



EIE COVID-19 IGG

Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DETECÇÃO DE
ANTICORPOS IgG CONTRA SARS-CoV-2

(Material fornecido para **192** reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

EIE COVID- 19 IGG

Bio-Manguinhos

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG
CONTRA SARS-CoV-2

(material fornecido para 192 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

1. NOME COMERCIAL

EIE COVID-19 IgG Bio- Manguinhos

2. FINALIDADE E MODO DE USO DO PRODUTO

O kit EIE COVID-19 IgG Bio- Manguinhos é um teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG específico para SARS-CoV-2, gerados por meio de infecção natural ou por resposta vacinal, no soro ou plasma humano;

Em casos de infecção natural, recomenda-se que as análises devem ser realizadas após 7 dias do início dos sintomas, o que pode melhorar os parâmetros de desempenho do teste;

Resultados Falso Reagentes podem ocorrer devido a reatividade cruzada com anticorpos para outros coronavírus;

Pode ocorrer um resultado não reativo se a quantidade de anticorpos para o vírus SARS-CoV-2, presente na amostra, estiver abaixo do limite de detecção do ensaio;

Resultados não reagentes não excluem risco de infecção pelo SARS-CoV-2.

Produto destinado exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro*.

3. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E MANUSEIO

O kit EIE COVID-19 IgG Bio- Manguinhos deve ser armazenado entre 2 °C e 8 °C até a sua utilização. Não congele o Kit ou seus componentes. Todos os insumos devem ser retirados da refrigeração até atingirem temperatura ambiente antes da sua utilização. O Tampão de Lavagem 20X pode sofrer cristalização e deve ser colocado em banho-maria a 37 °C até total dissolução dos cristais. O diluente da Amostra e Conjugado 2X podem sofrer precipitação podendo ainda assim serem utilizados. Tanto o Tampão de Lavagem 20X quanto Diluente da Amostra e Conjugado 2X devem ser diluídos em água antes da sua utilização, conforme descrito neste manual.

De acordo com estudos realizados em Bio- Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável durante 24 a 36 horas, permite que o conjunto diagnóstico se mantenha em condições estáveis.

4. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO TESTE

O desenvolvimento deste kit foi realizado pela equipe de pesquisadores do Centro de Tecnologia em Vacinas uma aliança entre UFMG e FIOCRUZ-MINAS, sua validação externa foi realizada em laboratórios da USP, FIOCRUZ e Bio- Manguinhos, instituições e laboratórios que compõem a Rede Vírus de Pesquisa. A Rede Vírus é uma iniciativa e conta com financiamento do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), para a nacionalização de insumos e testes para diagnóstico de COVID-19. O desenvolvimento do teste contou ainda com o apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), atendendo demanda da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Minas Gerais.

O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma humano com proteínas recombinantes do vírus SARS-CoV-2 (Nucleocapsídeo (N) e Spike (S)). O antígeno recombinante é previamente adsorvido nas cavidades de microplacas / “strips” (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídas. Caso as amostras possuam anticorpos IgG específicos, estes irão se ligar ao antígeno da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti-imunoglobulina G humana, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450nm.

5. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

O kit EIE COVID-19 IgG Bio- Manguinhos pode ser realizado com amostras de soro ou plasma humano.

As amostras, devem ser estocadas e manipuladas adequadamente.

As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso.

Soro: É obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma: coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

6. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

6.1. Relação dos componentes fornecidos com o produto:

Diluyente Amostras/ Conjugado [2X].	2 frascos com 40mL
Tampão de Lavagem (20X)	2 frascos com 50mL
Solução Reveladora	1 frasco com 25mL
Ácido Sulfúrico 2M	1 frasco com 15mL
Controle Positivo	1 frasco com 0,15mL
Controle Negativo	1 frasco com 0,15mL
Conjugado	1 frasco com 0,4mL
Molduras com 6 “strips duplas sensibilizadas”	2 molduras

6.2. Materiais necessários não fornecidos:

- Lavadora automática para microplaca;
- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37 °C;
- Tampas para as placas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5 % ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450nm.

7. ESTABILIDADE EM USO DO PRODUTO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O kit EIE COVID-19 IgG Bio - Manguinhos deve ser armazenado entre 2 °C a 8 °C até o momento da sua utilização.

Não congele o kit ou seus componentes. Todos os insumos devem ser retirados da refrigeração até atingirem temperatura ambiente antes da sua utilização, com exceção do conjugado que deve ser retirado da refrigeração apenas no momento da sua utilização.

As placas sensibilizadas devem permanecer lacradas e refrigeradas até o momento de sua utilização. Após abertas, retirar a quantidade de strips que será utilizada e retornar a refrigeração possíveis sobras que devem ser utilizadas em até 14 dias se mantidas bem fechadas em seus sacos *zip*.

O Tampão de Lavagem 20X e o Diluente da Amostra e Conjugado 2X devem ser previamente diluídos em água destilada, conforme descrito neste manual, não podendo ser armazenados após sua diluição. Diluir estes insumos calculando o volume que será utilizado para realização do teste, a fim de não faltar reagente em reações futuras.

Após a abertura, utilizar os componentes do kit, exceto as placas, dentro do período de 2 meses.

8. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO:

Importante:

- a) Retirar os componentes do kit da refrigeração (2-8 °C) para que atinjam a temperatura ambiente antes do início do teste, retornando-os logo após o uso, com exceção do conjugado, que deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento de sua utilização, retornando a refrigeração imediatamente após sua utilização.
- b) Retirar apenas a quantidade de “strips” a serem utilizadas no teste, armazenando as “strips” restante no saco *zip* certificando-se que está bem fechado.
- c) Certificar que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma, alcance a temperatura ambiente antes o início do ensaio.

8.1. Preparo do Diluente da Amostra/Conjugado

O insumo diluente da amostra/conjugado 2X deve ser diluído, antes de sua utilização no teste, na proporção de uma parte de diluente em uma parte de água destilada (1:2).

Ex.: 40mL de diluente da amostra/conjugado (2X) + 40mL de água destilada.

Após o preparo, o diluente agora da amostra/conjugado 1X deve ser homogenizado e pode ser armazenado em temperatura 2-8 °C respeitando a validade do conjunto diagnóstico.

Importante:

- a) Esta solução não deve ser congelada.
 b) Tampão sujeito a precipitação, podendo ser utilizado sem riscos de interferências no teste.

8.2. Diluição, aplicação e incubação das amostras

Diluir em tubos, 5µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500µL do diluente de amostra/conjugado 1X (Diluição da amostra: 1:101).

Distribuir na placa sensibilizada, 100µL dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma: na coluna 1 fileiras “A” e “B” o controle positivo; na “C”, “D” e “E” o controle negativo; “F” sem soro (sem soro - SS). Nos demais orifícios, distribuir 100µL das amostras testes, já diluídas nos orifícios correspondentes (observe o desenho da placa).

DESENHO DA PLACA DE 96 POÇOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PQ	A3	A11	A19	A27	A35	A43	A51	A59	A67	A75	A83
B	PQ	A4	A12	A20	A28	A36	A44	A52	A60	A68	A76	A84
C	PN	A5	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	A69	A77	A85
D	PN	A6	A14	A22	A30	A38	A46	A54	A62	A70	A78	A86
E	PN	A7	A15	A23	A31	A39	A47	A55	A63	A71	A79	A87
F	SS	A8	A16	A24	A32	A40	A48	A56	A64	A72	A80	A88
G	A1	A9	A17	A25	A33	A41	A49	A57	A65	A73	A81	A89
H	A2	A10	A18	A26	A34	A42	A50	A58	A66	A74	A82	A90

PQ = Controle Positivo PN = Controle Negativo SS = Sem Soro A= Amostra

Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o ensaio deverá ser repetido.

8.3. Preparo do tampão de lavagem

Diluir o tampão na proporção de 1:20 em água destilada.

Exemplo: 50 mL do tampão 20X em 950 mL de água destilada.

Importante:

- a) Tampão sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37 °C até a dissolução dos cristais.
 b) Para utilizar lavadoras automáticas, deve-se considerar o volume mínimo exigido por cada equipamento. O tampão pode ser diluído e armazenado sob refrigeração (2-8 °C), respeitando a validade do conjunto diagnóstico.
 c) Esta solução não deve ser congelada.

8.4. Lavagem da placa

Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 5 vezes com tampão de lavagem (250 µL/orifício).

8.5. Diluição, aplicação e incubação do conjugado

Diluir o conjugado na proporção 1:100 em diluente de amostra/conjugado 1X, preparado anteriormente. Para uma placa inteira pode-se usar 120 µL do conjugado em 11,880 mL de diluente da amostra/conjugado 1X.

Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos “strips”. Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30min.

8.6. Lavagem da placa

Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 5 vezes com tampão de lavagem (250 µL/orifício).

8.7. Aplicação e incubação da Solução Reveladora

Distribuir 100µL da solução reveladora rapidamente em todos os orifícios. Retirar do frasco apenas a quantidade que será utilizada no teste, não retorne a sobra de solução ao frasco de origem.

Incubar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 10min.

8.8. Bloqueio da Reação

Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

8.9. Leitura

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm) e iniciar a leitura.

Para o cálculo do Cut-off deve-se fazer a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

8.10. Validação do Teste

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica dos controles estiverem na faixa descrita a seguir:

Controle Positivo: $\geq 0,600$ de DO

Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do Cut-Off (CO)

$CO = XPN + \text{Fator } (0,150)$

XPN = Média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade ótica

PN = Controle Negativo

Exemplo 1:

$$DO \text{ PN } 1 = 0,100 \quad XPN = \frac{DO \text{ PN}1 + DO \text{ PN}2 + DO \text{ PN}3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$$

$$DO \text{ PN } 2 = 0,098$$

$$DO \text{ PN } 3 = 0,101$$

$$CO = XPN + \text{Fator } (0,150)$$

$$CO = 0,099 + 0,150 = 0,249$$

Exemplo 2:

$$\text{DO PN 1} = 0,110$$

$$\text{DO PN 2} = 0,090$$

$$\text{DO PN 3} = 0,131 \rightarrow \text{Fora da faixa de validação do teste} = \text{descartar}$$

$$\text{CO} = \text{XPN} + \text{Fator (0,150)}$$

$$\text{CO} = 0,100 + 0,150 = 0,250$$

$$\text{XPN} = \frac{\text{DO PN1} + \text{DO PN2}}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

Exemplo 3:

$$\text{DO PN 1} = 0,110$$

$$\text{DO PN 2} = 0,080$$

$$\text{DO PN 3} = 0,040 \rightarrow \text{Fora da faixa de validação do teste} = \text{descartar}$$

$$\text{CO} = \text{XPN} + \text{Fator (0,150)}$$

$$\text{CO} = 0,095 + 0,150 = 0,245$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

$$\text{FC} = \text{CO} \times 1,3$$

Exemplo: $\text{CO} = 0,322$

$$\text{FC} = \text{CO} \times 1,3$$

$$\text{FC} = 0,322 \times 1,3$$

$$\text{FC} = 0,386$$

	CO	FC
AMOSTRAS NÃO REAGENTES (Faixa < Cut-Off)	FAIXA CINZA (Entre Cut-Off e Cut-Off x 1,3)	AMOSTRAS REAGENTES (Faixa > Cut-Off x 1,3)

9. OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade ótica superior ao Cut-Off.

Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade ótica inferior ao Cut-Off.

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o Cut-Off e a faixa cinza.

Importante:

Recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na faixa cinza, considerada neste teste, entre o valor obtido para o Cut-Off e o valor obtido com a multiplicação deste pelo fator 1,3.

Mantendo-se as amostras na faixa cinza após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para determinação do status da amostra e/ou a repetição do ensaio com uma amostra de uma nova coleta.

Operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser $\geq 0,07$. Se este valor for superior a 0,07 significa presença de background no teste.

10. USUÁRIO PRETENDIDO

O kit EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais capacitados de acordo com as instruções fornecidas.

11. INTERFERENTES E LIMITAÇÕES DO ENSAIO

11.1. Interferentes

Para avaliar a influência de condições sorológicas de outras patologias, não relacionadas ao teste, no desempenho do EIE COVID-19 IgG, foi avaliado um painel como as características descritas na tabela abaixo.

Amostras	N. de amostras positivas / N. de amostras testadas
HIV	0/10
Dengue	0/10
Chagas	0/10
Sífilis	0/10
HCV	0/10

Para avaliar a influência de condições não relacionadas ou substâncias interferentes na sensibilidade e especificidade do EIE COVID-19 IgG, um painel internacional - AcroMetrix (ref. 956400) - com amostras coletadas com HEPARINA, EDTA, baixa, média e alta hemólise, além de plasma lipêmico e icterico foi testado e não foram observadas mudança de status dos resultados esperados - Não Reagente – destas amostras. Além disso, foram feitos “spikes” nesse painel com amostras positivas e não foram observadas mudanças de status dos resultados esperados.

11.2. Limitações do ensaio

O EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual.

O EIE COVID-19 Bio-Manguinhos deve ser utilizado apenas com amostras de soro ou plasma humano.

Não utilizar o kit com data e validade vencida.

Um resultado reagente sugere a presença de anticorpos IgG para COVID-19 na amostra testada.

Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por SARS-CoV-2.

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade e especificidade

O índice de sensibilidade do EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos foi determinado em três avaliações, utilizando amostras coletadas após 15 dias do início dos sintomas e com qRT-PCR detectável (infecção natural) e indivíduos vacinados (1° e 2° doses).

Tabela 01: Avaliação da Sensibilidade do Kit EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos

Avaliação	Amostras Positivas	Sensibilidade Obtida
1° Dose de Vacina	40/58	68,9%
2° Dose de Vacina	44/45	97,7%
Infecção natural	44/45	97,7%

O índice especificidade do EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos teste foi obtida através de avaliação com amostras sem indicação de alguma patologia obtidas pré-pandemia.

Tabela 02: Avaliação da Especificidade do Kit EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos

Avaliação	Amostras Negativas
Avaliação	75/76
Especificidade Obtida	98,6 %

13. RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco.

- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem das placas esteja intacta. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, separe o kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os kits;
- As amostras e os controles devem ser manipulados seguindo as orientações de biossegurança necessárias;
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Só utilizar componentes do mesmo conjunto;
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte de interna dos “strips”;
- Cada “strip” só pode ser utilizada uma única vez;
- A solução reveladora e o conjugado são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Não congelar os componentes do kit.
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

14. DESCARTE DO PRODUTO

- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária.

15. TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Este produto foi desenvolvido por meio de procedimentos registrados e instalações em acordo com normas internas de Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório. O fabricante garante a qualidade do kit mediante seu uso adequado, descrito nestas instruções de uso, bem como orientações dadas durante o treinamento fornecido ao usuário.

16. RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Registro MS 80142170050

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva,
CRBio-2 RJ/ES nº: 21433-02.

Fabricante Legal:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

CNPJ 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Unidade Fabril:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro- RJ

CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto ao:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ- Brasil

CNPJ 33.781.055/0001-35

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ

SAC: 08000 210 310 ou moleculares@bio.fiocruz.br

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Vashist, SK. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics*. 2020, 10, 202.

Van Elslande, J; Houben, E., Depypere, M.; Brackenier, A.; Desme, S.; Andre, E.; Van Ranst, M.; Lagrou, K.; Vermeersch, P. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020, 26 - 1082e1087

Yu SHI, Y.; WANG, G.; CAI, X.; Jing-wen DENG, J.; Lin ZHEN, L.; Hai-hong ZHU, H.; ZHENG, M.; YANG, B.; CHEN, Z. An overview of COVID-19. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. 2020 21(5):343-360.