COVID-19 ELISA IgG

Producto para diagnóstico *in vitro*

G1032: Prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 en suero/plasma humano. 96 test.

INTRODUCCIÓN:

El SARS-CoV-2 (Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo) es un patógeno nuevo que surgió en la provincia china de Hubei en diciembre de 2019 y se propagó por todo el mundo en los meses siguientes declarándose pandémico en marzo de 2020. Los coronavirus son virus de ARN envueltos, de polaridad positiva y de cadena sencilla. El SARS-CoV-2 muestra una gran homología genética con el SARS-CoV y otros coronavirus de murciélago similares al SARS. La enfermedad se ha denominado COVID-19 y puede manifestarse como una infección asintomática, una infección leve del tracto respiratorio superior o una neumonía vírica severa con insuficiencia respiratoria e incluso la muerte. Los brotes de COVID-19 causan una importante mortalidad y morbilidad. Los signos y síntomas al inicio de la enfermedad incluyen fiebre, tos, fatiga, anorexia, dificultad para respirar, producción de esputo o mialgias. La edad y varias co-morbilidades (diabetes, enfermedades crónicas cardiovasculares o respiratorias) son fuertes factores de riesgo de enfermedad grave, complicaciones y muerte. La transmisión se produce principalmente de persona a persona a través de las gotas respiratorias entre contactos cercanos. Las transmisiones por aerosoles y por fómites son plausibles.

La detección del ácido nucleico del virus en muestras de las vías respiratorias superiores e inferiores es el diagnóstico de laboratorio más fiable. La liberación de ARN viral es mayor en el momento de la aparición de los síntomas y disminuye a lo largo del curso de la infección. La detección de ARN durante la convalecencia no indica necesariamente la presencia de virus infeccioso viable. El tipo y la toma de muestra, así como el método de extracción, pueden influir en la recuperación del ARN viral y dar lugar a resultados negativos falsos. Se han descrito respuestas serológicas tempranas con un tiempo medio de 11 días después de la aparición de los síntomas. Se han señalado varias aplicaciones relevantes para las pruebas serológicas: como ayuda en el diagnóstico de pacientes con varios días de evolución o en casos sospechosos con resultados repetidamente negativos de ARN; en estudios serológicos epidemiológicos para determinar la tasa precisa de infección; en la identificación de individuos que podrían servir como donantes de plasma para estrategias de inmunoterapia; para determinar el estado inmunológico de los individuos, especialmente en el personal sanitario para limitar su riesgo de exposición o propagación inadvertida del virus. Se ha sugerido que la proteína de la espícula y la nucleoproteína son los principales blancos de la respuesta de los anticuerpos.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados, la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado vienen listos para su uso.

Las soluciones de dilución de muestras y de conjugado están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.

Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

CONTENIDO DEL KIT:

1 VIRCELL COVID-19 PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con antígeno de SARS-CoV-2. Contiene antígeno inactivado. Contienen material de origen animal.

2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Contienen material de origen animal. Listo para su uso.

3 VIRCELL IgG POSITIVE CONTROL: 1,5 ml de suero control positivo con Neolone y Bronidox. Contienen material de origen humano. Contienen material de origen animal.

4 VIRCELL IgG CUT OFF CONTROL: 1,5 ml de suero cut off con Neolone y Bronidox. Contienen material de origen humano. Contienen material de origen animal.

5 VIRCELL IgG NEGATIVE CONTROL: 1,5 ml de suero control negativo con Neolone y Bronidox. Contienen material de origen humano. Contienen material de origen animal.

6 VIRCELL IgG CONJUGATE: 15 ml de una dilución de globulina anti-IgG humana conjugada con peroxidasa, con Neolone y Bronidox y coloreada de naranja. Contienen material de origen animal. Lista para su uso.

7 VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

8 VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.

9 VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween^{R}-20 y con Proclin 300.

Conservar entre 2 y 8ºC y comprobar la fecha de caducidad.

Material necesario no contenido en el kit:

-Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 µl.
-Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 µl.
-Lavador de placas de ELISA.
-Incubador/baño termostatizado.
-Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.
-Agua destilada.
-Alternativamente procesador automático de ELISA.

CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2 y 8ºC. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8ºC.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8ºC
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8ºC

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.

2. El producto está indicado únicamente para personal con formación para la técnica.
3. El producto es de un solo uso
4. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables.
5. Use únicamente los protocolos descritos en este prospecto. Si las condiciones no son las especificadas, los resultados pueden ser erróneos.
6. Use equipamiento de protección individual cuando se manipulen las muestras. Lávese las manos adecuadamente tras la manipulación de las muestras. Todos los procedimientos deben llevarse a cabo de acuerdo con las normas de seguridad aprobadas.
7. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.
8. No pipetear con la boca.
9. No utilizar en caso de deterioro del envase.
10. No use el kit tras su fecha de caducidad.
11. Si el test o elementos del mismo se almacenan en el refrigerador, han de estar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.
12. No dejar los reactivos a temperatura diferente a la recomendada más tiempo del absolutamente necesario.
13. Mantenga los recipientes para muestras y reactivos cerrados mientras no se estén utilizando.
14. Evite el uso de muestras sometidas a ciclos repetidos de congelación-descongelación.
15. Usar en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.
16. Los reactivos en este kit podrían incluir sustancias de origen animal y / o humano y/o antígenos inactivados (consulte el Contenido del kit). Aunque el material de origen humano se ha probado y se ha encontrado negativo para el Antígeno de Superficie de Hepatitis B (HBsAg), los anticuerpos de Hepatitis C y los anticuerpos del Virus de Inmunodeficiencia Humana, todos los materiales y muestras de pacientes deben manipularse y eliminarse como potencialmente infecciosos utilizando procedimientos de laboratorio de seguridad. Ningún método actual puede ofrecer una garantía completa de que estos u otros agentes infecciosos están ausentes. Deseche los reactivos no utilizados y los desechos de acuerdo con todas las regulaciones aplicables.
17. Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado, sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA VIRCELL.
18. Utilizar solo la cantidad necesaria para la realización de la prueba. No devolver al vial el exceso sobrante.
19. Durante los períodos de incubación, un adecuado sellado de las placas con la lámina adhesiva que se suministra evita la desecación de la muestra y garantiza la repetitividad de los resultados.
20. El kit contiene Proclin 300 (consulte el contenido del kit). Puede causar una reacción alérgica en la piel. En caso de contacto con la piel, lave con abundante agua y jabón. Para obtener más información, hay disponible una Hoja de datos de seguridad del material.
21. El kit contiene ácido sulfúrico (0,5 M) (consulte el contenido del kit). Evite el contacto con la piel o los ojos. En caso de contacto, enjuague inmediatamente la zona con agua. Para obtener más información, hay disponible una Hoja de datos de seguridad del material.
22. Para la utilización del producto en sistemas automáticos de análisis se recomienda una evaluación previa.
23. Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8ºC si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20ºC, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente. Las muestras se deben inactivar a 56ºC durante 30 minutos antes de testarse.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es la solución de lavado. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37ºC antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8ºC.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1. Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1ºC.
2. Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.
3. Agitar todos los componentes.
4. Sacar el número de pocillos 1 necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.
5. Realizar en tubos aparte una dilución 1/20 de los sueros, para ello poner 5 µl de suero en 95 µl de diluyente de muestras 2, rotularla como dilución 1/20.
6. Añadir 80 µl de diluyente de muestras 2 a todos los pocillos que se vayan a emplear, excepto a los de los controles. Añadir 20 µl de las diluciones 1/20 de las muestras, 100 µl del control positivo 3, 100 µl del suero cut off 4 (en duplicado) y 100 µl del control negativo 5 en los pocillos correspondientes.
7. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 45 minutos a 37±1ºC.
8. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado 9, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
9. Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado IgG 6 a todos los pocillos.
10. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 30 min. a 37±1ºC.
11. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado 9, asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.
12. Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato 7 a todos los pocillos.
13. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.
14. Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada 8 a todos los pocillos.
15. Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.
La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo.
Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:
Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

Índice de anticuerpos= (D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x10

Índice	Interpretación
<4	Negativo
4-6	Dudoso
>6	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.
Las muestras con índices inferiores a 4 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 de tipo IgG.
Las muestras con índices superiores a 6 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2 de tipo IgG. En caso de un resultado positivo cercano al umbral, se debe requerir una nueva muestra para la confirmación de la seroconversión.

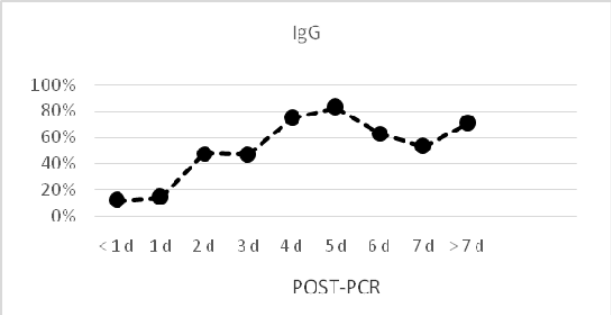
LIMITACIONES DEL MÉTODO:
1. Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
2. Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de diagnóstico directo.
3. El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
4. Las muestras recogidas al inicio de la infección pueden no tener niveles detectables de anticuerpos. En esos casos se recomienda obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días para ser ensayada en paralelo con la muestra original, con el fin de determinar una seroconversión.
5. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.
6. En pacientes inmunodeprimidos un resultado negativo no excluye la presencia de infección.
7. La ausencia de un nivel detectable de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
8. La fiabilidad de los resultados dependerá de una adecuada recogida de las muestras, transporte, almacenamiento y procedimientos de procesamiento.
9. El desempeño de esta prueba no ha sido evaluado para su uso en pacientes sin signos clínicos o sin síntomas de infección.
10. Los valores predictivos positivo y negativo dependen mucho de la prevalencia. Los falsos negativos son más probables durante un pico de actividad, cuando la prevalencia de la enfermedad es alta. Los falsos positivos son más probables durante los periodos de baja prevalencia.
11. Los resultados de prestaciones incluidos corresponden a estudios en una muestra poblacional definida. Pueden encontrarse pequeñas variaciones en poblaciones diferentes.

PRESTACIONES:
PORCENTAJES POSITIVOS Y NEGATIVOS.
Se ensayaron 1479 muestras positivas y negativas, de las cuales 1193 muestras se tomaron de pacientes hospitalizados en distintos días post PCR+, y se seleccionaron 286 muestras negativas prepandémicas de donantes sanos. Se calcularon los porcentajes de positivos y negativos de IgG:

Nº de muestras de pacientes post PCR+	1193
(%) IgG Positivas	58
Nº de muestras prepandémicas de donantes	286
(%) IgG Negativas	98

Además, se evaluó la evolución del porcentaje de positividad de IgG en un subconjunto de 498 muestras de pacientes hospitalizados según el tiempo transcurrido desde el primer resultado positivo de la PCR:

Tiempo (días)	Muestras (total)	IgG Positivas	% IgG Positivas
< 1 d	84	10	12
1 d	142	20	14
2 d	67	32	48
3 d	45	21	47
4 d	39	29	74
5 d	23	19	83
6 d	27	17	63
7 d	17	9	53
> 7 d	54	38	70



- **PRECISIÓN INTRAENSAYO:**

Se ensayaron 3 muestras pipeteadas individualmente 10 veces cada una en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

MUESTRA	N	% C.V.
CP	10	3,92
CO	10	4,95
CN	10	Sin cambio en la interpretación

C.V. Coeficiente de variación

- **PRECISIÓN INTERENSAYO:**

Se ensayaron 3 muestras pipeteadas individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

MUESTRA	N	% C.V.
CP	10	4,91
CO	10	8,50
CN	10	Sin cambio en la interpretación

C.V. Coeficiente de variación

- **INTERFERENCIAS:**

Interferencias-Anticuerpos antinucleares/Factor reumatoide:
Se ensayaron 10 muestras positivas frente a anticuerpos antinucleares y factor reumatoide. Se hallaron interferencias frente a anticuerpos antinucleares (1 de 5 muestras testadas).No se hallaron interferencias frente a factor reumatoide (5 muestras testadas).
Interferencias–Sustancias endógenas:
Se ensayaron 3 muestras con cada interferente. Las especificaciones se cumplieron en todos los casos. No se observaron interferencias con muestras hemolíticas (8,5 g/L de hemoglobina), ictéricas (6 g/L de bilirrubina) hiperlipémicas (5,8 g/L de colesterol y 11 g/L de

tributirina) o hiperproteicas (60 g/L de γ-globulina y 60 g/L de albumina).

Interferencias–Sustancias anticoagulantes:

Se ensayaron 3 muestras con cada anticoagulante. Las especificaciones se cumplieron en todos los casos. No se observaron interferencias con heparina (30 UI/mL), citrato (0,13 mol/L) y EDTA (2 mg/mL).

- **REACCIONES CRUZADAS:**

Se ensayaron 83 muestras caracterizadas positivas frente a otros microorganismos (parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, influenza A, influenza B, adenovirus, *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila* y virus sincitial respiratorio).

No se hallaron reacciones cruzadas frente a parainfluenza 1 (5 muestras testadas), parainfluenza 2 (1 muestra testada), parainfluenza 3 (5 muestras testadas), influenza A (10 muestras testadas), influenza B (10 muestras testadas), adenovirus (10 muestras testadas) *Mycoplasma pneumoniae* (10 muestras testadas), *Chlamydophila pneumoniae* (10 muestras testadas), *Coxiella burnetii* (10 muestras testadas), *Legionella pneumophila* (3 muestras testadas) y virus sincitial respiratorio (9 muestras testadas).

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

IVD	Producto para el diagnóstico *in vitro*
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-yºC
	Contiene suficiente para <n> pruebas
LOT	Lote
REF	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
WELLS X	<X> pocillos

BIBLIOGRAFÍA:

1. Guo, L. et al. (2020) Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). Clin Infect Dis. Mar 21. pii: ciaa310. doi: 10.1093/cid/ciaa310.

2. Li, Z. et al. (2020). Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. J Med Virol. Feb 27. doi: 10.1002/jmv.25727.

3. Liu, W. et al. (2020). Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. J Clin Microbiol. Mar 30. pii: JCM.00461-20. doi: 10.1128/JCM.00461-20.

4. To, KK. et al. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis. Mar 23. pii: S1473-3099(20)30196-1. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

5. Wölfel, R. et al. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature. Apr 1. doi:10.1038/s41586-020-2196-x.

6. Zhao, J. et al. (2019) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease. Clin Infect Dis. Mar 28. pii: ciaa344. doi: 10.1093/cid/ciaa344.

7. Zhang, W. et al. (2020). Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect. Feb 17;9(1):386-389.

8. Zhu, N. et al. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. Feb 20;382(8):727-733.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:
customerservice@vircell.com

REVISADO: 2020-04-07
L-G1032-ES-01