

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI
PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN
EXUDADO NASO/OROFARÍNGEO EN
MEDIO DE TRANSPORTE DE VIRUS (VTM)

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN EXUDADO NASO/OROFARÍNGEO EN VTM

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	4
2.	DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA	4
2.1.	Muestras analizadas	4
2.2.	Amplificación por RT-PCR	4
2.3.	Test rápido de antígenos Zhenrui	5
3.	ACEPTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	5
3.1.	Amplificación por RT-PCR	5
3.2.	Test rápido de antígenos Zhenrui	6
4.	RESULTADOS OBTENIDOS	6
5.	VALIDACIÓN ANALÍTICA	7
5.1.	Sensibilidad analítica	7
5.2.	Especificidad analítica	8
5.3.	Exactitud	8
6.	CONCLUSIONES	8

INFORME DE VALIDACIÓN

TEST RÁPIDO DE ANTÍGENOS ZHENRUI PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN EXUDADO NASO/OROFARÍNGEO EN VTM

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 exudado naso/orofaríngeo en VTM 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 200 muestras de VTM (exudado naso/orofaríngeo en VTM) de pacientes de población general que habían solicitado un test de PCR para la detección de SARS-CoV-2, de las cuales 100 habían resultado negativas y 100 positivas (con Ct≤25) por PCR previa. Desde su toma, tanto durante el transporte como 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 un plazo máximo de 96 horas para muestras no congeladas o en un plazo máximo de 2 horas desde el momento de su descongelación.

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 VTM. 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 de VTM, medidos con micropipeta.

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 humbral (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. Se consideró positivo el resultado cuando ambos técnicos coincidieron en la percepción visual de la banda T (Figura 1).



Figura 1. Test de antígenos para distintas muestras positivas con distintos Ct (todos Ct ≤ 25) por PCR, mostrando la distinta intensidad de banda T, indicativa del positivo en este test.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados cualitativos positivo/negativo obtenidos para las muestras analizadas se recogen en la tabla 3, 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	97	7	104
POS Ag	3	92	95
TOTAL (Sin NO CONCL)	100	99	199
NO CONCL Ag	0	1	1
TOTAL	100	100	200

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 VTM.

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 4).

Tabla 4. Verdaderos y falsos positivos y negativos obtenidos en el test de antígenos, (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR; TP=verdadero positivo; TN=verdadero negativo; FP=falso positivo; FN=falso negativo).

TP	92
TN	97
FP	3
FN	7

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=200, la "regla del 3" estima una valoración de sensibilidad máxima $\geq 98,5\%$ (con un 95% CI). La sensibilidad analítica calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 5. Se observa una sensibilidad del test de antígenos del 92,93% (con respecto a la RT-PCR, tomada como técnica de referencia) para muestras positivas con carga viral correspondiente a un Ct \leq 25 por PCR.

Tabla 5. Sensibilidad, especificidad y exactitud obtenidos para el test de antígenos con muestras de VTM (POS PCR=resultado positivo en RT-PCR).

	PCR POS Ct≤25
Sensibilidad	0.9293
Especificidad	0.97
Exactitud	0.9497

5.2. Especificidad analítica

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

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

La especificidad analítica calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la tabla 5. Se observa una especificidad del test de antígenos del 97% (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 5. Se observa una exactitud del test de antígenos del 94,97% (con respecto a la RT-PCR, tomada como técnica de referencia).

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 exudado naso/orofaríngeo en VTM, para muestras con **carga viral por PCR correspondiente a Ct≤25 la sensibilidad analítica es del 92,93%, la especificidad del 97% y la exactitud del 94,97%.**

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. (2013) Katsanis et al. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. Nature Reviews Genetics 14 (6):415-426.



Fdo: Eva Ruiz Casares, PhD
Directora Técnica GENYCA

GENYCA
VIVO diagnóstico
Calle Alegría, 18
28220 Majadahonda (Madrid)
CIF: B83751933

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.