

ELISA para la detección de IgG anti-SARS-CoV-2

Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.



CONTENIDO

1. USO PREVISTO - 3
2. RESUMEN - 3
3. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA - 3
4. REACTIVOS SUMINISTRADOS Y MATERIALES - 4
5. MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS - 4
6. ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PRUEBA - 5
7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD - 5
8. PREPARACIÓN DE REACTIVOS SUMINISTRADOS – 5
9. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA - 6
10. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO - 6
11. CONTROL DE CALIDAD - 7
12. RESULTADOS ESPERADOS - 7
13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO - 8
14. PRECAUCIONES Y SEGURIDAD - 8
15. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE PRUEBA – 10

Este kit está fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.

¡Utilice solo la versión actual de la Hoja de datos del producto adjunta al kit!

1. USO PREVISTO

El kit SARS-CoV-2 S1RBD IgG ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), para la detección y medición cualitativa de anticuerpos de clase IgG contra la proteína de espiga S-ECD del virus SARS-CoV-2 en suero y plasma humano.

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

2. RESUMEN

En diciembre de 2019, un nuevo coronavirus, ahora oficialmente nombrado síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), fué identificado en Wuhan China, que causó el 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, que 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.

La proteína de espiga (S) es una proteína anclada en la envoltura involucrada en el reconocimiento y la unión de SARS-CoV-2 a las células huésped. La proteína S puede ser escindida adicionalmente por la proteasa del huésped en dos subunidades llamadas S1 y S2. El polipéptido S1 contiene un dominio de unión al receptor (S1-RBD) crucial para el reconocimiento específico y la interacción con el receptor humano ACE2, el cual es el primer paso y el más esencial para la infección por el virus.

3. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

El kit ELISA SARS-CoV-2 S-ECD IgG es un kit de inmunoensayo de incubación en dos pasos. El dominio de unión al receptor de la proteína de espiga S recombinante (S-ECD) de SARS-CoV-2 se encuentra adsorbido sobre las tiras de micropocillos de poliestireno y puede reconocer específicamente anticuerpos anti-S-ECD en muestras de suero o plasma humano. Después de una incubación de 30 minutos, los anticuerpos anti-S1RBD son capturados por la proteína S1RBD inmovilizada mientras que los componentes no unidos se lavan. Después, Se agrega una solución de detección que contiene Anti-IgG humano conjugada con HRP para otra incubación de 30 min. en donde la Anti-IgG humano conjugada con HRP se une a los anticuerpos de la clase IgG previamente unidos a la proteína S-ECD en la placa. Después de eliminar las uniones inespecíficas, se agrega una solución de sustrato HRP que contiene 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB), resultando en la formación de un color azul. La reacción de color se detiene con una solución de paro, transformando el color azul en señales amarillas, que se cuantifica por un lector de microplacas de absorbancia a 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-S1RBP capturados dentro de los pozos.

4. REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

Componentes del kit	Cantidad
<ul style="list-style-type: none">• Placa ELISA revestida con SARS-CoV-2 S-ECD• Cada pocillo contiene S-ECD recombinante de SARS-CoV-2.• 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 vuelva a 2-8 ° C.• Una vez abierto, se mantiene estable durante 4 semanas a 2-8 ° C.	12 tiras x 8 pocillos (96 pocillos en total) en una porta tiras blanco y sellado en una bolsa de aluminio con desecante.
Buffer diluyente de muestra (10x)	1 x 20 ml
Buffer de Lavado (10x)	1 x 40 ml
Conjugado anti-IgG humano (HRP) (100x)	1 x 0.12 ml
Solución de sustrato	1 x 12 ml
Solución de alto.	1 x 12 ml
Control Blanco	2 x 1 ml

5. MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas y puntas de pipeta.
- Lavador manual de placas o tiras de 96 pocillos
- Depósitos de reactivos y buffer
- Toallas de papel o papel absorbente.
- Lector de microplacas/ Espectrofotometro capaz de leer la absorbancia a 450 nm o doble longitud de onda a 450/600 ~ 650 nm.
- Agua destilada o agua desionizada.

6. ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PRUEBA

- Se sugiere analizar las muestras de prueba inmediatamente después de la separación de suero o plasma. O preferiblemente almacenada congelada (-20 ° C o menos) en alícuotas. Se deben evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Se recomienda analizar la prueba por duplicado.
- Muestras de suero o plasma (con EDTA, citrato de sodio o heparina) pueden ser analizados. No se recomiendan muestras altamente lipémicas, ictéricas o con hemólisis. No se deben utilizar muestras con contaminación microbiana visible.
- Cuando sea necesario, analice con vórtex las muestras de suero o plasma a temperatura ambiente para garantizar la homogeneidad. Luego centrifugue las muestras a 10,000 a 15,000 rpm durante 5 minutos antes del ensayo para eliminar partículas. No omita este paso de centrifugación si las muestras están turbias y contienen partículas.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El kit debe almacenarse a 2-8 ° C una vez recibido, y todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso. Retire las tiras recubiertas de antígeno no utilizadas de la microplaca, devuélvalos a la bolsa de aluminio y vuelva a sellarlos. 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.

8. PREPARACIÓN DE REACTIVOS SUMINISTRADOS

8.1 Buffer de ensayo (1x)

Prepare 1x Buffer de ensayo mezclando el Buffer de ensayo 5x (30 ml) con 120 ml de agua destilada o agua desionizada. Si se observan precipitados en la botella de Buffer de ensayo 5x, caliente la botella en un baño maria a 37 ° C hasta que desaparezcan los precipitados. El buffer de ensayo 1x se puede almacenar a 2-8 ° C por hasta un mes.

8.2 Buffer de lavado (1x)

Prepare 1x Buffer de lavado mezclando el 10x Buffer de lavado (40 ml) con 360 ml de agua destilada o agua desionizada. Si se observan precipitados en la botella de Buffer de lavado 10x, caliente la botella en un baño de agua a 37 ° C hasta que desaparezcan los precipitados. El buffer de lavado 1x se puede almacenar a 2-8 ° C por hasta un mes.

8.3 Solución de conjugado anti-IgG humano (HRP) (1x)

Gira hacia abajo la Solución de detección de anticuerpos 100x brevemente, y diluir la cantidad deseada del anticuerpo 1: 100 con 1x Buffer de ensayo, Se requieren 100 µl de la Solución de detección de anticuerpos 1x por pocillo. Prepare solo la cantidad necesaria de la Solución de detección de anticuerpo 1x que sea necesaria. Regrese la Solución de detección de anticuerpo 100x a 2-8 ° C inmediatamente después de que se elimine el volumen necesario.

9. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra de suero o plasma generalmente requiere una dilución de 100 veces en el Buffer diluyente de muestra 1x. Un paso de dilución sugerido es agregar 10 µl de muestra a 990 µl de Buffer de ensayo 1x. El factor de dilución se puede ajustar en función del título de los anticuerpos en las muestras, Sin bajar de la proporción 1:100.

10. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

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

Paso 1	Agregar controles y muestra: Agregue 100 µl de Muestra y 100 µl de Control Blanco en sus respectivos pocillos. Se recomienda una prueba duplicada tanto para la Muestra como para el Control blanco. Nota: Use una punta de pipeta desechable para cada Muestra y Blanco para evitar la contaminación cruzada. Mezcle golpeando suavemente la placa.
Paso 2	Incubación: Cubra la placa e incube a temperatura ambiente durante 30 min.
Paso 3	Lavado: Deseche el contenido y golpee la placa sobre una toalla de papel limpia para eliminar la solución residual en cada pocillo. Agregue 300 µl de Buffer de lavado 1x a cada pocillo e incube durante 1 minuto. Deseche el Buffer de lavado 1x y golpee la placa sobre una toalla de papel limpia para eliminar el Buffer de lavado residual. Repita el paso de lavado para un total de 5 lavados.
Paso 4	Agregando Solución de detección conjugada con HRP: Agregue 100 µl de Solución de conjugado anti-IgG humano (HRP) 1x a cada pocillo.
Paso 5	Incubación: Cubra la placa e incube a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Paso 6	Lavado: Lave cada pocillo 5 veces como se describe en el paso 3.
Paso 7	Colorante: Agregue 100 µl de la solución sustrato a cada pocillo, incube a temperatura ambiente durante 15 minutos. Proteja de la luz.
Paso 8	Reacción de alto: Agregue 100 µl de Solución de alto a cada pocillo, golpee suavemente el marco de la placa durante unos segundos para garantizar una mezcla completa.
Paso 9	Medición: Mida la absorbancia de cada pocillo a 450 nm inmediatamente. Si se utiliza un instrumento de filtro doble, establezca la longitud de onda de referencia en 600 ~ 650 nm. Calcule el valor de corte y evalúe los resultados. (Nota: Leer la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción).

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente. Si la lectura se basa en un lector de placa de filtro único (450 nm). Todos los resultados deben calcularse restando el valor de absorbancia del pozo en blanco.

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 del paciente que se analiza.

- El valor de absorbancia del pozo en blanco debe ser <0.100 a 450 nm.

12. RESULTADOS ESPERADOS

Muestras	OD450
Control Blanco	0.060
	0.052
Suero de sujetos sanos	0.144
	0.324
	0.265
Suero de pacientes con COVID-19	0.95
	1.004
	1.367

Se recogieron muestras de casos confirmados con COVID-19 con síntomas clínicos, anomalías de laboratorio o manifestaciones de imagen pulmonar. No se han realizado pruebas en muestras de infecciones latentes o pacientes en el período de incubación.

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal y patológico para el nivel de IgG anti-S-ECD. Además, también se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras de control en el ensayo.

13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Se analizaron muestras positivas (sueros de pacientes positivos a COVID-19 por RT-PCR), y muestras negativas (sueros de individuos negativos a COVID-19).

Método	RT-PCR			Resultados Totales
	Resultados	Positivo	Negativo	
ELISA para la detección de IgG anti-SARS-CoV-2 (suero/plasma)	Positivo	50	3	53
	Negativo	9	114	123
	Resultados totales	59	117	176

14. PRECAUCIONES Y SEGURIDAD

Los ensayos ELISA son sensibles al tiempo y a la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, siga estrictamente los pasos del procedimiento de prueba.

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 las pruebas.
2. Asegúrese de que todos los reactivos estén dentro de la validez indicada en la caja del kit y del mismo lote. Nunca use reactivos después de la fecha de caducidad 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 no generar espuma. Regrese a 2-8 ° C inmediatamente después de su uso.
4. Use solo un volumen suficiente de muestra cómo se indica en los pasos del procedimiento. De lo contrario, puede causar 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 pocillos 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 de pipeta de eliminación diferentes para cada muestra y reactivos para evitar contaminaciones cruzadas.

9. Al agregar muestras o buffers, no toque el fondo del pozo con la punta de la pipeta.
10. Al medir con un lector de placa o espectrofotómetro, determine la absorbancia a 450 nm o a 450/600 ~ 650 nm.
11. La actividad enzimática del conjugado HRP podría verse afectada por el polvo y los químicos reactivos y 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 normas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) puede garantizar la seguridad personal.
13. Nunca coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio de análisis. Nunca pipetee las soluciones por vía oral.
14. Los productos químicos deben manipularse y eliminarse solo de acuerdo con las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) vigentes y las reglamentaciones locales o nacionales.
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. Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS) disponible a pedido.
16. Algunos reactivos pueden causar toxicidad, irritación, quemaduras o tener un efecto cancerígeno como materia prima. Se debe evitar el contacto con la piel y la mucosa, pero no se limita a los siguientes reactivos: la solución de parada, la solución de sustrato y el tampón de lavado.
17. La solución de paro es un ácido, úselo con el cuidado apropiado, limpie los derrames inmediatamente y lavarse con abundante agua si entra en contacto con la piel o los ojos.

15. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE PRUEBA

Agregue 100 μ l de muestra (previamente preparada) a cada pocillo.



Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.



Aspirar y lavar cada pocillo cinco veces.



Agregue 100 μ l de Solución de detección de anticuerpo 1 \times a cada pocillo.



Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.



Aspirar y lavar cada pocillo cinco veces.



Agregue 100 μ l de Solución de sustrato a cada pocillo.



Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.



Agregue 100 μ l de Solución de alto a cada pocillo.



Mida la absorbancia de cada pocillo a 450 nm.



Cálculo e Interpretación