

LECTURA DE LOS RESULTADOS

A. VALIDACIÓN DEL ENSAYO

El test es válido si la DO₄₅₀ media del Control Positivo es > 0,5 y la relación (DO₄₅₀ media del Control Positivo / DO₄₅₀ media del Control Negativo) es > 5,0.

B. INTERPRETACIÓN DEL ENSAYO

Para la interpretación de los resultados es preciso obtener el valor de **IRPC** (Índice Relativo x 100) de cada muestra. Para obtener el valor de IRPC de cada muestra hay que aplicar la siguiente relación (en ella se utilizan los valores medios de DO₄₅₀ obtenidos con las 2 réplicas de los controles):

$$\text{IRPC} = \left[\frac{\text{DO}_{450} \text{ Muestra} - \text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo}}{\text{Media DO}_{450} \text{ Control Positivo} - \text{Media DO}_{450} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

VALOR IRPC	Estado Inmune frente a SARS-CoV-2
Menor o igual a 20,0	NEGATIVO – anticuerpos IgG no detectables frente a SARS-CoV-2
Superior a 20,0	POSITIVO – presencia de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2

DESARROLLO DEL ENSAYO

1. Controles y Muestras	
2. Incubar	 +36 °C - +38 °C
3. Lavar (3 veces)	
4. Solución de Conjugado	
5. Incubar	 +36 °C - +38 °C
6. Lavar (3 veces)	
7. Solución de Sustrato	
8. Incubar en la oscuridad	 +20 - +25 °C (Tª Ambiente)
9. Solución de Paro	
10. Lectura de Resultados (450 nm)	

ES

HIPRACHECK SARS-CoV-2 IgG

Detección y cuantificación de anticuerpos específicos IgG, frente a SARS-CoV-2 en suero o plasma humano, mediante ELISA indirecto

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Coronavirus 2 (CoV-2) responsable del Síndrome Respiratorio Severo Agudo (SARS-CoV-2) es un virus de ARN no segmentado y de polaridad positiva que presenta envuelta. Es el causante de la denominada Enfermedad por Coronavirus del 2019 (COVID-19). Existen dos tipos principales de pruebas para el diagnóstico laboratorial de la COVID-19; (i) las pruebas de detección ARN viral de SARS-CoV-2 (principalmente mediante qPCR) que identifican individuos infectados con el virus durante la fase aguda de la infección y (ii) las pruebas serológicas que identifican a los individuos que han estado en contacto con el virus y han desarrollado una respuesta humoral específica contra el mismo.

HIPRACHECK SARS-CoV-2 IgG es una prueba basada en un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto, diseñado para el análisis serológico de **muestras humanas de suero o plasma** (tanto de extracción venosa como capilar). Esta prueba permite la detección de IgGs dirigidas específicamente contra el SARS-CoV-2. Algunos de los principales determinantes antigénicos del virus, expresados de forma recombinante y altamente purificados, se han utilizado para tapizar los 96 pocillos de cada microplaca. De este modo, las IgGs específicas de SARS-CoV-2 presentes en las muestras pueden formar complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) con la proteína inmovilizada en el pocillo, quedando de este modo retenidas en el mismo. La presencia de estos complejos Ag-Ac se detecta gracias a un anti-suero anti-IgGs humanas conjugado a peroxidasa. La utilización de un sustrato cromogénico específico para esta enzima (TMB), revela la presencia de los complejos Ag-Ac retenidos en el pocillo. Así, la consiguiente aparición de color en cada pocillo es proporcional a la cantidad de IgGs específicas de SARS-CoV-2 presentes en la muestra inicial.

COMPOSICIÓN DEL KIT (SUFICIENTE PARA UN MÁXIMO DE 184 ENSAYOS)

PRODUCTO	CANTIDAD
Microplacas de 96 pocillos (divididas en tiras de 8 pocillos) tapizadas con antígeno específico de SARS-CoV-2.	2
Vial N°0: Solución de Lavado (10x).	60 ml
Vial N°1: Diluyente de Muestras (3x): Solución diluyente de muestras concentrada con colorante verde.	60 ml
Vial N°2: Solución de Conjugado: Solución de Anti-IgG humana/HRPO con colorante rojo. Lista para su uso.	15 ml
Vial N°3: Solución de Sustrato: Solución de TMB. Lista para su uso.	15 ml
Vial N°4: Solución de Paro: Solución H ₂ SO ₄ . Lista para su uso.	15 ml
Vial N°5: Control Positivo: Solución positiva de anticuerpo monoclonal IgG específico frente al SARS-CoV-2 con colorante amarillo. Listo para su uso.	1,0 ml
Vial N°6: Control Negativo: Solución negativa de anticuerpo monoclonal IgG específico frente al SARS-CoV-2 con colorante azul. Listo para su uso.	1,0 ml
Cubierta adhesiva para microplaca.	2
Instrucciones de uso.	1

Material necesario no suministrado:

Incubador a +37 °C, pipetas de precisión (mono o multicanal) con sus correspondientes puntas, tubos y placas de fondo en U para diluir las muestras, lector de placas de ELISA, agua destilada o desionizada y lavador de placas.

PRECAUCIONES

Leer atentamente el manual de instrucciones. Conservar los reactivos entre +2 y +8 °C (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre +2 y +8 °C con su cubierta adhesiva y dentro de la bolsa de plástico con el saquito anti-humedad. No exponer la Solución de Sustrato a la luz intensa o a agentes oxidantes. **El TMB es muy sensible a cualquier mezcla o contaminación, por lo tanto, no debe devolverse a la botella una vez sacado de ella. Se proporciona un 25% de exceso de este reactivo para permitir tomar un pequeño exceso cada vez que se utilice.** No utilizar los kits después de su fecha de caducidad ni mezclar los reactivos o las instrucciones de diferentes lotes de kit. Para mantener la precisión es necesario efectuar un pipeteado y unos lavados cuidadosos. No pipetear nunca los reactivos con la boca. Utilizar guantes durante todo el proceso. La Solución de Paro contiene ácido sulfúrico 2N (corrosivo), manipularla con cuidado. Descontaminar todo el material antes de su eliminación. **Los reactivos, sin abrir y convenientemente conservados, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior de la caja.**

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

A. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento del ensayo.

Solución de Lavado (10x) (Vial N° 0): Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución de Lavado (10x) a 9 volúmenes de **agua destilada o desionizada** (Ej. Para preparar 200 ml de Solución de Lavado diluida mezclar 20 ml de la solución concentrada (10x) con 180 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluida es estable durante 7 días.

Diluyente de Muestras (3x) (Vial N° 1): Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución Diluyente de Muestras (3x) a 2 volúmenes de **agua destilada o desionizada** (Ej. Para preparar 60 ml de Solución Diluyente de Muestras diluida, mezclar 20 ml de solución concentrada (3x) con 40 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluida es estable durante 7 días.

NOTA: En su forma concentrada es posible que después de periodos prolongados de almacenamiento a +4° C se formen cristales tanto en la Solución de Lavado (10x) como en la Solución Diluyente de Muestras (3x). Si se pretende reconstituir todo el volumen suministrado de una sola vez, simplemente agitando por inversión el frasco varias veces será suficiente para reconstituirlo. Si solo se reconstituye una parte del volumen (el que se vaya a utilizar para el ensayo) es preciso asegurarse de que los cristales hayan quedado totalmente redisueltos antes de preparar la dilución. Para acelerar el proceso se puede sumergir el frasco en un baño a +28 – +37 °C durante 10 – 15 min. Para evitar la aparición de cristales en la solución de lavado concentrada, ésta puede almacenarse a temperatura ambiente durante toda la vida del kit.

B. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los controles positivo y negativo están listos para su uso y no requieren dilución. El resto de las muestras deben diluirse **1/100** en Solución Diluyente de Muestras diluida. Por razones de bioseguridad se recomienda la inactivación previa de las muestras mediante un tratamiento térmico a +56 °C durante 30 minutos. Este tratamiento está descrito que inactiva el SARS-CoV-2.

Si se dispone de placas de serología de 96 pocillos con fondo en U y de pipeta multicanal capaz de dispensar con precisión volúmenes de 10 µl, se recomienda **realizar la dilución 1/100 en dos pasos** del siguiente modo: Diluir inicialmente, en la placa de serología, 10 µl de muestra en 190 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida y, a continuación, transferir 10µl de esta dilución 1/20 de la muestra a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 40 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida.

C. DESARROLLO DEL ENSAYO

- A. Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y asegurarse de que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.
- B. Preparar una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control. Los controles positivo y negativo deben siempre analizarse por duplicado.
 1. Despegar la cubierta adhesiva de plástico y añadir **50 µl de los controles sin diluir y 50 µl de las muestras diluidas 1/100** a los pocillos apropiados en la placa.
 2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +36 °C - +38 °C**.
 3. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
 4. Añadir **50 µl de Solución de Conjugado** (Vial N°2) a cada pocillo.
 5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +36 °C - +38 °C**.
 6. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
 7. Dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Sustrato** (Vial N°3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
 8. Sellar la placa con una tapa adhesiva e incubar a **temperatura ambiente (+20 °C - +25 °C)** en la oscuridad **durante 15 minutos**.
 9. Quitar la tapa adhesiva y dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Paro** (Vial N°4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.
 10. Limpiar la superficie inferior de la placa con un papel absorbente. **Leer** la placa utilizando un lector de ELISA equipado con un filtro de **450 nm**. Realizar previamente el blanco con el aire. Registrar los resultados.