

Cartilha de orientação

Operacionalização dos kits
ErbaLisa COVID-19 IgG e IgM

Índice

Objetivos da Cartilha	03
Apresentação dos kits	04
Instruções de uso (protocolo em português)	05
Pontos de atenção da execução dos testes	07
Detalhes importantes na execução manual dos testes	08
Importância do calibrador e dos controles	08
Como melhorar o rendimento dos kits	08
Adaptação para automação	09
Principais problemas e suas causas	11
Considerações finais	12

Objetivos da Cartilha



Além de fornecer o que existe de mais moderno na detecção sorológica de anticorpos anti-SARS-CoV-2, a Erba busca também ajudar seus clientes parceiros em todas as fases do processo de execução do teste: desde a operacionalização dos kits até a interpretação dos resultados e liberação do teste.

Para isso, pensando tanto nos que já têm prática com testes de ELISA quando naqueles para os quais a metodologia é uma novidade, a Erba desenvolveu uma orientativa sobre como operacionalizar os kits ErbaLisa COVID-19 (de forma manual ou automatizada). O documento contém as principais dicas e ressalta o que se deve fazer ou não fazer, em função de nossos diversos aprendizados.

Obrigado por adquirir os kits ErbaLisa COVID-19 IgG e IgM!

Nesta cartilha você terá dicas práticas sobre como operacionalizar os nossos kits (manual ou automático).

Cada kit contém:

- Registros na Anvisa:
ErbaLisa COVID-19 IgG:
MS 81826160050
ErbaLisa COVID-19 IgM:
MS 81826160051
- Lista de reagentes
 - Calibrador
 - Controle positivo
 - Controle negativo
 - Diluente de amostra
 - Conjugado
 - Substrato TMB
 - Solução de parada
 - Solução de lavagem (20x)

Dados de sensibilidade e especificidade:

	Sensibilidade	Especificidade
IgG	98,1%	98,3%
IgM	100%	90,0%



Principais características:

- Soluções prontas para uso (apenas a solução de lavagem 20x deve ser diluída);
- Menor tempo de incubação: 50 minutos em temperatura ambiente.
- Elevada sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos de Sars-Cov-2 em soro humano comprovadas pelo INCQS.
- Alto desempenho.



Instruções de uso (Protocolo em português):

- 1 Coloque o número desejado de tiras revestidas no suporte.
- 2 Prepare a diluição 1:21 das amostras de teste: coloque em uma rack um tubo de ensaio pequeno (ou similar) para cada amostra, identificando-o. Adicione em cada tubo 200 μ L de diluente de amostra e 10 μ L da amostra. Misture bem.
- 3 Distribua 100 μ L do calibrador, dos controles e das amostras nos poços apropriados, conforme o protocolo de pipetagem sugerido abaixo. Para o branco do reagente, dispense 100 μ L de diluente de amostra na posição do poço 1A. Bata a placa delicadamente sobre a bancada para remover bolhas de ar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	Amostra										
B	CAL	Amostra										
C	CN	Amostra										
D	CP	Amostra										
E	Amostra											
F	Amostra											
G	Amostra											
H	Amostra											

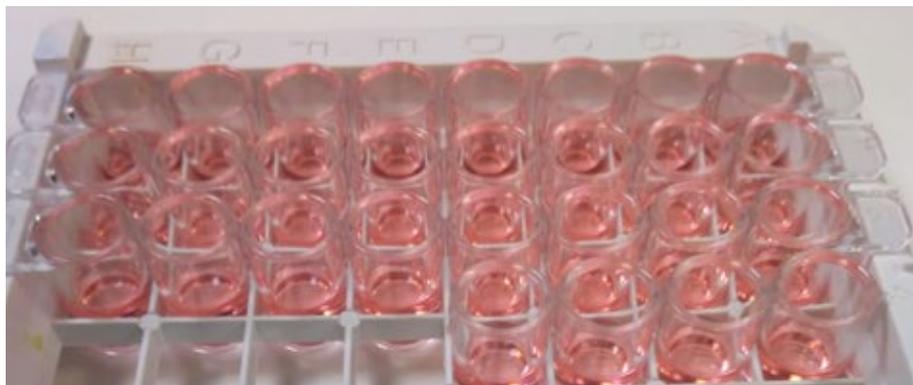
A solução de lavagem 20X (frasco de 25mL) deve ser diluída em 475mL de água destilada, produzindo 500mL de solução de lavagem 1X.



- 4 Tampe com película protetora ou papel alumínio e incube por 20 minutos em temperatura ambiente.
- 5 Remova o líquido de todos os poços, vertendo a placa rapidamente em um recipiente de descarte, tomando cuidado para não ocorrer contaminação entre os poços. Lave os poços pipetando 300 μ L de solução tampão de lavagem 1X em cada poço. Deixe a solução tampão de lavagem 1X agir por 30 a 60 segundos e despreze o líquido. Repita essa etapa de lavagem três vezes. Ao término, bata a placa ou a tira virada para baixo em um papel toalha apoiado na bancada, a fim de remover a solução residual.

Instruções de uso (Protocolo em português):

- 6 Dispense 100 μ L de conjugado enzimático em cada poço, tampe com película protetora ou fita de vedação e incube por 20 minutos em temperatura ambiente.

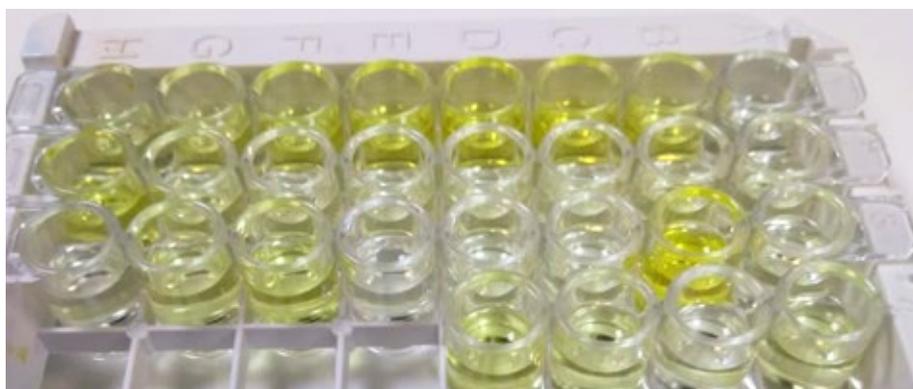


- 7 Remova o conjugado enzimático de todos os poços, vertendo a placa rapidamente no recipiente de descarte. Lave os poços três vezes, dispensando em cada vez 300 μ L de solução tampão de lavagem 1X em cada poço. Deixe a solução tampão de lavagem 1X agir por 30 a 60 segundos e despreze o líquido a cada ciclo de lavagem. Ao término, seque com papel absorvente ou papel toalha, batendo a placa ou a tira virada para baixo, a fim de remover a solução residual.

- 8 Dispense 100 μ L de substrato TMB em cada poço, tampe com película protetora ou papel alumínio e incube por 10 minutos em temperatura ambiente. Proteja contra a luz. Esta solução não deve ser removida dos poços.

- 9 Adicione 100 μ L de solução de parada nos poços, na mesma ordem que foi adicionado o substrato TMB.

- 10 Realize a leitura da densidade óptica (DO) utilizando um leitor de ELISA com filtro primário de 450 dentro de, no máximo, 10 minutos após a adição da solução de parada. É recomendada a utilização de um filtro secundário de 600-650 nm.



No link você encontra diversos vídeos tutoriais sobre todos os passos da realização de um teste ELISA:

<https://www.calbiotech.com/support/technical-support/videos>

Ao realizar os testes, atenção!



Luz

Os kits possuem componentes fotossensíveis. Após o uso, fechar imediatamente os frascos das soluções. Realizar sempre os testes nos mesmos locais, para garantir a mesma exposição à luz durante todo o processo. Durante a incubação da etapa de adição do substrato TMB, proteger a placa da exposição à luz sob risco de influência nos resultados.



Homogeneização

Todos os reagentes, em especial o calibrador e o conjugado, devem ser bem homogeneizados, evitando a formação de bolhas.

Antes de preparar a diluição das amostras ou antes de alocar as amostras no equipamento, estas devem ser bem homogeneizadas.

Após cada lavagem, verificar a presença de bolhas ou volume residual de solução de lavagem nos poços. O ideal é que os poços estejam completamente secos e sem bolhas.

Lembre-se!

Durante as incubações, a placa deve ser coberta com um papel (pode ser papel alumínio), para evitar contaminação.

Tome cuidado para não misturar frascos e soluções de kits diferentes.



Temperatura

O kit deve ser sempre armazenado em temperatura recomendada (2-8°C), sendo retirado da refrigeração ao menos 30 minutos antes da realização dos testes. Todos os componentes devem estar em temperatura ambiente (20-25°C) para fazer o teste. A temperatura deve ser constante no laboratório, pois variações maiores que 3°C podem afetar os resultados.



Pipetas

No caso de realização do teste manual, é imprescindível que as pipetas estejam bem calibradas. Ponteiros novas devem ser utilizadas para evitar contaminações.



Tempo

O teste deve ser feito sem interrupção, ou seja, após cada etapa iniciar imediatamente a próxima.



Armazenamento

Imediatamente após a realização dos testes, os reagentes devem ter seus frascos hermeticamente fechados e guardados de volta na geladeira, permanecendo o menor tempo possível na bancada, para que não ocorra degradação.

Saiba mais!

Detalhes importantes na realização manual dos testes

- Amostras devem ser bem homogeneizadas.
- Utilizar pipetas muito bem calibradas.
- Se utilizar pipetas multicanal, utilizar recipientes para os reagentes limpos.
- Sempre incubar a placa no mesmo local, abrigado da luz (utilizar uma folha de papel alumínio, por exemplo).
- O teste deve ser feito sem interrupção, ou seja, após cada etapa iniciar imediatamente a próxima.

Calibrador e controles

Como é feito o cálculo do resultado (índice)?

- Primeiro, calcula-se o Cut-off: densidade óptica do calibrador DO CAL x Fator de calibração (FC), que encontra-se impresso no frasco do calibrador.
- A leitura da absorbância de cada amostra é dividida pelo Cut-off

$$\text{Cut-off} = \text{DO CAL} \times \text{FC}$$

$$\text{Índice} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Cut-off}}$$

- Por isso, é indispensável a dosagem do calibrador em cada corrida.

Para que servem os controles positivo e negativo?

- Os controles devem ser dosados junto com a rotina e possuem valores de referência que sempre devem ser observados conforme a instrução de uso, para validar uma corrida ou não. Corridas nas quais os controles não atenderam aos valores de referência não podem ser consideradas válidas.
- O uso dos controles é indispensável e garante ao laboratório a validade do teste.

Como melhorar o rendimento do kit?

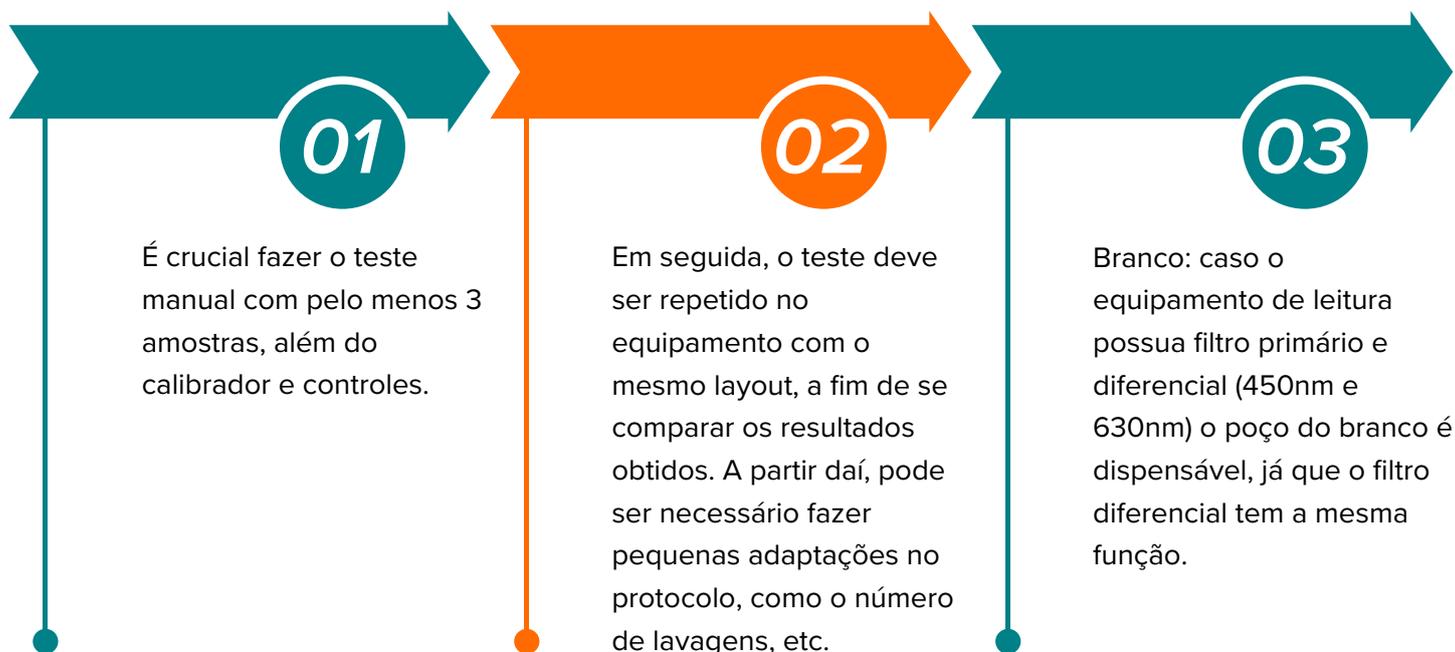
- Como cada corrida precisa de calibradores/controles, rotinas pequenas levam a um gasto maior de poços e de controles/calibradores.
- **Atenção:** cada frasco de controle/calibrador contém 1mL e, conforme instruções de uso, cada pipetagem consome 100L de solução.
- Para rotinas pequenas, recomenda-se acumular o maior número de amostras possível e fazer os testes a cada 2 ou 3 dias, e não diariamente



Adaptação para automação

A adaptação dos kits para a automação é realidade em grande parte dos laboratórios, diminuindo a necessidade de mão de obra especializada e aumentando a produtividade.

No entanto, alguns cuidados precisam ser tomados na adaptação do teste:



Ao selecionar amostras para a validação, caso as mesmas tenham resultados positivos ou negativos em outros métodos de dosagem de anticorpos anti-SARS-CoV-2, é importante entender que os resultados não necessariamente serão similares, pois:

- Fabricantes distintos utilizam formulações de reagentes diferentes, concentrações diferentes e diferentes cálculos para o resultado final;
- Os testes de sorologia para COVID utilizam proteínas virais diversas como antígeno;
- Metodologias distintas não devem ser comparadas a nível de resultado quantitativo*
- Devemos utilizar apenas resultados qualitativos como referência.



***IMPORTANTE:** os resultados em índices encontrados após o cálculo não são valores de concentração de anticorpos na amostra de soro. Ainda não existem testes sorológicos quantitativos para SARS-CoV-2. Os índices são valores que visam orientar o resultado qualitativo.

Adaptação para automação

Alguns detalhes importantes devem ser observados para garantir que o equipamento está funcionando perfeitamente.



Após a adição dos reagentes, não deve haver bolhas nos poços. Isso é um sinal de que a dispensação não está adequada.



O volume em todos os poços deve ser igual. Volumes diferentes sugerem um problema na dispensação ou na aspiração.



Após a aspiração dos reagentes, não deve haver bolhas nos poços. Isso sugere um problema na aspiração ou na dispensação.

Ao utilizar-se automação para qualquer ensaio, acrescenta-se algumas variáveis que podem levar a alterações nos resultados obtidos. Por isso, de modo geral, é muito importante observar os seguintes pontos ao utilizar analisadores automatizados para ELISA:

- Temperatura de incubação do equipamento (e do ambiente onde ele se encontra)
- Volume pipetado de amostras, reagentes e soluções de lavagem
- Pressão da lavagem, assim como o número de lavagens
- Aspiração e dispensação das soluções de lavagens – não deve haver bolhas nos poços nem volume residual de solução de lavagem
- Verificar o perfeito funcionamento das lâmpadas da leitora.

Principais problemas e suas causas

A tabela abaixo tem o objetivo de listar os principais problemas observados durante a realização dos testes e suas possíveis causas.

Problema	Possível causa
Mudança de cor do TMB	Oxidação do reagente ou contaminação.
Diminuição da DO do calibrador ao longo dos dias	Degradação do calibrador. Dentro dos limites aceitáveis (indicado na seção de CQ da instrução de uso) não é um problema.
Presença de bolhas nos poços	Pipetagem ou aspiração inadequadas, seja pelo método manual ou automatizado
Diferenças de tempo de reação	Pipetagem de cada reagente em uma sequência diferente na placa
Grande variação de resultados em replicatas	Pipetagem inconsistente, ponteiras frouxas, micropipetas sem manutenção periódica ou calibração, lavagens insuficientes, resíduo de solução de lavagem significativa nos poços, erros na diluição da amostra e cálculos
Precipitação ou contaminação dos reagentes	Armazenamento dos reagentes inadequado ou validade expirada; Não usar reagentes que tenham sinais de contaminação, precipitação ou alteração na coloração; Material ou recipientes sujos;
Precipitação ou contaminação da solução de lavagem (aspecto turvo)	Precipitação de sais, contaminação com outros reagentes ou microbiana

Problema	Possível causa
Água deionizada	Água usada para solução de lavagem e limpeza dos recipientes (ou material) contaminada ou alcalina, agentes oxidantes e redutores podem afetar a qualidade dos resultados.
Coloração mais intensa (background)	Lavagens insuficientes, substrato oxidado, tempo de incubação maior do que o recomendado.
Fora do limite de detecção	Erros durante as diluições das amostras, temperatura dos reagentes e incubação diferente do recomendado, problemas no equipamento

***Consultar a assessoria científica para modificações apropriadas no protocolo.**

Considerações finais

Infelizmente, ainda não existe um teste diagnóstico considerado padrão ouro para a detecção de SARS-CoV-2. Todos os testes sorológicos disponíveis até o momento são considerados de triagem. Por isso, ao validar um kit, os resultados obtidos por outro método não devem ser considerados como verdade absoluta, apesar de os resultados qualitativos poderem ser utilizados como uma orientação para a validação.

É necessário entender que cada kit possui uma formulação diferente e utiliza proteínas virais distintas, de forma que a detecção de anticorpos no decorrer da doença pode variar de um kit para o outro. Um único resultado negativo, por si só, não exclui a possibilidade de infecção regressa por SARS-CoV-2.

Por isso, é importante que a avaliação dos resultados seja feita juntamente às informações de anamnese e epidemiológicas, por um profissional da saúde qualificado.

Resultados indeterminados, apesar de incômodos, são uma forma de segurança para o laboratório, para que não sejam liberados resultados falso-positivos ou falso-negativos, devido a pequenas variações que podem ocorrer nos métodos analíticos. Nesses casos, notas técnicas devem ser adicionadas ao laudo, orientando uma nova coleta e dosagem após sete dias.

Todos os laudos devem ser acompanhados de notas técnicas orientando a interpretação dos resultados. Para melhor compreensão dos resultados obtidos, ver a “Cartilha 2: Interpretação dos resultados”.

Por se tratar de um teste novo, existe a possibilidade de reações cruzadas com anticorpos produzidos contra outros agentes infecciosos ou mesmo vacinas. Tem-se observado entre diversos fabricantes, um número considerável de resultados falso positivos em pessoas que tomaram recentemente a vacina contra gripe. Isso evidencia a importância da interpretação dos resultados junto a um profissional de saúde qualificado.



 **MATRIZ**

Rua Chopin 33, Mezanino 3 – Sala 4
Bairro Chácara Reunidas – Santa Therezinha
Contagem – MG

 **FILIAL**

Biotech Town
Avenida Princesa Diana, 115
Nova Lima – MG

 **CONTATO GERAL/ASSUNTOS REGULATÓRIOS**
contato-brasil@erbamannheim.com

 **CONTATO COMERCIAL**
brazilsales@erbamannheim.com

 **CLIQUE AQUI E FALE COM A ASSESSORIA
CIENTÍFICA ERBA BRASIL**
31 99950-2785

