

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

OBJETIVO

Verificar el desempeño de la amplificación mediante RT-PCR utilizando el kit comercial AccuPower® COVID-19 en la plataforma ExyStation 48 de Bioneer que permite la detección de dos genes diana del SARS-CoV-2 (Gen E y RdRp).

UTILIDAD CLÍNICA

Los coronavirus (CoV) son virus que surgen periódicamente en diferentes áreas del mundo y que causan Infección Respiratoria Aguda (IRA), que puede ser leve, moderada o grave. El nuevo Coronavirus SARS COV-2 ha sido catalogado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una emergencia en salud pública de importancia internacional (ESPII). Se han identificado casos en todos los continentes y el 6 de marzo se confirmó el primer caso en Colombia.

La infección se produce cuando una persona enferma tose o estornuda y expulsa partículas del virus que entran en contacto con otras personas de manera directa, al tener contacto con sus mucosas o de manera indirecta, a través de la contaminación de objetos (fómites). Se conoce que cualquier persona puede infectarse, independientemente de su edad, pero hasta el momento se han registrado relativamente pocos casos de COVID-19 en niños. La infección puede llegar a ser mortal, especialmente en personas de edad avanzada y/o con comorbilidad como diabetes, asma o hipertensión.

La infección por el nuevo Coronavirus. Puede producir síntomas como fiebre, tos, dolor de garganta, secreción nasal, mialgias y malestar general. Los pacientes que cursan con mayor severidad de la enfermedad pueden presentar dificultad para respirar de espectro variable y llegar a manifestar el Síndrome respiratorio agudo severo (SARS), entidad potencialmente mortal.

Se ha descrito menos frecuentemente su asociación a cuadros de diarrea como manifestación clínica única o asociada a un cuadro respiratorio.

Los cuatro coronavirus humanos comunes 229E, NL63, OC43 y HKU1 causan enfermedades leves, cursando con un resfriado común. La pandemia del SARS de 2003 y el virus MERS originario de Arabia dieron a conocer a esta familia de virus en todo el mundo. El virus de la neumonía 2019-nCoV se informó el 31 de diciembre de 2019, después que docenas de visitantes de un mercado de productos de mar desarrollaron una neumonía grave (COVID-19). A finales de febrero de 2020 hubo 80,000 infecciones confirmadas y 2,700 muertes reportadas. El genoma publicado el 11 de enero (Genbank acc. MN908947) muestra una gran similitud con el virus del SARS; el nuevo nombre del virus es SARS-CoV-2 y la enfermedad causada se denomina COVID 19 (coronavirus disease 2019).

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB– INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

ALCANCE

Se realizó verificación del kit comercial AccuPower® COVID-19 en la plataforma ExyStation 48 de Bioneer, que permite la detección de los genes diana del SARS-CoV-2 (Gen E y RdRp) de la casa comercial Gencell Pharma en la Clínica Iberoamérica de la ciudad de Barranquilla a cargo del personal del área de Biología Molecular, donde se realizó el procesamiento de 44 muestras con resultado previo por RT-PCR procesadas en el área de Biología Molecular de la Clínica Universitaria Colombia en la ciudad de Bogotá por la plataforma ExyStation de Bioneer.

La plataforma de comparación cuenta con informe de verificación previo con Allplex™ 2019-nCoV de Seegene la cual trabaja bajo el protocolo de Berlín. Este Protocolo se basa en la detección de 3 marcadores diferentes: genes N, E y RdRp. Los ensayos para los genes E y N se entienden como protocolos de tamizaje para detectar cualquier beta-coronavirus asociado a murciélagos (no detectan coronavirus humanos comunes); el ensayo para RdRp es específico para coronavirus SARS y tipo SARS (incluyendo el 2019-nCoV).

MATERIALES Y METODOS

Material a utilizar:

- kit comercial AccuPower® COVID-19
- Equipo de detección: ExyStation 48.

Método para análisis de muestras: Se utilizará el protocolo de procesamiento propuesto en el inserto del kit AccuPower® COVID-19.

Proceso de Amplificación: El kit AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR es un kit de PCR que detecta el ARN de SARS-CoV-20 (gen E y gen RdRp) a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR).

Los kits MDx de tipo premezcla reducen las variaciones de resultados y aumentan la comodidad del usuario al minimizar el pipeteo

Información del gen objetivo: Siguiendo la recomendación de los CDC de Corea (KCDC v1.5), Ver imagen 1. La detección y confirmación se realiza de forma simultanea mediante 2 sondas:

- **Gen RdRp-nCoV:** para la confirmación de SARS-COV
- **Gen E-Sarbeco:** para la detección de coronavirus

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

Primer & Probe	Sequence (5'-3')	Target gene
RdRP_SARSr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	RdRP
RdRP_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
RdRP_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ3	
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	E gene
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ3	

Imagen 1: Genes objetivo

Fuente: Inseto AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR Kit.

- Configuración del instrumento de Real-time PCR**

PASO	TEMPERATURA °C	TIEMPO	CICLOS
Transcripción Reversa	55	10 min	1
Pre- Denaturacion	94	3 min	1
Denaturacion	94	15 seg	45
Amplificación	58	30 seg	
Escaneo			

Fuente: Inseto AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR Kit.

- Tamaño de la muestra:** Fueron procesadas 44 muestras con resultado previo por RT-PCR procesadas en el área de Biología Molecular de Clínica Universitaria Colombia en la ciudad de Bogotá por la ExiStation de Bioneer. Las muestras seleccionadas corresponden a muestras provenientes de pacientes con sospecha de infección por COVID-19 atendidos en la red medica de atención de las aseguradoras de la organización. Las muestras seleccionadas para el proceso de verificación tuvieron la siguiente distribución:

- **Muestras Negativas:** 22
- **Muestras Positivas:** 22

Las muestras seleccionadas cumplían con los criterios de almacenamiento y conservación.

RESULTADOS

La interpretación de los resultados debe ser realizada teniendo en cuenta:

Resultado del IPC: Verifica si la muestra inhibe la PCR y determina la amplificación de los ácidos nucleicos en cada pozo. La muestra de MERS-CoV fuertemente positiva

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

puede reducir la señal de IPC debido a la competencia de PCR.

TargetCt: Muestra el valor de Ct para cada objetivo para cada pozo. El valor del Ct de NTC debe ser 40Ct o negativo y el Ct de PC debe estar dentro del rango de validez.

Resultado de la muestra: El resultado de la muestra se informa como un valor de Ct. Basado en el PC, IPC y los resultados de la muestra. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Escenario	RESULTADOS			Interpretación
	Gen E	RdRp	IPC	
1	+	-	+	Coronavirus
2	+	+	+	nCoV
3	-	-	+	Negativo
4	-	+	-	Invalido
5	+	+	-	
6	+	-	-	
7	-	+	-	

Tabla 1. Interpretación de resultados.

Fuente: Inserto AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR Kit.

Interpretación: Si el valor Ct del gen E y el gen RdRp es ≤ 40 , se determina como "Positivo", y si el valor Ct es ≥ 40 , se determina como "Negativo".

A continuación, se relacionan los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras en donde se encontró un 100% de concordancia en las muestras con resultado positivo y negativo para COVID-19. Tabla 1 y 2.

Criterio de Aceptabilidad >80				
Concordancia Observada			100,0	CUMPLE
Secuencia	RESULTADOS EQUIPO COMPARACIÓN Existation 48 Bioneer	RESULTADOS EQUIPO A VERIFICAR - Existation Bioneer	% Concordancia	CUMPLIMIENTO
	Resultado	Resultado		
1	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
2	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
3	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
4	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
5	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
6	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
7	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
8	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
9	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
10	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
11	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
12	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
13	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
14	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
15	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE

Tabla 1. Consolidado de resultados obtenidos.

Fuente: Plantilla interna proceso de verificación.

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

Secuencia	RESULTADOS EQUIPO COMPARACIÓN Existation 48 Bioneer	RESULTADOS EQUIPO A VERIFICAR - Existation Bioneer	% Concordancia	CUMPLIMIENTO
	Resultado	Resultado		
16	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
17	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
18	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
19	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
20	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
21	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
22	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
23	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
24	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
25	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
26	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
27	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
28	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
29	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
30	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
31	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
32	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
33	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
34	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
35	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
36	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
37	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
38	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
39	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
40	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
41	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
42	Negativo	Negativo	100%	CUMPLE
43	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE
44	COVID-19	COVID-19	100%	CUMPLE

Tabla 2. Consolidado de resultados obtenidos.
Fuente: Plantilla interna proceso de verificación.

El análisis de los datos se realiza mediante el cálculo del índice Kappa teniendo en cuenta que en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es igual a 1. Tabla 3.

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

Tabla de 2x2			
Método de prueba	Criterio de precisión diagnóstica		
	COVID-19	Negativo	Total
COVID-19	TP	FP	TP+FP
Negativo	FN	TN	FN+TN
Total	TP+FN	FP+TN	N
MÉTODO A VERIFICAR		MÉTODO COMPARACIÓN Existation - Bioneer	
Existation 48 - Bioneer	COVID-19	Negativo	Total
COVID-19	21	0	21
Negativo	0	21	21
Total	21	21	42

Pe	0,50	kappa	grado de acuerdo
Po	1,00	< 0	sin acuerdo
Indice Kappa	1,00	0 - 0,2	insignificante
		0,2 - 0,4	bajo
		0,4 - 0,6	moderado
		0,6 - 0,8	bueno
		0,8 - 1	muy bueno

Tabla 3. Consolidado de resultados obtenidos.
Fuente: Plantilla interna Índice Kappa.

Se evidencia presencia de amplificación de control positivo. Imagen 1 y 2.

Gen E:

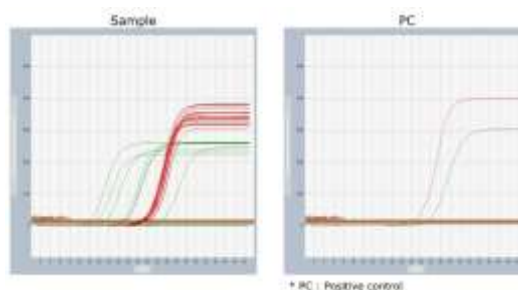


Imagen 1. Amplificación gen E.
Fuente: Qualitative Report. AccuPower® COVID-19(E gene) Real-Time RT-PCR Kit

Gen RdRp:

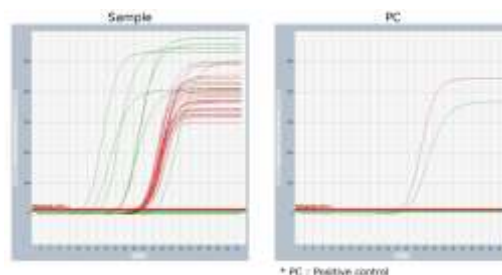


Imagen 2. Amplificación gen RdRp.
Fuente: Qualitative Report AccuPower® COVID-19(RdRp gene) Real-Time RT-PCR Kit

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB- INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

Análisis de resultados obtenidos:

Se evidencia 100% de concordancia entre los resultados obtenidos por la plataforma ExiStation de Bioneer de Clínica Iberoamérica y el equipo de comparación ExiStation de Bioneer de Biología molecular de Clínica Universitaria Colombia, el cual cuenta con verificación previa por la plataforma Allplex™ 2019-nCoV de Seegene, el cual trabaja bajo el "estándar de oro" o prueba de referencia estandarizada por el hospital Charité Virology en Berlin, Alemania.

CONCLUSIONES

Se evidenció amplificación de Gen E y RdRP en las 22 muestras con resultado previamente positivo, todas las muestras positivas presentaron Ct tempranos.

No se evidenció amplificación en el control negativo para los genes E y RdRp, lo cual indica que no hubo contaminación cruzada con muestras de control positivo y que el agua empleada en el proceso no presenta contaminación.

Hubo un 100% de concordancia en las muestras con resultado positivo y negativo con el método de comparación y el método a verificar, lo cual da cumplimiento a la guía del Ministerio de Salud y Protección Social: "*Lineamientos para la gestión de muestras durante la pandemia del SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia, GIPS05*", donde indica que las pruebas moleculares deben tener una especificidad por encima del 95%. Igualmente se evidencia cumplimiento en términos de sensibilidad indicado por una sensibilidad mínima del 85% y se obtuvo un 100% en el proceso de verificación realizado, permitiendo detectar sujetos positivos.

Por último, se puede concluir que el kit comercial AccuPower® COVID-19 de la plataforma ExyStation 48 de Bioneer, permite la detección de los genes diana del SARS-CoV-2 (Gen E y RdRp) lo cual se correlaciona con los estudios de validación realizados previamente en estudios publicados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Circular externa 019 25 marzo 2020 Ministerio de Salud y protección social Colombia. Detección Temprana SARS-CoV-2/COVID-19.
2. Guía GIPS05: Lineamientos para el uso de pruebas en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) en el marco de la emergencia sanitaria por COVID-19 en Colombia.
3. Guía GIPS21: Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-COV-2 (COVID19) en Colombia.

LAB. CLINICO, BANCO DE SANGRE O PATOLOGIA	PRESTACIÓN DEL SERVICIO
LAB– INFORME DE VERIFICACIÓN RT-PCR PARA SARS-COV-2 (COVID 19) EXYSTATION 48 DE BIONEER. CLÍNICA IBEROAMERICA.	Agosto 2020

4. Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud. Grupo ACIN- IETS de Consenso Colombiano para recomendaciones de atención COVID19.
5. Jorge E. Gomez Marin, Jaime Castellanos, Alfonso J. Rodriguez-Morales, Jaime A. Cardona-Ospina, Jorge Eduardo Forero Duarte, Salim Mattar, Germán Esparza. Consenso de grupo Ad-hoc sobre recomendaciones para la evaluación y controles de calidad para el diagnóstico molecular y serológico de la infección humana por SARS CoV-2. 2020.
6. Inseto kit de ADN / ARN viral ExiPrep™ Dx (K-4471, K-4472, K-4473).
7. Inseto AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR Kit.
8. Información Técnica ExiPrep™48 Dx, Revisión 0 (2020-05-14).
9. Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV). 01 de febrero de 2020.
10. Protocolo de verificación (validación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para la detección del SARS-CoV-2. Instituto Nacional de Salud.

ELABORADO POR

Lady Contreras Gomez. Bacterióloga de Calidad.

REVISADO POR

Juan Javier López – Dirección Médica Laboratorio Especializado.