

Anti-SARS-Cov-2 “Spike” ELISA IgG

REF	Σ	IVD
IMS2907	96	CE

1. USO PREVISTO.

Determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos IgG frente a Covid-19 basada en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las placas ELISA de 96 pocillos están recubiertas con el antígeno recombinante específico (Proteína Espícula o S) para unir los anticuerpos presentes en muestras de suero y plasma humano (K2-EDTA, K3-EDTA, Heparina-Li, Citrato de Sodio). El uso previsto del ensayo es ayudar en la identificación de individuos con respuesta inmune adaptativa frente a SARS-CoV-2, indicando una infección previa o reciente y contribuyendo en combinación con otras pruebas (PCR o antígeno), a la determinación de la fase en la que se encuentra la infección. Adicionalmente, este ensayo puede emplearse en investigación, estudios de seroprevalencia, vigilancia epidemiológica y respuesta inmune de diferentes vacunas frente al SARS-CoV-2.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es un nuevo virus que pertenece a la familia de los coronavirus, del genero Betacoronavirus¹, que surgió en China en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei en diciembre de 2019 y se ha extendido por todo el mundo hasta ser declarado por la OMS como pandemia en marzo 2020. SARS-CoV-2, es un virus de ARN monocatenario, de sentido positivo que presenta similitudes en la organización y expresión de su genoma con SARS-CoV, además de con otros coronavirus respiratorios humanos (NL63, 229E, OC43 y HKUI) y con los coronavirus de murciélago, que es su reservorio zoonótico². Así, su genoma codifica para 28 proteínas, 16 proteínas no estructurales y 4 proteínas estructurales, la proteína S (spike protein), la proteína E (envelope), la proteína M (membrane) y la proteína N (nucleocapsid)³.

Este virus causa diversas manifestaciones clínicas englobadas bajo el término COVID-19, que incluyen cuadros respiratorios que varían desde el resfriado común hasta cuadros de neumonía grave con síndrome de distrés respiratorio, shock séptico y fallo multiorgánico. La mayoría de los casos de COVID-19 notificados hasta el momento debutan con cuadros leves⁴.

Las vías transmisión del SARS-CoV-2 son similares a las descritas para otros coronavirus, destacando la transmisión a través de las secreciones de personas infectadas por gotas respiratorias de más de 5 micras, que son capaces de transmitirse a distancias de hasta 2 metros, así como a través de las manos o los fómites contaminados con estas secreciones seguido del contacto con la mucosa de la boca, nariz u ojos. De igual manera, el virus puede ser viable en el aire, por lo que también es posible la transmisión aérea por aerosoles, aunque de manera restringida, no en espacios abiertos y principalmente en entornos sanitarios⁵.

El sistema inmunológico del huésped reacciona a la infección por SARS-CoV-2 produciendo anticuerpos específicos que aparecen en el suero o en el plasma. Se ha descrito que individuos infectados, después la detección del ARN vírico en hisopos mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), pueden desarrollar anticuerpos en apenas 2 días hasta dos semanas desde el inicio de los síntomas.

Las clases o isotipos de anticuerpos, también denominados Inmunoglobulinas, en humanos son cinco. De ellas, tres (IgG, IgM e IgA) se utilizan habitualmente en test serológicos para el diagnóstico. La IgG es la inmunoglobulina más abundante que se produce en respuesta a un antígeno y en concreto a SARS-CoV-2 y puede ser detectable en pacientes de COVID-19 después de la exposición inicial al virus, confiriendo inmunidad a largo plazo.

Este ensayo está basado en la detección de la espícula viral (proteína S), una glicoproteína que desempeña un papel clave en el reconocimiento del receptor y el proceso de fusión de la membrana celular, que está compuesta por dos subunidades, S1 y S2. La subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD) que reconoce y se une a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) del receptor del huésped, mientras que la subunidad S2 facilita la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática de su célula diana⁶, además de ser la principal diana de la mayoría de las vacunas.

Por último, cabe destacar que la proteína S presenta la inestabilidad intrínseca típica de las proteínas de fusión de clase I, y la proteína S tiende a replegarse prematuramente a la conformación posterior a la fusión, comprometiendo las propiedades inmunogénicas, por este motivo para este ensayo se ha empleado un trímero estabilizado de la proteína S mediante la introducción de mutaciones puntuales y puentes disulfuro⁷.

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El kit contiene placas de microtitulación tapizadas con la proteína recombinante S (trímero estabilizado). En un primer paso, la muestra diluida del paciente se incuba en los pocillos, permitiendo que los anticuerpos antígeno específicos se unan a la proteína S. Después de lavar los pocillos, para eliminar los anticuerpos no unidos, en un segundo paso de incubación, se añade un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (IgG) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Después de una segunda etapa de lavado, se añade el sustrato tetrametilbencidina (TMB) provocando que la enzima conjugada al anticuerpo anti-IgG catalice una reacción colorimétrica. La intensidad del color de la reacción es proporcional a la cantidad de anticuerpos antígeno específicos presentes en la muestra. El ensayo se puede llevar a cabo de manera automática o manual y es para uso profesional.

4. REACTIVOS

4.1. Contenido del kit

Los reactivos incluidos en un kit son suficientes para llevar a cabo 96 determinaciones. Cada kit anti-SARS-CoV-2 “Spike” ELISA IgA contiene:

MTP	Microplaca de 96 pocillos (12x8). Microplaca de tiras multipocillo tapizada con antígeno recombinante de SARS-Cov-2 en una bolsa sellada al vacío.
WASHBUF	50 ml de tampón de lavado (20X). HEPES, NaCl y detergentes. Contiene Proclin300 como conservante (< 0,0014%).
DILUBUF	25 ml de tampón diluyente del anticuerpo y de la muestra (1X – Listo para usar). Tampón que minimiza la unión inespecífica, la reactividad cruzada y la interferencia de la matriz, con colorante azul. Contiene CMIT/MIT 3:1 como conservante.
SUBS TMB	12 ml de sustrato cromógeno de tetrametilbencidina (TMB). (1X - Listo para usar)
SOL STOP	12 ml de solución de parada (1X – Listo para usar) 0,5M de ácido sulfúrico (H₂SO₄)
CNTRL + IgG	1,7 ml de control positivo IgG (estándar) Contiene CMIT/MIT 3:1 como conservante. Listo para usar.
CNTRL - IgG	1,5 ml de control negativo IgG. Contiene CMIT/MIT 3:1 como conservante. Listo para usar.
CNTRL ± IgG	1,5 ml de calibrador. Contiene CMIT/MIT 3:1 como conservante. Listo para usar.
CONJ IgG	120 µl de anticuerpo anti-humano conjugado con HRP (100X). Contiene CMIT/MIT 3:1 como conservante.
INSTRU	1 Instrucciones de uso.
TAPE	2 unidades de lámina protectora.

4.2. Materiales, reactivos y equipos requeridos no suministrados.

- Espectrofotómetro calibrado para lectura de placas ELISA a 450 nm y a 620 nm.
- Micropipetas calibradas ajustables que cubran un intervalo de 1-1000 µL y las correspondientes puntas de pipeta desechables.
- Lavador automático de placas: recomendados. El lavado de las placas también se puede llevar a cabo manualmente.
- Estufa incubadora: para la incubación de la microplaca a +37 ° C.
- Agua destilada o desionizada.
- Temporizador.
- Guantes desechables.
- Contenedor de desechos de sustancias biológicas.

5. CONDICIONES DE AMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN ADECUADOS.

Almacenar refrigerado entre +2 y +8° C. NO CONGELAR.

El kit sin abrir es estable hasta la fecha de caducidad. No usar después de esta fecha. Después de abrir, los reactivos son estables si se almacenan entre +2 y +8° C y se protege de la contaminación. No dejar los reactivos abiertos y a una temperatura diferente a la de almacenamiento por más tiempo del estrictamente necesario.

6. RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS.

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO. Sólo para uso profesional.

Sólo para personal de laboratorio cualificado.

Los componentes del kit contienen Proclin300, ácido sulfúrico y CMIT/MIT. Los compuestos deben ser disueltos con agua corriente antes de ser desechados. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías.
Ficha de datos de seguridad (MSDS) disponible en la web www.immunostep.com

Antes de comenzar el análisis, leer detenidamente las instrucciones. Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis. No sustituir o mezclar reactivos del kit de Immunostep con reactivos de otros fabricantes.

Mantener los componentes de kit fuera de la exposición directa de la luz durante el protocolo. La solución sustrato (TMB) es sensible a la luz.

Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.

Los reactivos no deben ser utilizados si el embalaje presenta evidencias claras de deterioro.

Usar equipos de protección personal para el manejo de muestras. Lavarse las manos adecuadamente después de manipular las muestras. Todos los procedimientos deben llevarse a cabo de acuerdo con normas de seguridad aprobadas.

Los reactivos en este kit incluyen sustancias de origen animal y/o humano. Aunque los materiales de origen humano han sido probados y encontrados negativos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), la hepatitis C y el virus de inmunodeficiencia humana, todos los materiales y muestras de pacientes deben ser manipulados y desechados como potencialmente infecciosos usando procedimientos de laboratorio seguros.

7. TOMA DE MUESTRAS.

La extracción de muestras (suero, plasma en EDTA, heparina o citrato) debe hacerse en tubos de recolección adecuados, usando el anticoagulante apropiado. Las muestras deben permanecer a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo se va a llevar a cabo pasadas las 8 horas, las muestras se deben de refrigerar entre +2 y +8° C. Si el ensayo no se va a completar las siguientes 48 horas desde la extracción de la muestra, entonces las muestras deben de almacenarse congeladas a - 20° C o menos, evitando ciclos de congelación y descongelación innecesarios. Las muestras deben estar correctamente inactivadas, un protocolo de inactivación puede ser mantener las muestras a 56° C durante 30 minutos antes de ser utilizadas..

7.1. Preparación de las muestras.

Las muestras se diluyen 1:100 en el tampón diluyente del anticuerpo y de la muestra (1X) incluido en el kit. Mezclar con un agitador tipo vórtex. Las muestras diluidas deben de ensayarse dentro de las siguientes 8 horas. Excepto TMB y solución de parada.

8. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

Atemperar los reactivos entre +18° C y +24° C (temperatura ambiente) durante 30 minutos.

Atemperar los reactivos entre +18° C y +24° C (temperatura ambiente) durante 30 minutos. Preparar una dilución 1:100 del anticuerpo conjugado HRP en tampón diluyente de la muestra y el anticuerpo. La dilución se debe de preparar un poco antes de su utilización, por ejemplo durante el paso de incubación de la muestra, ya que no es aconsejable dejar almacenada la dilución lista para usar del anticuerpo conjugado en HRP, debido a su escasa estabilidad.

El tampón de lavado incluido en el kit es un concentrado 20X. Si se observa cristalización en el tampón concentrado durante el almacenamiento, calentar a 37° C y agitar bien antes de hacer la dilución. Para llevar a cabo la dilución, se retira de la botella del concentrado la cantidad requerida para los ensayos y se diluye 1:20 en agua destilada.



Microplaca tapizada con el antígeno. Retirar las tiras necesarias para llevar a cabo el ensayo, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en la bolsa de papel aluminico junto con la bolsita de desecante.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.	Incubación de la muestra	Añadir 100 µl del control positivo, del control negativo, del calibrador y de la muestra preparada (dilución 1:100) dentro de los pocillos individuales de la microplaca. Se recomienda emplear dos pocillos por muestra, incluidos los controles y en particular para el calibrador. Incubar durante 60 minutos a +37°C. Cuando el proceso sea manual cubrir la microplaca con una de las láminas protectoras suministradas.
2.	Lavado	Si procede retirar la lámina protectora. Vaciar los pocillos y a continuación lavar 4 veces empleando 300 µl del tampón de lavado 1X en cada lavado. Dejar el tampón de lavado en cada pocillo entre 30 y 60 segundos por cada ciclo de lavado. Después del lavado, retire completamente todo el líquido de la microplaca golpeándola sobre papel adsorbente con las aberturas hacia abajo para eliminar todo el tampón de lavado residual.
3.	Incubación del conjugado	Añadir 100 µl de la dilución (1:100) del anticuerpo conjugado con HRP e incubar durante 30 minutos a +37°C. Cuando el proceso sea manual cubrir la microplaca con una de las láminas protectoras suministradas.
4.	Lavado	Si procede retirar la lámina protectora. Vaciar los pocillos y lavar como se describe anteriormente (paso 2).
5.	Reacción del sustrato	Añadir 100 µl de la solución de sustrato cromógeno (TMB) en cada pocillo de la microplaca. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (+18°C y +24°C) y protegida de la luz.
6.	Parada de la reacción	Añadir 100 µl de la solución de parada (1X – lista para usar) en cada pocillo, tratando de seguir el mismo orden en el que se añadió la solución de sustrato.
7.	Medición de la absorbancia	Medir las densidades ópticas (D.O) de cada pocillo en un espectrofotómetro de microplacas a 450 nm y a una longitud de onda de referencia de entre 620 y 650 nm dentro de los 30 minutos posteriores a haber añadido la solución de parada. Antes de la medida, agitar cuidadosamente la placa para asegurarse una distribución homogénea de la solución.

10. RESULTADOS

10.1. Control de Calidad

Los controles y el calibrador incluidos en el kit deben de ser usados en cada carrera. Los controles sirven como controles internos para validar los resultados del ensayo. De esta manera, los valores de densidad óptica (D.O) de los controles deben de estar dentro de los siguientes rangos, en caso contrario los resultados de ensayo no son válidos y se debería de repetir la prueba:

CONTROL	Valor de D.O
Control positivo	>1.5
Control negativo	<0.5
Calibrador	≥1.5 ≤0.5

Tabla de control de calidad para el ensayo de inmunoglobulina anti-SARS-CoV-2

Se recomienda que todos los ensayos incluyan los controles propios del laboratorio además de aquellos suministrados con este kit siempre que sea posible.

10.2. Interpretación de los resultados

Los resultados pueden ser evaluados calculando la relación o ratio entre la D.O de la muestra o el control, sobre la D.O del calibrador, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Ratio = \frac{D.O\ control\ o\ muestra}{promedio\ D.O\ calibrador}$$

Ratio	Resultado	Interpretación
<0.8	No reactivo	Negativo para anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2.
≥0.8 a <1.1	Reacción limitrofe	No se puede valorar la muestra con seguridad. Es recomendable repetir el análisis y si vuelve a salir un valor limitrofe, se recomienda solicitar, en una o dos semanas, una nueva muestra del paciente, para volver a analizarlo.
≥1.1	Reactivo	Positivo para anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2

^[1]

10.2. Evaluación cuantitativa de los resultados.

Este kit ELISA frente a la proteína S ha sido calibrado frente al Primer Estándar Internacional de OMS para inmunoglobulina anti-SARS-CoV-2 (humana), NIBSC Código 20/136. De esta manera es posible informar cuantitativamente de la concentración de inmunoglobulinas IgG en Unidades de Anticuerpos Unidos (BAU/ml) frente a la proteína S. Para ello el kit incluye un control positivo (estándar) de concentración conocida (consultar el certificado de análisis de cada kit, la concentración puede variar entre lotes) con el que poder hacer una recta de calibración mediante diluciones seriadas (Fig.1).

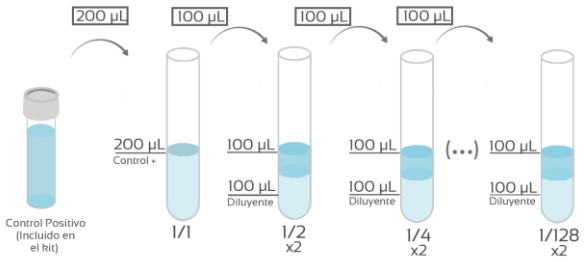


Figura 1: Esquema de dilución seriada (1:2) del control positivo incluido en el kit para la construcción de la curva de calibración. Solo a modo de ejemplo. Es posible que requiera un rango mayor rango dilucional.

Cada laboratorio tendrá que determinar su propio rango dilucional para la obtención del modelo de regresión, que será preferiblemente lineal, y para lo cual se recomienda utilizar dos réplicas por cada dilución y o puntos de concentración.

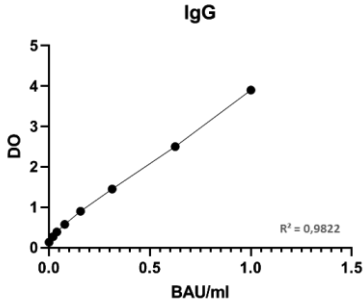


Figura 2: Curva de calibración representativa de un modelo de regresión lineal. En algunos casos será necesario comenzar empleando diluciones mayores (1:16 o 1:32) del control positivo como primer punto de concentración para la curva de calibración.

Por último, cabe destacar que la concentración del control positivo incluido en el kit también viene informada en µg/ml, además de en BAU/ml (consultar el certificado de análisis de cada kit, la concentración puede variar entre lotes).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de las muestras deben valorarse con combinación con la sintomatología clínica y otros procedimientos de diagnóstico.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por SARS-CoV-2. En una fase temprana de la infección la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra puede estar por debajo del límite de detección del ensayo.
- Un resultado positivo demuestra la presencia de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 y por lo tanto puede indicar tanto una infección en curso o aguda, como una infección pasada.
- Debido a la elevada similitud entre SARS-CoV-2 y otros coronavirus, no se puede excluir por completo reacciones cruzadas de anticuerpos, especialmente contra SARS-CoV.
- Los resultados del ensayo dependen de que los procedimientos de recolección y procesamiento de las muestras se hayan llevado a cabo correctamente.

12. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

12.1. Sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Para la evaluación de la sensibilidad diagnóstica se llevaron a cabo una par de estudios en 2 laboratorios clínicos diferentes en España.

En el primero se analizaron 67 muestras que se agruparon en función de la información disponible de cada muestra, en relación con los días que habían pasado desde la confirmación de la PCR y del inicio de los síntomas.

Resumen de los resultados de acuerdo a los días post-PCR:

Días después de la confirmación por PCR	N (número de muestras)	Negativo	Límitrofe	Positivo	%
0-7	10	4	1	5	50%
8-14	3	0	0	3	100%
15-21	5	0	0	5	100%
22-28	5	0	0	5	100%
29-35	2	0	0	2	100%
36-41	3	0	0	3	100%
42-48	3	0	0	3	100%
>48	2	0	0	2	100%
Total	34	4	1	29	

Contando los resultados limítrofes como negativos, el ensayo mostró más de un 50 % de concordancia positiva con la PCR en los primeros días posteriores a la confirmación por PCR. De igual forma, a partir del día 15 después de la PCR, la concordancia alcanza el 100% (n=21), mientras que más allá de los 30 días la concordancia se mantenía en el 100% (n =10). Resumen de los resultados de acuerdo al inicio de los síntomas:

Días desde el inicio de los síntomas	N (número de muestras)	Negativo	Límitrofe	Positivo	%
0-7	4	2	0	2	50%
8-14	6	2	1	3	50%
15-21	4	0	1	3	75%
22-28	6	0	0	6	100%
29-35	2	0	0	2	100%
36-48	5	0	0	5	100%
>48	6	0	0	6	100%
Total	33	4	2	27	

Contando los resultados limítrofes como negativos, el ensayo mostró más de un 50% de concordancia positiva con la PCR entre los días 0-7 posteriores al inicio de los síntomas. De igual forma, del 15 a los 21 días después del inicio de los síntomas, la concordancia con la PCR alcanza el 75% (n=4), mientras que de los 22 días en adelante la concordancia alcanzó el 100% (n =19).

Para determinar la especificidad diagnóstica, en el primer estudio se analizaron 76 muestras de donantes de sangre y sueros de pacientes con artritis reumatoide, tomadas antes del inicio del comienzo de la pandemia del SARS-CoV-2. Resumen descriptivo de los resultados de D.O obtenida en las dos series de muestras:

Muestras	N	Media (D.O)	DS	Mínimo	Máximo	Límite inferior	Límite superior
Donantes de sangre (2018)	66	0,3606	0,1417	0,16	0,71	0,32	0,39
Muestras suero (2017)	10	0,2455	0,0487	0,21	0,35	0,21	0,28

95% del intervalo de confianza para la media

Resumen de la especificidad diagnóstica correspondiente obtenida para las dos series de muestras contando los valores limítrofes como negativos:

Muestras	N	Negativo	Límitrofe	Positivo	Estimado
Donantes de sangre España (2018)	66	66	0	0	100%
Muestras suero (2017)	10	10	0	0	100%
Total	76	76	0	0	

En un segundo estudio, se seleccionaron 45 donantes divididos en 3 grupos, un primer grupo de pacientes vacunados con la vacuna de Pfizer-BioNTech (Comirnaty), 15 donantes infectados naturalmente por SARS-CoV-2 y 15 donantes ni infectados, ni vacunados. El objetivo del estudio fue tratar de identificar diferencias en el perfil de los vacunados e infectados con respecto de los donantes sanos no vacunados.



Figura 3: Diagrama de violín, comparando las muestras de plasma de donantes vacunados y donantes que han pasado por la infección frente a las muestras de donantes ni expuestos a la infección, ni vacunados. La significancia estadística se fue analizada con un test de Mann-Whitney.****p, 0,0001

El gráfico muestra una diferencia significativa entre las muestras de los donantes vacunados con Comirnaty y los donantes infectados naturalmente con respecto de las muestras procedentes de donantes no infectados y no vacunados.

12.2. Precisión.

Para el estudio de precisión intra-laboratorio se seleccionaron tres muestras (negativa, limítrofe y positiva) y siguiendo recomendaciones del CLSI y de la SEQC se seleccionó un diseño experimental 20 x 2 x 2, consistente en un estudio que al menos alcance los 20 días, con dos carreras por cada día que se lleva a cabo el ensayo y con dos réplicas por muestra ensayada en cada carrera. El ensayo se llevó a cabo en un sólo instrumento. Los resultados fueron los siguientes:

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3			
Resultado global	negativa	límitrofe	positiva			
N	78	78	78			
Valor medio	0,263	0,892	3,135			
	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
Repetibilidad	0,0276	11%	0,0367	4%	0,1919	6%
Interserial	0,0384	15%	0,0761	9%	0,2840	9%
Interdía	0,0345	13%	0,0592	7%	0,2577	8%
Intra-laboratorio	0,0437	17%	0,0891	10%	0,3321	11%

12.3. Especificidad analítica.

Para investigar la especificidad analítica se analizó la posible reactividad cruzada de los anticuerpos contra otros microorganismos que producen síntomas similares a la infección por SARS-CoV-2. De esta manera se seleccionaron 110 muestras caracterizadas como positivas para IgG para los siguientes microorganismos: MERS-CoV (1), H. Influenzae (17), RSV (16), Influenza A (1), Influenza B (13), Parainfluenza (19), Adenovirus (7), Enterovirus (5) M. pneumoniae (13), Legionella (6), C. pneumoniae (12).

Debido a la baja homología de la proteína S entre la familia de coronavirus, la reactividad cruzada con la mayoría de los representantes patógenos humanos de esta familia de virus están virtualmente excluidas.

Por otro lado, la homología de la proteína S entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV, que surgió en China en 2013, es de aproximadamente el 75%, lo que sugiere que es posible una reactividad cruzada de anticuerpos frente a ambos virus.

12.4. Interferencia.

Se analizó la posible interferencia que altos niveles de hemoglobina, colesterol y bilirrubina podrían tener sobre el rendimiento del ensayo. Para ello se seleccionaron muestras con diferentes concentraciones de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 que fueron enriquecidas con potenciales interferentes y analizadas posteriormente con el kit. La conclusión fue que el rendimiento del ensayo no se ve afectado por el uso de muestras lipémicas, ni ictericas, hasta concentraciones de 4 mg/ml de colesterol y 0,4 mg/ml de bilirrubina, respectivamente. Por el contrario, si se observó interferencia positiva en un porcentaje de entorno al 20 % de las muestras hemolíticas y con concentraciones de hasta 10 mg/ml de hemoglobina.

De igual manera, se ha comprobado que la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y factor reumatoide (FA) en la muestra puede provocar falsos positivos. En este sentido, se recomienda emplear una dilución (1:200) de las muestras de pacientes con pacientes con artritis reumatoide y /o enfermedades autoinmunes, para limitar dicha interferencia positiva.

Por otro lado, también se analizaron los efectos que las diferentes matrices potencialmente tendrían sobre los resultados del ensayo. Para ellos se seleccionaron 20 donantes con diferentes concentraciones de anticuerpos IgG específicos frente a SARS-CoV-2. A cada uno de los donantes se le tomó muestra en 4 tipos de tubos. 3 tubos de plasma cada uno con un anticoagulante diferente: EDTA, heparina y citrato. Y un tubo con gel separador para el suero. Las muestras se analizaron siguiendo las instrucciones del kit y en ningún caso se observaron diferencias significativas entre los diferentes anticoagulantes:

	N	Media	Desv	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Gel	20	1,4387	1,0163	0,7116	2,1657	0,19	2,73
EDTA	20	1,1590	0,9725	0,4633	1,8547	0,20	2,81
Heparina	20	1,1532	0,9785	0,4532	1,8531	0,17	2,86
Citrato	20	1,0698	0,9143	0,4157	1,7238	0,18	2,54
Total	80	1,2051	0,9704	0,5109	1,8993	0,18	2,73

13. BIBLIOGRAFÍA

- The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology. 2020;5(4):536-544.
- Zhou P, Yang X, Wang X, Hu B, Zhang L, Zhang W et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579(7798):270-273.
- Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. Cell Host & Microbe. 2020;27(3):325-328.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine. 2020;382(8):727-733.
- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris D, Holbrook M, Gamble A, Williamson B et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. New England Journal of Medicine. 2020;382(16):1564-1567.
- Belouzard S, Millet J, Licitra B, Whittaker G. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. Viruses. 2012;4(6):1011-1033.
- Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah N, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. Antiviral Research. 2020;176:104742.

14. EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	El contenido es suficiente para <n> análisis.
	Número de pedido.
	Etiquetado CE
	Medio de diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Fabricante.
	Caducidad.
	Número de lote.
	Observe las instrucciones de uso.
	Conservación de x°C a y°C.
	Contenido de cada test.
	Preste atención.
	Peligros biológicos.
	Microplaca de 96 pocillos (12x8).
	Buffer de lavado 20x.
	Buffer diluyente.
	Sustrato cromógeno de tetrametilbencidina.
	0,5M de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄).
	IgG control positivo.
	IgG control negativo.
	IgG calibrador.
	Conjugado de IgG anti-humano.
	Instrucciones de uso.
	Lámina protectora.

15. DATOS DEL FABRICANTE

	IMMUNOSTEP SL Av/ Universidad de Coimbra sn 37007 Salamanca – España
	Tel. +34 923 29 48 27 Fax. +34 923 29 48 27 E-Mail. info@immunostep.com Internet. www.immunostep.com