

Anti-IgG / COVID-19 ELISA

Para la detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2

Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.

Almacenamiento de 2 a 8 °C.



Contenido

1.	Uso deseado	3
2.	Resumen	3
3.	Principio de la prueba	3
4.	Reactivos y materiales suministrados.....	4
5.	Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados	4
6.	Almacenamiento y preparación de muestras.....	4
7.	Almacenamiento y estabilidad del kit	5
8.	Preparación de reactivos suministrados	5
9.	Procedimiento del ensayo	6
10.	Control de calidad.....	7
11.	Resultados esperados.....	7
12.	Limitaciones del procedimiento.....	7
13.	Características de desempeño	8
14.	Precauciones y seguridad	9
15.	Resumen del procedimiento de la prueba	10
16.	Referencias	12
17.	Fecha de emisión	12
18.	Simbología utilizada	13

Este kit es fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.

1. Uso deseado

El kit Anti-IgG/COVID-19 ELISA, para la detección cualitativa de anticuerpos de clase IgG contra la proteína de espiga S-ECD (proteína recombinante S1+S2) del virus SARS-CoV-2 en suero y plasma humano.

"Solo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico".

2. Resumen

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una pandemia en curso causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). El primer caso conocido de COVID-19 se identificó en diciembre de 2019 y actualmente se ha extendido por todo el mundo [1].

Hasta la fecha, no existe un fármaco antiviral suficientemente eficaz para tratar COVID-19. Por lo tanto, el desarrollo de ensayos serológicos confiables es crucial, además, estos ensayos evalúan la eficacia de las vacunas aprobadas actualmente midiendo el nivel de anticuerpos producidos, determinando su durabilidad e identificando umbrales de protección [2].

El SARS-CoV-2 cuenta con cuatro proteínas estructurales principales: espiga (S), envoltura (E), nucleocápside (N), proteínas de membrana (M). La glucoproteína S juega un papel relevante en la infección de las células huésped y en su capacidad de transmisión. Es una proteína transmembrana, comprende dos subunidades responsables de la unión al receptor de la célula huésped (subunidad S1) y la fusión de la membrana viral y celular (subunidad S2) [3]. La glucoproteína de superficie de pico (S) es el objetivo antigénico principal para la mayoría de las vacunas y anticuerpos monoclonales (mAb) actualmente en desarrollo o en ensayos clínicos en todo el mundo [4]. El dominio extracelular de la proteína S (S-ECD, formado por los dominios S1 y S2) es blanco importante para la generación de anticuerpos. Se ha observado que la mayoría de los pacientes desarrollan anticuerpos después de los 10-11 días de presentar síntomas [3, 5], por lo tanto, su análisis representa la protección posterior a la infección.

Aunque la RT-PCR sigue siendo el método de referencia para identificar la infección aguda, a medida que la pandemia de SARS-CoV-2 continúa propagándose, las pruebas serológicas se han vuelto esenciales para comprender la evolución del paciente, así como el comportamiento de la pandemia [6].

3. Principio de la prueba

El kit Anti-IgG/COVID-19 ELISA es un inmunoensayo de incubación en dos pasos. La placa de 96 pocillos se encuentra recubierta con la proteína de espiga S recombinante (S-ECD) del SARS-CoV-2. Cuando la muestra contiene anticuerpos IgG anti-S1 y/o anti-S2 del SARS-CoV-2, estos reconocerán de forma específica la proteína S presente en el pozo, posteriormente al agregar el conjugado (anti-IgG humano/HRP), el anti-IgG detectará a los anticuerpos de tipo IgG previamente unidos a la proteína S-ECD en la placa. Esta interacción provocará que al agregar el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) se observe una coloración azul en el pozo. La solución de paro detendrá la reacción, transformando el color azul en señal amarilla, la cual se cuantifica con un lector de microplacas a una absorbancia de 450 nm.

4. Reactivos y materiales suministrados

Reactivos y materiales del kit	No. de contenedores/ unidades	Cantidad/unidades
Placa ELISA revestida con S-ECD SARS-CoV-2 [1]	1 microplaca de 96 pozos [2]	No Aplica
Buffer de Lavado (10X)	1 frasco	40 mL
Conjugado anti-IgG humano/HRP (100X)	1 tubo	120 µL
Solución diluyente de muestra (10X)	1 frasco	20 mL
Solución diluyente de conjugado	1 frasco	30 mL
Sustrato (TMB)	1 frasco	12 mL
Solución de Paro	1 frasco	12 mL
Blanco	1 tubo	2 mL

[1] Las tiras de micropocillos se pueden usar por separado. Coloque los pocillos o tiras no utilizados en la bolsa de almacenamiento sellable junto con el desecante y almacene de 2-8 °C. Una vez abierto, su estabilidad se mantiene durante 4 semanas a 2-8 °C.

[2] 12 tiras de 8 pocillos cada una. Se presenta en un soporte para pozos blanco y sellado en una bolsa de aluminio con desecante.

5. Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados

- Agua destilada.
- Micropipetas y puntas desechables para micropipeta.
- Depósitos para residuos de reactivos y buffer (RPBI).
- Toallas de papel o papel absorbente.
- Lector de microplacas/ Espectrofotómetro con capacidad de lectura de absorbancia a 450 nm o doble longitud de onda a 450/600 ~ 650 nm.
- Papel adherente para cubrir la placa.

6. Almacenamiento y preparación de muestras

- Se sugiere analizar las muestras inmediatamente después de su toma y separación de suero o plasma. En caso de no analizarse inmediatamente se debe separar el suero o plasma y almacenarlo en congelación (-20 °C) en alícuotas. Se deben evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Se recomienda analizar cada muestra mínimo por duplicado.
- Muestras de suero o plasma (con EDTA, citrato de sodio o heparina) pueden ser analizadas. No se recomienda el análisis de muestras lipémicas, ictéricas o con hemólisis. No se deben utilizar muestras con contaminación microbiana visible.
- Cuando sea necesario, se debe aplicar una agitación con vórtex a las muestras de suero o plasma a temperatura ambiente para garantizar la homogeneidad. Después, centrifugue las muestras a 10,000 a 15,000 rpm durante 5 minutos antes del ensayo para eliminar partículas indeseables. No omita este paso de centrifugación si las muestras se presentan turbias y contienen partículas suspendidas.

7. Almacenamiento y estabilidad del kit

El kit debe almacenarse a 2-8 °C a su recepción, en su caja, evitando exposiciones de luz. Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso. Se debe retirar las tiras recubiertas de antígeno no utilizadas de la microplaca, devolverlas a la bolsa de aluminio y sellar la bolsa nuevamente. Una vez abiertas, las tiras pueden almacenarse a 2-8 °C por hasta un mes. Para asegurar el máximo rendimiento, proteja los reactivos de la contaminación con microorganismos o productos químicos durante el almacenamiento.

8. Preparación de reactivos suministrados

8.1 Buffer de lavado (1X)

Prepare Buffer de lavado 1X mezclando el Buffer de lavado (40 mL) 10X con 360 mL de agua destilada. Si se observan precipitados en la botella de Buffer de lavado 10X, caliente el contenedor en un baño maría a 37 °C y mezcle hasta que desaparezcan los precipitados. El buffer de lavado 1X se puede almacenar a 2-8 °C hasta por un mes.

8.2 Conjugado anti-IgG humano/HRP

Tomando en consideración el total de pozos a usar, determine la cantidad de conjugado que deberá usar. Por cada mL de solución necesaria, se colocará 10 µL de conjugado concentrado y 990 µL de solución diluyente de conjugado. Homogenice previamente el conjugado concentrado y regrese inmediatamente después de su uso a 2-8 °C.

9. Preparación de muestra

Prepare la muestra (suero o plasma) 1:100 diluyendo 10 µL de muestra en 990 µL de solución diluyente de muestra. El factor de dilución se puede ajustar en función del título de los anticuerpos en las muestras, sin bajar de la proporción 1:100.

9. Procedimiento del ensayo

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante al menos 30 minutos, antes de usar.

Número de paso	Actividad
Paso 1: Muestras/Blanco	Agregue 100 µL de muestra previamente preparada y/o 100 µL de Blanco , al pocillo correspondiente. Usar una punta para pipeta desechable por cada muestra, para evitar contaminación cruzada. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
Paso 2: Lavado	Desechar la solución de todos los pocillos, golpeando la placa sobre una toalla de papel absorbente limpia para eliminar la solución residual en cada pozo. Lavar cada pocillo 5 veces, agregando 300 µL de solución de lavado a cada uno. Desechar la solución de lavado de los pocillos en cada lavado. Al terminar retirar completamente los residuos de la solución de lavado golpeando la placa contra un papel absorbente limpio.
Paso 3: Detección	Agregue 100 µL de Solución de conjugado anti-IgG humano/HRP a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
Paso 4: Lavado	Lave cada pocillo 5 veces como se describe en el paso 2.
Paso 5: Reacción de coloración	Agregue 100 µL de sustrato a cada pocillo. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos. Proteja de la luz.
Paso 6: Reacción de paro	Agregue 100 µL de Solución de paro a cada pocillo, golpee suavemente el marco de la placa durante unos segundos para garantizar una mezcla completa.
Paso 7: Medición	Mida la absorbancia de cada pocillo a 450 nm inmediatamente. Nota: Leer la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción (después de la adición de la solución de paro).

10. Control de calidad

Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente.

Todos los resultados deben calcularse restando el valor de absorbancia del pozo blanco.

Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad. Se recomienda que cada laboratorio establezca un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra analizada.

El valor de absorbancia del pozo en blanco debe ser <0.100 determinado a 450 nm.

11. Resultados esperados

Muestra	Valor de D.O. detectada a 450 nm
Blanco	< 0.100
Muestras de pacientes con niveles de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 menores al límite de detección	≤ 0.500
Muestras de pacientes con presencia de anticuerpos IgG anti -SARS-CoV-2	≥ 0.900

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia negativo y positivo. Además, también se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras de control en el ensayo.

12. Limitaciones del procedimiento

A continuación, se mencionan las limitaciones del procedimiento:

- Hiperlipidemia, muestras hemolizadas, muestras contaminadas con microorganismos, muestras con descongelamiento repetitivo y/o muestras inactivadas podrían afectar la precisión del ensayo y generar resultados erróneos.
- Las muestras con ictericia grave o contaminación grave producirán resultados incorrectos.
- La presencia de azida de sodio en la muestra afecta los resultados del ensayo. La azida de sodio no se debe utilizar como conservador de muestras.
- Si la microplaca no se lava adecuadamente o presenta líquidos residuales, puede causar alteraciones a los resultados.
- Si el intervalo de tiempo de adición de muestra o reactivos es demasiado largo, puede causar alteraciones a la prueba y los resultados.

13. Características de desempeño

- **Reactividad cruzada:** La reactividad cruzada del kit Anti-IgG/COVID-19 ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 se evaluó por duplicado para distintos anticuerpos contra Influenza A, VIH y otros Coronavirus. Ninguno de los anticuerpos reaccionó de forma cruzada con el kit, por lo tanto, no se generan resultados falsos positivos.
- **Interferencias endógenas/exógenas:** Suero positivo a anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 y suero negativo a anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 fue enriquecido con una de las siguientes sustancias a concentraciones especificadas y probado en múltiples repeticiones. No se encontraron resultados de falsa positividad o falsa negatividad.

Sustancia de interferencia	Concentración	Resultado
Bilirrubina	4.76 mg/mL	Sin interferencia
Colesterol	163 mg/mL	Sin interferencia
Creatinina	3.84 mg/mL	Sin interferencia
Glucosa	200 mg/mL	Sin interferencia
Cafeína	20 mg/mL	Sin interferencia
Urea	103 mg/mL	Sin interferencia
Ácido acetilsalicílico	10 mg/mL	Sin interferencia
Ácido ascórbico	10 mg/mL	Sin interferencia
Acetaminofén	10 mg/mL	Sin interferencia

- **Sensibilidad, Especificidad y Precisión:**

Se analizaron 173 muestras de pacientes con diagnóstico previo positivo a SARS-CoV-2 por RT-PCR para búsqueda de anticuerpos IgG.

Método	RESULTADO	RT-PCR		Total
		Positivo (+)	Negativo (-)	
Anti-IgG/COVID-19 ELISA	Positivo (+)	56	2	58
	Negativo (-)	1	114	115
Resultados totales		57	116	173

Sensibilidad Relativa: 98.25% (95% CI *: 94.29% ~ 99.4%)
 Especificidad Relativa: 98.28% (95% CI *: 94.34% ~ 99.41%)
 Precisión Global: 98.27% (95% CI *: 94.32% ~ 99.41%)
 *Intervalo de Confianza

14. Precauciones y seguridad

Los ensayos ELISA son sensibles al tiempo y a la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.

1. No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo de los ensayos.
2. Asegúrese de que todos los reactivos no presenten fecha de caducidad vencida (indicada en la caja del kit). No use reactivos con fecha de caducidad vencida (indicada en las etiquetas o cajas).
3. PRECAUCIÓN: Paso crítico. Permita que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (20-25 ° C) antes de su uso. Agite el reactivo suavemente antes de usar, teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a 2-8 °C inmediatamente después de su uso.
4. Use solo el volumen suficiente de muestra cómo se indica en los pasos del procedimiento de ensayo, de lo contrario, puede provocar baja sensibilidad del ensayo.
5. No toque el fondo exterior de los pozos, las huellas digitales o los rasguños pueden interferir con la lectura. Al leer los resultados, asegúrese de que el fondo de la placa esté seco y que no haya burbujas de aire dentro de los pozos.
6. Nunca permita que los pozos de la microplaca se sequen después del paso de lavado. Inmediatamente proceda al siguiente paso. Evite la formación de burbujas de aire al agregar los reactivos.
7. Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los pozos.
8. Calibre la pipeta con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivos para evitar contaminaciones cruzadas.
9. Al agregar muestras o reactivos, no toque el fondo del pozo con la punta de la pipeta.
10. Mida con un lector de placa o espectrofotómetro, determine la absorbancia a 450 nm.
11. La actividad enzimática del conjugado HRP podría verse afectada por el polvo y los químicos reactivos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas.
12. Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las buenas prácticas de laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
13. Nunca coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio de análisis.
14. Los productos químicos deben manipularse y eliminarse solo de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio vigentes y las reglamentaciones locales o nacionales aplicables.
15. Las puntas de las pipetas, los viales, las tiras y los recipientes de muestras deben recogerse y esterilizarse en autoclave durante no menos de 15 min a 15 psi o tratarse con hipoclorito de sodio al 10% durante 30 minutos para descontaminar antes de cualquier paso adicional de eliminación. Las soluciones que contienen hipoclorito de sodio nunca deben esterilizarse en autoclave. Las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) se encuentran disponibles a solicitud del interesado.
16. Algunos reactivos pueden causar toxicidad, irritación, quemaduras o tener un efecto cancerígeno. Se debe evitar el contacto con la piel y mucosas.
17. La solución de paro es un ácido, úselo con el cuidado apropiado, limpie los derrames inmediatamente y lave sus manos con abundante agua si entra en contacto con la piel o los ojos.

15. Resumen del procedimiento de la prueba

- 1** Agregar en los pozos correspondientes:
 - 100 μ L de muestra
 - 100 μ L de blanco.

↓

- 2** Incubar a temperatura ambiente por 30 min.

↓

- 3** Retire residuos. Lavar con 300 μ L de solución de lavado, repitiendo 5 ocasiones.

↓

- 4** Agregue 100 μ L de Conjugado.

↓

- 5** Incube a temperatura ambiente por 30 min.

↓

- 6** Retire residuos. Lavar con 300 μ L de solución de lavado, repitiendo 5 ocasiones.

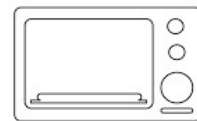
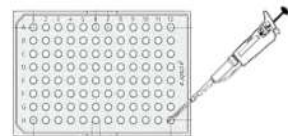
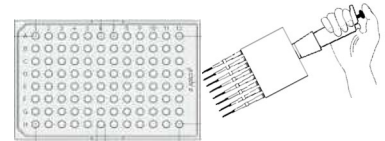
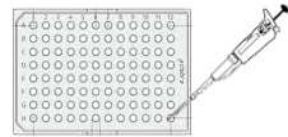
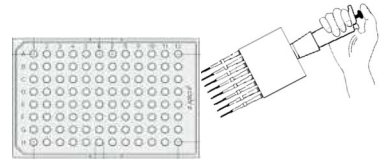
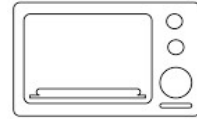
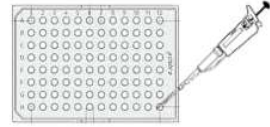
↓

- 7** Agregue 100 μ L de Solución de sustrato a cada pocillo.

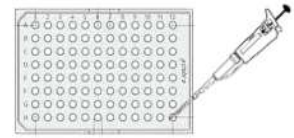
↓

- 8** Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

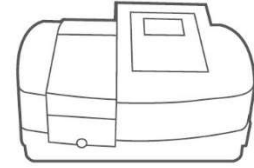
↓



9 Agregue 100 μ L de Solución de paro a cada pocillo.



10 Mida la absorbancia de cada pocillo a 450 nm



11 Interprete los resultados.

Positivo
 Negativo

16. Referencias





1. WHO **Novel coronavirus – China. Jan 12, 2020.**
<https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/> (2020).
2. Al-Jighefee, HT; Yassine, HM; Al-Nesf, MA; Hssain, AA; Taleb, S.; Mohamed, AS; Maatoug, H.; Mohamedali, M.; Nasrallah, GK Evaluación de la respuesta de anticuerpos en pacientes con COVID-19 sintomáticos y asintomáticos y evaluación diagnóstica de los nuevos kits ELISA IgM / IgG. *Patógenos* 2021, 10, 161. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020161>
3. Eleazar Ramírez Hernández, Luis Fernando Hernández-Zimbrón, Nayeli Martínez Zúñiga, Juan José Leal-García, Violeta Ignacio Hernández, Luis Eduardo Ucharima-Corona, Eduardo Pérez Campos, and Edgar Zenteno. *Viral Immunology*. Apr 2021. 165-173. <http://doi.org/10.1089/vim.2020.0174>
4. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Science Immunology*. 2020 Jun;5(48). DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8413. PMID: 32527802; PMCID: PMC7292505.
5. S.J. Zost, P. Gilchuk, R.E. Chen, J.B. Case, J.X. Reidy, A. Trivette, R.S. Nargi, R.E. Sutton, N. Suryadevara, E.C. Chen, E. Binshtein, S. Shrihari, M. Ostrowski, H.Y. Chu, J.E. Didier, K.W. MacRenaris, T. Jones, S. Day, L. Myers, F. Eun-Hyung Lee, D.C. Nguyen, I. Sanz, D.R. Martinez, P.W. Rothlauf, L.M. Bloyet, S.P.J. Whelan, R.S. Baric, L.B. Thackray, M.S. Diamond, R.H. Carnahan, J.E. Crowe Jr. **Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein.** *Nat. Med.*, 26 (2020), pp. 1422-1427, 10.1038/s41591-020-0998-x.
6. Winter, A.K.; Hegde, S.T. **The important role of serology for COVID-19 control.** *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, 758–759.

17. Fecha de emisión

IGG 0921/02

Septiembre, 2021. Versión 2.

18. Simbología utilizada

Símbolo	Descripción
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Lote
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
	No use si el empaque se encuentra dañado
	Consulta instrucciones de uso
	Temperatura límite 2°C~8°C.
	Contiene 96 pozos
	No se reúse
	Precaución
	Mantener seco

Para más información ingresa a:

www.amunet.com.mx