

**KIT NEUTRA/COVID-19 ELISA
PARA DETECCIÓN CUALITATIVA DE
ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES AL
SARS-CoV-2**

Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.

Almacenamiento de 2 a 8 °C.



Contenido

1. USO DESEADO.....	3
2. RESUMEN.....	3
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA	3
4. REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS.....	4
5. REACTIVOS Y MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS.....	4
6. ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	4
7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DEL KIT.....	5
8. PREPARACIÓN DE REACTIVOS SUMINSTRADOS	5
9. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	5
10. CONTROL DE CALIDAD	6
11. RESULTADOS ESPERADOS	6
12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	6
13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO.....	7
14. PRECAUCIONES Y SEGURIDAD	8
15. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE PRUEBA	10
16. FECHA DE EMISIÓN.....	10
17. SIMBOLOGÍA UTILIZADA.....	11

Este kit es fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.

The logo for Amunet S.A. de C.V. features the word "amunet" in a lowercase, rounded, sans-serif font. The letters are light blue with a subtle gradient and a slight shadow effect, giving it a three-dimensional appearance. The logo is centered horizontally on the page.

1. USO DESEADO

El ensayo para la detección cualitativa de anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2 por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), está intencionado para la detección cualitativa de anticuerpos neutralizantes al virus SARS-CoV-2 en suero humano, marcador de inmunidad ante el virus.

"Solo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico".

2. RESUMEN

En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus, oficialmente nombrado síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), fue identificado en Wuhan China, y es el agente causal del brote de una enfermedad respiratoria aguda asociada al coronavirus llamada, enfermedad por coronavirus 19 (COVID-19). Los signos y síntomas de COVID-19 pueden aparecer de 2 a 14 días después de la infección, estos incluyen fiebre, tos, falta de aliento o dificultades para respirar, dolor muscular y cansancio. En casos severos, la infección puede provocar neumonía, síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), insuficiencia renal y muerte.

El genoma del virus SARS-CoV-2 codifica 4 proteínas estructurales: la proteína S (espiga), la proteína E (envoltura), la proteína M (membrana) y la proteína N (nucleocapside).

La proteína N está en el interior del virión asociada al RNA viral, y las otras tres proteínas están asociadas a la envuelta viral. La proteína S forma estructuras que sobresalen de la envuelta del virus. La proteína S contienen el dominio de unión al receptor de las células que infecta (ACE2), por lo tanto, es la proteína determinante del tropismo del virus. Además, es la proteína que tiene la actividad de fusión de la membrana viral con la célula y de esta manera permite liberar el genoma viral en el interior de la célula que va a infectar.

El cuerpo produce anticuerpos neutralizantes específicamente contra la proteína espiga (PS). Se unen a la proteína impidiendo que esta reconozca al ACE2 y pueda entre a la célula. Por lo tanto, la protección contra infecciones y reinfecciones dependerá de los anticuerpos neutralizantes.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo para la detección cualitativa de anticuerpos neutralizantes del virus SARS-CoV-2 por ELISA es un kit de inmunoensayo que usa el método de sándwich por competencia para la detección de anticuerpos neutralizantes al virus SARS-CoV-2 en suero humano. El pozo esta previamente impregnado con ACE2, al agregar la proteína S marcada con HRP se unirá a la ACE2 que al agregar el sustrato se visualizara una coloración azul, pero si la muestra contiene anticuerpos neutralizantes, estos se unirán a la proteína S e impedirán que se una a la ACE2, provocando que no se observe la coloración azul en el pozo. La solución de paro detendrá la reacción, transformando el color azul en señales amarillas, la cual se cuantifica con un lector de microplacas a una absorbancia de 450 nm. La ausencia de color es proporcional a la cantidad de anticuerpos neutralizantes presentes en la muestra.

3. REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

Reactivos y materiales del kit	No. de contenedores/ unidades	Cantidad/unidades
^[1] Placa ELISA revestida de ACE2	^[2] 1 microplaca de 96 pozos	No Aplica
Buffer de Lavado (10X)	1 frasco	50 mL
Conjugado proteína S del SARS-CoV-2 marcada con HRP (concentrado)	1 tubo	10 µL
Solución diluyente de muestra	1 frasco	5 mL
Solución diluyente de conjugado	1 frasco	25 mL
Sustrato (TMB)	1 frasco	5 mL
Solución de Paro	1 frasco	5 mL
Control Negativo	1 tubo	0.1 mL
Control Positivo	1 tubo	0.1 mL

[1] Las tiras de micropocillos se pueden usar por separado. Coloque los pocillos o tiras no utilizados en la bolsa de almacenamiento plástica sellable junto con el desecante y almacene de 2-8 °C.

Una vez abierto, su estabilidad se mantiene durante 4 semanas a 2-8 °C.

[2] Se presenta en un porta pozos blanco y sellado en una bolsa de aluminio con desecante.

4. REACTIVOS Y MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Micropipetas y puntas desechables para micropipeta.
- Depósitos de reactivos y buffer (RPBI).
- Toallas de papel o papel absorbente.
- Lector de microplacas/Espectrofotómetro con capacidad para leer la absorbancia a 450 nm o doble longitud de onda a 450/600 ~ 650 nm.
- Papel adherente para cubrir la placa.

5. ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Se sugiere analizar las muestras inmediatamente después de su toma y separación de suero o plasma. En caso de no analizarse inmediatamente se debe separar el suero o plasma y almacenarlo en congelación (-20 °C) en alícuotas. Se deben evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Se recomienda analizar la prueba mínimo por duplicado.
- Muestras de suero o plasma (con EDTA, citrato de sodio o heparina) pueden ser analizadas. No se recomienda el análisis de muestras lipémicas, ictericas o con hemólisis. No se deben utilizar muestras con contaminación microbiana visible.
- Cuando sea necesario, se debe aplicar una agitación con vórtex a las muestras de suero o plasma a temperatura ambiente para garantizar la homogeneidad. Después, centrifugue las muestras a 10,000 a 15,000 rpm durante 5 minutos antes del ensayo para eliminar partículas indeseables. No omita este paso de centrifugación si las muestras se presentan turbias y contienen partículas resuspendidas.

6. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DEL KIT

El kit debe almacenarse a 2-8 °C a su recepción, en su caja, evitando exposiciones de luz. Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso. Se debe retirar las tiras recubiertas de antígeno no utilizadas de la microplaca, devolverlas a la bolsa de aluminio y sellar la bolsa nuevamente. Una vez abiertas, las tiras pueden almacenarse a 2-8 °C por hasta un mes. Para asegurar el máximo rendimiento, proteja los reactivos de la contaminación con microorganismos o productos químicos durante el almacenamiento.

7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS SUMINISTRADOS

8.1 Buffer de lavado (10X)

Prepare Buffer de lavado 1X mezclando el Buffer de lavado (2.5 mL) 10X con 22.5 mL de agua destilada. Si se observan precipitados en la botella de Buffer de lavado 10X, caliente el contenedor en un baño maría a 37 ° C y mezcle hasta que desaparezcan los precipitados. El buffer de lavado 1X se puede almacenar a 2-8 °C hasta por un mes.

8.2 Conjugado proteína S-HRP

Tomando en consideración el total de pozos a usar, determine la cantidad de conjugado que deberá usar. Por cada 2 mL de solución se colocará 0.5 µL de conjugado concentrado y 2 mL de solución diluyente de conjugado.

8. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante al menos 30 minutos, antes de usar.

No. de paso	Actividad
Paso 1	Muestras/controles y detección: Agregar 45 µL de solución diluyente de muestra, a cada pozo a usar. Colocar 5 µL de control positivo, control negativo y muestra (duplicados) en distintos pozos, preferentemente contiguos. Usar una punta para pipeta desechable para cada muestra, control positivo y control negativo para evitar contaminación cruzada. Agregar 100 µL de conjugado de proteína S con HRP. Mezcle golpeando suavemente la placa. Cubrir la placa e incubar a 37 °C por 30 minutos.
Paso 2	Lavado: Desechar la solución de todos los pozos. Lavar cada pocillo 5 veces, agregando 300 µL de solución de lavado a cada uno. Desechar la solución de lavado de los pocillos en cada lavado. Retirar completamente los residuos de la solución de lavado golpeando la placa contra un papel secante.

Paso 3	Reacción colorante: Agregar 50 µL de la solución de sustrato a cada pocillo, incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Proteja de la luz.
Paso 4	Reacción de paro: Agregue 50 µL de solución de paro a cada pocillo, mezcle suavemente con un agitador de placas o manualmente, garantizando una mezcla completa.
Paso 5	Medición: Mida la absorbancia de cada pocillo a 450 nm inmediatamente. Nota: Leer la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción de paro.

9. CONTROL DE CALIDAD

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente.

Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad. Se recomienda que cada laboratorio establezca un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra analizada.

10. RESULTADOS ESPERADOS

Muestra	Rango de D.O. detectada a 450 nm
Control negativo	≤ 0.40
Control positivo	≥ 0.20
Muestras de suero de pacientes con anticuerpos neutralizantes a SARS-CoV-2	≥ 0.3
Muestras de suero de pacientes sin anticuerpos neutralizantes a SARS-CoV-2	≤ 0.40

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia negativo y positivo. Además, también se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras de control en el ensayo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A continuación, se mencionan las limitaciones del procedimiento:

- Hiperlipidemia, muestras hemolizadas, muestras contaminadas con microorganismos, muestras con descongelamiento repetitivo y/o muestras inactivadas podrían afectar la precisión del ensayo y generar resultados erróneos.
- Las muestras con ictericia grave o contaminación grave producirán resultados incorrectos.
- La presencia de azida de sodio en la muestra afecta los resultados del ensayo. La azida de sodio no se debe utilizar como conservador de muestras.
- Si la microplaca no se lava adecuadamente o presenta líquidos residuales, puede causar alteraciones a los resultados.
- Si el intervalo de tiempo de adición de muestra o reactivos es demasiado largo, puede causar alteraciones a la prueba y los resultados.

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

- **Reactividad cruzada:** La reactividad cruzada del kit de ELISA para la detección de anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2 se evaluó por duplicado para distintos anticuerpos contra Influenza A, VIH y otros Coronavirus. Ninguno de los anticuerpos enumerados reaccionó de forma cruzada con el kit para la detección cualitativa de Anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2 y por lo tanto sin generar resultados falsos positivos.
- **Interferencias endógenas/exógenas:** Suero positivo a anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2 y el suero negativo a anticuerpos neutralizantes al SARS-CoV-2 enriquecido con una de las siguientes sustancias a concentraciones especificadas y probado en múltiples repeticiones. No se encontraron resultados de falsa positividad o falsa negatividad.

No.	Sustancia de interferencia	Concentración	Resultado
1	Bilirrubina	4.76 mg/mL	Sin interferencia
2	Colesterol	163 mg/mL	Sin interferencia
3	Creatinina	3.84 mg/mL	Sin interferencia
4	Glucosa	200 mg/mL	Sin interferencia
5	Cafeína	20 mg/mL	Sin interferencia
6	Urea	103 mg/mL	Sin interferencia
7	Ácido acetilsalicílico	10 mg/mL	Sin interferencia
8	Ácido ascórbico	10 mg/mL	Sin interferencia
9	Acetaminofén	10 mg/mL	Sin interferencia

- Sensibilidad, Especificidad y Precisión: Se analizaron 16 muestra de pacientes con previo diagnostico SARS-CoV-2 positivo por RT-PCR.

Método		RT-PCR		Total
KIT NEUTRA/COVID-19	RESULTADO	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Positivo (+)	5	1	6
	Negativo (-)	0	10	10
Resultados totales		5	11	16

Sensibilidad Relativa: 100% (95% CI *: 80.64% ~ 100%)

Especificidad Relativa: 90.91% (95% CI *: 68.06% ~ 100%)

Precisión Global: 93.75% (95% CI *: 71.67% ~ 100%)

*Intervalo de Confianza

- Estudios realizados con esta prueba: Se analizaron 32 pacientes de los cuales 12 eran vacunados y 20 no, con el presente Kit para la detección de anticuerpos neutralizantes.

Método		Vacunados		Total
KIT NEUTRA/COVID-19	RESULTADO	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Positivo (+)	11	1	12
	Negativo (-)	1	19	20
Resultados totales		12	20	32

Sensibilidad Relativa: 91.67% (95% CI *: 80.64% ~ 100%)

Especificidad Relativa: 95.00% (95% CI *: 68.06% ~ 97.91%)

Precisión Global: 93.75% (95% CI *: 71.67% ~ 98.89%)

*Intervalo de Confianza

13. PRECAUCIONES Y SEGURIDAD

Los ensayos ELISA son sensibles al tiempo y a la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.

1. No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo de los ensayos.
2. Asegúrese de que todos los reactivos no presenten fecha de caducidad vencida (indicada en la caja del kit). No use reactivos con fecha de caducidad vencida (indicada en las etiquetas o cajas).
3. **PRECAUCIÓN: Paso crítico.** Permita que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (20-25 ° C) antes de su uso. Agite el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a 2-8 °C inmediatamente después de su uso.
4. Use solo el volumen suficiente de muestra cómo se indica en los pasos del procedimiento de ensayo, de lo contrario, puede provocar baja sensibilidad del ensayo.

5. No toque el fondo exterior de los pozos, las huellas digitales o los rasguños pueden interferir con la lectura. Al leer los resultados, asegúrese de que el fondo de la placa esté seco y que no haya burbujas de aire dentro de los pozos.
6. Nunca permita que los pozos de la microplaca se sequen después del paso de lavado. Inmediatamente proceda al siguiente paso. Evite la formación de burbujas de aire al agregar los reactivos.
7. Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los pozos.
8. Calibre la pipeta con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivos para evitar contaminaciones cruzadas.
9. Al agregar muestras o reactivos, no toque el fondo del pozo con la punta de la pipeta.
10. Mida con un lector de placa o espectrofotómetro, determine la absorbancia a 450 nm.
11. La actividad enzimática del conjugado HRP podría verse afectada por el polvo y los químicos reactivos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas.
12. Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) puede garantizar la seguridad del personal.
13. Nunca coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio de análisis.
14. Los productos químicos deben manipularse y eliminarse solo de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio vigentes y las reglamentaciones locales o nacionales aplicables.
15. Las puntas de las pipetas, los viales, las tiras y los recipientes de muestras deben recogerse y esterilizarse en autoclave durante no menos de 15 min a 15 psi o tratarse con hipoclorito de sodio al 10% durante 30 minutos para descontaminar antes de cualquier paso adicional de eliminación. Las soluciones que contienen hipoclorito de sodio **nunca** deben esterilizarse en autoclave. Las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) se encuentran disponibles a solicitud del interesado.
16. Algunos reactivos pueden causar toxicidad, irritación, quemaduras o tener un efecto cancerígeno. Se debe evitar el contacto con la piel y mucosas.
17. La solución de paro es un ácido, úselo con el cuidado apropiado, limpie los derrames inmediatamente y lave sus manos con abundante agua si entra en contacto con la piel o los ojos.

14. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE PRUEBA

Agregar 45 μl de solución diluyente de muestra, más 5 μl de muestra y/o control. Agregar 100 μl de proteína S-HRP. Homogenice.

↓

Incubar por 30 minutos a 37 °C.

↓

Retire residuos. Lavar con 300 μl de solución de lavado 1X, con 5 réplicas.

↓

Agregue 50 μl de solución de sustrato a cada pozo.

↓

Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.

↓

Agregue 50 μl de solución de paro a cada pozo.

↓

Mida la absorbancia de cada pozo a 450 nm.














↓

Interprete los resultados

15. FECHA DE EMISIÓN

Mayo, 2021

16. SIMBOLOGÍA UTILIZADA

Símbolo	Descripción
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Lote
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
	No use si el empaque se encuentra dañado
	Consulta instrucciones de uso
	Temperatura límite 2°C~8°C.
	Contiene 96 pozos
	No se reúse
	Precaución
	Mantener seco