



COVID AR IgG

ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA, SEMICUANTITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA EL VIRUS SARS-CoV-2 EN SUERO, PLASMA O SANGRE ENTERA HUMANA CONSERVADA EN SEROKIT

Sólo para diagnóstico de uso “in vitro”

PRESENTACIONES: Kits por 96 determinaciones (Cod. COVID AR96)
Kits por 192 determinaciones (Cod. COVID AR192)

ASPECTO CLÍNICO Y USO AL QUE ESTA DESTINADO

El presente producto puede ser usado para la detección y cuantificación “in vitro” de anticuerpos específicos del tipo IgG contra SARS-CoV-2 en suero, plasma o sangre entera humana conservada en SEROKIT, constituyendo una herramienta complementaria en el diagnóstico de la enfermedad COVID-19, con fines epidemiológicos, para la identificación de potenciales donadores de plasma para transfusión terapéutica y para la cuantificación de anticuerpos específicos, útil en el monitoreo post vacunación. El SARS-CoV-2 es un nuevo coronavirus que tiene su origen en China, con similitud al SARS-CoV-1 y a coronavirus de murciélagos. En seres humanos, la infección por coronavirus causa principalmente enfermedades respiratorias. Los coronavirus poseen varias proteínas estructurales, incluyendo las proteínas Spike (S), Envoltura (E), Membrana (M), y Nucleocápside (N). Los datos publicados indican que la proteína Spike posee alta afinidad por la enzima convertidora de Angiotensina (ACE2), la cual actúa como receptor y participa del proceso de ingreso del virus a las células (1). El SARS-CoV-2 se transmite entre humanos por contacto directo, por medio de pequeñas gotas en el aire que se eliminan principalmente al toser o estornudar. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de síntomas es de aproximadamente 5 días, con un máximo estimado de 14 días. Las inmunoglobulinas del tipo IgG son producidas entre los días 10-20 post-infección, pudiendo en algunos casos aparecer con anterioridad, y luego se mantienen en el cuerpo por varios meses. La determinación de anticuerpos del tipo IgG sugiere infección con SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas típicos y en casos sospechosos asintomáticos y contribuye a la supervisión y al control de la pandemia. La detección de anticuerpos no debe utilizarse como único criterio para el diagnóstico de COVID-19.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ensayo inmunoenzimático, heterogéneo, no competitivo, basado en el método indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2, agente etiológico de la enfermedad denominada COVID-19 en muestras de suero o plasma humano. Los antígenos se obtienen por técnica de ADN recombinante y representan la proteína SPIKE y un dominio de esta misma proteína viral que contiene el sitio de unión al receptor, RBD (Receptor Binding Domain) (2).

Una dilución apropiada de las muestras se incuban en pocillos de poliestireno, recubiertos con el antígeno. Los anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 son específicamente capturados por esos antígenos, quedando unidos a la fase sólida. Luego de varios lavados, a fin de eliminar las inmunoglobulinas no capturadas, el sistema se incuban con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 inmunocapturados. El conjugado no unido se desecha por lavado y se revela la presencia de peroxidasa mediante el agregado de peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina como sustrato cromogénico. Esta incubación da como resultado la aparición de un color azul cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2 de la muestra. La reacción enzimática es detenida mediante el agregado de ácido sulfúrico, lo que produce un viraje de color hacia el amarillo espectrofotométricamente cuantificable. El producto es apto para la determinación cualitativa y semicuantitativa (titulación) de los anticuerpos IgG específicos y ha sido calibrado con el Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti SARS-CoV-2 NIBSC Código 20/136 permitiendo la cuantificación de anticuerpos IgG específicos.

CONTENIDO DEL KIT

Microplaca con tiras con pocillos: Microplaca de 12x8 tiras con pocillos rompibles sensibilizados con antígenos recombinantes del virus SARS-CoV-2. La microplaca está envasada en una bolsa tipo aluminio sellada con silicagel como desecante en su interior. **Llevar a temperatura ambiente antes de abrir para prevenir la formación de humedad.**

Nº de microplacas: Cod. COVID AR96 1, Cod. COVID AR192 2

Control Positivo: Dilución de suero humano reactivo para anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2, de 400 UI/ml*, con estabilizadores proteicos, inactivados químicamente, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Volumen Cod. COVID AR96 2,5 ml c/u Cod. COVID AR192 5,0 ml c/u

*Ha sido ajustado de acuerdo al Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti SARS-CoV-2 NIBSC Código 20/136 (versión 2.0 del 17/12/2020).

Control Negativo: Dilución de suero humano no reactivo para anticuerpos contra el virus SARS-CoV-2, con estabilizadores proteicos, inactivado químicamente, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Volumen Cod. COVID AR96 2,5 ml Cod. COVID AR192 5,0 ml

Diluyente de Muestras: Suspensión proteica para la dilución de las muestras, estabilizada buffereada con P.B.S., con inhibidores de inespecificidad, con conservadores. Agitar antes de usar.

Volumen Cod. COVID AR96 50 ml Cod. COVID AR192 100 ml

Solución para Lavado 25X: Solución para lavado de los pocillos concentrada 25X para ser diluida con Agua Destilada o Desionizada antes de usar. Contiene un buffer fosfato concentrado y un agente surfactante.

Volumen Cod. COVID AR96 50 ml Cod. COVID AR192 100 ml

Conjugado 10X: Solución proteica buffereada que contiene un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (HRP), concentrado 10X. Contiene estabilizadores de proteínas y conservadores. Diluir 1:10 antes de usar con el Diluyente de Conjugado provisto.

Volumen Cod. COVID AR96 2,5 ml Cod. C COVID AR192 3,5 ml

Diluyente de Conjugado: Suspensión proteica para la dilución del conjugado concentrado 10X, estabilizada buffereada con P.B.S., con conservadores. Agitar antes de usar.

Volumen Cod. COVID AR96 15 ml Cod. COVID AR192 30 ml

Sustrato: Solución que contiene peróxido de hidrógeno tamponado. Para mezclar con el Cromógeno.

Volumen Cod. COVID AR96 9 ml Cod. COVID AR192 15 ml

Cromógeno: Solución que contiene 3,3',5,5', Tetrametilbenzidina (TMB) con estabilizadores. Para mezclar con el Sustrato. **Advertencia: Almacenar y manipular protegida de la luz.**

Volumen Cod. COVID AR96 9 ml Cod. COVID AR192 15 ml

Solución Stop: Solución de Acido Sulfúrico 1M. Reactivo corrosivo. Listo para usar.

Volumen Cod. COVID AR96 15 ml Cod. COVID AR192 30 ml

Manual de Instrucciones: El presente documento.

Nota: Control Positivo y Negativo se preparan a partir de suero humano adecuadamente inactivado. Sin embargo, por ser derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

1. Micropipetas de 10-20, 100, 200 y 1000 µl con puntas descartables.
2. Material volumétrico de vidrio.
3. Cronómetro y papeles absorbentes.
4. Agua Destilada o Desionizada.

5. Incubador de microplacas de ELISA termostatzado a 37 ± 1 °C.
6. Sistema lavador microplacas automático o manual capaz de aspirar y dispensar volúmenes de 300-400 μ l con recipiente colector de desechos potencialmente infectivos.
7. Lector fotométrico de ELISA lineal con filtro de 450nm o bicromático provisto con filtros de 450nm y 620-630 nm. (de uso alternativo).
8. Materiales de bioseguridad.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. **El Kit tiene que ser conservado entre 2 y 8°C siempre en posición vertical. No congelar.**
2. **La humedad puede afectar la estabilidad de los pocillos de la microplaca. Para prevenir esto, la microplaca debe ser llevada a temperatura ambiente antes de abrir su envase.** Saque del marco sólo los pocillos necesarios para la prueba programada y guarde los restantes en su propio envase en presencia del desecante. **Ciérralo herméticamente y colóquelas nuevamente entre 2 y 8 °C.**
3. La Solución de Lavado diluida es estable a temperatura ambiente durante 1 semana.
4. Todos los otros reactivos son estables entre 2 y 8°C siempre que se hayan manipulado cuidadosamente para evitar la contaminación.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

1. El Kit tiene que ser conservado entre 2 y 8°C.
2. Los procedimientos deben realizarse cuidadosamente para obtener resultados fiables.
3. Evite cualquier contaminación de los reactivos al sacarlos de sus recipientes. Nosotros recomendamos utilizar pipetas automáticas con puntas descartables. Cuando dispense los reactivos no toque las paredes y el fondo de los pocillos.
4. No mezcle reactivos de lotes diferentes. No intercambie la tapa entre los diferentes reactivos componentes del Kit.
5. Asegúrese que el Sustrato/Cromógeno no entre en contacto con agentes oxidantes o con superficies metálicas; **evite su exposición a la luz** durante la etapa de incubación o en su manipulación. Cuando utilice el reactivo hágalo sólo en recipientes y materiales plásticos descartables, perfectamente limpios o estériles.
6. **Muestras y materiales potencialmente infecciosos tienen que ser manejados con cuidado siguiendo las normas de bioseguridad vigentes acordes con esta patología.**
7. Todos los objetos en contacto directo con las muestras y los residuos del ensayo deben tratarse como potencialmente infecciosos. Los procedimientos más efectivos para la inactivación son el tratamiento con autoclave a 121°C durante 30 minutos o con Hipoclorito de Sodio a una concentración final de 2.5% durante 24 horas.
8. Evite cualquier contacto de líquidos con la piel y mucosas. Siempre use para su protección guantes, lentes, etc., según las normas de bioseguridad acordes con esta patología.
9. La Solución Stop es Irritante por lo tanto manipúlela con cuidado.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- ✓ Coloque todos los reactivos a temperatura ambiente al menos 1 hora antes de comenzar con la prueba.
- ✓ Para prevenir la incidencia de la humedad en la microplaca, atempérela, saque del marco sólo los pocillos necesarios para la prueba programada y guarde inmediatamente los restantes en su propio envase que contiene el desecante. **Obtore firmemente el envase con cinta (cierre hermético) antes de guardar la microplaca entre 2 y 8°C.**
- ✓ Los tiempos de distribución e incubación deben ser los mismos para todos los pocillos; evite interrupciones entre los pasos del ensayo.
- ✓ En el procedimiento de lavado, use sólo la Solución para Lavado proporcionada con el Kit y siga cuidadosamente las indicaciones expresadas en la sección “Instrucciones de Lavado”.
- ✓ Elimine el exceso de Solución de lavado de los pocillos golpeándolos en forma invertida sobre papel absorbente.
- ✓ El color desarrollado en la última incubación es estable como máximo 30 minutos en la oscuridad.

RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Utilizar suero fresco, plasma (EDTA, Heparina, Citrato) ó sangre entera humana conservada en SEROKIT. La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas siguiendo las normas generales.

Las muestras de suero ó plasma deben ser límpidas. Ante la presencia de turbiedad, precipitados o coágulos recomendamos centrifugar a 2000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente o filtrar con membranas de 0.22µ. No utilizar muestras con contaminación bacteriana dado que pueden producir falsos resultados.

Muestras de suero o plasma altamente lipémicas, ictericas o hemolizadas no deberían ser usadas ya que pueden dar falsos resultados en el ensayo. Si las muestras no son usadas inmediatamente pueden guardarse entre 2 y 8°C durante 1 semana. Evitar utilizar muestras congeladas.

Para las muestras de sangre entera conservada en SEROKIT vea el Manual de Instrucciones correspondiente.

Las muestras deben ser manipuladas con cuidado siguiendo las normas de bioseguridad vigentes acordes con esta patología.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Diluyente de Muestras y Diluyente de Conjugado: Agitar antes de usar.

Solución para Lavado: La Solución para Lavado concentrada 25X tiene que ser diluida 1:25 con Agua Destilada o Desionizada antes de usar. Homogeneizar bien. La Solución para Lavado diluida es estable a temperatura ambiente durante 1 semana.

Conjugado 10X: Minutos antes de usar diluya el Conjugado concentrado 1:10 con el Diluyente de Conjugado provisto. Homogeneizar la solución suavemente. Preparar sólo la cantidad necesaria para las pruebas en curso.

Sustrato/Cromógeno: Aproximadamente 5 minutos antes de usar mezcle un volumen de Sustrato con un volumen de Cromógeno en un recipiente de plástico descartable, en cantidad necesaria de acuerdo a las necesidades. Esta solución es estable durante 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz.

INSTRUCCIONES DE LAVADO

Un buen procedimiento de lavado es esencial para obtener datos analíticos correctos y precisos.

Recomendamos que utilice un equipo lavador automático de microplacas de Elisa, calibrado y en buen funcionamiento. Normalmente 6 ciclos de lavado automático de 300-400 µl/pocillo cada uno, con un reposo de 30 segundos entre cada ciclo, son suficientes para remover falsos positivos y ruido de fondo. Recomendamos calibrar el sistema de lavado sobre el propio Kit para tener reproducibilidad en el desarrollo analítico.

En caso de lavado manual, se sugiere realizar 6 ciclos, distribuyendo y aspirando 300-400 µl/pocillo por ciclo.

En todos los casos, los desechos potencialmente infectivos del lavado de las microplacas tienen que ser inactivados con Hipoclorito de Sodio al 2.5% en concentración final durante 24 horas y desechados según la legislación vigente como residuos patogénicos.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO PARA USO EXCLUSIVO CON SUERO O PLASMA (IMPORTANTE: PARA USO CON SANGRE ENTERA CONSERVADA EN SEROKIT VER MAS ADELANTE).

Por lo menos 1 hora antes de usar coloque todos los reactivos necesarios para la prueba a temperatura ambiente. Agite antes de usar el Diluyente de Muestras y el Diluyente de Conjugado.

Para el ensayo CUALITATIVO utilizar el Control Positivo y el Control Negativo tal cual se encuentran en el kit. No deben ser diluidos.

Para el ensayo CUANTITATIVO utilizar el Control Positivo (400 UI/ml) tal cual se encuentra en el kit y tres diluciones el medio empleando el Diluyente de Muestras (Corresponden a 200, 100 y 50 UI/ml respectivamente). El Control Negativo utilizarlo tal cual se encuentra en el kit. No debe ser diluido.

1. Extraer del envase la cantidad de Pocillos de Reacción necesarios para el ensayo considerando las Muestras y los Controles.
2. En un vial ó tubo apropiado diluir las Muestras 1:51 con el Diluyente de Muestras utilizando 10 µl de

- Muestra y 500 µl de Diluyente de Muestras (ver Preparación de los Reactivos). Homogeneizar.
- Transferir 200 µl de cada Muestra diluida y los Controles a los pocillos correspondientes. *Se recomienda ensayar los Controles por duplicado.*
 - Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
 - Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
 - Descartar el contenido total de los pocillos por aspiración y lavarlos 6 veces con la Solución para Lavado diluida (ver Preparación de los Reactivos) según las instrucciones indicadas en *Instrucciones de lavado*. Por último invertir los pocillos y golpearlos sobre papel absorbente para eliminar el líquido residual.
 - Durante la incubación y minutos antes de usar preparar la solución de conjugado diluido (ver Preparación de los Reactivos).
 - Dispensar en cada pocillo 100µl de la solución de conjugado diluido.
 - Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
 - Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
 - Descartar la solución de conjugado y lavar 6 veces como se indicó en el punto 6.
 - Prepara la solución de Sustrato/Cromógeno (ver Preparación de los Reactivos). Agregar 100 µl de Sustrato /Cromógeno a todos los pocillos. Homogeneizar bien durante 10 segundos aplicando sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales
 - Incubar a 37 °C y oscuridad durante 30 minutos.
 - Retirar del incubador y frenar la reacción enzimática con el agregado de 100 µl de Solución Stop, homogeneizar bien durante 10 segundos y medir la Densidad Óptica a 450 nm con un lector de ELISA empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

Esquema simplificado del procedimiento de ensayo cualitativo y cuantitativo para uso exclusivo con suero o plasma (Importante: para uso con sangre entera conservada en SEROKIT ver más adelante)

<i>Reactivos</i>	<i>Controles</i>	<i>Muestras</i>
Muestras de Suero o Plasma Diluidas 1:51 y Controles	200µl	200µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 60 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Diluir cantidad necesaria de Conjugado 10X		
Conjugado diluido (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Preparar cantidad necesaria de Sustrato/Cromógeno		
Sustrato/Cromógeno (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C y oscuridad.</i>		
Leer inmediatamente los resultados en forma visual o frenar la reacción.		
Solución Stop	100µl	100µl
Homogeneizar 10 segundos y leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire dentro de los 30 minutos de agregada la Solución.		

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO SEMICUANTITATIVO (TITULACIÓN) PARA USO EXCLUSIVO CON SUERO O PLASMA. (IMPORTANTE: NO UTILIZAR ESTE PROCEDIMINETO CON SANGRE ENTERA CONSERVADA EN SEROKIT).

Por lo menos 1 hora antes de usar coloque todos los reactivos necesarios para la prueba a temperatura ambiente. Agite antes de usar el Diluyente de Muestras y el Diluyente de Conjugado.

- Extraer del envase la cantidad de Pocillos de Reacción necesarios para el ensayo considerando las Muestras y los Controles.
- En un vial ó tubo apropiado diluir la muestra que se desea titular 1:5 en un suero comprobadamente negativo para anticuerpos IgG específicos contra COVID-19 o alternativamente Suero Fetal Bovino (Estos materiales No están incluidos en el Kit). **Para ello, utilizar 20 µl de la muestra a titular y 80 µl del**

suero negativo o Suero Fetal Bovino. Homogeneizar.

3. En un recipiente adecuado, preparar una serie de ocho diluciones al medio. Para ello, transferir 50 µl de la dilución 1:5 de la muestra al recipiente con 50 µl de suero negativo o Suero Fetal Bovino (dilución 1:10). Luego, transferir 50 µl de la dilución 1:10 de la muestra al próximo recipiente con 50 µl de suero negativo o Suero Fetal Bovino (dilución 1:20) y así sucesivamente hasta la dilución 1:1280. Homogeneizar en cada dilución.
4. Agregar 180 µl del Diluyente de Muestras en los Pocillos de Reacción de COVIDAR IgG.
5. Transferir 20 µl de cada muestra diluida a los pocillos de reacción correspondientes. Homogeneizar. Cada muestra quedará diluida 10 veces. **DILUCION FINAL: Pocillo A corresponderá a la dilución del suero 1:100, la B, a la dilución 1:200, la C, a la dilución 1:400 y así hasta la fila H que corresponderá a la dilución 1:12800.**
6. Transferir 200 µl de los Controles Positivo y Negativo provistos en el kit a los pocillos destinados para este fin. **Los Controles NO deben ser diluidos (utilizar tal cual se encuentran en el kit).**
7. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
8. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
9. Descartar el contenido total de los pocillos por aspiración y lavarlos 6 veces con la Solución para Lavado diluida (ver Preparación de los Reactivos) según las instrucciones indicadas en *Instrucciones de lavado*. Por último invertir los pocillos y golpearlos sobre papel absorbente para eliminar el líquido residual.
10. Durante la incubación y minutos antes de usar preparar la solución de conjugado diluido (ver Preparación de los Reactivos).
11. Dispensar en cada pocillo 100µl de la solución de conjugado diluido.
12. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
13. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
14. Descartar la solución de conjugado y lavar 6 veces como se indicó en el punto 6.
15. Preparar la solución de Sustrato/Cromógeno (ver Preparación de los Reactivos). Agregar 100 µl de Sustrato /Cromógeno a todos los pocillos. Homogeneizar bien durante 10 segundos aplicando sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales
16. Incubar a 37 °C y oscuridad durante 30 minutos.
17. Retirar del incubador y frenar la reacción enzimática con el agregado de 100 µl de Solución Stop, homogeneizar bien durante 10 segundos y medir la Densidad Óptica a 450 nm con un lector de ELISA empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

Esquema simplificado del procedimiento de ensayo semicuantitativo (Titulación) para uso exclusivo con suero o plasma. (Importante: No utilizar este procedimiento con sangre entera conservada en SEROKIT)

<i>Reactivos</i>	<i>Controles</i>	<i>Muestras</i>
Muestras de Suero o Plasma a Titular	-	20µl
Suero Negativo ó Suero Fetal Bovino	-	80µl
<i>Homogeneizar. Las Muestras de Suero o Plasma están diluidas 1:5</i>		
Dilución 1:5 de las Muestras de Suero o Plasma	-	50µl
Suero Negativo ó Suero Fetal Bovino	-	50µl
<i>Homogeneizar. Continuar con diluciones al medio. (1:10 hasta 1:1280)</i>		
Diluyente de Muestras	-	180µl
Serie de Diluciones de Suero o Plasma (1:10 hasta 1:1280)	-	20µl
Controles	200µl	-
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 60 minutos a 37 °C. (Dilución Final de las Muestras de Suero o Plasma 1:100 hasta 1:12800)</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Diluir cantidad necesaria de Conjugado 10X		

Conjugado diluido (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Preparar cantidad necesaria de Sustrato/Cromógeno		
Sustrato/Cromógeno (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C y oscuridad.</i>		
Leer inmediatamente los resultados en forma visual o frenar la reacción.		
Solución Stop	100µl	100µl
Homogeneizar 10 segundos y leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire dentro de los 30 minutos de agregada la Solución.		

PROCEDIMIENTO ABREVIADO DE TITULACIÓN PARA USO EXCLUSIVO CON SUERO O PLASMA. (IMPORTANTE: NO UTILIZAR ESTE PROCEDIMIENTO CON SANGRE ENTERA CONSERVADA EN SEROKIT).

El Ministerio de Salud de Argentina recomienda la titulación de Plasmas de individuos Convalecientes para su selección en caso de uso terapéutico. Acorde a las guías emitidas en enero de 2021, se recomienda el uso de plasmas con títulos mayores o iguales a 1:1000 en base al ensayo con COVIDAR IgG. Con el fin de proveer un protocolo abreviado, se sugiere realizar 3 diluciones: 1:100, 1:1000 y 1:5000. Una reacción positiva en la primera dilución se considerará como título BAJO ($\geq 1:100$ y $< 1:1000$), reacción positiva en la segunda dilución se considerará como título MEDIO ($\geq 1:1000$ y $< 1:5000$) y reacción positiva en la tercera dilución se considerará como título ALTO ($\geq 1:5000$). A continuación se describe el protocolo a seguir:

Por lo menos 1 hora antes de usar coloque todos los reactivos necesarios para la prueba a temperatura ambiente. Agite antes de usar el Diluyente de Muestras y el Diluyente de Conjugado.

1. Extraer del envase la cantidad de Pocillos de Reacción necesarios para el ensayo considerando las Muestras y los Controles.
2. En un vial ó tubo apropiado diluir la muestra que se desea titular 1:10, 1:100 y 1:500 en un suero comprobadamente negativo para anticuerpos IgG específicos contra COVID-19 o alternativamente Suero Fetal Bovino (Estos materiales No están incluidos en el Kit). Homogeneizar.
3. Agregar 180 µl del Diluyente de Muestras en los Pocillos de Reacción.
4. Transferir 20 µl de cada muestra diluida anteriormente al cada pocillo de reacción correspondiente. Homogeneizar. La muestra quedará diluida 10 veces más. DILUCION FINAL: 1:100, 1:1000 y 1:5000.
5. Transferir 200 µl de los Controles Positivo y Negativo provistos en el kit a los pocillos destinados para este fin. **Los Controles NO deben ser diluidos (utilizar tal cual se encuentran en el kit).**
6. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
7. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
8. Descartar el contenido total de los pocillos por aspiración y lavarlos 6 veces con la Solución para Lavado diluida (ver Preparación de los Reactivos) según las instrucciones indicadas en *Instrucciones de lavado*. Por último invertir los pocillos y golpearlos sobre papel absorbente para eliminar el líquido residual.
9. Durante la incubación y minutos antes de usar preparar la solución de conjugado diluido (ver Preparación de los Reactivos).
10. Dispensar en cada pocillo 100µl de la solución de conjugado diluido.
11. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
12. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
13. Descartar la solución de conjugado y lavar 6 veces como se indicó en el punto 6.
14. Preparar la solución de Sustrato/Cromógeno (ver Preparación de los Reactivos). Agregar 100 µl de Substrato /Cromógeno a todos los pocillos. Homogeneizar bien durante 10 segundos aplicando sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales
15. Incubar a 37 °C y oscuridad durante 30 minutos.
16. Retirar del incubador y frenar la reacción enzimática con el agregado de 100 µl de Solución Stop, homogeneizar bien durante 10 segundos y medir la Densidad Óptica a 450 nm con un lector de ELISA empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

Esquema simplificado del procedimiento abreviado de Titulación para uso exclusivo con suero o plasma. (Importante: No utilizar este procedimiento con sangre entera conservada en SEROKIT)

Muestras de Suero o Plasma a Titular diluidas 1:10, 1:100 y 1:500 en Suero Negativo ó Suero Fetal Bovino		
<i>Homogeneizar</i>		
<i>Reactivos</i>	<i>Controles</i>	<i>Muestras</i>
Diluyente de Muestras	-	180 µl
Diluciones 1:10, 1:100 y 1:500 de las Muestras de Suero o Plasma	-	20µl
Controles	200 µl	-
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 60 minutos a 37 °C. (Dilución Final de las Muestras de Suero o Plasma 1:100, 1:1000 y 1:5000)</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Diluir cantidad necesaria de Conjugado 10X		
Conjugado diluido (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Preparar cantidad necesaria de Sustrato/Cromógeno		
Sustrato/Cromógeno (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C y oscuridad.</i>		
Leer inmediatamente los resultados en forma visual o frenar la reacción.		
Solución Stop	100µl	100µl
Homogeneizar 10 segundos y leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire dentro de los 30 minutos de agregada la Solución.		

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO PARA USO EXCLUSIVO CON SANGRE ENTERA CONSERVADA EN SEROKIT

Por lo menos 1 hora antes de usar coloque todos los reactivos necesarios para la prueba a temperatura ambiente. Agite antes de usar el Diluyente de Muestras y el Diluyente de Conjugado.

Para el ensayo CUALITATIVO utilizar el Control Positivo y el Control Negativo tal cual se encuentran en el kit. No deben ser diluidos.

Para el ensayo CUANTITATIVO utilizar el Control Positivo (400 UI/ml) tal cual se encuentra en el kit y tres diluciones el medio empleando el Diluyente de Muestras (Corresponden a 200, 100 y 50 UI/ml respectivamente). El Control Negativo utilizarlo tal cual se encuentra en el kit. No debe ser diluido.

1. Extraer del envase la cantidad de Pocillos de Reacción necesarios para el ensayo considerando las Muestras y los Controles.
2. En un vial o tubo apropiado diluir la muestra de sangre entera (que se encuentra en el vial con conservante provisto dentro del SEROKIT) 1:6 en Diluyente de Muestras mezclando **40 ul de muestra conservada con 200 ul de Diluyente de Muestras** (volumen total 240 ul). Homogeneizar.
3. Transferir 200 µl de cada Muestra diluida y los Controles a los pocillos correspondientes. *Se recomienda ensayar los Controles por duplicado.*
4. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
5. Incubar a 37 °C durante 60 minutos.
6. Descartar el contenido total de los pocillos por aspiración y lavarlos 6 veces con la Solución para Lavado diluida (ver Preparación de los Reactivos) según las instrucciones indicadas en *Instrucciones de lavado*. Por último invertir los pocillos y golpearlos sobre papel absorbente para eliminar el líquido residual.
7. Durante la incubación y minutos antes de usar preparar la solución de conjugado diluido (ver Preparación

de los Reactivos).

8. Dispensar en cada pocillo 100µl de la solución de conjugado diluido.
9. Aplicar sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales durante 10 segundos.
10. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
11. Descartar la solución de conjugado y lavar 6 veces como se indicó en el punto 6.
12. Preparar la solución de Sustrato/Cromógeno (ver Preparación de los Reactivos). Agregar 100 µl de Sustrato /Cromógeno a todos los pocillos. Homogeneizar bien durante 10 segundos aplicando sobre los pocillos movimientos circulares o pequeños golpes laterales
13. Incubar a 37 °C y oscuridad durante 30 minutos.
14. Retirar del incubador y frenar la reacción enzimática con el agregado de 100 µl de Solución Stop, homogeneizar bien durante 10 segundos y medir la Densidad Óptica a 450 nm con un lector de ELISA empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

Esquema simplificado del procedimiento de ensayo cualitativo y cuantitativo para uso exclusivo con sangre entera conservada en SEROKIT.

<i>Reactivos</i>	<i>Controles</i>	<i>Muestras</i>
Sangre Entera conservada en SEROKIT	-	40µl
Diluyente de Muestras	-	200µl
<i>Homogeneizar. Las Muestras están diluidas 1:6</i>		
Muestras Diluidas 1:6 y Controles	200µl	200µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 60 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Diluir cantidad necesaria de Conjugado 10X		
Conjugado diluido (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C.</i>		
Lavar 6 veces con Solución para Lavado diluida (Ver Preparación de los Reactivos)		
Preparar cantidad necesaria de Sustrato/Cromógeno		
Sustrato/Cromógeno (Ver Preparación de los Reactivos)	100µl	100µl
<i>Homogeneizar 10 segundos e incubar durante 30 minutos a 37 °C y oscuridad.</i>		
Leer inmediatamente los resultados en forma visual o frenar la reacción.		
Solución Stop	100µl	100µl
Homogeneizar 10 segundos y leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire dentro de los 30 minutos de agregada la Solución.		

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Luego del agregado de la Solución Stop, homogeneizar durante 10 segundos y medir la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo con un lector fotométrico de ELISA lineal con filtro de 450nm o alternativamente bicromático provisto con filtros de 450nm y 620-630 nm, empleando blanco de aire, dentro de los 30 minutos de agregada la solución.

Para el análisis semicuantitativo, el título de anticuerpos se corresponderá con la mayor dilución de la serie para la que se obtuvo un resultado positivo. Para el procedimiento abreviado de titulación, una reacción positiva en la primera dilución se considerará como título BAJO ($\geq 1:100$ y $< 1:1000$), reacción positiva en la segunda dilución se considerará como título MEDIO ($\geq 1:1000$ y $< 1:5000$) y reacción positiva en la tercera dilución se considerará como título ALTO ($\geq 1:5000$).

VALIDEZ DEL ENSAYO

El ensayo es considerado válido si:

1. El valor de DO 450 nm promedio del Control Negativo (CN) es < 0.150 . Valores anormales se observan si el sistema de lavado es defectuoso o no se observaron las “Instrucciones de Lavado” descritas en la sección correspondiente.
2. El valor de DO 450 nm del Control Positivo (CP) es > 1.000 . Valores diferentes se observan en caso de mantenimiento incorrecto del Kit.

En caso de que no se cumpla alguna de las especificaciones mencionadas anteriormente, antes de repetir el test verifique el correcto funcionamiento de los instrumentos usados en el ensayo, el procedimiento de distribución de Controles y Muestras o cualquier falla operativa.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Ensayo cualitativo

La presencia o ausencia presumible de anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2, debe ser analizada teniendo en cuenta el Límite de Decisión (**Cut-off value**).

Calcule el valor promedio de densidad óptica (DO) del Control Negativo, verifique la validez del ensayo como se describió y aplique la fórmula siguiente:

Límite de Decisión o Cut-off value = DO promedio del Control Negativo + 0.150

Muestras con un valor de DO 450 nm dentro del valor del Cut-off $\pm 10\%$ se considerarían en **zona gris**.

Las muestras con un valor de DO 450 nm por debajo del límite inferior de la zona gris se considerarían **no reactivas** para anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2.

Muestras con un valor de DO 450 nm más alto que el límite superior de la zona gris se considerarían **reactivas** para anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2.

Ejemplo de cálculo cualitativo:

Control Negativo promedio DO 450nm = 0.062

Control Positivo DO 450nm = 0.700

Cut-off = CN + 0.150 = 0.212

Zona gris: Entre 0.191 y 0.233

Muestra #1 DO 450nm = 0.085 No reactiva

Muestra #2 DO 450nm = 0.580 Reactiva

Muestra #3 DO 450nm = 0.198 Zona gris

Expresión de los resultados utilizando IP o RP

Luego de obtenido los valores de DO óptica es posible expresar los resultados del análisis utilizando el Índice de Positividad (IP) o Relación de Positividad (RP). Se obtiene por cálculo mediante el cociente entre la DO de la muestra y el Cut-off.

Este es un valor orientativo dependiente de la concentración de anticuerpos específicos y su afinidad, del tipo de lector fotométrico de ELISA y su rango de lectura y de condiciones operativas.

Muestras con un valor de IP o RP entre 0.9-1.1 se considerarían en **zona gris**.

Las muestras con un valor de IP o RP menor que 0.9 se considerarían **no reactivas** para anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2.

Muestras con un valor de IP o RP mayor que 1.1 se considerarían **reactivas** para anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2.

Ejemplo de cálculo utilizando IP o RP:

Control Negativo promedio DO 450nm = 0.062

Control Positivo DO 450nm = 0.700

Cut-off = CN + 0.150 = 0.212

Zona gris: Entre 0.191 y 0.233

Muestra #1 DO 450nm = 0.085 / Cut-off = 0.212 No reactiva, IP o RP = 0.4

Muestra #2 DO 450nm = 0.580 / Cut-off = 0.212 Reactiva, IP o RP = 2.7

Muestra #3 DO 450nm = 0.198 / Cut-off = 0.212 Zona gris, IP o RP = 0.9

Los valores máximos de IP o RP dependen del lector fotométrico de ELISA ya que pueden tener máximos de medición (saturación) diferentes. En relación a esto, en caso de contar con un equipo de lectura máxima con DO de 4.000, el IP o RP puede alcanzar un valor máximo de 20.0, mientras que con un equipo de lectura máxima con DO de 3.000, el IP o RP puede alcanzar un valor máximo de 15.0.

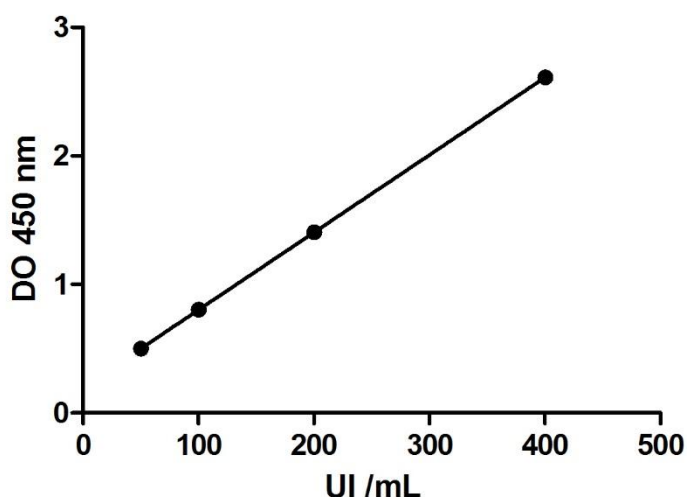
Ensayo Cuantitativo

Una muestra Reactiva para anticuerpos IgG específicos contra SARS-CoV-2 puede informarse cuantitativamente en UI/ml ajustado de acuerdo al Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti SARS-CoV-2 NIBSC Código 20/136 (versión 2.0 del 17/12/2020). Una muestra No Reactiva o en Zona Gris informarla aplicando el criterio utilizado para el Ensayo Cualitativo.

Establecer la Curva de Calibración “punto a punto” con los Valores de Densidad Óptica del Control Positivo de 400 UI/ml y sus diluciones de 200, 100 y 50 UI/ml en función de su concentración en UI/ml. Considerar el valor del Cut-off +10% como el límite inferior de la curva. El valor en UI/ml de la muestra se obtiene extrapolando su Densidad Óptica. Puede utilizar una computadora para el trazado de "punto a punto" para el cálculo con la Curva de Calibración.

Los valores obtenidos pueden variar de acuerdo al lector fotométrico de ELISA empleado y no pueden ser intercambiados con otros productos.

El siguiente gráfico es un ejemplo de una curva de calibración típica. No utilice esta curva para la determinación de concentraciones de anticuerpos en las muestras.



Toda muestra que evidencie una D.O. superior al valor máximo de linealidad establecido en 400UI/ml diluirla convenientemente en el Diluyente de Muestras para encontrar su valor en la línea standard. Luego expresar su resultado multiplicando por el factor de dilución. Alternativamente puede informarse “> 400 UI/ml”.

Ejemplo de cálculo cuantitativo:

DO 450 nm			
CP de 50 UI/ml	CP de 100 UI/ml	CP de 200 UI/ml	CP de 400 UI/ml
0.492	0.805	1.410	2.582

	DO 450 nm (CO: 0.212)	IP o RP	Informe Resultado
CN	0.062		
Muestra #1	0.085	0.4	No Reactiva
Muestra #2	0.580	2.7	Reactiva 63 UI/ml
Muestra #3	0.198	0.9	Zona Gris

CONCLUSIONES

Anticuerpos IgG específicos contra el virus SARS-CoV-2 comienzan a detectarse aproximadamente de 10 a 20 días luego de la primo-infección. En algunos casos pueden ser detectados con anterioridad.

Resultados positivos para IgG contra el virus SARS-CoV-2 pueden ser indicativos de una infección presente o pasada.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección previa causante de COVID-19, y no debe utilizarse como único resultado para descartar la existencia de una infección activa.

Resultados no reproducibles en la reactividad de las muestras o de los controles podrían deberse a algunas de las siguientes causas:

- Lavado incorrecto de los pocillos de reacción.
- Contaminación cruzada de una muestra no reactiva con una muestra reactiva adyacente.
- Contaminación del Sustrato y Cromógeno con agentes oxidantes (como por ejemplo cloro).
- Contaminación de la Solución Stop.
- Contaminación de la Solución para Lavado diluida.
- Conservación inadecuada de los pocillos de reacción no utilizados.
- Mal dispensado y homogeneizado de las muestras.
- Incorrecto funcionamiento de los equipos y materiales utilizados para el desarrollo de la reacción.
- Usar materiales no provistos potencialmente contaminados o mal lavados.
- Usar recipientes para la preparación de los reactivos potencialmente contaminados o mal lavados.
- Insuficiente atemperado del Kit al retirarlo de su temperatura de conservación antes de realizar la prueba.
- Inobservancia del procedimiento especialmente en la temperatura y tiempo de incubación.
- Otras.

DESEMPEÑO

Sensibilidad analítica

El límite de detección o mínima cantidad de analito detectable por el ensayo es 4.03 UI/ml determinado con el Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti SARS-CoV-2 NIBSC Código 20/136 (versión 2.0 del 17/12/2020).

Sensibilidad diagnóstica

Se analizó por COVID AR IgG 497 casos confirmados por qPCR en hisopados para SARS-CoV-2. Los resultados fueron los siguientes:

Días desde el inicio de síntomas	N	Reactividad positiva
< 7	139	39%
8-14	107	74%
15-21	58	78%
22-44	130	88%
> 45	63	95%

Estos resultados sugerirían que COVID AR IgG sería igual o más sensible que otros ELISA disponibles comercialmente.

Se estudió casos sospechosos según criterio del Ministerio de Salud de Argentina con síntomas compatibles pero con qPCR negativa, derivados de hospitales para su análisis serológico con COVID AR IgG.

Días desde el inicio de síntomas	N	IgG +
>5	13	4

Casos sospechosos según criterio del Ministerio de Salud de Argentina sin determinación por qPCR viajeros y contactos estrechos

Días desde el inicio de síntomas	N	IgG +
----------------------------------	---	-------

Se analizó 25 sueros positivos para qPCR en forma comparada entre COVID AR IgG y cuatro marcas comerciales de test inmunocromatograficos rápidos. De las 25 muestras, 20 muestras resultaron reactivas para COVID AR IgG y 5 negativas. No se registraron muestras positivas para ningún test inmunocromatograficos rápido que COVID AR IgG no haya detectado. COVID AR IgG presentó mayor sensibilidad relativa respecto a estos cuatros test rápidos.

Especificidad

Se analizó 94 muestras de la Sección Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín de Argentina obtenidas en fecha previa a la Pandemia (presumiblemente no reactivas para SARS-CoV-2). El 100% de las muestras arrojaron resultados No reactivos (por debajo del valor de Cut off menos el 10%).

Se analizó 80 muestras de profesionales de salud del Hospital General de Agudos José María Ramos Mejía asintomáticos, 110 muestras de profesionales de salud del Hospital de Clínicas José de San Martín y 80 del Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz. Las muestras fueron NO reactivas en todos los casos.

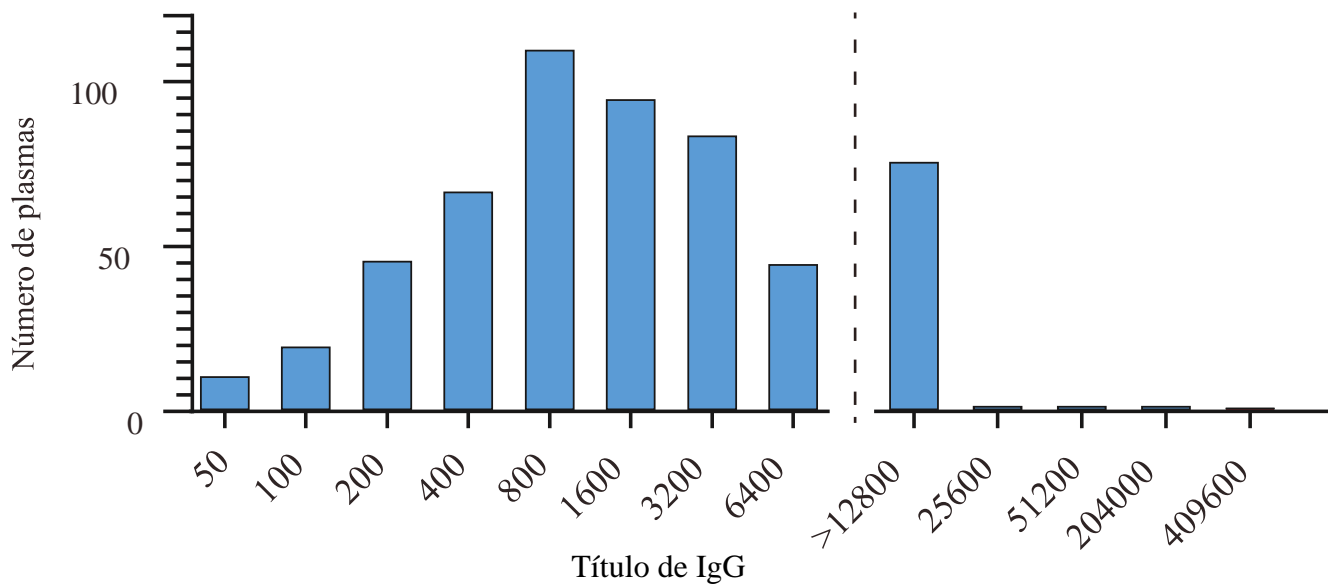
Adicionalmente se analizó 232 muestras de la Sección Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín de Argentina confirmadamente no reactivas para SARS-CoV-2 por qPCR. El 100% de las muestras arrojaron resultados No reactivos (por debajo del valor de Cut off menos el 10%).

Reproducibilidad

Determinaciones de la misma muestra realizadas en tres centros de salud diferentes y tres replicados de dos muestras diferentes. En todos los casos se obtuvieron coeficientes de variación menores al 20%.

Titulaciones de IgGs en suero o plasma

El siguiente gráfico muestra los Títulos de IgG de 561 plasmas de individuos convalecientes que fueron diagnosticados positivo para el virus SARS-CoV-2 por qPCR en la etapa aguda de la infección.



LIMITACIONES DEL MÉTODO

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. La técnica de ELISA, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico para infecciones por SARS-CoV-2. En relación a esto, el diagnóstico debe realizarse por qPCR u otro método que detecte un componente viral.

Un resultado no reactivo no excluye la posibilidad de exposición o infección por el virus SARS-CoV-2.

REFERENCIAS

- 1) Emergency response for evaluating SARS-CoV-2 immune status, seroprevalence and convalescent plasma in Argentina. Ojeda, D.S., González López Ledesma, M.M., Pallares, H.M., Costa Navarro, G.S., Sánchez, L., Perazzi, B., et al. (2021). PLoS Pathog 17(1): e1009161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009161>
- 2) A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S. et al. Nat Med 26, 1033–1036 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>.
- 3) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor Cell. (2020) Apr 16;181(2):271-280.

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162.

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com

www.lab-lemos.com

Autorizado por A.N.M.A.T. PM-1545-4

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Este producto es el resultado de un codesarrollo entre el CONICET, Fundación Instituto Leloir, Universidad de San Martín y Laboratorio Lemos S.R.L.

Industria Argentina