



Certificación de Aeskulisa® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM para SARS-CoV-2

Núñez Martha

Labotech de Venezuela
marthanunez@labotechla.com
orcid: 0009-0004-5221-3670
Zulia-Venezuela

Valeri Lenin

Instituto Autónomo Hospital
Universitario de Los Andes
Servicio de Laboratorios
leninconstantinovaleriramirez@gmail.com
orcid: 0009-0009-0095-6698
Mérida-Venezuela

Eduardo Chalbaud

Universidad Politécnica Territorial
Kléber Ramírez
Comunidad de Geociencias
chalbaud.eduardo09@gmail.com
orcid: 0000-0002-1567-8151
Mérida-Venezuela

Fecha de recepción: 02/07/2023

Fecha de aprobación: 25/07/2023

Resumen

La validación de los kits de inmunoensayo es un paso fundamental para la obtención del registro sanitario ante el Ministerio del Poder Popular para la Salud en Venezuela; y así poder comercializar en el territorio venezolano. Esta validación abarca diversas metodologías, como el ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima (ELISA); el análisis por inmunofluorescencia (IFA); y el inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA), entre otras. Estos procedimientos se llevan a cabo según protocolos nacionales e internacionales de certificación. El objetivo es verificar las características de desempeño establecidas por el fabricante y evaluar su rendimiento. Por ello, este artículo muestra un estudio retrospectivo, que determinó el rendimiento diagnóstico de dos kits de metodología de ELISA de la casa comercial

AESKU® para la detección de anticuerpos de espiga (S1) IgG e IgM en pacientes con el virus SARS-CoV-2, utilizados en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Para el procesamiento estadístico se utilizó el software estadístico SPSS IBM 16®, los resultados obtenidos fueron para la S1 IgG: precisión del 97,33 %, exactitud > 99 %, sensibilidad 93,78 % y especificidad > 99 %; y para la S1 IgM precisión del 94,20 %, exactitud > 99 %, sensibilidad 96,51 % y especificidad 92,85 %. Ello corroboró que las características reflejadas en los documentos emitidos por el fabricante de Aeskulisa® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM en cuanto a la calidad, exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad, son óptimas para la determinación de anticuerpos de espiga S1IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en suero o plasma humano.

Palabras clave:

AESKU; anticuerpos de espiga; certificación; COVID-19; SARS-CoV-2

Certification of AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG and IgM for SARS-CoV-2

Abstract

Validation of immunoassay kits of different methodologies such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), IFA immunofluorescence analyses, chemiluminescent immunoassay (CLIA), among others; under national and international certification protocols, it is one of the steps to obtain the sanitary registry before the Ministry of Popular Power for Health; and thus be able to be marketed in the Venezuelan territory. The objective is to verify the performance characteristics established by the manufacturer and to evaluate the performance of said methodologies. For this reason, this article shows a retrospective study, which determined the diagnostic performance of two ELISA methodology kits from the AESKU® commercial house for the detection of

IgG and IgM spike (S1) antibodies in patients with the SARS-CoV-2 virus, used at autonomous institute university hospital of the Andes. For statistical processing, the SPSS IBM 16® statistical software was used. The results obtained were for S1 IgG: 97,33 % precision > 99 % accuracy, 93,78 % sensitivity, and > 99 % specificity; and for the S1 IgM precision of 94,20 %, accuracy > 99 %, sensitivity 96,51 % and specificity 92,85 %. This corroborates that the characteristics reflected in the documents issued by the manufacturer of AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG and IgM in terms of quality, accuracy, precision, sensitivity and specificity, are optimal for the determination of S1 IgG spike antibodies and IgM against SARS-CoV-2 in human serum or plasma.

Keywords:

AESKU; certification; COVID-19; SARS-CoV-2; spike antibodies



Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), que ha generado una pandemia, es provocada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Este virus pertenece a la misma especie de coronavirus que causó el brote de SARS hace 18 años (Abebe et al., 2020; Chen et al., 2020; Peiris et al., 2003; Zhu et al., 2019). Para entrar en las células diana, el SARS-CoV-2 utiliza la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor. Además, para activar la proteína pico viral (S), usa la serina proteasa llamada transmembrana 2 (TMPRSS2) (Hoffman, 2020; Ou, 2020).

Tanto ACE2 como TMPRSS2 son abundantes, particularmente en el tracto respiratorio superior. Una creciente cantidad de evidencia sugiere que las respuestas de anticuerpos y células T son críticas para recuperarse de COVID-19 (Braun, 2020; Grifoni, 2020; Ni, 2020; Odak, 2020; Thevarajan, 2020). Como resultado, las respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 han recibido mucha atención como una forma de evaluar con precisión la prevalencia de la infección (Petherick, 2020).

Este virus de 120 a 160 nanómetros tiene una envoltura vírica en la que se integran varias proteínas de membrana, como las llamadas Spike glicosilada(S), la Envelope (E) y la Matrix (M). Dentro del virus hay una cápside, que se genera a partir de la proteína de la nucleocápside (N) y que forma complejos con el ARNmc+. La proteína Spike(S) se puede dividir en los dominios S1 y S2. El S1 transmite la unión al receptor superficial ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) de la célula huésped, mientras que el dominio S2 respalda la fusión del virus con la membrana celular.

El principal objetivo de este estudio es evaluar las características de desempeño del AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM que detecta anticuerpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 por la metodología de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay®, Wendelsheim, Alemania) al usar sueros controles con valores asignados y materiales de referencia. Este estudio es también el primer modelo de validación nacional descrito hasta la fecha y el primer estudio que informa del desempeño del AESKULISA® Kit de IgM e IgG SARS-CoV-2.

Esta validación es un requisito para la asignación del registro sanitario lo cual permite la implementación rutinaria de esta prueba serológica en todos los laboratorios venezolanos al racionalizar su uso con fines clínicos.

Materiales y métodos

Estudio retrospectivo realizado en el Laboratorio de Hormonas, Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes en la ciudad de Mérida ubicado en Venezuela, en marzo del 2021.

Desarrollo del ensayo

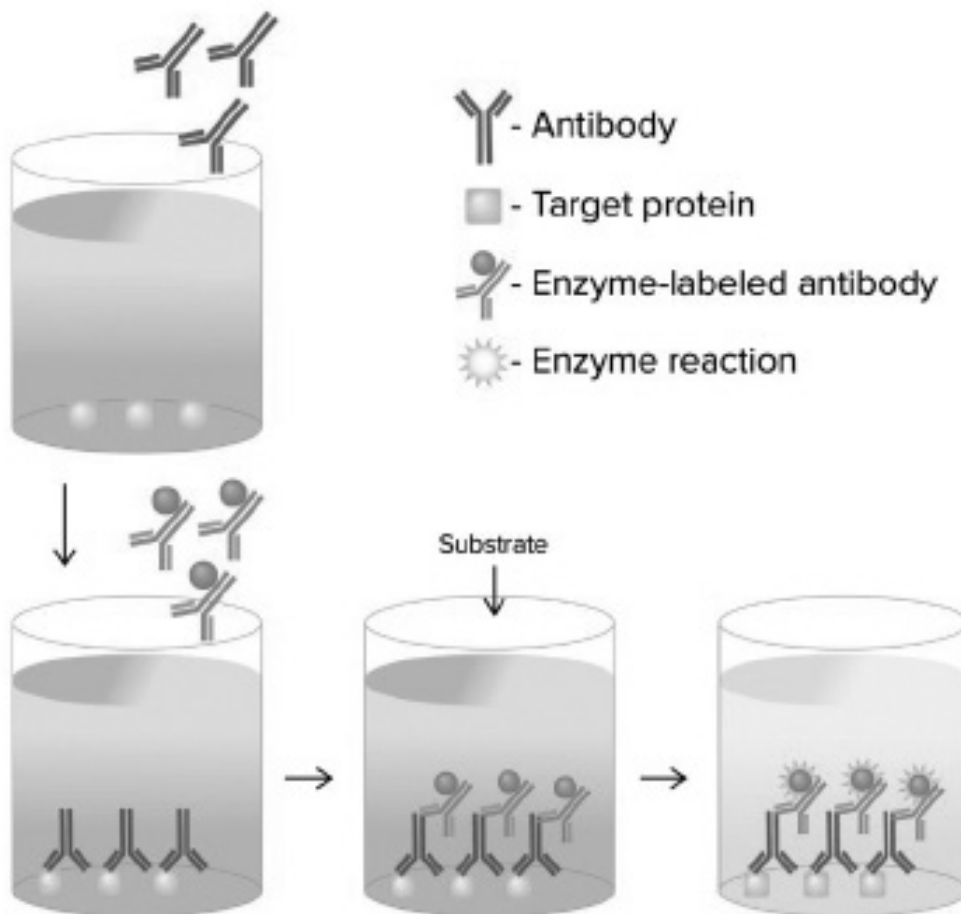
Los inmunoensayos AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM son ensayos cualitativos y cuantitativos para la detección de anticuerpos IgG e IgM humanos en el suero contra el dominio S1 de la proteína espiga glicosilada de SARS-CoV-2. AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgM se utiliza para ayudar a detectar infecciones agudas. AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG permite confirmar el contacto con un agente patógeno y ayuda a determinar el estado inmunitario.

AESKULISA® (AESKU Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es un procedimiento inmunológico acreditado especialmente para la detección de anticuerpos. La reacción de detección se basa en la interacción específica de anticuerpos y antígenos. Con esta finalidad, las tiras de ensayo de las placas de micro titulación de AESKULISA® están recubiertas con antígenos específicos de agentes patógenos infecciosos para la unión con los anticuerpos presentes en la muestra del paciente. Otros anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa detectan los inmunocom-

plejos que se forman de este modo. La enzima cataliza una reacción en la que un sustrato incoloro se transforma en un producto de color (Figura N° 1). La potencia de señal del producto de la reacción es proporcional a la actividad de anticuerpos en la muestra y se detecta mediante fotometría.

La detección de anticuerpos con AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM se basa en el uso del dominio S1 de la proteína de espiga glicosilada de SARS-CoV-2.

Figura N° 1. Representación esquemática del principio del ensayo ELISA de S1 IgG e IgM para SARS-CoV-2



Fuente: Lecturio (2022).



Se hizo un seguimiento preciso de las instrucciones para así corroborar las características establecidas por el fabricante. Para el uso adecuado de los inmunoensayos AESKULISA® solo se utilizaron los reactivos AESKULISA®. Estos no se intercambiaron por reactivos de otros fabricantes.

Las placas de microtitulación, los calibradores, los controles y los conjugados de los inmunoensayos AESKULISA® que se utilizaron dentro del ensayo fueron de los lotes 20360 (ref. 6125) para la IgG y 20360 (ref. 6126) para la IgM, ya que no se deben usar interlotes.

Las valoraciones de los calibradores y controles se hicieron siguiendo el certificado de control de calidad

(COA) (Tabla N° 1) y los criterios de validación del ensayo DO (Densidad óptica): DO CAL A < 0,3; DO CAL A < DO CAL B < DO CAL C < DO CAL D, DO CAL D > 1,3 para ambos lotes. Los controles negativos deben valorarse de forma negativa. Los controles positivos no deben valorarse de forma negativa. Para el uso cuantitativo de los inmunoensayos AESKULISA® los controles positivos deben encontrarse en el período de validez que está indicado en el COA específico de cada lote de AESKULISA®. Para el uso cualitativo de los inmunoensayos AESKULISA® los valores de DO del calibrador de corte B (CAL B) aplicado doblemente no deben diferir entre sí en más de un 20 %.

Tabla N° 1. Datos del COA (Certificado de control de calidad) AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM

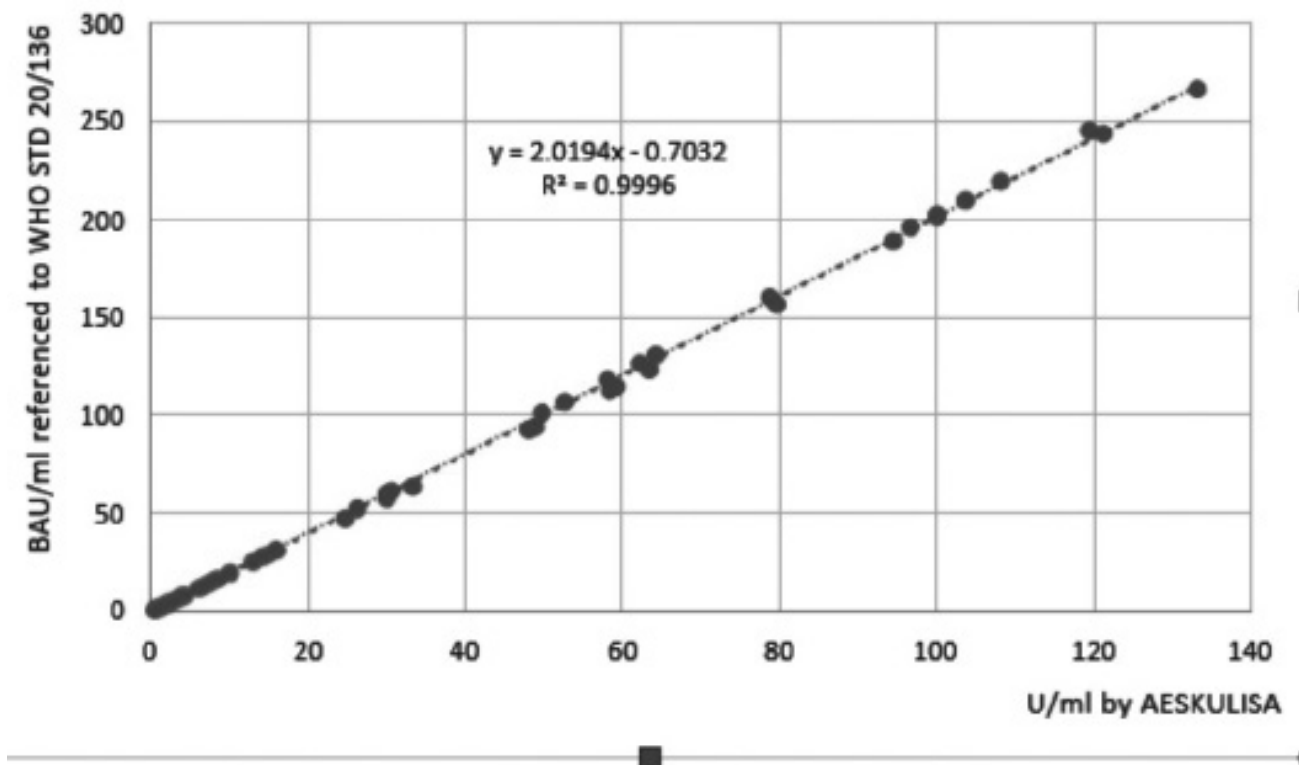
Descripción	Rango	Promedio
Control negativo	0 - 8 U/ml	-
Control positivo IgG	25 - 75 U/ml	50 U/ml
Control positivo IgM	24 - 72 U/ml	48 U/ml
Dudoso	8 - 12 U/ml	-
Rango de medición	3 - 100 U/ml	-

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

La correcta interpretación de los resultados debe hacerse tomando en cuenta el estudio de “establecimiento del panel internacional de normas y referencias” de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para anticuerpos anti-SARS-CoV-2, ya que el kit de AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG está calibrado en Unidades Arbitrarias (U/mL), sin embargo, para recalibrarlo

al estándar de la OMS NIBSC 20/136 se realizó un estudio en el que se obtuvo un factor de correlación de 2, según se demuestra en la Figura N° 2; por lo que todas las concentraciones obtenidas en el ensayo deben multiplicarse por 2 para así reportar los resultados en BAU (Binding Antibody Unit) unidades internacionales sobre mililitro.

Figura N° 2. Correlación BAU/ml contra Aesku U/ml usando AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG



Fuente: Aeskulisa (2020).



Para evitar reacciones cruzadas o contaminaciones de los kits, se utilizaron procedimientos basados en técnicas asépticas para la extracción de los reactivos. Se trabajó usando pipeteo inverso y puntillas nuevas. La reproducibilidad de los resultados dependió, entre otros, de la homogenización exhaustiva de los reactivos ante su uso, si no existe una dilución muestra-reactivo correcta según los principios básicos de trabajo, tendríamos una pérdida de sensibilidad de detección. Se cuidaron los niveles de temperatura los cuales oscilan entre 20-30 °C y se estandarizó para el estudio 22,7 °C.

Durante el almacenaje y la incubación, los reactivos se protegieron de fuentes de luz intensa. Nunca se expusieron a temperaturas superiores a 37 °C. Después de su uso, los reactivos se cerraban bien para evitar que se secan o contaminaran.

Recolección de la muestra

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos (BD Vacutainer SST II advance, BD EDTA, Plymouth, Reino Unido) de acuerdo con el procedimiento operativo estandarizado. A continuación, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, se recogió el suero y el plasma, y se analizaron de forma inmediata. En caso de que los análisis se retrasaran, las muestras se alicuotaron y almacenaron entre 2 y 8 °C durante un máximo de tres días. Si el almacenamiento era superior a ese tiempo, la muestra de suero se guardó a -20 °C.

Las muestras congeladas se descongelaron durante una hora antes de su procesamiento a temperatura ambiente el día del análisis, y se evitó congelar y descongelar más de una vez. Las muestras

descongeladas se agitan y centrifugan antes del análisis. Los sueros no se inactivaron antes de medir los anticuerpos.

Procedimientos analíticos

Se realizaron los análisis siguiendo las instrucciones de los fabricantes, se examinaron muestras de suero referenciales con RT-PCR positivos y RT-PCR negativos; así como también con valores asignados por quimioluminiscencia. Los sueros controles utilizados son parte del panel de referencia que se encuentran en el Laboratorio de Hormonas y Pruebas Especiales del Instituto Autónomo del Hospital Universitario de Los Andes

El análisis cuantitativo y cualitativo de los anticuerpos IgM e IgG anti-SAR CoV-2 dirigidos contra el dominio RBD en su porción S1 del virus se realizó mediante el AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM kits mediante metodología de ELISA en un Autobio PHOMO® analizador de microplacas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada placa ELISA, se calculó una relación entre la curva de calibración de los calibradores y las muestras de suero en duplicado (Tabla N° 2). Los criterios de interpretación proporcionados por los fabricantes se encuentran en la Tabla N° 3.

Tabla N° 2. Concentraciones de calibradores de AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM

Calibradores	Concentración (U/ml)
Calibrador A	1
Calibrador B	10
Calibrador C	30
Calibrador D	100

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Tabla N° 3. Criterios de interpretación de AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM

Prueba	Resultado	Resultado IgG	Interpretación
Metodología ELISA	< 8 U/ml	< 16 BAU/ml	Negativo
	Entre 8-12 U/ml	Entre 16-24 BAU/ml	Dudoso*
	> 12 U/ml	> 24 BAU/ml	Positivo

* Procedimiento: Para la muestra dudosa o *borderline* se debe volver a procesar la muestra en duplicado, en conjunto con una nueva muestra. Si al menos dos de los tres resultados son dudosos, la muestra es positiva. Si dos de los resultados, tres son < 8 U/ml o 16 BAU/ml la muestra será negativa.

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).



Evaluación de los rendimientos analíticos del AESKULISA[®] SARS-Cov-2 NP IgG E IgM kits

La evaluación del rendimiento se realizó de acuerdo con el documento EP 15-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute. Los criterios de aceptación se definieron de acuerdo con el desempeño informado por el fabricante y se resumen en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4. Características de rendimiento de los kits AESKULISA[®] SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM reportadas por el fabricante

Prueba	Resultado	Resultado IgG	Interpretación
Metodología ELISA	< 8 U/ml	< 16 BAU/ml	Negativo
	Entre 8-12 U/ml	Entre 16-24 BAU/ml	Dudoso*
	> 12 U/ml	> 24 BAU/ml	Positivo

* Procedimiento: Para la muestra dudosa o *borderline* se debe volver a procesar la muestra en duplicado, en conjunto con una nueva muestra. Si al menos dos de los tres resultados son dudosos, la muestra es positiva. Si dos de los resultados, tres son < 8 U/ml o 16 BAU/ml la muestra será negativa.

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con el software estadístico SPSS IBM16® y software Microsoft Office Excel 2010. Además, se midieron los coeficientes de variación, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo intraensayo para evaluar la repetibilidad, el rendimiento y la precisión del ensayo diseñado internamente.

Resultados

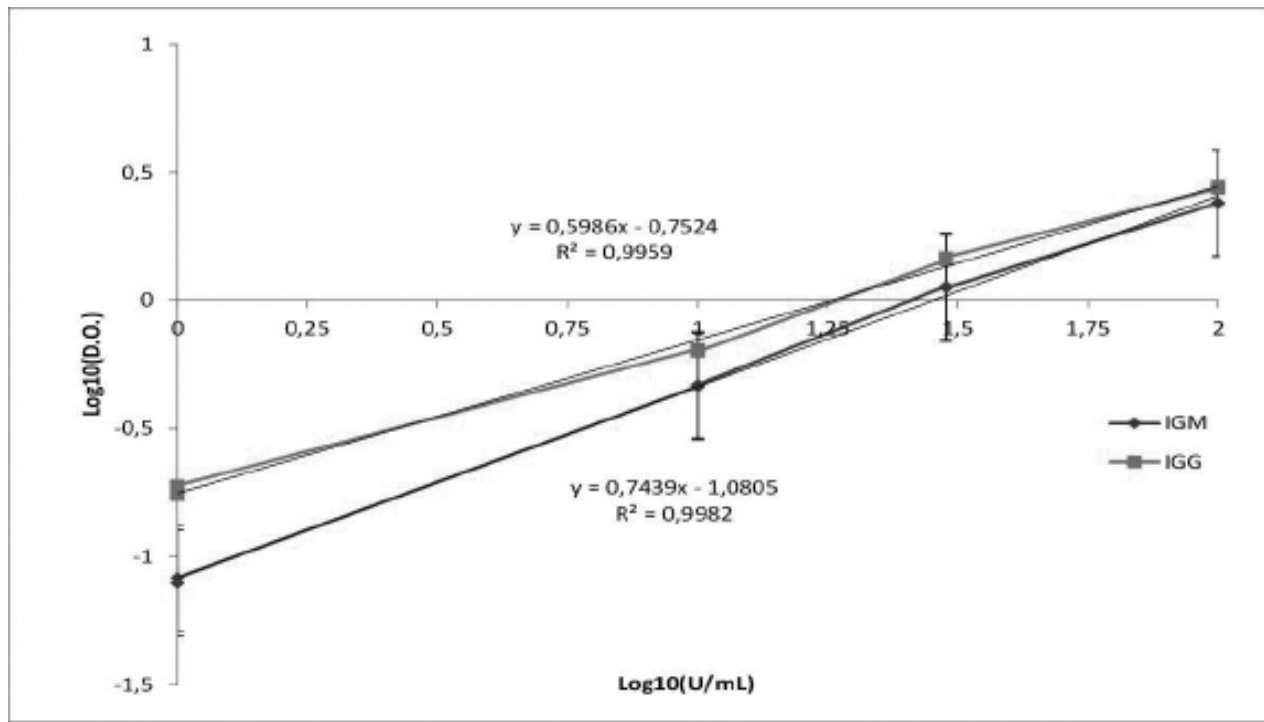
El diagrama de dispersión entre el logaritmo de las absorbancias o densidad óptica DO (eje Y) y los valores de concentración logarítmica (U/mL) (eje X) y se muestra en la Figura N° 3 como puntos múltiples que caen a lo largo de una línea recta como una curva estándar, estos se trazan a partir de los datos de la Tabla N° 5 que incluye el promedio de absorbancia de DO de cada estándar y la Tabla N° 6 los controles negativos y positivos para anticuerpos de espiga IgG e IgM de los kits.

Tabla N° 5. Media \pm desviación estándar de los valores de DO de diferentes estándares de anticuerpos de espiga IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en los kits AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y S1 IgM

	U/mL	IgG (DO)		IgM (DO)	
		\bar{X}	Media	DS	Media
Cal A	1	0,182	0,0113137	0,081	0,0028284
Cal B	10	0,640	0,0106066	0,466	0,0049497
Cal C	30	1,456	0,0296985	1,128	0,0106066
Cal D	100	2,766	0,0480833	2,399	0,0042426

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Figura N° 3. Curva estándar de los anticuerpos de espiga contra SARS-COV-2 de los kits AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y S1 IgM



Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Tabla N° 6. Media ± desviación estándar de los valores de DO de los controles negativos y positivos de anticuerpos de espiga IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en los kits AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y S1 IgM

	U/mL	DO		U/mL
	X	Media	DS	Valor esperado
CN IgG	1,07	0,184	0,01484924	0-8
CP IgG	57,43	1,998	0,01979899	25-75
CN IgM	5,00	0,117	0,00707107	0-8
CP IgM	34,73	1,559	0,00353553	25-75

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Para el ensayo ELISA de detección de SARS-CoV-2, se mostró una fuerte correlación positiva entre la absorbancia de DO y la concentración logarítmica de los anticuerpos (Ac) S1 IgG e IgM con una medida estadística de R2 (coeficiente de determinación) = 0,9959 y 0,9982, respectivamente; además, se estimó una ecuación de regresión lineal para de-

terminar la concentración logarítmica desconocida de Ac S1 IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en los kits, así como de los controles.

La evaluación de los calibradores se llevó a cabo en dos corridas analíticas cumpliendo los criterios de validación de la prueba, como se muestra en la Tabla N° 7.

Tabla N° 7. Criterios de validación AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y S1 IgM para los calibradores

	Densidad óptica DO IgG	Densidad óptica DO IgM
DO Cal A < 0,3	0,184	0,081
DO Cal A < DO Cal B < DO Cal C < DO Cal D	0,184 < 0,640 < 1,456 < 2,766	0,081 < 0,466 < 1,128 < 2,399
DO Cal D > 1,3	2,766	2,399

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Veracidad

Los niveles de los controles de calidad bajos mostraron un valor medio para la S1 IgG de $1,07 \pm 0,01$ U/ mL y para la S1 IgM de $5,0 \pm 0,01$ U/ mL sobre 20 muestras analizadas. El alto nivel de control de calidad evidenció un valor medio para la S1 IgG $57,43 \pm 0,02$ U/mL y para la S1 IgM $34,73 \pm 0,01$ U/ mL. Estos resultados concuerdan con los criterios de aceptación y están en línea con las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Sin embargo, este no proporciona un grado de incertidumbre para los

niveles de control de calidad negativos, sino que solo informa un rango, lo que impide una evaluación adecuada de la veracidad para los controles negativos.

Precisión

La precisión se determinó calculando la media, la DE y el CV para cada conjunto de mediciones repetidas de concentración entre análisis. Para que el punto de decisión se considere válido, la media ± 2 SD

para cada concentración no debe superponerse. La precisión calculada para IgG fue de 97,33 %, y para la IgM 96,50 %.

La sensibilidad y la especificidad diagnóstica de los kits se determinaron mediante la proporción de

individuos que poseen pruebas positivas mientras están enfermos y la proporción de pruebas negativas al estar sanos; la precisión y exactitud del control, se verificaron comparando los valores esperados con los valores obtenidos y la reproducibilidad de este, como se muestra en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Parámetros de validación de kits AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y S1 IgM

	Sensibilidad diagnóstica	Especificidad diagnóstica	Precisión del control	Exactitud del control
AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG	93,78 %	97,5 %	97,3	> 99 %
AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgM	96,5 %	92,9 %	94,2	> 99 %

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

La validación cualitativa se realizó mediante la comparación de la DO de la muestra del paciente con la DO media del calibrador B, analizados por duplicados (calibrador de corte CAL B). Si la densidad óptica de la muestra del paciente se sitúa en un rango ± 20 % del promedio de la DO del calibrador B,

este se considerará como borderline o dudoso, en caso de que la DO sea más elevada, la muestra del paciente se considerara positiva y en el caso que la DO sea más baja se considerara negativa. El valor del calibrador B tanto para el IgG como para la IgM no difiere entre sí del 20 % (Tabla N° 9).

Tabla N° 9. Validación cualitativa para los kits AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG y NP IgM

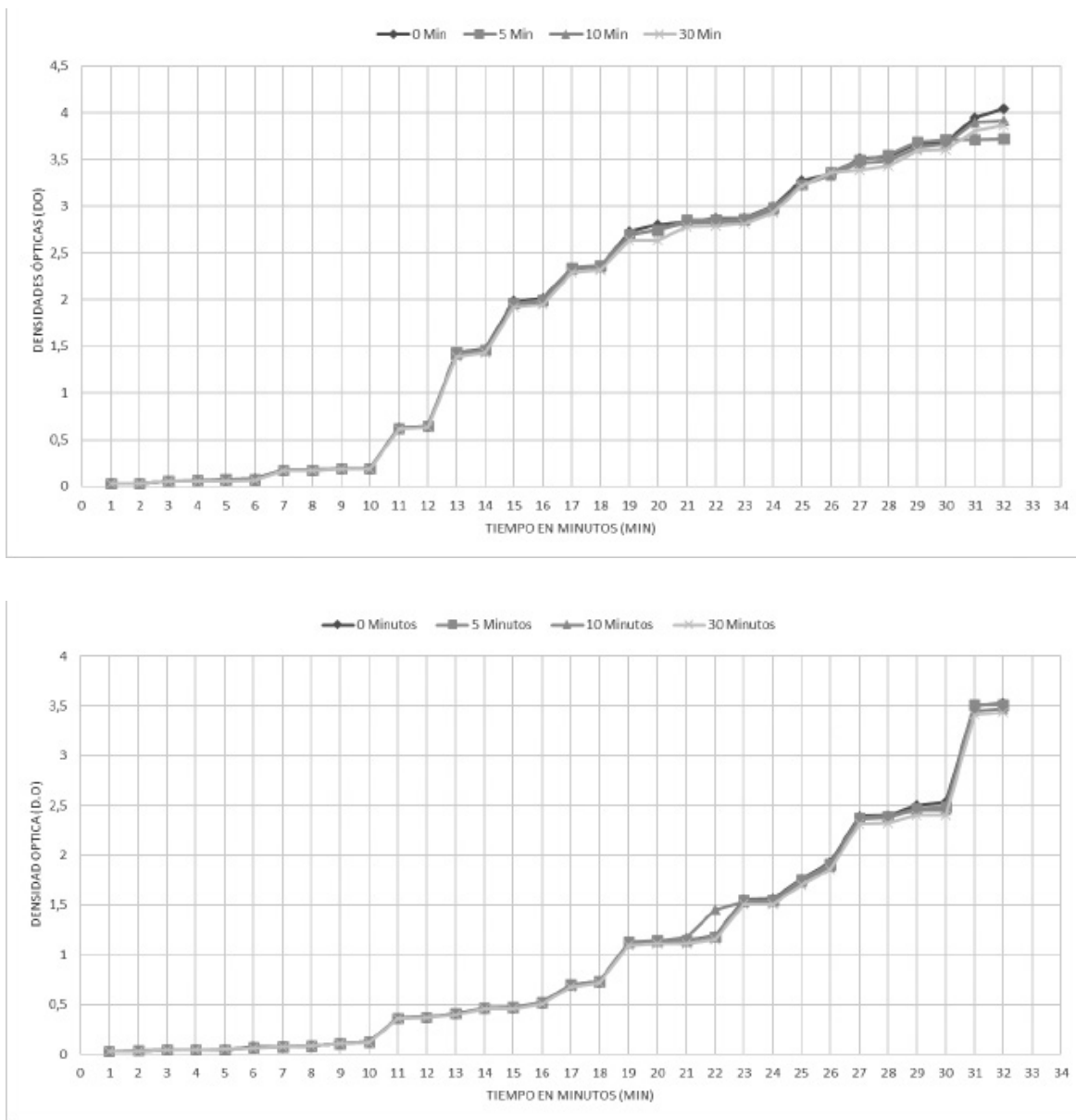
Prueba	Valor obtenido (DO)	Interpretación
IgG	< 0,512	Negativo
	0,512 - 0,767	Dudoso*
	> 0,767	Positivo
IgM	< 0,372	Negativo
	0,372 - 0,559	Dudoso*
	> 0,559	Positivo

* Procedimiento: Para la muestra dudosa o *borderline* se debe volver a procesar la muestra en duplicado, en conjunto con una nueva muestra. Si al menos dos de los tres resultados son dudosos, la muestra es positiva. Si dos de los resultados/tres son < 0,512 (IgG) o < 0,372 (IgM) la muestra será negativa.

Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).

Se realizó la medición de las densidades ópticas en un plazo de 30 minutos a 450 nm con un diferencial de 630 nm, para comprobar la estabilidad en el tiempo de lectura que indica el fabricante y se muestra en la Figura N° 4.

Figura N° 4. Lectura de la placa a los 0, 5, 10 y 30 minutos de los kits para SARS-COV-2 AESKULISA® SARS-CoV-2 S1 IgG (A) e IgM (B)



Fuente: Elaboración propia de los autores (2023).



Conclusión

En este estudio, las características de rendimiento del ensayo ELISA de anticuerpos de espiga de Aeskulisa® SARS-CoV-2, se validaron al observar la concordancia cualitativa y cuantitativa de sus resultados para paneles de suero referenciales con los del ensayo comercial de anticuerpos de espiga IgG e IgM anti-SARS-CoV-2.

El análisis cualitativo desarrollado en el ensayo es de tipo instrumental por lo que en este sistema de medidas el resultado que se obtiene se tiene que transformar en una respuesta binaria del tipo SÍ/NO, por lo tanto, no implica un tratamiento de datos, más allá de determinar la presencia o la ausencia de los anticuerpos en los sueros pacientes.

Se comprobó que las características de los kits Aeskulisa® SARS-CoV-2 S1 IgG e IgM de la casa comercial Aesku®, especificadas en los insertos y otros documentos emitidos por el fabricante, así como el uso que le hemos dado, comprueban la calidad, la presión, la sensibilidad y la exactitud para la determinación de anticuerpos de espiga IgG e IgM contra SARS-CoV-2 en suero o plasma humano. No hubo una diferencia significativa en los resultados reportados con matriz de plasma con respecto al suero, por ello se incluyeron como resultados únicos.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de Labotech de Venezuela del Departamento de Soporte Científico ubicado en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia.

Referencias

Aesku Diagnostics. (2020). Manual de instrucciones. Wendelsheim.

Behnke, G. (2019). Validación del kit de benzodiazepinas ELISA de Neogen usando clonazepam como molécula diana para sangre y orina. *Revista de Toxicología Analítica*, 1-7.

Braun, L. y Frensch, G. (2020). Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *Nature*.

Chen, Zhou, Dong, Qu, Gong, & Han (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 507-13.

CLSI (2014). *Verificación del usuario y la estimación del sesgo*. Wayne: CLSI. Documento EP 15-A3.

Abebe, E.; Dejenie, T.; Shiferaw, M.; Malik, T. (2020). The newly emerged COVID-19 disease: a systematic review. *Virology*, 17.

Gaudin, V. (2013). Validation of two ELISA kits for the screening of tylosin and streptomycin in honey according to the European decision 2002/657/EC. *Taylor & Francis group*, 93-109.

Grifoni, Weiskopf, Ramirez, Mateus, Dan, & Morderbacher (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, 1489-501.

- Hoffmam, Klein, Schroeder, Kruger, Herrler, & Erichsen (2020). SARS-CoV-2 °Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 271-80.
- Lecturio (2022). Lecturio. Retrieved from <https://www.lecturio.com/es/concepts/inmunoensayos/MPPS>. (1999). Resolución N° 55 (*Gaceta Oficial* N° 36.843 del 3 de diciembre de 1999). Caracas: MPPS.
- Ni, Ye, Cheng, Feng, Deng, & Zhao (2020). Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 °Convalescent Individuals. *Immunity*, 971-7.
- Odax, Barros-Martins, Bosnjak, Stahl, & Wiesner (2020). *Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19*. *EbioMedicine*.
- OMS (2020). Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. Geneva: WHO/BS/2020.2403.
- Ou, Liu, Lei, Li, Mi, & Ren, et al. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV-2. *Nat Commun.*, 1620.
- Peiris, Lai, Poon, Guan, Yam, & Lim (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*.
- Petherick, A. (2020). Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet*, 1101-2.
- Ruisánchez, I. (2010). Validación de métodos analíticos cualitativos. Departamento de Química Analítica y Química, 1-11.
- Thevarajan, Nguyen, Koutsakos, Druce, Caly, & Van de Sandt (2020). Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nat Med*, 453-5.
- Tre-Hardy, M. (2020). Validación de un ensayo quimioluminiscente para anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2. *Clin Chem Lab Med*, 1357-1364.
- Zhu, Zhang, Wang, Li, Yam, & Lim. (2019). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China. *N Engl J Med*, 727-33.