

# CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG



Kit de ELISA para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos IgG anti SARS-CoV2 en muestras de suero y plasma de humanos.

*ELISA kit for the qualitative and quantitative detection of IgG antibodies against SARS-CoV2 in human serum and plasma.*

Autorizado por ANMAT PM 2360-09



ELISA



Humanos



Chemtest Argentina S. A.  
Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.  
info@chemtest.net - chemtest.net

CHEMLIS®  
COVID-19 Quanti IgG

## Presentación / Componentes

Componentes	Descripción	15-CL13-2P Presentación 2 placas
Microplaca de análisis	Microplacas de 96 pocillos (12 strips x 8 pocillos con marco) recubiertas con antígeno, selladas y almacenadas en seco	2 microplacas (192 determinaciones)
Conjugado	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano) - Para reconstituir	2 unidades (c. s. p. 20 ml)
Solución sustrato-cromógeno	Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )] – CONSERVAR EN OSCURIDAD	1 x 30 ml
Solución de frenado	Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO	1 x 30 ml
Solución de lavado	Concentrada 10X	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
Diluyente de muestra	Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 120 ml
Control positivo/Estándar 800 UI	Liofilizado - Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 unidad (c. s. p. 1 ml)
Control negativo	Listo para usar - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S) 0,01%]	1 x 0,1 ml
Etiquetas	Etiquetas para rotulado de las alícuotas del Control positivo/Estándar 800 UI/ml	6 unidades
Bolsa de polietileno	Con cierre hermético - Reutilizable	1 unidad
Manual de instrucciones		1 unidad

## Nombre del producto

CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG

## Uso previsto

El kit CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos humanos del isotipo IgG dirigidos contra la proteína Spike (incluyendo RBD y NTD) de SARS-CoV2 en muestras de suero y plasma con EDTA, heparina o citrato de sodio.

La detección y cuantificación de anticuerpos IgG específicos contra SARS-CoV2 constituye una herramienta complementaria en el diagnóstico de una infección por SARS-CoV2 y puede ser usado con fines epidemiológicos, para la identificación de potenciales donadores de plasma para transfusión terapéutica y para el monitoreo post-vacunación.

El producto está concebido para ser utilizado como IVD y el procesamiento puede realizarse en forma manual o utilizando un equipo lavador automático de microplacas de ELISA.

## Importancia clínica

El COVID-19 es una enfermedad infecciosa contagiosa causada por el SARS-CoV2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) que se presenta con un amplio espectro de síntomas como fiebre, tos seca, dolor corporal, dificultad para respirar, neumonía y diarrea entre otros (1, 2). El SARS-CoV2 es un virus perteneciente a la familia Betacoronaviridae, a la cual también pertenecen el SARS-CoV y el MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome coronavirus), dos virus que han causado un número considerable de muertes en los brotes epidémicos de los años 2003-2004 y 2012-2013 respectivamente (3).

El SARS-CoV2 es un virión cuyo material genético está compuesto por un ARN monocatenario positivo que codifica para las cuatro proteínas estructurales

(S, Spike; E, Envoltura; M, Membrana y N, Nucleoproteína) que componen la partícula viral así como todas las proteínas no estructurales necesarias para su ciclo replicativo (1). El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de las micropartículas respiratorias que se producen cuando una persona infectada tose o estornuda y por contacto directo con infectados (1, 2).

El diagnóstico de la infección con SARS-CoV2 puede realizarse ya sea detectando directamente el virus por métodos de amplificación genética o de detección de antígenos virales o por métodos indirectos determinando la respuesta humoral en suero, plasma o sangre (4). Durante el proceso infeccioso el sistema inmune desarrolla una respuesta inmune humoral (anticuerpos IgM, IgG e IgA) dirigidos contra las diferentes proteínas del virus que pueden ser utilizados para determinar infecciones activas o pasadas (4).

La gran mayoría de las personas infectadas con SARS-CoV-2 seroconvierten entre los 5 y 15 días posteriores al inicio de los síntomas (PIS), con aproximadamente un 90% de seroconversión para el día 10 PIS (5). Las proteínas S y N del SARS-CoV2 son altamente inmunogénicas. La proteína S es el blanco de los anticuerpos neutralizantes del SARS-CoV2, y en particular el dominio de unión al receptor (RBD) de S es el blanco de >90% de los anticuerpos neutralizantes en los casos de COVID-19, con algunos anticuerpos neutralizantes dirigidos al dominio N-terminal (NTD) (5). Además, Spike es la proteína utilizada como inmunógeno en casi todas las vacunas contra el COVID-19. En distintos estudios las estimaciones de seroconversión a SARS-CoV2 varían entre el 91% y el 99% y, en general, los anticuerpos IgG, IgA e IgM anti-S aparecen simultáneamente en individuos infectados (5).

Entre los casos de COVID-19, casi todos los individuos seroconvierten y se vuelven positivos para las células T CD4 + para SARS-CoV2. La magnitud de la re-

puesta de células T CD4 + específicas de Spike se correlaciona con los títulos de IgG anti-Spike. Sin embargo, en el 1% al 10% de las infecciones por SARS-CoV2 confirmadas por PCR no se detectan o se detectan títulos bajos de anticuerpos anti-Spike utilizando los tests comerciales (5).

El SARS-Cov2 ha sido responsable de la mayor pandemia de los últimos 100 años en el mundo, diseminándose a más de 200 países desde su identificación en Diciembre de 2019 en la provincia de Wuhan en China hasta Noviembre de 2020. Ha causado, en menos de 1 año, más de 35 millones de infecciones y 1.100.000 muertes (6).

### **Principio de la técnica**

El kit CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG es un ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida (iELISA) basado en la detección de anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra la proteína Spike (incluyendo los dominios RBD y NTD) del SARS-CoV2. Este producto está diseñado para la determinación cualitativa y cuantitativa en Unidades Internacionales/ml (UI/ml) de los anticuerpos específicos utilizando como referencia el Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti-SARS-CoV2 (Código NIBSC: 20/136).

En este ensayo, las muestras de suero o plasma con Heparina, EDTA o Citrato de sodio son expuestas a pocillos recubiertos la proteína S (Spike) recombinante del SARS-CoV2. Si la muestra contiene anticuerpos IgM, IgG y/o IgA anti-S, estos se unen al antígeno inmovilizado en el pocillo. Al añadir los anticuerpos anti-IgG humana marcados con la enzima peroxidasa de rábano (conjugado enzimático), se forma un complejo con los anticuerpos IgG anti-S unidos al pocillo. El material libre es eliminado mediante lavados antes de agregar la solución sustrato-cromógeno. El color azul que aparece es el producto de la reacción del sustrato-cromógeno con el conjugado en aquellas

muestras que resulten positivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con el antígeno. Cuantos más anticuerpos presentes en la muestra, más intenso es el desarrollo de color en los pocillos de ensayo. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observa un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realiza en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia (Abs) a 450 nm.

### **Almacenamiento y vencimiento**

Conservación: entre 2 y 8°C.

Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas. La conservación correcta de todos los componentes del kit permitirá el uso del mismo hasta la fecha de caducidad.

Período de vida útil: 12 meses. No utilizar componentes de diferentes lotes o después de la fecha de vencimiento.

### **Materiales necesarios que no se suministran**

- Pipeta multicanal y/o micropipetas (p20, p200 y p1000 µl) de alta precisión.
- Contenedores para pipeta multicanal.
- Puntas de pipetas desechables.
- Lector de microplacas capaz de medir la absorbancia (Abs) a 450 nm.
- Equipo de lavado de microplacas automático (opcional). El lavado de microplacas también puede realizarse de forma manual.
- Agitador orbital.
- Cronómetro.
- Tubos para la dilución de los controles y muestras.
- Recipiente/probeta graduada para la preparación de la solución de lavado.
- Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I). Debe ser de la mayor calidad posible.
- Cobertor para microplacas (tapa, papel aluminio o film adhesivo).

## Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.
2. Conservar el kit y todos sus componentes a 2-8°C.
3. Antes de usar dejar que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (20-25°C), y colocar nuevamente a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
5. Las muestras de suero/plasma, como así también los controles positivo y negativo, deben considerarse potencialmente infecciosas y, por lo tanto, estas y los componentes del kit que las contactan deben manipularse con guantes y descartarse como residuo patológico según normativa legal vigente. La Solución de frenado contiene ácido clorhídrico (corrosivo). Su contacto con la piel genera irritación y debe manipularse con guantes. El resto de los componentes del kit no representa ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.
6. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.
7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.
8. Manipule los componentes del kit con cuidado para evitar la contaminación de los mismos.
9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.
10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.
11. Incluir los controles positivo y negativo, y el blanco de muestra al menos por duplicado en cada serie de análisis.

12. Para la preparación de la Solución de lavado 1X y la reconstitución del Control positivo/Estándar usar solamente agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

## Preparación de reactivos para una microplaca de análisis (96 reacciones)

### a. Solución de lavado 1X

Preparar 300 ml de Solución de lavado 1X (suficiente para una microplaca) agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 ml de agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

Notas:

-Si se observan cristales en la Solución de lavado 10X, la botella debe calentarse a no más de 45°C y agitar muy bien hasta la completa disolución de los mismos.

-Si se utiliza un lavador de microplacas tener en cuenta el volumen muerto del equipo y sumarlo a la preparación de la Solución de lavado 1X.

Se recomienda preparar c.s.p. procesar las placas del día.

### b. Conjugado

Reconstituir el Conjugado liofilizado añadiendo 10 ml (por frasco) de la Solución de lavado 1X preparada previamente (ver ítem anterior). Añadir la solución de lavado cuidadosamente. Dejar reposar el frasco un minuto y mezclar muy bien (tapar el frasco y homogenizar una o dos veces mediante agitación cabeza-cola). Preparar antes de usar.

Para una mayor exactitud, se recomienda pipetear los 10 ml utilizando dos marcas de graduación de la pipeta (por ejemplo: si se utiliza una pipeta tipo serológica de 10 ml pipetear dos veces de cero a 5 ml o una sola vez desde la posición -1 a 9 de la pipeta).

El conjugado una vez reconstituido se puede conservar a -20°C por un tiempo máximo de 90 días (no puede ser almacenado en el refrigerador) y durante este período se puede congelar y descongelar

solo una vez.

Si no se va a procesar la microplaca completa es conveniente reconstituir el conjugado como se indica arriba, realizar 3 alícuotas de igual volumen (aproximadamente de 3,5 ml cada una) y conservarlas a -20°C.

#### c. Diluyente de muestra

Reconstituir el Diluyente de muestra agregando la Solución de lavado 1X preparada previamente hasta el nivel indicado en el frasco correspondiente y mezclar muy bien hasta lograr una completa disolución. Preparar inmediatamente antes de usar.

El Diluyente de muestra remanente se puede conservar en el refrigerador (2 a 8°C) hasta 3 meses o a -20°C durante un año. En este último caso antes de su uso hay que descongelarlo totalmente, dejar que alcance la temperatura ambiente y mezclar muy bien hasta su completa disolución.

#### d. Control Positivo/Estándar 800 UI/ml

Reconstituir el Control Positivo/Estándar liofilizado añadiendo 1 ml de agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I) utilizando micropipeta. Dejar reposar el frasco 10 minutos, homogeneizar con la micropipeta, tomar todo el volumen y pasarlo a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml, (alícuota 1) y a partir de aquí realizar 5 alícuotas de 165 µl. Rotular las 6 alícuotas con las etiquetas provistas en el kit.

El Control Positivo/Estándar 800 UI/ml una vez reconstituido se puede conservar a -20°C hasta 1 año (no puede ser almacenado en el refrigerador) y durante este período se puede congelar y descongelar solo una vez.

### Preparación de los controles para una microplaca de análisis (96 reacciones)

#### a. Control positivo/Estándar 160 UI/ml

En un tubo de 1,5 ml agregar 50 µl de Control positivo/Estándar 800 UI/ml en 200 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/5) y mezclar muy bien. Dispensar 100 µl

por pocillo y por duplicado.

#### b. Control negativo

En tubos de 1,5 ml agregar 2,5 µl del Control negativo en 500 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:200) y mezclar muy bien. Dispensar 100 µl por pocillo y por duplicado.

<b>Importante:</b> agitar muy bien el Diluyente de muestra antes de usarlo.
---

#### b. Blanco de muestra

En cada placa se debe agregar un blanco de muestra constituido por el Diluyente de muestra. Dispensar 100 µl por pocillo del diluyente y por duplicado.

### Preparación de las muestras

Las muestras de suero o plasma deben diluirse 1:200 utilizando el Diluyente de muestra. Para ello, en tubos de 1,5 ml agregar 2,5 µl de suero en 500 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:200) y mezclar muy bien. Dispensar 100 µl por pocillo.

#### Notas:

-Se pueden analizar muestras de suero o plasma refrigeradas o congeladas y libres de turbidez. Las muestras se pueden conservar en heladera durante 1 ó 2 días. Para una conservación más prolongada, estas se deben guardar a -20°C y, en estos casos, se deben descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de realizar el análisis.

-Las muestras se pueden analizar en un solo pocillo. Sin embargo, se recomienda analizarlas por duplicado.

-Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

### Procedimiento de ensayo cuantitativo para una microplaca de análisis (96 reacciones)

#### Procedimiento

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los strips de 8 pocillos

llos necesarios para analizar los controles y las muestras. Guardar el resto de los strips, junto con los desecantes, en la bolsa de polietileno con cierre hermético incluida en el kit y volver a almacenar en el refrigerador (2-8°C).

Nota: una vez abierto el envoltorio original de la placa, los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno herméticamente cerrada y en el refrigerador (2-8°C) hasta 90 días.

2. Procesar y agregar los controles (Control positivo/Estándar 160 UI/ml, Control negativo y Blanco de muestra). Ver ítem Preparación de los controles.

3. Procesar y agregar las muestras de suero o plasma. Ver ítem Preparación de las muestras.

Nota: las muestras se pueden procesar en un solo pocillo o por duplicado. Sin embargo, para obtener un resultado más confiable se recomienda procesar las muestras por duplicado.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

6. Agregar 100 µl del Conjugado a cada pocillo. Ver ítem Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos (±1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo

y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

Nota: Muestras con altos valores de reactividad pueden dar lugar a la aparición de un precipitado del color negro debido a la precipitación del sustrato.

**Importante:** respetar los tiempos de incubación.

## Cálculos

### Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto al control positivo (CP) incluido en cada ensayo. Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs450) de cada muestra se relacionan con el valor de Abs450 de CP de la siguiente forma:

$$PR_{\text{Muestra}} = \frac{\text{Abs450 Muestra}^*}{\text{Promedio Abs450 CP}} \times 100$$

\*Abs450 promedio en caso de procesar las muestras por duplicado.

### Criterios de validez de la prueba

Para confirmar la validez del ensayo deben cumplirse los siguientes criterios:

- El valor del promedio de Abs450 del CP debe ser mayor a 1,7 (Promedio Abs450 CP > 1,7).
- Los valores de Abs450 de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.
- Los valores de Abs450 del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores a 0,1 (Abs450 Blc Mtra < 0,1).
- El valor promedio de la Abs450 del CN

debe ser menor a 0,15 (Promedio Abs450 CN < 0,15).

- La relación Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN debe ser mayor a 11 (Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN > 11).

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se puede considerar válida. En este caso la prueba debe repetirse ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las muestras deben interpretarse de la siguiente manera:

Suero/plasma (dilución 1:200)

PR	Interpretación
≤ 18,9%	Negativo
> 18,9% < 23,1%	Indeterminado
≥ 23,1%	Positivo

En caso de obtener un resultado indeterminado la prueba se debe repetir. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra obtenida en los días subsiguientes.

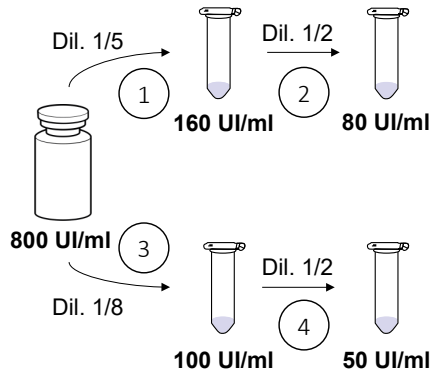
**Procedimiento de ensayo cuantitativo y cuantitativo para una microplaca de análisis (96 reacciones)**

**Curva estándar**

Reconstituir el Control Positivo/Estándar liofilizado añadiendo 1 ml de agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I) utilizando micropipeta. Ver ítem Preparación de los controles. El Control Positivo/Estándar una vez reconstituido contiene 800 UI/ml. La curva estándar debe realizarse dentro del rango lineal del ensayo 50-160 UI/ml. Para ello se deben realizar cuatro diluciones del Control positivo/Estándar 800 UI/ml y así obtener los estándares de 50 UI/ml, 80 UI/ml, 100 UI/ml y 160 UI/ml.

Seguir el siguiente esquema de dilucio-

nes para preparar los estándares:



- |   |
|---|
| <p>1) Control positivo/Estándar 160 UI/ml: 100 µl Control positivo/Estándar 800 UI/ml + 400 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/5).</p> <p>2) Estándar 80 UI/ml: 150 µl de la dilución anterior + 150 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/2).</p> <p>3) Estándar 100 UI/ml: 50 µl Control positivo/Estándar 800 UI/ml + 350 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/8).</p> <p>4) Estándar 50 UI/ml: 150 µl de la dilución anterior + 150 µl de Diluyente de muestra (dilución 1/2).</p> |
|---|

**Procedimiento**

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa se su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los strips de 8 pocillos necesarios para analizar los controles y las muestras. Guardar el resto de los strips, junto con los desecantes, en la bolsa de polietileno con cierre hermético incluida en el kit y volver a almacenar en el refrigerador (2-8°C).

Nota: Una vez abierto el envoltorio original de la placa, los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno herméticamente cerrada y en el refrigerador (2-8°C) hasta 90 días.

2. Procesar el control negativo, blanco



de muestra y la curva estándar y sembrar por duplicado siguiendo el esquema de la Figura 1. Ver ítem Preparación de los controles y curva estándar.

3. Procesar las muestras de suero o plasma y sembrar según el esquema de la Figura 1. Ver ítem Preparación de las muestras.

Nota: Las muestras se pueden procesar en un solo pocillo o por duplicado. Sin embargo, para obtener un resultado más confiable se recomienda procesar las muestras por duplicado.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

6. Agregar 100 µl de Conjugado a cada pocillo. Ver ítem Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos ( $\pm 1$  minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas.

No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

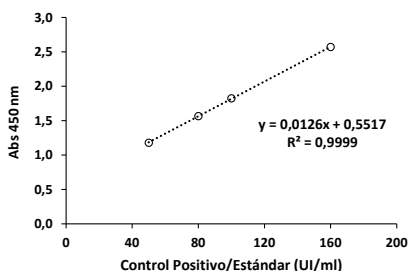
Nota: Muestras con altos valores de reactividad pueden dar lugar a la aparición de un precipitado del color negro debido a la precipitación del sustrato.

**Importante:** respetar los tiempos de incubación.

## Cálculos

### Expresión de los resultados

Una vez obtenidos los valores de Abs450 de los 4 estándares (50 UI/ml, 80 UI/ml, 100 UI/ml y 160 UI/ml) por duplicado graficar la curva estándar; esta permite determinar la concentración de anticuerpos en UI/ml de las muestras. Para graficar la curva estándar utilizando una computadora u ordenador se deberá escoger el método de evaluación "punto a punto". En la siguiente figura se puede ver un ejemplo de curva estándar con la ecuación obtenida de la regresión lineal.



Ejemplo de curva estándar y su respectiva ecuación de la regresión lineal (no utilice esta curva para la determinación de la concentración de anticuerpos en las muestras).

Para facilitar los cálculos es posible volcar los datos en la planilla de cálculos disponible en el link +INFO de este producto en la página web de Chemtest: <https://www.chemtest.net/salud-humana.php>

### Conversión de los resultados a unidades internacionales (UI/ml)

Para convertir los resultados obtenidos

en Abs 450 a UI/ml se deberá utilizar la ecuación obtenida de la regresión lineal:  $y = mx + b$ , donde  $m$  es la pendiente y  $b$  la ordenada al origen.

Continuando con el ejemplo de la curva estándar del apartado anterior, si en el mismo ensayo se obtiene un valor de Abs450 de 1,69 para una muestra incógnita ( $x_{inc}$ ) este equivaldría a 90,3 UI/ml:

$$x_{inc} \text{ (UI/ml)} = (1,69 - 0,5517) / 0,0126$$

$$x_{inc} \text{ (UI/ml)} = 90,3$$

Para calcular las UI/ml en la muestra, se deberá multiplicar el valor obtenido por el factor de dilución, en este caso 200:

$$\text{Muestra}_{inc} \text{ (UI/ml)} = 90,3 \text{ UI/ml} \times 200 = 18.060 \text{ UI/ml}$$

Ejemplo de cálculo cualitativo y cuantitativo:

Abs450			
CP/Estándar 160 UI/ml	Estándar 100 UI/ml	Estándar 80 UI/ml	Estándar 50 UI/ml
2,57	1,82	1,57	1,18

	Abs450	PR (%)	Evaluación cualitativa	Evaluación cuantitativa
CN	0,11	--	--	--
CP/Estándar (160 UI/ml)	2,57	100	--	--
Muestra #1	0,2	7,8	No reactivo	NC*
Muestra #2	0,5	19,4	Indeterminado	NC*
Muestra #3	1,69	65,7	Reactivo	18.060 UI/ml**
Muestra #4	3,2	124,4	Reactivo	>32.000 UI/ml**

\* NC, no corresponde.

\*\* Corresponde a las UI/ml de la muestra. Se obtienen multiplicando las UI/ml obtenidas en el ensayo por 200 (factor de dilución).

Toda muestra con un valor de Abs450 mayor al valor de absorbancia obtenido para el Estándar de 160 UI/ml (valor máximo de la curva estándar) deberá ser diluida conveniente en el Diluyente de muestra para poder interpolar el valor de Abs450 en el rango lineal de la curva estándar. Las UI/ml de la muestra se ob-

tienen multiplicando las UI/ml obtenidas a partir de la curva estándar por el factor de dilución correspondiente. Alternativamente el resultado se puede informar como "> 32.000 UI/ml".

Las muestras reactivas con menos de 50 UI/ml en el ensayo se deben informar como "reactivas < 10.000 UI/ml".

Por otra parte, las muestras negativas y/o indeterminadas no podrán ser evaluadas cuantitativamente ya que cualquier valor que tomen estarán por debajo del rango lineal del ensayo.

Según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en ensayos de unión de ligandos como el presente ELISA los valores de UI/ml y las BAU/ml (Binding Antibody Units) son numéricamente idénticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos con CHEMLIS® COVID 19 Quanti IgG se pueden expresar indistintamente tanto en UI/ml como en BAU/ml.

## Evaluación de desempeño

### Sensibilidad analítica

El límite de detección o la mínima cantidad de analito detectable es 2,5 UI/ml determinado a partir del Primer Estándar Internacional WHO para la inmunoglobulina humana anti SARS-CoV2 (Código NIBSC: 20/136).

### Linealidad

El kit CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG es es lineal en el rango de concentraciones de 20 UI/ml a 160 UI/ml.

### Evaluación clínica: sensibilidad y especificidad diagnóstica

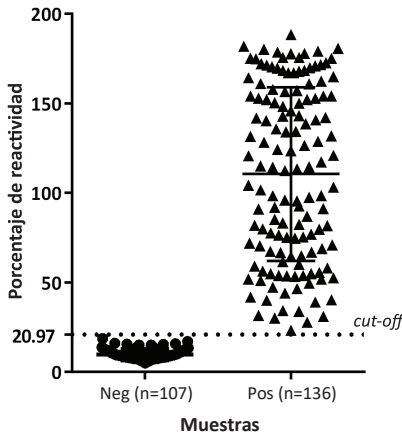
Para evaluar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del kit CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG se analizaron muestras de referencia positivas y negativas, respectivamente.

Las muestras de suero de referencia negativas (Neg, n=107) fueron obtenidas de

individuos sanos antes del comienzo de la pandemia de SARS-CoV2 en diciembre de 2019. Todas estas muestras resultaron serológicamente negativas para IgG anti SARS-CoV2 utilizando otros kits comerciales.

Las muestras de suero de referencia positivas fueron obtenidas de pacientes con hisopado positivo por RT-qPCR y serológicamente positivas para IgG utilizando un kit comercial que detecta anticuerpos IgG anti-Spike (Pos, n=136). Estas muestras fueron obtenidas entre junio de 2020 y marzo de 2021.

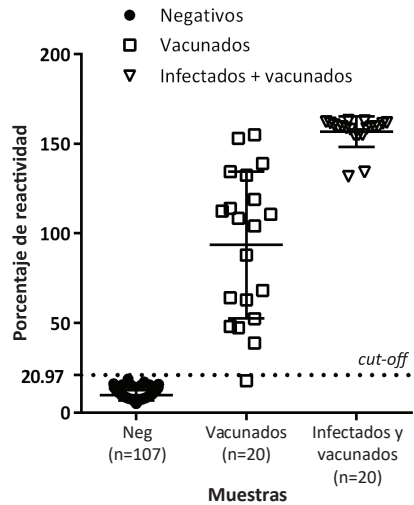
A partir del análisis de los resultados por curvas ROC se determinó el valor de corte (*cut-off*) del ensayo para el cual se obtuvo una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 100% con respecto a otro kit comercial utilizado para detectar anticuerpos IgG anti-Spike.



### Detección de anticuerpos vacunales

Para evaluar el desempeño diagnóstico del kit CHEMLIS® COVID-19 Quanti IgG en una población de individuos vacunados se analizaron 20 muestras de individuos sin infección previa con SARS-CoV2 y vacunados con esquema completo (2 dosis) de Sputnik V y 20 muestras obtenidas de pacientes con infección previa por SARS-CoV2 y vacunados con dos dosis de Sputnik V.

Las muestras obtenidas de los individuos con infección previa con el virus SARS-CoV2 y esquema completo de vacunación arrojaron valores de reactividad por encima del rango dinámico del ensayo; sin embargo, aún en estas condiciones se obtuvo una diferencia significativa con respecto a la población de vacunados sin infección previa (Mann Whitney test,  $P < 0.0001$ ). Por otra parte, solo una muestra de los vacunados con esquema completo y sin infección previa resultó negativa para la prueba.



### Referencias

- 1- Valencia D.N. Brief Review on COVID-19: The 2020 Pandemic Caused by SARS-CoV-2. *Cureus*. 2020 Mar 24;12(3):e7386. doi: 10.7759/cureus.7386.
- 2- Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation summary. [Mar;2020 ];<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/summary.html> 2020.
- 3- Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y and Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*. 2016 Jun;24(6):490-502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
- 4- Cindy H. Chau, Jonathan D. Stroppe

and William D. Frigg. COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology, 2020. *Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1002/phar.24399>.

5-Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021; 184(4): 861-80.

6-<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.

### **Limitaciones del test**

1. Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2, particularmente en aquellos que han estado en contacto con el virus. Para descartar una infección en estos individuos se debe realizar un seguimiento mediante pruebas directas.

2. Los resultados de las pruebas de anticuerpos no deben usarse como la única base para diagnosticar o excluir la infección por SARS-CoV-2 o para informar el estado de la infección.

3. Los resultados positivos pueden deberse a una infección pasada o presente con cepas de coronavirus distintas del SARS-CoV-2, como el coronavirus HKU1, NL63, OC43 o 229E.

4. Esta prueba no permite diferenciar anticuerpos vacunales de aquellos anticuerpos producidos por una infección con el virus SARS-CoV2.

5. Un lavado insuficiente (p. ej., menos de 3 ciclos de lavado, volumen insuficiente de la solución de lavado) puede dar lugar a valores de absorbancia falsamente elevados.

6. 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» (lavadores automáticos de placas de ELISA) 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 propor-

cionen resultados de ensayo que se hallen dentro de un marco fiable.

7. No se realizaron estudios de reactividad cruzada con virus influenza, para-influenza o virus respiratorio sincitial (VRS).

### **Advertencias**

-Para uso exclusivo profesional.

-Mantener fuera del alcance de los niños y animales domésticos. Centro Nacional de Intoxicaciones: Tel. 0800-333-0160.

### **ANMAT**

-Autorizado por ANMAT PM 2360-09. Chemtest Argentina S.A. Legajo N° 2360.

-Director Técnico: Andrés E. Ciochini.

### **Para asistencia técnica**

Ante cualquier consulta por favor contactar al tel (+54 11) 5353 6066 o a través de [info@chemtest.net](mailto:info@chemtest.net) / [chemtest.net](http://chemtest.net)

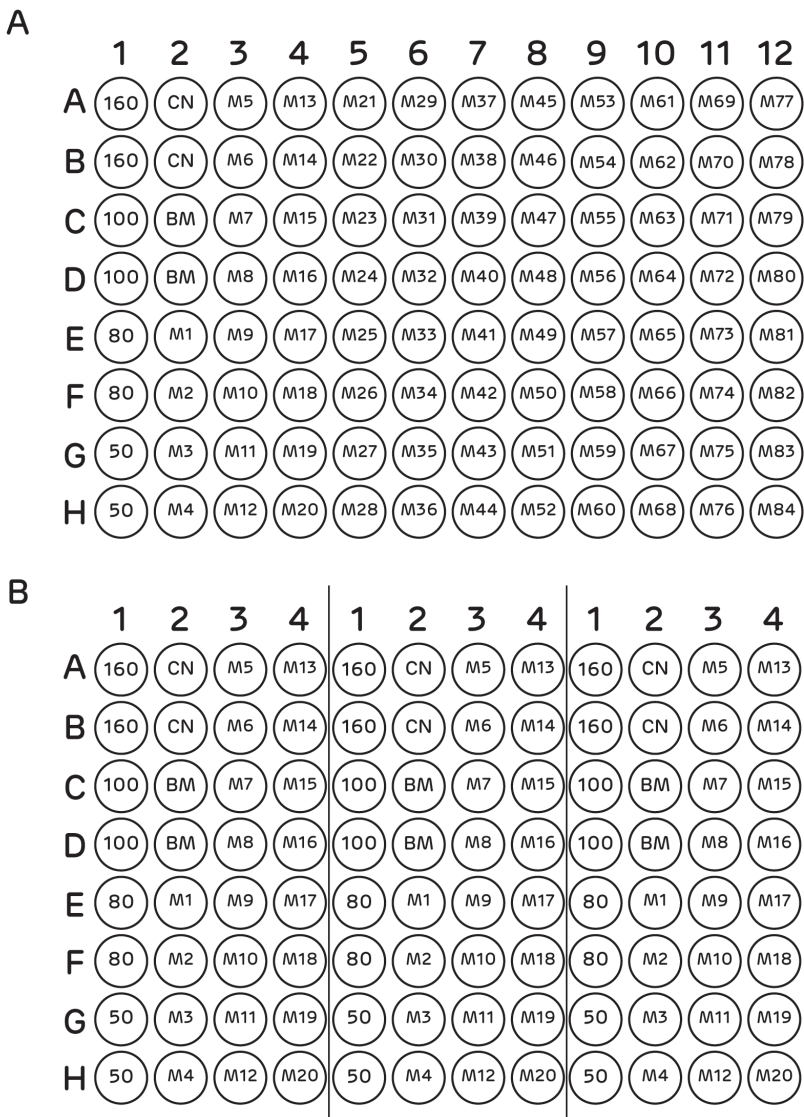


Figura 1. Esquema para procesar la microplaca de ELISA completa (A) o dividiendo la placa de a 4 strips x 8 pocillos (B). Se indican las posiciones por duplicado para el Control positivo/Estándar 160 UI/ml (160), Estándar 100 UI/ml (100), Estándar 80 UI/ml (80), Estándar 50 UI/ml (50), control negativo (CN) y blanco de muestra (BM). El resto de los pocillos quedan disponibles para el análisis de las muestras (M1 a M84 para la placa completa o M1 a M20 para la placa dividida en tres).








ELISA



Humanos

 Chemtest Argentina S. A.  
Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.  
[info@chemtest.net](mailto:info@chemtest.net) - [chemtest.net](http://chemtest.net)