

BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE

^[REF] **K243**

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa da capacidade de neutralização dos anticorpos totais anti- SARS-CoV-2 em amostras biológicas de soro ou plasma (EDTA ou Heparina), através da inibição da formação do imunocomplexo antígeno S e proteína ACE2 (S-ACE2), por ensaio de competição. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático

O kit BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa por competição de anticorpos totais anti-SARS-CoV-2 capazes de inibir o complexo S-ACE2 em amostras de soro e plasma humano.

Na incubação inicial, o Conjugado 1, composto pela proteína ACE2 conjugada com Biotina, se liga à Estreptavidina revestida na microplaca. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Na segunda incubação, amostras de soro e plasma que contém anticorpos totais anti-SARS-CoV-2 competem com a proteína ACE2 pela ligação com o Antígeno Spike conjugado à Peroxidase presente no Conjugado 2, impedindo a formação do complexo S-ACE2. Nova lavagem é realizada para remover os anticorpos totais anti-SARS-CoV-2, ligados ou não ligados ao Antígeno Spike. Após esta etapa, o substrato é adicionado e incubado. Uma cor azul para amostras indica a ausência de Anticorpos Totais anti-SARS-CoV-2 e formação do complexo entre o Antígeno Spike conjugado à Peroxidase e a ACE2. Por outro lado, uma menor intensidade da cor azul indica uma maior quantidade de Anticorpos totais anti-SARS- CoV-2 presentes na amostra que impediram a formação do complexo S-ACE2. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor de azul para amarelo, medida em um leitor de microplaca.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Placa sensibilizada com Estreptavidina e conservante.
- 2- Conjugado 1** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão contendo Proteína ACE2 recombinante ligada à Biotina, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.
- 3- Lavagem Concentrada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.
- 4- Diluente de Amostra** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão, estabilizantes, surfactante, corante e conservante.
- 5- Conjugado 2** - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão contendo Antígeno Spike ligado à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.
- 6- Substrato** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Ureia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.
- 7- Solução de Parada** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.
- 8- Controle Negativo** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução tampão, estabilizante, surfactante e conservante. **Potencialmente infectante.**
- 9- Controle Positivo** - Conservar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução Tampão, Anticorpos Totais Anti-SARS-CoV-2, corante, estabilizantes, surfactante e conservante. **Potencialmente infectante.**
- 10- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Reagentes	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
2- Conjugado 1	1 Frasco x 6 mL	2 Frascos x 6 mL	5 Frascos x 6 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	2 Frascos x 50 mL	5 Frascos x 50 mL
4- Diluente de Amostra	1 Frasco x 15 mL	2 Frascos x 15 mL	5 Frascos x 15 mL
5- Conjugado 2	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 2 mL	5 Frascos x 12 mL
6- Substrato	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
7- Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	2 Frascos x 12 mL	5 Frascos x 12 mL
8- Controle Negativo	1 Frasco x 300 µL	2 Frascos x 300 µL	5 Frascos x 300 µL
9- Controle Positivo	1 Frasco x 300 µL	2 Frascos x 300 µL	5 Frascos x 300 µL
10- Seladores de Placa	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior
- Instruções de uso (manual)

Materiais necessários não contidos no kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 10 a 100 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 50 a 100 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
- 5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 6- Cronômetro ou relógio.
- 7- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.
- 8- Água destilada ou deionizada.
- 9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 10- Incubadora de 37°C ± 2°C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento e transporte deverá ser de 2 a 8°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8°C.
- 4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
- 5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.
- 6- A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
- 7 -Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

- 8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
- 10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
- 11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
- 12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
- 13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
- 14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
- 15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina)

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo a solução pode ser estocada entre 2 a 30°C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução.

Substrato

O Substrato é pronto para o uso.

ESTABILIDADE APÓS ABERTO

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

- Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30°C) por no mínimo 40 minutos.
- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.
- 2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
- 3- Pipetar 50 µL de Conjugado 1 em todas as cavidades, inclusive na cavidade do Branco.
- 4- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.
- 5- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 6- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual); Usar 500 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, para um total de cinco (5) ciclos de lavagem com molho de 30 segundos por ciclo.
- Nota:** Avaliar a capacidade de aspiração e dispensação do equipamento. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente pois lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

- 7- Pipetar 50 µL de Diluente de Amostra em todas as cavidades.
- 8- Pipetar 10 µL de Amostra ou Controles nas cavidades previamente determinas, em seguida, pipetar 100 µL do Conjugado 2 em todas as cavidades.
- 9- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 10- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 11- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 12- Repetir o item 6.
- 13- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.
- 14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 15- Incubar por 15 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
- 16- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 17- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.
- 18- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
- 19- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Branco	> 1,000
Controle Negativo	> 1,200
Controle Positivo	< 1,000

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

QUALITATIVO

Cálculo da Porcentagem de Inibição da Reação

% de inibição da reação=[1-(Amostra/ControleNegativo)]x100

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Controle Negativo	Controle Negativo = 2,181
Amostra	Amostra = 1,013
%=[1-(Amostra/ControleNegativo)] x100	[1-(1,013/2,181)]x100=53,55%

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo da porcentagem de inibição da reação das amostras, considerar os dados abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO
Negativo	< 30%
Positivo	> 35%
Indeterminado	Entre 30 e 35%

Nota: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

O kit é um ensaio qualitativo com a possibilidade de correlação da capacidade de inibição da reação pela análise em porcentagem. Ainda não existem dados clínicos que estabeleçam uma relação entre a capacidade de inibição da reação apresentada em uma amostra e o estado clínico do paciente. Os resultados obtidos com o kit BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE demonstram apenas que pacientes com resultados < 30% não possuem anticorpos neutralizantes, e amostras > 35% possuem estes anticorpos. Resultados < 30% não descartam a infecção por SARS-CoV-2. Resultados > 35% podem decorrer de infecção por outros coronavírus, apesar de não ter sido evidenciada reação cruzada nos estudos realizados durante o desenvolvimento. Este produto simula o mecanismo de inibição imunodominante baseado na neutralização viral por anticorpos neutralizantes através do bloqueio da formação do imunocomplexo S-ACE2. Pacientes positivos para o vírus podem desenvolver outros anticorpos neutralizantes ou ainda desenvolver anticorpos contra o SARS-CoV-2 não neutralizantes, ambos não detectáveis pela metodologia proposta. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Rematóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 140 amostras negativas para COVID-19, mas positivas para outras infecções. Dentre elas, 10 amostras positivas para Influenza, 27 amostras positivas para Rinovírus, 13 amostras positivas para Vírus Sincial Respiratório, 10 amostras positivas para Zika, 10 amostras positivas para Dengue, 10 amostras positivas para Chikungunya, 10 amostras positivas para Toxoplasmose, 10 amostras positivas para Citomegalovírus, 10 amostras positivas para Rubéola, 10 amostras positivas para HIV, 10 amostras positivas para HBV e 10 amostras positivas para HCV. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para Zika, Dengue, Chikungunya, Toxoplasmose, Citomegalovírus, Rubéola, HIV, HBV e HCV. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO

PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Repetibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	0,262	0,084	1,306
Desvio Padrão	0,024	0,011	0,083
Coefficiente de Variação (%)	9,141	12,586	6,357

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Reprodutibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	0,262	0,079	1,206
Desvio Padrão	0,025	0,007	0,078
Coefficiente de Variação (%)	10,125	8,936	6,446

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Para realização do estudo de sensibilidade e especificidade clínicas foram analisadas 156 amostras clinicamente conhecidas, sendo 96 positivas e 60 negativas. Os resultados podem ser observados na tabela abaixo:

	Resultado Esperado	BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE
Amostra Positiva	96	93
Amostra Negativa	60	57
Total de Amostras Testadas	156	

Sensibilidade Clínica: 96,87% (93/96) – IC 95%: 88,9% - 100%
Especificidade Clínica: 95% (57/60) – IC 95%: 89,62% - 100%

Um novo estudo de sensibilidade clínica foi realizado com 70 amostras positivas para o padrão ouro PRNT, que são consideradas positivas pelo método quando apresentam título ≥ 1/20.

Um novo estudo de especificidade clínica foi realizado com 100 amostras pré-pandêmicas.

Sensibilidade (68/70) = 97,1% IC 95%: 93,3 – 100%
Especificidade (92/100) = 92,0% IC95%: 86,9 – 97,1%

Foi realizado também o estudo de detecção de anticorpos neutralizantes em diferentes grupos de amostras. Segue abaixo os novos dados:

Estudo por grupo de amostras:

Grupo*	Total de Amostras Avaliadas	Ac Neutralizante Positivo
Grupo de indivíduos infectados com sintomas >14 dias	37	28
Grupo de indivíduos não infectados e vacinados com CORONAVAC (> 30 dias pós 2ª dose)	73	64

*Os dados apresentados acima não representam a sensibilidade do produto, mas a expressão de anticorpos neutralizantes em diferentes situações por grupo avaliado no painel testado.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Os Coronavírus (CoV) pertencem a família Coronaviridae, e estão amplamente distribuídos infectando seres humanos e outros mamíferos. Em humanos, os sintomas mais comuns apresentados são: febre, tosse, dispneia, mialgia ou fadiga. Pode causar doenças que variam do resfriado comum a doenças mais graves, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS- CoV). Em dezembro de 2019, uma série de casos de pneumonia de causa desconhecida surgiu em Wuhan na China, com sintomatologia clínica muito semelhante à pneumonia viral, após sequenciamento completo das amostras respiratórias foi evidenciado ser infecção por Coronavírus, que foi chamado de novo coronavírus (2019-nCoV). Em aproximadamente 150 países em todos os continentes já foram notificados casos de infecção.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
2. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Corman VM, Landt O, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019- nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
5. Huang C, Wang Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497- 506.
6. Huo, J., Le Bas, A., Ruza, R.R. et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. Nat Struct Mol Biol 27, 846–854 (2020).
7. Quibasa: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit BIOLISA COVID-19 ANTICORPO NEUTRALIZANTE na ANVISA: 10269360337

Revisão: Junho/2023

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



FABRICADO POR



NÚMERO DO LOTE



CONTROLE



DATA DE FABRICAÇÃO



CONTROLE POSITIVO



DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)



CONTROLE NEGATIVO



LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)



RISCO BIOLÓGICO



O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTE



INFLÂMVEL



CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO



CORROSIVO



PRODUTO PARA
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



PROTEGER DA
LUZ E CALOR



NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA



NÃO REUTILIZE



PRODUTO
ESTERELIZADO



CUIDADO



PERIGO

BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE

REF K243

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de la capacidad de neutralización de los anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 en muestras biológicas de suero o plasma (EDTA o Heparina), al inhibir la formación del Inmunocomplejo del antígeno S y proteína ECA2 (S-ECA2), mediante prueba de competición. Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimatico
El kit de BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE es um immunoensayo en fase sólida basado en el principio de detección cualitativa por competición de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 capaz de inhibir el complejo S-ECA2 em muestras de suero y plasma humano.
En la incubación inicial, el Conjugado 1, compuesto por la proteína ECA2 conjugado con Biotina, se une a Estreptavidina recubierta en la microplaca. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. En la segunda incubación, muestras de suero y plasma que contienen anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 compiten con la proteína ECA2 por unirse con el antígeno Spike conjugado con Peroxidasa presente en Conjugado 2, que previene la formación del complejo S-ECA2. Se realiza un nuevo lavado para eliminar los anticuerpos totales, anti-SARS-CoV-2, unidos o no unidos a Antígeno Spike. Después de este paso, se agrega el sustrato y se incuba. Un el color azul para las muestras indica la ausencia de anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 y formación de complejos entre el antígeno 5 conjugado con peroxidasa y ECA2. Por otro lado, un menor intensidad del color azul indica una mayor cantidad de Anticuerpos totales anti-SARS-CoV-2 totales presentes en la muestra impidió la formación del complejo S-ECA2. La Solución de Lavado se agrega para detener la reacción y hay un cambio de color de azul a amarillo, medido en un lector microplaca.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa sensibilizada con Estreptavidina y conservante.
- 2- Conjugado 1** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón que contiene Proteína ECA2 recombinante unida a Biotina, tensioactivo, estabilizadores, colorantes y conservantes.
- 3- Lavado Concentrado** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón (Fosfato <0,5 mol/L, Cloruro de Potasio <100 mmol/L, Cloruro de Sodio <5 mol/L), tensioactivo y preservativo.
- 4- Diluyente de Muestra** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón, estabilizadores, tensioactivo, colorante y preservativo.
- 5- Conjugado 2** - Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón que contiene Antígeno 5 unido a Peroxidasa, tensioactivo, estabilizadores, colorantes y conservantes.
- 6- Sustrato** - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
- 7- Solución de Parada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Ácido Clorhidrato 1 M.
- 8- Control Negativo** - Almacenar de 2 a 8 ° C. Contiene: Solución Tampón, estabilizante, tensioactivo y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 9- Control Positivo** - Almacenar entre 2 y 8 ° C. Contiene: Solución Tampón, Anticuerpos Totales Anti-SARS-CoV-2, Tinte, estabilizadores, tensioactivos y conservantes. **Potencialmente infeccioso.**
- 10- Selladores de Placas**

PRESENTACIÓN

Reagentes	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidad	2 Unidades	5 Unidades
2- Conjugado 1	1 Vial x 6 mL	2 Viales x 6 mL	5 Viales x 6 mL
3- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	2 Viales x 50 mL	5 Viales x 50 mL
4- Diluyente de Muestra	1 Vial x 15 mL	2 Viales x 15 mL	5 Viales x 15 mL
5- Conjugado 2	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
6- Sustrato	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
7- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	2 Viales x 12 mL	5 Viales x 12 mL
8- Control Negativo	1 Vial x 300 µL	2 Viales x 300 µL	5 Viales x 300 µL
9- Control Positivo	1 Vial x 300 µL	2 Viales x 300 µL	5 Viales x 300 µL
10- Selladores de Placas	3 Unidades	6 Unidades	15 Unidades

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el ítem anterior
- Instrucciones de uso (manual)

Materiais necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 10 a 100 µL con coeficiente de variación menor que 1,5%
- 2- Repipetador para pipetajes repetitivos de volúmenes de 10 a 100 µL com coeficiente de variación menor que 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Lectora de ELISA con capacidad de absorbencia en 450 y 630 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8- Agua destilada o deionizada.
- 9- Herramientas de Control de Calidad.
- 10- Incubadora de 37°C ± 2°C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento y transporte debe ser de 2 a 8°C. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- **Solamente para el uso diagnóstico *in vitro*.**
- 2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.
- 3- El embalaje de aluminio conteniendo las microplacas debe ser abierto solamente después de alcanzar la temperatura ambiente. Recolocar las tiras de microcavidades no utilizadas en el El embalaje de aluminio, sellar y almacenar entre 2 y 8°C.
- 4- El agua utilizada en la limpieza del material debe ser reciente e exenta de contaminantes.
- 5- Columnas deionizadoras saturadas liberan agua alcalina, iones diversos y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar de forma significativa los resultados.
- 6- La Solución de Parada contiene Ácido Clorídrico que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manipular con el debido cuidado.
- 7- Toda materia prima del producto es probada y debe ser no reactiva para HBsAg, Anti-HIV 1&2 y Anti-HCV. Sin embargo, esos tests no ofrecen total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de todo producto que contiene suero es potencialmente capaz de transmitir dolencias. Por lo tanto, es necesario tomar los debidos cuidados de bioseguridad en la manipulación de esos productos.

- 8- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.
- 9- Por medida de protección, debe cubrir la placa durante la reacción.
- 10- Asegurar que el fondo de la cavidad este limpio y seco, y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permitir que las cavidades sequen durante el ensayo.
- 11- No exponga los reactivos, especialmente el Sustrato, a la luz fuerte o vapores de Hipoclorito durante el almacenamiento o etapas de incubación.
- 12- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.
- 13- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
- 14- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
- 15- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Suero o Plasma (EDTA o Heparina)

No se deben utilizar muestras hemolizadas o altamente lipémicas. Las muestras pueden mantenerse refrigeradas, entre 2 y 8°C, durante un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a -20°C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO
Solución de Lavado

Diluir el contenido del Reactivo Nº 3 (Lavado Concentrado) em 1000 mL de agua destilada o deionizada. Después de la preparación de la solución se puede almacenar a 2 a 30°C hasta la fecha de validez impresa en el frasco original. Caso ocurra cristalización, calentar a 37°C hasta su disolución.

Sustrato

El Sustrato está listo para su uso.

ESTABILIDAD DESPUÉS DE ABRIR

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE es estable después de abrir hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de la prueba y el medio ambiente. Por lo tanto, se sugiere controlar el rendimiento del produto utilizando controles internos del kit y criterios de validación técnica.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos consultar con el SAC (Servicio de Asesoría al Cliente).

Antes de iniciar el ensayo, coloque todos los reactivos, controles y Muestras para estabilizar a temperatura ambiente (15 - 30°C) durante al menos 40 minutos.

- 1- Separar las cavidades a utilizar considerando: Controles y Muestras (se recomienda probar por duplicado). Devuelva las tiras no utilizadas de la microplaca al embalaje original sellado.
- 2- Separe la primera cavidad para Blanco (OPCIONAL).
- 3- Pipete 50 µL de Conjugado 1 en todos los pocillos, incluyendo la cavidad del Blanco.
- 4- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir el cavidades con sellador de placa.
- 5- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 6- Desechar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavadora) o por decantación (manual). Utilice aproximadamente 500 µL de solución de lavado, **preparado previamente**, para un total de cinco (5) lavar con una salsa de 30 segundos por ciclo.
- 7- **Nota:** Evalúe la capacidad de succión y dispensación del equipo. Para garantizar el secado de la placa, al final del lavado, toque la placa durante unos segundos sobre papel absorbente como lavado/ secado puede provocar resultados inadecuados.

- 7- Pipetee 50 µL de Diluyente de Muestra en todos los pocillos.
- 8- Pipetee 10 µL de Muestra o Controles en los pocillos previamente determinado, luego pipetear 100 µL del Conjugado 2 en todos los pocillos.
- 9- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubrir el cavidades con el sellador de placas.
- 10- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 11- Retire el sellador de placas de las cavidades.
- 12- Repetir el ítem 6.
- 13- Pipetee 100 µL de Sustrato en todos los pocillos.
- 14- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubrir el cavidades con el sellador de placas.
- 15- Incube durante 15 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 16- Retire el sellador de placas de las cavidades.
- 17- Pipetee 100 µL de Solución de Parada en todos los pocillos.
- 18- homogenizar suavemente durante ± 30 segundos.
- 19- Leer con doble filtro: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (en el máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para lectura do Blanco y dos Controles son compatibles con los valores presentados abajo:

ITEM	ABSORBANCIAS
Blanco	> 1,000
Control Negativo	> 1,200
Control Positivo	< 1,000

Caso los valores se encuentren fuera de los valores esperados, se debe repetir la técnica.

DESCRIPCIÓN DE LOS CÁLCULOS
CUALITATIVO

Cálculo del porcentaje de inhibición de reacción:
% de inhibición de la reacción = [1-(Muestra/ControlNegativo)] x100
Ejemplo

ITEM	ABSORBANCIAS
Control Negativo	Control Negativo = 2,181
Muestra	Muestra = 1,013
%=[1-(Muestra/ControlNegativo)] x100	[1-(1,013/2,181)]x100=53,55%

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después de calcular el porcentaje de inhibición de la reacción de las muestras, considere los datos a continuación para determinar los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO
Negativo	< 30%
Positivo	> 35%
Indeterminado	Entre 30 e 35%

Nota: En el caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Muestras que obtienen resultados repetidamente indeterminado se debe volver a probar utilizando un método alternativo. Si los resultados permanecen indeterminado, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recogida.. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretado por el profesional médico responsable, y el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo para ilustración y no se puede utilizar para calcular los resultados.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El kit es un ensayo cualitativo con posibilidad de correlación de la capacidad de inhibición de la reacción por análisis en porcentaje. Aún no existen datos clínicos que establezcan una relación entre la capacidad de inhibir la reacción presentada en una muestra y el estado clínico del paciente. Los resultados obtenidos con el kit BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE demuestran solo que los pacientes con resultados <30% no tienen anticuerpos neutralizantes y las muestras > 35% sí tienen estos anticuerpos. Los resultados <30% no descartan la infección por SARS-CoV-2. Resultados> 35% pueden deberse a infección por otros coronavirus, aunque no se evidenció reacción cruzada en estudios llevados a cabo durante el desarrollo. Este producto simula el mecanismo de inhibición inmunodominante basado en la neutralización viral por los anticuerpos neutralizantes bloquean la formación del inmunocomplejo S-ECA2. Los pacientes con virus positivos pueden desarrollar otros anticuerpos neutralizantes o incluso anticuerpos no neutralizantes contra el SARS-CoV-2, ambos indetectables por la metodología propuesta. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo de la enfermedad.

INTERFERENTE

No se observó interferencia para el Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Rematoide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y Anti Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio con 140 muestras negativas para COVID-19, pero positivo para otras infecciones. Dentro de ellas, 10 muestras positivas para influenza, 27 muestras positivas para rinovirus, 13 muestras positivas para virus sincitial Respiratorio, 10 muestras positivas de Zika, 10 muestras positivo para Dengue, 10 muestras positivas para Chikungunya, 10 muestras positivas para toxoplasmosis, 10 muestras positivas para Citomegalovirus, 10 muestras positivas para Rubéola, 10 muestras HIV positivas, 10 muestras positivas para Muestras positivas para VHB y 10 HCV. No fue observado reactividad cruzada con muestras positivas para Zika, Dengue, Chikungunya, Toxoplasmosis, Citomegalovirus, Rubéola, HIV, HBV y HCV. A pesar de los resultados encontrados, no es posible descartar completamente la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe poseer un programa interno de control de calidad, donde procedimientos, normas, límites y tolerancia para variaciones sean claramente establecidos. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, que debe ser vigilada por los propios laboratorios. Por lo tanto, es recomendable la utilización de controles, que permiten la evaluación, la precisión y la exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia:

Repetibilidad	Muestras		
	1	2	3
Promedio	0,262	0,084	1,306
Desviación Estandar	0,024	0,011	0,083
Coefficiente de Variación (%)	9,141	12,586	6,357

Reproducibilidad

La reproducibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia:

Reproducibilidad	Muestras		
	1	2	3
Promedio	0,262	0,079	1,206
Desviación Estandar	0,025	0,007	0,078
Coefficiente de Variación (%)	10,125	8,936	6,446

SENSIBILIDAD E ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Realizar el estudio de sensibilidad y especificidade se analizaron 156 muestras clínicamente conocidas, 96 positivos y 60 negativos. Los resultados pueden ser observado en la siguiente tabla:

	Resultado Esperado	BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE
Muestra Positiva	96	93
Muestra Negativa	60	57
Total de Muestras Probadas	156	

Sensibilidad Clínica: 96,87% (93/96) - 95% IC: 88,9% - 100%
Especificidad Clínica: 95% (57/60) - 95% IC: 89,62% - 100%

Se realizó un nuevo estudio de sensibilidad clínica con 70 muestras positivas al Estandar oro PNRT (Ensayo de neutralización de reducción de placa), que se consideran positivas por el método cuando presentan título ≥ 1/20. Se realizó un nuevo estudio de especificidad clínica con 100 muestras prepandémicas.

Sensibilidad (68/70) = 97,1% IC del 95%: 93,3 - 100%
Especificidad (92/100) = 92,0% IC del 95%: 86,9 - 97,1%

También se llevó a cabo el estudio de detección de anticuerpos neutralizantes en diferentes grupos de muestras. A continuación se muestran los nuevos datos:

Estudio por grupo de muestra:

Grupo*	Total de Muestras Evaluadas	Ac Neutralizante Positivo
Grupo de individuos infectados con síntomas> 14 días	37	28
Grupo de personas no infectadas vacunadas con CORONAVAC (> 30 días después de la segunda dosis)	73	64

* Los datos presentados anteriormente no representan la sensibilidad del producto, sino la expresión de anticuerpos neutralizantes en diferentes situaciones por grupo evaluado en el panel probado.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la familia Coronaviridae y son ampliamente distribuido infectando humanos y otros mamíferos. En humanos, los síntomas más comunes presentados son: fiebre, tos, disnea, mialgia o fatiga. Puede causar enfermedades que van desde el resfriado común a las enfermedades más graves, como el síndrome respiratorio oriental (MERS-CoV) y Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARSCoV).

En diciembre de 2019, una serie de casos de neumonía causaron la enfermedad apareció en Wuhan en China, con síntomas clínicos muy similar a la neumonía viral, después de la secuenciación completa de las muestras respiratorias se demostró que era una infección por Coronavirus, que se llamó el nuevo coronavirus (2019-nCoV). En aproximadamente 150 países en todos los continentes, ya se han informado casos de infección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
2. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Corman VM, Landt O, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019- nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
5. Huang C, Wang Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497- 506.
6. Huo, J., Le Bas, A., Ruza, R.R. et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. Nat Struct Mol Biol 27, 846–854 (2020).
7. Quibasa: Datos do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos Bioclin son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje de presentación, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

Serviço de Asesoría al Cliente
Teléfono: +55 31 3439 5454 | E-mail: customerservice@bioclin.com.br

Número de registro del kit BIOLISA COVID-19 ANTICUERPO NEUTRALIZANTE en la ANVISA: 10269360337

Revisión: Junio/2023

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTÁ DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZER

REF K243

INSTRUCTIONS FOR USE

FUNCTION

Test for qualitative determination of the neutralization capacity of total antibodies anti-SARS-CoV-2 in biological samples of serum or plasma (EDTA or Heparin) by inhibiting the formation of the S antigen and ACE2 protein complex (S-ACE2) by competition test. For use only *in vitro* diagnosis.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzyme
The BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZER kit is a solid phase immunoassay based on the principle of qualitative detection by competition of total antibodies anti-SARS-CoV-2 capable of inhibiting the S-ACE2 complex in serum and human plasma samples.
In the initial incubation, Conjugate 1, composed of the protein ACE2 conjugated to Biotin, binds to coated Streptavidin on the microplate. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. In the second incubation, serum and plasma samples containing total antibodies anti-SARS-CoV-2 compete with the ACE2 protein for binding with the Spike Antigen conjugated to Peroxidase present in Conjugate 2, preventing the formation of the S-ACE2 complex. A New wash is performed to remove the total antibodies anti-SARS-CoV-2, linked or not linked to Spike Antigen. After this step, the substrate is added and incubated. An blue color for samples indicates the absence of Total Antibodies anti-SARS-CoV-2 and complex formation between the Antigen Spike conjugated to Peroxidase and ACE2. On the other hand, a lower intensity of the blue color indicates a greater amount of Total anti-SARS-CoV-2 antibodies present in the sample prevented the formation of the S-ACE2 complex. The Stop Solution is added to stop the reaction if there is a color change from blue to yellow, measured on a reader microplate.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8°C. Contains: Plate sensitized with Streptavidin and preservative.
- 2- Conjugate 1** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Biotin-bound recombinant ACE2 protein, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 3- Concentrated Washing** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution (Phosphate <0.5 mol/L, Potassium Chloride <100 mmol/L, Sodium Chloride <5 mol/L), surfactant and preservative.
- 4- Sample Diluent** - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer Solution, stabilizers, surfactant, dye and preservative.
- 5- Conjugate 2** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution containing Spike Antigen linked to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
- 6- Substrate** - Store between 2 and 8°C. Contains: Solution Buffer containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
- 7- Stop Solution** - Store at 2 to 8°C. Contains: Acid Hydrochloride 1 M.
- 8- Negative Control** - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer, stabilizer, surfactant and preservative solution. **Potentially infective.**
- 9- Positive Control** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer Solution, Total Anti-SARS-CoV-2 Antibodies, Dye, stabilizers, surfactant and preservative. **Potentially infecting.**
- 10- Plate Sealers**

PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1 - Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
2- Conjugate 1	1 Vial x 6 mL	2 Vials x 6 mL	5 Vials x 6 mL
3- Concentrated Washing	1 Vial x 50 mL	2 Vials x 50 mL	5 Vials x 50 mL
4- Sample Diluent	1 Vial x 15 mL	2 Vials x 15 mL	5 Vials x 15 mL
5- Conjugate 2	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
6- Substrate	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
7- Stop Solution	1 Vial x 12 mL	2 Vials x 12 mL	5 Vials x 12 mL
8- Negative Control	1 Vial x 300 µL	2 Vials x 300 µL	5 Vials x 300 µL
9- Positive Control	1 Vial x 300 µL	2 Vials x 300 µL	5 Vials x 300 µL
10- Plate Sealers	3 Units	6 Units	15 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials in the kit:

- Reagents described in the above table
- Instructions for use (manual)

Required materials not contained in the kit:

- 1- Pipette capable of dispensing volumes of 10 to 100 µL with lower coefficiente of variation than 1.5%.
- 2- Re-pipettor for repetitive pipetting volumes of 10 to 100 µL, with lower coefficient of variation than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3- Microplate washer (optional).
- 4- ELISA reader capable of absorbance at 450 and 630 nm wavelength.
- 5- Paper towel to dry cavities
- 6- Stopwatch or watch.
- 7- Flask to store the Washing Solution after dilution.
- 8- Distilled or deionized water.
- 9- Tools of Quality Control.
- 10- Incubator 37°C ± 2°C.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The storage temperature and transport should be 2 to 8°C. Keep away from light and avoid humidity. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

- 1- For *in vitro* diagnostic use only.**
- 2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
- 3- The sachet containing the microplate should be opened only after it reaches room temperature. Place the strip with unused cavities in the sachet, seal and store be 2 to 8°C.
- 4- The water used in material cleaning must to be recent and free of contaminants.
- 5- Deionized and saturated columns release alkaline water, several ions and oxidizing and reducing agents that can signifi cantly alter the results.
- 6- Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. Handle it with care.
- 7- All the raw material of product is tested and should be nonreactive for HBsAg, Anti-HIV 1&2 and Anti-HCV. However, these tests do not provide total assurance of the absence of infectious agents. The manipulation of any product containing human serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, we must take due care in handling the bio safety of these products.

- 8- Always add reagents in the same order to minimize the diff erence in reaction time between the cavities.
- 9- As a safety measure, you should cover the plate during the reaction.
- 10- You must ensure that the bottom of the cavity is clean and dry, and there are no bubbles on the surface fl uid before reading the plate. Do not let the cavities run dry during the test.
- 11- Do not expose reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite fumes during storage or incubation steps.
- 12- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
- 13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Service) of Quibasa.
- 14- Do not use the product in case of damaged packaging.
- 15- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or Plasma (EDTA or Heparin)

Hemolysed or highly lipemic samples should not be used. The samples can be kept refrigerated, between 2 and 8°C, for a maximum period of 5 days. If samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at -20°C.

PROCESS DESCRIPTION

PREPARATION OF WORKING REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of the Reagent N° 3 (Concentrate Washing) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation the solution may be stored at 2 to 30°C until expiration date printed on the original bottle. In case of crystallization, heat it at 37°C until dissolution.

Substrate

The Substrate is ready for use.

STABILITY AFTER OPEN

The results of the stability test show that the KIT BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZER is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to the conditions of the test and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using internal kit controls and technique validation criteria.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the SAC (Customer Service).

- Before starting the assay, place all reagents, Controls and Samples to stabilize at room temperature (15 - 30°C) for at least 40 minutes.
- 1- Separate the cavities to be used considering: Controls and Samples (it is recommended to test in duplicate).
- Return unused strips from the microplate to the packaging sealed original.
- 2- Separate the first cavity for Blank (OPTIONAL).
- 3- Pipette 50 µL of Conjugate 1 in all wells, including in the Blank cavity.
- 4- Homogenize gently for ± 30 seconds, cover the cavities with plate sealer.
- 5- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 6- Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer) or by decanting (manual). Use approximately 500 mL of Wash Solution, **previously prepared**, for a total of five (5) washing with a 30-second sauce per cycle.
- Note:** Evaluate the suction and dispensing capacity of the equipment. To guarantee the drying of the plate, at the end of the washing, tap the plate for a few seconds on absorbent paper as washing/Poor drying can cause inadequate results.

- 7- Pipette 50 µL of Sample Diluent into all wells.
- 8- Pipette 10 µL of Sample or Controls into the wells previously determined, then pipette 100 µL of the Conjugate 2 in all wells.
- 9- Homogenize gently for ± 30 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.
- 10- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 11- Remove the plate sealer from the cavities.
- 12- Repeat item 6.
- 13- Pipette 100 µL of Substrate into all wells.
- 14- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.
- 15- Incubate for 15 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 16- Remove the plate sealer from the cavities.
- 17- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
- 18- Gently mix for ± 30 seconds.
- 19- Read using double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Verify if the results obtained by the reading of the Blank and Controls are compatible to the values below:

ITEM	ABSORBANCE
Blank	> 1.000
Negative Control	> 1.200
Positive Control	< 1,000

If the values are out the expected values, you must repeat the technique.

DESCRIPTION OF CALCULATIONS

QUALITATIVE

Reaction Inhibition Percentage Calculation:
% inhibition of reaction=[1-(Sample/NegativeControl)] x100
Example:

ITEM	ABSORBANCES
Negative Control	Negative Control = 2,181
Sample	Sample = 1,013
%=[1-(Sample/NegativeControl)] x100	[1-(1,013/2,181)]x100=53,55%

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the index of the samples, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	QUALITATIVE
Negative	> 30%
Positive	> 35%
Undetermined	Entre 30 or 35%

Note: In the case of an undetermined result, the sample must be re-analyzed. Samples that obtain results repeatedly indeterminate must be retested using an alternative method. If the results remain indeterminate, a new sample must be collected in two weeks. The result of the last sample collected must prevail.. The results provided by this kit should be interpreted by the responsible medical professional, and the sole criterion for determining diagnosis and/or treatment of the patient.

Note: The data presented in the examples are only for illustration and cannot be used to calculate the results.

PROCEDURE LIMITATIONS

The kit is a qualitative assay with the possibility of correlation of the inhibition capacity of the reaction by the analysis in percentage.

There are still no clinical data that establish a relationship between the ability to inhibit the reaction presented in a sample and the clinical status of the patient. The results obtained with the BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZING kit demonstrate only that patients with results < 30% do not have neutralizing antibodies, and samples > 35% do have these antibodies.

Results <30% do not exclude SARS-CoV-2 infection.

Results > 35% may be due to infection by other coronaviruses, although no cross-reactions were evidenced in studies performed during development.

This product simulates the immunodominant inhibition mechanism based on viral neutralization by neutralizing antibodies, blocking the formation of the S-ACE2 immune complex. Patients with positive virus may develop other neutralizing or even non-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, both undetectable by the proposed methodology. All results should be interpreted in conjunction with other clinical information available prior to definitive diagnosis of the disease.

INTERFERENT

No interference was observed for Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rematoid Factor 980 IU/mL, C Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti Streptolysin O 1023 IU/ml.

CROSS REACTIVITY

A study was carried out with 140 negative samples for COVID-19, but positive for other infections. Amongst them, 10 positive samples for Influenza, 27 positive samples for Rhinovirus, 13 positive samples for Syncytial Virus Respiratory, 10 Zika positive samples, 10 samples positive for Dengue, 10 positive samples for Chikungunya, 10 positive samples for Toxoplasmosis, 10 positive samples for Cytomegalovirus, 10 positive samples for Rubella, 10 HIV positive samples, 10 positive samples for HBV and 10 HCV positive samples. It was not observed cross-reactivity with positive samples for Zika, Dengue, Chikungunya, Toxoplasmosis, Cytomegalovirus, Rubella, HIV, HBV and HCV. Despite the results found, it is not possible to completely rule out the possibility of cross-reactivity.

The final diagnosis should consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control, where all procedures, rules, limits and tolerance to variations be clearly established. It is important to mention that all measurement systems present a analytical variety, and it must be monitor by the laboratory. Therefore, it is recommendable the use of controls, allowing the precision and accuracy of the dosages.

PRUDUCT PERFORMANCE**ACCURACY****Repeatability**

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Repeatability	Samples		
	1	2	3
Average	0.262	0.084	1.306
Standard Deviation	0.024	0.011	0.083
Coefficient of Variation (%)	9.141	12.586	6.357

Reproducibility

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Reproducibility	Samples		
	1	2	3
Average	0.262	0.079	1.206
Standard Deviation	0.025	0.007	0.078
Coefficient of Variation (%)	10.125	8.936	6.446

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

To carry out the sensitivity and specificity study 156 clinically known samples were analyzed, 96 positive and 60 negative. The results can be observed in the table below:

	Expected Result	BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZER
Positive Sample	96	93
Negative Sample	60	57
Total Samples Tested	156	

Clinical Sensitivity: 96.87% (93/96) - 95% CI: 88.9% - 100%

Clinical Specificity: 95% (57/60) - 95% CI: 89.62% - 100%

A new clinical sensitivity study was carried out with 70 positive samples for the PRNT gold standard, which are considered positive by the method when they present titer $\geq 1/20$.

A new clinical specificity study was performed with 100 pre-pandemic samples.

Sensitivity (68/70) = 97.1% 95% CI: 93.3 - 100%

Specificity (92/100) = 92.0% 95%CI: 86.9 - 97.1%

The study of detection of neutralizing antibodies in different groups of samples was also carried out. Below are the new data:

Study by sample group:

Grup*	Total evaluated samples	Positive Neutralizing Ac
Group of infected individuals with symptoms > 14 days	37	28
Group of uninfected individuals vaccinated with CORONAVAC (> 30 days after 2nd dose)	73	64

*The data presented above do not represent the sensitivity of the product, but the expression of neutralizing antibodies in different situations per group evaluated in the tested panel.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Coronaviruses (CoV) belong to the Coronaviridae family, and are widely distributed infecting humans and other mammals. In humans, the most common symptoms presented are: fever, cough, dyspnoea, myalgia or fatigue. It can cause diseases ranging from the cold common to more serious diseases, such as the Eastern Respiratory Syndrome (MERS-CoV) and Severe Acute Respiratory Syndrome SARS-CoV. In December 2019, a series of cases of pneumonia caused disease appeared in Wuhan in China, with clinical symptoms very similar to viral pneumonia, after complete sequencing of the respiratory samples was found to be Coronavirus infection, which it was called the new coronavirus (2019-nCoV). In approximately 150 countries on all continents have already been reported cases of infection.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 26(8); 1337–44.2017 AACR
2. WHO. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and sérum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 rev. 2, 2002:31.
3. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
4. Corman VM, Landt O, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019- nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3).
5. Huang C, Wang Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497- 506.
6. Huo, J., Le Bas, A., Ruza, R.R. et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. Nat Struct Mol Biol 27, 846–854 (2020).
7. Quibasa: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439 5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service

Phone: +55 31 3439 5454 | E-mail: customerservice@bioclin.com.br

ANVISA registration for BIOLISA COVID-19 ANTIBODY NEUTRALIZER kit: 10269360337

Review: June/2023

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER