

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI
PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN SALIVA

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN SALIVA

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	3
2.1.	Muestras analizadas	3
2.2.	Amplificación por RT-PCR.....	3
2.3.	Test rápido de antígenos Zhenrui.....	4
2.4.	Medida de tiempo para positivo.....	4
3.	ACEPTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	4
3.1.	Amplificación por RT-PCR.....	4
3.2.	Test rápido de antígenos Zhenrui.....	5
3.3.	Medida de tiempo para positivo.....	5
4.	RESULTADOS OBTENIDOS	6
4.1.	Resultados cualitativos positivo/negativo	6
4.2.	Resultados de tiempo para positivo	6
5.	VALIDACIÓN ANALÍTICA.....	9
5.1.	Sensibilidad analítica	9
5.2.	Especificidad analítica.....	9
5.3.	Exactitud	10
6.	CONCLUSIONES.....	10

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN SALIVA

1. INTRODUCCIÓN

COVID-19 (acrónimo del inglés coronavirus disease 2019) es una enfermedad infecciosa causada por el coronavirus SARS-CoV-2. Distintos tipos de tests de COVID-19 permiten confirmar o descartar la presencia del nuevo coronavirus (2019-nCoV) de manera rápida y segura, mediante una reacción específica de detección del virus.

El Test Rápido de Antígenos Zhenrui® es un inmunoensayo de flujo lateral diseñado para la detección cualitativa de antígenos de la nucleocápside del SARS-CoV-2 por parte de un proveedor de servicios sanitarios, a través de frotis nasofaríngeos y orofaríngeos de personas sospechosas de estar contagiadas por COVID-19.

En este estudio se ha validado el desempeño de este kit en muestras de saliva de pacientes portadores de SARS-CoV-2. Este proceso de validación se ha basado en la valoración del desempeño del mismo en comparación con la técnica RT-PCR, considerada "gold standard" para la detección de SARS-CoV-2.

Los detalles del proceso de validación, sus resultados y el análisis de los datos obtenidos se detallan a continuación.

2. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

2.1. Muestras analizadas

Se analizó un total de 252 muestras de saliva de pacientes de población general que habían solicitado un test de PCR para la detección de SARS-CoV-2, de las cuales 148 habían resultado negativas y 104 positivas (con Ct \leq 29) por PCR previa. Desde su toma se pudieron mantener a temperatura ambiente (entre 15-28°C) durante varios días (Ott et al., 2020; Vogels et al., 2020), aunque a su llegada al laboratorio se mantuvieron a 2-8°C. Algunas de las muestras positivas empleadas se mantenían congeladas, por formar parte del biobanco propio de la actividad del laboratorio.

Todas las muestras fueron sometidas al análisis mediante RT-PCR y test de Ag en el mismo día.

2.2. Amplificación por RT-PCR

Considerada la técnica "gold standard" para la detección de SARS-CoV-2, la RT-PCR consiste en una retrotranscripción seguida de una PCR multiplex a tiempo real (RT-Mx-PCR) en un único ensayo, para la detección cualitativa de 2019-nCoV (RNA-virus) en saliva. La detección RNA de SARS-CoV-2 implica la presencia del virus en la muestra analizada.

El diseño de la técnica empleada se basa en las recomendaciones para la detección de SARS-CoV-2 del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), División de Enfermedades Víricas (Atlanta GA, USA), del 30/03/2020 (CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, IVD, CDC-006-00019 Rev.03).

En presencia de RNA de SARS-CoV-2 en la muestra, por RT-PCR se amplifican regiones del genoma del virus mediante el empleo de sets de primers y sondas específicas (ensayo Taqman). En concreto, se analizan dos regiones del gen de la nucleocápside (N) del virus SARS-CoV-2. Además, de manera simultánea se realiza RT-PCR para la detección del gen humano RPPH1 (RNase P), empleado como control. La RT-Mx-PCR se llevó a cabo en equipos Rotorgene-Q 5plex (QIAGEN).

Como sistema de aseguramiento interno de la calidad (IQA) a cada ensayo de PCR se incorporaron controles positivos y NTCs, tal y como se especifica a continuación:

- Como control interno de cada muestra, la amplificación de RP permite verificar la presencia de RNA en la muestra analizada, como consecuencia de un correcto proceso de aislamiento de RNA a partir de la muestra primaria y la ausencia de una potencial contaminación durante el proceso de extracción.
- En el NTC o No-Template-Control, se sustituye la muestra por agua libre de RNasas, sin ácido nucleico alguno, para descartar la presencia de contaminación en algún punto del ensayo.
- El control positivo para 2019-nCoV permite verificar el buen funcionamiento del ensayo específico para el virus (reactivos -enzimas, primers, sondas- y equipos).
- El control positivo para RPP30 humano permite verificar el buen funcionamiento del ensayo específico para la amplificación de la región génica humana (reactivos -enzimas, primers, sondas- y equipos).

Se realizó la RT-PCR a todas las muestras incluidas en el estudio, las cuales anteriormente habían sido informadas como negativas o positivas mediante otra RT-PCR previa.

2.3. Test rápido de antígenos Zhenrui

La realización del test de antígenos Zhenrui a cada muestra incorporada al estudio se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, con las siguientes puntualizaciones:

- Al tratarse de muestras líquidas, no se incorporó el tampón de extracción incluido en el kit.
- Al pocillo S del cassette se incorporaron en todos los casos 100µl de muestra primaria, medidos con micropipeta.

2.4. Medida de tiempo para positivo

En este estudio se valoró también el tiempo necesario para la detección de resultado positivo en el test de antígenos. Para ello, se realizó análisis visual del cassette a tiempo (en minutos) 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 25.

Los resultados se obtuvieron mediante análisis visual por parte de dos técnicos distintos del laboratorio.

3. ACEPTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Amplificación por RT-PCR

Los resultados esperados para cada uno de los controles son los siguientes:

Tabla 1. Resultados esperados para los controles incluidos en cada ensayo.

Tipo de control	Nombre	N1	N2	RP	C _t esperado
Amplificación	COVID-19_N_Positive Control	+	+		~18-19
Amplificación	Hs_RPP30 Control			+	~18-19
Contaminación	NTC	-	-	-	Ninguno

Si alguno de estos controles no presentó el resultado esperado, no se dio por bueno el ensayo y se procedió a la repetición del mismo. Cuando todos los controles presentaron resultados aceptables, los resultados de las muestras analizadas se interpretaron según los siguientes criterios:

Tabla 2. Criterios de interpretación de resultados.

N1	N2	RP	Interpretación del resultado
+	+	±	Se detecta SARS-CoV-2
Solo uno (N1 o N2) es positivo		±	No concluyente
-	-	+	No se detecta SARS-CoV-2
-	-	-	Inválido

Para las muestras con RT-PCR positiva se determinó el valor Ct, definido como el número de ciclo al que fluorescencia detectada en el tubo (producto de la amplificación del RNA viral) cruza el umbral (threshold), el cual constituye el nivel de señal que refleja un incremento estadísticamente significativo sobre la línea base establecida. El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de material genético inicial.

3.2. Test rápido de antígenos Zhenrui

La interpretación del resultado del test de antígenos se realizó según las indicaciones del fabricante, mediante análisis visual por parte de dos técnicos distintos del laboratorio.

3.3. Medida de tiempo para positivo

Se consideró tiempo para positivo el dato en minutos, según los intervalos valorados (punto 2.4.), en el que se percibió señal positiva (independientemente de la intensidad de la misma) en la línea T del cassette por parte de los dos técnicos distintos que valoraron visualmente el resultado (Figura 1).



Figura 1. Test de antígenos para distintas muestras positivas con distintos Ct por PCR, mostrando la distinta intensidad de banda T, indicativa del positivo en este test.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Resultados cualitativos positivo/negativo

En las tablas 3 y 4 se recogen los resultados obtenidos para las muestras analizadas, en función de sus resultados cualitativos para la PCR y el test de antígenos.

Tabla 3. Todas las muestras analizadas, según resultado para PCR y test de antígenos (NEG PCR=resultado negativo en RT-PCR; POS PCR=resultado positivo en RT-PCR; NEG Ag=resultado negativo en test de antígenos; POS Ag=resultado positivo en test de antígenos; NO CONCL Ag=resultado no concluyente en test de antígenos).

	NEG PCR	POS PCR	TOTAL
NEG Ag	144	15	159
POS Ag	1	88	89
TOTAL (Sin NO CONCL)	145	103	248
NO CONCL Ag	3	1	4
TOTAL	148	104	252

Tabla 4. Todas las muestras negativas y positivas con Ct≤25 analizadas, según resultado para PCR y test de antígenos (NEG PCR=resultado negativo en RT-PCR; POS PCR=resultado positivo en RT-PCR; NEG Ag=resultado negativo en test de antígenos; POS Ag=resultado positivo en test de antígenos; NO CONCL Ag= resultado no concluyente en test de antígenos).

	NEG PCR	POS PCR	TOTAL
NEG Ag	144	2	146
POS Ag	1	77	78
TOTAL (Sin NO CONCL)	145	79	224
NO CONCL Ag	3	1	4
TOTAL	148	80	228

De las 252 muestras analizadas, de 4 no se pudo obtener resultado para el test de antígenos (no concluyente). Estas 4 muestras de saliva tenían en común el alta grado de mucosidad, lo cual imposibilitó que el inmunoensayo pudiera llevarse a cabo (Figura 2).



Figura 2. Progresión del inmunoensayo del test de antígenos para 2 muestras negativas distintas. La muestra de la derecha presentó tal grado de mucosidad que no permitió obtener un resultado concluyente.

4.2. Resultados de tiempo para positivo

Para el análisis de los tiempos de positivo, las muestras positivas por PCR fueron agrupadas según su Ct, tal y como se recogen en la tabla 5 y en la figura 3.

Tabla 5. Tiempos de positivo para el test de antígenos obtenidos para todas las muestras analizadas, según Ct obtenido en la PCR (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR).

TIEMPO PARA POSITIVO (min)	POS PCR Ct≤20	POS PCR 20<Ct≤25	POS PCR Ct>25	TOTAL
2 min	1	1	2	4
3 min	22	7	4	33
5 min	1	2	0	3
10 min		11	12	23
20 min		3	4	7
≥25 min		10	8	18
TOTAL	24	34	30	88

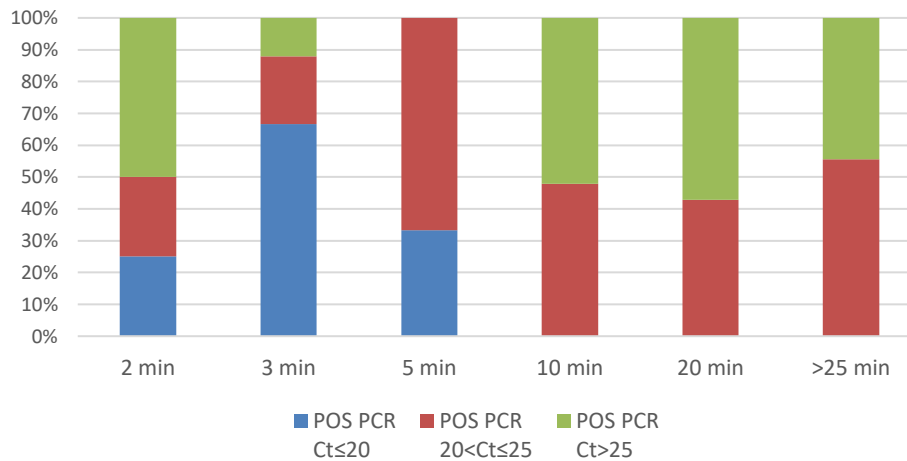


Figura 3. Distribución de muestras positivas según su Ct por PCR en función de su tiempo de positivo para el test de antígenos (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR).

Según los estadísticos recogidos en la tabla 6, el test de antígenos presentó los tiempos de positivo más bajos (96% de las muestras en 3 minutos o menos) cuando la muestra de saliva positiva presentaba una carga viral por PCR correspondiente a Ct≤20 (promedio de 3±0,2 minutos). Para muestras de menor carga viral con Ct>20 (N=64), los tiempos de positivos superaron los 15 minutos de media, detectándose el positivo en 10 minutos o menos en el 61% de los casos (N=39) y en más de 10 minutos en el 39% (N=25).

Tabla 6. Promedio y desviación estándar de tiempos de positivo para el test de antígenos obtenidos para todas las muestras analizadas, según Ct obtenido en la PCR (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR).

TIEMPO PARA POSITIVO (min)	POS PCR Ct≤20	POS PCR 20<Ct≤25	POS PCR Ct>25
PROMEDIO	3.0	16.7	23.1
SD (95% IC)	0.2039	9.9613	5.3426

Asimismo, se ha observado que un mayor grado de mucosidad de la muestra se asocia a un incremento en el tiempo de positivo (Figura 4).



Figura 4. Progresión del inmunoensayo del test de antígenos para 6 muestras positivas distintas. Las tres muestras de la derecha presentaron un mayor grado de mucosidad y, como consecuencia, un mayor tiempo de positivo.

5. VALIDACIÓN ANALÍTICA

La validación de una técnica permite valorar la capacidad de ésta para cumplir su objetivo, en este caso detectar SARS-CoV-2 en muestras de saliva.

El poder de la validación se relaciona con el tamaño muestral del estudio, de manera que el número de muestras positivas permitirá estimar la sensibilidad del ensayo, y el número de muestras negativas permitirá estimar su especificidad (Tabla 7).

Tabla 7. Verdaderos y falsos positivos y negativos obtenidos en el test de antígenos, teniendo en cuenta todas las muestras positivas por PCR (con Ct≤29) o únicamente las muestras positivas con Ct≤25 (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR; TP=verdadero positivo; TN=verdadero negativo; FP=falso positivo; FN=falso negativo).

	PCR POS Ct≤29	PCR POS Ct≤25
TP	88	77
TN	144	144
FP	1	1
FN	15	2

5.1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad de una técnica viene dada por la proporción de resultados positivos correctamente identificados por el test, calculada según la siguiente expresión:

$$\text{Sensibilidad analítica} = \frac{TP}{TP + FN}$$

Con N=252, la "regla del 3" estima una valoración de sensibilidad máxima $\geq 98,8\%$ (con un 95% CI). La sensibilidad analítica calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 8. Se observa una sensibilidad del test de antígenos del 97,5% (con respecto a la RT-PCR, tomada como técnica de referencia) incluyendo en las positivas muestras con carga viral correspondiente a un Ct≤25 por PCR. Al tener en cuenta todas las muestras positivas incluidas en el estudio (Ct≤29), la sensibilidad se ve reducida al 85,4%.

Tabla 8. Sensibilidad, especificidad y exactitud obtenidos para el test de antígenos con muestras de saliva, teniendo en cuenta todas las muestras positivas por PCR (con Ct≤29) o únicamente las muestras positivas con Ct≤25 (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR).

	PCR POS Ct≤29	PCR POS Ct≤25
Sensibilidad	0.854	0.975
Especificidad	0.993	0.993
Exactitud	0.935	0.987

5.2. Especificidad analítica

La especificidad viene determinada por la proporción de resultados negativos correctamente identificados, se calcula en base a la siguiente expresión:

$$\text{Especificidad analítica} = \frac{TN}{TN + FP}$$

La especificidad analítica calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 8. Se observa una especificidad del test de antígenos del 99,3% (con respecto a la RT-PCR, tomada como técnica de referencia).

5.3. Exactitud

Definida como la capacidad de una técnica para proporcionar resultados correctos, la exactitud se calcula según la siguiente ecuación:

$$Exactitud = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

La exactitud calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 8. Se observa una exactitud del test de antígenos del 98,7% (con respecto a la RT-PCR, tomada como técnica de referencia) incluyendo en las positivas muestras con carga viral correspondiente a un $Ct \leq 25$ por PCR. Al tener en cuenta todas las muestras positivas incluidas en el estudio ($Ct \leq 29$), la exactitud se ve reducida al 93,5%.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio de validación del test de antígenos Zhenrui para detección de SARS-CoV-2 en muestras de saliva, se presentan las siguientes conclusiones:

- Un alto grado de mucosidad en la saliva se asocia a una mayor probabilidad de obtener un resultado no concluyente. Asimismo, un mayor grado de mucosidad de la muestra se asocia a un incremento en el tiempo de positivo.
- Para muestras de saliva con carga viral por PCR correspondiente a $Ct \leq 20$ el **tiempo de positivo promedio** es de **3 minutos**.
- Para muestras de saliva con **carga viral por PCR correspondiente a $Ct \leq 25$ la sensibilidad analítica es del 97,5%, la especificidad del 99,3% y la exactitud del 98,7%**.
- Muestras con cargas virales más bajas ($Ct > 25$) son detectadas con una menor sensibilidad (85,4%), constituyendo un mayor riesgo de falsos negativos para este grupo analítico.

REFERENCIAS

1. (2020) 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV), Wuhan, China. [Online] US Centers for Disease Control and Prevention. [Accessed 28 Jan 2020].
2. (2020) CDC 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR diagnostic panel. US Centers for Disease Control and Prevention. [30/03/2020].
3. (2020) Real-time RT-PCR panel for detection 2019-novel coronavirus. US Centers for Disease Control and Prevention. [Accessed 28 Jan 2020].
4. (2020) Emergency use authorization. [Online] US Centers for Disease Control and Prevention. [Accessed 28 Jan 2020].
5. (2010) Mattocks et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 18:1276-1288.
6. (2020) Ott et al. Simply saliva: stability of SARS-CoV-2 detection negates the need for expensive collection devices. medRxiv [Preprint]. doi: 10.1101/2020.08.03.20165233. PMID: 32793924; PMCID: PMC7418742.
7. (2020) Vogels et al. SalivaDirect: Simple and sensitive molecular diagnostic test for SARS-CoV-2 surveillance. medRxiv 2020.08.03.20167791; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20167791>
8. (2013) Katsanis et al. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nature Reviews Genetics* 14 (6):415-426.

CLÁUSULA DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

Toda la información contenida en este informe es propiedad intelectual de GENYCA Grupo Vivo Diagnostico o, en su caso, está debidamente referenciada a su origen y autores. Este informe no supone recomendación alguna por parte de GENYCA Vivo Diagnostico al respecto del uso de este test con muestras distintas de para las que ha sido validado y concedido el marcado CE-IVD.