

## INSTRUCCIONES DE USO

Los números [1] – [11] hacen referencia a las ilustraciones de la página 3.

### Uso recomendado

Actim® ELISA SARS-CoV-2 IgG es un ensayo inmunoenzimométrico para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 en suero obtenido a partir de muestras de sangre venosa. El test se ha desarrollado para uso profesional para ayudar a la detección de una infección reciente por COVID-19.

### Componentes del kit

Un solo uso. Los componentes de la prueba Actim ELISA SARS-CoV-2 IgG 35530ETAC son los siguientes:

Componente	Cantidad	Contenido
Placa de pocillos	1 ud (96 pocillos)	Microplaca recubierta por dominio S1 recombinante de la proteína Spike del SARS-CoV-2.
Conjugado con HRP 100x	175 µl	Anticuerpo contra la IgG humana monoclonal con HRP en una matriz de proteínas estabilizadas.
Calibradores (A-F) 50x	50 µl (x6)	Calibradores tamponados que contienen SAB y acida de sodio como conservante. Las concentraciones exactas se mencionan en el certificado.
Controles (Neg-Pos) 50x	50 µl (x2)	Controles tamponados que contienen SAB y acida de sodio como conservante. Los límites de aceptación se mencionan en el certificado.
Diluyente de muestras	50 ml	Un tampón de disolución de muestras listo para usar con SAB y acida de sodio como conservante.
Solución de lavado 25x	100 ml	Tensioactivo concentrado en una solución salina tamponada con diazolidinyl urea como conservante.
Sustrato	20 ml	Tetrametilbencidina (TMB) en tampón con peróxido de hidrógeno.
Diluyente conjugado	15 ml	Un tampón de disolución de conjugados listo para usar con CMIT/MIT como conservante.
Solución de detención	15 ml	0,5 M ácido sulfúrico
Instrucciones de uso	(documento físico)	
Certificado	(documento físico)	

### Materiales y equipo obligatorios, pero no suministrados con el kit

- Agua destilada/desionizada
- Pipetas precisas de un solo canal capaces de suministrar 10 µL, 40 µL, 100 µL y 500 µL
- Dispensador o pipetas precisas multicanal capaces de suministrar 100 µL
- Lector de microplacas capaz de medir la absorbencia a 450 nm
- Lavaplaques (automático o manual)
- Agitador de placas (p. ej., es adecuado un agitador de vibración a 1200 rpm)
- Tubos de cristal o plástico para preparar las disoluciones necesarias
- Una tapa/cubierta o similar para proteger la placa de la luz durante la incubación mediante un sustrato
- Cronómetro

### Conservación

Almacene el kit sin abrir a +2...+8 °C y no lo utilice pasada la fecha de caducidad. Los componentes de un kit sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está impresa en el embalaje exterior. Cada componente de la prueba también tiene la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.

### Relevancia clínica

SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo grave por coronavirus 2) es un nuevo coronavirus que se detectó en diciembre de 2019. Tras expandirse rápidamente por todo el mundo durante los meses siguientes, se declaró una pandemia por SARS-CoV-2 en marzo de 2020. En febrero de 2020, la OMS denominó la enfermedad ocasionada por el SARS-CoV-2 como COVID-19. Esta enfermedad se transmite principalmente mediante gotículas o a través de un contacto estrecho con personas infectadas. El periodo de incubación del SARS-CoV-2 suele ser de entre tres y siete días, pero puede alcanzar los 14 días.

La determinación de anticuerpos en muestras de suero/plasma se emplea para demostrar si el sistema inmunológico ha estado en contacto con el virus. Se suele estimar que, en un plazo de 19 días a partir de la aparición de los síntomas, prácticamente el 100 % de los pacientes obtiene un resultado positivo en inmunoglobulina antiviral. Las pruebas de IgG para SARS-Cov-2 se pueden emplear, por ejemplo, para realizar estudios serológicos o supervisar y controlar brotes locales. La prueba resulta útil para determinar la tasa de infección real y la tasa de mortalidad de los infectados, ya que la presencia de anticuerpos antivirales específicos permite identificar a personas infectadas, incluidas las infecciones asintomáticas.

## Principio de la prueba

El kit contiene una placa de pocillos con 96 pocillos recubierta por dominio S1 recombinante de la proteína Spike del SARS-CoV-2. Esta proteína capturará los anticuerpos IgG en el S1 del SARS-CoV-2. Se añaden calibradores, muestras y controles diluidos, y los anticuerpos IgG contra el SARS-CoV-2 presentes se unirán en la placa. Tras la incubación y la eliminación de las sustancias no fijadas, se añade un anticuerpo contra la IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Esta segunda incubación con enzimas es necesaria para catalizar una reacción de color. Tras la incubación y la eliminación de conjugados no fijados mediante irrigación, se añade un sustrato de tetrametilbencidina (TMB). Se desarrolla un color azul en proporción con la cantidad de IgG contra el SARS-CoV-2 presentes en el pocillo. Se añade una solución de detención y el color cambia de azul a amarillo. La intensidad del color se mide con un lector de microplacas.

Este kit proporciona un método sencillo y rápido para detectar la presencia de anticuerpos IgG del SARS-CoV-2 en muestras de suero humano. El kit contiene todos los reactivos necesarios para analizar 80 muestras simples o 40 dobles.

## Precauciones de seguridad y eliminación de residuos

Los reactivos son únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.



El kit contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) (consulte los componentes del kit).

Provoca graves quemaduras cutáneas y daño ocular (H314). Puede ser corrosivo para los metales (H290).

Evite el contacto con la piel o los ojos. Si se produce un contacto, limpie la zona de inmediato con agua. Si desea obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad del material.

Use guantes al realizar este ensayo. La muestra del paciente, los residuos de la muestra, los controles, los calibradores y las placas de pocillos incubados siempre deberán manipularse como materiales infecciosos.

Evite el contacto con reactivos que contengan peróxido de hidrógeno o ácido sulfúrico.

Evite el contacto con la piel, los ojos o la ropa. No lo ingiera ni inhale los vapores. En caso de contacto, aclare con abundante agua durante al menos 15 minutos.

Todos los reactivos se deben tratar como residuos infecciosos y se deben desechar de acuerdo con las normas de eliminación locales.

## Toma y almacenamiento de muestras

Para realizar una medición por duplicado, hacen falta 10 µL de suero humano. Todas las muestras de los pacientes deberán manipularse según las directrices del Comité Nacional de Estándares clínicos de laboratorio para evitar la transmisión hemática de infecciones. Una muestra debe analizarse lo antes posible o almacenarse a +4 °C durante un máximo de 24 horas. Las muestras que no se puedan analizar de inmediato se almacenarán congeladas, pero se recomienda evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación.

## Notas del procedimiento

- Revise a fondo este procedimiento.
- Respete las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y las directrices de seguridad.
- **Importante. Los reactivos son específicos del lote.** No los mezcle ni intercambie reactivos de otros lotes.
- Permita que los reactivos, las muestras y la placa/materiales alcancen una temperatura ambiente antes de usarlos.
- Mezcle todos los reactivos suavemente y por completo inmediatamente antes de usarlos. Evite la formación de espuma. **[1]**
- Si queda líquido bajo la tapa del vial, golpee el vial o centrifúguelo brevemente.
- Se recomienda que todos los calibradores, los controles y las muestras se procesen por duplicado. La lectura de absorbancia media de cada duplicado deberá emplearse para calcular los resultados.

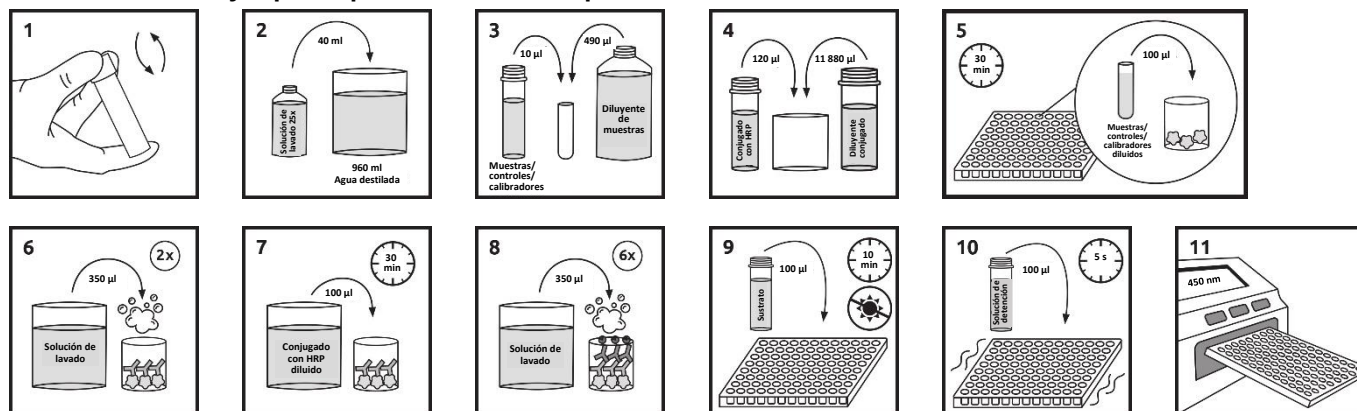
## Preparación de reactivos y muestras

1. Disuelva la solución de lavado 25x con una proporción 1:25 en agua destilada/desionizada. **[2]**
2. Disuelva los calibradores A-F, el control positivo, el control negativo y las muestras del paciente con una proporción 1:50 en diluyente de muestras y mezcle por completo. **[3]**
3. Disuelva conjugado con HRP 100x con una proporción 1:100 en diluyente de muestras justo antes de su uso. **[4]**

## Procedimiento de ensayo

1. Añada 100 µl de calibradores/muestras/controles diluidos a los pocillos correspondientes e incube la placa a temperatura ambiente sobre un agitador durante **30 minutos**. **[5]**
2. Lave la placa dos veces con 350 µl de solución de lavado (1x) por pocillo. **[6]**
3. Añada 100 µl de conjugado con HRP diluido a cada pocillo e incube la placa a temperatura ambiente sobre un agitador durante **30 minutos** (exactamente). **[7]**
4. Lave la placa seis veces con 350 µl de solución de lavado (1x) por pocillo. **[8]**
5. Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo e incube la placa durante **10 minutos** (exactamente). No lo agite. Cubra la placa para protegerla de la luz. Aparece un color azul en los pocillos. **[9]**
6. Añada 50 µl de solución de detención a cada pocillo. Agite la placa durante 5 segundos para mezclarlo. El color de la solución cambia de azul a amarillo. **[10]**
7. Lea la placa a 450 nm en un plazo de **10 minutos** tras haber añadido la solución de detención. **[11]**

## Ilustraciones de un ejemplo de procedimiento de la prueba



## Control de calidad y material de referencia

Tenga en cuenta que deben usarse los controles y los calibradores incluidos en el kit en cada procesamiento.

Los criterios de aceptación de los controles se determinan en el certificado que se incluye con el kit. Como no hay disponible ninguna regla de oro para la concentración en la medición de IgG de COVID-19, los valores de los calibradores del ensayo se definieron mediante la disolución de un anticuerpo IgG de COVID-19 humano altamente purificado en una matriz.

El calibrador y los controles positivo y negativo deben cumplir los criterios especificados para el lote de la prueba. Si estos requisitos de control no se alcanzan, los resultados de la prueba podrán ser imprecisos (inválidos) y la prueba deberá repetirse. El intervalo aproximado de medición es 0,0-1,5 U/ml. Si una muestra indica un valor de absorbencia fuera de la curva de calibración, diluya y vuelva a procesar la muestra si debe conocer la concentración real. Si solo necesita un resultado positivo o negativo cuantitativo, las muestras no se tienen que diluir y volver a procesar si los requisitos de control de la prueba se cumplen de otro modo.

Los controles positivo y negativo se han diseñado para controlar fallos importantes del reactivo, pero no garantizan la precisión del valor de corte del ensayo. Se recomienda que todos los ensayos incluyan los controles propios del laboratorio además de los que se suministran con este kit. Puede que se realicen controles adicionales según la normativa local, estatal o federal, o requisitos de acreditación, así como la política de control de calidad del propio laboratorio.

## Cálculo de la curva estándar e interpretación de la prueba

Calcule la absorbencia media de cada par de resultados de la prueba duplicados.

Puede trazarse una curva estándar a partir de las densidades ópticas de los calibradores mediante el uso del ajuste de la curva de normalización 4-PL. Los valores del calibrador específicos del lote se definen en el certificado. Hay que emplear programas adecuados para la reducción de datos asistidos por ordenador para realizar el cálculo de los resultados. A partir de la curva estándar ajustada, puede determinarse el valor de las muestras y los resultados se muestran en U/ml.

El punto de decisión clínica es aproximadamente 0,2 U/ml.

Un resultado de la prueba POSITIVO en combinación con una recuperación demostrada de la enfermedad sugiere la probabilidad de una infección previa por SARS-CoV-2. UN resultado NEGATIVO indica la ausencia de probabilidad de infección. Tenga en cuenta que los resultados próximos al punto de decisión clínica requieren una confirmación adicional.

## Limitación de la prueba

- La prueba está indicada únicamente para su uso por parte de profesionales.
- Se recomienda tener en cuenta los resultados de la prueba en combinación con el estado clínico de cada persona, los resultados de otras pruebas diagnósticas y la información epidemiológica general.
- Un resultado negativo de la prueba serológica no garantiza la ausencia de una infección reciente.
- Las muestras tomadas al inicio de la infección pueden no poseer niveles detectables de anticuerpos.
- Los pacientes inmunodeprimidos o con otras enfermedades que afecten al sistema inmunológico, fallo multiorgánico y empleo de fármacos que reduzcan la función inmunitaria también pueden reflejar niveles inusualmente bajos de IgG, lo que provocaría un falso negativo en la detección de anticuerpos IgG de COVID-19.
- La determinación de anticuerpos no sustituye la detección directa mediante PCR. Es importante tener en cuenta que un resultado positivo en IgG de SARS-CoV-2 indica que se ha producido una infección, pero no significa necesariamente que se pueda garantizar la inmunidad (es decir, una protección frente a la infección).
- Una infección anterior por SARS u otra cepa de coronavirus puede producir un resultado positivo en IgG debido a las similitudes de las diferentes cepas. La correcta realización de los procedimientos de recogida, transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras es esencial para obtener el resultado de la prueba.
- El ensayo se valida manualmente, pero puede adaptarse a un instrumento automatizado.

## Notas

- No utilice componentes que hayan sufrido daños durante el transporte.
- Use el kit antes de que alcance la fecha de caducidad (impresa en el embalaje exterior).
- No utilice reactivos de diferentes lotes de kits o con códigos de lote distintos y no mezcle reactivos de diferentes lotes de kits o con códigos de lote distintos.
- Proteja las placas de corrientes, luz intensa o luz solar directa durante la prueba.

# Actim® ELISA SARS-CoV-2 IgG

- Evite la contaminación de los reactivos. No utilice el mismo contenedor para albergar varias muestras. Evite la contaminación de los reactivos al cambiar las puntas de las pipetas.
- Es necesario emplear una técnica precisa y unos dispositivos de pipeteado correctamente calibrados para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
- Resulta esencial realizar una aspiración cuidadosa del concentrado de lavado para garantizar una correcta precisión de la prueba.
- Unos tiempos de incubación o unas temperaturas diferentes de los que se indican en este documento pueden afectar a los resultados.
- La adición de conjugado con HRP desencadena una reacción cinética que finaliza con el lavado. Mantenga iguales los tiempos de incubación de cada pocillo mediante la adición de reactivos en intervalos programados.
- Si se protegen de la luz, los valores de absorbencia son estables durante 10 minutos.
- Evite la presencia de burbujas de aire en el micropocillo, ya que esto podría provocar un resultado incorrecto.
- Los lectores de microplacas miden la absorbencia de forma vertical. No toque la parte inferior de los pocillos.

## Rendimiento del test

### Sensibilidad analítica

El límite de cuantificación (LoQ) y el límite de detección (LoD) se han definido según los requisitos definidos en las directrices EP17-A2 de la „Evaluación de la capacidad de detección para procedimientos de medición en el laboratorio clínico“ del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, <https://clsi.org/>). El límite de detección de esta prueba es de 0,000 U/ml y el límite de cuantificación es de 0,003 U/ml.

### Reactividad cruzada (especificidad analítica)

Debido a la reducida homología de la proteína S1 dentro de la familia de los coronavirus, se pueden excluir virtualmente las reacciones cruzadas de la mayoría de los representantes de patógenos humanos pertenecientes a esta familia de virus. Sin embargo, debido a la estrecha relación entre SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2, es probable que se produzcan reacciones cruzadas entre estos dos virus. Se ha probado la reacción cruzada con otros virus humanos. El panel probado se muestra en la tabla 1. No se produjeron reacciones cruzadas con anticuerpos IgG generados contra otros virus. Había dos muestras de suero justo por encima del corte (0,21 U/ml y 0,24 U/ml), pero no hay motivos para suponer que se produjera una reacción cruzada real al anticuerpo en ninguna de las muestras. La otra muestra poseía altos niveles de IgG del virus del sarampión (1/56 muestras), pero las otras muestras que dieron positivo en IgG del virus del sarampión no arrojaron resultados elevados. La otra muestra no se diferenció de las otras muestras de suero, que no arrojaron resultados elevados. Este panel no se probó para detectar el SARS-CoV-1 y no se puede excluir su presencia.

**TABLA 1.** El contenido del panel de reactividad cruzada.

<b>6 muestras positivas para SARS-CoV-2</b> (4 donantes [2 donantes con muestras consecutivas] con prueba PCR previa positiva en SARS-CoV-2)	
<b>90 muestras humanas (antes de SARS-CoV-2)</b> con resultado positivo en:	
<i>81 IgG de adenovirus</i> <i>66 IgG de citomegalovirus (CMV)</i> <i>73 IgG de tipos 1 y 2 del herpes simple</i> <i>86 IgG del virus de la gripe A</i> <i>72 IgG del virus de la gripe B</i> <i>73 IgG del virus de las paperas (parotitis)</i> <i>20 IgG de mycoplasma pneumoniae</i> <i>90 IgG de virus paragripal 1/2/3</i>	<i>50 IgG de parvovirus B19</i> <i>89 IgG de virus respiratorio sincitial</i> <i>87 IgG de virus de la varicela-zoster</i> <i>87 IgG de antígeno de la cápside viral del virus de Epstein-Barr</i> <i>18 IgG de enterovirus</i> <i>56 IgG de virus del sarampión</i> <i>1 IgG de hantavirus grupo 1 "Eurasia"</i> <i>45 IgG de haemophilus influenzae tipo B</i>

### Precisión

La precisión intranalítica se evaluó mediante tres (3) muestras de suero con niveles enriquecidos conocidos de control positivo. Estas muestras se analizaron con 16 duplicados. El resultado se resume más abajo con resultados aceptables.

**Tabla 2.** Resumen de resultados intranalíticos.

KG1893	OD450	DE	CV %	U/ml	DE	CV %
<b>Muestra 1</b>	0.239	0.017	7.1	0.231	0.008	3.6
<b>Muestra 2</b>	0.616	0.050	8.1	0.362	0.015	4.2
<b>Muestra 3</b>	1.009	0.141	14.0	0.501	0.060	12.0

La reproducibilidad interanalítica se evaluó mediante dos (2) muestras de suero diferentes enriquecidas con una concentración conocida de anticuerpos S1 de SARS-CoV-2 y un control positivo y negativo. Las muestras se probaron en dieciséis (16) momentos diferentes. La reproducibilidad de este kit es aceptable. El resumen del resultado se muestra más abajo.

**Tabla 3.** Resumen de resultados interanalíticos.

KG1893	OD450	DE	CV %	U/ml	DE	CV %
<b>Suero enriquecido-1</b>	0.711	0.194	27.2	0.304	0.058	19.2
<b>Suero enriquecido-2</b>	1.096	0.194	17.7	0.459	0.071	15.5

## Prueba de interferencia

La interferencia se determinó enriqueciendo (con dos concentraciones conocidas diferentes) muestras de suero, cada una elaborada en cuatro (4) duplicados. Las muestras probadas son plasma-EDTA, plasma citrato, suero hemolizado, suero lipémico y suero icterico. No se detectaron interferencias en plasma-EDTA, plasma citrato, suero hemolizado y suero lipémico. El suero icterico arrojó unos datos de recuperación inferiores a los aceptables. Al analizar las muestras ictericas, el resultado puede indicar un falso negativo o arrojar un resultado cuantitativo demasiado bajo. Un resultado cualitativo positivo también es fiable en las muestras ictericas.

## Resultado clínico

Se ha realizado un estudio clínico para determinar el resultado clínico del kit Actim ELISA SARS-CoV-2 IgG. Se investigó mediante el análisis de muestras de 670 pacientes, para lo que se usó el kit Actim ELISA SARS-CoV-2 IgG. En estos pacientes, se han confirmado infecciones por SARS-CoV-2 mediante pruebas RT-PCR y días después de conocer el muestreo de PCR.

La sensibilidad, especificidad y precisión del diagnóstico se definieron y calcularon según los requisitos y las disposiciones de CLSI EP24-A2 "Evaluación de la precisión del diagnóstico de las pruebas de laboratorio mediante curvas de característica operativa del receptor".

La sensibilidad clínica es del 96 % y la especificidad es del 98 % siete (7) días después del muestreo de PCR (tabla 4; N=642). La prueba posee una elevada especificidad, pero una baja sensibilidad clínica hasta el día 7, como se esperaba (tabla 5; N=591). Los resultados generales se muestran en la tabla 6 (n=670).

**Tabla 4.** Resumen de los resultados de rendimiento clínico.

	<b>≥7 días después del muestreo para PCR</b>	
<b>Límite S1 0,2 U/ml</b>	PCR positiva	PCR negativa
Positiva	76	11
Negativa	3	552
<b>Estadística</b>	<b>Valor</b>	<b>IC del 95 %</b>
<b>Sensibilidad</b>	96.2%	Del 89,3 % al 99,2 %
<b>Especificidad</b>	98.1%	Del 96,5 % al 99,0 %
<b>Valor predictivo positivo (*)</b>	87.4%	Del 79,4 % al 92,6 %
<b>Valor predictivo negativo (*)</b>	99.5%	Del 98,4 % al 99,8 %
<b>Precisión (*)</b>	97.8%	Del 96,4 % al 98,8 %
(*) Estos valores dependen de la prevalencia de la enfermedad.		

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de rendimiento clínico.

	<b>&lt;7 días después del muestreo para PCR</b>	
<b>Límite S1 0,2 U/ml</b>	PCR positiva	PCR negativa
Positiva	16	11
Negativa	12	552
<b>Estadística</b>	<b>Valor</b>	<b>IC del 95 %</b>
<b>Sensibilidad</b>	57.1%	Del 37,2 % al 75,5 %
<b>Especificidad</b>	98.1%	Del 96,5 % al 99,0 %
<b>Valor predictivo positivo (*)</b>	59.3%	Del 42,7 % al 73,9 %
<b>Valor predictivo negativo (*)</b>	97.9%	Del 96,8 % al 98,6 %
<b>Precisión (*)</b>	96.1%	Del 94,2 % al 97,5 %
(*) Estos valores dependen de la prevalencia de la enfermedad.		

**Tabla 6.** Resumen de los resultados de rendimiento clínico.

<b>Límite S1 0,2 U/ml</b>	PCR positiva	PCR negativa
Positiva	92	11
Negativa	15	552
<b>Estadística</b>	<b>Valor</b>	<b>IC del 95 %</b>
<b>Sensibilidad</b>	86.0%	Del 77,9 % al 91,9 %

# Actim® ELISA SARS-CoV-2 IgG

<b>Especificidad</b>	98.1%	Del 96,5 % al 99,0 %
<b>Valor predictivo positivo (*)</b>	89.3%	Del 82,3 % al 93,8 %
<b>Valor predictivo negativo (*)</b>	97.4%	Del 95,8 % al 98,3 %
<b>Precisión (*)</b>	96.1%	Del 94,4 % al 97,5 %
(*) Estos valores dependen de la prevalencia de la enfermedad.		

## Referencias

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):536-544.












**Gralinski LE and Menachery VD.** Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* (2020) 12(2):135.


**Wang G and Jin X.** The progress of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) event in China. *J Med Virol.* (2020) 92 (5): 468-472

**Long QX et al.** Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med.* (2020) 26(6): 845-848.

**Perera RA et al.** Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Euro Surveill.* (2020) 25(16):2000421.

## Explicación de los símbolos

	Fecha de caducidad		Limitación de temperatura
	Fabricante		Código de lote
	Número de catálogo		Un solo uso
	Consultar las instrucciones de uso		Contiene suficiente material para "n" pruebas
	IVD		Marca CE
	Sustancia corrosiva		

 Actim Oy  
 Klovinpellontie 3, 02180 Espoo, Finland  
 Tel. +358 9 547 680  
 www.actimtest.com  
 actim@actimtest.com

© Actim Oy. All rights reserved. Actim is a trademark of Actim Oy.

AOAES35530-1 2021-02-15

