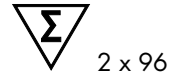


Novembro 2021

# Instruções de utilização do QuantiFERON<sup>®</sup> SARS-CoV-2 ELISA Kit



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro

Para utilização com os QuantiFERON<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes



626420



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, EUA  
Telefone: +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724  
Hilden, Alemanha



R1 1124420PT



# Índice

Utilização prevista .....	5
Utilizador previsto .....	6
Descrição e princípio .....	7
Resumo e explicação .....	7
Materiais fornecidos .....	9
Conteúdo do kit .....	9
Componentes do kit.....	10
Plataforma e software .....	10
Materiais necessários, mas não fornecidos .....	11
Reagentes adicionais .....	11
Equipamento.....	11
Avisos e precauções .....	12
Informações de segurança.....	12
Precauções .....	13
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	16
Estabilidade na utilização .....	16
Reagentes reconstituídos e não utilizados.....	16
Armazenamento e manuseamento de espécimes .....	17
Procedimento: Executar o ELISA .....	18
Protocolo: IFN- $\gamma$ ELISA .....	18
Resultados (cálculos) .....	24
Geração de curva-padrão e valores da amostra .....	24

---

Controlo de qualidade do teste .....	26
Interpretação de resultados .....	28
Limitações .....	29
Características de desempenho do ensaio .....	30
Desempenho analítico .....	30
Desempenho clínico .....	41
Referências .....	48
Guia de resolução de problemas .....	53
Símbolos .....	57
Informações de contacto .....	58
Apêndice A: Informações técnicas .....	59
Resultados indeterminados .....	59
Amostras de plasma coaguladas .....	59
Amostras de plasma lipémicas .....	59
Apêndice B: Procedimento abreviado do teste ELISA .....	60
Informações de encomenda .....	62
Histórico de revisões do documento .....	63

## Utilização prevista

O ensaio QuantiFERON SARS-CoV-2 é um teste de diagnóstico *in vitro* concebido para a deteção qualitativa do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produzido pelas células T CD4+ e CD8+ em resposta à estimulação por um cocktail de péptidos do SARS-CoV-2 em sangue total heparinizado. A quantidade de IFN- $\gamma$  produzido é medida utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

O ensaio QuantiFERON SARS-CoV-2 destina-se a auxiliar na avaliação da resposta imunitária mediada por células (Cell-Mediated Immune, CMI) em indivíduos sem historial de infeção por SARS-CoV-2 que receberam vacinação contra a COVID-19 com vacinas que têm como alvo a proteína da espícula (S) do vírus SARS-CoV-2.

O ensaio QuantiFERON SARS-CoV-2 deve ser utilizado em conjunto com outros testes laboratoriais e avaliações epidemiológicas/clínicas para determinar a resposta imunitária de um indivíduo à vacinação contra a COVID-19.

Após a vacinação, o desenvolvimento de respostas imunitárias das células T poderá demorar vários dias, embora o tempo de presença das respostas imunitárias das células T não esteja bem caracterizado em indivíduos vacinados.

Resultados não reativos não excluem a presença de infeção ativa por SARS-CoV-2 nem determinam a eficácia das vacinas contra a COVID-19. Se se suspeitar de infeção ativa, confirme utilizando outro teste molecular ou de antígeno para o SARS-CoV-2. Os resultados do ensaio devem ser sempre utilizados em conjunto com o exame clínico, o historial médico do paciente e outros resultados.

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

---

## Utilizador previsto

Este kit destina-se a utilização profissional.

O produto deve ser utilizado apenas por pessoal com formação específica, especializado em técnicas de biologia molecular e familiarizado com esta tecnologia.

# Descrição e princípio

## Resumo e explicação

O QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) é um ensaio qualitativo que utiliza tubos de colheita de sangue especializados com antígenos péptidos que estimulam as células imunitárias utilizando proteínas específicas do SARS-CoV-2. A incubação do sangue ocorre em tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado para presença de IFN- $\gamma$  produzido em resposta aos antígenos péptidos. As respostas mediadas por células T específicas à infecção por SARS-CoV-2 foram relatadas após a vacinação com diferentes tipos de vacinas que têm como alvo a proteína da espícula [1–34].

Em primeiro lugar, o sangue total é colhido para cada um dos QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes, que incluem um tubo Nil, um tubo Ag1, um tubo Ag2 e um tubo Mitogen. Alternativamente, o sangue pode ser colhido num único tubo de colheita de sangue que contém heparina de lítio ou sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes.

Os QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes são agitados para misturar o antígeno com o sangue e devem, logo que possível, ser incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  no prazo de 16 horas após a colheita. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é processado e a quantidade de IFN- $\gamma$  (UI/ml) é medida pelo ELISA. O QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA utiliza uma solução-padrão de IFN- $\gamma$  humano recombinante que tenha sido testada em relação a uma preparação de IFN- $\gamma$  de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Os resultados das amostras de teste são indicados em Unidades Internacionais por ml (UI/ml) relativamente a uma curva-padrão preparada testando a diluição da solução-padrão fornecida com o kit.

---

Anticorpos heterófilos (por ex., anticorpo anti-rato humano) em soro ou plasma de certos indivíduos são uma causa conhecida de interferência com imunoenaios. O efeito dos anticorpos heterófilos no QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA é minimizado pela adição de soro normal de rato no diluente verde e a utilização de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')<sub>2</sub> como o anticorpo de captura do IFN- $\gamma$  no revestimento dos poços de microplacas.

A amostra de plasma do tubo Mitogen serve como um controlo positivo de IFN- $\gamma$  para cada espécime testado. Uma resposta baixa a Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tiver uma resposta não reativa às proteínas do SARS-CoV-2. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado do espécime, enchimento/mistura do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- $\gamma$ . Níveis elevados de IFN- $\gamma$  na amostra de Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou para a secreção de IFN- $\gamma$  intrínseca. O tubo Nil ajusta-se aos efeitos de fundo (por ex., níveis elevados de IFN- $\gamma$  circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- $\gamma$  do tubo Nil é subtraído ao nível de IFN- $\gamma$  dos tubos Ag 1, Ag 2 e Mitogen.



# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

<b>Componentes do ELISA</b>	<b>Kit de 2 placas</b>
N.º de catálogo	626420
Microplate Strips (Tiras da microplaca) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ humano murino	2 conjuntos de tiras da microplaca 12 x 8
IFN- $\gamma$ Standard (Solução-padrão de IFN- $\gamma$ ) liofilizada (contém IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, timerosal a 0,01% p/v)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado concentrado 100x), liofilizado (HRP de anti-IFN- $\gamma$ humano murino, contém timerosal a 0,01%)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem concentrado 20x) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas) (contém H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 x 15 ml
<i>QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit Instructions for Use (Instruções de utilização do QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit)</i>	1

\* Contém ácido sulfúrico

---

## Componentes do kit

### Controlos e calibradores

O QFN SARS ELISA utiliza uma solução-padrão de IFN- $\gamma$  humano recombinante que tenha sido testada em relação a uma preparação de IFN- $\gamma$  de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535).

### Plataforma e software

O software de análise QFN SARS é opcional e pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível para transferência em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Materiais necessários, mas não fornecidos

## Reagentes adicionais

- Água desionizada ou destilada, 2 litros

## Equipamento\*

- Incubadora a  $37 \pm 1$  °C (com ou sem CO<sub>2</sub>)
- Pipetas de volume calibrado variável para fornecimento de 10 µl a 1000 µl com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada, capaz de fornecer 50 µl e 100 µl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas com capacidade para velocidades entre 500 e 1000 rpm
- Lavadora de microplacas (recomenda-se a utilização de uma lavadora de placas automática para garantir a segurança no manuseamento de amostras de plasma).
- Leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm
- Vórtex de velocidade variável
- Centrífuga capaz de centrifugar os tubos de colheita de sangue até, pelo menos, 3000 RCF (g)
- Proveta graduada, 1 ou 2 litros
- Tampa de placa
- Toalhas absorventes com liberação reduzida de pelos

\* Antes de utilizar, certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

---

# Avisos e precauções

Para os clientes na União Europeia, tenha em atenção que poderá ser necessário comunicar incidentes graves, que tenham ocorrido em relação ao dispositivo, ao fabricante e à autoridade reguladora do estado-membro onde o utilizador e/ou o paciente estão estabelecidos.

## Informações de segurança


Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a ficha de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos e devem ser tratados como materiais de risco biológico.
- Elimine as amostras e os resíduos dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos. Elimine as amostras e os resíduos dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- O ensaio QFN SARS deve ser utilizado em conjunto com outros testes laboratoriais e avaliações epidemiológicas/clínicas para determinar a resposta imunitária de um indivíduo à vacinação contra a COVID-19.
- Um resultado não reativo do QFN SARS não exclui a possibilidade de infeção por SARS-CoV-2 nem determina a eficácia das vacinas contra a COVID-19. Os resultados não reativos falsos podem ocorrer devido a manuseamento incorreto dos tubos de colheita de sangue após punção venosa, execução incorreta do ensaio ou outras variáveis imunológicas individuais, incluindo as relacionadas com quaisquer comorbidades. A

produção de IFN- $\gamma$  não específico ou anticorpos heterófilos a partir de outras condições inflamatórias poderá mascarar respostas específicas aos péptidos do SARS-CoV-2.

- Um resultado reativo do QFN SARS não deve ser a base única ou definitiva para determinar a eficácia das vacinas contra a COVID-19. A execução incorreta do ensaio pode causar resultados reativos falsos do QFN SARS.
- Um resultado reativo falso do QFN SARS pode resultar de uma colheita incorreta da amostra de sangue ou de um manuseamento inadequado do espécime, afetando a função dos linfócitos. Consulte "Procedimento: Executar o ELISA", página 18, para obter informações sobre o correto manuseamento de espécimes de sangue. O atraso na incubação pode levar a resultados indeterminados ou não reativos falsos, e outros parâmetros técnicos podem afetar a capacidade de deteção de uma resposta do IFN- $\gamma$  significativa.
- Uma resposta baixa a Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tiver uma resposta não reativa às proteínas do SARS-CoV-2. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado do espécime, enchimento/mistura do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- $\gamma$ . Níveis elevados de IFN- $\gamma$  na amostra de Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou para a secreção de IFN- $\gamma$  intrínseca.

## Precauções

<p><b>CUIDADO</b></p> 	<p>Manuseie o sangue humano como se se tratasse de sangue potencialmente infeccioso.</p> <p>Cumpra todas as diretrizes relevantes para o manuseamento de sangue. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou respetivos produtos em conformidade com a legislação local.</p>
---	--

### QuantifERON Enzyme Stopping Solution



Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para os metais. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### QuantifERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### QuantifERON Green Diluent



Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### QuantifERON Wash Buffer 20x Concentrate

Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a libertação para o ambiente.

## Informações adicionais

Fichas de dados de segurança: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- O timerosal é utilizado como um conservante em alguns reagentes do QFN SARS. Pode ser tóxico em caso de ingestão, inalação ou contacto com a pele.
- Divergências em relação às *Instruções de utilização do QuantifERON ELISA Kit* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes da utilização. Não utilize os frascos de conjugado ou de solução-padrão de IFN- $\gamma$  que apresentem sinais de danos ou se o vedante de borracha não estiver em perfeitas condições. Não manuseie frascos partidos. Tome as precauções adequadas para eliminar os frascos em segurança. Recomenda-se a utilização de um dispositivo próprio para abrir os frascos de conjugado ou de solução-padrão de IFN- $\gamma$ , para minimizar o risco de ferimentos com a tampa metálica.

- 
- Não misture nem utilize as tiras da microplaca, a solução-padrão de IFN- $\gamma$ , o diluente verde ou o conjugado concentrado 100x de diferentes lotes de kits QFN SARS. Os outros reagentes (tampão de lavagem concentrado 20x, solução de substrato de enzimas e solução de paragem de enzimas) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados.
  - Elimine os reagentes e amostras biológicas não utilizados em conformidade com a legislação em vigor.
  - Não utilize o QFN SARS ELISA Kit após o prazo de validade.
  - É necessário cumprir sempre os procedimentos laboratoriais corretos.
  - Certifique-se de que o equipamento laboratorial, por exemplo, as lavadoras e os leitores de placas, se encontra calibrado/validado para utilização.

---

# Armazenamento e manuseamento de reagentes

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade ou armazenados de forma incorreta.

## Estabilidade na utilização

- Armazene o kit ELISA a 2–8 °C.
- Mantenha a solução de substrato de enzimas sempre protegida da luz solar direta.

## Reagentes reconstituídos e não utilizados

- Para obter instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte "Procedimento: Executar o ELISA", página 18.
- A solução-padrão reconstituída do kit pode ser guardada durante um máximo de 3 meses, se armazenada entre 2–8 °C.

Anote a data na qual a solução-padrão do kit foi reconstituída.

- O conjugado concentrado 100x reconstituído tem de ser novamente armazenado entre 2–8 °C e também tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.

Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

- O conjugado funcional tem de ser utilizado no prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado à temperatura ambiente durante um máximo de 2 semanas.



---

## Armazenamento e manuseamento de espécimes

Consulte as *Instruções de utilização dos QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes* (1124422) para obter detalhes sobre o fluxo de trabalho de colheita de sangue para o teste QFN SARS.

# Procedimento: Executar o ELISA

## Protocolo: IFN- $\gamma$ ELISA

### Pontos importantes

- Consulte Conteúdo do kit, página 9, e Materiais necessários, mas não fornecidos, página 11, para saber quais os materiais necessários para executar o ELISA.

### Configuração (tempo necessário para executar o ensaio)

De forma a obter resultados válidos do ensaio QFN SARS, o operador precisa de executar tarefas específicas dentro de tempos definidos. Antes da utilização do ensaio, recomenda-se que o operador planeie cuidadosamente cada fase do ensaio para permitir o tempo adequado para cada fase. O tempo necessário é estimado abaixo; o tempo de teste de várias amostras quando em lote também é indicado.

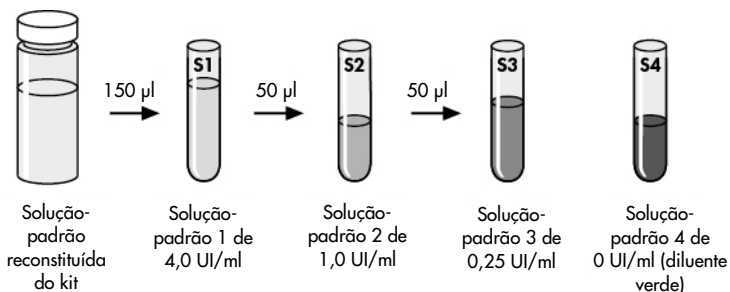
- Aproximadamente 3 horas para uma placa do ELISA
- <1 hora de trabalho
- Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

### Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.
2. Remova da estrutura as tiras de placa do ELISA que não são necessárias, sele a bolsa de alumínio e volte a colocar no frigorífico para conservação até serem necessárias.
3. Deixe pelo menos 1 tira para as soluções-padrão QFN SARS e tiras suficientes para o número de indivíduos a serem testados (consulte a Figura 2 para obter o formato recomendado da placa). Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.

- 3a. Reconstitua a solução-padrão de IFN- $\gamma$  com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco é completamente dissolvido. A reconstituição da solução-padrão de IFN- $\gamma$  com o volume correto produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.
- 3b. Utilizando a solução-padrão reconstituída, prepare uma série de diluição de 4 concentrações de IFN- $\gamma$  (consulte a Figura 1).
- 3c. Deverá ser gerada uma curva-padrão com as seguintes concentrações de IFN- $\gamma$ :
  - S1 (Solução-padrão 1) contém 4,0 UI/ml
  - S2 (Solução-padrão 2) contém 1,0 UI/ml
  - S3 (Solução-padrão 3) contém 0,25 UI/ml
  - S4 (Solução-padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas diluente verde [Green Diluent, GD]).
- 3d. As soluções-padrão têm de ser testadas, pelo menos, em duplicado.
- 3e. Prepare novas diluições da solução-padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Procedimento	
A	Rotular os 4 tubos: S1, S2, S3, S4
B	Adicionar 150 $\mu$ l de GD a S1, S2, S3, S4
C	Adicionar 150 $\mu$ l da solução-padrão do kit a S1 e misturar bem
D	Transferir 50 $\mu$ l de S1 para S2 e misturar bem
E	Transferir 50 $\mu$ l de S2 para S3 e misturar bem
F	Apenas GD serve como solução-padrão zero (S4)



**Figura 1. Preparação da série de diluição da curva-padrão.**

4. Reconstitua o conjugado concentrado 100x liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco é completamente dissolvido.
  - 4a. O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de conjugado concentrado 100x reconstituído em diluente verde (Tabela 1).
  - 4b. O conjugado funcional deve ser utilizado no prazo de 6 horas após a preparação.
  - 4c. Volte a colocar qualquer conjugado concentrado 100x não utilizado a 2–8 °C imediatamente após a utilização.

**Tabela 1. Preparação de conjugado (funcional)**

Número de tiras	Volume de conjugado (concentrado 100x)	Volume de diluente verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita de sangue e subsequentemente armazenadas (refrigeradas ou congeladas), misture bem a amostra armazenada antes de adicionar ao poço ELISA. As amostras de plasma podem ser

armazenadas em QFN SARS Blood Collection Tubes centrifugados durante um máximo de 28 dias a 2–8 °C ou as amostras de plasma colhidas podem ser armazenadas durante um máximo de 28 dias a 2–8 °C. As amostras de plasma colhidas também podem ser armazenadas abaixo de –20 °C (preferencialmente até –70 °C) durante um máximo de 24 meses.

As amostras de plasma podem ser carregadas/utilizadas diretamente dos tubos de colheita de sangue centrifugados para medição na placa do QFN SARS ELISA.

**Importante:** Se pretender transferir as amostras de plasma diretamente a partir dos QFN SARS Blood Collection Tubes centrifugados, deve evitar misturar, seja de que forma for, o plasma. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado a cada poço da placa do ELISA.
7. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados (consulte o esquema recomendado da placa do ELISA na Figura 2).
8. Por fim, adicione 50 µl de cada solução-padrão 1 a 4 aos poços da placa adequados (consulte o esquema recomendado da placa do ELISA na Figura 2). As soluções-padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 Ag1	3 Ag1	5 Ag1	7 Ag1	9 Ag1	S2	S2	13 Ag1	15 Ag1	17 Ag1	19 Ag1	21 Ag1
C	1 Ag2	3 Ag2	5 Ag2	7 Ag2	9 Ag2	S3	S3	13 Ag2	15 Ag2	17 Ag2	19 Ag2	21 Ag2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 Ag1	4 Ag1	6 Ag1	8 Ag1	10 Ag1	11 Ag1	12 Ag1	14 Ag1	16 Ag1	18 Ag1	20 Ag1	22 Ag1
G	2 Ag2	4 Ag2	6 Ag2	8 Ag2	10 Ag2	11 Ag2	12 Ag2	14 Ag2	16 Ag2	18 Ag2	20 Ag2	22 Ag2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

**Figura 2. Esquema recomendado da placa do ELISA.** S1 (Solução-padrão 1), S2 (Solução-padrão 2), S3 (Solução-padrão 3), S4 (Solução-padrão 4). 1 N (Amostra 1. Plasma de controlo de Nil), 1 Ag1 (Amostra 1. Plasma de Ag1), 1 Ag2 (Amostra 1. Plasma de Ag2), 1 M (Amostra 1. Plasma de Mitogen).

9. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e misture bem o conjugado e as amostras de plasma/soluções-padrão, utilizando um agitador de microplacas durante 1 minuto entre 500 a 1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante  $120 \pm 5$  minutos. Durante a incubação, a placa do ELISA não deve ser exposta à luz solar direta. Desvios do intervalo de temperaturas especificado podem dar origem a resultados errados.
11. Durante a incubação da placa do ELISA, prepare o tampão de lavagem funcional. Dilua uma parte do tampão de lavagem concentrado 20x com 19 partes de água desionizada ou destilada, e misture bem. É fornecido tampão de lavagem concentrado 20x suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional.
12. Assim que a incubação da placa do ELISA estiver concluída, lave os poços da placa do ELISA com 400  $\mu\text{l}$  de tampão de lavagem funcional. Execute o passo de lavagem, no mínimo, 6 vezes. Por questões de segurança, recomenda-se a utilização de uma lavadora de placas automática durante o manuseamento de amostras de plasma.

A lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está completamente cheio com tampão de lavagem até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante normal de laboratório ao reservatório de efluente, e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

13. Bata na placa do ELISA, virada para baixo sobre uma toalha absorvente (com libertação reduzida de pelos), para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100  $\mu\text{l}$  de solução de substrato de enzimas a cada poço da placa, cubra a placa com uma tampa e misture bem durante 1 minuto a 500–1000 rpm, utilizando um agitador de microplacas.

- 
14. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos. Durante a incubação, a placa do ELISA não deve ser exposta à luz solar direta.
  15. Após a incubação de 30 minutos, adicione 50  $\mu\text{l}$  da solução de paragem de enzimas a cada poço da placa, pela mesma ordem de adição do substrato, e misture bem entre 500 a 1000 rpm, utilizando um agitador de microplacas.
  16. Meça a densidade ótica (Optical Density, OD) dos poços da placa do ELISA no prazo de 5 minutos após a paragem da reação, utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 nm a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.

# Resultados (cálculos)

O software de análise QFN SARS pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do software de análise QFN SARS.

O software executa uma avaliação de controlo de qualidade do ensaio, gera uma curva-padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado em "Interpretação de resultados", página 28. O software indica todas as concentrações superiores a 10 UI/ml como ">10", uma vez que esses valores ultrapassam o intervalo linear validado do ELISA.

Como alternativa à utilização do software de análise QFN SARS, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir descrito.

## Geração de curva-padrão e valores da amostra

Se o software de análise QFN SARS não for utilizado

A determinação da curva-padrão e dos valores da amostra UI/ml requer um programa de folhas de cálculo, como o Microsoft® Excel®, se não for utilizado o software de análise QFN SARS.

### Utilização de um programa de folhas de cálculo

1. Determine os valores médios de OD das réplicas de solução-padrão do kit de cada placa.
2. Construa uma curva-padrão de  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ , traçando o  $\log_{(e)}$  da OD média (eixo Y) em função do  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  das soluções-padrão em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos a solução-padrão zero. Calcule a linha de correlação da curva-padrão através de análise de regressão.



3. Utilize a curva-padrão para determinar a concentração de IFN- $\gamma$  (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de OD de cada amostra.
4. Estes cálculos podem ser efetuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software padrão de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft Excel). Recomendamos que sejam utilizados estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (Coefficient of Variation, %CV) das soluções-padrão e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva-padrão.

### Cálculo da amostra

Se as seguintes leituras de OD fossem obtidas para as soluções-padrão, os cálculos que utilizam  $-\log(e)$  – seguiriam os da Tabela 2.

**Tabela 2. Curva-padrão**

Solução-padrão	UI/ml	Valores a e b de OD	OD média	%CV	$\text{Log}_{(e)}$ UI/ml	$\text{Log}_{(e)}$ médio (Optical Density, OD)
Solução-padrão 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Solução-padrão 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Solução-padrão 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	NA	-1,386	-2,079
Solução-padrão 4	0	0,034, 0,037	0,036	NA	NA	NA

A equação da curva é  $y = 0,7885(X) - 0,9837$ , onde "m" = 0,7885 e "c" = -0,9837. Este valores são utilizados na equação  $X = (Y-c)/m$  para obter o valor de X. Com base na curva-padrão, o coeficiente de correlação calculado é ( $r$ ) = 1,000. NA: Não aplicável.

A validade do ensaio é determinada utilizando os critérios especificados em "Controlo de qualidade do teste", página 26.

A curva-padrão (Tabela 2) é utilizada para converter as respostas de OD do antígeno para unidades internacionais (UI/ml)

**Tabela 3. Cálculo da amostra**

Antígeno	Valor de OD	Log <sub>(e)</sub> valor de OD	X	e <sup>X</sup> (UI/ml)	Antígeno – Nil (UI/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Os valores de IFN- $\gamma$  (em UI/ml) para Ag1, Ag2 e Mitogen são corrigidos quanto ao fundo ao subtrair o valor em UI/ml obtido pelo respetivo controlo Nil. Estes valores corrigidos são utilizados para a interpretação dos resultados do teste.

## Controlo de qualidade do teste

A exatidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva-padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados das soluções-padrão devem ser examinados antes de se poder interpretar os resultados das amostras do teste.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD média da Solução-padrão 1 tem de ser  $\geq 0,600$ .
- O %CV dos valores replicados da Solução-padrão 1 e da Solução-padrão 2 tem de ser  $\leq 15\%$ .
- Os valores de OD replicados da Solução-padrão 3 e da Solução-padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 unidades de densidade ótica da respetiva média.
- O coeficiente de correlação ( $r$ ) calculado a partir dos valores médios de absorvância das soluções-padrão tem de ser  $\geq 0,98$ .

- Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.
- O valor de OD média da Solução-padrão zero (Diluyente verde) deve ser  $\leq 0,150$ . Se o valor de OD média for  $>0,150$ , o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

O software de análise QFN SARS calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade.

Cada laboratório deve determinar os tipos de materiais de controlo e a frequência de testes apropriados de acordo com a legislação em vigor ou outras organizações de acreditação aplicáveis. Devem ser considerados procedimentos externos alternativos de avaliação da qualidade e validação.

Nota: Os plasmas enriquecidos com IFN- $\gamma$  recombinante demonstraram reduções de até 50% na concentração quando armazenados tanto a 2–8 °C como -20 °C. O IFN- $\gamma$  recombinante não é recomendado para a definição de soluções-padrão de controlo em amostras de plasma.

# Interpretação de resultados

Os resultados do QFN SARS são interpretados utilizando os seguintes critérios (Tabela 4).

Importante: O ensaio QFN SARS deve ser utilizado em conjunto com outros testes laboratoriais e avaliações epidemiológicas/clínicas para determinar a resposta imunitária de um indivíduo à vacinação contra a COVID-19.

**Tabela 4. Interpretação dos resultados do teste QFN SARS**

Nil (UI/ml)	Antígeno de Ag1 menos Nil (UI/ml)	Antígeno de Ag2 menos Nil (UI/ml)	Mitogen menos Nil (UI/ml)*	Resultado do QFN SARS	Relatório/Interpretação
≤8,0	≥0,15 e ≥25% de Nil	Qualquer	Qualquer	Reativo	<i>Detetada resposta ao SARS-CoV-2</i>
	Qualquer	≥0,15 e ≥25% de Nil			
	<0,15 ou ≥0,15 e <25% de Nil	<0,15 ou 0,15 e <25% de Nil	≥0,50	Não reativo	<i>NÃO detetada resposta ao SARS-CoV-2</i>
	<0,15 ou ≥0,15 e <25% de Nil	<0,15 ou ≥0,15 e <25% de Nil	<0,50	Indeterminado <sup>‡</sup>	<i>Não é possível detetar Mitogen e resposta ao SARS-CoV-2</i>
≥8,0 <sup>§</sup>	Qualquer				

\* Respostas ao controlo positivo de Mitogen (e, ocasionalmente, de antígeno de Ag) podem ficar fora do alcance do leitor de microplacas. Isto não tem qualquer impacto nos resultados do teste. Os valores >10 UI/ml são indicados pelo software QFN SARS como >10 UI/ml.

<sup>‡</sup> Consulte "Guia de resolução de problemas", página 53, para saber quais são as causas prováveis.

<sup>§</sup> Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos possuíam níveis de IFN-γ >8,0 UI/ml do valor de Nil.

## Limitações

Os resultados dos testes QFN SARS têm de ser utilizados em conjunto com o historial epidemiológico, o estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada um dos indivíduos.

Os indivíduos com valores de Nil superiores a 8 UI/ml são classificados como "Indeterminado", uma vez que uma resposta 25% mais elevada aos antígenos de Ag pode ficar fora do intervalo de medição do ensaio.

- Um resultado não reativo tem de ser considerado com os dados médicos relevantes e o historial clínico do indivíduo para a probabilidade de resposta imunitária à vacinação, particularmente para indivíduos com função imunitária comprometida.
- O ensaio QFN SARS deve ser utilizado em conjunto com outros testes laboratoriais e avaliações epidemiológicas/clínicas para determinar a resposta imunitária de um indivíduo à vacinação contra a COVID-19.

Podem ocorrer resultados duvidosos ou indeterminados devido a:

- Desvios do procedimento descrito nas Instruções de utilização
- Transporte/manuseamento incorreto de espécimes de sangue
- Níveis elevados de IFN- $\gamma$  em circulação ou presença de anticorpos heterófilos
- Ultrapassagem dos tempos de sangue validados desde a colheita de sangue até à incubação. Consulte as *Instruções de utilização dos QFN SARS Blood Collection Tubes* (1124422).

---

# Características de desempenho do ensaio

## Desempenho analítico

### Cut-off do ensaio

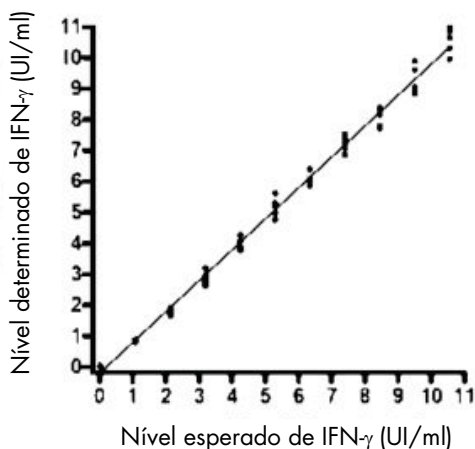
O cut-off do ensaio QFN SARS foi determinado utilizando dados de vinte (20) indivíduos que testaram não reativo para o SARS-CoV-2 com um teste RT-PCR autorizado ou um teste serológico autorizado pela FDA e vinte (20) dados com a vacinação completa (entre 2–16 semanas após o estado de vacinação completa) com uma vacina autorizada pela FDA dos EUA. Os dados de sensibilidade e especificidade em conjunto com os intervalos de confiança (IC) de 95% bilaterais exatos foram analisados e demonstraram que o cut-off ideal do ELISA era de 0,15 UI/ml (consulte a Tabela 5).

**Tabela 5. Valores de cut-off do QFN SARS (UI/ml) com sensibilidade e especificidade correspondentes com IC de 95% bilaterais exatos**

Valor de cut-off	Sensibilidade			Especificidade		
	Valor	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor	IC inferior a 95%	IC superior a 95%
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

## Linearidade

Demonstrou-se que o QFN SARS ELISA é linear colocando aleatoriamente 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$  na placa do ELISA. A linha de regressão linear apresenta uma inclinação de  $1,002 \pm 0,011$  e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 3).



**Figura 3. Ilustração da análise de regressão do estudo de linearidade.**

### Reprodutibilidade

Foi realizado um teste de reprodutibilidade multilaboratorial para avaliar o desempenho do ensaio QFN SARS entre laboratórios com múltiplos operadores. Este estudo foi realizado em três laboratórios da QIAGEN. Inscreveu-se um total de três (3) indivíduos de estudo reativos ao SARS-CoV-2 e três (3) não reativos ao SARS-CoV-2 (resultados determinados pelo teste RT-PCR ou pelo teste serológico autorizado pela FDA).

Quatro (4) tubos de colheita de sangue de heparina de lítio foram colhidos de cada indivíduo de estudo. Em seguida, os tubos de colheita de sangue de heparina de lítio foram transferidos para um dos laboratórios de teste onde o sangue foi aliquotado em três (3) conjuntos de QFN SARS Blood Collection Tubes (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen e Nil). Cada conjunto de QFN SARS Blood Collection Tubes foi transferido para cada um dos laboratórios de teste e, em seguida, testado de acordo com o procedimento de ensaio QFN SARS. Em cada laboratório, cada indivíduo foi testado com dez (10) réplicas (cinco [5] réplicas para Ag1 e cinco [5] réplicas para Ag2). Em cada laboratório, um (1) operador executou o teste QFN SARS independentemente. Nenhum operador tinha conhecimento dos resultados obtidos pelos



outros operadores, nem dos resultados do teste RT-PCR ou do teste serológico do indivíduo de estudo.

Foram gerados 30 resultados nos três locais de teste por cada um dos 6 indivíduos de estudo, o que resultou num total de 90 pontos de dados. É apresentado um resumo dos resultados do estudo de reprodutibilidade na Tabela 6.

**Tabela 6. Resumo dos resultados do estudo de reprodutibilidade – consoante a concordância na % dos resultados qualitativos entre operadores; N = 30 amostras de pacientes**

<b>Laboratório 1 – 1 operador</b>	<b>Laboratório 2 – 1 operador</b>	<b>Laboratório 3 – 1 operador</b>
25/30 = 83%	30/30 = 100%	30/30 = 100%
Concordância dos resultados qualitativos	Concordância dos resultados qualitativos	Concordância dos resultados qualitativos

A concordância na percentagem global entre todas as amostras reativas e não reativas aos resultados qualitativos esperados (indivíduo reativo com um resultado reativo e indivíduo não reativo com um resultado não reativo com base no resultado do método de referência do indivíduo) foi de 94,4% (85/90) em todos os três laboratórios.

### Repetibilidade interlote

Foi realizado um estudo para determinar a variabilidade interlote dos QFN SARS Blood Collection Tubes. Foi testado um total de dois (2) indivíduos de estudo reativos para o SARS-CoV-2 e três (3) não reativos para o SARS-CoV-2 (resultados determinados pelo teste RT-PCR ou teste serológico autorizado pela FDA). Foram incluídos neste estudo três (3) lotes separados de cada um dos QFN SARS Ag1 e Ag2 Blood Collection Tubes. Foram testadas cinco (5) réplicas por dador por lote de tubos de colheita de sangue. É apresentado um resumo dos resultados de precisão interlote na Tabela 7.

**Tabela 7. Resumo dos resultados do estudo de precisão interlote – Concordância na percentagem global para os QFN SARS Ag1 e Ag2 Blood Collection Tubes; N = 25**

QFN SARS BCT	Número de lote do BCT	Número de células qualitativas em concordância/Total de células	Proporção	Limite de confiança inferior	Limite de confiança superior
Ag1	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
Ag2	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%

A concordância na percentagem global entre todas as amostras reativas e não reativas aos resultados esperados (indivíduo reativo com um resultado reativo e indivíduo não reativo com um resultado não reativo com base no resultado do método de referência do indivíduo) foi de 100% em todos os três lotes de QFN SARS Ag1 e Ag2 BCT.

#### Limite de branco (Limit of Blank, LoB)

O limite de branco (Limit of Blank, LoB) foi avaliado para o ensaio QFN SARS. Duas réplicas, cada uma de 14 amostras de plasma humano individuais normais (os brancos), foram testadas com 2 lotes do QFN SARS ELISA por 3 operadores, em 3 dias de teste, um operador por dia de teste para um total de 84 réplicas de cada lote do kit ELISA.

Os valores de LoB (UI/ml) para os 2 lotes do kit ELISA foram calculados em separado, conforme apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8. Valores de LoB (UI/ml) para os 2 lotes do QFN SARS ELISA Kit**

QFN SARS ELISA Kit	LoB estimado (UI/ml)
Kit 1	0,030
Kit 2	0,040

O valor de LoB mais elevado, 0,040 UI/ml, em ambos os lotes do QFN SARS ELISA Kit, foi relatado como o valor de LoB final.

#### Limite de detecção (Limit of Detection, LoD)

O limite de detecção (Limit of Detection, LoD) foi avaliado para o ensaio QFN SARS. Um pool de plasma humano foi gerado ao combinar 14 amostras de plasma individuais. Cada um dos 3 operadores preparou um stock padrão de referência IFN- $\gamma$  a 1,0 UI/ml diluído em tampão. Foi efetuada uma série de diluição de 8 concentrações em plasma. O estudo foi realizado durante 3 dias, por 3 operadores que se alternavam, utilizando 2 lotes do QFN SARS ELISA Kit. Para cada dia de teste, foram testadas 5 réplicas de cada concentração dentro de cada conjunto da série de diluição em sequência, para um total de 45 réplicas para cada diluição da concentração de IFN- $\gamma$  para cada lote do QFN SARS ELISA Kit.

O valor de LoD para cada um dos lotes do QFN SARS ELISA Kit testados foi calculado em separado, conforme apresentado na Tabela 9. O LoD foi estimado utilizando um modelo de regressão Probit. O LoD foi baseado na concentração estimada (UI/ml) que proporcionou uma probabilidade estimada de 95% de obter uma taxa de incidência superior a 0,04 UI/ml (determinada pelo LoB).

**Tabela 9. Valores de LoD estimados (UI/ml) para os 2 lotes do QFN SARS ELISA Kit**

QFN SARS ELISA Kit	Probabilidade	Concentração estimada (UI/ml)	Limite de confiança inferior a 95% para estimativa	Limite de confiança superior a 95% para estimativa
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit2	0,95	0,065	0,060	0,073

---

O valor de LoD mais elevado, 0,065 UI/ml, calculado em ambos os lotes do QFN SARS ELISA Kit, foi relatado como o valor de LoD final

### Substâncias interferentes

Foi realizado um estudo para determinar os efeitos de potenciais substâncias interferentes no desempenho da detecção do IFN- $\gamma$  do QFN SARS ELISA. Os interferentes incluídos neste teste foram: triglicéridos (total), hemoglobina, proteína (soro total), bilirrubina (conjugada), bilirrubina (não conjugada), sulfato de abacavir, ciclosporina e prednisolona. Cinco pools de plasma com concentrações de IFN- $\gamma$  conhecidas foram preparados utilizando diferentes concentrações de interferentes. O nível de pool de IFN- $\gamma$  base foi preparado previamente com uma quantidade pré-determinada do IFN- $\gamma$  presente (aproximadamente 0,21, 0,45 e 1,4 UI/ml). Este pool foi então utilizado para preparar os pools de interferentes. As concentrações de interferentes testadas foram de 0 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL e 20 mg/dL. As concentrações de interferentes alvo foram baseadas em intervalos de referência, valores patológicos, intervalos terapêuticos e tóxicos, ou conforme recomendado pelo fornecedor ou níveis clínicos gerais. Foram testadas seis réplicas para cada nível de concentração da amostra interferente.

Para cada concentração da amostra, foi realizado um teste de duas amostras, comparando a diferença em log<sub>10</sub> médio (UI/ml) do nível do interferente primário com o controle (ou seja, nível livre de interferentes), conforme apresentado na Tabela 10 e Tabela 11. A diferença estimada na resposta média, juntamente com os respectivos limites de confiança de 95% bilaterais e o valor p também foram relatados.

**Tabela 10. Log10 UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente primário para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor p
Triglicéridos	Alto	1,4	0,019	-0,040	0,077	0,491
		0,45	0,004	-0,022	0,030	0,732
		0,21	0,006	-0,035	0,047	0,759
Hemoglobina	Alto	1,4	-0,005	-0,42	0,032	0,784
		0,45	-0,000	-0,023	0,023	0,981
		0,21	0,000	-0,034	0,035	0,980
Proteína	Alto	1,4	0,004	-0,034	0,042	0,836
		0,45	0,001	-0,38	0,040	0,962
		0,21	-0,008	-0,076	0,060	0,809
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	-0,011	-0,057	0,034	0,589
		0,45	-0,002	-0,058	0,053	0,923
		0,21	-0,014	0,074	0,046	0,625
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	-0,008	-0,041	0,026	0,614
		0,45	-0,000	-0,042	0,041	0,982
		0,21	-0,000	-0,048	0,048	0,989
Abacavir	Alto	1,4	0,008	-0,025	0,041	0,601
		0,45	0,012	-0,019	0,044	0,412
		0,21	-0,006	-0,052	0,040	0,770

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

**Tabela 10. Log<sub>10</sub> UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente primário para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor p
Ciclosporina	Alto	1,4	0,014	-0,020	0,047	0,383
		0,45	0,005	-0,035	0,045	0,773
		0,21	0,024	-0,008	0,056	0,131
Prednisolona	Alto	1,4	0,017	-0,017	0,050	0,293
		0,45	0,000	-0,036	0,036	0,979
		0,21	0,015	-0,035	0,065	0,524

**Tabela 11. Log10 UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente elevado para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor p
Triglicéridos	Alto	1,4	0,053	-0,004	0,110	0,063
		0,45	0,039	-0,021	0,058	<0,001
		0,21	0,034	-0,002	0,071	0,061
Hemoglobina	Alto	1,4	-0,001	-0,042	0,040	0,967
		0,45	0,016	-0,007	0,040	0,152
		0,21	0,014	-0,030	0,059	0,489
Proteína	Alto	1,4	-0,030	-0,071	0,011	0,136
		0,45	0,000	-0,046	0,046	0,992
		0,21	-0,045	-0,103	0,012	0,109
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	0,001	-0,046	0,048	0,961
		0,45	0,012	-0,043	0,067	0,639
		0,21	0,015	-0,044	0,074	0,586
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	0,015	-0,011	0,042	0,231
		0,45	0,015	-0,023	0,052	0,411
		0,21	0,012	-0,033	0,057	0,566
Abacavir	Alto	1,4	0,013	-0,015	0,040	0,322
		0,45	0,015	-0,014	0,044	0,283
		0,21	0,008	-0,034	0,050	0,677

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

**Tabela 11. Log<sub>10</sub> UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente elevado para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor p
Ciclosporina	Alto	1,4	0,002	-0,019	0,024	0,816
		0,45	0,007	-0,030	0,043	0,682
		0,21	0,015	-0,007	0,038	0,155
Prednisolona	Alto	1,4	0,007	-0,016	0,030	0,518
		0,45	-0,001	-0,034	0,033	0,964
		0,21	0,021	-0,025	0,068	0,334

Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre o nível do interferente primário e o controlo (nível livre de interferentes) e para o nível do interferente elevado, exceto para o nível de concentração de triglicéridos de 0,45 UI/ml. A diferença média foi determinada como estando dentro dos desvios-padrão de  $\pm 2$  da medição do nível médio de controlo, demonstrando que a diferença observada está dentro da variabilidade esperada do ensaio e que não se espera que os níveis clinicamente relevantes de triglicéridos interfiram com o QFN SARS ELISA.



---

## Desempenho clínico

O desempenho clínico do ensaio QFN SARS foi avaliado num estudo prospetivo e observacional realizado entre junho e outubro de 2021 com indivíduos sem historial de infeção por SARS-CoV-2 e que receberam vacinação contra a COVID-19 com vacinas que têm como alvo a proteína S do SARS-CoV-2, assim como com indivíduos sem um historial de infeção por SARS-CoV-2 e que não receberam vacinação contra a COVID-19.

Os indivíduos que aceitaram participar foram avaliados em função dos critérios de inclusão e exclusão do estudo, sendo que apenas os indivíduos que preenchiam todos os critérios de inclusão, mas nenhum dos de exclusão fizeram parte do estudo e foram submetidos a uma colheita de sangue para o QFN SARS.

Segue-se um resumo dos indivíduos que participaram no estudo

- Grupo 1: Foram incluídos indivíduos sem um historial de infeção natural por SARS-CoV-2, que não tinham recebido vacinação contra a COVID-19 no momento da colheita de sangue para o QFN SARS, que nunca tinham testado positivo para a infeção por SARS-CoV-2, que obtiveram um resultado de teste serológico não reativo e que não apresentavam sinais ou sintomas de COVID-19 no período de 4 semanas de participação.
- Grupo 2: Foram incluídos indivíduos sem historial de infeção por SARS-CoV-2, que tinham recebido vacinação contra a COVID-19 com vacinas que tinham como alvo a proteína S do SARS-CoV-2 no momento da colheita de sangue para o QFN SARS e que nunca tinham testado positivo para a infeção por SARS-CoV-2.
- Nenhum dos participantes tinha sido recetor de transplante (órgão sólido ou célula) e/ou submetido a um tratamento contra o cancro na altura da participação no estudo.

No total, foram incluídos 218 indivíduos no Grupo 1 e 171 indivíduos no Grupo 2. Após a colheita de sangue para o QFN SARS, quatro indivíduos do Grupo 1 foram considerados não elegíveis devido a um resultado de teste serológico reativo, obtido através de uma

amostra colhida na mesma visita onde se procedeu à colheita de sangue para o QFN SARS, tendo os mesmos sido posteriormente excluídos da análise.

Foram recolhidas amostras, os QFN SARS Blood Collection Tubes foram processados e o plasma foi armazenado a  $\leq -20$  °C até estar pronto para a realização de testes com o QFN SARS ELISA. Todas as execuções da placa do QFN SARS ELISA foram válidas e não foram obtidos resultados indeterminados. Daí resultaram 214 e 171 amostras avaliáveis nos Grupos 1 e 2, respetivamente.

### Dados demográficos

O número de amostras colhidas em cada país e a percentagem do total para cada grupo de estudo encontram-se apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12. Resumo da colheita de amostras por país**

País da colheita da amostra	Grupo 1		Grupo 2	
	N	%	N	%
Países Baixos	214	100,00%	153	89,47%
Estados Unidos	0	0,00%	18	10,53%

Um resumo da idade do indivíduo, incluindo a idade média, mediana, mínima e máxima, assim como o desvio-padrão (DP) da idade, é apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13. Resumo da idade do indivíduo (anos)**

N	Média	Mediana	DP	Mínima	Máxima
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Um resumo do sexo do indivíduo é apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14. Resumo do sexo do indivíduo**

<b>Sexo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Indivíduos do sexo feminino</b>	234	60,78%
<b>Indivíduos do sexo masculino</b>	151	39,22%

## Especificidade

A concordância clínica com comparação entre os resultados do QFN SARS e os resultados do método de referência é apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15. Concordância clínica: resultado do QFN SARS vs. método de referência**

		<b>Resultado do método de referência</b>		
		<b>Grupo 1</b> (-vax, -infecção)	<b>Grupo 2</b> (+vax, -infecção)	<b>Total</b>
<b>Resultado do QFN SARS</b>	<b>Não reativo</b>	199	34	233
	<b>Reativo</b>	15	137	152
<b>Total</b>		214	171	385

Para indivíduos não vacinados (Grupo 1), 199 dos 214 testaram não reativo com o QFN SARS, tendo os restantes 15 testado reativo. Para indivíduos vacinados (Grupo 2), 137 dos 171 testaram reativo com o QFN SARS, tendo os restantes 34 testado não reativo. Nenhuma das 15 e 34 amostras discordantes dos Grupos 1 e 2, respetivamente, foi submetida a testes adicionais com um método discordante.

A concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) (especificidade) foi calculada para indivíduos não vacinados (Grupo 1), em conjunto com o intervalo de confiança (IC) de 95% bilateral exato, e é apresentada na Tabela 16.

**Tabela 16. Concordância na percentagem de negativos (Especificidade)**

N.º do grupo	NPA (especificidade)	IC de 95%
Grupo 1	92,99%	88,70–96,02%
(-vax, -infecção)	(199/214)	

## Sensibilidade

A concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) (sensibilidade) foi calculada para indivíduos vacinados (Grupo 2), em conjunto com o IC de 95% bilateral exato, e é apresentada na Tabela 17.

**Tabela 17. Concordância na percentagem de positivos (Sensibilidade)**

N.º do grupo	PPA (sensibilidade)	IC de 95%
Grupo 2	80,12%	73,34–85,82%
(+vax, -infecção)	(137/171)	

## Concordância na percentagem de positivos por idade

Para indivíduos vacinados (Grupo 2), a concordância na percentagem de positivos foi estratificada de acordo com a idade <60 e ≥60 anos e é apresentada na Tabela 18.

**Tabela 18. Concordância na percentagem de positivos entre <60 e ≥60 anos.**

Intervalo de idades (anos)	PPA (Sensibilidade)	IC de 95%
<60	85,33% (128/150)	78,78–90,64%
60+	42,86% (9/21)	21,82–65,98%

## Concordância na percentagem de positivos pela vacina contra a COVID-19

Para os indivíduos vacinados (Grupo 2), a concordância na percentagem de positivos foi estratificada pela vacina contra a COVID-19 recebida e é apresentada na Tabela 19.

**Tabela 19. Concordância na percentagem de positivos pela vacina contra a COVID-19**

Vacina	PPA (Sensibilidade)	IC de 95%
Astra Zeneca	62,50% (5/8)	24,49–91,48%
Janssen (Johnson & Johnson)	86,67% (13/15)	59,54–98,34%
Moderna	77,27% (17/22)	54,63–92,18%
Pfizer – BioNTech	80,95% (102/126)	73,00–87,40%

## Fatores associados aos resultados não reativos em indivíduos vacinados

Para determinar se uma idade superior, o tempo decorrido após a conclusão da vacinação contra a COVID-19, a vacina recebida e o sexo estão associados aos resultados não reativos em indivíduos vacinados (Grupo 2), foi realizada uma análise de regressão logística univariada. A associação entre cada fator e os resultados não reativos foi calculada em termos de rácio de probabilidades (Odds Ratio, OR) e os resultados são apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20. Associação entre fatores e resultados não reativos em indivíduos vacinados**

Fator		OR (IC de 95%)	Valor p
Idade (anos)		1,08 (1,05–1,12)	<0,001
Tempo decorrido desde a vacinação até à colheita de sangue para o QFN SARS (dias)		1,02 (1,01–1,03)	<0,001
Vacina	Pfizer – BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)	0,689
Sexo	Indivíduos do sexo feminino	1	–
	Indivíduos do sexo masculino	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Os únicos fatores que se associaram de forma significativa aos resultados não reativos em indivíduos vacinados revelaram ser a idade e o tempo decorrido após a vacinação.

Tendo o estudo sido realizado em países onde as vacinas contra a COVID-19 foram disponibilizadas primeiro a indivíduos mais velhos, é possível que a idade tenha tido influência na associação entre o tempo decorrido desde a vacinação e os resultados não reativos. A Tabela 21 apresenta a análise de regressão com o fator da idade como covariante.

**Tabela 21. Associação entre fatores e resultados não reativos controlados pela idade**

<b>Fator</b>	<b>OR (IC de 95%)</b>	<b>Valor p</b>
Idade (anos)	1,07 (1,03–1,11)	<0,001
Tempo decorrido desde a vacinação até à colheita de sangue para o QFN SARS (dias)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Quando a idade é controlada, a associação entre o tempo decorrido desde a vacinação e os resultados não reativos já não se revela significativa. No entanto, o fator da idade permaneceu significativamente associado.

---

## Referências

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0). Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-cov-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*. 2021
5. Alessandra D’Abramo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. *Int J Infect Dis*. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19 Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020



8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *SciImmunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in human. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: [https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor\\_Anti\\_SARS\\_CoV\\_2\\_Humoral\\_and\\_T\\_cell\\_Responses.95281.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx)
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M, Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunat Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S

- 
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerria, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T-cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

- 
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
  22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
  23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
  24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
  25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
  26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
  27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
  28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
  29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020

- 
30. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of quantiFERON-TB gold in-tube and quantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

# Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de apoio técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas dos Serviços de Assistência da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa surgir sobre informações e/ou protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Comentários e sugestões

---

### Resolução de problemas ELISA

#### Desenvolvimento cromático não específico

- |   |   |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa                        | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Contaminação cruzada dos poços ELISA               | Tome cuidado ao pipetar e misturar as amostras para minimizar os riscos.  |
| c) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de três meses a contar a partir da data de reconstituição.                                       |
| d) A solução de substrato de enzimas está contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.  |

## Comentários e sugestões

---

- e) Mistura do plasma nos QFN SARS Blood Collection Tubes antes da colheita      Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma, seja de que modo for, antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

### Leituras de densidade ótica baixas para as soluções-padrão

- a) Erro de diluição da solução-padrão      Certifique-se de que as diluições da solução-padrão do kit são preparadas corretamente conforme as presentes Instruções de utilização.
- b) Erro de pipetagem      Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.
- c) Temperatura de incubação demasiado baixa      A incubação do ELISA deve ser efetuada à temperatura ambiente ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).
- d) Tempo de incubação demasiado curto      A incubação da placa com o conjugado, com as soluções-padrão e com as amostras deve durar  $120 \pm 5$  minutos. A solução de substrato de enzimas deve ser incubada na placa durante 30 minutos.
- e) Filtro incorreto de leitor de placas utilizado      A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.
- f) Os reagentes estão demasiados frios      Todos os reagentes, à exceção do conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, 1 hora.
- g) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou      Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição.

## Comentários e sugestões

---

### Fundo elevado

- |   |  |
|---|--|
| a) Lavagem incompleta da placa                        | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.                          |
| b) Temperatura de incubação demasiado elevada         | A incubação do ELISA deve ser efetuada à temperatura ambiente ( $22 \pm 5$ °C).  |
| c) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado até à data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de três meses a contar a partir da data de reconstituição. |
| d) A solução de substrato de enzimas está contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.   |













### **Curva-padrão não linear e variabilidade de duplicados**





- a) Lavagem incompleta da placa      Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.
- b) Erro de diluição da solução-padrão      Certifique-se de que as diluições da solução-padrão são preparadas corretamente conforme as presentes Instruções de utilização.
- c) Mistura mal efetuada      Misture bem os reagentes, invertendo ou misturando suavemente em vórtex, antes de os adicionar à placa.
- d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio      A adição de amostras e de soluções-padrão deve ser efetuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o ensaio.



# Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer nas instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Prazo de validade
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (por ex., rotulagem de componentes)
	Componentes
	Contém
	Número
	Número global de item comercial
	Representante autorizado
<b>Rn</b>	R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão
	Limitação de temperatura

Símbolo	Definição do símbolo
	Fabricante
	Consultar as instruções de utilização
	Manter afastado da luz solar
	Aviso/cuidado

## Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de apoio técnico em **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos dos Serviços de Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte a contracapa do manual ou visite-nos em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

---

# Apêndice A: Informações técnicas

## Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados são pouco comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado, mas também com um número de fatores técnicos (por ex., armazenamento/manuseamento incorreto dos tubos de colheita de sangue, lavagem incompleta da placa do ELISA), caso as instruções de utilização anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na colheita de sangue ou no manuseamento das amostras de sangue, repita todo o teste QFN SARS com novos espécimes de sangue. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados no caso de suspeitar de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio processual ao teste ELISA. Os médicos podem optar por colher um novo espécime ou efetuar outros procedimentos conforme acharem adequado.

## Amostras de plasma coaguladas

Se ocorrerem coágulos de fibrina nas amostras de plasma de armazenamento de longo prazo, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

## Amostras de plasma lipêmicas

Deve ter-se cuidado ao pipetar amostras lipêmicas, uma vez que os depósitos de gordura podem bloquear as pontas de pipeta.

## Apêndice B: Procedimento abreviado do teste ELISA

1. Eleve a temperatura dos componentes do ELISA até à temperatura ambiente, à exceção do conjugado concentrado 100x, durante pelo menos 60 minutos.



2. Reconstitua a solução-padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução-padrão.



3. Reconstitua o conjugado concentrado 100x liofilizado com água destilada ou desionizada.

4. Prepare conjugado funcional em diluente verde e adicione 50 µl a todos os poços.



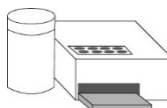
5. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste e 50 µl de soluções-padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.



6. Incube durante 120 minutos à temperatura ambiente.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem.



8. Adicione 100  $\mu$ l de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.



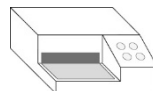
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50  $\mu$ l de solução de paragem de enzimas a todos os poços. Misture utilizando um agitador.



11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm



12. Analise os resultados.



## Informações de encomenda

<b>Produto</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>N.º de cat.</b>
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Kit ELISA de 2 placas	626420
<b>Produtos relacionados</b>		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 tubos (50 de Nil, 50 de Ag1, 50 de Ag2 e 50 de Mitogen)	626725

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consulte o respetivo manual do utilizador ou manual do kit QIAGEN. Os manuais do utilizador e os manuais dos kits QIAGEN estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

## Histórico de revisões do documento

<b>Data</b>	<b>Descrição</b>
R1, novembro de 2021	Versão inicial

---

Esta página foi deixada intencionalmente em branco.



#### **Contrato de Licença Limitada do QuantIFERON® SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit**

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, reconicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantIFERON® (QIAGEN Group) Proclin®. Os nomes registados, as marcas comerciais etc. utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

© 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

