

ALMACENAMIENTO: Refrigeración 2-8°C
CADUCIDAD/VIGENCIA: La fecha se indica en el empaque.

TIPO DE MUESTRA: Suero
KIT DE DIAGNÓSTICO PARA USO IN VITRO

CONTENIDO

1 INDICACIÓN DE USO	8 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD
2 USUARIOS	9 MUESTRAS
3 INTRODUCCIÓN	10 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO
4 FUNDAMENTO	10.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS
5 COMPONENTES DEL KIT	10.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
6 MATERIALES REQUERIDOS NO CONTENIDOS EN EL KIT	10.3 EJECUCIÓN DEL ENSAYO
7 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS	11 RECOMENDACIONES PARA EL ENSAYO
7.1 SOLUCIÓN DE LAVADO	12 CONTROL DE CALIDAD
7.2 AGENTE DE DILUCIÓN	13 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
7.3 SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS	14 LIMITACIONES DE LA PRUEBA
7.4 ANTICUERPO SECUNDARIO	15 CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO
7.5 SUSTRATOS PARA REVELADO	15.1 SENSIBILIDAD
7.6 SOLUCIÓN DE PARO	15.2 PRECISIÓN
7.7 CONTROL POSITIVO	15.3 REACTIVIDAD CRUZADA
7.8 CONTROL NEGATIVO	16 REFERENCIA

Interpretación de la prueba positiva para anticuerpos en contra del SARS-CoV-2
La presencia de anticuerpos tipo IgG sugiere que el sujeto ha sido expuesto al virus y ha desarrollado una respuesta inmune, típicamente esto ocurre al menos dos semanas después de la exposición y expresión clínica de la enfermedad. No determina en forma categórica que ya no se tiene riesgo de contraer la enfermedad, pero sugiere que es de menor riesgo que quien no tiene anticuerpos.

1 INDICACIÓN DE USO
El kit permite la detección de anticuerpos de la clase IgG específicos para el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína de espiga (S) del coronavirus tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) en muestras de suero de sujetos sospechosos de haber sido infectados por el virus. Este ensayo sólo proporciona resultados cualitativos. El resultado obtenido deberá ser correlacionado por el personal de salud con los datos clínicos del paciente y resultados de estudios complementarios.

La glicoproteína S de los coronavirus es esencial para la unión del virus a la célula hospedera durante el proceso de infección. Se ha reportado que el SARS-CoV-2 (anteriormente llamado 2019-nCoV) puede infectar las células epiteliales respiratorias humanas a través de la interacción con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE2). La proteína S es una proteína transmembranal tipo I, está formada por dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD), que es responsable del reconocimiento de ACE2 en la superficie celular, mientras que la subunidad S2 contiene elementos básicos necesarios para la fusión a la membrana. La proteína S desempeña un papel clave para la inducción de la respuesta inmune de células T y generación de anticuerpos neutralizantes, que en principio proporcionan una inmunidad protectora. La metodología desarrollada para este kit tiene por objeto detectar la presencia de anticuerpos de la clase IgG anti-RBD de la proteína S1 del coronavirus SARS-CoV-2 mediante un ensayo de ELISA indirecto. Para ello se sensibiliza una placa de inmunoensayos con el RBD de la proteína de S de SARS-CoV-2 coronavirus tipo 2 (antígeno) y

2 USUARIOS
Este kit es para uso de profesionales de laboratorio clínico y/o cuidado de la salud.

3 INTRODUCCIÓN
La enfermedad causada por coronavirus 2019 COVID-19 (por sus siglas en inglés **Coronavirus Disease 2019**) es una enfermedad respiratoria aguda causada por el SARS-CoV-2, la cual fue declarada como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a principios de 2020.

posteriormente se colocan las muestras de suero para determinar la presencia de anticuerpos que reconozcan específicamente al RBD. La interacción de la proteína con los anticuerpos tipo IgG presentes en el suero analizado se pone de manifiesto por la adición de un anticuerpo anti-IgG humana acoplado a peroxidasa y la reacción enzimática posterior con el sustrato cromogénico que se detecta a 450 nm.

4 FUNDAMENTO
Este kit de ELISA está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos humanos séricos de la clase IgG anti-SARS-CoV-2. Este ensayo utiliza una técnica en placa basada en un inmunoensayo-enzimático.

Los sueros problema se diluyen 1:100 y se colocan en una placa de inmunoensayo de 96 pozos sensibilizada previamente con el RBD de la proteína S del virus SARS-CoV-2 (antígeno), las proteínas que no se unen se eliminan mediante los lavados subsecuentes. La formación del complejo antígeno-anticuerpo anti-RBD se pone de manifiesto por la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), el exceso de anticuerpo secundario se elimina mediante lavados. La adición del sustrato cromogénico 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) con peróxido de hidrógeno evidencia la formación del complejo RBD-anticuerpo IgG anti- SARS-CoV-2- anticuerpo anti-IgG humana, mediante el desarrollo de color que puede ser cuantificado empleando un lector de microplacas a 450 nm.

La cantidad de anticuerpos anti-RBD presentes en la muestra será proporcional a la densidad óptica (D.O.) dada por la coloración del sustrato cromogénico.

5 COMPONENTES DEL KIT (Presentación una placa)

No. DE PARTE	COMPONENTE	CANTIDAD	UNIDADES	CONTENIDO	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO
B-2020	Placa de inmunoensayo sensibilizada	1	1 placa	Placa de poliestireno de 96 micropozos de fondo plano Nunc-MaxiSorp, con antígeno RBD	2-8 °C
C-2020	Agente de dilución	1.8 g	1 botella	Polvos para preparar solución de dilución	Temperatura ambiente
D-2020	Solución de lavado 10X	50 mL	1 botella	Regulador de fosfatos pH7.4 con Tween 20 como surfactante	Temperatura ambiente
E-2020	Control positivo	12 µL	1 tubo	Anticuerpo anti-proteína "S" de SARS-CoV-2	2-8 °C
G-2020	Anticuerpo secundario	12 µL	1 tubo	Anticuerpo anti-IgG humano marcado con HRP	2-8 °C
H-2020	Sustrato A para revelado	5 mL	1 botella	Solución de peróxido de hidrogeno	2-8 °C
I-2020	Sustrato B para revelado	5 mL	1 botella	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en solvente orgánico	2-8 °C
J-2020	Solución de paro	5 mL	1 botella	Solución de ácido metanosulfónico	2-8 °C
N/A	Sellador adhesivo para placas de 96 pozos	1	1 película	Sellador de plástico adherible no estéril	Temperatura ambiente
F-2020	Control negativo	12 µL	1 tubo	Anticuerpo IgG humano no relacionado con SARS-CoV-2	2-8 °C

6 MATERIALES REQUERIDOS NO CONTENIDOS EN EL KIT

- Puntas para micropipeta para 10, 200 y 1000 µL
- Pipeta serológica para 5, 10 y 25 mL
- Probeta de 100 mL
- Tubos para microcentrifuga 1500 µL
- Tubos cónicos 15 o 50 mL
- Canaletas
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplacas para lectura a 450 nm

7 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS
El kit se transporta a temperatura ambiente (18 – 25°C) sin embargo, una vez que tenga el kit en su laboratorio se recomienda refrigerar o separar los reactivos de acuerdo con su temperatura de almacenamiento. Preparar las soluciones de trabajo inmediatamente antes de su uso. Ver sección de preparación de reactivos. Evitar el uso de soluciones con más de 24 h de preparación.

7.1 SOLUCIÓN DE LAVADO
Solución amortiguadora de fosfatos con surfactante
Cantidad: 1 x 50 mL
Almacenamiento: Temperatura ambiente
Preparación: 10X concentrado. El contenido debe diluirse con 450 mL de agua desionizada o destilada, mezclar adecuadamente antes de su uso.

7.2 AGENTE DE DILUCIÓN
Agente de dilución 3% en regulador de fosfatos con surfactante.
Cantidad: 1 x 1.8 g/60 mL
Almacenamiento: Temperatura ambiente no mayor a 25°C
Preparación: Transferir 60 mL de la solución de lavado al recipiente marcado como **AGENTE DE DILUCIÓN**, mezclar perfectamente antes de su uso. Una vez que el agente de dilución haya sido reconstituido deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para utilizarlo en ensayos subsecuentes.

7.3 SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS
Agente de dilución 1% en solución amortiguadora de fosfatos con surfactante
Cantidad: 1 x 12 mL
Almacenamiento: Temperatura ambiente no mayor a 25°C
Preparación: En un tubo cónico hacer una dilución 1:3 del **AGENTE DE DILUCIÓN** (preparado en el paso anterior). Colocar 8 mL de la solución de lavado en un tubo cónico y transferir 4 mL del agente de dilución, mezclar adecuadamente antes de su uso. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

7.4 ANTICUERPO SECUNDARIO
Anticuerpo anti-IgG humana acoplado a HRP
Cantidad: 1 x 12 µL para 6 mL
Almacenamiento: 2-8°C
Preparación: Transferir el contenido del anticuerpo secundario en 6 mL de solución diluyente de anticuerpos. Mezclar antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para utilizarlo en ensayos subsecuentes.

8 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD
Evite el contacto de los reactivos con la piel, use guantes, bata de laboratorio y lentes de seguridad al manejar los reactivos del kit. En caso de contacto accidental lave con abundante agua por al menos 15 minutos.

sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para usos subsecuentes.

7.5 SUSTRATOS PARA REVELADO
Solución que contiene peróxido de hidrógeno (A) y 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en solvente orgánico (B).
Cantidad: 2 x 5 mL
Almacenamiento: 2-8 °C
Preparación: Mezclar volúmenes iguales del sustrato A y sustrato B para revelado. El kit contiene suficiente volumen de sustrato A y sustrato B para una placa completa, si se requiere utilizar una menor cantidad de pozos, preparar solo el volumen requerido. **Preparar 15 min antes de su uso**, mezclar adecuadamente y dejar reposar a temperatura ambiente. Una vez que el sustrato para revelado haya sido preparado, deberá protegerse de la luz y desecharse al terminar el ensayo. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

7.6 SOLUCIÓN DE PARO
Solución de ácido metanosulfónico
Cantidad: 1 x 5 mL
Almacenamiento: 2-8°C
Preparación: Listo para usarse

7.7 CONTROL POSITIVO
Anticuerpo anti-proteína S de SARS-CoV
Cantidad: 12 µL para 0.3 mL
Almacenamiento: 2-8°C
Preparación: Transferir 0.3 mL de la **SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS** al tubo marcado como control positivo. Mezclar perfectamente por pipeteo suave antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para utilizarlo en ensayos subsecuentes.

7.8 CONTROL NEGATIVO
Anticuerpo anti-IgG humano no relacionado con SARS-CoV-2.
Cantidad: 12 µL para 0.3 mL
Almacenamiento: 2-8°C
Preparación: Transferir 0.3 mL de la **SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS** al tubo marcado como control negativo. Mezclar perfectamente por pipeteo suave antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

un tratamiento con calor cómo se describe en la sección de preparación de la muestra.

9 MUESTRAS
Se requieren 10 µL de muestra de suero humano para la determinación por duplicado. Los sueros pueden analizarse el mismo día de la toma de muestra, mantenerse en refrigeración (2 a 8°C) hasta por 2 semanas (periodos más prolongados deberán ser probados por el usuario) o en congelación (-20°C) para tiempos de almacenamiento más largos. No se recomienda analizar muestras hemolizadas.

10 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

10.1 Preparación de reactivos
Preparar las soluciones de trabajo inmediatamente antes de su uso. Ver sección de preparación de reactivos. Evitar el uso de soluciones con más de 24 h de preparación.

10.2 Preparación de la muestra
a) Se recomienda calentar las muestras a 56°C durante 1 h en baño de agua. Este tratamiento no es necesario si las muestras se manejan en una cabina de bioseguridad. No se han observado diferencias en el desempeño del ensayo entre muestras tratadas o no tratadas con calor.
b) Centrifugar a 2000 rpm durante 3 min.
c) Diluir las muestras 1:100, tomar 10 µL de suero y agregar 990 µL de **AGENTE DE DILUCIÓN** reconstituido. Mezclar adecuadamente antes de colocarlas en la placa.

10.3 Ejecución del ensayo
a) Extraer la placa de 96 pozos de su empaque y remover por inversión el líquido excedente sobre un material absorbente.
b) Colocar 100 µL por pozo de las muestras diluidas 1:100 y los **CONTROLES**, se recomienda analizar las muestras por duplicado.
c) Incubar por 1.5 h a temperatura ambiente
d) Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.
e) Adicionar 50 µL por pozo del **ANTICUERPO SECUNDARIO** diluido previamente.
f) Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
g) Remover el **ANTICUERPO SECUNDARIO**.
h) Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.
i) Adicionar 100 µL por pozo de **SUSTRATO PARA REVELADO**, equilibrado a temperatura ambiente y preparado 15 min previos a su uso.
j) Incubar a temperatura ambiente durante 20 min protegido de la luz.
k) Adicionar 50 µL/pozo de **SOLUCIÓN DE PARO**.
l) Determinar la D.O. con un lector de placas empleando un filtro de 450 nm con una corrección a 570 nm.

Nota: si su espectrofotómetro no cuenta con el filtro para realizar la lectura a 570 nm, puede emplear otro filtro para la corrección (>570 nm).

11 RECOMENDACIONES PARA EL ENSAYO

- Se recomienda que todas las muestras se analicen al menos por duplicado. La interpretación de los resultados se deberá realizar a partir del promedio de la D.O. de cada muestra.
- Mantenga los **SUSTRATOS PARA REVELADO** en su envase original y evite la exposición a la luz.
- Es necesario una técnica de pipeteo cuidadosa y el uso de dispositivos de pipeteo calibrados para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
- Los tiempos o temperaturas de incubación diferentes a los establecidos en este manual pueden afectar los resultados.
- Evite la formación de burbujas de aire en los pozos, ya que esto podría dar como resultado una menor eficiencia de unión y un mayor coeficiente de variación. Para ello puede emplearse la técnica inversa de pipeteo.
- Todos los reactivos deben mezclarse suave y completamente antes de su uso. Evitar la formación de espuma.

12 CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la validez de los resultados, se sugiere que cada ensayo incluya controles negativos y positivos internos, adicionales a los controles proporcionado en el kit. El valor promedio de la D.O. del control positivo no debe ser menor que 1.5.

13 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

a) Calcule el valor promedio de la D.O. de controles y muestras.
b) Determine la interpretación de la muestra comparando la D.O. con la siguiente tabla:

Interpretación	Intervalo	Resultados
Negativo	Valor obtenido ≤ 0.5	La muestra no contiene anticuerpos IgG relacionados a SARS-CoV-2
Positivo	Valor obtenido ≥ 0.6	La muestra contiene anticuerpos IgG relacionados a SARS-CoV-2
Límite	0.5< Valor obtenido <0.6	Repetir la prueba e interpretar el resultado relacionando con otras pruebas clínicas

14 LIMITACIONES DE LA PRUEBA

a) Esta prueba es sólo para detección cualitativa. Los resultados de las pruebas no deben ser la única base para el diagnóstico clínico y el tratamiento. La confirmación de

infección con SARS-CoV-2 debe combinarse con los datos clínicos del paciente y otras pruebas diagnósticas.
b) En la primera semana del inicio de la infección con SARS-CoV-2, los resultados de los pacientes pueden ser negativos para IgG, debido a que aún es una etapa temprana para la detección de estos anticuerpos. Además, los pacientes con baja inmunidad u otras enfermedades que afectan la función inmune, la falla de órganos sistémicos importantes y el uso de medicamentos que inhiben la función inmune también pueden conducir a resultados negativos de la respuesta de IgG hacia el coronavirus. La infección previa de SARS-CoV u otra cepa de coronavirus puede causar respuesta de IgG positiva debido a posibles homologías filogenéticas entre cepas virales.
c) La contaminación bacteriana o fúngica de muestras de suero o reactivos, o la contaminación cruzada entre reactivos puede causar resultados erróneos.
d) El agua desionizada tratada con resinas de poliéster puede inactivar a la enzima HRP.

15 CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO

15.1 Sensibilidad
No existen controles internacionales estándar disponibles para evaluar la respuesta inmune hacia SARS-CoV-2. Para evaluar la especificidad del ensayo, se analizaron sueros positivos (provenientes de pacientes diagnosticados como positivos para SARS-CoV-2 por qRT-PCR) y sueros negativos (obtenidos antes de la pandemia y de pacientes negativos a SARS-CoV-2 por qRT-PCR) para establecer el punto de corte de D.O. y determinar la presencia de anticuerpos.

15.2 Precisión
Durante el desarrollo del kit se evaluaron muestras positivas en triplicados por dos analistas en forma independiente. Se obtuvo un %CV de las D.O. menor al 10% intra e inter ensayos.

15.3 Reactividad cruzada
No se ha determinado reactividad cruzada con otras enfermedades.

16 REFERENCIA

Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. Nat Rev Immunol. 2020;20:269–70.

STORAGE: Refrigeration at 2-8°C
EXPIRATION DATE: The date is indicated on the packaging box

TYPE OF SAMPLE: Serum
DIAGNOSTIC KIT FOR USE IN VITRO

CONTENTS	
1 INTENDED USE	8 SAFETY CONSIDERATIONS
2 USERS	9 SAMPLES
3 INTRODUCTION	10 ASSAY PROCEDURE
4 PRINCIPLE	10.1 PREPARATION OF REGENTS
5 KIT COMPONENTS	10.2 PREPARATION OF SAMPLE
6 REQUIRED MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT	10.3 ASSAY PERFORMANCE
7 REAGENT PREPARATION AND STORAGE	11 RECOMMENDATIONS FOR THE ASSAY
7.1 WASHING SOLUTION	12 QUALITY CONTROL
7.2 DILUENT AGENT	13 RESULTS INTERPRETATION
7.3 DILUENT SOLUTION OF ANTIBODIES	14 TEST LIMITATIONS
7.4 SECONDARY ANTIBODY	15 DEVELOPMENT FEATURES
7.5 DEVELOPMENT SUSTRATES	15.1 SENSITIVITY
7.6 STOP SOLUTION	15.2 ACCURACY
7.7 POSITIVE CONTROL	15.3 CROSS REACTIVITY
7.8 NEGATIVE CONTROL	16 REFERENCE

Interpretation of the positive test for anti-SARS-CoV-2 antibodies
The presence of IgG-type antibodies suggests that a subject has been exposed to the virus and has developed an immune response, typically this occurs at least two weeks after exposure and clinical symptoms expression of the disease. It does not categorically determine that such subject is no longer at risk of disease, but it suggests that is at lower risk than someone lacking of antibodies.

1 INTENDED USE
The kit allows detection of IgG-type antibodies specific to receptor-binding domain (RBD) of the spike protein (S) of the Severe Acute Respiratory Syndrome-coronavirus type-2 (SARS-CoV-2) in serum samples of subjects suspected of had been infected by the virus. This assay only provides qualitative results. The result should be correlated by health personnel with the patient's clinical data and results of complementary studies.

SARS-CoV-2 (formerly known as 2019-nCoV) has been reported to infect human respiratory epithelial cells through interaction with human angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) receptor. Protein S is a type-I transmembrane protein, consisting of two subunits, S1 and S2. The S1 subunit contains the receptor-binding domain (RBD), which is responsible for the recognition of ACE2 on cell surface, while subunit S2 contains basic elements necessary for membrane fusion. Protein S plays a key role in inducing immune response of T cells and generating neutralizing antibodies, which provides a protective immunity. The methodology developed for this kit aims to detect the presence of IgG- type antibodies anti-RBD of SARS-CoV-2 coronavirus S1 protein by means of an indirect ELISA assay. For this purpose, an immunoassay plate is sensitized with the RBD of SARS-CoV-2 coronavirus S1 protein (antigen), and then serum samples are added to determine presence of antibodies recognizing specifically RBD. The interaction of protein with IgG-type antibodies in the tested serum is evidenced by addition of an anti-human-IgG antibody coupled to peroxidase and subsequent enzymatic reaction with chromogenic substrate detected at 450 nm.

2 USERS
The kit is for use by clinical laboratory and/or healthcare professionals.

3 INTRODUCTION
The COVID-19 disease (by its abbreviation Coronavirus Disease 2019) is an acute respiratory disease caused by SARS-CoV-2, and such was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) in early 2020.

Glycoprotein S of coronaviruses is essential for binding the virus to the host cell during the infection process.

4 PRINCIPLE
The present ELISA kit is designed for qualitative detection of serum human antibodies of anti-SARS-CoV-1 IgG type. The assay uses a plate technique based on an enzymatic-immunoassay. The tested serums are diluted 1:100 and placed on a 96-well immunoassay plate previously sensitized with the RBD of SARS-CoV-2 virus (antigen) S-protein, the non-binding proteins are removed by subsequent washings. Formation of anti-RBD antigen-antibody complex is showed by adding anti-human IgG secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP), excess of secondary antibody is removed by washings. Adding 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) chromogenic substrate with hydrogen peroxide shows formation of anti-human IgG antibody anti-SARS-CoV-2-RBD-IgG antibody complex, through color development which can be quantified using a microplate reader at 450 nm.

The amount of anti-RBD antibodies in the sample will be proportional to the optical density (OD) shown by the chromogenic substrate color.

5 KIT COMPONENTS (One plate version)

ITEM No.	COMPONENT	QUANTITY	UNITS	CONTENT	STORAGE TEMPERATURE
B-2020	Sensitized immunoassay plate	1	1 plate	Nunc-MaxiSorp 96-microwell flat-bottom polystyrene plate, with RBD antigen	2-8 °C
C-2020	Dilution agent	1.8 g	1 bottle	Powder for preparing dilution solution	Room temperature
D-2020	Washing solution 10x	50 mL	1 bottle	Phosphate buffer at pH 7.4 with Tween 20 as surfactant	Room temperature
E-2020	Positive Control	12 µL	1 tube	SARS-CoV-2 anti-protein S antibody	2-8 °C
F-2020	Negative Control	12 µL	1 tube	Human IgG antibody not related to SARS-CoV-2	2-8 °C
G-2020	Secondary antibody	12 µL	1 tube	HRP-labeled anti-human IgG antibody	2-8 °C
H-2020	Substrate A for development	5 mL	1 bottle	Hydrogen peroxide solution	2-8 °C
I-2020	Substrate B for development	5 mL	1 bottle	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in organic solvent	2-8 °C
J-2020	Stop solution	5 mL	1 bottle	Methane sulfonic acid solution	2-8 °C
N/A	Adhesive sealing for 96-well plates	1	1 film	Non-sterile adhesive plastic sealant	Room temperature

- 6 REQUIRED MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT**
- Micropipette tips for 10, 200 and 1000 µL
 - Serological pipette for 5, 10 and 25 mL
 - 100 mL graduated cylinder
 - 1500 mL microcentrifuge tubes
 - 15- or 50-mL conic tubes
 - Reagent reservoirs
 - Deionized or distilled water
 - Microplate reader for reading at 450 nm

7 REAGENTS PREPARATION AND STORAGE
The kit is transported at room temperature (18-25°C) however, once the kit is in the laboratory it is suggested to refrigerate or separate the reagents according to their storage temperature. Prepare working solutions immediately before use. See reagent preparation section. Avoid using solutions with more than 24 hours of being prepared.

7.1 WASHING SOLUTION
Phosphate buffer at pH 7.4 with surfactant
Amount: 1x50 mL
Storage: Room temperature
Preparation: concentration 10X. Dilute content with 450 mL of deionized or distilled water, mixing properly before use.

7.2 DILUENT AGENT
3 % diluent agent in phosphate buffer with surfactant.
Amount: 1x1.8 g/60 mL
Storage: Room temperature no more than 25°C
Preparation: Transfer 60 mL of washing solution to the container marked as **DILUTION AGENT**, mix thoroughly before use. Once the diluting agent has been reconstituted it should be discarded at the end of the assay. It is not recommended to store it for use in further assays.

7.3 DILUENT SOLUTION OF ANTIBODIES
1% dilution agent in phosphate buffer with surfactant.
Amount: 1 x 12 mL
Storage: Room temperature no more than 25 °C
Preparation: Prepare a dilution 1:3 of **DILUTION AGENT** (prepared as in the step before) in a conical tube. Add 8 mL of washing solution in a conical tube and transfer 4 mL of dilution agent, mix thoroughly before use. It is not recommended to store it for use in further assays.

7.4 SECONDARY ANTIBODY
Anti-human IgG antibody coupled to HRP
Amount: 1x12 mL for 6 mL
Storage: 2-8°C
Preparation: Transfer the secondary antibody content to 6 mL of diluent solution of antibodies. Mixing before use. Once the antibody has been prepared it should be discarded at the end of the assay. It is not recommended to store it for subsequent use.

7.5 DEVELOPMENT SUSTRATES
Solution containing hydrogen peroxide (A) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in organic solvent (B).
Amount: 2x5 mL
Storage: 2-8°C
Preparation: Mixing equal volumes of substrate A and substrate B for developing. The kit contains enough volume of substrate A and substrate B for a whole plate, if fewer wells are required, prepare the required volume only. **Prepare 15 minutes before use**, mix properly and allow to stand at room temperature. Once the developing substrate has been prepared, it should be protected from light and discarded at the end of the assay. It is not recommended to keep it for use in further assays.

7.6 STOP SOLUTION
Methane sulfonic acid solution
Amount: 1x5 mL
Storage: 2-8°C
Preparation: Ready-to-use

7.7 POSITIVE CONTROL
SARS-CoV-2 anti-protein S antibody
Amount: 12 mL for 0.3 mL
Storage: 2-8°C
Preparation: Transfer 0.3 mL of **DILUENT SOLUTION OF ANTIBODIES** to the tube labeled as positive control. Mixing thoroughly by gently pipetting before use. Once the antibody has been prepared it should be discarded at the end of the assay. It is not recommended to store it for use in further assays.

7.8 NEGATIVE CONTROL
Anti-human IgG antibody no related to SARS-CoV-2
Amount: 12 mL for 0.3 mL
Storage: 2-8°C
Preparation: Transfer 0.3 mL of **DILUENT SOLUTION OF ANTIBODIES** to the tube labeled as negative control. Mixing thoroughly by gently pipetting before use. Once the antibody has been prepared it should be discarded at the end of the assay. It is not recommended to store it for use in further assays.

8 SAFETY CONSIDERATIONS
Avoid skin to contact the reagents; wear gloves, laboratory coat and safety goggles when manipulating kit reagents. In case of accidental contact, wash thoroughly with water for 15 minutes at least. Due to potential risk of serum samples containing active SARS-CoV-2 viruses, heat treatment as described in sample preparation section is recommended.

9 SAMPLES
10 mL of human serum sample is required for determination in duplicate. Serums could be analyzed the same day as the sample collection, kept refrigerated (2 to 8°C) for up to 2 weeks (longer periods must be tested by the user) or keep it frozen (-20°C) for longer storage times. Analyzing hemolyzed samples is not recommended.

10 ESSAY PROCEDURE

10.1 Preparation of Regents
Prepare working solutions immediately before use. See reagents preparation section. Avoid using solutions with more than 24 hours of being prepared.

10.2 Preparation of Sample
a) Heating samples at 56°C in water bath is recommended. Such treatment is not necessary when samples are processed on a biosafety cabinet. No differences in assay performance have been observed between heat-treated and non-heat-treated samples.
b) Centrifugate to 2000 rpm for 3 minutes.
c) Dilute samples 1:1000, take 10 mL serum and add 900 mL of reconstituted **DILUTION AGENT**. Mixing properly before adding to the plate.

10.3 Essay Performance
a) Remove the 96-well plate from packaging and invert the excess of liquid on an absorbent material.
b) Add 100 mL of diluted samples 1:100 and the **CONTROLS** to each well, analyzing by duplicate all samples is recommended.
c) Incubate for 1.5 hours at room temperature.
d) Wash 6 times adding 200 mL of **WASHING SOLUTION** to each well and fully remove.
e) Add 50 mL of **SECONDARY ANTIBODY** previously diluted.
f) Incubate for 1 hour at room temperature.
g) Remove the **SECONDARY ANTIBODY**
h) Wash 6 times adding 200 mL of **WASHING SOLUTION** to each well and fully remove.
i) Bring to room temperature and prepare 15 minutes before use the **DEVELOPING SUBSTRATE**. Add 100 mL of **DEVELOPING SUBSTRATE** to each well.
j) Incubate at room temperature for 20 minutes avoiding light.
k) Add 50 mL/well of **STOP SOLUTION**.
l) Determine the OD via plate reader using a 450 nm filter and correction to 579 nm. Note: if the spectrometer does not have a filter to read at 570 nm, use another filter for correction (> 570 nm).

11 RECOMMENDATIONS FOR THE ASSAY
a) It is recommended to analyze all samples by duplicated, at least. The interpretation of results should be from the OD average of each sample.
b) Keep the **DEVELOPING SUBSTRATES** on the original container and avoid exposure to light.
c) A careful pipetting technique is necessary, and properly calibrated pipette devices are necessary to assure reproducibility of the test.
d) Different incubation times or temperatures to those stated in this manual could modify the results.
e) Avoid air bubble formation on wells, as this could result in a lower bind efficiency and a higher coefficient of variation. The reverse pipetting technique could be used for this purpose.
f) All reagents should be mixed thoroughly and gently before use. Avoid foaming.

12 QUALITY CONTROL
In order to assure validity of results, it is suggested each assay to include negative and positive internal controls, in addition to those contained in the kit. The OD average value of positive control should be not less than 1.5.

13 RESULTS INTERPRETATION
a) Calculate OD average value of controls and samples.
b) Determine the sample interpretation by comparing OD in the following table:

Interpretation	Interval	Results
Negative	Obtained value ≤ 0.5	The sample does not contain IgG antibodies related to SARS-CoV-2
Positive	Obtained value ≥ 0.6	The sample does contain IgG antibodies related to SARS-CoV-2
Limit	0.5 < Obtained value < 0.6	Repeat the test and interpret with other clinical tests

14 TEST LIMITATIONS
a) This test is for qualitative detection only. The test result should not be the only basis for clinical diagnosis and treatment. Confirmation of infection with SARS-CoV-2 should be combined with patient's clinical data and other diagnostic tests.
b) In the first week after the onset of SARS-CoV-2 infection, patient results could be negative for IgG, since it is an early stage for detection of these antibodies. In addition, patients with low immunity or other diseases affecting immune function, failure of main systemic organs, and usage of an inhibiting immune function drugs can also provide a negative result of IgG response to coronavirus. Previous infection with SARS-CoV or another coronavirus strain could provide a positive IgG response due to possible phylogenetic homologies among viral strains.
c) Bacterial or fungal contamination in serum samples or reagents, or cross contamination among reagents could provide incorrect results.
d) Deionized water treated with polyester resins could inactivate the HRP enzyme.

15 DEVELOPMENT FEATURES

15.1 Sensitivity
There are no international standard controls available to assess the immune response to SARS-CoV-2. To assess the

specificity of the assay, positive serums (from patients diagnosed as SARS-CoV-2 positive by qRT-PCR) and negative serums (obtained before pandemic and from SARS-CoV-2 negative patients by qRT-PCR) were analyzed to establish the OD endpoint and determine the presence of antibodies..

15.2 Accuracy
During the kit development, positive samples were evaluated in triplicate by two analysts independently. A coefficient of variation percentage (CV %) of OD less than 10% was obtained intra- and inter-assays.

15.3 Cross Reactivity
Cross reactivity with other diseases has not been determined.

16 REFERENCE
Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. Nat Rev Immunol. 2020;20:269–70.

Version 1.0; February 2021.

