con 120 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.*
- 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 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.*

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 raccomandabile utilizzare almeno:

- 2 pozzetti (p.e. A1) per il bianco-reagente e i campioni.
- 3 pozzetti (p.e. B1, C1, etc) per il controllo negativo.
- 2 pozzetti (p.e. B2, C2, etc) per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

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

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

1. Pipettare **50 µl** di controllo negativo, **100 µl** di campioni da testare e **100 µl** di **tampone di reazione 1X** nei relativi pozzetti. Usare il **50 µl** come bianco-reagente.
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 anti-IgM 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.

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 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 Practices) 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.

9.2. Calcolo dei risultati

Il risultato del test è **NEGATIVO** quando il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di cut-off è minore di 0,9. Un risultato negativo indica la assenza di anticorpi IgM anti - SARS-CoV-2 NP.

Il risultato del test è **POSITIVO** quando il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di cut-off è maggiore o uguale a 1,1. Un risultato positivo indica la presenza di anticorpi IgM anti - SARS-CoV-2 NP.

Il risultato del test è considerato **DUBBIO** quanto il rapporto tra la assorbanza del campione e il valore di cut-off ha valore compreso tra 0,9 e 1,1. Il campione non può essere interpretato al momento del test. In tale caso viene suggerito il test del campione con un altro metodo.

Interpretazione Risultato	RES = $OD_{\text{sample}}/OD_{\text{Cut-off}}$
Negativo	RES < 0,90
Positivo	RES \geq 1,10
Dubbio	0,90 < RES < 1,10
$OD_{\text{Cut-off}} = 0,20$	

9.2.1 Valori attesi

Nella tabella seguente sono rappresentati valori di densità ottica tipicamente ottenuti da campioni testati con ELVI021M:

Campioni	OD450
Controllo negativo	0.113
	0.098
	0.121
	0.117
Sieri da soggetti sani	0.127
	0.154
	0.097
Sieri da pazienti con COVID-19 confermata	1.052
	0.38
	0.242

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 diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è **>93%**.

11.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é >93%.

11.3. Precisione

Intra-assay	n	Media	Cv (%)
Siero 1	20	0.51	3,85
Siero 2	20	1.15	5,99
Siero 3	20	1.27	5,01
Inter-assay	n	Media	Cv (%)
Siero 1	10	0.18	4,88
Siero 2	10	0.45	6,26
Siero 3	10	1,18	4,95

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 ELVI021M. Non sono stati riscontrati risultati positivi a nCoV19.

SOLID PHASE IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF IgM ANTIBODIES AGAINST THE SARS-CoV-2 NUCLEOCAPSIDE PROTEIN (NP) IN HUMAN SERUM OR PLASMA

For in vitro diagnostic use only

1. INTENDED USE

Anti-nCoV19 IgM is a solid phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of antibodies of the IgM class directed against the *SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP)* in samples of human serum or plasma. The kit contains sufficient reagent for 96 determinations.

2. SUMMARY

In December 2019, a novel coronavirus, now officially named as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has been identified in Wuhan China, which caused the outbreak of a coronavirus-associated acute respiratory disease called coronavirus disease 19 (COVID-19). Signs and symptoms of COVID-19 may occur 2 to 14 days after infection, which include fever, cough, shortness of breath or difficulties in breathing, pain in the muscle and tiredness. In severe cases, the infection can further lead to pneumonia, severe acute respiratory syndrome (SARS), kidney failure and death.

Nucleocapsid protein (NP) is the most abundant protein on the helical nucleocapsid of coronaviruses, which envelopes the entire genomic RNA. NP also interacts with other viral structural proteins to play important roles during host cell entry and virus particle assembly and release. Anti-NP antibodies have been shown to be the earliest and the most predominant antibodies detectable in patient's blood samples after coronavirus infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-nCoV19 IgM is a two-step incubation immunoassay kit. Recombinant nucleocapsid protein (NP) of SARS-CoV-2 pre-coated onto the polystyrene microwell strips can specifically recognize anti-NP antibodies in human serum or plasma specimens. After a 1-hour incubation, anti-NP antibodies are captured by immobilized NP protein while the unbound components are washed away. Afterwards, a detection solution containing HRP-conjugated anti-human IgM is added for another 1-hour incubation, wherein HRP-conjugated anti-human IgM binds to the IgM class antibodies previously bound to NP protein on the plate. After removal of nonspecific bindings, a HRP substrate solution containing 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) is added, resulting in the formation of a blue color. Color reaction is stopped by 2M H₂SO₄, transforming the blue color to yellow signals, which is quantified by an absorbance microplate reader at 450nm. The color intensity is proportional to the amount of anti-NP IgM antibodies captured inside the wells.

4. WARNING 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,

ELVI021M Anti-nCoV19 IgM

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 IgM can only be used by qualified personnel who are thoroughly familiar with the technical work.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Supplied materials

Color code	DESCRIPTION	Q.ty	Unity	Symbol
	Microplate coated with SARS-CoV-2 recombinant NP: 12 strips breakable in 8 wells, sealed in aluminium foil. Resealable during use.	1	Pcs	MT PLATE
● Nero	Conjugate anti-IgM (100X): 0,12 ml aqueous solution of anti-human IgM antibodies against the sample IgM, conjugated with HRPO.	1	Vial	CONJ
○ Bianco	Assay buffer (5X): 20 ml of buffer to dilute samples and controls.	1	Vial	DIL
● Giallo	Substrate. 12 ml of 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); ready to use.	1	Vial	SUBS TMB
○ Bianco	Wash buffer (10X): 40 ml of concentrated wash buffer to wash the wells.	1	Vial	WASH BUF
● Rosso	Blocking solution: 12 ml of sulfuric acid, 0.2 mol/l, ready to use.	1	Vial	SOLN
● Azzurro	Negative control: 0,2 ml of a solution of sorological matrix negative to IgM.	1	Vial	CONTROL -
	Instructions for users (<i>MELVIO21M</i>)	1	Pz	-

It is possible to buy separately a positive control (REF. ELVIO21M-CTR) to validate the assay.

5.2. Equipments and materials needed but not provided

- microplate photometer with filters 450/620 nm
- Incubator 37 ° C
- Microplate washer
- pipettes with disposable tips (10, 100, 200, 1000 uL)
- Vortex-Mixer
- Disposable tubes
- Support for tubes
- distilled water.
- Timer.

5.3. Storage and stability of the kit

The reagents must be kept between 2...8°C. Do not use reagents after the expiry. The expiry date is printed on each component and on the box label.

6. SAMPLES COLLECTION AND PREPARATION

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 between 10,000 and 15,000 rpm for 5 minutes before analyzing 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 100X dilution in the **1X Assay buffer** prepared as described below. A suggested dilution is to add 10 µl of sample to 990 µl of **1X Assay buffer**.

7. ASSAY PROCEDURE

7.1. Reagent preparation

- *Bring all the reagents and samples 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.
- The vial of the **Conjugate Anti-IgM (100X)** contains 0.12 ml of a concentrated solution of anti-human IgM antibodies conjugated to horseradish peroxidase, stabilizers, preservatives.
Vortex and centrifuge briefly the **Conjugate anti-IgM (100X)** and dilute the desired quantity in a 1:100 ratio with **1X Assay buffer** prepared as described below. 100 µl of **Conjugate 1X anti-IgM** are required per well. Prepare only the strictly necessary quantity of **Conjugate Anti-IgM 1X**. Return the **Conjugate anti-IgM (100X)** to 2-8°C immediately after removing the necessary volume.
- The vial of **Assay buffer (5X)** contains 30 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 Assay buffer by mixing (30 ml) of **Assay buffer 5x** with 120 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 Assay buffer** obtained can be stored at 2-8°C for a maximum of one month.
- 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 wash buffer by 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 advisable 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 use at least:

- 2 wells (f.i. A1) for the blank and the samples.
- 3 wells (f.i. B1, C1, etc) for the negative control.
- 2 wells (f.i. B2, C2, etc) for the positive control.

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 **50 µl** of negative control, **100 µl** of samples and **100 µl** of **Assay buffer 1X** in the correspondent wells. Use **100 µl** of **Assay buffer 1X** as blank.
2. Cover the wells with plastic foil.
3. **Incubate for 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 anti-IgM 1X** in all the wells. Cover the wells with adhesive film.
6. **Incubate for 1 hour at room temperature.**
7. Repeat the washing as in step 4.

8. Pipette **100µl** of **Substrate** in all the wells.
9. **Incubate exactly for 15 min at room temperature (20°...25°C) in the dark.**
10. Pipette **100µl** of **Stop solution** in all the wells, in the same order as the solution TMB.
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.
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm **entro 10 min** dopo l'aggiunta della soluzione stop.

For the 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.*

Measure the absorbance of all the wells at **450 nm** and enter all the measured values in the worksheet.

It is recommended to measure the double wavelength optical densities using 620 nm as the reference length.

Where they were measured in duplicate, 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 regulations 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. CALCULATION OF THE RESULTS

9.1. Test validation

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

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

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

9.2. Results interpretation

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

The test result is **POSITIVE** when the ratio between the absorbance of the sample and the cut-off value is more or equal to 1,1. A positive result indicates the presence of antibodies IgM anti - SARS-CoV-2 NP.

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

RESULT INTERPRETATION	RES = $OD_{\text{sample}}/OD_{\text{Cut-off}}$
Negative	RES < 0,90
Positive	RES \geq 1,10
Suspicious	0,90 < RES < 1,10
$OD_{\text{Cut-off}} = 0,20$	

9.2.1 Attended value

The following table shows the optical density values typically obtained from samples tested with ELVI021M:

Samples	OD450
Negative Control	0.113
	0.098
	0.121
	0.117
Serum from healthy subjects	0.127
	0.154
	0.097
Serum from COVID-19 patients	1.052
	0.38
	0.242

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

10. LIMITATION 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

Diagnostic sensitivity is the probability of the test to provide a positive result in the presence of specific antibodies. Diagnostic sensitivity is >92%.

11.2. Diagnostic specificity

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

11.3. Precision

Intra-assay	n	Average	Cv (%)
Sample 1	20	0.51	3,85
Sample 2	20	1.15	5,99
Sample 3	20	1.27	5,01
Inter-assay	n	Average	Cv (%)
Sample 1	10	0.18	4,88
Sample 2	10	0.45	6,26
Sample 3	10	1,18	4,95





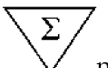







11.4. Cross-reactivity

7 nCoV19 negative samples from patients with a positive diagnosis of Influenza A / B or RSV were tested with ELVI021M. No positive results were found in respect of nCoV19.

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 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

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