
Ensayo de Aptitud: Detección del virus SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Sergio Dávila, John Leguizamón, María Arias, Andrés León, Diego Ahumada, Gabriel Molina, Katherin Holguín, Antonio García, Luis Santos, Gustavo Gómez, Nicolás Vanoy, Cristina Barros*, Sergio Gómez*

Instituto Nacional de Metrología de Colombia

*Instituto Nacional de Salud

Avenida Carrera 50 No.26- 55 Int. 2 CAN Bogotá D.C.-Colombia

(57- 1) 2542222, contacto@inm.gov.co

RESUMEN

Con la declaración de la pandemia del COVID-19, en Colombia se inició el proceso de autorización de laboratorios para detección del virus SARS-CoV-2, en la actualidad esta red cuenta con más de 190 laboratorios. Como una actividad de fortalecimiento técnico, desde el Instituto Nacional de Metrología y el Instituto Nacional de Salud, se desarrolló un Ensayo de Aptitud cualitativo dirigido a la detección del virus por RT-qPCR.

La evaluación se hizo por gen reportado por cada laboratorio, el 98.3% obtuvo un desempeño satisfactorio y el 1.7% restante obtuvo no satisfactorio para al menos uno de los genes reportados.

PALABRAS CLAVES

Ensayo de Aptitud, evaluación de desempeño, ítem de ensayo de aptitud, SARS-CoV-2, RT-qPCR.

1. INTRODUCCIÓN

La relevancia de la correcta detección de infectados por SARS-CoV-2, para la mitigación y control de la enfermedad, hace que sea necesaria la implementación de herramientas que permitan evaluar la calidad de los resultados producidos por los laboratorios autorizados en el país, para el diagnóstico del virus. En este sentido, para el INM, como coordinador de la metrología científica e industrial, y encargado de la ejecución de actividades que permitan la innovación y soporten el desarrollo económico, científico y tecnológico del país, a través de la investigación y la prestación de servicios metrológicos, es de vital importancia contribuir a brindar confianza en dichas mediciones.

El método de referencia establecido por la Organización Mundial de la Salud es la Reacción en Cadena de la Polimerasa – Transcripción Reversa en tiempo real (RT-qPCR), en particular con el uso de diferentes protocolos desarrollados en Alemania, China, Estados Unidos, Japón, Tailandia, entre otros (CDC 2020, Corman 2020, Thailand 2020, Nao 2019) (1- 4)

Aunque existen diversas herramientas que los laboratorios pueden emplear para asegurar la calidad de los resultados que producen, los Ensayos de Aptitud se constituyen en una de las más poderosas, al ser una evaluación externa e independiente del laboratorio, en este sentido, siguiendo experiencias similares (5) a través del Ensayo de Aptitud para la

detección de SARS-CoV-2, El INS y el INM a partir de sus objetivos misionales han buscado brindar herramientas de control y aseguramiento para evaluar el desempeño de los laboratorios autorizados en la detección del virus empleando RT-qPCR como método de medición.

2. DISEÑO Y PLANIFICACIÓN DEL ENSAYO DE APTITUD EN SARS-CoV-2.

2.1. Descripción

El Ensayo de Aptitud cualitativo diseñado tenía como objetivo evaluar la capacidad de los laboratorios participantes para detectar la presencia del virus SARS-CoV-2 empleando la reacción en cadena de la polimerasa como método de referencia. En este sentido se preparó como ítem de ensayo de aptitud (IEA), un panel con 5 soluciones, éste incluía tres muestras positivas en diferentes niveles de concentración y dos negativas. Las muestras positivas correspondían a diluciones gravimétricas del material RGTM10169 producido por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST por sus siglas en inglés), constituido por dos fragmentos de Ácido Ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) (Figura 1 y tabla 1.)



Fig. 1. Esquema fragmentos material RGTM 10169 empleado en la preparación de los ítems de ensayo, frente al genoma de referencia NC_045512

Tabla 1. Descripción fragmentos material RGTM10169.

Fragmento	Tamaño (bases)	Región*	Observaciones
1	3985	25949 - 29698	Cubre marcos de lectura abiertos (ORF) genes E y N entre otros Presenta cambio C/T en posición 28144 (ORF 8)
2	3790	12409 - 15952	Cubre 90% del ORF RdRp

*El IEA no cubría la región S

2.2. Preparación y caracterización del ítem de ensayo

A partir del material RGTM 10169, se preparó una solución stock de trabajo, y de esta se prepararon tres niveles de concentración en buffer fortificado con RNA humano. Por separado, se prepararon dos blancos, uno con buffer fortificado con RNA total humano, y otro con solo buffer citrato.

Cada uno de los blancos y de las muestras positivas fue envasado en viales de polipropileno con tapa rosca de 500 µL libres de DNAsas (Desoxirribonucleasa) y RNAsas (Ribonucleasa), en cada vial se dispensaron 80 µL de solución.

Previo a la producción del IEA se preparó un piloto del material en tres niveles de concentración, para evaluar su homogeneidad y estabilidad a corto plazo en diferentes temperaturas (- 20 °C y 4 °C), donde se evidenció que el material es lo suficientemente homogéneo y estable (a 4 °C por más de 4 semanas) demostrando que es adecuado para el EA propuesto.

La homogeneidad y estabilidad del IEA fueron evaluadas de acuerdo con las recomendaciones de la Guía ISO 35:2017 (6). Para el estudio de homogeneidad se emplearon 15 viales por nivel, seleccionados aleatoriamente, estos fueron medidos por triplicado mediante RT-qPCR. A través de un análisis de varianza de un factor se determinó el grado de heterogeneidad del material (0.9 % a 1.2 %), considerado como apto para el propósito de acuerdo con el plan de producción.

Se realizó un estudio de estabilidad del material a corto plazo siguiendo un modelo isócrono a 4°C (6), durante 4 semanas. La evaluación se realizó por RT-qPCR para los 3 niveles, de acuerdo con el análisis de regresión y al no tener una pendiente significativamente diferente de cero (valor p 0,607, figura 2), el material se considera estable y apto para su uso en el EA. La Figura 2 presenta el resultado del estudio de estabilidad para el nivel de alta concentración, resultados similares se obtuvieron para los otros dos niveles (datos no mostrados).

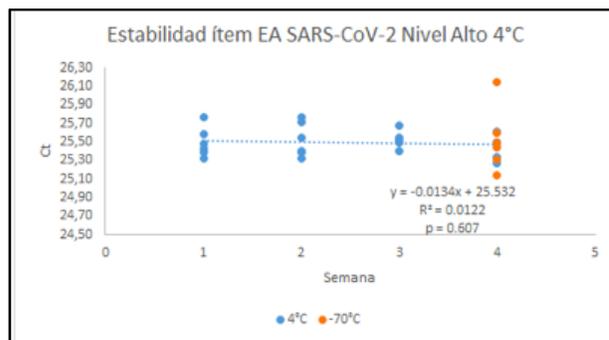


Fig. 2. Resultados monitoreo del IEA para el nivel alto.

2.3. Asignación de valor

Dado que es un EA cualitativo (literal b numeral 3.7 NTC ISO/IEC 17043:2010 (8)), el valor de la propiedad del ítem de ensayo de aptitud está determinado por la presencia o ausencia de RNA del virus SARS-CoV-2 en las muestras que constituyen cada uno de los paneles, donde hay 3 positivas y 2 negativas. Las muestras positivas se prepararon en 3 niveles de concentración con el objetivo de evaluar la capacidad de los laboratorios de detectar regiones específicas del virus en alta, media y baja concentración.

2.4. Presentación final del IEA

Cada participante recibió un panel con 5 viales de 500 µL en polipropileno, con tapa rosca y sello, libres de DNAsas y RNAsas, con un contenido de 80 µL (aproximadamente) del IEA, empacados en un blíster, en bolsa plástica y bolsa aluminizada (Figura 3).



(A) Vial, (B) blíster, (C) bolsa aluminizada y (D) bolsa plástica.

Fig. 3. Presentación del IEA.

3. RESULTADOS

Este ejercicio se diseñó como un programa de ensayo de aptitud cualitativo según lo que establece en el numeral 11 de la norma NTC ISO 13528:2017 (7). la evaluación desempeño del participante estuvo basado en la **proporción de resultados correctos** (numeral 11.4.4 de la norma NTC ISO 13528:2017 (7)), el criterio evaluación del EA y de aceptación del resultado del participante se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterio de evaluación EA

Parámetro	Declaración de resultados	Criterio de evaluación
SARS-CoV-2 (Cualitativo)	Positivo Negativo	80 % (4 de 5 resultados correctos respecto al valor de referencia)

Teniendo en cuenta que el objetivo de un ensayo de aptitud tipo cualitativo es identificar o describir una o más características del ítem de ensayo de aptitud (literal b numeral 3.7 NTC ISO/IEC 17043:2010 (8)) en este caso la evaluación de cada ítem es binaria (positivo/negativo) y el desempeño global se evaluó con base en la coincidencia entre los resultados del laboratorio participante y el laboratorio de referencia de acuerdo con la siguiente ecuación (1), donde la proporción de soluciones asignadas correctamente corresponde a las soluciones cuyo resultado sea igual al valor de referencia:

$$\text{Resultado} = \left(\frac{\text{Número de soluciones asignadas correctamente}}{5} \right) * 100 \quad (1)$$

Teniendo en cuenta la expresión anterior, la evaluación de desempeño a través “**proporción de resultados correctos**” se establece de la siguiente forma:

- Si la proporción de resultados correctos es $\geq 80\%$, el desempeño se considera “satisfactorio”.
- Si la proporción de resultados correctos es $< 80\%$, el desempeño se considera “No satisfactorio”.

Dado que los laboratorios participantes reportaron resultados con diferente número de ensayos y secuencias de detección, la evaluación de desempeño se hizo por gen o ensayo para cada laboratorio.

Los valores de respuesta instrumental (Ct o Cp o Cq) reportados por los laboratorios participantes no afectaron su evaluación de desempeño del criterio cualitativo, pero si se realizó un análisis descriptivo que permitirá brindar una idea general del comportamiento de estas variables en cada gen/ensayo.

3.1. Análisis de resultados

Se inscribieron 124 laboratorios en el EA, de los cuales 121 reportaron resultados. Por comparación frente a los valores de referencia establecidos por el laboratorio de Bioanálisis del INM, se obtuvieron los resultados de la evaluación del desempeño por gen, de acuerdo con el número de genes reportados por cada laboratorio.

3.1.1. Ensayos evaluados

El 74 % de los laboratorios participantes emplearon plataformas abiertas de medición, donde solo

aplicaba la retrotranscripción y amplificación de la muestra, el 26 % restante uso plataformas cerradas, donde en su mayoría los laboratorios prepararon una dilución de cada una de las muestras contenidas en el panel a 900 μ L, y de allí tomaron el volumen requerido por su plataforma de medición.

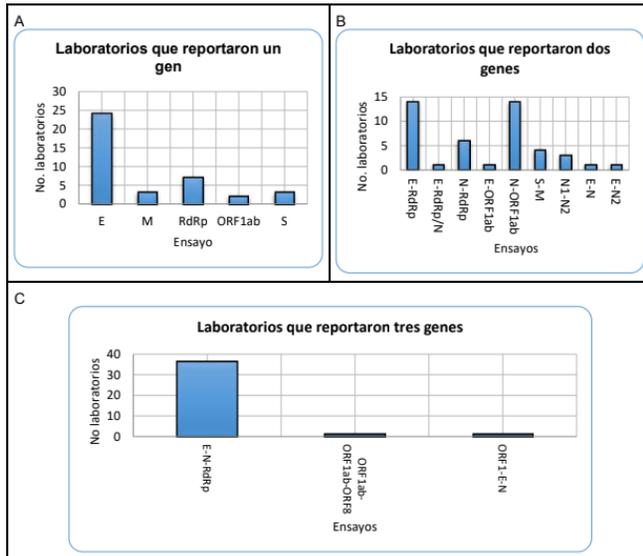


Fig. 4. Genes reportados por los laboratorios participantes en el EA

En cuanto a los genes de detección relacionados por los laboratorios, el 32 % reportó un solo gen, siendo E el más frecuente seguido de RdRp y M (Figura 4A); el 37 % reportó dos ensayos (Figura 4B) y el 31 % restante tres ensayos, siendo predominante el uso de los genes virales E, N y RdRp (Figura 4C). La Figura 5 presenta la distribución del número de laboratorios que reportaron resultados para cada uno de los ensayos.

3.1.2. Evaluación del desempeño

La evaluación se hizo para cada gen reportado por cada laboratorio participante, 119 laboratorios obtuvieron un desempeño satisfactorio para los distintos genes reportados, equivalente al 98.3 %, el 1.7 % restante obtuvo un desempeño no satisfactorio para al menos uno de los genes reportados, la figura 5 presenta un resumen de los resultados obtenidos por gen.

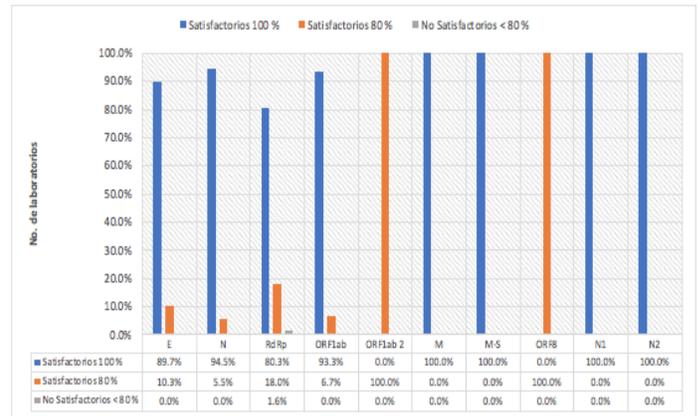


Fig. 5. Resultados generales reportados por los laboratorios

En relación con los laboratorios con evaluación satisfactorio y teniendo en cuenta el criterio de evaluación del desempeño establecido (mayor o igual a 80 %), se determinó que 20 laboratorios (16.5 %), fallaron en la asignación de una de las muestras contenidas en los paneles entregados, en un total de 28 ensayos reportados (Figura 5); entre las causas identificadas se encontró el reporte de resultados falsos negativos, falsos positivos, o no reportados (Figura 6).

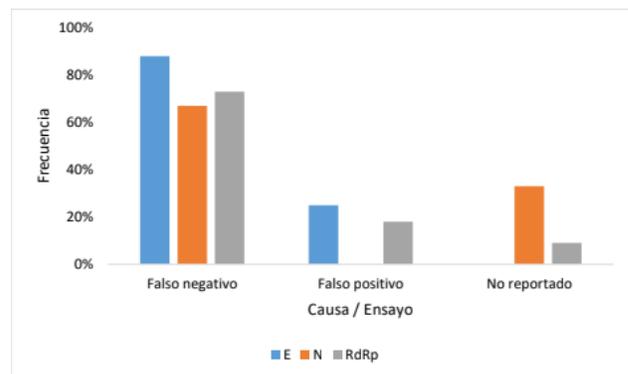


Fig. 6. Causas de error identificadas en el EA

4. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

En cuanto a los genes no cubiertos en el alcance de este EA, Gen S, M y ORF1ab fueron medidos por algunos participantes y generaron algunas observaciones de los mismos, por tal motivo se espera contemplar en futuras rondas la inclusión de estos genes para su evaluación y así fortalecer el ejercicio de EA.

El servicio de EA evaluó la competencia de los laboratorios para detectar la presencia del virus SARS-CoV-2 por RT-qPCR, dada la naturaleza del IEA empleado, este proceso no cubre la etapa de extracción de RNA.

En el ejercicio de EA participaron un total de 121 laboratorios de los cuales 119 obtuvieron un desempeño satisfactorio para los distintos genes reportados, lo que es equivalente al 98.3 %, el 1.7 % restante obtuvo un desempeño no satisfactorio para al menos uno de los genes reportados.

Los resultados de estos ejercicios ayudan a las entidades de control a identificar componentes críticos de la medición y la creación de estrategias que permitan el fortalecimiento de competencias de estos laboratorios y realizar controles cuando sea pertinente. Este tipo de ejercicios deben ser desarrollados con una frecuencia apropiada y liderados según su misión por el INM en conjunto con el INS o quien sea designado, de tal manera que se pueda garantizar la confianza de las pruebas realizadas a la ciudadanía en cuanto a la detección de este virus.

AGRADECIMIENTOS

Como respuesta a las necesidades en salud pública causadas por la pandemia por COVID-19, este EA contó con el apoyo del Global Quality and Standards Programme Colombia – Programa de Calidad para la Cadena de Químicos, el cual es liderado por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI) y es financiado por la Secretaría de Estado para Asuntos Económicos de Suiza (SECO), el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo y Colombia Productiva y del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST por sus siglas en inglés).

REFERENCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel*. Retrieved from https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-rt-pcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2
2. Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., & Zambon, M. (2020). Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. *Carité Berlin*.
3. Department of Medical Sciences Ministry of Public Health of Thailand. (2020). Diagnostic detection of Novel coronavirus 2019 by Real time RT-PCR. Retrieved from <https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/>
4. Nao, N., Shirato, K., Katano, H., Matsuyama, S., & Takeda, M. (2019). Detection of second case of 2019-nCoV infection in Japan (corrected version). *National Institute of Infection Diseases, Japan*. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.7>
5. Ziichhardt H, Kammel M (2020) INSTAND ev. Report on Extra External Quality Assessment Scheme Group No 340. Virus Genome Detection - SARS-CoV-2.
6. ISO/Guide 35:2017. REFERENCE MATERIALS - GUIDANCE FOR CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF HOMOGENEITY AND STABILITY.
7. NTC-ISO 13528:2017. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA USO EN ENSAYOS DE APTITUD POR COMPARACIÓN INTERLABORATORIO.
8. NTC-ISO-IEC 17043:2010. EVALUACIÓN DE LA CONFORMIDAD. REQUISITOS GENERALES PARA LOS ENSAYOS DE APTITUD