



UDITEST-V2G®

KIT DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS IgG ANTI-SARS-CoV-2
EN MUESTRAS DE SUERO

ALMACENAMIENTO: Refrigeración 2-8°C

CADUCIDAD/VIGENCIA: La fecha se indica en el empaque.

TIPO DE MUESTRA: Suero/Plasma

KIT DE DIAGNÓSTICO PARA USO *IN VITRO*

CONTENIDO

- | | |
|--|--|
| 1 INDICACIÓN DE USO | 8 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD |
| 2 USUARIOS | 9 MUESTRAS |
| 3 INTRODUCCIÓN | 10 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO |
| 4 FUNDAMENTO | 10.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS |
| 5 COMPONENTES DEL KIT | 10.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA |
| 6 MATERIALES REQUERIDOS NO CONTENIDOS EN EL KIT | 10.3 EJECUCIÓN DEL ENSAYO |
| 7 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS | 11 RECOMENDACIONES PARA EL ENSAYO |
| 7.1 SOLUCIÓN DE LAVADO | 12 CONTROL DE CALIDAD |
| 7.2 AGENTE DE DILUCIÓN | 13 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS |
| 7.3 SOLUCIÓN DILUYENTE DE ANTICUERPOS | 14 LIMITACIONES DE LA PRUEBA |
| 7.4 ANTICUERPO SECUNDARIO | 15 CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO |
| 7.5 SUSTRATOS PARA REVELADO | 15.1 SENSIBILIDAD |
| 7.6 SOLUCIÓN DE PARO | 15.2 PRECISIÓN |
| 7.7 CONTROL POSITIVO | 15.3 REACTIVIDAD CRUZADA |
| 7.8 CONTROL NEGATIVO | 16 REFERENCIA |

Interpretación de la prueba positiva para anticuerpos en contra del SARS-CoV-2

La presencia de anticuerpos tipo IgG sugiere que el sujeto ha sido expuesto al virus y ha desarrollado una respuesta inmune, típicamente esto ocurre al menos dos semanas después de la exposición y expresión clínica de la enfermedad. No determina en forma categórica que ya no se tiene riesgo de contraer la enfermedad, pero sugiere que es de menor riesgo que quien no tiene anticuerpos.

1 INDICACIÓN DE USO

El kit permite la detección de anticuerpos de la clase IgG específicos para el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína de espiga (S1) del coronavirus tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) en muestras de suero o plasma de sujetos sospechosos de haber sido infectados por el virus, o en personas vacunadas contra SARS-CoV-2. El resultado obtenido deberá ser interpretado por el personal de salud.

2 USUARIOS

Este kit es para uso de profesionales de laboratorio clínico y/o cuidado de la salud.

3 INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por coronavirus 2019, COVID-19 (por sus siglas en inglés **C**oronavirus **D**isease 2019) es una enfermedad respiratoria aguda causada por el SARS-CoV-2, la cual fue declarada como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a principios de 2020.

La glicoproteína S de los coronavirus es esencial para la unión del virus a la célula hospedera durante el proceso de infección. Se ha reportado que el SARS-CoV-2 (anteriormente llamado 2019-nCoV) puede infectar a las células epiteliales respiratorias humanas a través de la interacción con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (ACE-2). La proteína S es una proteína transmembranal tipo I, está formada por dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD), que es responsable del reconocimiento de ACE-2 en la superficie celular, mientras que la subunidad S2 contiene elementos básicos necesarios para la fusión a la membrana. La proteína S desempeña un papel clave para la inducción de la respuesta inmune de células T y generación de anticuerpos neutralizantes, que en principio proporcionan una inmunidad protectora. La metodología desarrollada para este kit tiene por objeto detectar la presencia de anticuerpos de la clase IgG anti-RBD de la proteína S1 del coronavirus SARS-CoV-2 mediante un ensayo de ELISA indirecto. Para ello se sensibiliza una placa de inmunoensayos con el RBD de la proteína de S de SARS-CoV-2 coronavirus tipo 2 (antígeno) y

posteriormente se colocan las muestras de suero para determinar la presencia de anticuerpos que reconozcan específicamente al RBD. La interacción de la proteína con los anticuerpos tipo IgG presentes en el suero analizado se pone de manifiesto por la adición de un anticuerpo anti-IgG humana acoplado a peroxidasa y la reacción enzimática posterior con el sustrato cromogénico que se detecta a 450 nm.

4 FUNDAMENTO

Este kit de ELISA está diseñado para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos humanos séricos de la clase IgG anti-SARS-CoV-2. Este ensayo utiliza una técnica en placa basada en un inmunoensayo-enzimático.

Los sueros problema se diluyen (ver sección correspondiente) 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 subsiguientes. 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.) dada por la coloración del sustrato cromogénico.

5 COMPONENTES DEL KIT (Presentación una placa)

No. DE PARTE	COMPONENTE	CANTIDAD	UNIDADES	CONTENIDO	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO
B-2020	Placa de inmunoensayo sensibilizada	1	1 placa	Placa de poliestireno de 96 micropozos de fondo plano Nunc-MaxiSorp, con antígeno RBD	2-8 °C
C-2020	Agente de dilución	1.8 g	1 botella	Polvo para preparar solución de dilución	Temperatura ambiente
D-2020	Solución de lavado 10X	50 mL	1 botella	Regulador de fosfatos pH7.4 con Tween 20 como surfactante	Temperatura ambiente
E-2020	Control positivo	12 µL	1 tubo	Anticuerpo anti-proteína "S" de SARS-CoV-2	2-8 °C
G-2020	Anticuerpo secundario	12 µL	1 tubo	Anticuerpo anti-IgG humano marcado con HRP	2-8 °C
H-2020	Sustrato A para revelado	5 mL	1 botella	Solución de peróxido de hidrogeno	2-8 °C
I-2020	Sustrato B para revelado	5 mL	1 botella	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en solvente orgánico	2-8 °C
J-2020	Solución de paro	5 mL	1 botella	Solución de ácido metanosulfónico	2-8 °C
F-2020	Control negativo	12 µL	1 tubo	Anticuerpo IgG humano no relacionado con SARS-CoV-2	2-8 °C

6 MATERIALES REQUERIDOS NO CONTENIDOS EN EL KIT

- Micropipetas de diferentes volúmenes (10-1000 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
- Cronómetro o timer

7 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Manténgase en refrigeración (2 a 8 °C), no se congele. Preparar las soluciones de trabajo inmediatamente antes de su uso. Ver sección de preparación de reactivos. Evitar el uso de soluciones con más de 24 h de preparación.

7.1 SOLUCIÓN DE LAVADO

Solución amortiguadora de fosfatos con surfactante

Cantidad: 1 x 50 mL

Almacenamiento: Temperatura ambiente

Preparación: 10X concentrado. El contenido debe diluirse con 450 mL de agua desionizada o destilada, mezclar adecuadamente antes de su uso.

7.2 AGENTE DE DILUCIÓN

Agente de dilución 3% en regulador de fosfatos con surfactante.

Cantidad: 1 x 1.8 g/60 mL

Almacenamiento: Temperatura ambiente no mayor a 25°C

Preparación: Transferir 60 mL de la solución de lavado al recipiente marcado como **AGENTE DE DILUCIÓN**, mezclar perfectamente antes de su uso. Una vez que el agente de dilución haya sido reconstituido deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para utilizarlo en ensayos subsiguientes.

7.3 SOLUCIÓN PARA ANTICUERPOS

Agente de dilución 1% en solución amortiguadora de fosfatos con surfactante

Cantidad: 1 x 12 mL

Almacenamiento: Temperatura ambiente no mayor a 25°C

Preparación: En un tubo cónico hacer una dilución 1:3 del **AGENTE DE DILUCIÓN** (preparado en el paso anterior). Colocar 8 mL de la solución de lavado en un tubo cónico y transferir 4 mL del agente de dilución, mezclar adecuadamente antes de su uso. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

7.4 ANTICUERPO SECUNDARIO

Anticuerpo anti-IgG humana acoplado a HRP

Cantidad: 1 x 12 µL para 6 mL

Almacenamiento: 2-8°C

Preparación: Transferir el contenido del anticuerpo secundario en 6 mL de solución para anticuerpos. **Preparación:** Transferir el contenido del anticuerpo secundario en 6 mL de solución diluyente de anticuerpos. Mezclar antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya

sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para usos subsecuentes.

7.5 SUSTRATOS PARA REVELADO

Solución que contiene peróxido de hidrógeno (A) y 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) en solvente orgánico (B).

Cantidad: 2 x 5 mL

Almacenamiento: 2-8 °C

Preparación: Mezclar volúmenes iguales del sustrato A y sustrato B para revelado. El kit contiene suficiente volumen de sustrato A y sustrato B para una placa completa, si se requiere utilizar una menor cantidad de pozos, preparar solo el volumen requerido. **Preparar 15 min antes de su uso**, mezclar adecuadamente y dejar reposar a temperatura ambiente. Una vez que el sustrato para revelado haya sido preparado, deberá protegerse de la luz y desecharse al terminar el ensayo. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

7.6 SOLUCIÓN DE PARO

Solución de ácido metanosulfónico

Cantidad: 1 x 5 mL

Almacenamiento: 2-8°C

Preparación: Listo para usarse

7.7 CONTROL POSITIVO

Anticuerpo anti-proteína S de SARS-CoV

Cantidad: 12 µL para 0.3 mL

Almacenamiento: 2-8°C

Preparación: Transferir 0.3 mL de la **SOLUCIÓN PARA ANTICUERPOS** al tubo marcado como control positivo. Mezclar perfectamente por pipeteo suave antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda almacenarlo para utilizarlo en ensayos subsecuentes.

7.8 CONTROL NEGATIVO

Anticuerpo anti-IgG humano no relacionado con SARS-CoV-2.

Cantidad: 12 µL para 0.3 mL

Almacenamiento: 2-8°C

Preparación: Transferir 0.3 mL de la **SOLUCIÓN PARA ANTICUERPOS** al tubo marcado como control negativo. Mezclar perfectamente por pipeteo suave antes de su uso. Una vez que el anticuerpo haya sido preparado deberá ser descartado al terminar el ensayo. No se recomienda guardarlo para emplearlo en ensayos posteriores.

8 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

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 algunas 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.

9 MUESTRAS

Se requieren 10 µL de muestra de suero/plasma humano para la determinación por duplicado. Los sueros pueden analizarse el mismo día de la toma de muestra, mantenerse en refrigeración (2 a 8°C) hasta por 2 semanas (periodos más prolongados deberán ser probados por el usuario) o en congelación (-20°C) para tiempos de almacenamiento más largos. No se recomienda analizar muestras hemolizadas.

10 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

10.1 Preparación de reactivos

Preparar las soluciones de trabajo inmediatamente antes de su uso. Ver sección de preparación de reactivos. Evitar el uso de soluciones con más de 24 h de preparación.

10.2 Preparación de la muestra

a) 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 y no tratadas con calor.

b) Centrifugar a 2000 rpm durante 3 min.

Diluir las muestras 1:100 con AGENTE DE DILUCIÓN RECONSTITUIDO para la determinación cualitativa (10 µL de suero/plasma y agregar 990 µL de AGENTE DE DILUCIÓN reconstituido). Para la determinación cuantitativa ver el esquema de dilución en el inserto correspondiente.

10.3 Ejecución del ensayo

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

b) Colocar 100 µL por pozo de las muestras diluidas y los **CONTROLES**. Se recomienda analizar las muestras por duplicado.

c) Incubar por 1.5 h a temperatura ambiente

d) Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.

e) Adicionar 50 µL por pozo del **ANTICUERPO SECUNDARIO** diluido previamente.

f) Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.

g) Remover el **ANTICUERPO SECUNDARIO**.

h) Lavar 6 veces adicionando 200 µL por pozo de **SOLUCIÓN DE LAVADO** en cada pozo y remover completamente.

i) Adicionar 100 µL por pozo de **SUSTRATO PARA REVELADO**, equilibrado a temperatura ambiente y preparado 15 min previos a su uso.

j) Incubar a temperatura ambiente durante 20 min protegido de la luz.

k) Adicionar 50 µL/pozo de **SOLUCIÓN DE PARO**.

l) 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).

*Leer dentro de los siguientes 30 min posteriores a la adición de la solución de paro

11 RECOMENDACIONES PARA EL ENSAYO

- Se recomienda que todas las muestras se analicen al menos por duplicado. La interpretación de los resultados se deberá realizar a partir del promedio de la D.O. de cada muestra.
- Mantenga los **SUSTRATOS PARA REVELADO** en su envase original y evite la exposición a la luz.
- Es necesario una técnica de pipeteo cuidadosa y el uso de dispositivos de pipeteo calibrados para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
- Los tiempos o temperaturas de incubación diferentes a los establecidos en este manual pueden afectar los resultados.
- Evite la formación de burbujas de aire en los pozos, ya que esto podría dar como resultado una menor eficiencia de unión y un mayor coeficiente de variación. Para ello puede emplearse la técnica inversa de pipeteo.
- Todos los reactivos deben mezclarse suave y completamente antes de su uso. Evitar la formación de espuma.

12 CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la validez de los resultados, se sugiere que cada ensayo incluya controles negativos y positivos internos, adicionales a los controles proporcionado en el kit. El valor promedio de la D.O. del control positivo no debe ser menor que 1.5.

13 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Determine la interpretación de la muestra comparando la D.O. con la siguiente tabla:

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	$0.5 < \text{Valor obtenido} < 0.6$	Repetir la prueba e interpretar el resultado relacionando con otras pruebas clínicas

Nota: Si la muestra se corrió por duplicado, calcular el valor promedio de la D.O. de controles y muestras

14 LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Los resultados de las pruebas no deben ser la única base para el diagnóstico clínico y el tratamiento del paciente.

- Los resultados pueden ser negativos para IgG dentro de la primera semana del inicio de la infección o si no se cuenta con el esquema completo de vacunación. 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.
- Para personas vacunadas se recomienda evaluar la presencia de anticuerpos al menos 14 días posteriores al finalizar el esquema de vacunación.
- El agua desionizada tratada con resinas de poliéster puede inactivar a la enzima HRP.
- La contaminación bacteriana o fúngica de muestras de suero o reactivos, o la contaminación cruzada entre reactivos puede causar resultados erróneos.

15 CARACTERÍSTICAS DE DESARROLLO

15.1 Sensibilidad

Para evaluar la especificidad del ensayo, se analizaron sueros positivos (provenientes de pacientes diagnosticados como positivos para SARS-CoV-2 por qRT-PCR) y sueros negativos (obtenidos antes de la pandemia y de pacientes negativos a SARS-CoV-2 por qRT-PCR) para establecer el punto de corte de D.O. y determinar la presencia de anticuerpos.

15.2 Precisión

Durante el desarrollo del kit se evaluaron muestras positivas en triplicados por dos analistas en forma independiente. Se obtuvo un %CV de las D.O. menor al 10% intra e inter ensayos.

15.3 Reactividad cruzada

No se ha determinado reactividad cruzada con otras enfermedades.

16 REFERENCIA

Camacho-Sandoval, R.; Nieto-Patlán, A.; Carballo-Uicab, G.; Montes, A.; Jiménez-Martínez, M.d.C.; Vallejo-Castillo, L.; González-González, E.; Arrieta-Oliva, H.I.; Gómez-Castellano, K.; Guzmán-Bringas, U.; et al. Development and Evaluation of a Set of Spike and Receptor Binding Domain-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for SARS-CoV-2 Serological Testing. *Diagnostics* 2021, 11, 1506.

Versión 1.2; Agosto 2021