



## VALIDACIÓN (Verificación secundaria) KIT careGENE™ N-CoV RT-PCR

**Julio 30 de 2020**

### Introducción

De acuerdo con las orientaciones del Instituto Nacional de Salud (1), el presente documento reporta los procedimientos para el análisis de verificación del desempeño de un estuche de diagnóstico, en términos de sensibilidad analítica y sensibilidad y especificidad con respecto a muestras previamente identificadas y confirmadas, con el propósito de demostrar su usabilidad en las instalaciones de un usuario final.

### Descripción del estuche careGENE™ N-CoV RT-PCR (Wells Bio, Inc)

El sistema evaluado, se diseñó como una prueba de diagnóstico basada en sondas TaqMan, que usa un proceso de retrotranscripción acoplado a amplificación en un solo paso, en el que se amplifica y detecta el gen E del SARS-CoV-2 (sonda acoplada a FAM) y una sonda (ROX) que detecta la amplificación de un gen de control interno humano. El sistema **careGENE™ N-CoV RT-PCR** incluye una segunda ronda de confirmación en reacciones independientes, que usa la amplificación y detección de un fragmento del gen para RdRP (sonda FAM), que se recomienda que se realice en aquellas muestras que sean positivas para el gen E. El sistema careGENE™ recomienda usar 10 µL de volumen de plantilla de RNA extraído para cada reacción.

### Sensibilidad analítica (Limit of Detection, LoD)

Se determinó realizando la reacción de amplificación con seis réplicas de diluciones seriadas de un RNA control de SARS-CoV-2 previamente titulado (AMPLIRUN® CORONAVIRUS-Vircell). Se utilizaron concentraciones conocidas de 40, 20, 10, 5 y 2.5 copias genómicas/µL y se realizaron tres montajes independientes cada uno con 6 réplicas, bajo condiciones reproducibles, con lo cual se obtuvo un total de 18 resultados por cada dilución

El LoD<sub>6</sub>, es la última dilución donde las 6 réplicas (por triplicado) muestran amplificación positiva y específica (2).

**Tabla 1. Evaluación del Límite de detección para el gen E.**

| Concentración (copias/µl) | % Detección de las réplicas | Cq medio | Desviación Estándar | Coefficiente de variación |
|---------------------------|-----------------------------|----------|---------------------|---------------------------|
| 40                        | 100                         | 30.96    | 0.447               | 1.44                      |
| 20                        | 100                         | 32.37    | 0.489               | 1.51                      |
| 10                        | 100                         | 34.09    | 0.743               | 2.17                      |
| 5                         | 100                         | 36.13    | 2.17                | 6.00                      |
| 2.5                       | 0                           | NA       | NA                  | --                        |

NA: No amplificación

**Tabla 2. Evaluación del Límite de detección para el gen RdRP**

| Concentración (copias/μL) | % Detección de las réplicas | Cq medio | Desviación Estándar | Coefficiente de Variación |
|---------------------------|-----------------------------|----------|---------------------|---------------------------|
| 40                        | 100                         | 31.69    | 0.758               | 2.39                      |
| 20                        | 100                         | 34.08    | 1.43                | 4.19                      |
| 10                        | 100                         | 37.73    | 2.59                | 6.86                      |
| 5                         | 50                          | 39.60    | 2.47                | 6.23                      |
| 2.5                       | 0                           | NA       | NA                  | --                        |

NA: No amplificación

En conclusión, el LOD<sub>6</sub> fue de 5 copias/μL para el gen E (50 copias por reacción) y el LOD<sub>6</sub> fue de 10 copias/μL para el gen RdRP (100 copias por reacción).

### Evaluación de la Sensibilidad y especificidad clínica

El kit **careGENE N-CoV RT-PCR** fue evaluado con RNA extraído de 100 muestras clínicas de aspirados nasofaríngeos del biobanco del Instituto de Virología de la Universidad El Bosque. Las muestras utilizadas, han sido recolectadas en diferentes proyectos de investigación que han sido previamente autorizados por el Comité Técnico y Comité de Ética de la Institución. Este panel incluyó 55 muestras positivas y 45 muestras negativas, previamente clasificadas así según el protocolo descrito por Corman y colaboradores (2020) (3). Los resultados obtenidos con el kit **careGENE™ N-CoV RT-PCR** muestran un total de 51 muestras positivas y 49 muestras negativas, arrojando un dato de sensibilidad del **91.9%** y una especificidad del **98.91%**. El acuerdo observado entre los tests fue del 0,91, el Índice kappa que arrojó el análisis fue de 0,820 (CI 95% -0.270 - 1.911), es decir concordancia “Muy buena”.

**Tabla 3. Muestras positivas y negativas con cada uno de los sistemas**

|          |          | PROTOCOLO BERLIN |          | Total |
|----------|----------|------------------|----------|-------|
|          |          | POSITIVO         | NEGATIVO |       |
| careGENE | POSITIVO | 51               | 0        | 51    |
|          | NEGATIVO | 4                | 45       | 49    |
| Total    |          | 55               | 45       | 100   |

**Tabla 4. Porcentaje de muestras positivas y negativas**

|          |          | PROTOCOLO BERLIN |           |
|----------|----------|------------------|-----------|
|          |          | POSITIVO         | NEGATIVO  |
| careGENE | POSITIVO | VP (51.5)        | FP (0.5)  |
|          | NEGATIVO | FN (4.5)         | VN (45.5) |

VP=Verdaderos positivos, FP=Falsos positivos, FN= Falsos negativos, VN= Verdaderos negativos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{51.5}{(51.5+4.5)} = 0.9196$$

$$\text{Especificidad} = \frac{45.5}{(45.5+0.5)} = 0.9891$$



## Discusión

Las pruebas de diagnóstico molecular se siguen considerando el Gold estándar para la confirmación de casos de COVID-19 causados por el SARS-CoV-2. Existen ventajas en la sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares, y han sido desarrollado múltiples métodos para la detección del material genético del virus por el sistema de amplificación de ácidos nucleicos. En tanto, las fases preanalíticas y analíticas en cada país e incluso en los diferentes laboratorios en un mismo país, son muy diferentes, se recomienda fuertemente hacer verificaciones secundarias usando muestras confirmadas en el país donde se va a usar un estuche de diagnóstico ya descrito. En este caso, la prueba **careGENE™ N-CoV RT-PCR**, tuvo un desempeño adecuado al compararlo con el estándar de diagnóstico (protocolo del Instituto de Virología de la Universidad de Charité, Berlín). El pequeño porcentaje de muestras que no fueron detectadas por el kit comercial se relacionó con muy bajas cargas virales (valor de Cq >38). En tanto, la gran mayoría de muestras clínicas de interés (en sintomáticos o pacientes críticos), amplifican antes de este ciclo, el estuche de diagnóstico evaluado podrá detectar con exactitud estas muestras. De manera interesante, se demostró que la confirmación de los positivos para E, usando la amplificación de un gen de mayor especificidad (RdRP) tuvo concordancia absoluta. Es importante, orientar a los futuros usuarios, sobre el interés de hacer o no confirmación, ya que por las necesidades de diagnóstico en el continente Americano, desde hace varios meses se eliminó el segundo paso de confirmación con RdRP.

El sistema **careGENE™ N-CoV RT-PCR** es de fácil uso, y requiere solamente los elementos y equipos que se encuentran disponibles en cualquier laboratorio de biología molecular que este familiarizado con amplificaciones usando sondas TaqMan. Este estuche de diagnóstico se comportó según lo descrito en los documentos internos, tanto en la sensibilidad analítica como en la sensibilidad y especificidad usando muestras clínicas.

## Conclusiones y Recomendaciones

\*.- El estuche de diagnóstico **careGENE™ N-CoV RT-PCR** demostró tener una sensibilidad de 91,9% y una especificidad de 98,9% para la detección del SARS-CoV-2 en muestras clínicas previamente confirmadas.

\*.- La prueba **careGENE™ N-CoV RT-PCR** puede ser usada siguiendo los protocolos internos del fabricante, para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2, de acuerdo a las recomendaciones de las autoridades de salud Colombianas y de la ACIN (4, 5).

## REFERENCIAS

1. Protocolo de Verificación (validación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para la detección del SARS-CoV-2. Dirección de Redes en Salud Pública, Dirección Vigilancia y Análisis del Riesgo. Instituto Nacional de Salud. Colombia. <http://www.ins.gov.co/Noticias/Coronavirus/Protocolo%20verificaci%C3%B3n%20RT%20PCR%20SARS%20CoV-2.pdf>
2. Shehata HR, Ragupathy S, Shanmughanandhan D, Kesanakurti P, Ehlinger TM, Newmaster SG. Guidelines for Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods for Molecular Diagnostic Identification of Probiotics. *J AOAC Int.* 2019;102(6):1774-1778. doi:10.5740/jaoacint.18-0320
3. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, et al . [Detection of 2019 novel coronavirus \(2019-nCoV\) by real-time](#)



[RT-PCR.](#) Euro Surveill. 2020 Jan;25(3):2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

4. Saavedra-Trujillo CH. Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-CoV-2/COVID 19 en establecimientos de atención de la salud. recomendaciones basadas en consenso de expertos e informadas en la evidencia. Revista Infectio 2020; 24:3:Suppl 1. <https://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/851/946>
5. Gomez-Marin JE, Castellanos JE, Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Forero-Duarte JE, Mattar S, Esparza G. Ad-hoc group consensus recommendations on the evaluation and quality control of molecular and serological diagnostics tests for SARS CoV-2 human infection. Infectio 2020; 24 (3) Supl 2: 11-16

**Tabla 5. Detalle de la concordancia Sensibilidad Clínica**

| MUESTRA | CareGENE |           |           | BERLIN    |
|---------|----------|-----------|-----------|-----------|
|         | Pan-CoV  | SARS-CoV2 |           | Pan-CoV   |
|         | E        | RdRP      |           | E         |
|         | Cq       | Cq        | RESULTADO | RESULTADO |
| 001     | 30,23    | 37,50     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 002     | 34,22    | 39,48     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 003     | 22,81    | 23,93     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 004     |          |           | NEGATIVO  | NEGATIVO  |
| 005     | 25,22    | 28,51     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 006     | 15,17    | 17,33     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 007     | 15,32    | 17,08     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 008     | 17,84    | 19,18     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 009     | 33,82    | 39,59     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 010     | 18,08    | 19,93     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 011     | 11,08    | 11,57     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 012     | 32,42    | 36,78     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 013     | 29,62    | 30,75     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 014     | 16,93    | 18,01     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 015     | 23,14    | 23,24     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 016     | 20,94    | 21,64     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 017     | 28,11    | 31,55     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 018     | 29,45    | 31,98     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 019     | 16,32    | 16,70     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 020     | 26,90    | 27,28     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 021     | 22,01    | 24,24     | POSITIVO  | POSITIVO  |
| 022     | 26,44    | 28,12     | POSITIVO  | POSITIVO  |



|     |       |       |          |                 |
|-----|-------|-------|----------|-----------------|
| 023 | 32,84 | 37,79 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 024 | 24,22 | 24,38 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 025 | 28,78 | 30,69 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 026 | 28,99 | 29,32 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 027 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 028 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 029 | 32,42 | 34,18 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 030 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 031 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 032 |       |       | NEGATIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 033 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 034 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 035 | 29,65 | 31,07 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 036 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 037 | 22,73 | 24,77 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 038 | 25,46 | 25,35 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 039 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 040 | 23,08 | 24,46 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 041 | 28,01 | 28,62 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 042 | 20,16 | 20,64 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 043 | 23,72 | 25,03 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 044 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 045 | 29,26 | 28,82 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 046 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 047 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 048 | 25,68 | 26,05 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 049 | 33,67 | 38,44 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 050 | 26,01 | 27,37 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 051 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 052 | 15,62 | 16,73 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 053 |       |       | NEGATIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 054 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 055 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 056 | 23,02 | 23,85 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 057 | 27,52 | 29,51 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 058 | 29,15 | 33,51 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 059 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 060 | 16,99 | 17,13 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 061 | 18,93 | 19,74 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 062 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 063 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |



|     |       |       |          |                 |
|-----|-------|-------|----------|-----------------|
| 064 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 065 | 18,24 | 18,37 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 066 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 067 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 068 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 069 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 070 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 071 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 072 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 073 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 074 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 075 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 076 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 077 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 078 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 079 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 080 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 081 | 29,87 | 32,29 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 082 | 19,61 | 20,12 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 083 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 084 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 085 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 086 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 087 | 29,40 | 38,68 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 088 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 089 |       |       | NEGATIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 090 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 091 |       |       | NEGATIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 092 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 093 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 094 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 095 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 096 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 097 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 098 | 12,35 | 13,72 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |
| 099 |       |       | NEGATIVO | NEGATIVO        |
| 100 | 30,76 | 28,83 | POSITIVO | <b>POSITIVO</b> |