



INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD



La salud
es de todos

Minsalud

**Protocolo de verificación
(validación secundaria)
para pruebas moleculares
de PCR en tiempo real (RT-qPCR)
para la detección del SARS-CoV-2**

Dirección Redes en Salud Pública
Dirección Vigilancia y Análisis del Riesgo

Protocolo de verificación (validación secundaria) para pruebas moleculares de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para la detección del SARS-CoV-2

ELABORADO POR:

Laboratorio Nacional de Referencia de Virología
Dirección Redes en Salud Pública

- Sergio Yebraíl Gómez Rangel. *Profesional Coordinador*
- Lissethe Carolina Pardo Herrera. *Profesional Coordinador*
- Angelica María Rico Turca. *Profesional*

Dirección Vigilancia y Análisis del Riesgo

- Ricardo Andres Caicedo Díaz. *Epidemiólogo.*

Dirección Redes en Salud Pública

- Esther Cristina Barros Liñán. *Profesional especializada.*
- Astrid Carolina Flórez Sánchez.
Directora Técnica de Redes en Salud Pública

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa–Transcripción Reversa (RT-qPCR) en tiempo real es una técnica ampliamente utilizada en virología diagnóstica. Recientemente ante la emergencia en salud pública ocasionada por el nuevo coronavirus emergente SARS-CoV-2, el laboratorio del Instituto de Virología de Charité en Berlín, Alemania estandarizó y validó el protocolo de diagnóstico bajo la metodología de RT-qPCR, debido a la naturaleza de la metodología y a su nivel de confiabilidad en la detección del virus, esta fue transferida a los Laboratorios Nacionales de Referencia de Latinoamérica a través de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Posteriormente diferentes metodologías de diagnóstico han sido ensambladas en varios países, algunas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) y comercializadas en nuestro país bajo registro sanitario INVIMA. Este documento especifica el protocolo de evaluación o verificación diagnóstica de las pruebas de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) para la detección viral del SARS-CoV2 disponibles comercialmente en Colombia en muestras de población colombiana tomadas a partir de hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos y muestras de aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar. Algunos sectores utilizan

los conceptos de ‘validación primaria’ y ‘validación secundaria’, esta última con el sentido de verificación.

En el marco de la emergencia declarada por Covid-19 que actualmente vive el país, se propone el desarrollo de un protocolo de verificación diagnóstica que ayude a los diferentes centros de diagnóstico e investigación del país a generar información que permita evidenciar el desempeño diagnóstico de la RT-qPCR para el SARS-CoV-2.

El acelerado crecimiento de los casos y el apresurado ritmo con el que la pandemia lleva los servicios de diagnóstico e investigación, estimula a que a pesar de las limitaciones en términos de tiempo, recurso tecnológico, recurso económico, talento humano y sumado a esto la premura de los resultados, sea necesario contar en el menor tiempo posible y con el mínimo de recursos con información relevante que permita la aplicación de tecnologías, específicamente de RT-qPCR. Por tal motivo, el presente documento sugiere el uso racional de muestras biológicas y de estuches de diagnóstico sin perder el rigor metodológico del principio de una validación secundaria o verificación diagnóstica. El trabajo del laboratorio se orientará en la verificación de los datos de desempeño publicados del fabricante y en demostrar que el método funciona en las instalaciones del usuario final.

Glosario

Verificación: confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos de un método, especificados por el fabricante.

Características operativas: atributos estadísticos que miden el desempeño diagnóstico de una prueba utilizada para el diagnóstico.

Confiabilidad: también llamada reproducibilidad de una prueba implica la cantidad de error que se comete al realizar la medición. Se puede encontrar la confiabilidad intra-analista o inter-analista.

Especificidad: proporción de personas verdaderamente no enfermas que han sido catalogadas como tales mediante una prueba diagnóstica.

Exactitud: proporción de individuos clasificados correctamente.

Rendimiento de pruebas diagnósticas: es la capacidad evidenciada de las pruebas diagnósticas para configurar adecuadamente los pacientes en condiciones locales, frente a condiciones aleatorias

y variables de contexto o paciente. Una técnica con buen rendimiento hace referencia a una prueba que en diferentes condiciones ambientales, analista o muestra pueda detectar la presencia o ausencia de lo que se está investigando.

Sensibilidad: proporción de personas verdaderamente enfermas que han sido catalogadas como tales mediante una prueba diagnóstica.

Validez: capacidad de una prueba diagnóstica para detectar correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad en cuestión y si ésta realmente esta cumple la función para la cual fue diseñada, se expresa matemáticamente con índices como sensibilidad y especificidad, entre otras.

Valor predictivo positivo: probabilidad condicional que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad.

Valor predictivo negativo: probabilidad condicional que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

Establecer una metodología de evaluación del rendimiento diagnóstico de las pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa - Transcripción Reversa (RT-qPCR) en tiempo real para la detección viral del SARS-CoV2 disponibles comercialmente en Colombia, frente a la prueba de referencia, RT-qPCR protocolo Berlín, Alemania, recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y aplicado por el Instituto Nacional de Salud.

Objetivos específicos

- Comparar el desempeño diagnóstico de las pruebas moleculares de RT-qPCR disponibles comercialmente,

mediante concordancia diagnóstica frente al estándar de referencia la RT-qPCR protocolo estandarizado en Berlín-Alemania.

- Estimar la sensibilidad, especificidad, exactitud y valores predictivos de las pruebas de RT-qPCR para la detección viral del SARS-CoV2 disponibles comercialmente, frente a la técnica de RT-qPCR protocolo estandarizado en Berlín- Alemania como estándar de referencia.
- Verificar parámetros de desempeño de los métodos comerciales de RT-qPCR descritos en los insertos y determinar si son adecuadas para su uso previsto en población colombiana.

Metodología

Tipo y diseño del estudio

Cada evaluación deberá tratarse como un estudio primario de pruebas diagnósticas donde se estimarán las características operativas en términos de sensibilidad, especificidad, exactitud y valores predictivos de estuches comerciales de RT-qPCR para el diagnóstico del SARS-CoV2, con muestras provenientes de pacientes colombianos.

Las muestras deberán organizarse en paneles de desempeño, las muestras biológicas que se utilizarán deberán ser seleccionadas por criterios de positividad (presencia del virus) y negatividad (ausencia del virus) de la enfermedad de Covid-19. Este criterio deberá ser asignado siempre por la prueba de referencia, que en este caso es la RT-qPCR estandarizada en el Protocolo de Berlin.

Adicionalmente no como parte del proceso de verificación, si resulta posible realizar estudio de repetibilidad con la estimación del coeficiente de variación (%CV) por el procesamiento de un número de muestras bajo las mismas condiciones técnicas y ambientales, es decir un mismo analista analizando consecutivamente muestras duplicadas, permitiría comprobar la repetibilidad y la reproducibilidad mediante el procesamiento por parte de diferentes analistas un número de muestras, utilizando el mismo sistema de medición.

Estimadores

Para la verificación diagnóstica se calcularán los siguientes estimadores, junto con sus intervalos de confianza al 95% (95%IC):

- Sensibilidad (Se)
- Especificidad (Sp)
- Valor predictivo positivo (VPP)

- Valor predictivo negativo (VPN)
- Exactitud (Ex)
- Tasa de falsos positivos y negativos
- Índice Kappa de Cohen

Diseño muestral

El panel de desempeño deberá contener muestras positivas y negativas para la condición de estudio, en este caso deberá tener muestras que cuenten con RNA viral del SARS-CoV-2 y con muestras exentas de él. Adicionalmente, deberá abarcar todo el espectro de la enfermedad, pacientes sintomáticos claramente positivos, pacientes asintomáticos, así como muestras de pacientes de diferentes grupos etarios.

Muestra

Se utilizarán muestras de hisopados nasofaríngeos u orofaríngeos y muestras de aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar que hayan estado en óptimas condiciones de almacenamiento a $-70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Criterios de selección

Se aplicarán los siguientes criterios de selección a las muestras:

Criterios de inclusión

Muestras procedentes de pacientes que cumplan con los siguientes criterios:

- Pacientes sospechosos sintomáticos evaluados en consulta desde las diferentes entidades de salud (instituciones prestadoras de salud) a nivel nacional.
- Pacientes sospechosos sintomáticos procedentes de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)
- Pacientes sospechosos asintomáticos con previo contacto con personas sintomáticas.

- Pacientes sospechosos procedentes de conglomerados.
- Personas sospechosos procedentes de estudios de tamizaje poblacional.

Criterios de exclusión

Deberán ser excluidas de la evaluación las muestras que cumplan por lo menos uno de los siguientes criterios:

- Evidencia de almacenamiento inadecuado o presencia de contaminación microbiana, fúngica, química como solventes o reactivos.
- Menos de 250uL de volumen en el vial.
- Alteraciones o modificaciones en su rotulado.

Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realiza teniendo en cuenta lo siguiente:

Para un estudio de pruebas diagnósticas con resultado dicotómico (distribución binomial positivo y negativo), cuyo objetivo es comparar proporciones de sensibilidad y especificidad entre dos pruebas, se realizarán para el tamaño total de la muestra, cálculos independientes para sensibilidad y especificidad, los parámetros de sensibilidad esperados determinarán el número de muestras positivas y los parámetros de especificidad esperados determinaron el número de muestras negativas, adicionalmente, se deberá tener en cuenta el número de pruebas para la evaluación.

Panel de evaluación de Sensibilidad (muestras positivas): conformar el panel incluyendo muestras confirmadas positivas para la condición en estudio.

Una manera de calcular la cantidad mínima de muestras positivas requeridas para el ejercicio es la siguiente, de acuerdo con Jacobson (1998) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1998,17 (2), 507-526

$$n = \{Se (1-Se)C^2\} / E^2$$

Donde

- **Se**= Sensibilidad esperada (otorgada por el fabricante o la literatura)
- **C**= Intervalo de confianza estimado (1.96 para un 95% de confianza)
- **E**= % de error permitido en la estimación de sensibilidad expresado en decimal (habitualmente ± 5 -20%).

Ejemplo: Para un ejercicio donde la sensibilidad esperada sea de 85%, la confianza sea del 95% y el error máximo del 5%.

$$n = \frac{(0,85)(1 - 0,85)(1,96^2)}{0,05^2}$$

$$n = 196$$

Panel de evaluación de Especificidad (muestras negativas): Conformar el panel incluyendo muestras confirmadas negativas para la condición en estudio. Se deben integrar muestras de pacientes aparentemente sanos y que padezcan otro tipo de condiciones semejantes a la de estudio pero negativa para ésta.

Una manera de calcular la cantidad mínima de muestras negativas requeridas para la validación o verificación de una técnica según Jacobson (1998) como sigue:

$$n = \{Sp (1-Sp)C^2\} / E^2$$

Donde:

- **Sp**= Especificidad esperada (otorgada por el fabricante o la literatura)
- **C**= Intervalo de confianza estimado (1.96 para un 95% de confianza)
- **E**= % de error permitido en la estimación de Especificidad expresado en decimal (habitualmente ± 5 -20%).

Ejemplo: Para un ejercicio donde la especificidad esperada sea de 90%, la confianza sea del 95% y el error máximo del 5%.

$$n = \frac{(0,90)(1 - 0,90)(1,96^2)}{0,05^2}$$

$$n = 138$$

Para la estimación del tamaño de la muestra se deben considerar factores como: costos operativos, vía de obtención de los estuches y tiempos de ejecución, entre los más importantes. Los estuches de RT-qPCR generalmente tienen una presentación por 100 reacciones, que permitiría estimar un “*n muestral*” de al menos 80 muestras, 40 positivas y 40 negativas, excluyendo los controles internos de la corrida; sin embargo, en el mercado existen algunas metodologías cerradas que automatizan e integran la preparación de las muestras, el proceso de la extracción y amplificación de ácidos nucleicos, cuya presentación comercial es menor de 100 o inclusive individual.

En casos en que la disponibilidad de los insumos puede estar limitada y no sea viable definir el tamaño de muestras basado en las herramientas del cálculo de tamaño de muestras definidas, es posible considerar la información de los estudios robustos de validación primaria internos y externos realizados por parte del fabricante, con un tamaño de muestra superior a 30 muestras procesadas. Para estos casos se puede optar por un tamaño de muestra que se establece desde el criterio estadístico mínimo para poder inferir comportamiento sobre una población ($n \geq 30$), sugiriendo procesar mínimo 33 muestras, distribuyendo equitativamente entre muestras previamente caracterizadas como positivas y negativas. Es decir, conformando un panel con un mínimo de 33 muestras: 17 muestras positivas y 16 muestras negativas. Esto significaría un error máximo permitido del 15%. Se recomienda adicionalmente en estos casos, que las características de sensibilidad y

especificidad no sean inferiores al 85%.

Es posible utilizar además otras formas de estimar el número de muestras necesario para la confirmación del panel, pero siempre deben tenerse claros los parámetros a obtener en términos de sensibilidad, especificada y error tipo I.

Definición del valor por el patrón de referencia

Debe establecerse el criterio de verdad positivo y negativo basado en los resultados de la prueba molecular de laboratorio de RT-qPCR protocolo estandarizado en Berlín, Alemania para SARS-CoV2.

Recomendaciones para el procedimiento

Selección de las muestras y procedimiento: Una vez seleccionadas las muestras, se deben tratar de la siguiente manera:

- Generar una base de datos de las muestras seleccionadas para el procedimiento
- Alistar las muestras en una gradilla e iniciar el procedimiento tan pronto estén fuera de congelación y se encuentren en estado líquido.
- El procesamiento analítico de las muestras se debe llevar a cabo de acuerdo a las recomendaciones y procedimientos descritos en el inserto de cada estuche sin ninguna modificación.
- Las muestras se deberán procesar en condiciones óptimas controladas de laboratorio, con un antecedente de monitoreo de condiciones ambientales que garantice la temperatura y humedad relativa del proceso.
- Los equipos de laboratorio deben contar con intervenciones metrológicas periódicas realizadas por una entidad autorizada para dichos procedimientos.
- Las muestras deberán ser procesadas por un solo analista con un alto nivel de experticia en técnicas moleculares.

- Cuando se incluye el estudio de reproducibilidad deberá disponerse de más de un analista con un alto nivel de experticia en técnicas moleculares.

Recolección de la información

Fuente de información

La fuente de información es primaria, las unidades de análisis serán los resultados de las muestras de hisopados o aspirados que se procesaron por cada una de las técnicas moleculares de RT-qPCR evaluadas.

Los resultados de cada corrida analítica serán validados de acuerdo con los criterios de validación interna de cada una de las pruebas, incluidos en el manual o inserto de las técnicas.

Estándar de Referencia

El “estándar de oro” o prueba de referencia corresponde a la prueba de PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) estandarizada por el hospital Charité Virology en Berlín, Alemania.

Todas las muestras de hisopado o aspirados incluidas en el panel para el estudio de verificación o validación secundaria se deberán caracterizar previamente por el estándar de referencia.

Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados de los procesamiento de las muestras se deberá realizar de acuerdo con lo manifestado por los fabricantes de las técnicas.

Procesamiento y análisis de los datos

Procesamiento de datos: una vez construidas las bases de datos se realiza el análisis univariado que consiste en determinar la frecuencia de resultados

positivos y negativos por la prueba sometida al proceso de verificación, posteriormente se realiza el análisis bivariado, tomando en cuenta los resultados del análisis univariado junto con los resultados del patrón de referencia.

Se deberán originar tablas de contingencia 2x2, donde las columnas correspondían al valor establecido por el estándar de referencia (positivo/negativo) y en las filas se presentaba el valor de la prueba evaluada (positivo/negativo).

Prueba a evaluar	Prueba de referencia		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	VP	FP	VP + FP
Negativo	FN	VN	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	N

Análisis de datos

Estimación de características operativas individuales:

con la información completa, se procede a calcular sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, exactitud y el intervalo de confianza al 95%, en el software Epidat 3.0, o cualquier tipo de software diseñado para éste fin.

Para la interpretación del índice Kappa se utilizará la tabla de Landis y Koch 1977,

Escala de índice Kappa de Cohen

Coeficiente Kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre
0,01 – 0,20	Leve
0,21 – 0,40	Aceptable
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Considerable
0,81 – 1,00	Casi perfecta

Bibliografía

- Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, et all. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-qPCR. Euro Surveill. 2020; 25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Organización Panamericana de la Salud Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV). 01 de febrero de 2020
- EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second edition. 2014
- Jacobson RH. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1998,17 (2), 507-526
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics, 33(1), 159.