

ESTUDIO PARA LA EVALUACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO DE LOS REACTIVOS DE DIAGNOSTICO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SARS-COV-2 PARA PRUEBAS MOLECULARES DE PCR EN TIEMPO REAL (RT qPCR) CON EL REACTIVO FTD™ SARS-CoV-2 EMPLEADO EN EL LABORATORIO CLINICO ALIFE HEALTH

CONTENIDO

1. INFORMACIÓN GENERAL DEL ESTUDIO DE EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO.....	2
2. OBJETIVOS	4
2.1. GENERAL.....	4
2.2. ESPECÍFICOS	4
2.3. ALCANCE	4
3. REFERENCIAS NORMATIVAS.....	4
4. DEFINICIONES	5
5. MATERIALES Y MÉTODOS	7
5.1. TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	7
5.2. CRITERIOS DE EXCLUSION	7
5.3. FTD™ SARS-COV-2.....	8
5.4. DESARROLLO METODOLOGICO.....	8
5.5. CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO	9
FTD™ SARS-COV-2.....	9
6. RESULTADOS COMPARACION DE METODOS	10
7. CONCEPTO	13
8. BIBLIOGRAFIA.....	14

1. INFORMACIÓN GENERAL DEL ESTUDIO DE EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO

TITULO	ESTUDIO PARA LA EVALUACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO DE LOS REACTIVOS DE DIAGNOSTICO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE SARS-COV-2 PARA PRUEBAS MOLECULARES DE PCR EN TIEMPO REAL (RT qPCR) CON EL REACTIVO FTD™ SARS-CoV-2 EMPLEADO EN EL LABORATORIO CLINICO ALIFE HEALTH
ENTIDAD	Laboratorio Clínico Alife Health
LUGAR	Ciudad: Bogotá - Departamento: Cundinamarca - País: Colombia
TIPO DE ESTUDIO	Experimental prospectivo
RESPONSABLES DE LA VERIFICACIÓN	Sandra Milena Charif Rodriguez – Especialista de aplicaciones Clínicas Siemens Healthineers Carlos Antonio Cala Navarro – Especialista de aplicaciones Clínicas Siemens Healthineers Sindy Muñoz - Profesional responsable de la Extracción Alexander Chitiva - Profesional responsable de la Extracción Hernán Avellaneda – Profesional responsable de la Amplificación Miguel Parra – Profesional responsable de la Amplificación
VERIFICADO POR	Dina Luz Ortiz Diaz – Customer Care Manager

El 31 de diciembre de 2019, la World Health Organización (WHO) (Organización Mundial de la Salud, OMS) fue informada de varios casos de neumonía de etiología desconocida que se habían detectado en la ciudad de Wuhan, en la provincia de Hubei de China. Poco después, una nueva cepa del coronavirus, SARS-CoV-2, observada por primera vez en seres humanos, se identificó como la causa de esta nueva enfermedad, denominada posteriormente COVID-19. El 30 de enero de 2020 la OMS declaró el SARS-CoV-2 como una emergencia de salud pública de importancia internacional. Desde su aparición se ha extendido rápidamente por todo el mundo, causando un brote global masivo que ha alcanzado el estado de pandemia.

Los primeros síntomas del COVID-19 no son muy específicos. Las personas afectadas pueden presentar secreción nasal, dolor de cabeza, dolor muscular y cansancio. Dos o

3 días después suele aparecer fiebre, tos y síntomas respiratorios, que pueden dar lugar a neumonía grave y muerte. La gravedad de los síntomas clínicos exige que aproximadamente el 20 % de los pacientes permanezcan hospitalizados, y el 5 % pasen a cuidados intensivos. Las manifestaciones más graves se observan principalmente en personas que son vulnerables debido a su edad (mayores de 70 años) o que padecen enfermedades asociadas.

Sin embargo, la infección también puede ser asintomática o paucisintomática (es decir, que produce pocas manifestaciones clínicas, o ausencia de ellas) entre el 30 % y 60 % de las personas infectadas. El tiempo de incubación es de un promedio de 5 días, en un intervalo comprendido entre 2 y 12 días.

El intervalo de serie (es decir, el tiempo comprendido entre la aparición de síntomas de una enfermedad en una persona y la aparición de síntomas en una segunda persona a la que se transmite la infección) es de aproximadamente 4 días. Por lo tanto, el intervalo de serie del COVID-19 es más corto que la mediana de su período de incubación. Esto sugiere que una proporción importante de transmisión secundaria puede producirse antes de la aparición de la enfermedad. Esta «transmisión silenciosa» hace que esta pandemia sea difícil de contener y tenga más probabilidad de propagarse muy rápidamente.

FTD SARS-CoV-2 es una ayuda para la identificación de la enfermedad del COVID-19 mediante la detección de ácido ribonucleico (ARN) del SARS-CoV-2 extraído de hisopos nasofaríngeos y bucofaríngeos en pacientes con sospecha de infección por COVID-19.

Para la verificación de las especificaciones de desempeño, se desarrolló un estudio comparativo para la determinación cualitativa de SARS-CoV-2 para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) con el reactivo FTD™ SARS-CoV-2 empleado en el laboratorio clínico health life

Nuevo coronavirus humano SARS-CoV-2

Los coronavirus pertenecen a una amplia familia de virus encapsulados con un genoma con ARN de sentido positivo, que puede causar enfermedades en animales y seres humanos. Los géneros Alfacoronavirus (AlphaCoV) y Betacoronavirus (BetaCoV) contienen siete coronavirus humanos conocidos que pueden causar infecciones leves de las vías respiratorias, pero también infecciones de mayor gravedad como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) y el COVID-19.

El SARS-CoV-2 (el agente etiológico del COVID-19) pertenece al género Betacoronavirus y se identificó por primera vez en seres humanos en enero de 2020. La ruta de transmisión aún se está investigando. Aunque es probable que los murciélagos sean los huéspedes del SARS-CoV-2 detecta dos regiones genómicas diferentes específicas para el SARS-CoV-2

Las muestras se procesaron por la metodología de referencia y la evaluada conforme a las especificaciones de casa matriz de cada técnica definidas en el manual del operador. Los datos obtenidos fueron registrados, tabulados y analizados por el área de Asesoría Científica de la división Diagnóstica de SIEMENS Colombia.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

Realizar la evaluación de desempeño del método para la determinación cualitativa de SARSCOV-2 para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) con el reactivo FTD™ SARS-CoV-2 empleado en el laboratorio clínico Alife Health teniendo como referencia las especificaciones de calidad propios establecidos por la organización y por Manufactura.

2.2. ESPECÍFICOS

- Verificar que no existen diferencias significativas en términos de sensibilidad, especificidad para la detección viral del SARS-COV-2, frente a la técnica RT- qPCR protocolo estandarizado Charite de Berlin como estándar de referencia.
- Realizar un estudio de comparación de los métodos para evaluar el desempeño del ensayo frente a las metodologías seleccionadas como referencia.

2.3. ALCANCE

Para la determinación cualitativa de SARSCOV-2 para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) con el reactivo FTD™ SARS-CoV-2 empleado en el laboratorio clínico Alife Health

3. REFERENCIAS NORMATIVAS

- Resolución 3100 de 2019. Por la cual se definen los procedimientos y condiciones de inscripción de los Prestadores de Servicios de Salud y de habilitación de servicios de salud. Estándar Historias Clínicas y Registros. Criterio 18.3. Cuenta con: Registro de validación de pruebas y ensayos.
- Resolución 1445 del 8 de mayo de 2006 MANUALES DE ESTÁNDARES DEL SISTEMA ÚNICO DE ACREDITACIÓN. Estándar N.1 Gestión de la tecnología: “La organización cuenta con un proceso de análisis, para que, previo a la introducción de nueva tecnología, se estudien factores, para garantizar la adecuada incorporación de la misma, tales como el costo beneficio o costo efectividad de la nueva tecnología, la evidencia de seguridad, etc.”

- ISO 15189 Ítems No.
 - 5.3.2 Los equipos deben demostrar (en cuanto a instalación y uso rutinario) capacidad para lograr el desempeño requerido, y deben cumplir con las especificaciones pertinentes de los análisis correspondientes.
 - 5.6.6 Para aquellos análisis que utilizan diferentes procedimientos o equipos, o se realizan en diferentes sitios, o para todos estos, debe haber un mecanismo definido para verificar la comparabilidad de los resultados durante todos los intervalos clínicos apropiados. Esta verificación se debe realizar en períodos de tiempo definidos, apropiados a las características del procedimiento o instrumento.
 - 5.6.7 El laboratorio debe documentar, registrar y, si es apropiado, actuar en forma expedita sobre los resultados de estas comparaciones. Se debe actuar sobre los problemas o deficiencias identificadas y los registros conservados sobre las acciones. Además, los laboratorios de análisis clínicos emplean equipamiento que debe garantizar el cumplimiento de las especificaciones de calidad desde su producción y distribución hasta su empleo en los diferentes procesos analíticos realizados en muestras biológicas.
 - La incidencia del equipamiento en los resultados obtenidos y, por consiguiente, en la salud de la población, hace necesaria su evaluación.
- CLIA, 493.1253
 - "Si un laboratorio realiza la misma prueba en metodologías o instrumentos diferentes, o realiza la misma prueba en diferentes sedes.

El laboratorio debe tener un sistema que dos veces por año evalúe y defina la relación entre resultados de la prueba que usan metodologías o instrumentos diferentes, o bien en las diferentes sedes.
- JCAHO Estándares para la Validación de Métodos. Accreditation Manual for Pathology and Clinical Laboratory Services. Joint Commissions on Accreditation of Healthcare Organizations. Oakbrook Terrace, IL.
- Protocolo de verificación (Validación secundaria) pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT- qPCR) para la detección de SARS-COV-2. Dirección redes en salud Publica.

4. DEFINICIONES

ACIDOS NUCLEICOS: biomoléculas portadoras de la información genética. Son biopolímeros, de elevado peso molecular, formados por otras subunidades estructurales o monómeros, denominados Nucleótidos.

ARNm(ARN mensajero): Molécula de ARN que lleva la información necesaria para la síntesis de una proteína. Se origina por el proceso de transcripción, en el cual al enzima ARN polimerasa sintetiza ARN usando al ADN como molde. En los organismos eucariontes el ARNm recién sintetizado sufre un procesamiento antes de ser transportado al citoplasma para servir de molde para la síntesis de proteínas.

CEBADOR O PRIMER: Segmento corto de ADN que se aparea a una cadena simple de ácido nucleico y sirve de punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria, en presencia de nucleótidos y la enzima ADN polimerasa.

CONCORDANCIA: El análisis de concordancia se usa para comparar diversos métodos clínicos entre sí cuando son aplicados al mismo grupo de individuos (muestras apareadas).

ENSAYO CLINICO: Estudio experimental, analítico, prospectivo ó retrospectivo, aleatorizado y con tamaños muestrales suficientes. Pueden tener una duración desde días hasta años, sobre una muestra seleccionada de una población.

ESTUDIO PROSPECTIVO: Es un estudio longitudinal en el tiempo que se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo, en el futuro.

EXACTITUD: Es el grado en que los valores se aproximan al valor verdadero.

INDICE KAPPA: Mide el grado de acuerdo entre varios métodos o evaluadores que clasifican al paciente (o el resultado de una observación) según una serie de posibilidades (categorías) mutuamente excluyentes. El caso más sencillo se presenta cuando la variable cualitativa es dicotómica (dos posibilidades) y se está comparando dos métodos de clasificación (por ejemplo dos escalas clínicas). Landis y Cohen propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

Índice kappa	Grado de acuerdo
Menor de 0.00	Sin acuerdo
0.00 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Discreto
0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81 - 1,00	Casi Perfecto

Se define el índice de concordancia kappa de la siguiente manera:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $1 - P_e$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De ese margen nosotros observamos probablemente sólo una parte $P_o - P_e$, salvo que haya acuerdo perfecto $P_o = 1$.

Así pues en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es 1; si la concordancia observada es igual a la esperada kappa vale 0; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado el índice kappa es menor que cero.

MATERIAL DE CONTROL: Muestra o solución, la cual es analizada para propósitos de control de calidad.

MUESTRA: Sujetos realmente estudiados.

SIGMA: es la desviación típica que da una idea de la variabilidad en un proceso.

TRANSCRIPCIÓN: Proceso por el cual una cadena de ADN es usada como molde para la síntesis de un ARN complementario por acción de la enzima ARN polimerasa.

TRANSCRIPTASA REVERSA O INVERSA Enzima que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN, el cual se duplica posteriormente para dar la doble cadena de ADN. Frecuente en retrovirus y también empleado en ingeniería genética para generar ADN complementario (ADNc).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. TAMAÑO DE LA MUESTRA

En el estudio se emplearon en promedio 33 muestras, almacenadas conforme a las especificaciones de conservación requeridas para la determinación cualitativa de SARSCOV-2 para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) con el reactivo FTD™ SARS-CoV-2.

5.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Deberán ser excluidas de la evaluación las muestras que cumplan con los siguientes criterios:

- Evidencia de almacenamiento inadecuado o presencia de contaminación microbiana, fúngica, química como solventes o reactivos.
- Recolección o transporte inadecuado según lineamientos para la vigilancia de virus respiratorios del instituto nacional de salud.

5.3. FTD™ SARS-COV-2

Esta prueba es un proceso basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de patógenos en muestras humanas.

En una primera fase, los ácidos nucleicos deben extraerse de los tipos de muestras indicados en el apartado Uso previsto, con la adición del control interno (IC).

El eluido con los ácidos nucleicos purificados de los patógenos se añade a una mezcla maestra para activar la reacción de RT-PCR. La mezcla maestra contiene enzima, tampón, desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), cebadores y sondas sintéticos específicos para las secuencias diana. La ventaja de utilizar varios pares de cebadores/sondas en una única mezcla de reacción es detectar simultáneamente diferentes dianas en una reacción.

En presencia de la diana, los cebadores y las sondas se hibridarán con la secuencia específica y permitirán la amplificación por la polimerasa. Las diferentes sondas incluyen colorantes fluorescentes y desactivadores de fluorescencia en estrecha proximidad, lo que limita la fluorescencia emitida. Sin embargo, durante la amplificación, la polimerasa extiende la nueva cadena y degrada la sonda marcada con el colorante fluorescente, gracias a su actividad de exonucleasa. Esto separa el colorante fluorescente del desactivador de fluorescencia, lo que permite la emisión de la fluorescencia.

El nivel de fluorescencia aumenta con la generación de amplicones y es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos del patógeno contenido en la muestra. El termociclador en tiempo real notifica el aumento del nivel de fluorescencia como un valor de umbral del ciclo (Ct).

El ensayo utiliza el virus de la arteritis equina (EAV) como control interno (IC), que se introduce en cada muestra y en el control negativo (NC) durante el proceso de extracción. El IC se extrae, se procesa y se amplifica simultáneamente con cada muestra, con el fin de monitorizar el proceso de extracción y poder identificar la inhibición de la PCR.

El NC también se procesa como una muestra (extracción y RT-PCR) y confirma la ausencia de contaminación.

El kit SARS-CoV-2 también contiene un control positivo (PC), que se añade a cada análisis de RT-PCR. El PC monitoriza el proceso de RT-PCR y el rendimiento de los cebadores y las sondas.

5.4. DESARROLLO METODOLOGICO

Para la verificación de las especificaciones de desempeño, se desarrolló un estudio comparativo para la determinación cualitativa de SARSCOV-2 para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) con el reactivo FTD™ SARS-CoV-2 frente a las metodologías empleadas en los laboratorios de la red externa de esta institución. Las muestras se procesaron por las metodologías de referencia y la evaluada conforme a las especificaciones de casa matriz de cada técnica definidas en el manual del operador.

Los datos obtenidos fueron registrados, tabulados y analizados por el área de Asesoría Científica de la división Diagnóstica de SIEMENS Colombia.

5.5. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

FTD™ SARS-COV-2



FTD SARS-CoV-2 es una prueba cualitativa de amplificación de ácidos nucleicos in vitro para la detección de ácidos nucleicos del coronavirus 2 del síndrome respiratorio grave (SARS-CoV-2), en hisopos nasofaríngeos y bucofaríngeos de pacientes que presenten signos y síntomas de infección por SARS-CoV-2 junto con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos, con sospecha de tener enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19). La prueba está concebida como una ayuda para el diagnóstico de infecciones causadas por el nuevo coronavirus humano SARS-CoV-2.
Para uso diagnóstico in vitro

Evaluación de la exactitud

6. Resultados Comparación de métodos

N	ID MUESTRA	FASTRACKDIAGNOSTICS (FTD)	REFERENCIA (CHARITE)
		INTERPRETACION	INTERPRETACION
1	MG	POSITIVO	POSITIVO
2	SB754	POSITIVO	POSITIVO
3	CVE9611	NEGATIVO	NEGATIVO
4	CVE9619	NEGATIVO	NEGATIVO
5	NAB784	POSITIVO	POSITIVO
6	DMC818	NEGATIVO	NEGATIVO
7	CVE9612	NEGATIVO	NEGATIVO
8	CVE9620	POSITIVO	POSITIVO
9	LAM6464	POSITIVO	POSITIVO
10	DCD815	NEGATIVO	NEGATIVO
11	CVE9613	NEGATIVO	NEGATIVO
12	CVE9621	NEGATIVO	NEGATIVO
13	ODA203	POSITIVO	POSITIVO
14	TD476	POSITIVO	POSITIVO
15	CPZ382	NEGATIVO	NEGATIVO
16	CVE9614	NEGATIVO	NEGATIVO
17	JEP238	POSITIVO	POSITIVO
18	MR517	NEGATIVO	NEGATIVO
19	MEZ373	NEGATIVO	NEGATIVO
20	CVE9615	NEGATIVO	NEGATIVO
21	JAC526	POSITIVO	POSITIVO
22	OPJG866	NEGATIVO	NEGATIVO
23	OEA961	NEGATIVO	NEGATIVO
24	CVE9616	POSITIVO	POSITIVO
25	WAM11	POSITIVO	POSITIVO
26	OFP647	NEGATIVO	NEGATIVO
27	CVE9617	POSITIVO	POSITIVO
28	MEM166	POSITIVO	POSITIVO
29	LFS447	POSITIVO	POSITIVO
30	CVE9618	NEGATIVO	NEGATIVO
31	MR517	NEGATIVO	NEGATIVO
32	PC	POSITIVO	POSITIVO

33	EPB505	POSITIVO	POSITIVO
----	--------	----------	----------

LABORATORIO DE REFERENCIA			TOTALES
HEALTH LIFE	Fuera del intervalo de referencia	Dentro del intervalo de referencia	
Fuera del intervalo de referencia	16	0	16
Dentro del intervalo de referencia	0	17	17
33	16	17	33
% Sensibilidad	100%		
% Especificidad	100%		

SARS-COV-2	Reactivo Referencia	No Reactivo Referencia
Reactivo a validar	VR	FR
No Reactivo a validar	FNR	VNR
Sensibilidad	$VR/(VR+FNR)=\text{Verdaderos Reactivos}$	
Especificidad	$VNR/(VNR+FR)=\text{Verdaderos No Reactivos}$	

CRITERIO DE ACEPTABILIDAD		
CONCORDANCIA OBSERVADA	100%	CUMPLE

ÍNDICE KAPPA	1.00
VPP (%)	100.0
VNP (%)	100.0
Total Reactivos	16
Total No Reactivos	17

ÍNDICE KAPPA		CRITERIO DE ACEPTABILIDAD
Pe	0.50	
Po	1,00	CUMPLE: SE OBSERVA EXACTITUD DIAGNOSTICA ENTRE LOS METODOS

Índice kappa	Grado de acuerdo
Menor de 0.00	Sin acuerdo
0.00 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Discreto
0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81 - 1,00	Casi Perfecto

7. CONCEPTO

Se evidencia concordancia en el 100% de las muestras procesadas tanto negativas como positivas del método utilizado en el laboratorio Clínico Alife Health FTD SARS-COV-2 frente al método del laboratorio de referencia Corman, et.AI(2020-V2) Charite Virology Berlin, Germany con un Índice Kappa de 1, que muestra una sensibilidad del 100% y especificidad del 100%.

Criterios para un análisis válido

El análisis se considera válido y los resultados del paciente se notifican si se cumplen todas las siguientes condiciones:

1. El NC no mostrará ninguna traza de amplificación aparte de la del IC. Si hay una posible contaminación (aparición de una curva en el NC o un grupo de curvas en las muestras con un valor de Ct alto, los resultados obtenidos no se pueden interpretar y es necesario repetir el análisis completo (incluida la extracción).
2. Todos los PC deben mostrar un trazado de amplificación positivo (es decir, exponencial). El valor de Ct del PC debe estar por debajo de 33.
3. Todas las muestras y NC (o cada material extraído) deben mostrar un registro de amplificación positiva para el IC. El valor de Ct del IC debe estar por debajo de 33.

Si se cumplen los criterios indicados, se considerará positiva cualquier muestra de paciente que tenga un trazado exponencial para uno de los patógenos identificados por el kit. La ausencia de un trazado exponencial indica la ausencia o una carga indetectable de ácido nucleico.

Por ejemplo, si una muestra de paciente analizada con la mezcla maestra de SCoV2 muestra un trazado exponencial de fluorescencia en el canal verde, esta muestra contiene una carga detectable de ARN de SARS-CoV-2.

El IC debe ser positivo (canal rojo) para cada material extraído (muestras y NC).

En el presente estudio se evidenció que no existen errores clínica ni estadísticamente significativos en términos de concordancia en los resultados emitidos para

8. BIBLIOGRAFIA

1.Capacidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico: nivel sigma Recomendación (2012) SEQC F.J. Gella Tomás, N. Alonso Nieva, Nieva, B. Boned Juliani, F. Canalias Reverter, S. Izquierdo Alvarez, R. López Martínez, N. Serrat Orús. España 2012.

2.Organizacion panamericana de la salud. Directrices de laboratorio para la detección y Diagnostico de la infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCov) 01 de Febrero de 2020.

3.The Institut Pasteur website:<https://www.pasteur.fr/en/medical-center/disease-sheets/covid-19-disease-novel-coronavirus#symptoms>. Accessed March 2020.

4.Protocolo de validación (Verificación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT qPCR) para la detección de SARS-COV-2, Direccion redes en Salud Publica.2020

5.Lineamientos para la vigilancia por Laboratorios de virus respiratorios.INS.2019

6.Inserto FDS- SARS-COV-2.REV A.2020-04