

Human Anti-IgG/A/M SARS-CoV-2 ELISA

Apenas para diagnóstico *in vitro*

Código do produto: MK654/MK654.10

Produto fabricado por:
The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK
www.bindingsite.com
Telephone: +44 (0)121 456 9500
e-mail: info@bindingsite.com



1 INDICAÇÕES DE USO

O Human Anti-IgG/A/M SARS-CoV-2 ELISA é um ensaio de imunoadsorção enzimática destinado à detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgA e IgM para a proteína spike SARS-CoV-2 em soro humano e extração de gota de sangue seco. O Anti-SARS-CoV-2 IgG/A/M humano ELISA destina-se à identificação de soroconversão em resposta à exposição a SARS-CoV-2.

2 CONTEXTO

O SARS-CoV-2 é um *Betacoronavirus* da família *Coronaviridae*, sendo o agente patológico da COVID-19⁽¹⁾. O SARS-CoV-2 é transmitido, sobretudo, de pessoa para pessoa via gotículas respiratórias; no entanto, o vírus pode resistir e permanecer ativo em superfícies por longos períodos⁽²⁾.

Os sintomas comuns da COVID-19 incluem febre, tosse persistente, cansaço, falta de ar, dor de garganta e perda ou alteração do olfato ou paladar. Quando a doença apresenta um quadro grave, pode causar a Síndrome da Deficiência Respiratória Aguda (SDRA), pneumonia e morte⁽³⁾.

Dada a variedade de sintomas e a falta de características clínicas distintas, é de fundamental importância compreender a prevalência da infecção. Os exames diagnósticos para a COVID-19 incluem testes moleculares, tais como o RT-PCR, que são utilizados para detectar os pacientes que apresentam infecção ativa. Os exames para detecção de anticorpos podem identificar a soroconversão em pacientes que foram anteriormente expostos ao vírus SARS-CoV-2⁽⁴⁾.

3 PRINCÍPIO DO TESTE

Os micropoços são pré-revestidos com antígeno de proteína spike SARS-CoV-2. Os calibradores, controles e amostras diluídas do paciente são adicionados aos poços e os anticorpos que reconhecem o antígeno SARS-CoV-2 se ligam durante a primeira incubação. Após lavar os poços para remover todas as proteínas não ligadas, é adicionado o conjugado anti-IgG, IgA e IgM humana (específico para a cadeia γ , α , μ) marcado com peroxidase purificada. O conjugado se liga ao anticorpo humano capturado e o excesso de conjugado não ligado é removido por um novo passo de lavagem. O conjugado ligado é visualizado com substrato de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), gerando um produto de reação azul. Sua intensidade é proporcional à concentração de anticorpo na amostra. Ácido fosfórico é adicionado a cada poço a fim de parar a reação. Isso produz uma cor de ponto final amarela, que é lida a 450 nm.

4 MATERIAIS

4.1 MATERIAIS FORNECIDOS – kit com 1 placa ou 10 placas

- 4.1.1 *Poços revestidos*: 1 ou 10 placas com 96 poços revestidos com antígeno spike trimérico SARS-CoV-2. Cada placa é acondicionada em embalagem de alumínio que pode ser fechada novamente, contendo duas bolsas de sílica gel
- 4.1.2 *Diluinte da amostra*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 50 mL de tampão para diluição da amostra. Cor amarela, pronto para o uso.
- 4.1.3 *Tampão de lavagem*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 50 mL de tampão concentrado 20 vezes para lavagem dos poços.
- 4.1.4 *Calibrador cut-off*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 0,5 mL do anticorpo monoclonal diluído para o antígeno spike trimérico SARS-CoV-2. Pronto para o uso.
- 4.1.5 *Controle alto*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 0,5 mL de soro humano diluído. Pronto para o uso.
- 4.1.6 *Controle negativo*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 0,5 mL de soro humano diluído. Pronto para o uso.
- 4.1.7 *Conjugado*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 14 mL de anticorpo marcado com peroxidase purificada para IgG, IgA e IgM humana. Pronto para o uso.
- 4.1.8 *Substrato TMB*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 14 mL de substrato TMB. Pronto para o uso.
- 4.1.9 *Solução de parada da reação*: 1 ou 10 frascos, cada um contendo 14 mL de ácido fosfórico 3M. Pronto para o uso.

4.2 MATERIAIS FORNECIDOS ELETRONICAMENTE PODEM SER ACESSADOS EM: <https://edocs.bindingsite.com>

- 4.2.1 *Certificado CQ E654.QC*: Indica o coeficiente do calibrador específico do lote.
- 4.2.2 *Instruções de Uso E654*

4.3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS ADICIONAIS - não fornecidos

- 4.3.1 Lavadora automática de microplacas: Recomenda-se o uso de uma lavadora automática de microplacas, apesar da lavagem das placas também poder ser realizada manualmente.
- 4.3.2 Leitor de placas: Capaz de medir a absorbância em 450 nm referenciadas no ar.
- 4.3.3 Água destilada ou deionizada: Deve ser da mais alta qualidade disponível.
- 4.3.4 Micropipetas calibradas: Para distribuir 1000, 100 e 10 μ L.
- 4.3.5 Pipeta multicanal: Recomendada para distribuir volumes de 100 μ L de conjugado, substrato e solução de parada da reação.
- 4.3.6 Tubos de vidro/plásticos: Para diluição da amostra.

5 PRECAUÇÕES

Todos os doadores do soro humano fornecido neste kit tiveram seus soros testados e demonstraram ser negativos para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV1 e HIV2), bem como do vírus da hepatite C. Os testes usados foram aprovados pela FDA (EUA) ou liberados para uso em diagnósticos *in vitro* na UE (Diretriz 98/79/CE, Anexo II); no entanto, tais testes não são capazes de garantir a ausência de agentes infecciosos. Devem ser estabelecidos métodos apropriados de manuseio e descarte de todo o material potencialmente infectado, incluindo, entre outros, o uso constante de vestimentas e equipamentos de proteção adequados. Apenas funcionários que tenham recebido treinamento integral em tais métodos devem ter permissão de realizar estes procedimentos.

AVISO: Este produto contém azida sódica e ProClin™, necessitando ser manipulado com cuidado. Luvas adequadas e outros equipamentos de proteção devem ser usados sempre que este produto for manipulado. Não ingerir, nem permitir que o produto entre em contato com a pele (principalmente pele rachada ou com feridas abertas) ou membranas mucosas. Se ocorrer o contato, lave com água corrente em abundância e procure imediatamente um médico. Azidas de metais explosivos podem ser formadas devido ao contato prolongado da azida sódica com encanamentos de chumbo e de cobre. Ao descartar o reagente, lave com água corrente em abundância para evitar o acúmulo de azida.

Os tampões e soro fornecidos neste kit contêm várias enzimas inibidoras, conforme listado abaixo. Elas são perigosas e devem ser manuseadas com cuidado.

INIBIDOR	CONCENTRAÇÃO
Azida sódica	0,099%
ProClin 300	0,045%-0,08%
Bromonitrodioxano	0,002%
Metilisotiazolona	0,002%

A solução de parada da reação contém ácido fosfórico 3M, que pode causar irritação. Evite o contato com a pele ou os olhos. Respingos de reagente devem ser limpos de forma apropriada, observando as regulações locais e ambientais.

CUIDADO: Este produto deve ser usado apenas por pessoal adequadamente treinado. Recomenda-se observar o protocolo informado. Qualquer desvio pode afetar o desempenho do teste e os resultados obtidos. Atenção às “**Observações**” e avisos específicos nestas Instruções de Uso.

Os reagentes de kits com números de lotes diferentes **NÃO** são intercambiáveis. Caso sejam realizados muitos testes, é preciso certificar-se de que todos os reagentes são do **MESMO** lote. Todas as tiras utilizadas devem ser retiradas da mesma embalagem de alumínio. A substituição de qualquer componente pode causar resultados incorretos.

Para evitar contaminação do reagente, especialmente do conjugado e dos calibradores, use somente material de plástico/vidro novo ou limpo. NUNCA devolva reagente não utilizado para o frasco.

Não deixe os frascos de reagente destampados; qualquer evaporação ou contaminação resultante causará resultados inconsistentes.

O substrato TMB não deve ser exposto à luz nem à água.

Não devem ser usados soros contaminados com microrganismos, hemolisados, lipêmicos e amostras que contenham material particulado.

A diluição imprecisa da amostra não pode ser verificada, pois os controles do kit estão prontos para o uso. Recomenda-se o uso de pipetas calibradas e amostras de CQ internas apropriadas.

Quando forem utilizados sistemas de teste e diluidores de amostra automatizados, bem como outros equipamentos automatizados, siga cuidadosamente as instruções do fabricante. Deve-se ficar atento à configuração do equipamento e à instalação e conexão com serviços externos. Todas as configurações de lavadoras e leitores automáticos devem ser cuidadosamente seguidas. A manutenção do equipamento deve ser feita de acordo com as instruções do fabricante.

6 COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras devem ser obtidas por punção venosa e, no caso de plasma, separadas o mais rápido possível. O sangue deve coagular e o soro deve ser separado assim que possível, para evitar hemólise. Os soros podem ser armazenados a uma temperatura de 2-8°C por até oito dias; alternativamente, divida-os em alíquotas e congele-os a -20°C ou a temperatura inferior, no caso de armazenamento prolongado. Deve-se evitar o congelamento/descongelamento repetidos. Centrifugar as amostras que contêm precipitados antes de realizar o teste.

Extrações de gota de sangue seco podem ser realizadas usando os métodos de laboratório para extração de proteína. É responsabilidade individual do laboratório usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para o próprio laboratório⁽⁵⁾.

7 PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE

7.1 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

O kit deve ser armazenado a 2-8°C. Não deve ser congelado. Temperaturas de armazenamento inadequadas afetarão os resultados. O tampão de lavagem diluído em um recipiente limpo pode ser armazenado a 2-8°C durante, no máximo, 4 semanas. A data de validade do kit é indicada na etiqueta externa. O calibrador e os controles podem ser armazenados por até 15 dias depois de abertos, desde que estejam tampados para evitar a evaporação e sejam armazenados em um refrigerador a 2-8°C.

7.2 PREPARAÇÃO

- 7.2.1 **Traga os componentes do kit para temperatura ambiente:** Retire os componentes do kit da geladeira e deixe-os em temperatura ambiente (20-24°C) por aproximadamente 60 minutos. Os poços **não** devem ser retirados da embalagem de alumínio até alcançarem a temperatura ambiente. Os kits podem ser mantidos em temperatura ambiente durante até 1 semana.
- 7.2.2 **Componentes do kit:** Misture delicadamente cada componente do kit antes de seu uso
- 7.2.3 **Diluição do tampão de lavagem:** O tampão de lavagem é diluído 1/20 em água destilada, por exemplo, 50 mL de concentrado de tampão de lavagem para 950 mL de água destilada. O tampão diluído pode ser armazenado a 2-8°C por até 4 semanas.
- 7.2.4 **Diluição da amostra:** Dilua 10 μ L de cada amostra com 390 μ L de diluinte da amostra (1/40) e misture bem.
- 7.2.5 **Kit de calibrador e controles:** Pré-diluído. Pronto para o uso (não é necessário diluir 1/40).
- 7.2.6 **Manuseio de tiras e molduras:** Coloque o número necessário de poços no suporte de tiras. Posicione a partir do poço A1, enchendo as colunas da esquerda para a direita na placa. Ao manusear a placa, aperte as bordas longas da moldura para evitar que os poços caiam. Devolva imediatamente os poços não usados para a embalagem de alumínio com as duas bolsas de sílica gel e sele novamente para

minimizar a exposição à umidade. Preste atenção para não furar ou rasgar a embalagem de alumínio.

AVISO: A exposição dos poços à umidade ou contaminação por poeira ou outra matéria particulada resultará em degradação do antígeno, resultando em baixa precisão do teste e resultados potencialmente falsos.

8 MÉTODO DO TESTE

8.1 Adição de amostra

Adicionar 100 µL de cada calibrador, controle e amostra diluída (1/40) nos poços apropriados da placa fornecida, deixando dois poços para o calibrador e um único poço para controle e amostra diluída por teste. As amostras devem ser adicionadas o mais rápido possível à placa a fim de minimizar o desvio do teste. O temporizador deve ser iniciado após a adição da última amostra. **Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos.**

8.2 Lavagem

Após a incubação, esvazie os poços e lave 3 vezes com 250-350 µL de tampão de lavagem por poço. A placa pode ser lavada manualmente ou usando uma lavadora automática de microplacas. Após a lavagem final, inverta a placa e bata gentilmente em papel absorvente para auxiliar na secagem absorvente.

8.3 Adição de conjugado

Adicionar 100 µL de conjugado em cada poço. Incube em temperatura ambiente por 30 minutos. Para evitar contaminação, não retorne o excesso de conjugado ao frasco de reagente.

8.4 Lavagem

Após a incubação, esvazie os poços e lave como descrito acima.

8.5 Adição de substrato (TMB)

Adicionar 100 µL de substrato TMB em cada poço. Incube em temperatura ambiente no escuro por 10 minutos. Para evitar contaminação, não retorne o excesso de substrato TMB ao frasco de reagente.

8.6 Parada da reação

Adicionar 100 µL de solução de parada da reação em cada poço na mesma ordem e velocidade com que o substrato TMB foi adicionado a cada poço.

8.7 Leitura da absorbância

Leia a absorbância de cada poço a 450 nm em um leitor de microplaca, até 30 minutos após a parada da reação.

Analísadores automáticos

Os protocolos estão disponíveis para alguns modelos específicos de analisadores automáticos, estão disponíveis mediante solicitação ao seu representante local da Binding Site. Protocolos de teste desenvolvidos para plataformas alternativas devem ser totalmente validados antes do uso.

9 RESULTADOS E CONTROLE DE QUALIDADE

9.1 Calculando as razões dos resultados

Os resultados devem ser fornecidos através da razão da absorbância da amostra sobre a absorbância do calibrador cut-off, multiplicada pela concentração do kit calibrador. A concentração do calibrador é atribuída no lançamento do produto e indicado no certificado CQ.

$$\text{Concentração do calibrador} \times \left(\frac{\text{Absorbância (OD) da amostra}}{\text{Absorbância (OD) do calibrador cut-off}} \right) = \text{Resultado}$$

9.2 Interpretação de resultados

É recomendado que os resultados de amostra sejam interpretados de acordo com a tabela a seguir:

Resultado	Interpretação
<1,0	Negativo para anticorpos Anti-SARS-CoV-2
≥1,0	Positivo para anticorpos Anti-SARS-CoV-2

9.3 Controle de qualidade

Para que um teste seja válido, todos os critérios a seguir devem ser atendidos:

- Calibrador e controles devem ser incluídos em cada corrida.
- O controle negativo deve dar um resultado final de <1,0
- O controle alto deve dar um resultado final ≥1,0
- Os resultados das absorbâncias devem seguir o padrão abaixo:
Controle negativo < Calibrador cut-off < Controle alto

Se os critérios acima não forem atendidos, o teste é inválido e deve ser repetido. Se o problema persistir, consulte o fornecedor para suporte técnico local.

9.4 Limitações

- Os resultados obtidos pelo teste não devem ser utilizados como diagnóstico de COVID-19. Os resultados devem ser interpretados de acordo com o histórico clínico e outros achados laboratoriais.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de uma infecção por SARS-CoV-2.
- Neste momento, não se sabe por quanto tempo os anticorpos persistem após a infecção e se a presença de anticorpos confere imunidade protetora.

10 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

10.1 PRECISÃO

A precisão foi medida utilizando-se o procedimento EP12-A2 do CLSI (Protocolo do usuário para avaliação de desempenho de teste qualitativo, 2a. edição) em um único lote do kit. Quarenta réplicas foram testadas através do cut-off (valor de corte) clínico (C₅₀) e pelos valores acima (C₉₅) e abaixo do cut-off (C₅).

PRECISÃO		
n=40	Resposta média	% CV
Amostra negativa	0,774	4,56
Amostra cut-off	1,019	5,07
Amostra positiva	1,132	3,97

10.2 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

O teste foi avaliado quanto à potencial reatividade cruzada de indivíduos com outras condições médicas. No total, 39 amostras de 8 categorias de doenças foram testadas. As 39 amostras foram negativas e nenhuma amostra foi positiva pelo teste. Os dados foram resumidos a seguir:

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA			
Categoria	Número	Positivo	Negativo
Antiadenovírus (IgG e/ou IgA e/ou IgM)	1	0	1
Antienterovírus (IgG e/ou IgA e/ou IgM)	5	0	5
Antivírus sincicial respiratório (IgG e/ou IgM)	4	0	4
Antivírus Epstein-Barr	4	0	4
Antiparainfluenza 1/2/3 IgG	5	0	5
Anti-influenza A (IgG e/ou IgM)	5	0	5
Anti-influenza B (IgG e/ou IgM)	4	0	4
Cepas endêmicas de coronavírus	11	0	11
TOTAL	39	0	39

10.3 SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Uma gama de substâncias interferentes foi adicionada às amostras de soro acima e abaixo do cut-off que, posteriormente, foram testadas. Nenhuma alteração nos resultados informados foi vista utilizando-se:

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES	
Substância	Concentração
Bilirrubina	200 mg/L
Hemoglobina	2000 mg/L
Triglicerídeo	3000 mg/L

10.4 DESEMPENHO CLÍNICO

10.4.1 MÉTODO MANUAL

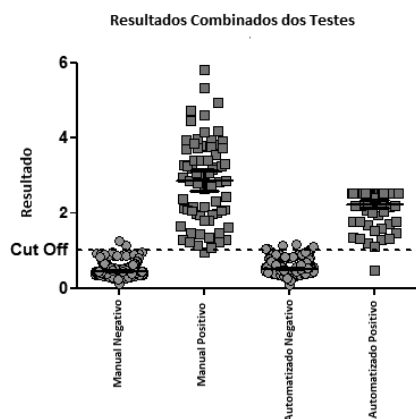
Um estudo foi realizado para determinar o desempenho clínico do teste. Um total de 707 amostras de soro foram coletadas e consideradas negativas para COVID-19. Mais 162 amostras de soro foram coletadas de sujeitos não hospitalizados, que apresentaram COVID-19 de leve a moderada e testaram positivo para SARS-CoV-2 pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR). Todos as amostras de pacientes de COVID-19 foram coletadas ≥14 dias após o início dos sintomas ou do teste PCR positivo.

DESEMPENHO CLÍNICO DA DOENÇA LEVE A MODERADA EM INDIVÍDUOS NÃO HOSPITALIZADOS UTILIZANDO METODOLOGIA MANUAL – TODAS AS AMOSTRAS					
Categoria	Número	Positivo	Negativo	Especificidade/NPA (95% CI)	Sensibilidade/PPA (95% CI)
Considerados negativos para COVID-19	707	5	702	99,3 (98,4 - 99,8)	96,3 (92,1 - 98,6)
Doença leve a moderada para indivíduos não hospitalizados Positivo para COVID-19 confirmado por PCR	161	155	6		

10.4.2 ANALISADOR AUTOMÁTICO

Um estudo foi realizado para determinar o desempenho clínico do teste, utilizando-se um analisador automático. Um total de 359 amostras de soro foram coletadas e consideradas negativas para COVID-19. Outras 73 amostras de soro foram coletadas de indivíduos não hospitalizados, que apresentaram a doença, COVID-19, de leve a moderada e testaram positivo para SARS-CoV-2 pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR). Todas as amostras de pacientes de COVID-19 foram coletadas ≥14 dias após o início dos sintomas ou do teste PCR positivo.

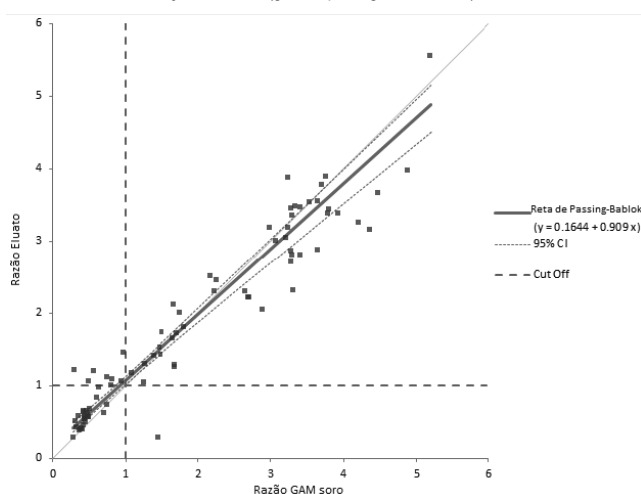
DESEMPENHO CLÍNICO DA DOENÇA LEVE A MODERADA EM INDIVÍDUOS NÃO HOSPITALIZADOS UTILIZANDO METODOLOGIA AUTOMATIZADA – TODAS AS AMOSTRAS					
Categoria	Número	Positivo	Negativo	Especificidade/NPA (95% CI)	Sensibilidade/PPA (95% CI)
Considerados negativos para COVID-19	359	6	353	98,3 (96,4 - 99,4)	98,6 (92,6 - 100,0)
Doença leve a moderada em indivíduos não hospitalizados Positivos para COVID-19 confirmados por PCR	73	72	1		



A figura 1 mostra a distribuição de indivíduos que foram negativos e positivos obtidos após realização do teste.

Um estudo comparativo foi realizado analisando-se 81 amostras pareadas de soro e de amostras de sangue seco, utilizando-se Anti-SARS-CoV-2 IgG/A/M humana ELISA. A análise de regressão Passing-Bablok gerou os seguintes resultados:

Coefficiente de correlação $r = 0,959$ (gerado por regressão linear)



A figura 2 mostra a correlação entre amostras de soro e amostras de sangue seco.

11 REFERÊNCIAS

1. Guo, Y *et al.* (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med Res* 7, 11.
2. N. van Doremalen *et al.* (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 382: 1564-1567.
3. Hussin A. Rothan *et al.* (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity.* 109 (102433)
4. Yi-Wei Tang *et al.* (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology.* 58 (6) e00512-20
5. CLSI GP44-A4, Vol. 30 No.10, 5.5.1.1.1, May 2010, "Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline".

Indicação dos termos e condições de garantia da qualidade do produto

O desempenho deste produto é garantido, de acordo com suas especificações, até a data de validade indicada no rótulo, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nesta instrução de uso sejam seguidos corretamente.

Descarte

O descarte de resíduos deve ser realizado em conformidade com os requisitos estabelecidos pela legislação vigente, estabelecidos pelas autoridades federal, estadual e municipal, da Vigilância Sanitária e dos Órgãos Ambientais.

Fabricante

The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham, B15 1QT, Reino Unido

Telefone: +44 (0)121 456 9500

Fax: +44 (0)121 456 9749

E-mail: info@bindingsite.co.uk

Importador

Diamedica Importação E Exportação De Produtos Para Laboratório LTDA. – ME

Rua Gastão Vieira, 451

São Carlos – SP – CEP: 13562-410

CNPJ: 23.119.193/0001-08

Reg. ANVISA/MS: 81357320121

Atendimento ao consumidor: (16) 3415-2829

Instruções de uso acompanham o produto.