



UDITEST-V2G®

1. INFORMACIÓN GENERAL

Autorización de fabricación y comercialización por COFEPRIS

Oficio: CAS/SESSDM/1002/2021

Solo para uso en diagnóstico *in vitro*

Las instrucciones deben ser seguidas cuidadosamente como se indica en el manual de usuario. Los resultados no pueden ser confiables si hay variaciones en el método indicado en el manual de usuario.

Nombre:

UDITEST-V2G®

2. USO

El estuche UDITEST-V2G® está diseñado para detectar anticuerpos específicos contra el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) de la clase IgG en muestras de suero o plasma de pacientes.

UDITEST-V2G® es una prueba cualitativa que permite detectar anticuerpos IgG en pacientes con sospecha de respuesta inmune adaptativa causada por COVID-19. Esta basada en un ELISA indirecto que puede ser realizado de forma manual o con equipos automatizados de lavado. Los resultados pueden ser obtenidos con equipos convencionales de absorbancia, 450nm y 570nm.

El ensayo UDITEST-V2G® no debe utilizarse para diagnosticar infección aguda.

3. RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró estado de pandemia el pasado 11 de Marzo del 2020 (1). A la fecha (Febrero 2021) la Organización Mundial de la Salud reporta más de 100,000, 000 de casos confirmados a nivel global y decesos de 2,244,713 (2).

La COVID-19 es causada por el virus SARS-CoV-2 que pertenece a la familia Coronaviridae, es un virus de RNA de cadena positiva (3). El modo de transmisión de la COVID-19 es por el contacto directo con personas COVID-19 positivas o con contacto de objetos (fómites) contaminados con el virus (4), una vez que el virus ingresa en el organismo se reproduce en las vías respiratorias altas y bajas causando síntomas de infección respiratoria caracterizados por fiebre, tos seca, dificultad para respirar, entre otros (5). El periodo de incubación del virus es de 3 a 5 días, posteriormente a la incubación comienza la aparición de los síntomas, para los casos sintomáticos, algunas personas pueden no generar sintomatología alguna sin embargo son capaces de transmitir la infección. El diagnóstico de COVID-19 se realiza identificando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) uno o varios fragmentos del RNA viral en muestras de hisopados orofaríngeos o nasofaríngeos, este diagnóstico se

debe realizar dentro de los primeros días después de aparecidos los síntomas (6).

La generación de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 comienza posterior a los 5 días de la infección para la clase IgM, los anticuerpos de clase IgG comienzan a producirse de 7 a 14 días después de la infección. Los anticuerpos IgG son anticuerpos de larga duración, presentan capacidad de reconocer y neutralizar las partículas virales para combatir la infección (7).

La determinación de anticuerpos específicos contra SARS-CoV-2 permite evaluar si un paciente tuvo COVID-19 y presenta anticuerpos de forma natural o bien si fue vacunado y presenta anticuerpos protectores.

4. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo es una ELISA que está diseñada para la detección cualitativa de anticuerpos humanos séricos de la clase IgG anti-SARS-CoV-2. Los sueros problema se diluyen 1:100 y se colocan en una placa de inmunoensayo de 96 pozos sensibilizada previamente con el RBD de la proteína S del virus SARS-CoV-2 (antígeno), las proteínas que no se unen se eliminan mediante los lavados subsecuentes. La formación del complejo antígeno-anticuerpo anti-RBD se pone de manifiesto por la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), el exceso de anticuerpo secundario se elimina mediante lavados. La adición del sustrato cromogénico 3,3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB) con peróxido de hidrógeno evidencia la formación del complejo RBD-anticuerpo IgG anti-SARS-CoV-2-anticuerpo anti-IgG humana, mediante el desarrollo de color que puede ser cuantificado empleando un lector de microplacas a 450 nm.

La cantidad de anticuerpos anti-RBD presentes en la muestra será proporcional a la densidad óptica (D.O.) generada por la reacción enzimática del anticuerpo secundario unido al complejo antígeno-anticuerpo.

5. MANEJO DEL PRODUCTO

Contenido del Kit:

Presentación del kit	1 placa	5 placas	10 placas	20 placas
Muestras clínicas corridas por duplicado/total de reacciones	44%	220%	440%	880%
Placa de inmunoensayo sensibilizada	1 pieza	5 piezas	10 piezas	20 piezas
Agente de dilución	1.8 gramos	9.0 gramos	18 gramos	36 gramos
Solución de lavado 10X	50 mL	250 mL	500 mL	1000 mL
Control positivo	12 µL	60 µL	120 µL	240 µL
Control negativo	12 µL	60 µL	120 µL	240 µL
Anticuerpo secundario	12 µL	60 µL	120 µL	240 µL
Sustrato A para revelado	5 mL	25 mL	50 mL	100 mL
Sustrato B para revelado	5 mL	25 mL	50 mL	100 mL
Solución de paro	5 mL	25 mL	50 mL	100 mL
Sellador adhesivo para placas de 96 pozos	1	5	10	20

Almacenamiento de reactivos:

Temperatura de almacenamiento: 2 a 8°C. NO CONGELAR.
Importante: El agente de dilución y la solución de lavado 10x se almacenan a temperatura ambiente (18 a 25°C) una vez recibido el kit.

Proteger de la luz.

Fecha de caducidad:

UDITEST-V2G® cerrado tiene una fecha de caducidad de 3 meses a partir de su producción.

Una vez abierto, utilizar inmediatamente.

Cuidados y precauciones

Evite el contacto de los reactivos con la piel, use guantes, bata de laboratorio y lentes de seguridad al manejar los reactivos del kit. En caso de contacto accidental lave con abundante agua por al menos 15 minutos.

Debido al riesgo potencial de que las muestras de suero contengan virus activos de SARS-CoV-2, se recomienda dar un tratamiento con calor cómo se describe en la sección de preparación de la muestra.

6. PROCEDIMIENTO

Materiales provistos:

UDITEST-V2G® (1, 5, 10 o 20 placas)

Materiales requeridos, pero no provistos:

- Micropipetas 10, 200 y 1000 µL
- Puntas para micropipeta para 10, 200 y 1000 µL
- Pipeta serológica para 5, 10 y 25 mL
- Probeta de 100 mL
- Tubos para microcentrífuga 1500 µL
- Tubos cónicos 15 o 50 mL
- Canaletas
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplacas para lectura a 450 nm
- Filtro para corrección

OPCIONAL:

- Equipo automatizado para lavado de ELISA

Procedimiento del ensayo:

Antes de comenzar, reconstituir los reactivos de acuerdo a las instrucciones del manual de usuario:

Preparación de la muestra:

- Se recomienda calentar las muestras a 56 °C durante 1 h en baño de agua. Este tratamiento no es necesario si las muestras se manejan en una cabina de bioseguridad. No se han observado diferencias en el desempeño del ensayo entre muestras tratadas o no tratadas con calor.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 3 min.
- Diluir las muestras 1:100, tomar 10 µL de suero y agregar 990 µL de **AGENTE DE DILUCIÓN** reconstituido. Mezclar adecuadamente antes de colocarlas en la placa.

Ejecución del ensayo:

- Extraer la placa de 96 pozos de su empaque y remover por inversión el líquido excedente sobre un material absorbente.

- Colocar 100 µL por pozo de las muestras diluidas 1:100 y los **CONTROLES**, se recomienda analizar las muestras por duplicado.
- Incubar por 1.5 h a temperatura ambiente
- Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.
- Adicionar 50 µL por pozo del **ANTICUERPO SECUNDARIO** diluido previamente.
- Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
- Remover el **ANTICUERPO SECUNDARIO**.
- Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.
- Adicionar 100 µL por pozo de **SUSTRATO PARA REVELADO**, equilibrado a temperatura ambiente y preparado 15 min previos a su uso.
- Incubar a temperatura ambiente durante 20 min protegido de la luz.
- Adicionar 50 µL/pozo de **SOLUCIÓN DE PARO**.
- Determinar la D.O. con un lector de placas empleando un filtro de 450 nm con una corrección a 570 nm.

Nota: si su espectrofotómetro no cuenta con el filtro para realizar la lectura a 570 nm, puede emplear otro filtro para la corrección (>570 nm).

7. RESULTADOS

UDITEST-V2G® requiere de medir la D.O. con un lector de placas convencional a un filtro de 450 nm. Los resultados deben interpretarse de acuerdo a los siguientes parámetros:

Interpretación de los resultados.

Interpretación	Intervalo	Resultados
Negativo	Valor obtenido ≤ 0.5	La muestra no contiene anticuerpos IgG relacionados a SARS-CoV-2.
Positivo	Valor obtenido ≥ 0.6	La muestra contiene anticuerpos IgG relacionados a SARS-CoV-2
Límite	$0.5 \leq$ Valor obtenido < 0.6	Repetir la prueba e interpretar el resultado relacionado con otras pruebas clínicas.

8. LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Para uso de emergencia autorizado por COFEPRIS
- UDITEST-V2G® es para uso de diagnóstico *in vitro*
- Esta prueba es sólo para detección cualitativa. Los resultados de las pruebas no deben ser la única base para el diagnóstico clínico y el tratamiento. La confirmación de infección con SARS-CoV-2 debe combinarse con los datos clínicos del paciente y otras pruebas diagnósticas.
- En la primera semana del inicio de la infección con SARS-CoV-2, los resultados de los pacientes pueden ser negativos para IgG, debido a que aún es una etapa temprana para la detección de estos anticuerpos. Además, los pacientes con baja inmunidad u otras enfermedades que afectan la función inmune, la falla

de órganos sistémicos importantes y el uso de medicamentos que inhiben la función inmune también pueden conducir a resultados negativos de la respuesta de IgG hacia el coronavirus. La infección previa de SARS-CoV u otra cepa de coronavirus puede causar respuesta de IgG positiva debido a posibles homologías filogenéticas entre cepas virales.

- La contaminación bacteriana o fúngica de muestras de suero o reactivos, o la contaminación cruzada entre reactivos puede causar resultados erróneos.
- El agua desionizada tratada con resinas de poliéster puede inactivar a la enzima HRP.

9. DESEMPEÑO

Se realizó la evaluación para determinar el desempeño clínico UDITEST-V2G® usando equipos modulares como lavador, incubador y lector de microplacas de 96 pozos.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para estimar la sensibilidad, se recolectaron 149 muestras de suero y plasma en diferentes momentos de pacientes que dieron positivo al SARS-CoV-2 mediante método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que también presentaron síntomas de COVID-19, así como muestras de pacientes que fueron contactos de personas portadoras de SARS-CoV-2, cada muestra se analizó con el ensayo UDITEST-V2G® y equipos modulares para microplacas. Se calculó la sensibilidad diagnóstica con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Para estimar la especificidad, se analizaron 229 muestras de suero y plasma de personas que eran negativos para el SARS-CoV-2. De las 229 muestras, 108 se recolectaron antes de noviembre de 2019 (antes del brote COVID-19) y 121 durante el brote COVID-19. Las 229 muestras se analizaron con el kit UDITEST-V2G® y equipos modulares para microplacas, se calculó la especificidad diagnóstica con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Tabla 1. Tabla de contingencia para anticuerpos anti-SARS CoV-2.

	Datos confirmados del laboratorio			
	Parámetro	Positivo	Negativo	Total
UDITEST-V2G®	Positivo	148	5	153
	Negativo	1	224	225
	Total	149	229	378

Tabla 2. Resultados obtenidos para anti-SARS-CoV-2.

Kit	N	VP	VN	FP	FN	VPP%	VPN%	OBS	OBS	ESP	ESP
								S%	E%	S%	E%
UDITEST-V2G®	378	148	224	5	1	96.73	99.55	99.33 (IC 95% 96.3-99.8)	97.82 (IC 95% 95.0-99.06)	S/D	S/D

N: Número de muestras; VP: Verdaderos Positivos; VN: Verdaderos Negativos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos negativos; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; S: Sensibilidad; E: Especificidad; OBS: Valor observado; ESP: Valor Esperado; S/D: Sin datos.

Especificidad analítica

Se evaluó UDITEST-V2G® para determinar la posible reactividad cruzada de personas con otras afecciones médicas. Se probaron un total de 28 muestras de 13 categorías diferentes. Todas las muestras fueron negativas, no se observó ninguna muestra fue positiva mediante UDITEST-V2G®. Los datos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Especificidad analítica.

Categoría	n	IgG		OBSERVACIONES
		Negativo	Positivo	
Hepatitis C	2	2	0	
VIH	2	2	0	
CMV IgG	1	1	0	
TORCH IgM	1	1	0	
TORCH IgG	1	1	0	
ZIKA IgM	3	3	0	
Dengue	7	7	0	Incluye 3 IgM y 4 totales
CHIK IgM	3	3	0	
VIH-Sifilis	4	4	0	
Influenza A H1	1	1	0	pool influenza 1
Influenza A/H1, A/H3, B (Yamagata Lineage)	1	1	0	
Influenza A/H3	1	1	0	pool influenza 2
Influenza A/H1, A/H3, B (Victoria Lineage)	1	1	0	

Precisión

Se analizaron dos muestras (una positiva y una negativa) con 20 repeticiones, en un día con 20 repeticiones en un día, con un operador, obteniéndose la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Reproducibilidad

Con base en la guía EP15-A3 (*User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline-Third Edition*), se analizaron dos muestras (una positiva y una negativa) realizando 5 repeticiones por corrida durante 5 días por diferentes operadores para evaluar la variación intralaboratorio del ensayo. Se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el % de coeficiente de variación (CV) de la prueba para cada muestra. Los datos muestran que el ensayo se realizó dentro de parámetros aceptables de precisión con % CV interensayo que puede observarse en la tabla 4.

Tabla 4. Precisión.

Muestra	Media IC	Repetibilidad UDITEST-V2G		Reproducibilidad UDITEST-V2G	
		% CV Esperada	% CV Observada	% CV Esperada	% CV Observada
Control positivo	1.81	10	4.25	10	5.07
Control negativo	0.114	10	5.06	10	5.29

Validez externa

Se analizó el panel de referencia AccSet SARS-CoV-2 Performance Panel marca Seracare con número de catálogo 0820-0410 y número de lote 10497051. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Panel de tercera opinión.

No. tubo	Resultado esperado	Resultado obtenido	Acuerdo
PAS-01	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-02	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-03	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-04	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-05	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-06	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-07	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-08	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-09	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-10	Reactivo	Reactivo	Sí
PAS-11	No reactivo	No reactivo	Sí

Concordancia

Se realizó la prueba de concordancia del kit UDITEST-V2G® comparándose con ensayos automatizados basados en quimioluminiscencia y en electroquimioluminiscencia obteniéndose una concordancia del 100%.

Tabla 6. Resultados de la prueba de concordancia.

Muestra	Resultado método automatizado (Quimioluminiscencia)	Resultado método automatizado (Electroquimioluminiscencia)	Resultado UDITEST-V2G. KIT DE ELISA
PAS-01	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-02	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-03	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-04	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-05	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-06	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-07	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-08	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-09	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-10	Reactivo	Reactivo	Reactivo
PAS-11	No reactivo	No reactivo	No reactivo

10. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
2. WHO. Novel coronavirus situation dashboard. Geneva, Switzerland: WHO, 2020
3. Zhu N et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 2020 Jan 24; [e-pub]. (<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>)
4. Chan JF-W et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: A study of a family cluster. Lancet 2020 Jan 24; [e-pub]. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9))
5. Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020 Jan 24; [e-pub]. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5))
6. Corman VM et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill : Bulletin European sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin, 31 Dec 2019, 25(3) DOI: 10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045
7. Kramer F and Simon V. Serology assays to manage COVID-19. Science Jun 2020. 10.1126/science.abc1227

Conclusiones

En esta evaluación UDITEST-V2G® obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 99.33% (IC del 95%, 96.3-99.8).

La especificidad diagnóstica obtenida fue de 97.82% (IC del 95% 95.0-99.06); el fabricante no informó algún valor de especificidad.

Al evaluar la especificidad analítica, no se observó ninguna reacción cruzada con muestras de suero y plasmas que contenían anticuerpos contra otros virus.

El valor de precisión en los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad, se observaron dentro del rango de CV reportado por el fabricante.

Los resultados obtenidos con el panel de tercera opinión fueron los esperados.

Los lavados de las microplacas pueden realizarse con lavador automatizado de microplacas, sin afectar los resultados esperados.