

ELA CHEMSTRIP® COVID-19




Kit para la detección del virus SARS-Cov2 basado en amplificación isotérmica y detección rápida por tiras reactivas.

Kit for the detection of SARS-Cov2 virus based on isothermal amplification and quick detection by lateral flow.

Autorizado por ANMAT PM 2360-05



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

ELA CHEMSTRIP® COVID-19

Presentación: 100 determinaciones

Contenido

Tiras reactivas (en envoltorio trilaminado para protección de la luz y humedad)	100 tiras violetas (RNAsaP, 5 sobres) y 100 tiras celestes (GenE, 5 sobres)
Diluyente de muestra	2 x 40 ml
Tubos 1,5 ml	200 tubos
Control interno de extracción	1 x 0,5 ml
Mix ELA 2X	1 x 1,5 ml
Primer Mix 10X GenE	1 x 0,2 ml
Primer Mix 10X RNAsaP	1 x 0,2 ml
Enzimas 1 U/ μ l	1 x 0,2 ml
Control positivo ELA	1 x 0,04 ml
ddH ₂ O DNAsa y RNAsa free	1 x 1 ml
Manual de instrucciones	1

Nombre y aplicación

ELA CHEMSTRIP® COVID-19

Kit para la detección de SARS-Cov2 en muestras de humanos.

El kit ELA CHEMSTRIP® COVID-19 es un kit para la detección del virus SARS-Cov2 mediante amplificación isotérmica (Easy Loop Amplification, ELA®) y detección inmunocromatográfica (CHEMSTRIP®). La detección se realiza sobre ARN genómico del virus purificado a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo, orofaríngeo y lavado broncoalveolar.

Introducción

El COVID-19 es una enfermedad infecto-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 de los 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 que componen la partícula viral así como todas las proteínas no estructurales necesarias para su ciclo replicativo (1).

La forma principal de propagación del SARS-Cov2 parece ser el contacto cercano entre las personas. Se cree que el virus se transmite más ampliamente a través de las microgotas respiratorias que se producen cuando una persona infectada tose o estornuda (1, 2). El contagio

puede ocurrir cuando las microgotas de la tos o el estornudo de una persona infectada se transmiten por el aire a corta distancia y se depositan en las membranas mucosas de la boca, nariz u ojos de las personas que están cerca (1,2). El virus también se puede propagar cuando una persona toca una superficie o un objeto contaminado con el virus y luego se toca la boca, la nariz o los ojos. Además, si bien aún no está ampliamente documentado, es posible que el SARS-Cov2 se propague más ampliamente a través del aire (propagación por aire) (4) o por otras formas que todavía se desconocen.

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 mayo de 2020. Ha causado, en menos de 6 meses, más de 3 millones de infecciones y 260.000 muertes (5).

Principio del ensayo

ELA CHEMSTRIP® COVID-19 está especialmente diseñado para amplificar una región del GenE del virus SARS-Cov2 a partir de ARN genómico (ARNg) purificado y del gen RNAsaP de humanos como control de la extracción y purificación de la muestra. El sistema utiliza una tecnología exclusiva basada en amplificación mediada por loop denominada Easy loop Amplification (ELA®) y detección inmunocromatográfica (CHEMSTRIP®). La reacción de ELA se realiza a temperatura constante (60 min a 60°C) y no requiere de termocicladores. El sistema utiliza una sonda que permite eliminar posibles falsos positivos incrementando la especificidad del ensayo y oligonucleótidos marcados con FAM (6-carboxifluoresceína) y Biotina; de esta manera, solo los productos de amplificación específicos incorporan ambos marcadores.

La detección inmunocromatográfica (CHEMSTRIP®) de los productos de amplificación marcados con FAM y Biotina

se basa en la captura inmunológica de nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos de cabra anti-FAM durante su paso a través de una membrana. Los productos de amplificación marcados con FAM reaccionan con las partículas de oro funcionalizadas con los anticuerpos anti-FAM y los complejos formados migran por cromatografía hacia la zona de reacción en la membrana. En esta zona se han inmovilizado anticuerpos anti-Biotina y anticuerpos anti-IgG de cabra en las líneas de ensayo (TL) y control (CL), respectivamente.

Si en la reacción de ELA se generan productos de amplificación marcados con FAM y Biotina, los complejos nanopartícula-amplicón son capturados por el anticuerpo anti-Biotina inmovilizado en la TL visualizándose como una banda de color rojo púrpura. Independientemente de la presencia en la muestra de productos de amplificación marcados, los complejos que no fueron capturados en la TL continúan migrando y son capturados en la CL por los anticuerpos anti-IgG de cabra dando origen también a la formación de una banda de color rojo púrpura. La aparición de la CL indica que la cromatografía se ha desarrollado correctamente y en condiciones que aseguran la reacción antígeno-anticuerpo.

Componentes del kit

- Tiras reactivas en formato dipstick
Tiras reactivas en envoltorio trilaminado sellado con sobres de sílica gel en su interior para protección de la luz y humedad (20 tiras por sobre). 100 tiras violetas (RNAsaP, 5 sobres) y 100 tiras celestes (GenE, 5 sobres).
- Diluyente de muestra
Listo para usar.
- Tubos de 1,5 ml
- Control interno de extracción
Listo para usar.
- Mix ELA
Concentrada 2X.
- Primer Mix GenE

Concentrada 10X.

-Primer Mix RNAsaP
Concentrada 10X.

-Enzimas
Concentración 1 U/μl.

-Control positivo ELA
Listo para usar.

-ddH₂O DNAsa y RNAsa free

-Manual de instrucciones

Almacenamiento y vencimiento

Conservación:

-Los reactivos para ELA (caja interna de Reactivos ELA) deben ser conservados a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y protegidos de la luz.

-El resto de los componentes del kit (sobres conteniendo las tiras reactivas, diluyente de muestra y tubos de 1,5 ml) deben ser conservados a temperatura ambiente (15 a 25°C).

Nota: al descongelar los reactivos de ELA homogeneizarlos suavemente o con vortex y luego realizar un spin. Evitar la excesiva repetición de ciclos de congelamiento/descongelamiento. Para un uso frecuente, se recomienda alicuotar los reactivos de ELA, una vez abierto.

Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas.

Vencimiento: 12 meses.

No utilizar componentes del kit una vez pasada la fecha de vencimiento.

<p><u>Atención:</u> conservar la caja de Reactivos ELA a -20°C.</p>

Materiales necesarios que no se suministran

- Micropipetas (p2, p20 y p1000).
- Puntas de pipetas con filtro (libre de RNAsas)
- Baño térmico con tapa termostatazada y capaz de mantener constante la temperatura a 60°C durante 60 min.
- Microcentrífuga.
- Cronómetro.

Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el Manual de instrucciones del kit.
2. Conservar el kit y todos sus componentes en las condiciones arriba indicadas.
3. Las reacciones de amplificación se deben realizar en un sector diferente al sector donde se realiza la detección con tiras reactivas y utilizando micropipetas exclusivas para tal fin. Los tubos en donde se realizó la amplificación NO deben ser abiertos en el mismo sector donde se realiza la mezcla de reacción e incubación.
4. Mantener las tiras reactivas en su envoltorio original con desecante y herméticamente cerrado para protegerlas de la luz y la humedad.
5. Sacar las tiras de su envoltorio original solo inmediatamente antes de usarlas.
6. Manipular todos los reactivos y materiales siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.
7. Los ensayos deben realizarse en laboratorios de análisis clínicos con plataforma de biología molecular que cumplan estrictamente con las prácticas apropiadas de bioseguridad; los laboratorios deben reunir condiciones de Nivel de Bioseguridad 2 (BSL2) y poseer una Cabina de Seguridad Biológica tipo 2 certificada (<https://www.paho.org/es/documentos/directrices-provisionales-bioseguridad-laboratorio-para-manejo-transporte-muestras>).
8. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.
9. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.

Instrucciones de uso (ver Figura 1)

Preparación de la muestra: agregar 5 µl del Control interno de extracción en el primer paso del proceso de extracción del ARN genómico. Recomendamos utilizar las columnas de extracción PURO

Virus RNA (Productos Biológicos S. A.).

Paso 1: Amplificación isotérmica

1. Descongelar los reactivos, manteniéndolos a la Enzima en frío. Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente y homogeneizarlos antes de su uso (Sector 1).
2. Preparar la reacción en los tubos provistos en el kit según Tabla 1. Todos los pasos deben ser realizados manteniendo los tubos en hielo (Sector 1). Mantener los tubos cerrados y pasar al Sector 2.

Notas:

- Se deben preparar dos reacciones por muestra de ARNg a analizar (2 tubos por muestra), una para el GenE y otra para el control RNAsaP.
- Incluir en cada serie de reacciones los controles, positivo y negativo, por duplicado.

3. Mezclar los componentes suavemente y centrifugar 15 segundos (spin) (Sector 2).
4. Colocar los tubos en el baño térmico con tapa termostatzada e incubar durante 60 min a 60°C (Sector 2).

Tabla 1: Preparación de los tubos de reacción.

Componentes \ Tubos	Gen E	RNA-saP	Cont pos	Cont neg
Mix ELA COVID-19 (2x)	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl
Primer Mix GenE (10X)	1,5 µl	-	1,5 µl	1,5 µl
Primer Mix RNAsaP (10X)	-	1,5 µl	-	-
Enzima (1U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Muestra (ARNg purificado)	5 µl	5 µl	-	-
Control pos ELA	-	-	5 µl	-
ddH ₂ O	-	-	-	5 µl
Volumen final	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

En el caso de preparar la mezcla de reacción para más de una muestra proceda como se ejemplifica en la Tabla 2.

Tabla 2: Ejemplos de preparación de Mix de reacción del GenE para distinto número de muestras a procesar.

Número de muestras a analizar	Mix ELA 2X (µl)	Primer Mix GenE 10X (µl)*	Enzimas (µl)	Vol. final (µl)**
1	75	1,5	1	10
2	15	3	2	20
3	22,5	4,5	3	30
4	30	6	4	40
5	37,5	7,5	5	50
6	45	9	6	60
7	52,5	10,5	7	70
8	60	12	8	80
9	67,5	13,5	9	90
10	75	15	10	100
11	82,5	16,5	11	110
12	90	18	12	120
13	97,5	19,5	13	130
14	105	21	14	140
15	112,5	22,5	15	150
16	120	24	16	160
17	127,5	25,5	17	170
18	135	27	18	180
19	142,5	28,5	19	190
20	150	30	20	200

* Para los tubos de reacción de RNAsaP proceder de la misma manera pero utilizando la Mix de Primers (10X) correspondiente a RNAsaP.

** Se recomienda preparar volumen suficiente para una o dos reacciones mas con respecto a la cantidad de muestras a analizar.

Una vez preparada la mix, alicuotar 10 µl por tubo y agregar 5 µl de muestra.

Importante:

- Realizar la mezcla de las reacciones de amplificación isotérmica en un sector diferente (Sector 1) al sector donde se realiza la incubación y detección (Sector 2).
- Usar siempre tips con filtro.
- Las micropipetas y otros materiales utilizados para la amplificación NO DEBEN SER USADOS para la detección. EVITAR LA CONTAMINACION CRUZADA.

Paso 2: Detección (Sector 2)

1. Centrifugar los tubos 15 segundos (spin) (Sector 2).

2. Abrir el tubo cuidadosamente (evitando generar aerosoles) y agregar 300 µl del Diluyente de muestra (Sector 2).

Nota: agregar el diluyente de muestra suavemente por las paredes del tubo sin tocar la superficie del líquido.

3. Tomar una tira reactiva violeta y colocarla en el tubo de reacción de RNAsaP, y una tira celeste y colocarla en el tubo de reacción del GenE. Las tiras se deben colocar en forma vertical siguiendo la orientación de las flechas impresas sobre la tira reactiva (Sector 2)

4. Esperar 10 minutos y sin retirar la tira del tubo leer el resultado de la prueba (Sector 2). Si el resultado es válido para RNAsaP (ver criterios de validez en el Paso 3) continuar con el análisis del GenE (Paso 4).

Importante:

-Para los tubos de reacción del GenE se utilizan las tiras reactivas celestes y para los de RNAsaP las tiras violetas.

-No retirar la tira reactiva del tubo para leer el resultado, solo levantarla lo suficiente para poder visualizar la TL y CL y descartar todo junto (tubo y tira) en un recipiente adecuado.

-Cerrar con cinta adhesiva el sobre conteniendo las tiras que no se utilizan.

-Luego de cada ronda de evaluación de muestras, limpiar el equipamiento y las superficies con solución de lavandina al 5% u otros agentes químicos utilizados para la eliminación de ácidos nucleicos.

Paso 3: Criterios de validez

Resultado válido: cuando para RNAsaP (tira violeta) se observan dos bandas de color rojo púrpura correspondientes a la CL y la TL.

Si el resultado es válido continuar con el Paso 4.

Resultado inválido: cuando para RNAsaP

(tira violeta) se observa la CL pero no la TL o cuando independientemente de la visualización o no de la TL, no se observa la CL.

Si el resultado es inválido no se puede continuar con el ensayo y se debe repetir el análisis desde el proceso de extracción del ARN en adelante.

Paso 4: Interpretación del resultado

Resultado positivo: cuando para el GenE (tira celeste) se observan dos bandas de color rojo púrpura correspondientes a la CL y la TL.

Independientemente de la intensidad de color de la TL el resultado se debe considerar positivo.

Resultado negativo: cuando para el GenE (tira celeste) sólo se observa una banda de color rojo púrpura correspondiente a la CL.

Resultado inválido: cuando para el GenE (tira celeste) independientemente de la visualización o no de la TL, no se observa la banda correspondiente a la CL.

En este caso, repetir el análisis desde el paso de amplificación en adelante ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el Manual de instrucciones del kit.

Toda línea que pueda aparecer pasados los 10 minutos no tendrá valor diagnóstico.

Consideraciones acerca de la Interpretación del resultado

En algunos casos hemos observado un resultado positivo para el GenE (visualización de dos bandas de color rojo-púrpura correspondientes a la CL y la TL en la tira celeste) y negativo para RNAsaP (visualización de una única banda de color rojo-púrpura correspondiente a la CL en la tira violeta).

En nuestros estudios de validación hemos observado que los casos en los que se obtuvo este resultado correspondían a paci-

entes con resultado positivo por confirmación por Real-Time PCR (RT-PCR).

Por lo tanto, recomendamos considerar un resultado GenE (tira celeste) positivo y RNAsaP (tira violeta) negativo como **Resultado Positivo**.

Limitaciones de uso

-ELA CHEMSTRIP® COVID-19 ha sido validado con muestras de ARN extraído a partir de muestras nasofaríngeas y orofaríngeas con kits de extracción de ARN basados en columnas de sílica.

-Los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica del paciente y sus síntomas clínicos.

-EL kit no está recomendado para monitorear la evolución en el tiempo de los pacientes convalecientes.

-Un resultado negativo por cualquier test que detecta genoma viral, no elimina concluyentemente la posibilidad de una infección.

Determinación del límite de detección

Análisis del estándar SARS-Cov2 (ARN)

Fuente: Cedido por el Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI-ANLIS). Este estándar fue cuantificado usando como referencia el estándar 30-XXXX-71 proporcionado por la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).

Resultados: para determinar el límite de detección (LOD, Limit Of Detection) del kit ELA CHEMSTRIP® COVID-19 se realizaron diluciones seriadas a partir del stock del estándar proporcionado por INEI-ANLIS de tal manera de contar con 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 200, 100, 50 y 25 moléculas totales por tubo de reacción. Todas las muestras se analizaron por cuadruplicado para la detección del

GenE.

El LOD se determinó como la mínima concentración de moléculas por reacción (moléc/rn) para la cual se observó un resultado positivo, es decir, dos bandas coloreadas correspondientes a la TL y CL.

Como se muestra en la Tabla 3, para la concentración de 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 y 200 y 100 moléculas/rn se obtuvieron 4 resultados positivos sobre 4 determinaciones totales, para 50 moléculas/rn dos positivos sobre 4 y para 25 moléculas/rn un resultado positivo sobre 4 determinaciones totales.

Tabla 3: Determinación del límite de detección.

Target	GenE						
Cc ARN (moléc/rn)	2×10^5	2×10^4	2×10^3	200	100	50	25
Positivos/Total	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las distintas concentraciones del ARNg del virus SARS-Cov2 en las distintas repeticiones se estableció que el Límite de Detección o Límite de Sensibilidad Analítica del kit ELA CHEMSTRIP® COVID-19 es de 25 a 100 copias del genoma del virus SARS-Cov2.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) diagnóstica se analizaron 60 muestras de ARN purificado en las que no se detectó la presencia de SARS-Cov2 y 100 muestras en las que sí se detectó la presencia del virus. Estas muestras fueron analizadas por el IN-EI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" utilizando la metodología de RT-PCR validada según los estándares de la OPS/OMS.

Las 160 muestras se analizaron utilizando el kit ELA CHEMSTRIP® COVID-19 obteniéndose un resultado negativo para

las 60 muestras negativas, lo que determina una **Especificidad diagnóstica del 100%**, y un resultado positivo para 94 muestras de las 100 muestras positivas lo que determina una **Sensibilidad diagnóstica del 94%**.

Reacciones cruzadas

A partir de un profundo análisis bioinformático se evaluó la posibilidad de detección cruzada con otros virus respiratorios y con genomas de otros entes biológicos, incluyendo el genoma humano y bacterias frecuentes en las áreas de toma de muestra.

La evaluación se realizó utilizando el programa BlastN, recuperando un total de 1000 hits en cada prueba. En todos los test se emplearon como sonda las secuencias de los primers forward y reverse diseñados para el gen E.

En base a los criterios previamente descritos, podemos resumir la especificidad in silico como*:

SARS-CoV-2	detectable
Alphacoronavirus 299E	no detectable
Alphacoronavirus NL63	no detectable
Betacoronavirus HKU-1	no detectable
Betacoronavirus 1	no detectable
Influenza A	no detectable
Influenza B	no detectable
RSVA	no detectable
RSVB	no detectable
GenBank*	no detectable

* En esta búsqueda se excluyeron: SARS-CoV-2, SARS, MERS, Alphacoronavirus 299E, Alphacoronavirus NL63, Betacoronavirus HKU-1, Betacoronavirus 1, Influenza A y B, RSV A y B, construcciones sintéticas y patentes.

Interferencias

En ninguno de los ensayos realizados sobre ARN purificado a partir de muestras clínicas y utilizando métodos de purificación basados en matrices de sílica (Qi

amp viral RNA minikit-Qiagen, Tianamp virus DNA/RNA kit-Tiagen, PURO virus RNA-Productos Bio-Lógicos) se detectó la presencia de inhibidores que afecten a la amplificación o a la visualización del producto.

Advertencias

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

-La identificación de casos sospechosos de COVID-19 constituye un evento de notificación obligatoria en el marco de la Ley 15465 y debe ser notificado en forma inmediata y completa al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS2.0) al Grupo de Eventos: Infecciones respiratorias agudas (IRAS), Evento Sospecha de Virus Emergente. La información a notificar debe ser recopilada de acuerdo a la Ficha de notificación, investigación epidemiológica y pedido de estudios de laboratorio ante caso sospechoso de COVID-19 disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/fichas>

ANMAT

-Autorizado por ANMAT PM 2360-05.
Chemtest Argentina S.A. Legajo N° 2360.
-Director Técnico: Andrés E. Ciocchini.

Para asistencia técnica

Ante cualquier consulta por favor contactar al tel 54 11 2033-1455 (Ext. 6028) info@chemtest.net / chemtest.net

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.

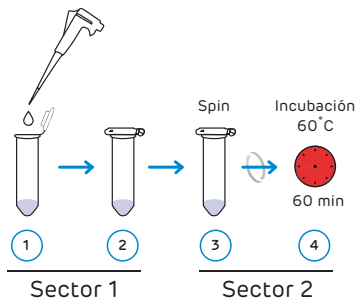
3- Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y and Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*. 2016 Jun;24(6):490-502.

doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.

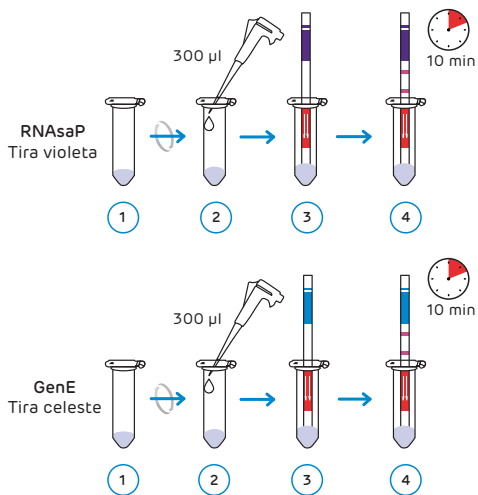
4- Liu Y, Ning Z, Chen Y, Guo M, Liu Y, Gali NK, Sun L, Duan Y, Cai J, Westerdahl D, Liu X, Xu K, Ho KF, Kan H, Fu Q, and Lan K. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*. 2020 Apr 27. doi: 10.1038/s41586-020-2271-3.

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

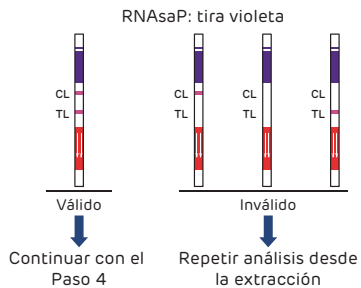
Paso 1: Amplificación isotérmica



Paso 2: Detección (Sector 2)



Paso 3: Criterios de validez



Paso 4: Interpretación del resultado

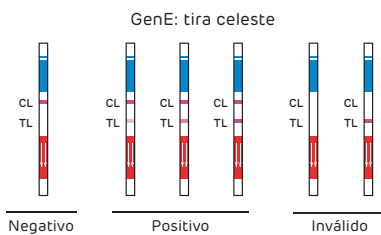



Figura 1: Instrucciones de uso, criterios de validez e interpretación de los resultados.

Notas

Autorizado por ANMAT PM 2360-05



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