

Los cambios a la versión anterior se resaltan en

ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG)

Instrucciones de ensayo

Diagnóstico in vitro IVD

REFERENCIA	ANTICUERPOS CONTRA	CLASE IG	SUSTRATO	FORMATO
EI 2606-9601-10 G	SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)	IgG	Pocillos de microtitulación recubiertos de Ag	96 x 01 (96)



Uso previsto

El presente inmunoensayo enzimático (ELISA) sirve para la determinación in vitro cuantitativa de anticuerpos humanos de la clase de inmunoglobulina IgG contra SARS-CoV-2 en suero, plasma con EDTA, heparina o citrato o gotas de sangre seca (*dried blood spots*, DBS) para apoyar el diagnóstico de una infección por SARS-CoV-2 y constituye un complemento para la detección directa de patógenos. Además, la serología puede utilizarse para la recopilación de datos epidemiológicos así como para la determinación de anticuerpos tras la vacunación con vacunas basadas en S1/RBD. El producto está concebido para ser utilizado como IVD y, opcionalmente, el procesamiento puede realizarse en equipos totalmente automáticos.

Significación clínica

El *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2* (SARS-CoV-2, anteriormente 2019-nCoV) pertenece a la familia de los coronavirus y se clasifica como SARS-CoV en el género *Betacoronavirus* [1]. A finales de 2019 se identificó al SARS-CoV-2 como el patógeno causante de la frecuente neumonía de causa incierta. El virus desencadenó una oleada de infecciones que se propagó por todo el mundo rápidamente y, a principios de 2020, la OMS declaró la pandemia [2-5].

El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de infección por gotitas en el aire al toser o estornudar y por contacto directo con infectados [3-4, 6]. El personal sanitario y sus familiares pertenecen al grupo de personas especialmente vulnerables [6]. Los murciélagos parecen ser un reservorio zoonótico del virus [3, 4, 6].

El tiempo de incubación del SARS-CoV-2 es de 3 a 7, máximo 14 días [2]. Los síntomas de una neumonía por SARS-CoV-2 son fiebre, tos, dificultades para respirar, agotamiento y pérdida del sentido del gusto y del olfato [2-4, 6, 7]. En la mayoría de pacientes, la infección se manifiesta con síntomas de enfermedad con fiebre leve e infiltraciones pulmonares irregulares; sin embargo, una parte de los pacientes, sobre todo personas mayores y enfermos crónicos, desarrollan un síndrome de dificultad respiratoria aguda (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) [2, 3, 5, 6]. La enfermedad, causada por el SARS-CoV-2, fue denominada «COVID-19» en febrero de 2020 por la OMS.

Para diagnosticar una infección por SARS-CoV-2, los procedimientos más adecuados son la detección de ARN viral mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, RCP-TI (RT-PCR) o de proteína del virus en el ELISA o un test rápido, principalmente de materiales de muestra de las vías respiratorias superiores (frotis nasofaríngeo y orofaríngeo) y de las vías respiratorias inferiores (lavado broncoalveolar, secreciones traqueales, esputo, etc.) [4, 5]. La detección de los antígenos víricos es menos sensible que el test RCP-TI (RT-PCR).



La determinación de anticuerpos permite la confirmación de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas típicos y en casos sospechosos y contribuye a la supervisión y al control del brote [4, 5]. La proteína S (spike protein) y la proteína nucleocápside(N) del SARS-CoV-2 son altamente inmunogénicas. Más del 90% de los anticuerpos neutralizantes en los pacientes de COVID-19 están dirigidos contra dominios de unión de los receptores (RBD) de la proteína S. La proteína S es la proteína diana de casi todos las vacunas contra el COVID-19 [8].

Aproximadamente el 90% de los infectados por SARS-CoV-2 desarrollan anticuerpos específicos hasta el día 10 tras el inicio de los síntomas. Los IgG, IgA y IgM contra la proteína S aparecen con frecuencia de forma simultánea [8]. Para obtener resultados serológicos significativos, deben analizarse 2 muestras de paciente, una de la fase aguda (semana 1 de la enfermedad) y otra de la fase de convalecencia (de 3 a 4 semanas más tarde) [4, 6, 9]. Las células T específicas del SARS-CoV-2 aparecen algunos días después del comienzo de los síntomas. Se asocia una respuesta de células T específicas a una evolución leve de la COVID-19 [8].

Se han relacionado los anticuerpos neutralizantes con una inmunidad protectora contra una reinfección con SARS-CoV-2 o SARS-CoV; se han detectado anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV 17 años después de la infección. Las células T reactivas de SARS-CoV-2 forman parte del repertorio de células T de las personas que, en 2003, experimentaron una infección por SARS-CoV. Estas células proliferan tras el contacto con el SARS-CoV-2. Se encontraron células T con reacción cruzada en aproximadamente la mitad de las personas analizadas sin historial de SARS-CoV-2, presumiblemente debido a infecciones pasadas con coronavirus de resfriado. Esto indica una inmunidad duradera tras una infección por betacoronavirus [8, 10].

En la COVID-19, la memoria inmunológica es heterogénea: los anticuerpos específicos del virus, células B de memoria y células T presentan distinta intensidad y sus niveles se diferencian con una dinámica distinta. Los conocimientos hasta la fecha indican que la memoria de las células T y B y los anticuerpos tras una infección por SARS-CoV-2 persisten durante años en la mayoría de los casos [8].

Antígeno

Los pocillos de reactivo utilizados en este ELISA están recubiertos con un dominios S1 en la línea celular humana HEK 293 recombinante de la espina proteica del SARS-CoV-2.

Principios del ensayo

El envase de ensayo contiene tiras de microplaca, cada una con 8 pocillos de reactivo separables, recubiertos con dominio S1 representado de forma recombinante de la proteína S (spike protein) del SARS-CoV-2. En el primer paso del análisis, se incuban los pocillos de reactivo con muestras de pacientes diluidas. En el caso de muestras positivas, los anticuerpos IgG específicos (también IgA e IgM) se unen a los antígenos. Para detectar estos anticuerpos, se lleva a cabo una segunda incubación utilizando un anticuerpo anti-IgG humana marcado con una enzima (conjugado enzimático) que cataliza una reacción coloreada.



Materiales incluidos en este equipo

Componente	Color	Formato	Símbolo
1. Pocillos de reactivo recubiertos de antígeno 12 tiras de microplaca en marco de soporte, cada una con 8 pocillos de reactivo desprendibles, listas para usar	-	12 x 8	STRIPS
2. Calibrador 1 120 UR/ml (IgG, humana), listo para usar	Coloreado en rojo con intensidad decreciente	1 x 2,0 ml	CAL 1
3. Calibrador 2 80 UR/ml (IgG, humana), listo para usar		1 x 2,0 ml	CAL 2
4. Calibrador 3 40 UR/ml (IgG, humana), listo para usar		1 x 2,0 ml	CAL 3
5. Calibrador 4 20 UR/ml (IgG, humana), listo para usar		1 x 2,0 ml	CAL 4
6. Calibrador 5 10 UR/ml (IgG, humana), listo para usar		1 x 2,0 ml	CAL 5
7. Calibrador 6 1 UR/ml (IgG, humana), listo para usar		1 x 2,0 ml	CAL 6
8. Control positivo (IgG, humana), listo para usar	azul	1 x 2,0 ml	POS CONTROL
9. Control negativo (IgG, humana), listo para usar	verde	1 x 2,0 ml	NEG CONTROL
10. Conjugado enzimático IgG antihumana marcada con peroxidasa, listo para usar	verde	1 x 12 ml	CONJUGATE
11. Tampón de muestra listo para usar	azul claro	1 x 100 ml	SAMPLE BUFFER
12. Tampón de lavado concentrado 10x	incoloro	1 x 100 ml	WASH BUFFER 10x
13. Solución de cromógeno/sustrato TMB/H ₂ O ₂ , listo para usar	incoloro	1 x 12 ml	SUBSTRATE
14. Solución de parada 0,5 M de ácido sulfúrico, lista para usar	incoloro	1 x 12 ml	STOP SOLUTION
15. Lámina de recubrimiento	-	3 unidades	FOIL
16. Certificado de control de calidad	-	1 protocolo	-
17. Instrucciones de ensayo	-	1 folleto	-

Otros materiales y equipos necesarios (que no contiene el equipo de ensayo)

- Equipo de lavado de microplacas automático: recomendado. El lavado de microplacas puede también realizarse manualmente.
- Lector de microplacas: Longitud de onda 450 nm, rango de longitud de onda de 620 nm a 650 nm
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta
- Pipeta Stepper: recomendado para el pipeteo de soluciones de conjugado, sustrato y de parada
- Agua destilada o desionizada
- Incubador: para incubación de la microplaca a +37 °C
- Incubador o baño de agua: recomendado para calentar el tampón de lavado
- Cronómetro



Almacenamiento y estabilidad

El envase de ensayo debe almacenarse a una temperatura de entre +2 °C y +8 °C. ¡No congelar! Sin abrir, todos los componentes del equipo son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

Conservación una vez abierto

Una vez abiertos, los reactivos pueden conservarse hasta la fecha de caducidad indicada, siempre y cuando se almacenen a una temperatura de +2 °C a +8 °C y se protejan contra cualquier contaminación, si no se indica expresamente otra cosa en el siguiente texto.

Advertencias y medidas de precaución

- La aplicación debe ser realizado por personal de laboratorio formado en un laboratorio clínico o de investigación.
- En caso de daños visibles en los reactivos envasados, no utilizar el equipo de ensayo.
- Antes del uso del producto, deben leerse atentamente las instrucciones del ensayo. Debe utilizarse exclusivamente la versión vigente
- No mezclar ni intercambiar los reactivos de EUROIMMUN con reactivos de otros fabricantes.
- Respete las buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP) y las directivas de seguridad. Algunos de los reactivos contienen conservantes en una concentración no sujeta a declaración. Debe evitarse el contacto de las muestras y reactivos con los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos o la piel, lavar bien la zona afectada con agua. Quitarse la ropa contaminada y lavarla. En caso de ingesta, buscar asistencia médica.
- No se han detectado HBsAg ni anticuerpos contra VHC, VIH-1 y VIH-2 ni en los calibradores ni en los controles de origen humano. Sin embargo, todos los componentes del ensayo deberán ser tratados como potencialmente infecciosos y en consecuencia manipulados con cuidado.

Preparación y estabilidad de las muestras

- **Muestras:** Suero humano y plasma con EDTA, heparina o citrato, así como sangre capilar seca (*dried blood spots*, DBS), recogidos con la tarjeta de muestra de sangre de EUROIMMUN (referencia EUROIMMUN: ZV 9711-01100)
- **Preparación de la prueba:** Las **muestras de pacientes** a analizar se diluyen en la proporción **1:101** con el tampón de muestra.

Ejemplo: Añada 10 µl de muestra a 1,0 ml de tampón de muestra y mezcle bien con un vórtex. No es conveniente mezclar con la pipeta de muestreo.

Si se utilizan gotas de sangre seca (DBS), estas deben extraerse de la membrana de la tarjeta de muestra de sangre antes de la incubación de la muestra. Las instrucciones necesarias para la extracción (N.º de documento EUROIMMUN: EI_2606-10G_A_ES_ZXX) están disponibles en el portal de clientes (<https://products.euroimmun.de>).

- **Estabilidad de las muestras de pacientes:**
 - Almacenadas a entre +2 °C y +8 °C: hasta 14 días
 - Incubar las muestras diluidas el mismo día que se preparan



Preparación y estabilidad de los reactivos

Nota: Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (de +18 °C a +25 °C) aproximadamente 30 minutos antes de su uso.

El incubador ELISA regulable termostáticamente debe ajustarse a +37 °C ± 1 °C.

- **Pocillos de reactivo recubiertos:** Listo para usar. Abra el envoltorio protector resellable de la microplaca por las muescas situadas por encima de la costura de cierre. Para evitar que los preparados se humedezcan, no abra el envoltorio protector hasta que el contenido haya alcanzado la temperatura ambiente. Vuelva a introducir inmediatamente en el envoltorio protector los pocillos de reactivo no utilizados de una microplaca empezada y ciérrelo herméticamente mediante la costura de cierre integrada (no retirar la bolsa estanca).
Una vez abierto el envoltorio protector, los pocillos de reactivo recubiertos de antígeno pueden conservarse hasta 4 meses si se almacenan en seco a entre +2 °C y +8 °C.
- **Calibradores y controles:** Listo para usar. Los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso.
- **Conjugado enzimático:** Listo para usar: El reactivo debe mezclarse bien antes de su uso.
- **Tampón de muestra:** Listo para usar.
- **Tampón de lavado:** El tampón de lavado se suministra en una concentración 10x. En caso de que aparezcan cristales de sal en el tampón concentrado, calentar el tampón a +37 °C y mezclarlo bien antes de diluirlo. El volumen necesario debe diluirse con agua desionizada o destilada en la proporción 1:10 (1 parte de reactivo y 9 partes de agua).
Ejemplo: Para una tira de microplaca, 5 ml de concentrado y 45 ml de agua.
El tampón de lavado diluido listo para usar es estable durante 4 semanas cuando se almacena entre +2°C y +8°C y se manipula adecuadamente.
- **Solución de cromógeno/sustrato:** Listo para usar. Cerrar el pocillo inmediatamente tras su uso, pues la solución es sensible a la luz. La solución de sustrato/cromógeno debe ser transparente; si antes del uso ya presenta una coloración azulada, no debe utilizarse.
- **Solución de parada:** Listo para usar.

Eliminación

Las muestras de pacientes, los calibradores, los controles y las tiras de microplaca incubadas deben manipularse como desechos infecciosos. Todos los reactivos deben desecharse conforme a las normativas legales.

Control de calidad

Para todos los grupos de ensayos realizados, las extinciones de los calibradores y las unidades relativas de los controles positivo y negativo deben estar dentro de las tolerancias establecidas para el lote. Se incluye un certificado de control de calidad que contiene estos datos. Si los controles no cumplen estos requisitos, los resultados del ensayo pueden ser imprecisos y deberá repetirse el ensayo.

Material de referencia

Los resultados del ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) se indican en forma de unidades relativas (UR/ml). No obstante, el retorno al primer estándar internacional de la OMS (First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin NIBSC code 20/136) es posible mediante un factor de conversión. La preparación contiene, según la definición, 250 UI o BAU (Binding Antibody Units) por ampolla y se ha disuelto en 250 µl de agua dest. La indicación se refiere al contenido de inmunoglobulina total y debe considerarse siempre en relación con una clase de inmunoglobulina concreta y una estructura objetivo antigénica concretas.



Realización del ensayo

Realización (parcialmente) manual del ensayo

Incubación de muestras: (1^{er} paso) Conforme al esquema de pipeteo, agregar a cada pocillo de reactivo **100 µl de calibradores, control positivo y negativo o muestras de pacientes diluidas**. Incubar durante **60 minutos a +37 °C ± 1 °C**.

En caso de realización manual del ensayo, es preciso cubrir los pocillos de reactivo con la lámina suministrada. En caso de realización automática del ensayo, se deben seguir las instrucciones específicas del fabricante del equipo automático.

Lavado: Manual: Retirar la lámina de recubrimiento. Vaciar los pocillos de reactivo y a continuación lavarlos **3 veces, utilizando cada vez 300 µl de tampón de lavado diluido listo para usar**.

Automático: Retirar la lámina de recubrimiento. Lavar cada pocillo **3 veces con 450 µl de tampón de lavado diluido listo para usar** (ajuste del programa: p. ej., TECAN Columbus Washer «Overflow Mode»).

Dejar actuar el tampón de lavado en cada pocillo de reactivo entre 30 y 60 segundos por cada ciclo de lavado y, a continuación, aspirar o vaciar. Tras el proceso de lavado, tanto en la ejecución manual como en la automática, sacudir enérgicamente la microplaca con las aberturas hacia abajo sobre papel absorbente para eliminar por completo los restos de tampón de lavado.

Atención:

Las posiciones libres dentro de la tira de microplaca deben ocuparse con pocillos vacíos con el mismo formato de placa que el del parámetro a analizar.

Incubación del conjugado: (2^{er} paso) Añadir con la pipeta **100 µl de conjugado enzimático** (IgG antihumana marcada con peroxidasa) en cada pocillo de reactivo. Incubar durante **30 minutos a +37 °C ± 1 °C**.

En caso de realización manual del ensayo, es preciso cubrir los pocillos de reactivo con la lámina suministrada.

Lavado: Retirar la lámina de recubrimiento. Vaciar los pocillos de reactivo. Lavar según se ha descrito anteriormente.

Incubación del sustrato: (3^{er} paso) Añadir **100 µl de la solución de cromógeno/sustrato** en cada pocillo de reactivo con la pipeta. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (entre +18 °C y +25 °C; proteger de la exposición directa a la luz solar).

Parada: Añadir **100 µl de la solución de parada** en cada pocillo con la pipeta, en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se agregó previamente la solución de cromógeno/sustrato.

Medición: La **medición fotométrica** de la intensidad del color debe realizarse **a una longitud de onda de medición de 450 nm** y una longitud de onda de referencia de entre 620 nm y 650 nm, **dentro de los 30 primeros minutos después de añadir la solución de parada**. Antes de realizar la medición, agitar ligeramente la microplaca para asegurar la distribución homogénea de la solución colorante.

Realización del ensayo mediante equipos de análisis totalmente automáticos

La dilución de las muestras y la posterior realización del ensayo tienen lugar de forma totalmente automática mediante un equipo de análisis. Las condiciones de incubación programadas en el software autorizado por EUROIMMUN pueden diferir ligeramente respecto de las especificaciones contenidas en las instrucciones del ensayo ELISA, pero han sido validadas en combinación con el EUROIMMUN Analyzer I, el EUROIMMUN Analyzer I-2P, la EUROLabWorkstation ELISA, el Sprinter XL o el DSX de la marca Dynex y el presente ELISA de EUROIMMUN. Puede solicitarse una documentación de validación.



Nota: El procesamiento en otros sistemas totalmente automáticos es posible, pero el usuario mismo debe validarlos.

Esquema de pipeteo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 1	P 1	P 9	P 17								
B	C 2	P 2	P 10	P 18								
C	C 3	P 3	P 11	P 19								
D	C 4	P 4	P 12	P 20								
E	C 5	P 5	P 13	P 21								
F	C 6	P 6	P 14	P 22								
G	pos.	P 7	P 15	P 23								
H	neg.	P 8	P 16	P 24								

El esquema de pipeteo especificado para las tiras de microplaca 1 a 4 es un ejemplo de **análisis cuantitativo** de 24 muestras de pacientes (P 1 a P 24).

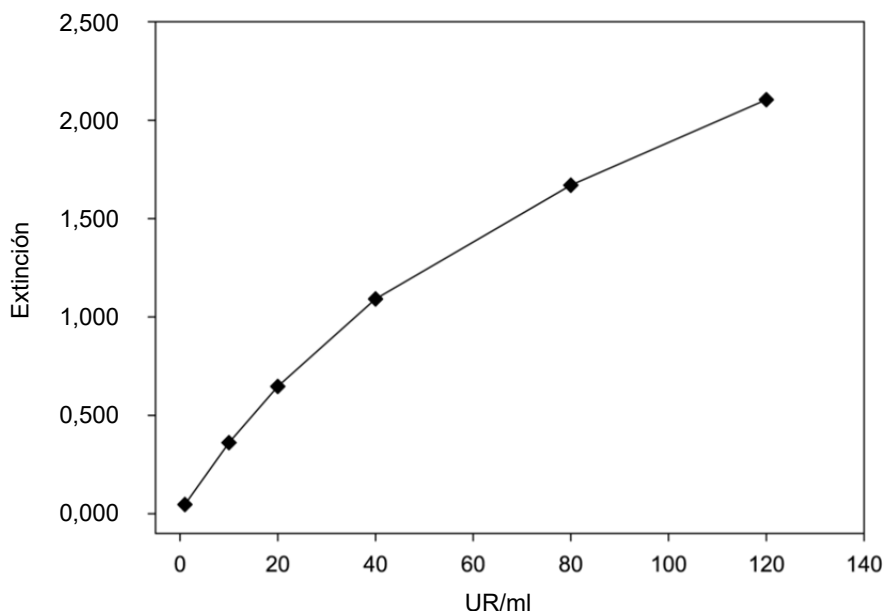
Los calibradores (C 1 a C 6), los controles positivo (pos.) y negativo (neg.) y las muestras de los pacientes se han utilizado en una sola determinación. La fiabilidad del ensayo puede incrementarse mediante la determinación por duplicado de cada muestra.

Los pocillos pueden ser desprendidos individualmente de cada tira de microplaca: Esto permite ajustar el número de sustratos usados para el ensayo al número de muestras a examinar, y evitar así el desperdicio de reactivos.

Los controles positivo y negativo sirven como comprobación interna de la fiabilidad del desarrollo del ensayo. Deben utilizarse en cada ensayo.

Interpretación de los resultados

Una vez trazados los valores de extinción medidos para los 6 calibradores contra las concentraciones correspondientes (lineal/lineal), se puede obtener una curva estándar que permite determinar la concentración de anticuerpos en las muestras desconocidas. Para el cálculo por ordenador de la curva estándar, se debería escoger el método de evaluación «punto a punto». La siguiente figura representa un ejemplo típico de una curva estándar. No utilice esta curva para la determinación de la concentración de anticuerpos en las muestras de pacientes.





Si la extinción de una muestra de paciente se sitúa por encima de la del calibrador 1 (120 UR/ml o 384 BAU/ml), el resultado debe indicarse como «> 384 UR/ml» o «>384 BAU/ml». En estos casos, se recomienda reanalizar esa muestra a una dilución de p. ej., 1 : 1010. El resultado en UR/ml obtenido a partir de la curva estándar deberá multiplicarse posteriormente por un factor de dilución de 10. En especial después de la vacunación con vacunas basadas en S1/RBD, pueden aparecer concentraciones muy altas de anticuerpos que requieren una dilución considerablemente más elevada para alcanzar el rango de medición lineal.

EUROIMMUN recomienda interpretar los resultados de la siguiente manera:

<8 UR/ml:	negativo
de ≥8 a <11 UR/ml:	dudoso
≥11 UR/ml:	positivo

En caso de determinaciones duplicadas, se deberá usar el promedio para los cálculos. Si los resultados de una determinación duplicada difieren considerablemente entre sí, EUROIMMUN recomienda reanalizar la muestra.

Conversión del resultado a unidades internacionales (*Binding Antibody Units*, BAU/ml)

Debido a la correlación lineal de los resultados en unidades relativas (UR/ml) con el «primer estándar internacional de la OMS», la evaluación de la muestra cuantitativa puede convertirse a unidades estandarizadas. Según las indicaciones de la OMS, para ello hay que utilizar UI/ml (UI = unidades internacionales) en relación con la detección de anticuerpos neutralizantes o BAU/ml (BAU = *Binding Antibody Units*) en ensayos de unión de ligandos como el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG), en los que los datos en UI/ml y BAU/ml son numéricamente idénticos. Para convertir resultados de ensayos, así como rangos de medición y rangos de valores límite que están indicados en UR/ml a BAU/ml, los valores respectivos deben multiplicarse por el factor 3,2. De ello resulta la siguiente interpretación de los resultados:

< 25,6 BAU/ml:	negativo
de ≥ 25,6 a < 35,2 BAU/ml:	dudoso
≥ 35,2 BAU/ml:	positivo

La aplicación del factor de conversión se representa en la siguiente tabla a modo de ejemplo:

	Evaluación en UR/ml		x 3,2	Evaluación en BAU/ml	
rango dudoso	8 – 11			25,6 – 35,2	
Calibrador 5 (punto de corte)	10			32	
Rango de medición	1 – 120			3,2 – 384,0	
	UR/ml	Evaluación	BAU/ml	Evaluación	
Muestra 1	< 1 (< mín.)	<i>negativo</i>	< 3,2 (< mín.)	<i>negativo</i>	
Muestra 2	5,5	<i>negativo</i>	17,6	<i>negativo</i>	
Muestra 3	10,1	<i>dudoso</i>	32,3	<i>dudoso</i>	
Muestra 4	25,0	<i>positivo</i>	80,0	<i>positivo</i>	
Muestra 5	108,8	<i>positivo</i>	348,2	<i>positivo</i>	
Muestra 6	> 120 (> máx.)	<i>positivo</i>	> 384 (> máx.)	<i>positivo</i>	

Características de rendimiento analíticas

Se recopilaron los siguientes datos con muestras de suero o plasma:

Sensibilidad de detección:

Límite del blanco inferior/Limit of Blank (LoB): 0,86 UR/ml

Límite de detección inferior/Limit of Detection (LoD): 1,20 UR/ml

LoB y LoD se determinaron según los requisitos de la directiva EP17-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, <https://clsi.org/>).



Precisión: Se realizaron estudios de precisión intralaboratorio según la directiva EP05-A3 del CLSI. Se analizaron 6 muestras (reactividad distribuida en todo el rango de medición). La precisión se indica en forma de desviación estándar (SD) y coeficientes de variación (CV).

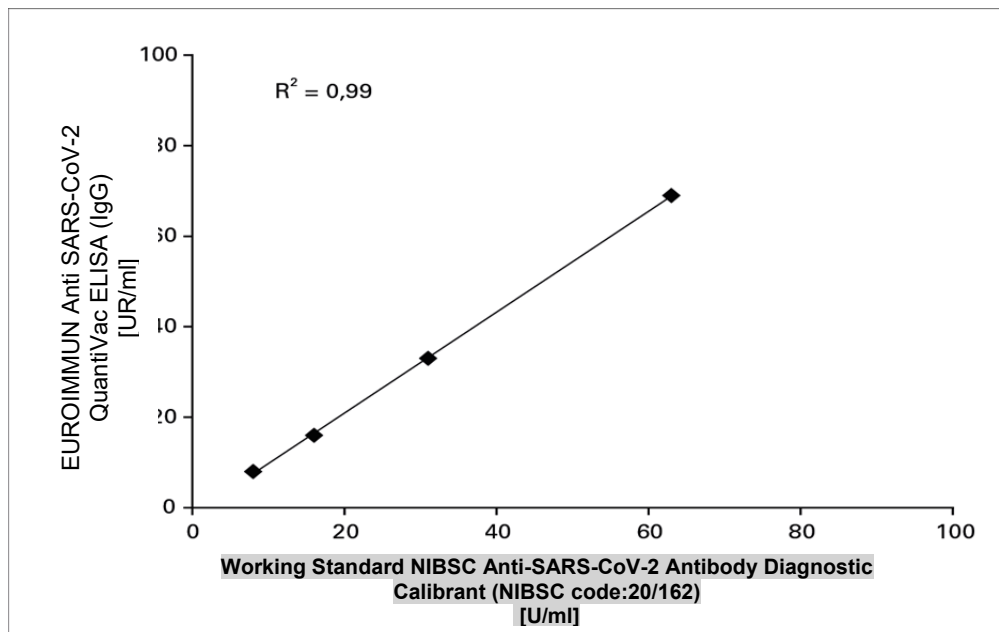
Precisión intralaboratorio

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Muestra 6	
Promedio	2,53 UR/ml		7,63 UR/ml		10,24 UR/ml		10,23 UR/ml		30,03 UR/ml		91,93 UR/ml	
	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
<i>Repetibilidad</i>	0,226	9,0%	0,266	3,5%	0,326	3,2%	0,270	2,6%	0,709	2,4%	4,220	4,6%
<i>Entre series</i>	0,350	13,9%	0,578	7,6%	0,749	7,3%	0,983	9,6%	2,533	8,4%	5,311	5,8%
<i>El mismo día</i>	0,417	16,5%	0,637	8,3%	0,817	8,0%	1,020	10,0%	2,630	8,8%	6,784	7,4%
<i>Entre días</i>	0,311	12,3%	0,000	0,0%	0,578	5,6%	0,000	0,0%	0,000	0,0%	2,142	2,3%
<i>Dentro del laboratorio</i>	0,520	20,6%	0,637	8,3%	1,000	9,8%	1,020	10,0%	2,630	8,8%	7,114	7,7%

Linealidad: La linealidad del ELISA Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac-ELISA (IgG) se determinó según los requisitos de la directiva EP06-A del CLSI. El ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) es lineal por lo menos en el rango de concentración analizado (6 UR/ml a 120 UR/ml).

Estudio I: Correlación con el patrón de trabajo, Working Standard NIBSC Anti-SARS-CoV-2 Antibody Diagnostic Calibrant (código NIBSC: 20/162)

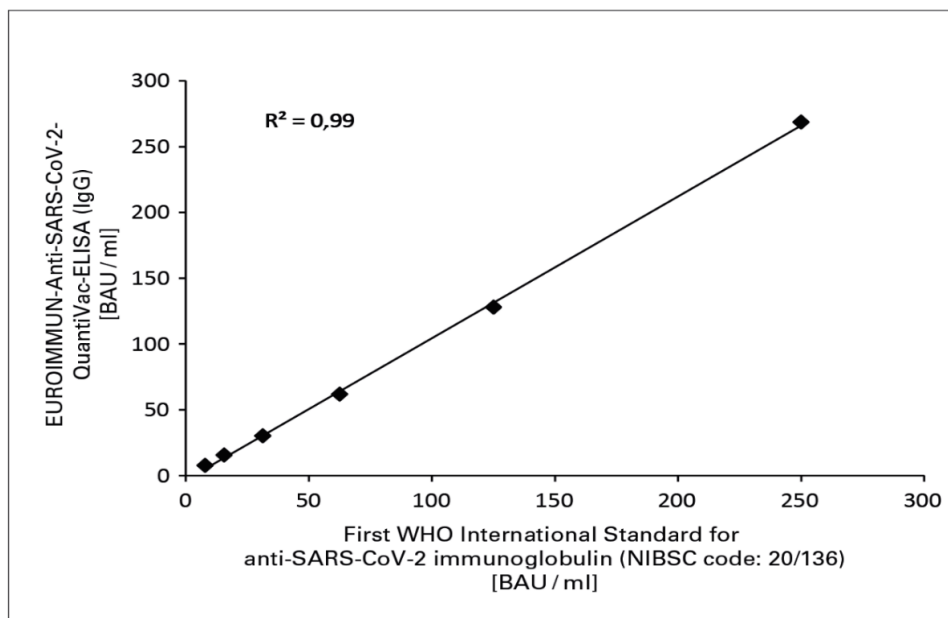
Se analizaron diluciones seriadas del Working Standard NIBSC Anti-SARS-CoV-2 Antibody Diagnostic Calibrant (código NIBSC: 20/162) con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG). El análisis de correlación arrojó un coeficiente de correlación de $r = 0,99$.





Estudio II: Correlación con el primer estándar internacional de la OMS para inmunoglobulina contra SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/136)

Se analizaron diluciones seriadas del «primer estándar internacional de la OMS para inmunoglobulina contra SARS-CoV-2» (código NIBSC: 20/136) con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG). Las concentraciones resultantes en UR/ml se convirtieron a BAU/ml mediante la multiplicación con el factor 3,2. El análisis de correlación arrojó un coeficiente de correlación de $r = 0,99$.



Reactividad cruzada (especificidad analítica): Debido a la poca similitud de la proteína S1 dentro de la familia de los coronavirus, están casi descartadas las reacciones cruzadas con la mayoría de representantes patogénicos para los humanos de esta familia de virus. Se analizaron 163 muestras obtenidas antes de la aparición del SARS-CoV-2 (antes de enero 2020) y que tenían anticuerpos de al menos un coronavirus patógeno para los humanos (HCoV HKU1; HCoV OC43; HCoV NL63; HCoV 229-E) con el ELISA Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG). Se observaron reacciones positivas solo en el 1,2% de los análisis (2 muestras). Por consiguiente, las reacciones cruzadas con este HCoV endémico son improbables. No obstante, las reacciones cruzadas entre SARS-CoV(-1) y SARS-CoV-2 son probables a causa de su estrecho parentesco.

Anticuerpos contra	n (positivo) / n/total)	ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac IgG de EUROIMMUN Tasa positiva [%]
HCoV	2/163	1,2

No se observaron otras posibles interferencias con autoanticuerpos como anticuerpos antimitocondriales (AMA), factores reumatoides (FR) y anticuerpos contra estructuras no emparentadas como *Haemophilus influenzae* de tipo B (HIB), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus sincitial respiratorio (VSR), virus paragripales, virus Epstein-Barr (VEB), así como anticuerpos de vacunas contra virus gripales y contravirus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE). En muestras de pacientes con títulos elevados de anticuerpos contra adenovirus y enterovirus, con anticuerpos muy elevados contra diversos autoantígenos y con neumonías bacteriológicas graves se pudo medir una reacción positiva débil en muy pocos casos aislados. Sin embargo, se descarta una interferencia general como el motivo de la frecuencia tan reducida.



Grupo	n (positivo) / n (total)	Tasa positiva [%]
HIB	0/5	0
VHB	0/6	0
VHC	0/6	0
Vacuna contra la gripe	0/40	0
TBE	0/25	0
VSR	0/35	0
Adenovirus	1/30	3,3
Virus paragripales	0/30	0
Enterovirus	1/30	3,3
VEB	0/22	0
aAc	1/40	2,5
AMA	0/19	0
FR	0/40	0
Neumonía bacteriana aguda	1/58	1,7

Interferencias: Las muestras hemolíticas, lipémicas e ictericas no revelaron interferencias en este ensayo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml de hemoglobina, 20 mg/ml de triglicéridos y de 0,4 mg/ml de bilirrubina. Las muestras con otras sustancias con posibilidad de interferencia en concentraciones de hasta 60 g/l de albumina, 13 mmol/l de colesterol, 3510 ng/ml de biotina y 2,0 mg/ml de IgA, IgG e IgM humanos tampoco influyeron en el resultado de este ELISA. En este ELISA, los fármacos habituales en concentraciones de hasta 200 mg/l de paracetamol, 900 mg/l de aspirina, 500 mg/l de ibuprofeno y 150 mg/l acetilcisteína no influyeron en el resultado del ensayo.

Se recopilaron los siguientes datos con muestras de gotas de sangre seca (DBS):

Precisión: Se analizaron 6 muestras (reactividad distribuida en todo el rango de medición). Los datos se determinaron en 20 días, en dos ensayos por día con dos réplicas. Cada réplica se generó a partir de una extracción independiente de una gota de sangre seca. La precisión se indica en forma de desviación estándar (SD) y coeficientes de variación (CV). Precisión intralaboratorio

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Muestra 6	
Promedio	88,29 UR/ml		55,78 UR/ml		8,90 UR/ml		9,97 UR/ml		1,68 UR/ml		11,48 UR/ml	
	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
<i>Repetibilidad</i>	8,888	10,1%	5,332	9,6%	0,832	9,4%	0,787	7,9%	0,340	20,3%	1,163	10,1%
<i>Entre series</i>	7,652	8,7%	3,709	6,6%	0,625	7,0%	0,481	4,8%	0,096	5,7%	0,487	4,2%
<i>El mismo día</i>	11,728	13,3%	6,495	11,6%	1,041	11,7%	0,922	9,2%	0,354	21,1%	1,261	11,0%
<i>Entre días</i>	0,589	0,7%	2,023	3,6%	0,409	4,6%	0,599	6,0%	0,197	11,7%	0,867	7,5%
<i>Dentro del laboratorio</i>	11,743	13,3%	6,803	12,2%	1,118	12,6%	1,099	11,0%	0,405	24,1%	1,530	13,3%

Linealidad: La linealidad del ELISA Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac-ELISA (IgG) se determinó según los requisitos de la directiva EP06-A del CLSI. El ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) es lineal por lo menos en el rango de concentración analizado (6 UR/ml a 80 UR/ml).



Comparación de métodos:

Estudio I: Para la determinación de la correlación al utilizar extractos de gotas de sangre seca (*dried blood spots*; DBS) y plasma de sangre venosa, se analizaron 20 muestras de sangre total inoculadas y seis muestras de pacientes (procedencia: Europa, EE. UU.) con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG). Para cada uno de los seis pacientes, se aporta una muestra de sangre capilar y una muestra de sangre venosa extraída. En el caso de las muestras inoculadas, se analizó la sangre total en comparación con el plasma de la sangre venosa.

La concordancia de los resultados del análisis de las gotas de sangre capilar seca y las muestras de sangre venosa fue del 100% (concordancia positiva [PPA]: 100%; concordancia negativa (NPA): 100%). Los resultados dudosos no se tuvieron en cuenta para el cálculo.

n = 26		EUROIMMUN: ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) Plasma de sangre venosa		
		positivo	dudoso	negativo
EUROIMMUN: ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG), DBS	positivo	14	0	0
	dudoso	0	1	2
	negativo	0	0	9

Características de rendimiento clínicas

Sensibilidad diagnóstica (prevalencia):

Para determinar la sensibilidad diagnóstica, se analizaron muestras de pacientes con infección por SARS-CoV-2 detectada. La sensibilidad indicada a continuación corresponde, por tanto, a la prevalencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 en infectados por COVID-19.

Para la determinación de la sensibilidad, se analizaron con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) 202 muestras de 194 pacientes (procedencia: Europa, EE. UU.) en los cuales se confirmó una infección por SARS-CoV-2 con una muestra de la fase temprana de la infección mediante un ensayo RCP-TI (RT-PCR). El análisis serológico se realizó con muestras tomadas en el curso posterior de la infección. En las muestras tomadas hasta el día 10 (momento del inicio de los síntomas o detección directa del patógeno positiva), el ELISA Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) mostró una sensibilidad del 56,7%. La sensibilidad de las muestras que fueron tomadas tras el día 10 fue del 90,3% para el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG). Los resultados dudosos (n = 7) no se tuvieron en cuenta para el cálculo.

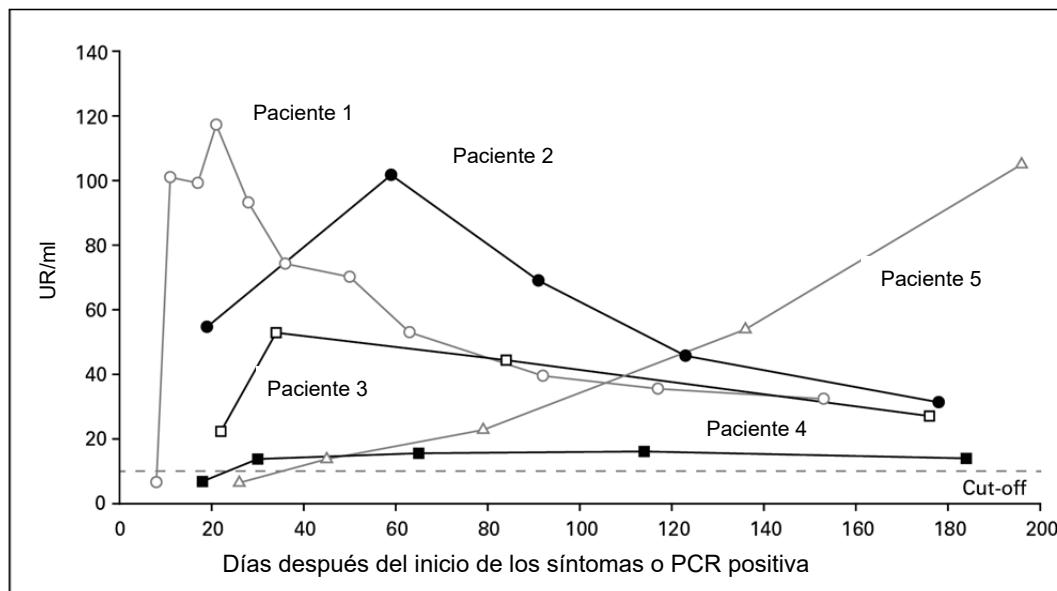
Días tras el inicio de los síntomas o detección directa del patógeno	EUROIMMUN: ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG)		
	positivo	negativo	Sensibilidad
≤ 10	17	13	56,7%
> 10	149	16	90,3%

De 46 pacientes, en los cuales se confirmó una infección por SARS-CoV-2 con una muestra de la fase temprana de la infección mediante un ensayo RCP-TI (RT-PCR), había varias muestras de evolución. La detección de anticuerpos falló durante la evolución en el 93,2% de los pacientes tras ≥ 21 días del inicio de los síntomas o la detección directa del patógeno positiva.

Días tras el inicio de los síntomas o detección directa del patógeno	ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) de EUROIMMUN			
	positivo	dudoso	negativo	Sensibilidad
≥ 21	41	2	3	93,2%



La evolución temporal de la formación de anticuerpos y la actividad de dichos anticuerpos pueden variar considerablemente en momentos determinados. En la mayoría de pacientes, los anticuerpos son detectables a los 10 días tras el inicio de los síntomas o la detección directa del patógeno positiva. En casos aislados, se registró una síntesis muy retardada de IgG (>4 semanas tras el inicio de los síntomas o la detección directa del patógeno positiva). El gráfico muestra las respuestas inmunes individuales en pacientes de COVID-19 determinadas con el ELISA Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) de EUROIMMUN.



Especificidad: Para la evaluación de la especificidad del ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG), se analizaron 210 sueros de pacientes que arrojaron resultados positivos para anticuerpos contra otros coronavirus patógenos para los humanos, otros patógenos o factores reumatoides, así como 230 muestras de donantes asintomáticos y sintomáticos que se tomaron durante el brote de virus del Zika en Colombia. Además, se analizaron 1018 muestras de donantes de sangre, niños y embarazadas que se tomaron antes de la aparición del SARS-CoV-2 (antes de enero de 2020). Los resultados en el rango de valores límite (n = 5) no se tuvieron en cuenta para el cálculo de la especificidad. De ello resulta una especificidad del ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) del 99,8%.

Colectivo	n	ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) de EUROIMMUN
		Especificidad
Donantes de sangre	849	99,9%
Embarazadas	99	99,0%
Niños	70	100,0%
Pacientes mayores	97	100,0%
Donantes asintomáticos durante el brote del virus del Zika 2015/16 (Colombia)	150	100,0%
Donantes sintomáticos durante el brote del virus del Zika 2015/17 (Colombia)	80	98,7%
Infecciones por otros coronavirus patógenos para los humanos	11	100,0%
Gripe (vacunado recientemente incl. evoluciones)	40	100,0%
Infección aguda por VEB y anticuerpos heterófilos	22	100,0%
Factores reumatoides	40	100,0%
Total	1458	99,8%



Correlación con prueba de neutralización (NT):

Estudio I:

Se analizaron 109 muestras de un grupo mezclado (25 muestras de donantes de sangre sanos, obtenidas antes de enero de 2020, y 84 muestras de pacientes con infección por SARS-CoV-2 confirmada ocurrida hace tiempo) con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) de EUROIMMUN y un sucedáneo de NT disponible comercialmente. La concordancia de los resultados cualitativos de ambos ensayos fue del 98,2%.

n = 109		el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG)	
		positivo	negativo
Sucedáneo de NT comercial	positivo	81	2
	negativo	0	26

Estudio II:

Se analizaron 74 muestras de pacientes con infección por SARS-CoV-2 confirmada ocurrida hace tiempo) con el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG) de EUROIMMUN y una PRNT₅₀ (prueba de neutralización en placa según Wölfel et al. 2020). La concordancia de los resultados cualitativos de ambos ensayos fue del 97,3%.

n = 74		el ELISA Anti SARS-CoV-2 QuantiVac (IgG)	
		positivo	negativo
SARS-CoV-2- PRNT ₅₀	positivo	71	0
	negativo	2	1

Limitaciones del procedimiento

- Para el diagnóstico médico, debe tenerse siempre en cuenta, además del resultado del ensayo serológico, el cuadro clínico del paciente y otros resultados, p. ej., los de la detección directa de patógenos.
- Un resultado del ensayo serológico negativo no descarta la enfermedad. Sobre todo en una fase temprana de la infección, puede que todavía no haya anticuerpos presentes o que todavía no lo estén en una cantidad detectable. Si se obtiene un resultado dudoso, no es posible una evaluación inequívoca. En caso de que exista sospecha clínica y se obtenga un resultado serológico negativo o dudoso, se recomienda el esclarecimiento por medio de otros métodos diagnósticos y/o el análisis serológico de una segunda muestra. Un resultado positivo indica el contacto con un agente patógeno. En la determinación de anticuerpos IgM específicos de agentes patógenos, los estímulos policlonales del sistema inmunitario o las persistencias de anticuerpos constituyen interferencias que pueden limitar el valor diagnóstico de los resultados positivos. Los niveles elevados significativos de anticuerpos IgG específicos (incremento superior al factor 2) y/o una seroconversión en una segunda muestra tomada al cabo de entre 7 y 10 días como mínimo, pueden interpretarse como un indicio de una infección aguda. La muestra y la segunda muestra deberían incubarse paralelamente en cavidades adyacentes de la microplaca del ELISA en la misma serie de ensayo.
- Los volúmenes de pipeteo, tiempos de incubación, temperaturas y pasos de preparación indicados deben seguirse conforme a las instrucciones del ensayo.
- La obtención y la preparación correctas de las muestras son decisivas para los resultados del ensayo.
- El sistema de ensayo está validado exclusivamente para la detección de IgG contra SARS-CoV-2 en suero, plasma o gotas de sangre seca humanos.



- Tanto el comportamiento de enlace de los anticuerpos como la actividad de la enzima usada dependen de la temperatura. Es recomendable utilizar un incubador ELISA con regulación térmica para todos los pasos de incubación. Cuanto mayor sea la temperatura ambiente durante las incubaciones, mayores serán también los valores de extinción. Estas variaciones también afectan a los tiempos de incubación. Sin embargo, los calibradores están sometidos también a las mismas influencias y, por tanto, estas variaciones se compensan al final en el cálculo de los resultados.
- Un lavado insuficiente (p. ej., menos de 3 ciclos de lavado, volumen insuficiente de tampón de lavado o tiempos de acción demasiado cortos) puede dar lugar a valores de extinción falsamente elevados.
- Los restos de líquido (>10 µl) que permanezcan en los pocillos de reactivo tras el proceso de lavado pueden influir en la conversión del sustrato y dar lugar a valores de extinción falsamente bajos.
- La adaptación parcial o total del sistema de ensayo a la utilización en aparatos para el procesamiento automático de las muestras u otros equipos de «manipulación de líquidos» puede causar diferencias entre los resultados obtenidos mediante el aparato automático y los obtenidos manualmente. Cada usuario es responsable de validar los equipos automáticos que utiliza para que proporcionen resultados de ensayo que se hallen dentro de un marco fiable.









Literatura

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2.** Nat Microbiol. 2020; 5(4): 536-44
2. Borges do Nascimento IJ, von Groote TC, O'Mathúna DP, Abdulazeem HM, Henderson C, et al. International Task Force Network of Coronavirus Disease 2019 (InterNetCOVID-19). **Clinical, laboratory and radiological characteristics and outcomes of novel coronavirus (SARS-CoV-2) infection in humans: A systematic review and series of meta-analyses.** PLoS One. 2020; 15(9): e0239235
3. Gralinski LE, Menachery VD. **Return of the Coronavirus: 2019-nCoV.** Viruses 2020, 12(2), 135
4. Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. **Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection.** ACS Nano. 2020 Apr 9.
5. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. **Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review.** Ann Intern Med. 2020; 172(11): 726-34
6. Xiao SY, Wu Y, Liu H. **Evolving status of the 2019 novel coronavirus Infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring.** J Med Virol. 2020; 92(5): 464-7
7. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siaty DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, et al. **Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study.** Eur Arch Otorhinolaryngol. 2020; 277(8): 2251-61
8. Sette A, Crotty S. **Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19.** Cell. 2021; 184(4): 861-80
9. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurts van Kessel CH, Corman VM, et al. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients.** Emerg Infect Dis. 2020; 26(7)
10. Swadling L, Maini MK. **T cells in COVID-19 - united in diversity.** Nat Immunol. 2020; 21(11): 1307-8

Ayuda técnica

Si tiene problemas técnicos, póngase en contacto con nosotros a través de nuestro sitio web <https://www.euroimmun.de/en/contact/>.

Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación	Símbolo	Explicación
STRIPS	Tiras de microplaca	STOP SOLUTION	Solución de parada
CAL 1-6	Calibradores 1 a 6	FOIL	Lámina de recubrimiento
CAL 1	Calibrador 1	IVD	Diagnóstico in vitro
CAL 2	Calibrador 2	LOT	Denominación del lote
CAL 3	Calibrador 3		Protegerlo de la luz solar
CAL 4	Calibrador 4		Temperatura de almacenamiento
CAL 5	Calibrador 5		Sin abrir, utilizable hasta (AAAA-MM-DD)
CAL 6	Calibrador 6	CE	Marcado CE
POS CONTROL	Control positivo		Fecha de fabricación (AAAA-MM-DD)
NEG CONTROL	Control negativo		Fabricante
CONJUGATE	Conjugado		Consultar el manual de instrucciones.
SAMPLE BUFFER	Tampón de muestra	REF	Referencia
WASH BUFFER 10x	Tampón de lavado, concentrado 10x		Contenido suficiente para <n> pruebas
SUBSTRATE	Sustrato		Riesgos biológicos