

Versão 5.0

Atualização 09.02.2021

cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit

Instruções de uso

Cat. No.: L00847

96 testes

Apenas para uso no diagnóstico *in vitro*.

O usuário deverá ler esta instrução de uso cuidadosamente antes de utilizar o produto.
Para Uso em Diagnóstico In Vitro.

CONTEÚDO

I.	USO PRETENDIDO	3
II.	INTRODUÇÃO	3
III.	PRINCÍPIO DO ENSAIO	4
IV.	CONTEÚDO DO KIT	4
V.	ARMAZENAMENTO	4
VI.	ADVERTÊNCIAS	5
VII.	PRECAUÇÕES	5
VIII.	REAGENTES E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS	5
IX.	COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	6
X.	PROTOCOLO	6
	Preparo dos Reagentes	6
	Diluição de amostra e controles	6
	Preparação da placa de captura	7
	Procedimento do teste	7
XI.	RESUMO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO	8
XII.	CONTROLE DE QUALIDADE	8
XIII.	INTERPREÇÃO DE RESULTADOS	9
XIV.	INTERPRETAÇÃO DE PONTO DE CORTE [CUTOFF]	9
XV.	LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	9
XVI.	DESEMPENHO	10
XVII.	DESEMPENHO CLÍNICO	11
XVIII.	REFERENCIAS	14
XIX.	SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	15

I. USO PRETENDIDO

O cPass™ SARS CoV 2 é um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) destinado à detecção qualitativa de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 no soro humano e plasma com EDTA. Destina-se ao uso como auxiliar na identificação de indivíduos com uma resposta imune adaptativa à SARS-CoV-2, indicando infecção recente ou prévia. Diferenciar indivíduos ou soros com e sem anticorpos neutralizantes funcionais, bem como a porcentagem de inibição. Neste momento, é desconhecido por quanto tempo os anticorpos persistem após a infecção e se a presença de anticorpos confere imunidade protetora. Os testes são limitados a laboratórios certificados sob o “*Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)*”, 42 U.S.C 263a para realizar testes de alta complexidade.

Os resultados são para a detecção dos anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2. Os anticorpos neutralizantes do SARS-CoV-2 são geralmente detectáveis no sangue vários dias após a infecção inicial, embora o tempo que os anticorpos permanecem após a infecção não está bem caracterizado. Indivíduos podem ter o vírus detectável presente por várias semanas após a soroconversão.

Os laboratórios dos Estados Unidos e seus territórios devem informar todos os resultados positivos às autoridades competentes de saúde pública.

Resultados negativos não excluem infecção aguda por SARS-CoV-2. Se houver suspeita de infecção aguda, testes diretos para SARS-CoV-2 são necessários.

Resultados falsos positivos podem ocorrer devido à reatividade cruzada de anticorpos pré-existentes ou de outras causas possíveis. Os falsos positivos também se devem àqueles em convalescência versus resultados negativos qPCR. Falsos negativos podem ser causados por infecção precoce sem presença de anticorpos versus resultados positivos qPCR.

Este produto é usado sob autorização do *Food and Drug Administration (FDA)* para uso de emergência.

II. INTRODUÇÃO

A síndrome respiratória aguda grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2 ou nCoV 2019) é um vírus de RNA de sentido positivo não segmentado e envelopado. É a causa da doença Coronavírus 2019 (COVID 19), que é contagiosa em humanos.

O SARS-CoV-2 possui várias proteínas estruturais, incluindo *spike (S)*, envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A proteína *spike (S)* contém um domínio chamado *Receptor-Binding Domain (RBD)*, responsável pelo reconhecimento do receptor da superfície celular, enzima de conversão da angiotensina 2 (ACE2). Verificou-se que o RBD da proteína S de SARS-CoV-2 interage fortemente com o receptor ACE2 humano, levando à endocitose em células hospedeiras da porção posterior do pulmão e replicação viral.

A infecção por SARS-CoV-2 inicia uma resposta imune, que inclui a produção de anticorpos no sangue. Os anticorpos secretados fornecem proteção contra futuras infecções por vírus, porque permanecem no sistema circulatório por meses à anos após a infecção e se ligará rápida e fortemente ao patógeno para bloquear as infiltrações celulares e replicação. Estes anticorpos são chamados anticorpos neutralizantes.

III. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit é uma ferramenta de detecção de ELISA por competição. Utilizando o domínio de ligação ao receptor purificado (RBD) a proteína *spike* (S) e o receptor da célula hospedeira ACE2, este teste foi projetado para imitar a interação do vírus com o hospedeiro pela interação direta proteína-proteína em um tubo de ensaio ou poço de uma placa ELISA. A interação altamente específica pode então ser neutralizada, da mesma maneira que em um Teste de neutralização de vírus (VNT) convencional.

O kit contém dois componentes principais: um fragmento recombinante de *Receptor Binding Domain* (RBD) de SARS-CoV-2 conjugado com peroxidase do rábano silvestre (HRP); e a proteína receptora ACE2 humana (hACE2). A interação proteína-proteína entre HRP-RBD e hACE2 pode ser bloqueada pela ação de anticorpos neutralizantes contra o RBD de SARS-CoV-2.

Primeiro, as amostras e os controles são pré-incubados com o HRP-RBD para permitir a ligação dos anticorpos de neutralização circulantes para HRP-RBD. A mistura é então adicionada a placa de captura que é pré-revestida com a proteína hACE2. A HRP-RBD não ligada assim como qualquer HRP-RBD ligado ao anticorpo não neutralizante serão capturados na placa enquanto os complexos de anticorpos neutralizantes circulantes HRP-RBD permanecem no sobrenadante e são removidos durante a lavagem. Após as etapas de lavagem, a solução de TMB é adicionada tornando a cor azul. Adicionando a Solução de Parada [Stop Solution], a reação é extinta, tornando a cor amarela. Esta solução final pode ser lida a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação. A absorbância da amostra é inversamente dependente do título dos anticorpos neutralizantes de anti-SARS-CoV-2.

IV. CONTEÚDO DO KIT

Componente	96 testes	
	Quantidade	Código
Placa de captura	1 placa	S1-80
Controle Positivo	1 frasco (0.05 mL)	S1-10
Controle Negativo	1 frasco (0.05 mL)	S1-11
Conjugado HRP-RBD	1 frasco (0.02 mL)	S1-30
Tampão de Diluição HRP	1 frasco (10 mL)	S1-90
Tampão de Diluição de Amostra	1 frasco (30 mL)	S1-60
Solução de Lavagem 20x	1 frasco (40 mL)	S1-70
Solução TMB	1 frasco (12 mL)	S1-40
Solução de Parada	1 frasco (6 mL)	S1-50
Selador de Placa	2 unidades	NA

* Placa de captura: microplacas de 96 poços (8 poços x 12 tiras) pré-revestidas com proteína ACE2 recombinante; 12 tiras configuradas em placa; Placa selada em um envelope de alumínio com dessecante.

V. ARMAZENAMENTO

O kit fechado é estável até a data de expiração impressa na embalagem, se armazenado de 2°C a 8°C e o kit aberto é estável por até 40 dias a partir da data de abertura se armazenado de 2°C a 8°C.

VI. ADVERTÊNCIAS

Para uso no diagnóstico *in vitro*

1. O material de origem humana usado para preparar os controles incluídos neste kit deve ser manuseado como material potencialmente infeccioso. Use precauções universais ao manusear.
2. Não pipete com a boca.
3. Não fume, coma ou beba em áreas onde são manuseadas amostras ou reagentes do kit.
4. Use luvas descartáveis ao manusear os reagentes do kit e lave bem as mãos depois.
5. Certos componentes deste produto contêm 0,03% de ProClin 300 como conservante, um conservante biocida que pode causar sensibilização em contato com a pele; exposição prolongada ou repetida pode causar reação alérgica em determinados indivíduos sensíveis.
6. Certos componentes são rotulados com o seguinte:

Irritante para os olhos (R 36). Irritante para a pele (R 38). Evite o contato com a pele (S 24). Evite o contato com os olhos (S 25). Em caso de contato com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure orientação médica (S 26). Use roupas de proteção adequadas (S 36). Se ingerido, procure orientação médica imediatamente e mostre este recipiente ou rótulo (S 46).

VII. PRECAUÇÕES

1. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde recomendam que agentes potencialmente infecciosos sejam tratados no Nível 2 de Biossegurança.
2. Não misture componentes de diferentes números de lote. Não misturar com componentes de outros fabricantes.
3. Não utilize reagentes fora do prazo de validade.
4. Todos os reagentes devem permanecer em temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de realizar o teste. Use apenas o volume necessário de reagentes. Não coloque os reagentes de volta nos frascos, pois pode ocorrer contaminação do reagente.
5. Antes de abrir o Controle Positivo e o Controle Negativo, bata o frasco na bancada para garantir que todo o líquido esteja na parte inferior do frasco.
6. Use apenas água destilada ou deionizada e vidrarias/utensílios limpos.
7. Não deixe os poços secarem durante o teste; adicione reagentes imediatamente após as etapas de lavagem.

VIII. REAGENTES E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo com filtro de 450 nm. Leia o manual do operador ou entre em contato com o fabricante do instrumento para estabelecer as especificações de desempenho de linearidade do leitor
- Lavadora de microplacas automatizada para lavar a placa
- Água deionizada ou destilada para diluir a solução de lavagem 20 ×
- Cilindros graduados para preparar a solução de lavagem
- Recipiente plástico para armazenar a solução de lavagem
- Tubos para alíquota e diluição de amostras
- Pipetas de precisão de 10 µL, 200 µL e 1000 µL
- Ponteiros de pipeta de 10 µL, 200 µL e 1000 µL
- Pipetas multicanais
- Reservatório de reagente descartável

- Toalhas de papel
- Cronometro
- Geladeira para armazenar amostras e componentes do kit
- Centrífuga
- Incubadora 37 °C

IX. COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

1. Manuseie todo o sangue e soro como se fosse capaz de transmitir agentes infecciosos.
2. O NCCLS fornece recomendações para o manuseio e armazenamento de amostras de soro e plasma (Procedimentos-padrão aprovados para o manuseio e processamento de amostras de sangue, H18-A. 1990).
2. O armazenamento da amostra de soro para o **cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit** foi determinado como sendo de até 16 dias a 2-8 ° C.
3. Para o desempenho deste produto recomenda-se um volume mínimo de 50 µL por amostra de soro ou plasma, caso seja necessário repetir o teste. As amostras devem ser coletadas assepticamente por punção venosa. A separação precoce do coágulo evita a hemólise do soro.
4. Para o soro humano, use um tubo separador de sangue e deixe a amostra coagular por 30 minutos, depois centrifugue por 10 minutos a 1000 g. Execute o ensaio imediatamente, caso contrário, armazene a alíquota abaixo de -20°C. Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.
5. Para o plasma humano, trate o sangue com o anticoagulante EDTA. Centrifugue por 10 minutos a 1000 g e dentro de 30 minutos para coleta de plasma. Execute o ensaio imediatamente, caso contrário, armazene amostras abaixo de -20°C. Evite repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

X. PROTOCOLO

- Preparação dos reagentes

1. Todos os reagentes devem ser ambientados antes do uso (20°C a 25°C). Guarde todos os reagentes no refrigerador imediatamente após o uso.
2. Todas as amostras e controles devem ser submetidos a agitação (vortex) antes do uso.
3. Preparação de HRP-RBD: Dilua o Conjugado RBD com HRP com uma razão de diluição de 1:1000 com o Tampão de Diluição RBD. Por exemplo, dilua 10 µL de Conjugado HRP com HRP com 10 mL de Tampão de Diluição HRP para fazer uma solução de HRP-RBD.
4. Preparação da Solução de Lavagem de 1x: Dilua a Solução de Lavagem 20x com água deionizada ou destilada com uma proporção de volume de 1:19. Por exemplo, dilua 40 mL de Solução de Lavagem com 760 mL de água deionizada e armazene a solução entre 2°C e 8°C.

Nota: Se observar a presença de precipitado na Solução de Lavagem 20x, incube o frasco em banho-maria (até 50°C) com mistura ocasional até todo o precipitado ser dissolvido.

- Diluição de amostra e controles

Dilua as amostras de teste, Controles Positivo e Negativo com Tampão de Diluição de Amostra com uma proporção de volume de 1:9. Por exemplo, dilua 10 µL da amostra com 90 µL de Tampão de Diluição da Amostra.

- Preparação da Placa de Captura

1. Recomenda-se que todos os Controles Positivos, Negativos e amostras sejam preparados em duplicata.
2. Conte as tiras de acordo com o número de amostras de teste e instale as tiras. Verifique se as tiras estão bem encaixadas na estrutura da placa.

Configuração do teste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle negativo											
B	Controle negativo											
C	Controle positivo											
D	Controle positivo											
E												
F												
G												
H												

3. Deixe as tiras não utilizadas na embalagem e guarde de 2°C a 8°C. As tiras devem ser armazenadas no envelope de alumínio fechado para evitar que a umidade danifique a placa de captura.

- Procedimento do teste

Reação de neutralização

1. Em tubos separados, misture o Controle Positivo diluído, o Controle Negativo diluído e as amostras diluídas com a Solução HRP-RBD diluída com uma proporção de volume de 1:1. Por exemplo, misture 100 µL de Controle Positivo (já diluído) com 100 µL de Solução HRP-RBD. Incubar as misturas a 37°C por 30 minutos ou 45 minutos em temperatura ambiente. Manter a opção de temperatura ambiente ou 37° no próximo passo
2. Transfira 100 µL de cada mistura de Controle Positivo, mistura de Controle Negativo e mistura de amostra aos poços correspondentes da placa recoberta com hACE2.
3. Cubra a placa com o Selador de Placas e incube a 37°C por 15 minutos ou em temperatura ambiente por 25 minutos.
4. Remova o Selador de Placas e lave a placa com 260 µL (ou 300 µL, se em lavadora) de Solução de Lavagem 1x por quatro vezes.
5. Bater a placa no papel toalha para remover o líquido residual nos poços após as etapas de lavagem.

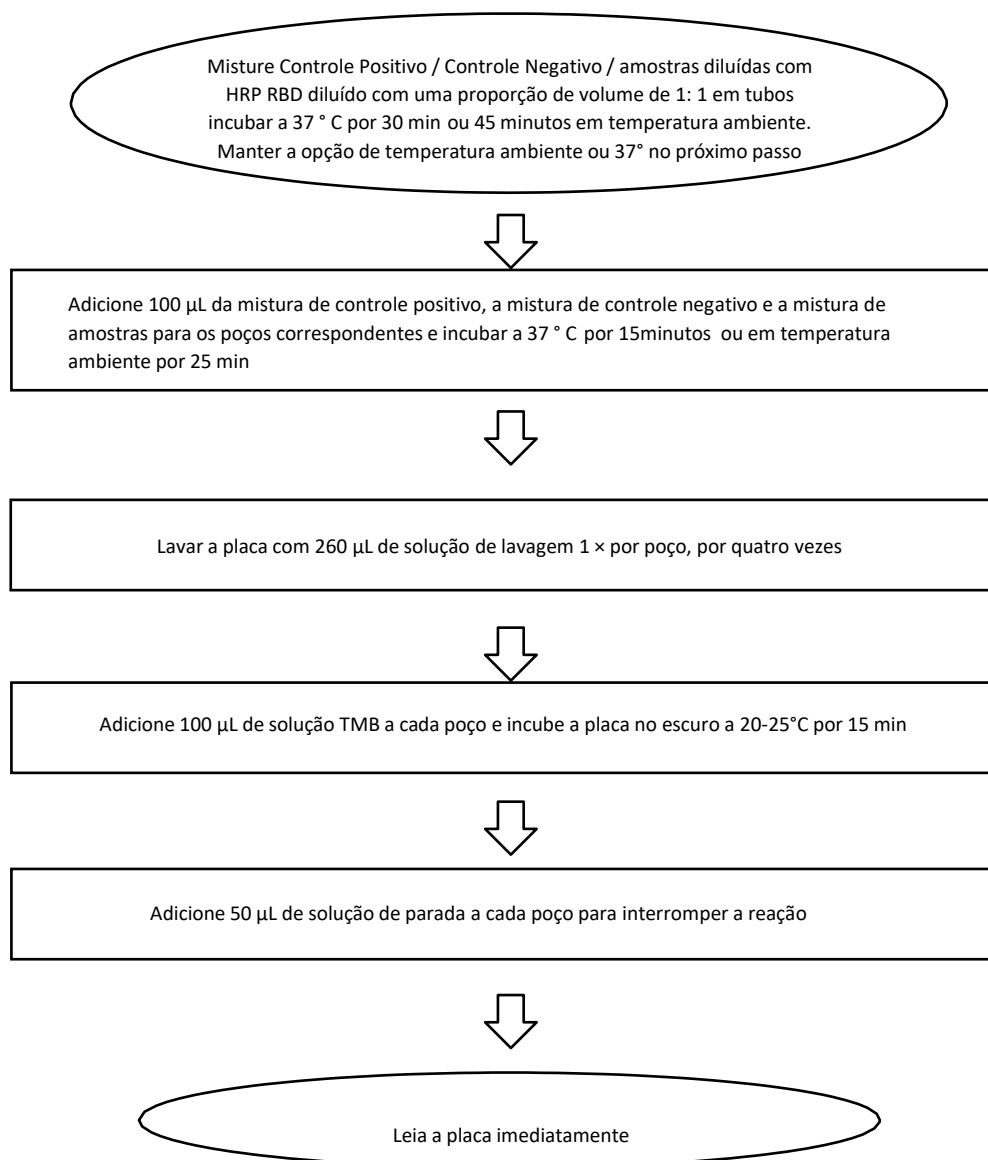
Reação do substrato e medição de absorbância

6. Adicione 100 µL de Solução TMB a cada poço e incube a placa no escuro a 20-25°C por 15 minutos (inicie o tempo após a adição da Solução TMB ao primeiro poço).

7. Adicione 50 μL de Solução de Parada a cada poço para interromper a reação.
8. Leia a absorbância no leitor de placas de microtitulação a 450 nm imediatamente.

Nota: O tempo de reação do substrato é determinado pela temperatura, a temperatura de reação ideal é 25°C. Se a temperatura for inferior a 25°C, prolongar o tempo de reação adequadamente.

XI. RESUMO DO PROCEDIMENTO DE ENSAIO



XII. CONTROLE DE QUALIDADE

Para garantir a validade dos resultados, cada ensaio deve incluir tanto Controle Positivo quanto Negativo. A densidade óptica média (OD450) de cada controle deve estar dentro dos valores listados

na tabela a seguir. Se os valores OD450 dos controles não atenderem aos requisitos em da tabela a seguir, o teste é inválido e deve ser repetido.

- valores de OD 450 para controle de qualidade

Itens	Valores OD 450	Resultado de controle para ensaio válido
Controle de Qualidade	> 1.0	Controle Negativo
	< 0.3	Controle Positivo

Nota: Os padrões na tabela destinam-se apenas a avaliar o desempenho do kit.

XIII. INTERPREÇÃO DE RESULTADOS

O ponto de corte positivo e ponto de corte negativo para detecção de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 pode ser usado para interpretação da taxa de inibição. O operador pode determinar o resultado da amostra comparando a taxa de inibição com a tabela a seguir.

$$\text{Inibição} = \left(1 - \frac{\text{Valor de OD da amostra}}{\text{Valor de OD do Controle Negativo}} \right) \times 100\%$$

XIV. INTERPRETAÇÃO DE PONTO DE CORTE [CUTOFF]

Cutoff	Resultado	Interpretação
≥ 20%	Positivo	Detectado anticorpo neutralizante de SARS-CoV-2
< 20%	Negativo	Não detectado anticorpo neutralizante de SARS-CoV-2

- O valor de corte é baseado em validação painel de soros de pacientes com COVID 19 e que confirmaram presença de Anticorpos Neutralizantes por metodologia PRNT, e um painel de soros negativos.
- Os resultados são reportados qualitativamente como positivos ou negativos para presença de Anticorpos Neutralizantes e reportados como semiquantitativo com sua respectiva taxa de inibição.
- Resultados fraco-positivos (entre 20% a 30% de inibição) devem ser interpretados com cautela, pois encontram-se abaixo da fase exponencial da curva de produção de anticorpos neutralizantes, podendo indicar tanto uma fase basal, como uma tendência a cessar a produção de anticorpos neutralizantes.

XV. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Este teste foi projetado para detecção qualitativa, embora forneça também resultados da taxa de inibição.

- Ainda não está muito claro o significado clínico entre resultados Borderline positivo para Anticorpo Neutralizante (exemplo: 21%) e resultados também positivos, mas com taxa de inibição alta (exemplo: 90%). Estudos realizados com o kit cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit conseguiram caracterizar claramente que soros PRNT positivo (teste de neutralização em placas) obtém resultados acima de 20% de taxa de inibição (concordância 99,9%) e que Soros Convalescentes geram taxa de Inibição acima de 60% (concordância 99,9%).

- Resultados negativos não descartam a infecção por SARS-COV-2, particularmente aqueles que estiveram em contato com o vírus.
- Resultados positivos podem ser devidos a infecção atual ou passada com cepas de vírus não corona SARS-COV-2, como HKU1, NL63, OC43 ou 229E.
- Os resultados deste teste não devem ser usados como único diagnóstico ou para excluir a infecção por SAR-CoV-2 ou para informar o status da infecção.
- Este ensaio foi desenvolvido para detecção de anticorpos Neutralizantes de SARS-CoV-2 pela via RBD-ACE-2. Alguns pacientes podem desenvolver anticorpos contra SARS-Cov-2, porém não desenvolverem anticorpos Neutralizantes (RBD-ACE-2), o que leva um resultado negativo no c-Pass.
- A proposta deste kit é avaliar a capacidade dos anticorpos de neutralizar o vírus através da ligação RBD-ACE-2. Estudos comprovam que este mecanismo é Imunodominante, mas não podemos descartar que existam outros mecanismos de neutralização do vírus, como por exemplo, o Impedimento Estérico. Isto talvez explique resultados de PRNT positivos e que resultam em valores negativos boarderlines no c-Pass.

XVI. DESEMPENHO

Precisão

- **Intra-ensaio:** Uma amostra de um controle conhecido foi diluída no tampão de amostra de acordo com o protocolo do kit e foi testada 10 vezes na mesma placa para avaliação de precisão intra-ensaio. A conclusão foi de que a variação intra-ensaio é menor ou igual a 10%.
- **Inter-ensaio:** Uma amostra de um controle conhecido foi diluída no tampão de amostra de acordo com o protocolo do kit e foi testada em 3 lotes distintos escolhidos randomicamente para avaliação da precisão Inter-ensaio. A conclusão foi que a variação inter-ensaio é menor ou igual a 15%.

Definição de valor de cut-off

Foram executadas 32 amostras normais (Pré-COVID) e realizada a análise ROC. No estudo, a área sob a curva foi analisada e o cut-off de 20% foi escolhido para dar uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 93%.

Reatividade cruzada:

Foram testadas em duplicata 60 amostras. 58 destas resultaram em Negativa (Planilha abaixo) e 2 amostras resultaram em falsos positivos, demonstrando especificidade de 96,7%. Tais resultados cruzados são de soros positivos para SARS-CoV-1. É possível que o mecanismo de interação (RBD-ACE-2) funcione da mesma forma para SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2. Estudos são necessários para comprovar que pacientes com contato prévio com SARS-CoV-1 desenvolveram imunidade para SARS-CoV-2. Por fim, destaca-se que existem apenas 900 casos conhecidos no mundo de SARS-CoV-1, tornando esta reação cruzada não muito relevante do ponto de vista epidemiológico.

Patógeno	Amostras testadas
Coronavírus humano OC43	2
Coronavírus humano 229E	2
Dengue vírus	3
Zika vírus	1
MERS-CoV (Alpaca)	2
Influenza A/B	11

HCV	5
ANA	5
RSV	7
HBV	10
HIV	10

Interferentes:

O teste de interferência preliminar foi executado e não foi detectada interferência para os seguintes possíveis interferentes nas respectivas concentrações:

Interferente	Concentração
Albumina	(50 mg/mL)
Hemoglobina	(10 mg/mL)
Bilirrubina	(0,4 mg/mL)
Triglicerídeos	(15 mg/mL)

XVII. DESEMPENHO CLÍNICO

Ao avaliar o desempenho do cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit, é recomendado dois tipos de abordagem. A primeira abordagem é a comparação com amostras confirmadas positivas com PCR já em produção de anticorpos. A segunda abordagem é a comparação com um outro ensaio de Anticorpos Neutralizantes.

Comparação com pacientes infectados por SARS-Cov-2: Amostras de soro de um grupo de pacientes foram testadas usando este kit. O grupo combinado consistiu em amostras de pessoas saudáveis normais (n = 86) e amostras de pacientes com RT-PCR confirmados positivo para SARS-CoV-2 (n = 133). Não foram estudadas por outro método comparativo se os pacientes produziram anticorpos Neutralizantes ou não. Portanto, o estudo abaixo compara apenas pacientes infectados por SARS-Cov-2 (PCR positivo) que desenvolveram anticorpos.

		RT-PCR ou Negativo Presumido	
		Positivo (n = 133)	Negativo (n = 86)
cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit	Positivo	125	3
	Negativo	8	83
	Percentual de concordância positiva	94.0%	
	Percentual de concordância negativa		96.5%

Comparação com ensaio de Neutralização em Placas (PRNT): O ensaio denominado PRNT (Neutralização em Placas) é considerado o padrão ouro para detecção de anticorpos Neutralizantes. Foram comparadas 66 amostras, sendo 20 negativas PRNT e 46 positivas PRNT. Das 20 Negativas PRNT, 20 também resultaram negativas no cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit (Taxa de inibição abaixo de 20%). Das 46 amostras positivas em PRNT, 42 resultaram positivas no cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit. As taxas de inibição das 4 amostras que foram positivas no PRNT, porém negativas no cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit foram: 12%, 17%, 20% e 17%.

- Concordância cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit e PRNT: 62/66 (94% de concordância)

Repetibilidade

Conclusão:

- 1) 0% CV para Inter-execuções (3 execuções, 3 dias, 1 lote de reagente) estão dentro dos critérios de aceitação.
- 2) 0% CV para Interoperadores (3 execuções, 3 dias, 2 operadores) estão dentro dos critérios de aceitação.

Amostra	% de inibição entre lotes		% de inibição entre operadores	
	DP	CV%	DP	CV%
Positiva	1,457	1,7	1,556	1,8
Médio Positiva	2,902	4,0	2,646	3,6
Baixo Positiva	4,147	6,6	5,174	8,3
Negativa	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos

Reprodutibilidade

Conclusão:

- 1) 0% CV para Inter-Lotes (3 lotes de reagentes, 3 execuções (3 dias), 2 operadores) estão dentro dos critérios de aceitação.
- 2) 0% CV para Inter-Dias (3 dias, 2 operadores, 3 lotes) estão dentro dos critérios de aceitação.
- 3) 0% CV para Interoperadores (2 operadores, 3 dias, 3 lotes de reagentes) estão dentro dos critérios de aceitação.

Amostra	% de inibição entre lotes		% de inibição entre dias		% de inibição entre operadores	
	DP	CV%	DP	CV%	DP	CV%
Positiva	0,919	1,1	0,323	0,4	1,651	1,9
Médio Positiva	2,363	3,3	0,644	0,9	1,638	2,3
Baixo Positiva	2,494	4,0	0,466	0,8	3,455	5,6
Negativa	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos	Resultados negativos

As amostras foram coletadas para desempenho clínico utilizando RT-PCR como o ensaio padrão ouro ou negativos presumidos coletados como reagentes cruzados de acordo com o protocolo PR20-003-3 e PR20-003-1. Para uma avaliação verdadeira comparativa de método, essas mesmas amostras positivas e negativas de RT-PCR conhecidas (RT-PCR negativas ou presumivelmente negativas) também foram avaliadas utilizando um ensaio de neutralização por redução de placa de vírus vivo, considerado o padrão ouro para análise de anticorpos neutralizantes para a maioria dos vírus, incluindo SARS-CoV-2.

O ensaio de Neutralização em Placas (PRNT) é considerado o padrão ouro para detecção de anticorpos Neutralizantes. Foram comparadas 112 amostras, sendo 88 negativas PRNT e 26 positivas PRNT. Das 20 Negativas PRNT, 20 também resultaram negativas no cPass™ SARS CoV 2 Neutralization

Antibody Detection Kit (Taxa de inibição abaixo de 30%). Das 88 amostras negativas em PRNT, 88 resultaram negativas no cPass™ SARS CoV 2 Neutralization Antibody Detection Kit.

		PRNT	
		Positivo (n = 26)	Negativo (n = 88)
cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit	Positivo	26	0
	Negativo	0	88
	Percentual de concordância positiva	100.0% (95% CI, 87.1- 100.0%)	
	Percentual de concordância negativa		100.0% (95% CI, 95.8- 100.0%)

Comparação de Método/ Realidade Clínica (de todos os dados)			
		RT-PCR ou Negativo presumido	
		Positivo (n = 133)	Negativo (n = 86)
cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit	Positivo	122	3
	Negativo	11	83
	Percentual de concordância positiva	91.7% (95% CI, 85.8- 95.3%)	
	Percentual de concordância negativa		96.5% (95% CI, 90.2-98.8%)

Comparação de Método/ Realidade Clínica (Positivos)				
Dias após início dos sintomas	# de PCR positivos em qualquer momento	cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit		
		# Resultados positivos	PPA	95% CI
≤ 7	0	0	N/A	N/A
8-14	9	9	100%	70.1-100%
≥ 15	33	33	100%	89.6-100%
Desconhecido	5	5	100%	56.6-100%

Comparação de Método/ Realidade Clínica (Positivos)				
Dias da coleta de soro vs teste de PCR	# de PCR positivos em qualquer momento	cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit		
		# Resultados positivos	PPA	95% CI
≤ 7	27	18	66.7%	47.8-81.4%
8-14	15	14	93.3%	70.2-98.8%
≥ 15	42	41	97.6%	87.7-99.6%
Desconhecido	2	2	100%	34.2-100%

Comparação de Método/ Realidade Clínica (Positivos)				
---	--	--	--	--

Dias após início dos sintomas ou coleta de soro vs teste de PCR (combinado)	# de PCR positivos em qualquer momento	cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit		
		# Resultados positivos	PPA	95% CI
≤ 7	27	18	66.7%	47.8-81.4%
8-14	24	23	95.8%	79.8-99.3%
≥ 15	75	74	98.7%	92.8-99.8%
Desconhecido	7	7	100%	64.6-100%

XVIII. REFERENCIAS

1. Chinese Center for Disease Control and Prevention (2020) Public protection guidelines for Novel coronavirus pneumonia, People's Medical Publishing House (PMPH).
2. ZHOU Peng, YANG Xinglou. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020.
3. XUE Xiongyan, ZHU Changlin, HUANG Shaozhen, Inactivation of 2019 new coronary virus before antibodies detection by different methods. *Journal of Southern Medical University*, 2020.
4. SHI Heshui, HAN Xiaoyu, FAN Yanqing. Radiologic Features of Patients with 2019-n Co V Infection. *Journal of Clinical Radiology*, 2020.
5. NCCLS. 1991. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Internal Quality
6. Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. NCCLS Publication C3-A3.
7. NCCLS. 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. NCCLS Publication C3-A3.
8. Melissa L. Tuck et al. Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collections: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Integration Working Group. *J Proteome Res* 2009.
9. Chee Wah Tan et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction. 2020. Preprint on ResearchSquare : doi: <https://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-4574/v1>.

XIX. SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Causa Provável	Solução
Baixa Precisão	Os poços não lavados ou aspirados corretamente.	Verifique se o equipamento de lavagem está funcionando adequadamente e os poços estão secos após aspiração.
	Os poços foram riscados com as ponteiras ou agulhas de lavagem.	Dispensar e aspirar a solução para dentro e para fora dos poços com cautela.
	Partículas foram encontradas nas amostras.	Remova todas as partículas por centrifugação antes do ensaio.
Sinal Fraco/Sem sinal	O substrato não é adicionado ou adicionado na hora errada.	Siga o manual para adicionar o substrato corretamente.
	Os componentes são usados a partir de outros lotes ou fontes.	Use apenas lote componentes específicos.
	O substrato está contaminado.	Usar novo substrato com o mesmo lote.
	O volume dos reagentes não está correto.	Repita o ensaio com o volumes de acordo com as instruções.
	A placa não foi incubada no tempo e temperatura apropriada.	Siga o manual para repetir o ensaio.
	A placa não é lida imediatamente.	Leia a placa dentro de 5 minutos.
Alto Background	A placa não foi lavada corretamente.	Verifique se o aparelho de lavagem funciona devidamente.
	O substrato está contaminado	Use novo substrato com o mesmo lote.
	Evaporação dos poços durante a incubação.	Execute as etapas de incubação com a seladora de placa em ensaio repetido.
	Tempo e/ou temperatura incorreto de incubação.	Siga o manual para repetir a Ensaio.

Fabricado por:
GenScript USA Inc.
 860 Centennial Ave, Piscataway, NJ 08854
 Estados Unidos da América

Corgenix. Inc
 11575 Main Street Broomfield, CO 80020
 Estados Unidos da América

Importado e Distribuído no Brasil por:
NL COMERCIO EXTERIOR LTDA
 CNPJ 52.541.273/0001-47
 Rua Vigário Albernaz, 367/371
 São Paulo - SP - Brasil
 Registro na ANVISA/MS: 10230730137

SAC: +55 11 5060 4700 +55 11 94203 6150
www.nldiagnostica.com.br
comercial.nl@nldiagnostica.com.br
 Resp. Técnica: Luciana Ramalho Ferrari
 CRBIO/SP 56012/01-D

ALERTA AO USUÁRIO

Observar a correlação da versão indicada nas Instruções de Uso com o produto adquirido, conforme disponibilizado pelo fabricante. Entrar em contato com o distribuidor no Brasil se desejar receber as Instruções de Uso em formato impresso sem custo adicional.

GARANTIA

Garantimos que os produtos atendem as especificações e estão livres de não conformidades. Nossa responsabilidade será limitada a substituição ou reembolso de qualquer montante que não exceda o preço de compra imputável aos produtos.