

ACCEL ELISA COVID-19 kit (AE301)



Plexense, Inc.
 #1-1302, 16-4 Dongbaekjungang-ro, 16-gil
 Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Corea
Teléfono: +82-70-4725-4682
www.plexense.com



Uso Previsto *Este reactivo es para uso diagnóstico in vitro.*

El kit está detectando el nuevo anticuerpo COVID-19 en suero humano. Es para la detección o para ayudar en el diagnóstico de COVID-19. Los pacientes con casos sospechosos de agrupamiento requieren diagnóstico o diagnóstico diferencial de una nueva infección por coronavirus. El ensayo se valida manualmente, pero se puede adaptar a un instrumento automatizado. El ensayo es solo para la detección cualitativa.

Uso Previsto Este kit es para uso profesional de laboratorio o profesionales de la salud.

Principio Del Procedimiento Este kit ELISA está diseñado, desarrollado y producido para la medición cualitativa del anticuerpo humano anti-COVID-19 en suero. Este ensayo utiliza la técnica de inmunoensayo enzimático basado en microplacas. Se añaden controles de ensayo y muestras de suero humano diluido 1:10 a los pocillos de microtitulación de una microplaca que se revistió con proteína nucleocápsida recombinante COVID-19. Y se agrega a cada pocillo un anticuerpo trazador de IgG antihumano de cabra policlonal marcado con peroxidasa de rábano (PHR). Después del primer período de incubación, la matriz de proteína no unida se elimina con una etapa de lavado posterior. Después de un período de incubación, se forma un inmunocomplejo de "antígeno recombinante COVID-19 - anticuerpo humano anti-COVID-19 - anticuerpo trazador de IgG anti humano marcado con PHR" si hay un anticuerpo IgG de coronavirus específico presente en la muestra analizada. El anticuerpo marcador marcado con PHR unido al pocillo se incuba luego con una solución de sustrato en una reacción temporizada y luego se mide en un lector de microplacas espectrofotométrico. La actividad enzimática del anticuerpo marcador unido al anticuerpo anti-COVID-19 en la pared del pozo de microtitulación es proporcional a la cantidad del nivel de anticuerpo anti-COVID-19 en la muestra analizada.

Resumen y Explicación El nuevo coronavirus 2019 (COVID-19) es un coronavirus de ARN monocatenario. Las comparaciones de las secuencias genéticas de este virus han mostrado similitudes con el SARS-CoV y los coronavirus de murciélago. En humanos, los coronavirus causan infecciones respiratorias. Los coronavirus están compuestos de varias proteínas, incluidas la espiga (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápsida (N). Los resultados sugieren que la proteína espiga retiene suficiente afinidad con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE2) para usarla como mecanismo de entrada de células. Se cree que la transmisión de coronavirus de persona a persona ocurre principalmente entre contactos cercanos a través de gotitas respiratorias generadas por estornudos y tos. La IgG es la inmunoglobulina más abundante que se produce en respuesta a un antígeno y se mantendrá en el cuerpo después de la exposición inicial para una respuesta a largo plazo.

Material es suministrados

1. Policubeta sensibilizada Covid-19
2. Buffer de Diluyente de Conjugado
3. Buffer de Diluyente de la Muestra
4. Sustrato de TMB
5. Conjugado de PHR
6. Control Positivo
7. Control Negativo

Materiales adicionales necesarios no suministrados

1. Recolección de sangre con tapón rojo sin separadores de gel neutro.
2. Centrífuga de laboratorio general para separación de Suero.
3. Washing buffer: 1X Phosphate-buffered saline with 0.1% TWEEN® 20 (PBST) (PBST) ([NaCl]: 137 mM, [KCl]: 2.7 mM, [Na2HPO4]: 10 mM, [KH2PO4]: 1.8 mM, [Tween® 20]: 0.1% (w/v) such as ROCKLAND, Cat# MB-075-1000, or equivalent)
4. Mezclador Vortex
5. Pipetas de precisión de un solo canal capaces de suministrar 10 µL, 25 µL, 100 µL y 1000 µL, etc. Repeating dispenser suitable for delivering 100 µL.
6. Puntas de pipeta desechables adecuadas para dispensar por encima del volumen.
7. Tubo de microcentrífuga desechable o microplaca para dilución de muestra
8. Agua desionizada o destilada
9. Pipeta multicanal ELISA o sistema de lavado automático

(semiautomático)

10. Lector de microplacas espectrofotométrico capaz de leer absorbancia a 650 nm.

Almacenamiento y Estabilidad Almacenar a 2–8 ° C. No congelar. Vuelva a 2–8 ° C inmediatamente después de su uso. No utilizar después de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta.

Advertencias y Precauciones Los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro. El material fuente contiene reactivos que contienen albúmina de suero bovino. Use guantes mientras realiza este ensayo y manipule estos reactivos como si fueran potencialmente infecciosos. Evitar contacto con ojos, piel o ropa. No ingerir ni inhalar humos. En caso de contacto, lávese inmediata y abundantemente con agua durante al menos 15 minutos. Use buenas prácticas de laboratorio.

Preparación de espécimen Las muestras solo deben usarse el mismo día. No se deben utilizar muestras hemolíticas.

Procedimiento de ensayo

Dilución de Conjugado PHR:

1. El conjugado PHR debe agitarse completamente para homogeneizar antes de abrir el vial y comenzar la dilución.
2. Antes de usar, prepare la dilución diluida de HRP-Conjugado 1: 500 con el Buffer de dilución de conjugado (por ejemplo, agregando 20 µL de stock de conjugado de HRP a 10 ml del buffer de dilución de conjugado). El conjugado diluido debe usarse inmediatamente después de la dilución. El conjugado diluido no utilizado debe desecharse al final de la prueba.

Dilución del Control Negativo:

1. El control negativo debe agitarse completamente para homogeneizar antes de abrir el vial y comenzar la dilución.
2. Antes de usar, diluya la dilución de control negativo 1:10 con el buffer de dilución de muestra (por ejemplo, agregue 15 µL de stock de control negativo a 135 µL de buffer de dilución de muestra). El control negativo diluido debe usarse inmediatamente. El control negativo diluido no utilizado debe desecharse al final de la prueba.

Dilución del Control Positivo:

1. El control positivo debe agitarse completamente para homogeneizar antes de abrir el vial y comenzar la dilución.
2. Antes de usar, diluya la dilución de Control Positivo 1:10 con el Buffer de Dilución de Muestra (por ejemplo, agregue 15 µL de stock de Control Positivo a 135 µL de buffer de Dilución de Muestra). El control positivo diluido se debe utilizar de inmediato. El control positivo diluido no utilizado debe desecharse al final de la prueba.

Dilución de Muestras:

1. Recoja la muestra de sangre en un tubo de recolección con tapón rojo mediante punción venosa. (No use tubos con separadores de gel neutro).
2. Permita que la sangre coagule.
3. Separar el suero del coágulo por centrifugación.
4. Transfiera cuidadosamente el suero a un tubo limpio previamente etiquetado.
5. Diluya la dilución de Suero 1:10 con buffer de dilución de muestra (por ejemplo, agregando 15 µL de Suero a 135 µL de Tampón de dilución de muestra). La muestra diluida debe usarse inmediatamente..

Procedimiento de Ensayo:

1. Mezcle el conjugado de PHR diluido y cada control negativo diluido, control positivo y muestra de Suero para obtener una proporción de 1: 1 (por ejemplo, agregando 150µL de conjugado de HRP diluido a 150µL de muestra de Suero).
2. Transfiera 100 µL de mezclas de suero, conjugado de PHR a pozos de microplacas individuales y permita que los pozos se incuben durante 20 minutos a temperatura ambiente (15-30 °C).
3. Lave los pozos manualmente con un dispositivo de pipeteo o una lavadora semiautomática.

A. Methodo Manual:

- i. Decantar las mezclas de suero, conjugado de PHR de los pocillos. Retire todo el reactivo residual de la microplaca golpeándolo sobre papel absorbente con la abertura hacia abajo
- ii. Llene cada pocillo con 120 µl de buffer de lavado con una pipeta multicanal.
- iii. Decanta el 1X PBST de los pozos. Retire todo el buffer de lavado residual de la microplaca golpeándolo sobre papel absorbente con la abertura hacia abajo.
- iv. Repita los pasos ii y iii cuatro veces más. No deje humedad residual en los pocillos en cada paso de lavado.

B. Método semiautomatizado:

- i. Decantar las mezclas de Suero, conjugado de PHR de los pocillos. Retire todo el reactivo residual de la microplaca golpeándolo sobre papel absorbente con la abertura hacia abajo.
 - ii. Llene cada pocillo con 120 µl de buffer de lavado utilizando la lavadora semiautomatizada.
 - iii. Aspirar los pozos a fondo. Retire todo el buffer de lavado residual de la microplaca golpeándolo sobre papel absorbente con la abertura hacia abajo. El reactivo residual puede causar resultados falsos.
 - iv. Repita los pasos ii y iii cuatro veces más. No deje humedad residual en los pocillos en cada paso de lavado.
4. Agregue 100 uL de sustrato TMB a cada pocillo y agite la placa durante 30 segundos.
 5. Incube los pocillos a temperatura ambiente (15-30 ° C) durante 10 minutos para permitir el desarrollo del color (Azul).
 6. Después de 10 minutos, lea el valor de absorbancia usando un lector de microplacas a 650 nm. La prueba debe leerse dentro de 1 minuto después de la finalización de la prueba.

Interpretación de los resultados del ensayo Los resultados positivos y negativos se determinaron tomando el valor de reacción a una DO de 650 nm dividido por el valor de corte. Los valores > 1.1 fueron positivos, mientras que los valores <1.1 fueron negativos
* Valor de corte: promedio + 3SD (nivel de confianza del 99%, muestra negativa: 49 ea) = 0.224

Valor calculado	Resultado	Interpretación
< 1.1	Negativo	Ausencia de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 o que los niveles de anticuerpos estén por debajo de los límites de detección del ensayo.
≥ 1.1	Positivo	Presencia de anticuerpos (ya sea IgG o IgM o ambos) que indican exposición al SARS-CoV-2

- Notas de procedimiento**
1. Se recomienda que todas las muestras se analicen por duplicado. La lectura de absorbancia promedio de cada duplicado debe usarse para la reducción de datos y el cálculo de resultados.
 2. Mantenga los reactivos sensibles a la luz en las botellas originales y evite la exposición innecesaria a la luz.
 3. Guarde las tiras recubiertas de anticuerpos no utilizadas en la bolsa Ziploc de aluminio con desecante para protegerlas de la humedad.
 4. Es necesaria una técnica cuidadosa y el uso de dispositivos de pipeteo calibrados adecuadamente para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
 5. Los tiempos o temperaturas de incubación diferentes a los establecidos en este inserto pueden afectar los resultados.
 6. Evite las burbujas de aire en el micropocillo ya que esto podría dar como resultado una menor eficiencia de unión y un mayor % VC de lectura duplicada.
 7. Todos los reactivos deben mezclarse suave y completamente antes de su uso. Evita la formación de espuma.

Limitaciones del procedimiento

1. Esta prueba es solo para detección cualitativa. Los resultados de la prueba no deben ser la única base para el diagnóstico clínico y el tratamiento. La confirmación de infección con nuevo coronavirus (COVID-19) debe combinarse con los signos clínicos del paciente junto con otras pruebas.
2. En la primera semana del inicio de la infección con el nuevo coronavirus (COVID-19), los resultados de los pacientes pueden ser negativos para IgG. Además, los pacientes con baja inmunidad u otras enfermedades que afectan la función inmune, la falla de órganos sistémicos importantes y el uso de medicamentos que inhiben la función inmune también pueden conducir a resultados negativos de la nueva IgG de coronavirus. La infección previa de SARS u otra cepa de coronavirus puede causar una ligera IgG positiva en vista de la similitud de diferentes cepas.
3. La contaminación bacteriana o fúngica de muestras o reactivos de suero, o la contaminación cruzada entre reactivos puede causar resultados erróneos.
4. El agua desionizada con resinas de poliéster puede inactivar la enzima peroxidasa de rábano (PHR).

Características de rendimiento**Límite de detección**

No hay unidades estandarizadas internacionales disponibles para COVID-19. Una muestra positiva se diluyó en serie y se determinó que el límite de detección no era superior a 0,625 ng / ml.

Repetibilidad

El control del ensayo se prueba en 8 réplicas con un % VC de valores de OD inferiores al 8%.

Reproducibilidad

Se probaron tres lotes con las mismas muestras 8 veces con un % VC inferior al 13%.

Reactividad cruzada

No se observe interferencia para la siguiente enfermedad o agentes infecciosos:

- ◆ Anti-influenza A
- ◆ Anti-influenza B
- ◆ Hepatitis C (VHC)
- ◆ Antinuclear Antibodies (ANA)
- ◆ Hepatitis B (VHB)

Pruebas clínicas

El kit ACCEL ELISA COVID-10 detectó el anticuerpo anti-COVID-19 en el Suero del paciente (n = 90), y en el Suero normal (n = 251) no se detectaron anticuerpos anti-COVID-19. 90 muestras de Suero humano positivo de SARS-CoV-2 y 49 de 251 muestras de Suero humano negativo fueron confirmadas por RT-PCR antes de su uso en esta prueba. El resto de 202 muestras negativas se recogieron antes de diciembre de 2019 antes de la aparición de COVID-19.

		Método de Referencia		Total
		positivo	negativo	
ACCEL ELISA	Positivo	85	0	85
	negativo	5	251	256
Total		90	251	341

sensibilidad : 94.4%
especificidad : 100.0%

Referencias Bibliograficas

1. CDC (2020). Transmission of Novel Coronavirus (COVID-19).
2. Chenjia Yuan, Shi Jinsong , Qidong An , Liu Chang , Li Xin , Qiang , Ruanji Shou , mountains . Wuhan 2019 Bioinformatics coronavirus genome analysis [J / OL]. Bioinformatics: 1-10 [2020-02-10].
3. Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses Methods in Molecular Biology* 10.1007/978-1-4939-2438-7_1
4. Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. (2005). spike receptor-binding domain complexed with its receptor. doi: 10.2210/pdb2ajf/pdb
5. Wu, L.-P., Wang, N.-C., Chang, Y.-H., Tian, X. G.-D. (2007). Duration of Antibody Responses after Sever Syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), 1562 10.3201/eid1310.070576
6. Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., ... Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and mode protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences* 10.1007/s11427-020-1637-5
7. Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

Agenda de
símbolos
(EN980
/ISO15223)

Fabricante



Dispositivo médico para diagnóstico In

Vitro



Temperatura de almacenamiento



Consulte las instrucciones de uso



Código de lote



Número de catalogo



Fecha de
revisión

2020.07.01

Revision No. 1
