



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE
LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE
SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL
DESARROLLO DE HERRAMIENTAS
METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE
LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE
MEDICIÓN**

Sergio Dávila González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Departamento de química
Bogotá D.C., Colombia

2022

FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Sergio Dávila González

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en ciencias Bioquímica

Director (a):

Ph.D. Químico Carlos Yesid Soto Ospina
Profesor Titular, Departamento de Química

Codirector (a):

MSc. Bioquímica John Emerson Leguizamón Guerrero

Línea de Investigación:

Metrología en bioanálisis

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Metrología Química y Bioanálisis (GIMQB)

Bioquímica y Biología Molecular de las Microbacterias (BBMM)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de química
Bogotá D.C., Colombia
2022

*Para mis Padres, mi Hermanita, a Majito 🐶 y
con mucho cariño para Pedrito.*

*El trabajo que nunca comienza es el que más
tarda en terminarse.
J.R.R Tolkien*

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

A handwritten signature in black ink, reading "Sergio Dávila". The signature is written in a cursive, flowing style.

Sergio Luis Dávila González

Fecha 30/01/2022

Agradecimientos

Este documento lleva el amor que siento por la ciencia, el valor de la investigación y la importancia del trabajo en equipo. Aunque nada de esto sería posible sin el apoyo de incondicional de mi familia por ser una guía y una fuente de amor, mi pareja Majito por ser incondicional, una enorme fuente de motivación e inspiración y sobre todo amor. Mis amigos de infancia por darme confianza en este proceso y hacer todo mas fácil y Jhon E. por la enorme confianza que ha tenido en mi.

Este documento va dedicado a ustedes.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores: Carlos Yesid Soto por abrirme las puertas a la investigación, confiar en mi y apoyarme en este camino. A John Emerson Leguizamon por ser mi mentor, una fuente de admiración, por su paciencia y por su amistad.

Un especial agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia por ser mi hogar por tantos años, brindarme la oportunidad de comenzar este proceso y las herramientas para finalizar esta etapa.

Infinitas gracias al Instituto Nacional de Metrología por el gran apoyo para el desarrollo de este proyecto, a Diego Ahumada por abrirme las puertas al INM y darme la oportunidad de construir país desde la ciencia.

Gracias al Grupo de Metrología en Bioanálisis, por todas la enseñanzas y apoyo en todo este proceso, especialmente a Maria Mercedes Arias, Andres Felipe Leon y Claudia Tere. Por sus consejos y la ayuda que me brindaron en cada momento.

Gracias al Instituto Nacional de Salud por ser parte de este proyecto, brindar insumos y apoyo en todo el proceso de la actividad, a la organización de Naciones Unidas para el desarrollo industrial ONUDI a través del programa global de calidad y normas (GQSP) por toda su colaboración para llevar a cabo las actividad del Ensayo de Aptitud de SARS CoV-2y al Grupo Técnico Temático de Bioanálisis de la Red Colombiana de Metrología, por todo el apoyo para la gestión del taller de transferencia.

A los Institutos de Metrología: National Institute of Standards and Technology y al Joint Research Center por donar los Materiales de Referencia empleados en este trabajo.

Finalmente, a todos los que participaron de cualquier forma en este trabajo.

Sergio

2023-01-24

Resumen

El virus SARS CoV-2 es el agente etiológico patógeno causante de la enfermedad COVID-19, la que tuvo un rápido surgimiento de nuevos casos alrededor del mundo ocasionando la declaración de pandemia por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Hasta la fecha, se han reportado alrededor de 664.9 millones de casos de COVID-19 alrededor del mundo y 6.7 millones de muertes por esta enfermedad; En este sentido, la detección de nuevos casos es una de las herramientas más utilizadas para hacer seguimiento al avance de la pandemia. A pesar de la existencia de varias estrategias para la detección del virus causante de la enfermedad, en la actualidad por su alta sensibilidad y fácil implementación, el método de referencia es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En Colombia se conformó la red nacional de laboratorios para la detección del virus SARS-CoV-2, coordinada por el Instituto Nacional de Salud (INS), como un mecanismo para ampliar la capacidad de detección de casos positivos a nivel nacional.

Con el objetivo de fortalecer ésta red nacional de laboratorios, el INS, en convenio con el Instituto Nacional de Metrología (INM), y con el apoyo de la cooperación internacional, desarrollaron un conjunto de herramientas para apoyar las actividades de aseguramiento de la calidad de los resultados de medición que llevan a cabo cada uno de los laboratorios de esta red; en particular se desarrollaron dos materiales de referencia (MR) a nivel de ARN en solución. Estos fueron caracterizados por PCR en tiempo real y PCR digital, ambas con retrotranscripción (RT), los cuales demostraron ser lo suficientemente homogéneos y estables para ser empleados como Item de Ensayo de Aptitud (IEA), así como Control Positivo en un Ensayo de Aptitud (EA) para la detección de SARS CoV-2 por técnicas basadas en PCR, y un taller de transferencia técnica, respectivamente.

El desarrollo y ejecución de estas actividades permitió identificar posibles debilidades metrológicas de los laboratorios en la detección de secuencias de SARS-CoV-2 por RT-PCR y mejorará la calidad de las mediciones desde la perspectiva de la vigilancia de salud pública.

Palabras clave: Virus SARS CoV-2, Ensayo de Aptitud, Material de Referencia, Validación de métodos, RT-ddPCR

Abstract

STRENGTHENING OF THE NATIONAL NETWORK OF LABORATORIES THAT PERFORM SARS-COV-2 DETECTION BY PCR THROUGH THE DEVELOPMENT OF METROLOGICAL TOOLS TO ENSURE THE QUALITY OF MEASUREMENT RESULTS

The SARS CoV-2 virus is the pathogen that causes the disease COVID-19, the rapid emergence of new cases around the world led to the declaration of a pandemic by the WHO. Around 664.9 million cases have been reported around the world and 6.7 million deaths, so the detection of new cases is one of the most used tools to monitor the progress of the pandemic. Despite the existence of several strategies for the detection of the virus that causes the disease, currently the reference method is the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique due to its high sensitivity and easy implementation. In Colombia, the national network of laboratories for the detection of the SARS-CoV-2 virus was formed, coordinated by the National Institute of Health, as a mechanism to expand the detection of positive cases nationwide.

With the objective of strengthening this national network of laboratories, the INS, in agreement with the National Institute of Metrology INM, as well as with the support of international cooperation, developed a set of tools to support the quality assurance activities of the measurement results carried out by each of the laboratories of this network; in particular, two reference materials (RM) were developed at the level of RNA in solution. These were characterized by real-time PCR and digital PCR, both with reverse transcription (RT), which proved to be sufficiently homogeneous and stable to be used as a Proficiency Test Item (IEA), as well as a Positive Control in a Proficiency Assay. (EA) for virus detection by PCR-based techniques, and a technical transfer workshop, respectively.

The development and execution of these activities made it possible to identify possible metrological weaknesses of the laboratories in the detection of SARS-CoV-2 sequences by RT-

PCR and will improve the quality of the measurements from the perspective of public health surveillance.

Keywords: SARS-CoV-2 virus, Proficiency test, Reference material, Method Validation, RT-ddPCR

Contenido

	Pág.
Lista de Figuras	XVIII
Lista de tablas.....	XXIII
Lista de abreviaturas.....	XXV
Introducción	27
Justificación	30
1. Marco Teórico y estado del arte.....	33
1.1 Coronavirus.....	33
1.1.1 <i>Coronavirus</i> de importancia reciente: SARS y MERS	34
1.2 SARS CoV-2.....	35
1.2.1 Estructura del SARS CoV-2.....	37
1.2.2 Variantes del SARS CoV-2	39
1.3 Métodos de alineamiento múltiple.....	41
1.4 Métodos de análisis	42
1.4.1 Métodos basados en proteínas	42
1.4.2 Métodos basados en ácidos nucleicos.....	43
1.5 Aseguramiento de la calidad.....	51
1.5.1 Materiales de Referencia	51
1.5.1.1 Homogeneidad.....	53
1.5.1.2 Estabilidad.....	54
1.5.1.3 Caracterización y Asignación de valor	55
1.5.2 Validación de Métodos	56
1.5.3 Ensayos de Aptitud	57
1.5.4 Trazabilidad Metrológica.....	58
1.6 Estado del arte.....	61
1.6.1 Detección de SARS CoV-2	61
1.6.2 RT-PCR.....	62
1.6.3 Métodos de detección comerciales.....	64

1.6.4	Variabilidad genética y su relación con la detección	65
1.6.5	Ensayos de Aptitud de SARS CoV-2.....	67
1.6.6	Materiales de Referencia de SARS CoV-2.....	68
1.6.7	Red de Laboratorios para la detección de SARS CoV-2 en Colombia	70
2.	Objetivos.....	72
2.1	Objetivo General	72
2.2	Objetivos específicos	72
3.	Materiales y métodos	73
3.1	Desarrollo de Métodos por PCR.....	74
3.1.1	Materiales e instrumentos	74
3.1.2	Verificación de métodos de detección de SARS CoV-2 por PCR	80
3.1.2.1	Verificación de métodos por qPCR.....	81
3.1.2.2	Verificación de métodos por ddPCR	82
3.1.3	Optimización de métodos por PCR digital	84
3.1.4	Validación de métodos por PCR	85
3.2	Producción de pilotos y Materiales de Referencia de SARS-CoV-2.....	87
3.2.1	Producción piloto Ítem Ensayo MR SARS-CoV-2.....	87
3.2.1.1	Preparación gravimétrica de los niveles seleccionados	88
3.2.1.2	Envasado y etiquetado	88
3.2.1.3	Almacenamiento.....	88
3.2.1.4	Homogeneidad	89
3.2.1.5	Estabilidad a corto plazo	89
3.2.1.6	Caracterización.....	90
3.2.1.7	Asignación de valor.....	90
3.2.2	Producción normalizada del Ítem de ensayo de Aptitud: Material de Referencia deSARS CoV-2	90
3.2.3	Producción piloto del Control Positivo de SARS CoV-2.....	93
3.2.4	Producción normalizada del Material de Referencia: Control Positivo SARS-CoV-2	95
3.2.3.1	Dilución gravimétrica de niveles Control Positivo	95
3.3	Actividades de transferencia técnica	98
3.3.1	Ensayo de Aptitud	98
3.3.2	Taller de Transferencia técnica.....	99
4.	Resultados y discusión.....	102
4.1	Verificación de métodos.....	102
4.1.1	Verificación in silico de oligonucleótidos	102
4.1.2	Verificación de métodos por PCR	107
4.1.3	Optimización de métodos por ddPCR	114
4.2	Validación de métodos por PCR.....	118
4.2.1	Validación de métodos por RT-qPCR.....	119

4.2.2 Validación de métodos mediante RT-ddPCR	127
4.3 Producción de Materiales de Referencia.....	134
4.4 Actividades de Transferencia.....	155
5. Conclusiones y recomendaciones	179
5.1 Conclusiones.....	179
5.2 Perspectivas	181
5.3 Recomendaciones.....	182
5.4 Agradecimientos finales	182

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Clasificación taxonómica de SARS CoV-2	36
Figura 2: Representación esquemática de la organización del genoma de SARS CoV-2.	38
Figura 3: Representación de la estructura de SARS CoV-2, con las principales proteínas estructurales	39
Figura 4: Dendograma evolutivo de SARS CoV-2. Se muestran en color las variantes de interés a través del tiempo, las grises tienen una baja distribución o se encuentran extintas.	40
Figura 5: Esquema del funcionamiento de un alineamiento tipo Clustal. [63].....	42
Figura 6. Programa de amplificación de PCR, se muestran las principales etapas que ocurren durante la reacción, cambios en la temperatura permiten la desnaturalización del ADN y la generación de nuevas copias del molde base de ADN.	44
Figura 7. Curva de Amplificación para un ensayo de PCR en tiempo real, se muestran las principales regiones que componen la curva.	46
Figura 8. Esquema metodológico de una preparación de un ensayo por ddPCR, se divide en las principales etapas del procedimiento.....	47
Figura 9. Diagrama de un cartucho de generación de gotas para la técnica ddPCR, el cartucho cuenta con 8 canales para cada tipo de reactivo, Aceite, Muestra y donde se genera la emulsión resultante. En cada Cartucho pueden ser preparadas 8 muestras simultáneamente.	48
Figura 10. Esquema gráfico de la preparación habitual de un ensayo por dPCR,	50
Figura 11. Representación gráfica la cadena de trazabilidad metrológica.	59
Figura 12. Variación estimada en función del tiempo en la detección de pruebas de SARS CoV-2.....	62
Figura 13. Distribución de los ensayos comerciales según su país de fabricación.	65
Figura 14. Esquema general ejecución de actividades del proyecto.	74
Figura 15: Distribución de fragmentos 1-2 de RNA que constituyen en material RGTM-10169, cobertura de dianas de amplificación para la detección de SARS CoV-2.....	75
Figura 16: Distribución de dianas de amplificación del material EURM-019 de SARS CoV-2.....	76
Figura 17. Esquema para la verificación de variación de regiones de las dianas de amplificación seleccionadas.....	80

Figura 18. Diseño experimental tipo isócrono del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos del piloto de IEA SARS CoV-2.....	89
Figura 19. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos MR-IEA SARS CoV-2.	92
Figura 20. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos del piloto MR Control Positivo SARS CoV-2.....	94
Figura 21. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos Control Positivo MR-SARS CoV-2. El esquema aplica para los materiales NIPC y JIPC.	96
Figura 22. Esquema de cobertura del Ensayo de Aptitud para la detección de SARS CoV-2 mediante RT-qPCR, los recuadros Rosa indican las etapas contempladas para esta actividad. <i>*Las Plataformas cerradas de PCR son aquellas que realizan el proceso de extracción de RNA, Retro-transcripción y amplificación en un único instrumento sin intervención del experimentador.</i>	99
Figura 23. Panel de la actividad de Transferencia, el panel cuenta con 5 materiales de SARS CoV-2 de distinta concentración para la evaluación de parámetros de medición por qPCR.	100
Figura 24. Curva de Calibración ilustrativa a partir del material NIPC.....	100
Figura 25. Formato de Captura de Datos compartido a los laboratorios para el reporte de los resultados obtenidos en los procesos de medición del taller de transferencia.	101
Figura 26. Árbol filogenético generado mediante ClustalO para las secuencias del gel S en	102
Figura 27. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo E Charite.	104
Figura 28. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo N1 (China).	104
Figura 29. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primers y sondas del protocolo N2-(CDC-USA).....	105
Figura 30. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo RdRp (Francia).....	106
Figura 31. Curvas de Amplificación de ensayos por qPCR empleado una metodología de retrotranscripción en dos datos, para la detección de SARS CoV-2, Se emplea RNA de SARS CoV-2	107
Figura 32. Gel de agarosa con productos de amplificación de SARS CoV-2 por PCR.....	108
Figura 33. Gel de agarosa con productos de amplificación de SARS CoV-2 por PCR.....	109
Figura 34. Curvas de Amplificación de ensayos por qPCR, para la detección de SARS CoV-2, Se emplea RNA de SARS CoV-2.....	110
Figura 35. Curva de amplificación para la evaluación preliminar del intervalo lineal y la eficiencia de la reacción.....	111

Figura 36. Gráficos de amplitud (A) y frecuencia (B) para los ensayos preliminar de amplificación por ddPCR para los genes E, N y RdRp.	113
Figura 37. Parámetros de resolución y lluvia en el estudio de temperatura de anillamiento del gen RdRp	116
Figura 38. Parámetros de resolución y lluvia en el estudio de temperatura de anillamiento del ensayo E Charite	117
Figura 39. Gráficos de amplitud para los ensayos E Charite y RdRp empleando una metodología de Retrotranscripción y amplificar por ddPCR en un único paso.	118
Figura 40. Intervalo lineal cuantificación de ARN de SARS CoV-2 por RT-qPCR	120
Figura 41. Evaluación de precisión de métodos por RTqPCR, A: Precisión relativa Intermedia y como Repetibilidad. B: Niveles de concentración analizados con su incertidumbre por precisión.....	123
Figura 42. Evaluación del Límite de Detección para los ensayos de detección de SARS CoV-2 por qPCR. Valores en copias/ μ L (A), Valores en Copias/reacción (B).....	125
Figura 43. Evaluación del Límite de Detección para los ensayos de detección de SARS CoV-2 por qPCR.	127
Figura 44. Intervalo lineal para la cuantificación de ARN de SARS CoV-2 por RT-ddPCR	129
Figura 45. Valores de precisión como repetibilidad e Inter-días asociada a los métodos de medición por RT-ddPCR para SARS CoV-2.....	131
Figura 46. Límites de Detección (LOD) por RT-ddPCR	133
Figura 47. Límites de Detección (LOD) por RT-ddPCR representados en copias/ μ L.....	134
Figura 48. Diseño etiquetas empleadas en la preparación del material.....	135
Figura 49. Regresión lineal del estudio de estabilidad del Piloto IEA de SARS CoV-2, los puntos morados corresponden a la temperatura de estudio -20°C, los verdes a 4°C y los puntos amarillos corresponden a la temperatura de Referencia -70°C.....	138
Figura 50. Diseño y presentación final del IEA SARS CoV-2	140
Figura 51. Presentación final de Panel de IEA SARS CoV-2.....	140
Figura 52. Evaluación de estabilidad del IEA SARS CoV-2 mediante Regresión Lineal	143
Figura 53. Presentación final materiales preparados.....	146
Figura 54. Estabilidad Control Positivo empleando buffer citrato in-house	147
Figura 55. Estudio de estabilidad – Piloto Control Positivo SARS CoV-2.....	149
Figura 56. Presentación final materiales preparados.....	150
Figura 57. Estudio de Estabilidad -Control Positivo SARS CoV-2	153
Figura 58. Distribución de la plataforma de medición utilizada por los laboratorios, para plataformas abiertas (A) y cerradas (B)	157

Figura 59. Distribución de los principales fabricantes de plataformas cerradas utilizadas por los laboratorios, A. Protocolos Internos, B. Kits comerciales para la detección de SARS CoV-2 en plataformas abiertas de PCR, C. Kits Comerciales para plataformas de PCR cerradas.....	159
Figura 60. Distribución de genes reportados por los laboratorios participantes del EA SARS CoV-2	160
Figura 61. Controles Reportados por los participantes del EA SARS CoV-2.....	161
Figura 62. Desempeño de los laboratorios participantes de EA SARS CoV-2 según el gen empleado.....	162
Figura 63. Principales fuentes de error de los laboratorios participantes de EA SARS CoV-2 según el gen empleado	163
Figura 64. Diagrama de cajas y bigotes de valores de Ct obtenidos por los laboratorios para el IEA con los genes E, N y RdRp.....	165
Figura 65. Volumen de RNA y volumen total de reacción de PCR empleada.	168
Figura 66. Plataformas de PCR empleadas por los laboratorios en la ejecución del taller de transferencia.	169
Figura 67. Distribución de protocolos para la detección de SARS CoV-2 (A), Mezclas de reacción por RT-PCR (B) Kit's comerciales para la detección de SARS CoV-2 (C).....	170
Figura 68. Límites de Detección reportados por laboratorios participantes de taller de transferencia en Copias/reacción (A), Copias/ μ L(B).....	171
Figura 69. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración para cada una de las dianas evaluadas por los laboratorios para el material NIPC.	172
Figura 70. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración para cada una de las dianas evaluadas por los laboratorios para el material JIPC.	173
Figura 71. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración por gen y laboratorio para el material NIPC	174
Figura 72. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración por gen y laboratorio para el material JIPC	175
Figura 73. Límite de detección reportado por los laboratorios (Copias/Reacción).....	176

XXII FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN
DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS
PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Propiedades del MERS CoV, SARS CoV-1 [34]–[36]	35
Tabla 2: Comparación de similitud genómica de algunos CoV's	36
Tabla 3. Protocolos iniciales emitidos por la OMS al inicio de la pandemia de COVID-19, Cada uno de estos está asociado a una entidad nacional de investigación.	63
Tabla 4. Ensayos de Aptitud que se han desarrollado para la evaluación de la detección de SARS CoV-2 por RT-PCR.....	68
Tabla 5. Materiales de Referencia de SARS CoV-2 nivel de RNA	69
Tabla 6. Descripción fragmentos material RGTM10169	75
Tabla 7. Protocolos de amplificación aplicables a los MR de SARS CoV-2.....	76
Tabla 8. Mezclas de reacción empleadas para el desarrollo de actividades experimentales.	77
Tabla 9. Dianas de amplificación seleccionados para la validación y caracterización de MR.	79
Tabla 10. Variantes de interés actual seleccionadas para la verificación in-silico de protocolos por PCR mediante alineamiento múltiple.....	81
Tabla 11. Parámetros evaluados en la optimización de métodos por RT-ddPCR	85
Tabla 12: Parámetros evaluados en la Validación de métodos por RT-ddPCR.....	86
Tabla 13. Resumen producción piloto Ítem Ensayo MR SARS-CoV-2	88
Tabla 14. Resumen producción MR-IEA SARS-CoV-2	91
Tabla 15. Resumen producción Control Positivo MR SARS-CoV-2.....	95
Tabla 16. Resumen producción de Pilotos y MR Control Positivo SARS-CoV-2	97
Tabla 17. Parámetros de la evaluación de la linealidad del método por RT-qPCR	119
Tabla 18. Resumen de los intervalos lineales validados por RT-qPCR	121
Tabla 19. Incertidumbres relativas por precisión por RTqPCR	124
Tabla 20. Parámetros de la evaluación de la linealidad del método por RT-ddPCR	128
Tabla 21. Estimación del LOQ del método por RT-ddPCR.....	133
Tabla 22. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-ddPCR.....	136

XXI) FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Tabla 23. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-qPCR.....	136
Tabla 24. Resultados del estudio del comportamiento del Piloto IEA de SARS-Co-V en plataformas cerradas de PCR	139
Tabla 25. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-ddPCR.....	141
Tabla 26. Valor de Referencia e incertidumbres relativas del MR- Ítem Ensayo de Aptitud SARS CoV-2.	145
Tabla 27. Valores de Ct para diferentes niveles producidos para los ensayos N1-china, N2-CDC y RdRp	146
Tabla 28. Evaluación de homogeneidad del Piloto Control Positivo SARS CoV-2 por RT-qPCR	148
Tabla 29. Evaluación de homogeneidad - Control Positivo SARS CoV-2 por RT-qPCR.....	152
Tabla 30. Caracterización MR Control Positivo SARS CoV-2	154
Tabla 31. Valores informáticos de Ct para MR Control Positivo SARS CoV-2	155
Tabla 32. Límites de Detección reportado por los laboratorios participantes del EA SARS CoV-2.....	164
Tabla 33. Genes reportado por los laboratorios en a ejecución del taller de SARS CoV-2	167

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxiribunocleico

ANOVA: Análisis de Varianza

CDC: Centro de Control de Enfermedades

cDNA: ADN complementario

COVID-19: Enfermedad por CoronaVirus (Por sus isglas en inglés)

Cq: Ciclo de Cuantificación/Umbral

ddPCR: PCR digital formato gotas

DiV: Dispositivos de Diagnóstico In Vitro

EA: Ensayo de Aptitud,

IEA: Ítem de Ensayo de Aptitud,

INM: Instituto Nacional de Metrología

INS: Instituto Nacional de Salud

ISO: Organización Internacional de Estandarización, siglas en inglés

JRC-IRMM: Laboratorio Adjunto – Instituto de Métodos y Materiales de Referencia (por sus siglas en inglés)

LoD: Limite de DetecciónPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

MR: Material de Referencia

MRC: Material de Referencia Certificado

NIST: Instituto de Estandares y Tecnología de Estados Unidos (Por sus isglas en Inglésinglés)

NTC: Control Sin Templado

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONAC: Organismo Nacional de Acreditación

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PN: Producción Normalizada,

qPCR: Reacción en Cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real

RNA: Ácido Ribunocleico

RT-ddPCR: ddPCR con Transcripción inversa

RT-PCR: PCR con Transcripción inversa RetroTranscripción

μL: Volumen en microlitros

λ: Lambda

XXV FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN
DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS
PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Introducción

El virus SARS-CoV-2, es el coronavirus descubierto más recientemente con gran impacto, es el causante de la enfermedad COVID-19, cuya presencia generó la declaración de pandemia, el 11 de marzo de 2020, por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[1]. El brote de la enfermedad comenzó en China a fines de diciembre de 2019, y su origen todavía no es completamente claro, aunque una transmisión del tipo zoonótico es la teoría con mayor apoyo científico[2].

A la fecha se han dado 241.411.380 casos y 4.912.112 muertes confirmadas en todo el mundo. En Colombia se han presentado 6,307,372 casos confirmados y 141,794 muertes asociadas a la enfermedad[3], lo que corresponde a la posición número 21 dentro de los países mayormente afectados por la pandemia. Debido a esto es considerada una de las enfermedades de mayor escala e impacto a nivel global de los últimos 50 años.

Debido a las características del SARS CoV-2 el cual resulto ser altamente transmisible por su forma de propagación aérea, la alta variabilidad genética de su proteína espiga (que juega un papel clave en el reconocimiento del receptor de huésped) y el proceso de fusión de su membrana celular, han producido a la identificación de un número considerable de variantes asociadas a linajes conocidos del virus, las que evolucionan continuamente a medida que se producen cambios en el código genético causados por mutaciones genéticas o recombinación viral durante la replicación del genoma [4]. Cuando se presentan una o mas mutaciones en el genoma del virus y estas ocasionan una diferenciación con otros virus de SARS-CoV-2 se generan las denominadas variantes. A diferencia de los linajes que son un grupo genéticamente relacionado de variantes del virus derivadas de un ancestro común. Un recombinante es una variante creada por la combinación de material genético de dos variantes diferentes [5].

El rápido aumento de casos de infección por SARS CoV-2 durante el brote de virus, indujo al desarrollo de estrategias rápidas para su detección. Parte de esto se logró con base en la secuencia de ARN genómico del SARS-CoV-2, que permitió el desarrollo de varios protocolos de detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con transcripción inversa [6]–[10]. Debido a la sensibilidad, rapidez y especificidad, esta técnica se ha considerado el método de referencia o Gold estándar para la detección del virus.

Inicialmente diferentes entidades a nivel mundial desarrollaron métodos de detección del virus por RT-PCR, los que fueron publicados y emitidos en distintos portales web y artículos científicos, siendo la mayoría de estas entidades asociadas a Centros de Control de Enfermedades (CDC). Eventualmente con la divulgación de dichos protocolos se llegó a la emisión de documentos por parte de la OMS recopilando algunos de estos protocolos para ser empleados como Uso de Emergencia [11]. Es importante mencionar que cada uno de estos protocolos cuenta con sus propias dianas de amplificación y condiciones específicas para su utilización.

Con base en estos protocolos y con la Autorización de Uso de Emergencia por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) [12] y el Listado de Uso de Emergencia de la OMS, entre otros, se desarrollaron y aprobaron varias pruebas en forma de Kit para el Diagnóstico *in vitro* (DiV) comercializadas para la detección de SARS-CoV-2, como un intento de poder detectar e identificar casos positivos y negativos de COVID-19 de forma rápida. La detección del virus SARS-CoV-2 se utilizó como respuesta primaria para el manejo y control de la enfermedad.

En función del avance de la pandemia en cada país se establecieron sus medidas de contingencia para controlar el brote de COVID-19, una de las más importantes fue el establecimiento de redes nacionales de laboratorios para la detección del virus en la población. Después de la aprobación de la organización sanitaria nacional, los laboratorios comenzaron a utilizar los protocolos

emitidos desde el comienzo de la pandemia y el uso de kit's de DiV disponibles. Aunque cada kit tiene sus propios controles positivos y negativos, no todos los protocolos tienen las mismas características de rendimiento. En este sentido, el uso de Materiales de Referencia (MR) como controles de calidad para la verificación y validación de métodos y la participación en Ensayos de Aptitud (EA) que evalúan el rendimiento de métodos de detección utilizados por los laboratorios donde se ejecutan ensayos diagnósticos, juegan un papel clave para brindar resultados confiables [13], [14] .

En el marco de la evolución de la pandemia y como respuesta a las necesidades del país, se planteó como principal objetivo de la presente Tesis de Maestría, fortalecer la red nacional de laboratorios de salud pública encargados de la detección del SARS-CoV-2 en Colombia mediante la producción de Materiales de Referencia a nivel de RNA que permitan desarrollar actividades de fortalecimiento mediante un Ensayo de Aptitud cualitativa (EA) para evaluar el desempeño de los laboratorios autorizados en la detección del virus mediante RT-qPCR. Actividad acompañada de un taller de transferencia que permita reforzar y evaluar distintos parámetros de medición en los métodos de detección empleados por los laboratorios de ensayo.

Este documento está organizado de tal manera que permita establecer la ruta de ejecución para las actividades planteadas, desde la validación de métodos analíticos para la cuantificación de SARS CoV-2, a la producción de pilotos, Materiales de referencia y el uso de estos en las actividades de evaluación y transferencia; finalmente el análisis de resultados experimentales obtenidos para estas actividades.

Justificación

A causa del brote y la rápida expansión del virus SARS CoV-2 a finales del 2019, se generó la necesidad de desarrollar herramientas que permitieran hacer un seguimiento a los casos de contagios por COVID-19. Esto fue posible mediante la rápida obtención de la secuencia del genoma del virus [15], así como su disponibilidad y facilidad de acceso lo cual permitió el desarrollo de métodos de detección del virus basados en técnicas de ácidos nucleicos ampliamente conocidas, como la PCR, la cual facilitó la implementación de los métodos desarrollados.

Inicialmente diferentes entidades a nivel mundial desarrollaron métodos de detección del virus por RT-PCR los cuales fueron publicados y emitidos en distintos portales web y artículos científicos, siendo la mayoría de estas entidades asociadas a Centros de Control de Enfermedades (CDC) dentro de los cuales destacan los métodos desarrollados por Charite en Alemania, CDC-China, CDC-EE. UU., Centro de control de Enfermedades Infecciosas de Japón y el INS de Tailandia. Eventualmente con la divulgación de dichos protocolos se llegó a la emisión de documentos por parte de la OMS donde se sugería el uso de dichos protocolos [11].

Con base en estos protocolos se emitió la autorización de uso de emergencia por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU.[12] , así como la emisión Listado de Uso de Emergencia de la OMS de los métodos por PCR Desarrollados. Esto derivó entre otros, en el desarrollo y aprobación de varias pruebas en forma de Kit para el Diagnóstico in Vitro (DiV) en forma comercial para la detección de SARS-CoV-2, como un intento de poder detectar e identificar casos positivos y negativos de COVID-19 de forma rápida. Inicialmente estos ensayos comerciales estaban dirigidos a la detección mediante PCR, aunque con el tiempo se comercializaron ensayos enfocados al uso de anticuerpos y antígenos.

A la fecha existen más de 470 ensayos comerciales DiV's a nivel de antígenos y más de 600 por PCR para la detección del virus SARS CoV-2 [16]. Frente a cada uno de estos Kit's comerciales existe una variedad de plataformas de PCR que permiten trabajar con uno o varios de los Kit

comerciales disponibles, en particular, plataformas de PCR abiertas y cerradas en el caso de ácidos nucleicos. Una característica importante en el caso de estos ensayos comerciales es que cada uno proporciona sus propios controles positivos y negativos como herramienta de control de calidad; sin embargo, los controles de un Kit comercial en particular no cuentan con una trazabilidad metrológica determinada lo cual dificulta que sea extrapolables a otros ensayos comerciales en la mayoría de los casos [17]. Por otro lado, la información disponible de estos controles se limita a especificar la secuencia de nucleótidos de los primer suministrados y en el caso del control positivo una respuesta instrumental para equipos de PCR en tiempo real lo que difícilmente tiene una equivalencia con otros ensayos comerciales.

Un factor adicional a tener en cuenta es la sensibilidad que puede tener la técnica de PCR para la detección de SARS CoV-2, la cual juega un factor determinante en el diagnóstico de la enfermedad; En efecto para pruebas de rutina de SARS CoV-2, se han reportado tasas de falsos negativos en pruebas RT-PCR del 27% en muestras nasales y 40% en muestras de faringe [18]. Además, diferentes estudios antes de la aparición de los síntomas dan estimaciones de falsos negativos entre el 20% y 38%, dependiendo el día del procesamiento de la muestra y del avance particular de la enfermedad [19]. Estos errores, a veces son más difíciles de detectar en el laboratorio, por lo que es muy importante disponer de un Sistema de Calidad que permita realizar seguimiento a la calidad de los resultados que reportan los laboratorios.

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) coordina la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, encargada de la detección del virus SARS-CoV-2. Ante el aumento en el número de casos del virus lo que genera urgencia en la detección del virus se crea una Red Ampliada de Laboratorios para su detección, compuesta por entidades de distinta naturaleza. En la actualidad esta red cuenta con más de 200 laboratorios a nivel nacional para el procesamiento de muestras sospechosas de SARS CoV-2 [20].

Ante la criticidad de la medición y detección del virus, en el presente trabajo se pretende desarrollar herramientas para el aseguramiento de la calidad en los resultados de medición por PCR, como lo son el desarrollo de métodos de medición, la generación de Materiales de Referencia a nivel de RNA y el uso de estos para ser empleados en actividades de transferencia como Ensayos de Aptitud y ejercicios interlaboratorio, con el objetivo del fortalecimiento de la

32 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Red Nacional de Laboratorios que realizan actividades de detección de SARS CoV-2, y así garantizar la confianza en los resultados de medición emitidos.

1. Marco Teórico y estado del arte

1.1 Coronavirus

Los coronavirus (CoV), fueron estudiados inicialmente por Tyrell y Bynoe en 1966 dándoles su nombre debido a sus viriones esféricos (125 nm de diámetro), que tiene una estructura exterior con proyecciones superficiales similares a una corona solar. Una característica principal de los coronavirus es su gran variedad, siendo el orden *Nidovirales* el grupo de virus más grande, el cual que incluye las familias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* y *Roniviridae* [21], [22]. La familia *Coronavirinae* se subdivide en cuatro géneros: *alfa*, *beta*, *gamma*, y *delta* coronavirus, clasificados inicialmente basado en la serología, sin embargo, en la actualidad el criterio dado es los agrupamientos filogenéticos[21].

Los miembros de la familia de *Nidovirus* se diferencian entre sí por el número de proteínas estructurales, así como su tipo y tamaño. Estas diferencias alteran la estructura de las nucleocápsides y los viriones, aunque no de manera significativa [23].

Respecto al genoma, los coronavirus son virus basados en ARN, que poseen un genoma no segmentado de ~30 kb. Su genoma contiene una estructura de Poli(A) en el extremo 3', lo que les permite actuar como un ARNm para la traducción de las poliproteínas tipo replicasa [24]. El gen de la replicasa que codifica las proteínas no estructurales (nsps), con alrededor de 20 kb, a diferencia de las proteínas estructurales y accesorias que componen sólo cerca de 10 kb del genoma viral [25], El extremo 5' del genoma contiene una secuencia líder y una región no traducida (UTR) que contiene múltiples estructuras de bucle de tallo requeridas para replicación y transcripción del ARN. Además, al principio de cada gen estructural o accesorio hay presencia de Secuencias de Regulación Transcripcionales (TRS) que se requieren para la expresión de cada uno de estos. El 3' UTR también contiene estructuras de ARN necesarias para la replicación y síntesis de ARN viral [26].

Los virus pertenecientes al orden *Nidovirales* son de ARN de cadena sencilla con sentido positivo (+ssRNA) no segmentados y envueltos generalmente por una proteína Nucleocapside. Algunos de estos presentan los genomas de ARN de mayor tamaño identificados, de hasta 33,5 kilobases

(kb). Otras características comunes del orden *Nidovirales* incluye: (1) la presencia de un complejo de genes replicasa seguidos de genes estructurales y accesorios, altamente conservado; (2) expresión de muchos genes no estructurales; (3) actividades enzimáticas únicas o inusuales codificadas dentro de la poliproteína replicasa-transcriptasa; y (4) expresión de genes corriente abajo mediante la síntesis de mRNA subgenómicos anidados en 3' [21], de ahí en nombre del orden *Nidovirales* asociado a los ARNm anidados en 3'.

1.1.1 *Coronavirus* de importancia reciente: SARS y MERS

En los últimos 20 años se ha observado la propagación de tres coronavirus con implicaciones severas en la salud humana. El primero fue reportado en noviembre de 2002, es conocido como el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), cuyo origen se dio en Foshan, China [27]. Para febrero de 2003 se conocían alrededor de 300 casos confirmados de SARS, principalmente asociados a personal médico y hospitalario [28]. Los viajes realizados desde Hong Kong a distintas partes del mundo originaron una propagación de bajo impacto de este virus [29].

En marzo de 2003, la OMS estableció una red de laboratorios para determinar el agente causal del SARS. La identificación del coronavirus con nombre (SARS-CoV) fue realizada en abril de ese mismo año [30]. Para julio de 2003 se habían confirmado 8.096 casos, con un total de 774 muertes en 27 países [31]. Sin embargo; luego del control, los contagios disminuyeron a cero, lo que, asociado a correctas medidas de control de infecciones, en lugar de las intervenciones médicas, produjeron la terminación de esa pandemia por SARS CoV,[31].

Alrededor de 10 años después, en junio de 2012, se presentó el primer caso de un nuevo coronavirus con afectaciones a la salud aún más severas que las causadas por el SARS CoV. Este nuevo coronavirus asociado a neumonía aguda e insuficiencia renal [32]recibió el nombre de Síndrome Respiratorio del Medio Oriente, mejor conocido por sus siglas en inglés (MERS-CoV).

Al igual que lo ocurrido con SARS CoV, los viajes internacionales de personas infectadas ocasionaron la propagación del MERS-CoV; sin embargo, la expansión, así como el número de

casos presentados fue menor en comparación con el primer brote de SARS. Los síntomas del MERS son más severos, dando como resultado un mayor número de fallecidos por el total de infectados. Los cambios asociados a la transmisibilidad o sintomatología de la enfermedad están asociados a pequeños cambios en la estructura de virus [32], [33]. La Tabla 1 se resume la información clave relacionada con los brotes de SARS y MERS.

	MERS CoV	SARS CoV
Fecha del Brote	Abril 2012	Noviembre 2002
Epícentro del Brote	Jiddah, Arabia Saudita	Guangdong, China
Animal de origen/intermediario	Murciélagos/Camello	Murciélago/ Paguma larvata
Número de casos	2494	8096
Número de fallecidos	858	744
Tasa de Transmisión	<1	3
Tasa de Mortalidad	37%	10%
Países afectados	27	26

Tabla 1: Propiedades del MERS CoV, SARS CoV-1 [34]–[36]

1.2 SARS CoV-2

El último coronavirus descubierto recibió el nombre de Síndrome Respiratorio Agudo Grave, mejor conocido por sus siglas en inglés (SARS CoV-2) pertenece al linaje B. este coronavirus es causante del brote en 2019 y de la enfermedad COVID-19 cuya alta patogenicidad e infección ha causado su dispersión alrededor del mundo [37]. La OMS declaró el estado de pandemia en marzo del 2020 luego de que la cifra de contagios por Covid-19 ascendiera a cerca de 370 millones casos [38]. El SARS CoV-2 ha mostrado ser el más virulento de la familia *Coronaviridae*, asociado a comorbilidades con enfermedades preexistentes y en adultos mayores, produciendo alta tasa de mortalidad [39].

SARS-CoV-2 y SARS-CoV tienen una similitud del 79.5%, y del (96%) con genomas de coronavirus encontrados en murciélagos, respectivamente, lo que sugiere basado en análisis filogenéticos una posible transferencia zoonótica entre especies y la presencia de un tercer huésped asociado[39]. La Tabla 2 muestra la similitud que tiene la secuencia de SARS CoV-2 con otros β -coronavirus.

Coronavirus Cepa	Similitud en secuencia Genómica	Referencia
Coronavirus Bat-RaTG13	96.2%	[40]
Coronavirus Bat-SL-CoVZC45	88%	[40]
Coronavirus Bat-SL-CoVZXC21	88%	[40]
SARS CoV-1 (2002)	79%	[41]
MERS CoV (2012)	51.8%	[42]

Tabla 2: Comparación de similitud genómica de algunos CoV's

Cabe mencionar que la subfamilia *Orthocoronavirinae* se clasifica en cuatro principales géneros según las diferencias en la estructura genómica y las relaciones filogenéticas: α -coronavirus, β -coronavirus, γ -coronavirus y δ -coronavirus. En La Figura 1 se muestra un esquema de la clasificación taxonómica del SARS CoV-2. Los mamíferos están infectados exclusivamente con α -coronavirus y β -coronavirus [24], los primeros siendo causantes de enfermedades respiratorias leves principalmente y los β -coronavirus asociadas a enfermedades respiratorias e intestinales graves. Por otro lado, los γ y δ coronavirus son conocidos por infectar exclusivamente a las aves.

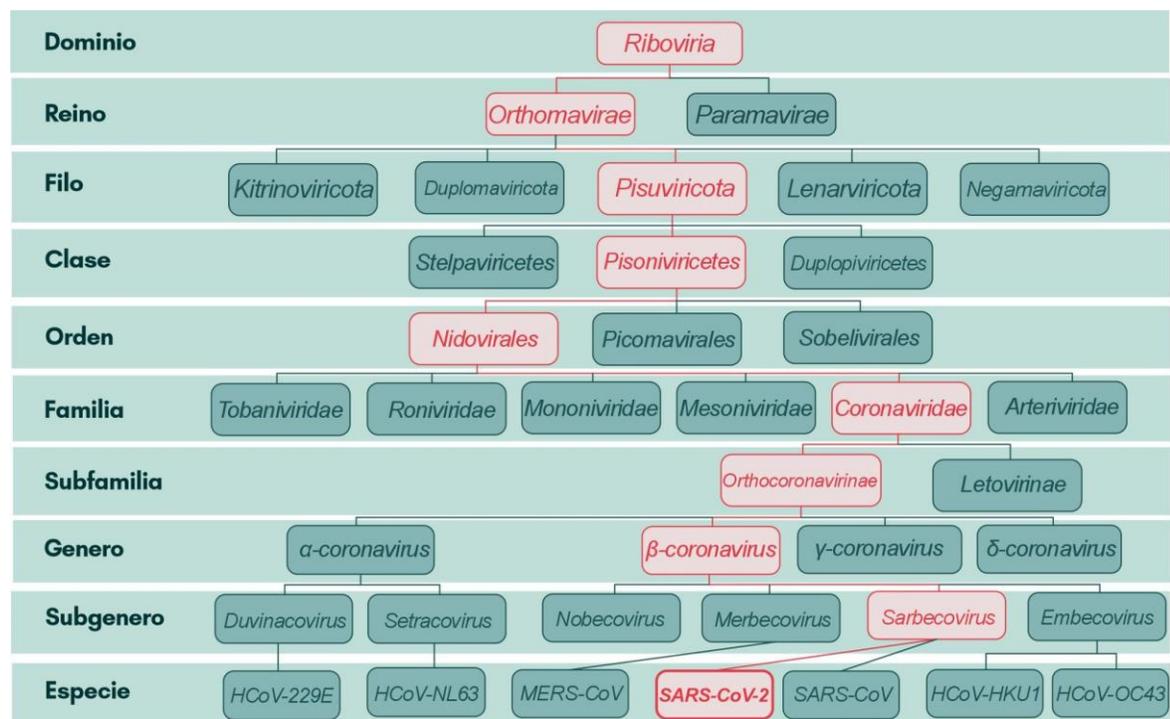


Figura 1: Clasificación taxonómica de SARS CoV-2

La infección por SARS-CoV-2 induce una respuesta inmunitaria extrema lo cual aumenta el nivel de citocinas y quimiocinas en los bronquios, lo que conduce a la acumulación de monocitos, leucocitos e interleucinas. Una elevada expresión de estos mediadores induce reacciones inflamatorias masivas que disminuyen la eficacia de los pulmones lo cual causa tos, fiebre y síntomas similares a los de la neumonía [43]. Los síntomas gastrointestinales, así como las infecciones silenciosas conocidas como asintomáticas, son particularmente comunes entre niños pequeños y adultos jóvenes [44] .

Entre lo que se conoce del mecanismo de infección del SARS-COV 2, la proteína S (Spike) del virus puede unirse a los receptores ACE2 expresados a nivel del epitelio del sistema respiratorio (células epiteliales traqueales y bronquiales, células epiteliales alveolares, neumocitos tipo 2), sistema cardiovascular (endotelio de las arterias coronarias, miocitos, adipocitos epicárdicos, endoteliales vasculares, y células lisas), tracto gastrointestinal (queratinocitos de esófago, células epiteliales gastrointestinales, células epiteliales intestinales, duodeno, intestino delgado, recto), sistema urogenital (túbulos proximales de riñón, células uroteliales de vejiga, superficie luminal de células epiteliales tubulares, testículos, vesícula seminal) , así como en el hígado y la vesícula biliar y en el sistema nervioso, principalmente en el tejido neuronal y el capilar cerebral del endotelio lo que conduce al daño de los nervios y al deterioro de los capilares cerebrales en Pacientes infectados con COVID-19 [44].

La información estructural del virus y la sintomatología, incluyendo su estructura molecular, ciclo de vida y sus interacciones con la célula huésped del SARS CoV-2 ha llevado al desarrollo de varias vacunas, junto con potenciales drogas antivirales.

1.2.1 Estructura del SARS CoV-2

El genoma del SARS-CoV-2 se secuenció y cargó a la base de datos del NCBI con el número de acceso (NC045512.2) [45], a partir de lo que se predijo la composición estructural del SARS CoV-2. La Figura 2, muestra la distribución general de los elementos génicos que componen el virus, este está compuesto por una proteína nucleocápside (N) que es un complejo helicoidal con la hemaglutinin-estearasa que envuelve el genoma, este está compuesto por una hebra +ssRNA de 29.9 kb [46], [47]

Por otra parte, 28 ORF's están relacionados con la codificación de funciones relacionadas con la replicación, formación del virión, y evasión de sistema inmune del huésped

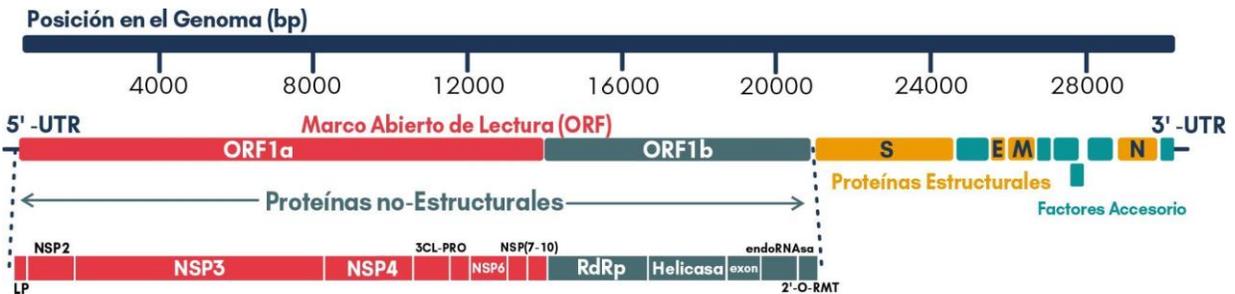


Figura 2: Representación esquemática de la organización del genoma de SARS CoV-2.

El genoma codifica en sentido 5'-3' proteínas estructurales conocidas como E, M, N y S (Figura 3). La proteína M, la que está incrustada en la membrana del virus cumple la función de impulsar el ensamblaje de nuevos viriones dentro de las células huésped [47]. También se la estudiado su efecto sobre la inducción a la apoptosis debido a mecanismos de oligomerización en el compartimiento intermedio del retículo endoplasmático de Golgi [48]. Actualmente se creó que la proteína M tiene un papel fundamental de andamiaje para las otras proteínas estructurales y promueve la formación de virión [49].

La proteína de Envoltura E muestra propiedades de oligomerización y puede interactuar consigo misma, a través de su dominio transmembrana con el fin de formar una especie de canal iónico [50]. La proteína E también puede establecer interacciones con la nucleocápside proteína N, relacionado con la liberación de este o la señalización de la célula huésped [49].

La proteína N está relacionada con el complejo replicasa-transcriptasa por sus siglas en inglés "RTC", la cual tiene un rol crucial en la integración del material genético del virus a las partículas esféricas del coronavirus luego de la infección del huésped.

La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), también conocida como ARN replicasa, es una enzima que está codificada en el genoma de la mayoría de los virus que contienen ARN y tiene un papel importante en catalizar el proceso de replicación del ARN a partir de la plantilla de ARN [51].

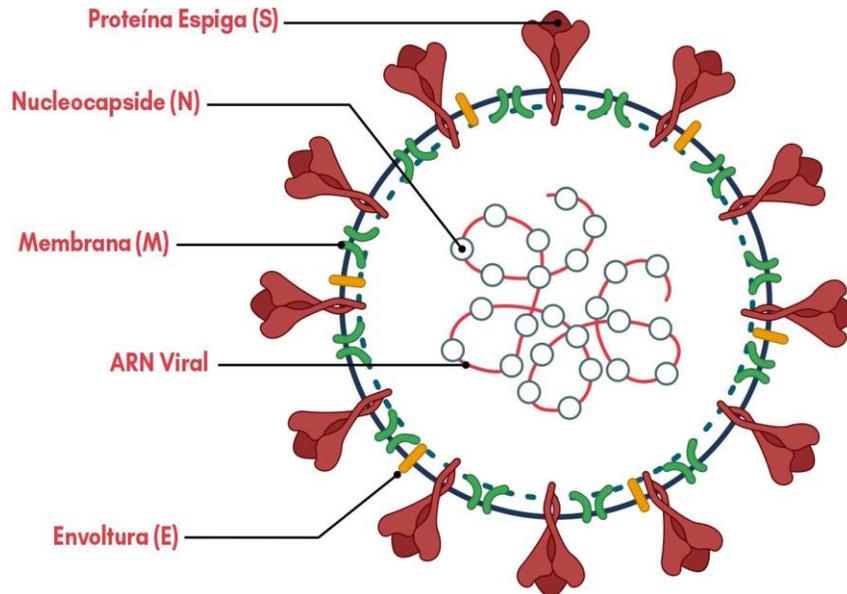


Figura 3: Representación de la estructura de SARS CoV-2, con las principales proteínas estructurales

La glicoproteína espiga o “Spike” como es conocida más ampliamente, es el principal antígeno existente en la superficie del virus. La proteína S es el objetivo del mecanismo de neutralización de anticuerpos durante infección haciéndolo determinante en el proceso de infección del huésped. Así mismo presenta la mayor tasa de mutación en el genoma del virus, principal responsable de la generación de nuevas variantes de interés, por lo que se considera un objetivo fundamental para el diseño de fármacos y métodos de diagnóstico contra SARS-CoV-2 Finalmente, el genoma también codifica dieciséis (16) proteínas no relacionadas con la estructura con funciones de replicación y modulación en la señalización en la célula hospedera [52]–[54].

1.2.2 Variantes del SARS CoV-2

Una Variante es considerada de interés cuando el SARS CoV-2 tiene o se sospecha en cierta manera de tener mutaciones que causan cambios significativos en la transmisibilidad, velocidad de replicación o aumentos severos en la sintomatología, evasión de la respuesta inmune, así

como una distribución en varios países . Con el fin de facilitar la interpretación y permitir facilitar el seguimiento de las variantes a la población en general la OMS [55]. A partir de mayo del 2021 sugirió utilizar el alfabeto griego para denominar estas variantes de interés, estas denominaciones por letras no cambian la notación científica de las variantes. Las variantes del SARS-CoV-2 en notación científica se clasifican según sus mutaciones de linaje y componentes. Como resultado, los virus pertenecientes al mismo linaje pero que contienen diferentes subconjuntos de mutaciones pueden clasificarse como diferentes variantes[5]. Las principales variantes de conocimiento actual en el desarrollo de la pandemia son la variante *Alfa* (α), *Beta* (β), *Gamma* (γ), *Delta* (δ) y *Ómicron*(\omicron) [45]. En la Figura 4 se observa un dendograma donde se ilustra las variantes principales de interés, en este se observa la dominancia de la variante Delta y Ómicron, desplazando en su mayoría a las demás variantes.

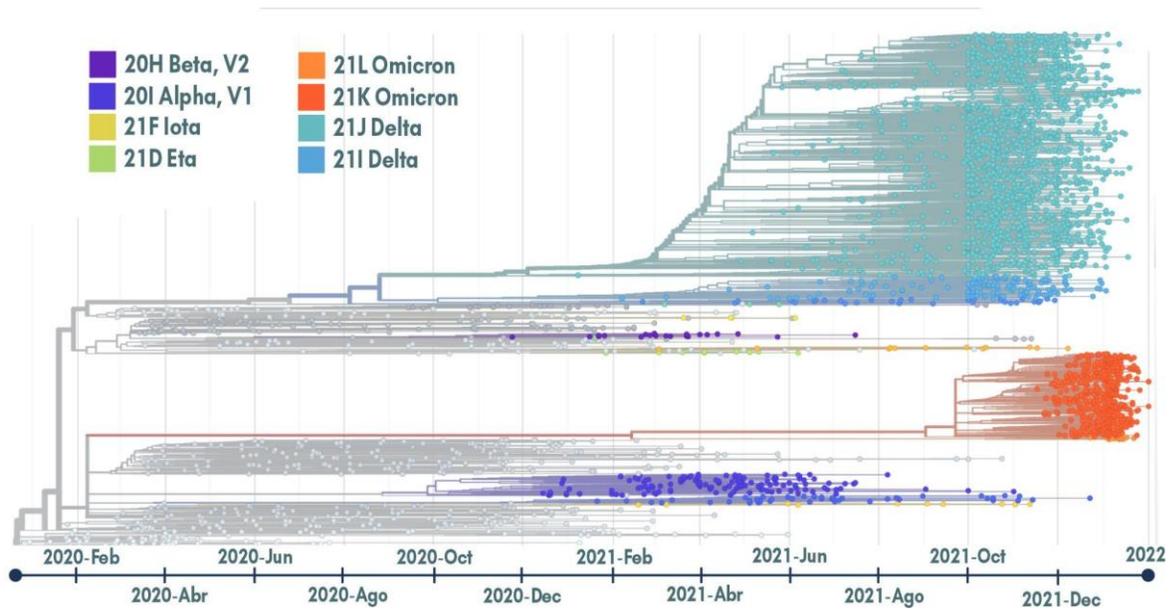


Figura 4: Dendograma evolutivo de SARS CoV-2. Se muestran en color las variantes de interés a través del tiempo, las grises tienen una baja distribución o se encuentran extintas.

El seguimiento dado al surgimiento de estas variantes ha sido posible debido a las técnicas de secuenciación masiva y ensamblaje, que han permitido obtener más de 14 millones de secuencias de genoma parcial o total de SARS-CoV-2, la mayoría de libre acceso en el portal GISAID [56].

A partir de estas se ha logrado obtener información relevante acerca de la evolución y su excepcional adaptación para infectar humanos, propagándose rápidamente con poca evidencia de selección natural entre los virus circulantes. En los últimos meses de 2020 se conocieron los primeros reportes de variantes emergentes de SARS-CoV-2 asociadas con mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad y escape de la inmunidad humoral [57].

La aparición de nuevas variantes puede estar relacionada con la capacidad que presentan los CoV's de acumular mutaciones las cuales general mayor diversidad génica mediante procesos de recombinación al momento de darse la infección de un huésped con distintas variantes [58]. Esto a pesar de contener una enzima con capacidad exonucleasa que reduce su tasa de error de replicación *in vivo* a índices menores que la Influenza [59]. Incluso es probable que este mecanismo de recombinación entre diferentes variantes del virus sean los causantes del brote de SARS-CoV-2 [60].

Las variantes de SARS-CoV-2 que circulan actualmente comparten varias mutaciones entre ellas, la mayoría presentes en el gen (S), que le permiten al virus propagarse con facilidad entre la población e incurrir en procesos de reinfección, manifestando su amplia capacidad de replicación [52].

1.3 Métodos de alineamiento múltiple

Los métodos de alineamiento múltiple MSA por sus siglas en inglés, son esenciales y ampliamente utilizados para análisis en biología molecular, biología computacional y bioinformática. Los MSA desarrollados por Feng y Doolittle, permiten analizar homologías y líneas filogenéticas [61], se basan en la heurística, que permite generar la mayoría de las alineaciones de secuencia múltiple [62], este método fue definido como alineación progresiva y funciona realizando alineamiento mediante algoritmos de programación dinámica como Needleman-Wunsch, o Smith-Waterman. Luego las secuencias son agrupadas para evaluar la relación que se vincula con un puntaje, que a su vez es convertido en una distancia mediante métodos como Neighbor-Joining (NJ), y finalmente usada para construir árboles guía donde se agregan secuencias según la similitud, donde las distancias cortas significan similitud y las largas divergencia. El alineamiento progresivo es el fundamento de estrategias que has surgido con el tiempo como ClustalW, Clustal Omega,

MAFFT, Kalign, MUSCLE, DIALIGN y T-Coffee, entre otros. Actualmente se cuenta con métodos que utilizan una metodología iterativa para mejorar la precisión del resultado, realizado mediante el cálculo constante del primer alineamiento de forma iterativa [63].

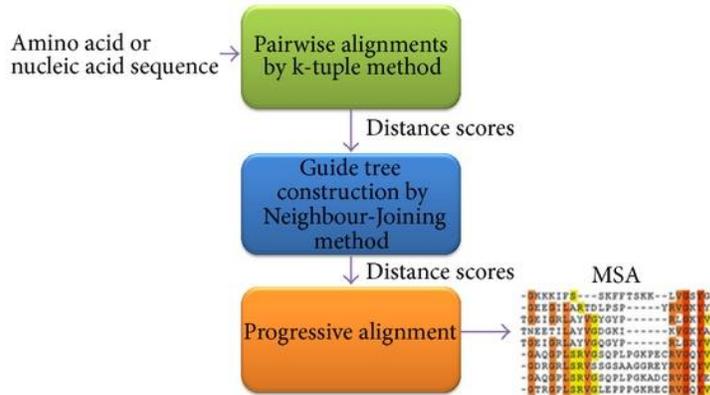


Figura 5: Esquema del funcionamiento de un alineamiento tipo Clustal. [63]

1.4 Métodos de análisis

Actualmente se dispone de un conjunto de métodos para el análisis del virus, basados, en distintos fundamentos técnicos, así como en el tipo de macromolécula de interés: proteínas, ácidos nucleicos, con fluorescencia o biosensores, cada uno con sus respectivas ventajas asociadas, siendo los dos primeros los principales métodos asociados a la detección de SARS CoV-2 debido a su confiabilidad, rapidez y economía de los procesos experimentales.

1.4.1 Métodos basados en proteínas

Entre los métodos basados en proteínas se incluyen los de detección inmunológica, y los recientemente desarrollados basados en proteómica. Los primeros se fundamentan en la interacción antígeno/anticuerpo; usualmente el anticuerpo es marcado con un compuesto fluorescente o con una enzima, de modo que cuando se presenta la interacción, puede ser fácilmente identificada y medida. Entre los sistemas desarrollados, destacan:

a) **Tiras de flujo lateral (LFD)**

Basadas en el uso de membranas que contienen esferas recubiertas con anticuerpos dirigidas a determinados objetivos, la técnica es fácil de utilizar y de interpretar, no requiere lavados o manipulación y puede completarse en menos de una hora después del proceso de enriquecimiento [64].

b) **Pruebas ELISA**

Comprende el uso de un método inmunoenzimático, donde usualmente un anticuerpo unido a un soporte sólido se emplea para capturar. Posteriormente un segundo anticuerpo conjugado con una enzima se usa para la detección, usualmente por espectrofotometría. El éxito del ensayo depende de la especificidad del anticuerpo. En la actualidad se cuentan con Kits ELISA de detección de anticuerpos basados en suero contra el SARS-CoV-2, disponibles comercialmente, los que detectan la nucleocápside (N) y la espiga (S) como proteínas estructurales del SARS-CoV-2 respectivamente [65], [66], [67].

c) **Inmunoensayos Quimioluminiscencia (CLIA)**

Los *Chemiluminescent Immunoassays* (CLIA) se basan en la producción de una señal de luz mediante reacciones químicas. específicamente un sustrato reacciona con la peroxidasa Avidin-Horseradish resultando en la generación de una señal lumínica, lo cual permite estimar la cantidad de IgG e IgM por la cantidad de luz emitida. Esta técnica es atractiva debido a su potencial optimización del flujo de trabajo, ofrece una alta especificidad, bajo nivel de interferencias, alta estabilidad de conjugados y reactivos, tiempo de incubación reducido. Sin embargo, la aplicación de CLIA se ve obstaculizada debido a paneles de prueba limitados, altos costos y respuesta no lineal a la concentración de analito debido a reacciones químicas complejas [68].

1.4.2 Métodos basados en ácidos nucleicos

Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos detectan secuencias específicas de ADN o ARN celular. Las metodologías que amplifican ácidos nucleicos son rápidas, y presentan

ventajas en la cuantificación frente a los métodos basados en proteínas, así como una especificidad mayor debido al uso de primer y sondas específicas, lo que aumenta la sensibilidad del proceso de detección [69], [70].

a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final y tiempo real

La PCR se basa en la amplificación específica del fragmento o secuencia de interés, en condiciones *in vitro*, a través de una reacción de polimerización por parte de una ADN polimerasa, la cual utiliza primers o cebadores que se anillan a una secuencia molde y sirven de cebadores para iniciar la polimerización mediante incorporación de nucleótidos complementarios, y de esta manera extender la secuencia.

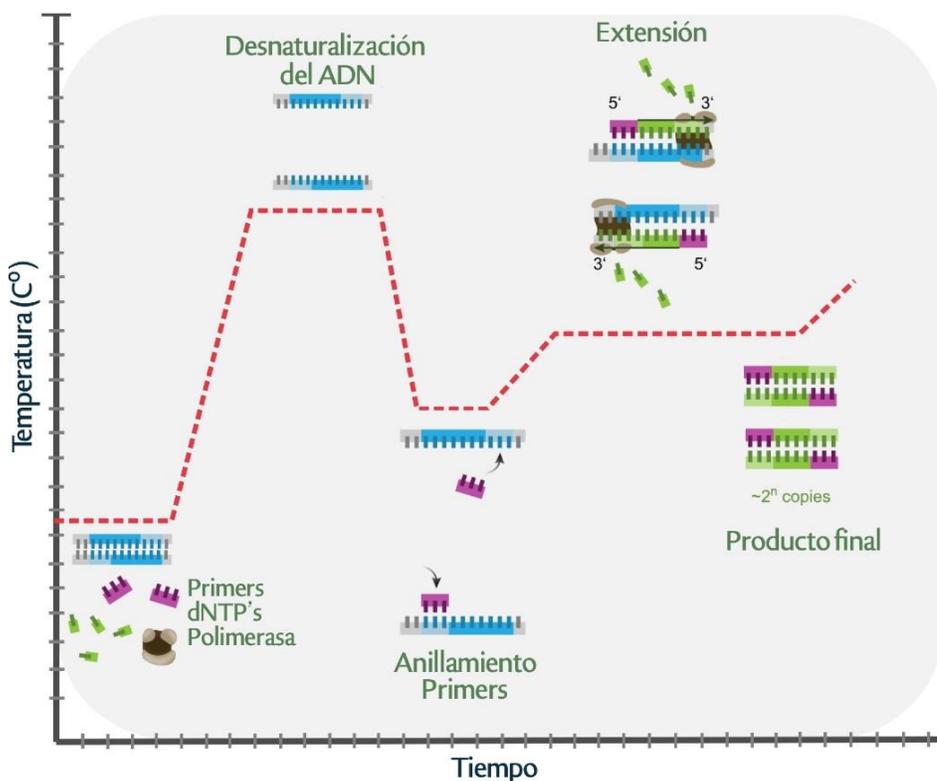


Figura 6. Programa de amplificación de PCR, se muestran las principales etapas que ocurren durante la reacción, cambios en la temperatura permiten la desnaturalización del ADN y la generación de nuevas copias del molde base de ADN.

Para esta técnica es fundamental el uso de un equipo (termociclador) que permite realizar varios ciclos de denaturación, anillamiento y extensión para la amplificación exponencial de la secuencia de interés, la Figura 6, muestra un programa de amplificación típico para una reacción de PCR.

La primera plataforma se denomina de punto final, donde la detección se determina una vez la reacción de amplificación ha concluido, empleando agentes intercalantes quienes presentan fluorescencia al intercalarse entre los puentes de hidrógeno de la doble hebra de ADN. Bromuro de Etidio es uno de estos agentes intercalantes, aunque su uso se ha disminuido considerablemente por su capacidad de realizar alteraciones en el ADN [71]. Como alternativa al uso de Bromuro de Etidio se utilizan moléculas de la familia de las cianinas conocidas comercialmente como SYBR, las que no son propiamente sustancias intercalantes. Su interacción se da en el surco menor de la doble cadena del DNA generando la desventaja de inespecificidad al no discriminar entre las secuencias de interés y cualquier otra secuencia amplificada durante el desarrollo de la PCR[72], como por ejemplo la formación de dímeros de primer, artefactos, contaminantes u otras secuencias amplificadas por uniones inespecíficas. Seguido de estos debe realizarse un análisis mediante un migración por electroforesis de agarosa, donde es posible evidenciar el tamaño de los fragmentos amplificados. La prueba proporciona resultados cualitativos referentes a presencia/ausencia de secuencias amplificadas [69].

La segunda plataforma, denominada PCR en tiempo real (qPCR), se basa en el uso de agentes fluoróforos basados en cianinas (SYBR) o sondas fluorescentes que interactúan de forma específica con la secuencia de ADN mediante complementariedad entre la sonda y la secuencia de interés. Estos agentes producen un aumento en la fluorescencia a medida que aumenta la concentración de amplimero ciclo a ciclo; En la Figura 7. se observa un diagrama que muestra un gráfico de amplificación típico de una PCR en tiempo real, se muestran los principales parámetros a tener en cuenta en un ensayo por qPCR, dentro de estos el valor de Ct, el cual es el número de ciclo donde la señal de fluorescencia es diferenciable de la señal base del instrumento, este punto de corte es conocido como umbral [69]. El uso de diferentes sondas fluorescentes permite detectar más de una secuencia de amplificación en una reacción de amplificación denominada PCR multiplex [70].

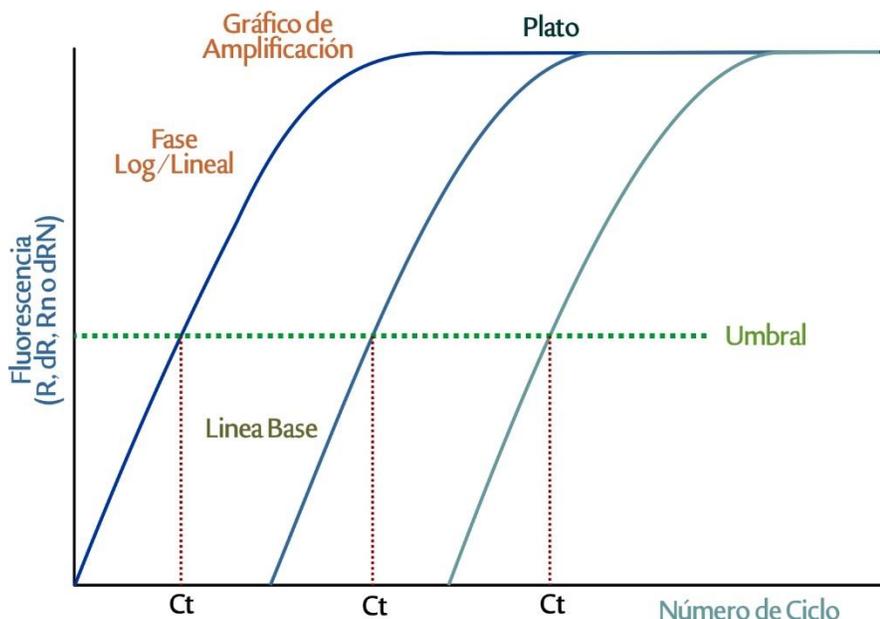


Figura 7. Curva de Amplificación para un ensayo de PCR en tiempo real, se muestran las principales regiones que componen la curva.

Una de las mayores desventajas de la PCR en tiempo real, especialmente en detección de patógenos, consiste en que para obtener una cuantificación absoluta, se requiere de una curva de calibración preparada con un estándar de concentración definida para la cuantificación de la muestra. Esta curva es construida mediante el uso de distintos niveles de concentración del estándar en función del ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés) obtenido para dicho nivel de concentración. Muchos de estos patrones son elaborados por los propios laboratorios como patrones de trabajo, por lo cual no se pueden considerar como materiales de referencia certificados [73].

b) PCR Digital

Es una de las variaciones más recientes de la técnica de PCR, se denomina PCR digital (dPCR), cuyo fundamento se basa en dividir la muestra en múltiples particiones (del orden de 1000 – 10 millones) según la plataforma utilizada, existen principalmente dos acercamiento a la técnica, el primero llamado ddPCR por sus siglas Droplet Digital PCR llamado así por la metodología

empleada de generación de gotas mediante una emulsión la cual ocasiona una compartimentalización donde ocurre la reacción de amplificación, y la segunda con nombre ddPCR por sus siglas Chip Digital PCR donde la muestra es particionada en una superficie sólida con múltiples cavidades donde ocurre la reacción.

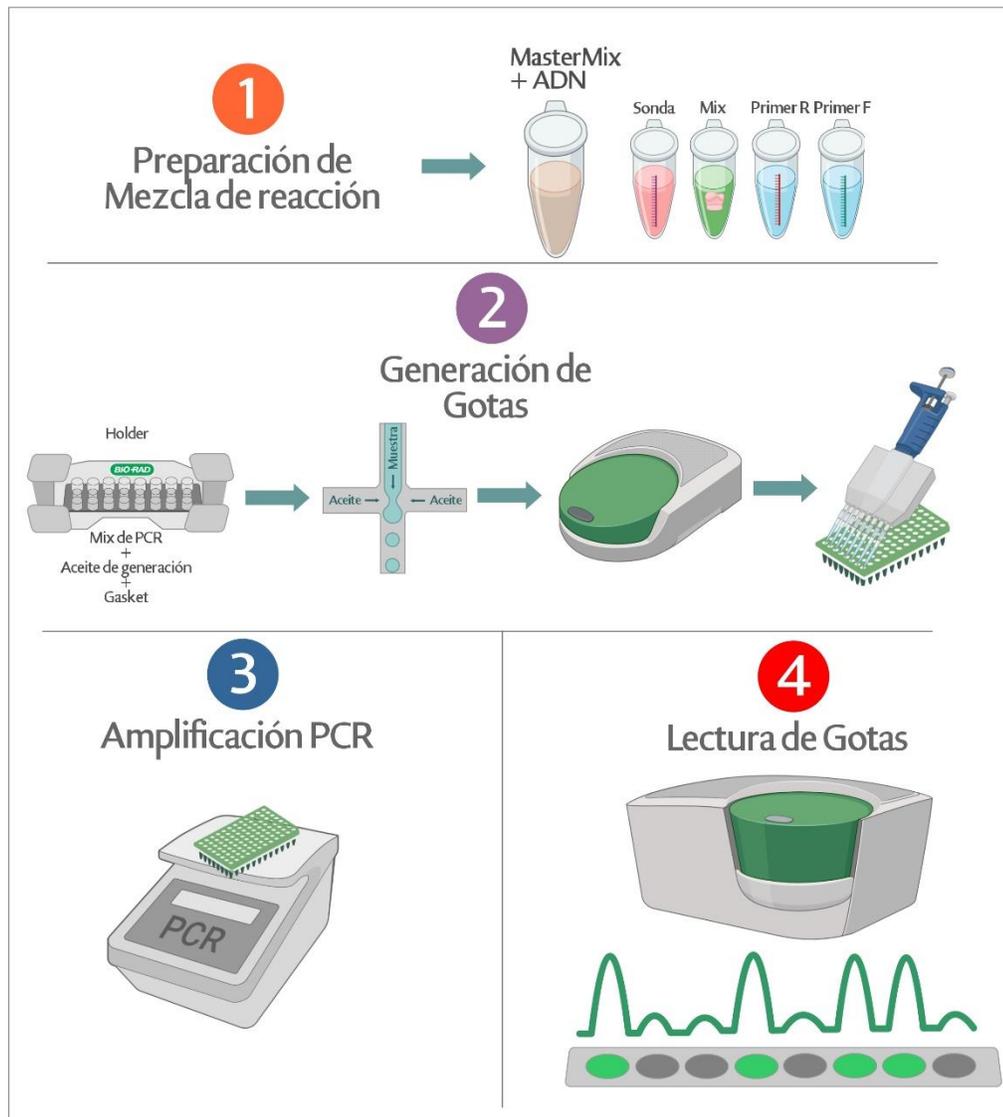


Figura 8. Esquema metodológico de una preparación de un ensayo por ddPCR, se divide en las principales etapas del procedimiento.

El proceso hace que en cada una de las particiones generadas se encuentre al menos una o ninguna molécula de ADN o ARN. La mezcla de PCR generada es sometida al proceso convencional de amplificación, empleando el mismo tipo de fluoróforos usados en la qPCR; al

final es posible contar el número de particiones positivas (particiones donde hay presencia de ADN y que por tanto generaron amplificación, y negativas, donde no hay material genético amplificado [74].

De manera general flujo de trabajo para un montaje de PCR digital en modo gotas se basa en cuatro etapas como se muestra en la Figura 8, la **primera etapa** consta de la Preparación de la mezcla de reacción, esta etapa consiste en generar una mezcla de los reactivos necesarios para que ocurra la reacción de amplificación en esta etapa no existe una variación significativa con la preparación de otra mezcla de reacción de PCR convencional. La **segunda etapa** es el núcleo del funcionamiento de la técnica, se denomina la Generación de gotas, en este proceso se generan las particiones mediante una emulsión de la mezcla de reacción con un *aceite* especial para la generación de las gotas. La emulsión es generada mediante un *cartucho* y un *Holder*; La Figura 9. esquematiza un cartucho de generación de gotas, en este se adiciona la mezcla y el aceite en pozos designados para este fin, dichos pozos están conectados por micro canales los cuales mediante un equipo denominado generador de gotas el cual aplica unas diferencias de presión y vacío permite la generación de la emulsión en un tercer pozo, el cartucho es sellado por una lámina de goma denominada *Gasket* la cual beneficia la generación de vacío y evita la salida de la muestra.

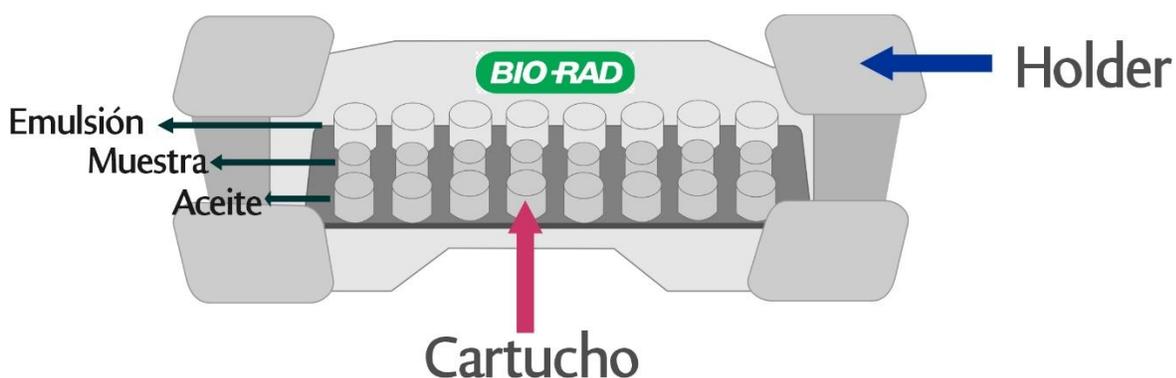


Figura 9. Diagrama de un cartucho de generación de gotas para la técnica ddPCR, el cartucho cuenta con 8 canales para cada tipo de reactivo, Aceite, Muestra y donde se genera la emulsión resultante. En cada Cartucho pueden ser preparadas 8 muestras simultáneamente.

Una vez finalizada la preparación de las muestras, estas son transferidas a una placa de PCR y es sellada a calor con una lámina de aluminio (Foil). La **Tercera etapa** consiste en la amplificación de las muestras mediante un termociclador y la **Cuarta etapa** consiste en la transferencia de la placa a un equipo denominado lector de gotas, este instrumento perfora cada pozo de la placa donde se transfirió la emulsión, mediante un capilar y un aceite de lectura que transporta la muestra hasta un canal de detección donde únicamente pasa una gota a la vez, cada gota generada es sometida a una determinada longitud de onda emitida por un sistema óptico dentro del lector. Si dentro de esta gota ocurrió una reacción de PCR esta tendrá una fluorescencia determinada, contrario a las gotas donde no ocurrió reacción, donde la fluorescencia basal es mucho menor. Así es posible diferenciar en cuales ocurrió una amplificación positiva y en cuáles no.

Esta naturaleza binaria es la que le confiere en nombre a la técnica y permite establecer una población de gotas donde ocurrió reacción denominada población positiva, y una población de gotas donde no ocurrió reacción, llamada población negativa.

Al aplicar la distribución de Poisson al conjunto de ambas poblaciones, es posible determinar la concentración inicial de la muestra en términos de copias de la secuencia de interés por unidad de volumen. En La Ecuación 1. Se muestra el procedimiento matemático para la obtención del valor de concentración.

$$\text{Ecuación 1. } [M] = \frac{\lambda}{V*d} \quad \lambda = -\ln \left(1 - \frac{P}{R}\right) [75]$$

Donde M es la concentración de la muestra analizada mediante PCR usualmente dada en número de copias/ μL , P el número de particiones positivas es decir donde ocurrió reacción de PCR y se obtuvo una señal de fluorescencia superior a la basal, R el número total de particiones analizadas, V el volumen de partición, cuyo valor es determinado por el fabricante aunque es común la medición experimental del volumen, d corresponde a la dilución del ADN en la mezcla de reacción de PCR, y lambda (λ) corresponde al número de copias por partición. [75]

A diferencia de la PCR en tiempo real, no requiere de un estándar para establecer el valor de concentración de la muestra de interés. Además, debido al mismo proceso de dilución y partición de la muestra, la técnica es menos sensible a la presencia de inhibidores, y la cuantificación no depende de la eficiencia de la reacción ofreciendo así, una plataforma para la medición de ácidos nucleicos con una precisión, sensibilidad y reproducibilidad superior a qPCR [76], [77]. En la Figura 10. Se presenta un esquema del flujo de trabajo en una amplificación mediante dPCR.

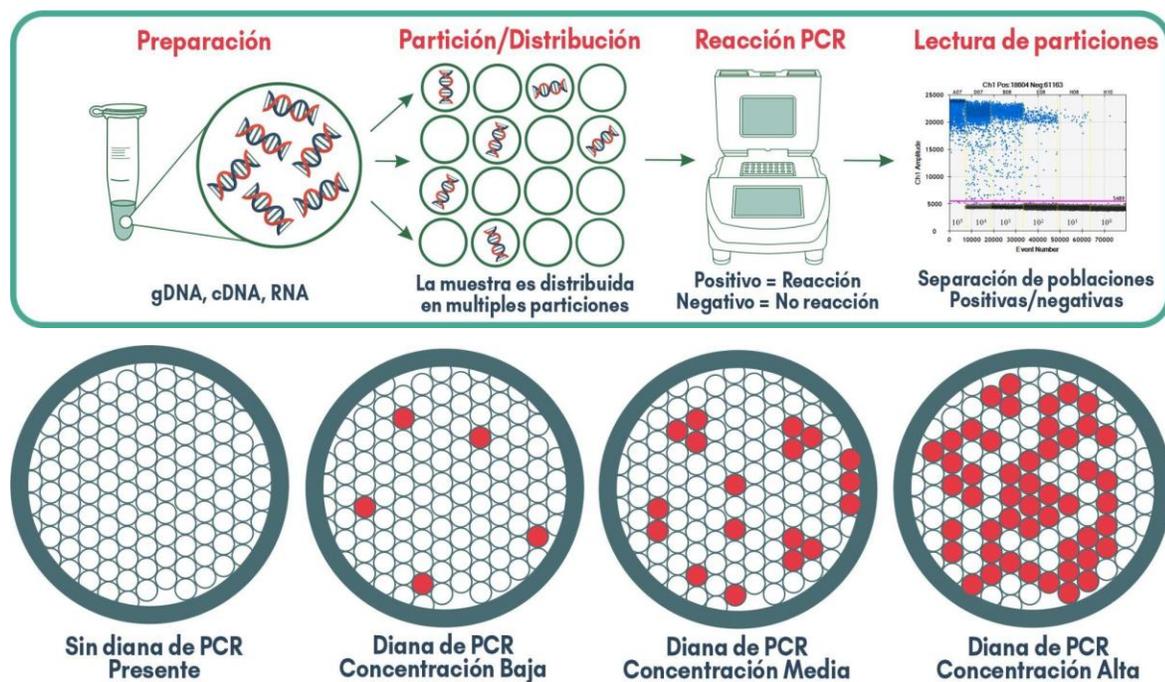


Figura 10. Esquema gráfico de la preparación habitual de un ensayo por dPCR, **A)** La muestra es dividida en múltiples compartimentos, ya sea en forma de gotas (ddPCR) o cavidades (cdPCR). Luego de ser amplificada, la lectura de cada partición es posible mediante la marcación de sondas con fluorescencia, lo cual permite discriminar las particiones donde hubo amplificación de la muestra diana. **B)** Representación del aumento de la concentración en una partición convencional por gotas (ddPCR)

La técnica es altamente poderosa en la detección de secuencias de ADN en muy baja concentración, llegando a una sensibilidad y especificidad superior a la PCR tiempo real, con Límites de Detección (LoD) equivalentes a 0.00187ng o 0.15 copias/uL [78]. Entre sus aplicaciones están el estudio de variación en el número de copias, detección de secuencias raras,

análisis de expresión de genes y cuantificación absoluta de ácidos nucleicos; esta última útil en los procesos de asignación de valor implicados en la producción de materiales de referencia [79], para ser empleados en procesos de detección y cuantificación de secuencias de ADN por PCR en tiempo real.

En virtud de sus características, y del hecho que no requiere de un estándar de ADN, la PCR digital ha sido descrita como un método potencialmente primario o de referencia para la cuantificación de ácidos nucleicos en términos del número de copias presentes [79], [80] [81]. Los métodos primarios son aquellas metodologías cuyas unidades del resultado final o resultados intermedios del ensayo son trazables al Sistema Internacional de Unidades. La mayoría de la instrumentación analítica empleada en los laboratorios de ensayos es comparativa (no absoluto) requieren de la realización de curvas de calibración usando estándares o MR que no tiene una precisión definida luego de las habituales diluciones. Los métodos primarios están en una categoría superior de calidad en comparación con los resultados que se obtienen mediante los métodos de menor jerarquía [82].

1.5 Aseguramiento de la calidad

En aras de asegurar la confianza en los resultados de medición que se producen, los laboratorios deben establecer y desarrollar un conjunto de actividades de aseguramiento de la calidad de los resultados de medición, que les permita garantizar la validez de los resultados obtenidos. Entre estas, aparte del control de equipos, instalaciones y personal, se encuentran aquellos asociados a garantizar la trazabilidad y por tanto la comparabilidad de los resultados de medición con otros, esto mediante el uso de materiales de referencia, uso de métodos validados, participación en ensayos de aptitud entre otros. A continuación, se considera el fundamento de algunos de los elementos que permiten efectuar el aseguramiento de la calidad.

1.5.1 Materiales de Referencia

Uno de los elementos de gran importancia para el aseguramiento de la calidad de los resultados es el uso de Materiales de Referencia (MR), los cuales son definidos según el Vocabulario Internacional en Metrología (VIM) [83] como un Material lo suficientemente homogéneo y

estable con respecto a propiedades especificadas establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas. Los MR son herramientas potentes en los laboratorios al ser utilizados para compensar los errores sistemáticos y de manera general para asegurar la calidad en sus mediciones [84]. Según la referencia empleada para la asignación del valor, los materiales de referencia pueden ser: a) primarios cuando el método de medición ha sido primario; b) secundarios cuando su valor ha sido asignado respecto a un material de referencia primario; y c) de trabajo cuando estos han sido preparados por el usuario y son empleados como control interno para los procesos de medición. La importancia de los MR radica en su uso en la validación de métodos, estimación de la incertidumbre, verificación del uso correcto de un método de medición, entre otros.

Una de las ventajas más importantes de emplear materiales de referencia certificados es que permiten asegurar la trazabilidad de los resultados de medición al SI. De esta forma se garantiza la comparabilidad de las mediciones, hecho que facilita el intercambio de información, y que permiten brindar herramientas en la toma de decisiones tomadas con base en resultados no solamente a nivel local, nacional e internacionalmente [85].

La producción de los MR está sujeta a la norma ISO-17034: 2016, la que brinda directrices sobre todo el proceso, asegurando los aspectos de calidad y buenas prácticas, así como una guía para las distintas propiedades a determinar en el material[86].

Generalmente la producción de estos materiales es precedida de la producción de un material a escala piloto, con el objeto de obtener resultados exploratorios sobre el comportamiento del analito en cuestión bajo las condiciones de una producción. Además, brindan la oportunidad de evidenciar factores de mejora para ser incluidos en la producción normalizada o final del MR. Sobre este material piloto se realizan estudios de homogeneidad y estabilidad, bajo diferentes condiciones, los cuales brindan información de las características del material [85]. Finalmente, si el material cumple con los valores propuestos se continúa con una producción normalizada, en la cual pueden cambiar el tamaño del lote, pero no la identidad del material en cuestión (Analito, material de envase, temperatura de almacenamiento, etc.). El material obtenido puede

ser destinado para su comercialización, uso interno como control, o ser usado como ítem de ensayo en pruebas de aptitud o ensayos colaborativos.

La producción de un material de referencia normalmente contempla varias etapas que funcionan como un esquema de procesos, las principales etapas de la producción son: 1) la selección del material de partida el cual es el principal componente del material, 2) el procesamiento, 3) el envasado del material, este debe cumplir los requerimientos que sean establecidos para el material, y 4) finalmente los estudios de homogeneidad, estabilidad, la caracterización y la asignación de valor. Estos últimos cuatro son desarrollados posterior a la producción del materiales, podrían denominarse como estudios que se efectúan sobre el material y nos habla de las características de este. A continuación, se menciona en que consiste cada uno de estos parámetros evaluados sobre el material.

1.5.1.1 Homogeneidad

El estudio de homogeneidad pretende establecer el grado de heterogeneidad presente entre las diferentes unidades que conforman el lote del material, de acuerdo con su presentación del MR. La metodología empleada en el dispensado del material, así como el volumen total dispensado pueden alterar el valor de la propiedad en las distintas unidades producidas.

El número de unidades necesarias para el estudio de homogeneidad varía según el tamaño del lote, que debe ser representativo de la dispersión del material entre y dentro de las unidades. La diferencia hallada en la propiedad entre las unidades y dentro de las unidades permite realizar la determinación de un valor de incertidumbre asociado a la homogeneidad del material y debe estar establecido en la documentación final del material [85], así como en la combinación final de la incertidumbre del valor de propiedad de un material.

La estimación del grado de homogeneidad del material se construye a partir de La Ecuación 2, donde u_{bb} es la incertidumbre asociada con la variabilidad entre unidades que corresponde a s_{bb} (la desviación estándar del componente entre unidades de un estudio de homogeneidad), $MS_{between}$ es el cuadrado medio entre grupos, MS_{within} es el cuadrado medio dentro del grupo o la varianza de repetibilidad y n es el número de réplicas.

$$\text{Ecuación 2. } u_{hom} = u_{bb} = s_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{n}}$$

En caso de que el valor de MS_{within} sea mayor que $MS_{between}$, el s_{bb} se calcula de acuerdo con La Ecuación 3, Donde $\nu_{MS_{within}}$ son los grados de libertad de la MS_{within} .

$$\text{Ecuación 3. } s_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} * \sqrt[4]{\frac{2}{\nu_{MS_{within}}}}$$

1.5.1.2 Estabilidad

El valor de la propiedad en un Material de Referencia puede verse alterado en función del tiempo, esto debido a procesos de degradación y alteración de este por condiciones tanto internas del material como externas, según el contenido de cada material. El objeto del estudio de estabilidad es establecer precisamente si el material presenta algún grado de inestabilidad y si este puede llegar a ser significativo, de acuerdo con el uso previsto del material.

La estabilidad del material permite conocer el comportamiento del analito en la matriz, el envase que contiene el material y las temperaturas de almacenamiento y transporte seleccionadas. Estos efectos son evaluados en función del tiempo; Generalmente, se suele analizar cambios de temperatura, donde se establece una temperatura como valor de referencia y se estudian otros valores de temperatura ya sean menores o mayores a este valor de referencia y el efecto que ocasionan sobre el valor de la propiedad del material.

Los estudios de estabilidad se clasifican en estudios a corto plazo, asociado a condiciones de transporte y de largo plazo relacionado al almacenamiento del material; Normalmente, se realiza la evaluación de la estabilidad mediante métodos de regresión que permita estimar las relaciones entre variables de respuesta instrumentales y el tiempo.

El diseño experimental de los estudios de estabilidad puede realizarse de forma clásica donde la propiedad es medida periódicamente o de forma isócrono donde todos los materiales son medidos

en una única ocasión, este último presenta ventajas respecto al tiempo de ejecución y procesado [85], [86].

En los estudios de estabilidad **clásicos** las mediciones del materiales son realizadas intentando mantener condiciones idénticas de medición, para distintos periodos de tiempo en los que se realizan las mediciones. La desventaja de esta metodología es que no se tiene en cuenta la variación instrumental que se pueda presentar en los sistemas de medición en función del tiempo y por consiguiente aumentar la incertidumbre asociada a la medición debido a la dispersión que se genera entre periodos de medición, esta variación no estaría relacionada con cambios en el valor de la propiedad únicamente.

La alternativa a los estudios clásicos es emplear diseños del tipo **isócrono**, en los cuales el almacenamiento se da bajo condiciones de referencia, donde se espera que las propiedades de interés del material se mantengan estables. En este diseño las unidades son almacenadas a una temperatura de estudio seleccionada, al cumplirse los periodos de tiempo seleccionados el material es transferido a una temperatura de referencia hasta finalizar el estudio de estabilidad, una vez completado, se realiza la medición de la totalidad de las unidades, beneficiando las condiciones de repetibilidad [85].

La estimación de la incertidumbre por estabilidad se calcula a partir de La Ecuación 4, donde $s_{(b)}$ corresponde al error estándar de la pendiente y t corresponde al tiempo total del estudio estabilidad.

$$\text{Ecuación 4.} \quad u_{lts} = s(b) * t$$

1.5.1.3 Caracterización y Asignación de valor

La caracterización del material de referencia es el proceso de medición de las propiedades a certificar. La caracterización de un MR suele ser un proceso riguroso, la ISO-17034:2016 sugiere distintas alternativas para realizarlo, la primera es hacer uso de solo un proceso de medición en un único laboratorio, donde se debe incluir la comparación directa de un MRC. La segunda es utilizar un mínimo de dos métodos con propiedades establecidas y trazables de exactitud/veracidad, permitiendo alternativas como utilizar más de un método y más de un

laboratorio asociado a la asignación del valor. Como tercera opción, el mensurando es definido mediante un único método empleado en una red de laboratorios .

La asignación de valor es la etapa que permite obtener el valor de la propiedad con una incertidumbre asociada, a partir de la información y resultados obtenidos en los estudios de homogeneidad, estabilidad, caracterización, así como los inherentes al mensurando de acuerdo con el modelo matemático que describe la forma de calcularlo. La Guía para la expresión de la incertidumbre en la medición (GUM) [85], [87], establece un conjunto de lineamientos para calcular la incertidumbre en un proceso de medición, que en el caso de un MR puede ser estimada (u_{MRC}) de acuerdo con la Ecuación 5.

$$\text{Ecuación 5.} \quad u_{MRC} = \sqrt{u_{car}^2 + u_{hom}^2 + u_{stab}^2}$$

Donde los términos u_{car} y u_{hom} hacen referencia a las incertidumbres asociadas a la caracterización y a la homogeneidad del lote, y los términos u_{stab} corresponden a los aportes por estabilidad.

1.5.2 Validación de Métodos

La validación de métodos es definida como la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto [83]

La importancia en la obtención de resultados exactos, reproducibles y comparables exigen contar con un enfoque metodológico adecuado. Lo anterior implica, que es necesario realizar la validación de los métodos de medición y establecer trazabilidad metrológica de los resultados que emiten los laboratorios. El proceso de validación permite conocer las limitaciones y la identificación de las variables de mayor relevancia que influyen en el desempeño del método [88], [89] . Los parámetros de desempeño a evaluar dependen del tipo de método, nivel de validación y del uso previsto, a su vez se logran obtener resultados que sean comparables con otros laboratorios a través de referencias establecidas, que para el caso de la mayoría mediciones químicas se realiza mediante materiales de referencia.

La validación de métodos puede ser desarrollada en distintos niveles según las necesidades propias del fin provisto del método: (a) **Nivel uno de validación o nivel de emergencia**, la que se desarrolla por un único laboratorio cuando se necesita usar un método analítico de manera inmediata, y busca dar un grado mínimo de confiabilidad a los resultados que se produzcan con el empleo del método. Este nivel contempla sólo los parámetros de validación relevantes, los cuales son escogidos por quien va a realizar el proceso. (b) **Nivel dos de validación o intra-laboratorio**, que se desarrolla por un único laboratorio y contempla todos los parámetros de calidad del método, tales como límites de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad, precisión intermedia, entre otros, dependiendo de las características del método y de lo que solicite la normatividad, regulación o guía. (c) **Nivel tres o nivel inter-laboratorio** desarrollado por más de un laboratorio, lo que significa, mínimo un laboratorio adicional al laboratorio que ya realizó la validación al nivel dos. Este nivel de validación requiere una comparación con un método de referencia existente. Los laboratorios participantes deben cumplir con los requisitos establecidos por la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC), de sus siglas en inglés) para estudios colaborativos. Finalmente (d) **Nivel cuatro o nivel de estudio colaborativo**, el cual se desarrolla con mínimo ocho laboratorios que deben como mínimo haber superado con anterioridad el nivel de validación dos. Este nivel de validación es equivalente a un estudio colaborativo completo de la AOAC. Al cumplirse los parámetros de validación y contar con la información pertinente a nivel de características del método se procede a proponer el método oficial o de referencia.

1.5.3 Ensayos de Aptitud

Según la norma ISO 17043:2010 [90], las comparaciones inter-laboratorios o ensayos de aptitud se utilizan principalmente para evaluar el desempeño de los laboratorios en los procesos de medición o ensayos con el objetivo de identificar problemas y toma oportuna de decisiones dentro de planes de mejora dentro de los procedimientos, ya sea a nivel instrumental o de formación.

La evaluación constante en el desempeño de los laboratorios es esencial para las autoridades reguladoras, los organismos de acreditación de laboratorios y otras organizaciones que especifican requisitos para los laboratorios, así como para los usuarios. La Norma Internacional ISO/IEC

17011 exige que los organismos de acreditación tengan en cuenta la participación y el desempeño en los ensayos de aptitud de los laboratorios. Existe una necesidad creciente de ensayos de aptitud para otras actividades de evaluación de la conformidad, tales como la inspección o la certificación de productos. La mayoría de los requisitos en esta Norma Internacional se aplican en campos de actividad en evolución, especialmente en lo concerniente a la gestión, planificación y diseño, personal, aseguramiento de la calidad, confidencialidad y otros aspectos, según corresponda [90].

En Colombia la Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC) define los criterios para la participación de los laboratorios en ensayos de aptitud. Estos tienen como fin utilizar los resultados de desempeño obtenidos por los laboratorios para evaluar la competencia técnica en la aplicación de métodos de ensayo o calibración específicos, cuando existen y resultan apropiados. Las entidades que están autorizadas para realizar estos ensayos son el Instituto Nacional de Metrología de Colombia-INM, como laboratorio primario, otros institutos nacionales de metrología firmantes del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo en el ámbito del Comité Internacional de Pesas y Medidas – CIPM- de la Oficina Internacional de Pesas y Medidas – BIPM, además de los organismos proveedores legalmente constituidos y que demuestren su competencia técnica mediante un certificado de acreditación vigente con la norma ISO/IEC 17043.

1.5.4 Trazabilidad Metrológica

El uso y aplicación de las herramientas definidas en las anteriores secciones concede la capacidad de generar trazabilidad metrológica en sus mediciones, esta permite garantizar la comparabilidad de los resultados de medición en diferente tiempo o lugar. Según el vocabulario internacional de metrología la trazabilidad se define como “la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida”.

Para una adecuada trazabilidad se necesita una jerarquía de calibración establecida y es aplicable a procedimientos y unidades de medida que involucren una magnitud o estándar [83].

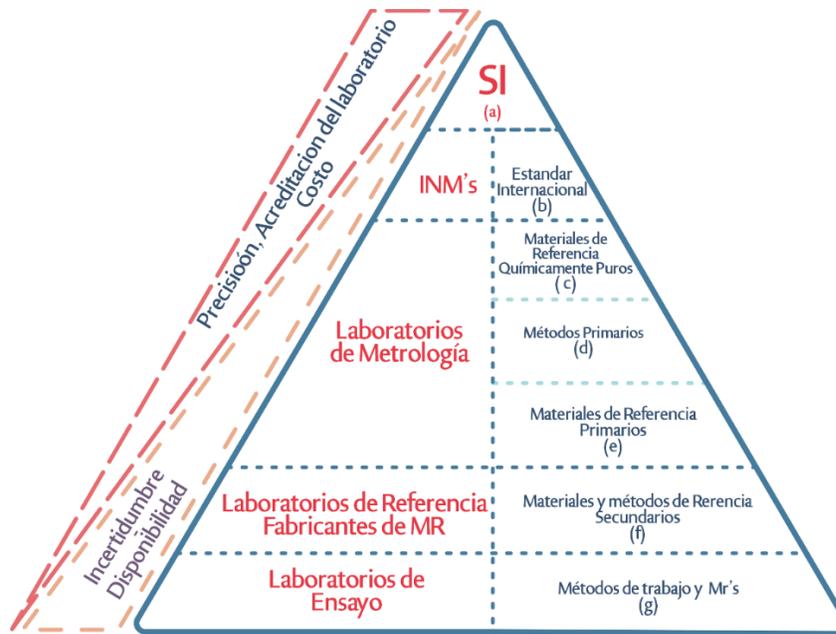


Figura 11. Representación gráfica la cadena de trazabilidad metrológica.

La Figura 11. Ilustra un esquema de jerarquía metrológica, el nivel de mayor jerarquía es el SI (Definido en la figura como *a*), por debajo de los Institutos Nacionales de Metrología, estos conservan Estándares Internacionales (*b*), los cuales son directamente trazables al SI debido a que tienen una relación definida con una unidad de medida o cantidad física. El siguiente nivel en la jerarquía son los laboratorios de Metrología, que cuentan con MR químicamente puros (*c*), la mayoría de estos de composición elemental, estos laboratorios a su vez cuentan con Métodos Primarios (*d*) de medición, la importancia de estos radica en la capacidad de emitir resultados sin contar con una referencia, siendo de gran importancia para la producción de MR primarios (*e*), denominados de esta manera al ser producidos por Métodos Primarios. Continuando con el siguiente nivel en la jerarquía se encuentran los laboratorios de referencia, con capacidad de producción de MR secundarios (*f*), denominados así por ser producidos a partir de Métodos Secundarios, los laboratorios productores se encuentran acreditados en la norma ISO 17034:2016 relacionada con la competencia de los productores de materiales de referencia. Finalmente se

encuentran los laboratorios de ensayo, los cuales emplean métodos de trabajo de rutina y dan uso a los MR producidos en los distintos niveles de la jerarquía metrológica según sus necesidades.

Es importante mencionar la relación inversa que se tiene al hablar de la incertidumbre y disponibilidad asociada a los métodos de medición a medida que se sube en la jerarquía, donde si bien los MR y métodos primarios cuentan con menor incertidumbre, precisión mayor, también tienen una disponibilidad limitada, y costo superior.

La norma ISO 17511:2020 indica como inicio de la trazabilidad el nivel más alto según se cuente con método de medición de orden superior, materiales de referencia (MR) o protocolos armonizados que faciliten estos procesos de medida. En este orden de ideas se plantean las siguientes alternativas:

- La existencia de un método primario de medición y materiales de referencia certificados en los cuales los resultados son trazables directamente al Sistema Internacional de Unidades (SI).
- Los métodos de medición están definidos por una entidad o consenso de estas, en este caso la asignación de valor de los MR es realizada mediante el método acordado
- Solo se cuenta con un método acordado sin MR asociados a este.
- Se cuenta con un método de referencia mediante consenso internacional, aunque sin MR disponibles avalados mediante consenso internacional.
- No se cuenta con un método de referencia, aunque si MR con metodologías consenso para la asignación de valor de este.
- No se cuenta con procedimiento o MR establecidos, por lo cual los resultados de medición son respaldados por controles internos dentro del protocolo de cada laboratorio.

Establecer la trazabilidad metrológica a una unidad SI para mediciones físicas como masa o longitud es generalmente más sencillo porque las magnitudes de interés están bien definidas y por lo general se puede medir directamente mediante métodos específicos. Por el contrario, la

cuantificación de muestras de origen biológico es intrínsecamente más complejos a la hora de realizar una caracterización en términos de estructura molecular y peso, toda vez que por lo general comparten una matriz, aparte muchos de los procedimientos requieren el conteo de copias de un gen, proteínas o células donde estos no son susceptibles a medición directa por procedimientos de rutina [91].

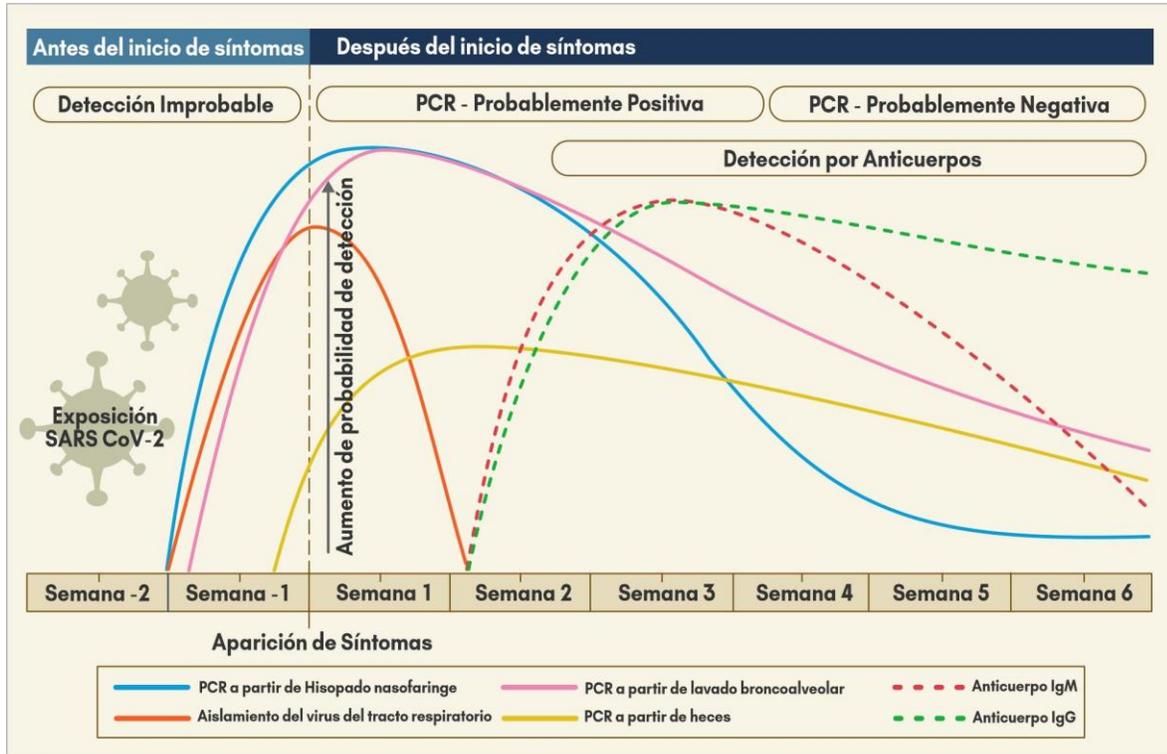
1.6 Estado del arte

1.6.1 Detección de SARS CoV-2

El comportamiento de la infección por SARS-CoV-2 genera retos en la detección del virus. Debido a su largo periodo de incubación durante la infección, es posible detectar material genético mediante técnicas moleculares dependiendo de su sensibilidad. Por el contrario, las técnicas basadas en la respuesta inmune son dependientes de la etapa de la infección, generando la necesidad de contar con variedad de técnicas durante el diagnóstico [92]. Por lo tanto, por el largo periodo de incubación y latencia del virus se recomienda la utilización de más de una estrategia en la detección. En la Figura 12, se presenta una relación entre el avance de la enfermedad y la pertinencia de cada una de las pruebas, toda vez que el diagnóstico rápido y efectivo es indispensable para no incurrir en una respuesta tardía en la contención de la enfermedad. Además, la alta tasa de pacientes asintomáticos contagiados con dificulta el diagnóstico mediante la sintomatología del paciente, lo que hace indispensable la generación de ensayos que puedan ser ajustados a la necesidad de cada paciente [93].

Una vez conocida la secuencia del genoma de SARS-CoV-2 , la retro-transcripción mediante PCR (RT-PCR) se estableció rápidamente como la técnica de referencia utilizada para el diagnóstico de la enfermedad, la que puede ser ejecutada en cualquier fase del contagio. Sin embargo, también existen otras técnicas de diagnóstico, como la cuantificación del SARS CoV-2 mediante la Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) [94], Detección de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR) [95], detección mediada por biosensores, además de técnicas basadas en inmunoensayos como: dispositivos de flujo lateral (LFDs), Inmunoensayos con Quimioluminiscencia (CLIA) [96] y Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) [93].

Figura 12. Variación estimada en función del tiempo en la detección de pruebas de SARS CoV-2



En Colombia las pruebas basadas en ácidos nucleicos e inmunoensayos son utilizadas según los lineamientos para detectar SARS-CoV-2, siendo la detección de ácido nucleico del virus la principal prueba diagnóstica [97]. De acuerdo con la validación de su desempeño, las pruebas basadas en inmunoensayos se recomiendan sólo para diagnóstico durante los primeros 11 días de infección.

1.6.2 RT-PCR

La detección mediante RT-PCR es altamente reproducible, sensible y selectiva, por esta razón es el método recomendado para la detección de SARS CoV-2; sin embargo, la técnica requiere de una instrumentación sofisticada, personal entrenado, y generalmente el proceso dura de 4 a 6 horas [98] si se tiene en cuenta los procesos de extracción de ARN de las muestras. Esto junto con la necesidad de aumentar la tasa de muestras evaluadas por unidad de tiempo, especialmente

en laboratorios de salud pública, condujo al desarrollo de alternativas a nivel instrumental que permiten tener una mayor automatización del proceso durante la extracción, purificación y amplificación de la muestra, lo que se conoce como plataformas cerradas de análisis [99].

Existen varios protocolos reportados, el primero reportado por el Instituto de Virología de Charite, los estandarizados en Tailandia, Japón, China, Corea, y el diseñado por los CDCs de EE. UU. Los protocolos se enfocan en amplificar principalmente regiones de los genes E, RdRp y N, los que han demostrado ser sensibles y específicos para la detección de SARS CoV-2 [9]. Sin embargo, otros protocolos se enfocan en amplificar principalmente regiones que codifican los genes S, ORF3, ORF8 y M [17]. La Tabla 3. resume las dianas de detección empleados por cada uno de estos protocolos

Instituto	Genes Diana
China CDC, China	ORF1ab y N
Institute Pasteur, Paris, Francia	Dos (2) dianas en la región RdRp
US CDC, USA	Tres (3) dianas en el gen N
National Institute of Infectious Diseases, Japan	Múltiples dianas en el región de la proteína S
Charité, Alemania	RdRp, E, N
HKU, Hong Kong SAR	ORF1b-nsp14, N
National Institute of Health, Tailandia	N

Tabla 3. Protocolos iniciales emitidos por la OMS al inicio de la pandemia de COVID-19, Cada uno de estos está asociado a una entidad nacional de investigación.

La selección de regiones diana para la amplificación es comúnmente realizada mediante el uso de herramientas bioinformáticas que han sido de utilidad no solo en la a identificación de dianas de amplificación, también en el diseño de las secuencias para primer y sondas para la detección de SARS CoV- 2 por qPCR.

La plataforma (BLAST) de libre acceso es una de las estas herramientas de la web más utilizada para este propósito [100], junto a las desarrolladas por casas comerciales como ThermoFisher, Qiagen. GenScript, entre otras [101]–[103].

Por otra parte, los ensayos multiplex, ofrecen la ventaja de poder amplificar y detectar varias dianas en una misma reacción. Esto se logra mediante el uso de sondas específicas (*Taqman probes*, *Thermo Fisher Scientific*) marcadas con distintos fluoróforos con λ_{\max} de absorción

distintos, lo que permite discriminar la señal asociada a cada uno de estos. En la actualidad ya se conocen algunos ensayos comerciales basados en RT-PCR para SARS-CoV-2 con la capacidad de amplificar variantes específicas aprovechando la selectividad que se obtiene al utilizar sondas marcadas [104]. Se ha demostrado como los ensayos de este tipo permiten aumentar la sensibilidad de la detección; además, la disminución de costos por reacción, tiempo y la capacidad de realizar seguimiento a las variantes hace de los ensayos multiplex una herramienta importante en la detección del SARS CoV-2 [105].

1.6.3 Métodos de detección comerciales

La disponibilidad de la secuencia del genoma de SARS CoV-2 tuvo un papel determinante en el desarrollo de las metodologías basadas en ácidos nucleicos para la detección de virus, lo que sumado a su rápida propagación del virus, desencadenó la declaración del estado de pandemia por la OMS, e indujo el desarrollo de los protocolos de medición por PCR mencionados anteriormente.

La criticidad por obtener datos acerca de la propagación de la enfermedad permitió por parte de la FDA y de la unión europea, la autorización de uso de emergencia de estos protocolos facilitando el desarrollo y uso de un gran número de ensayos comerciales. El objetivo de los Kit comerciales de detección de SARS CoV-2 es facilitar la implementación rápida y sencilla en los laboratorios; sin embargo, la información acerca de las características del método, así como la verificación de los controles en los mismos continúa siendo problemático, dado que su trazabilidad está ligada exclusivamente al proveedor y no se encuentran ligados a una jerarquía metrológica claramente establecida [106].

Según la norma ISO 17511:2020, que establece los requisitos para garantizar la trazabilidad metrológica de los valores asignados a calibradores y materiales de control veraces, se discute que la comparabilidad en los resultados obtenidos por los laboratorios estaría dada en la medida en que todos usen el mismo ensayo comercial, no obstante, dado la emergencia sanitaria y el afán por aumentar el volumen de procesamiento de muestras se emplean diferentes kits

comerciales para la detección de SARS CoV-2, generando una falta de armonización en los procedimientos de medición y por lo tanto disparidad en los resultados obtenidos por dichos métodos.

Actualmente se encuentran disponibles más de 650 ensayos comerciales para la detección de SARS CoV-2 por técnicas de PCR [16]. La mayoría de estos métodos emplea los protocolos emitidos al inicio de la pandemia, algunos con modificaciones realizadas de forma interna con el fin de cumplir con especificaciones que permitan acelerar o ampliar la capacidad de detectar múltiples genes en una misma reacción de PCR vía el uso de metodologías tipo Multiplex. [107]. En la Figura 13. se muestra el número de ensayos comerciales fabricados por país, donde predominan China, EE. UU. y Corea del Sur.

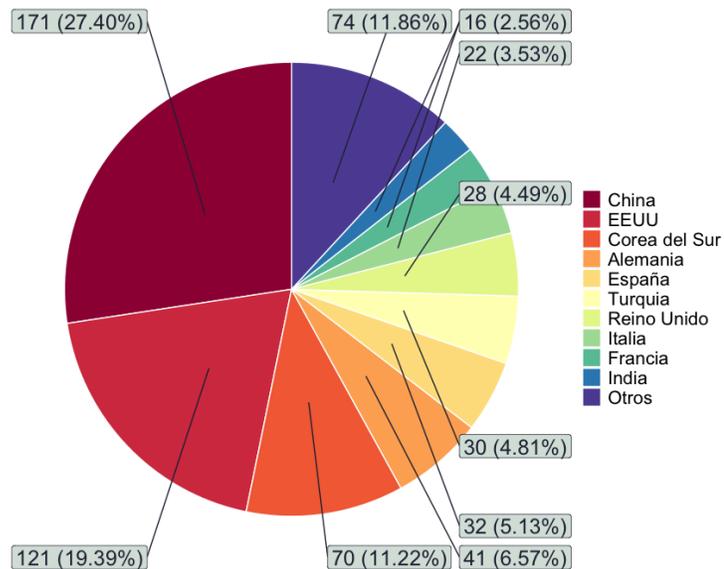


Figura 13. Distribución de los ensayos comerciales según su país de fabricación.

1.6.4 Variabilidad genética y su relación con la detección

El virus SARS CoV-2 es característico por su alto potencial de recombinación lo que produce alta variabilidad genética, llevando a la aparición constante de linajes y variantes. Por otra parte, dada la naturaleza de la técnica de PCR la cual se basa precisamente en identificar regiones específicas del genoma del virus, sumado a la variabilidad genética supone una afectación en la

eficiencia de las reacciones de amplificación, lo que restringe enteramente la reacción de amplificación si la complementariedad entre primer y molde no es la adecuada.

Se han realizado análisis genómicos a pequeña y gran escala para mostrar la evolución del SARS-CoV-2 y sus cambios a través del tiempo, algunos de estos realizados sobre más de 10 mil genomas de SARS CoV-2 para la identificación de SNP's [108]–[110].

Un ejemplo del efecto que tiene la aparición de variaciones en las secuencias del virus es el cambio que puede ocurrir en la sensibilidad de los métodos por PCR para la detección del virus; como ocurre con la delección del nucleótido presente en la posición 69-70 de la secuencia que codifica a la proteína S presente en variantes como la B.1.1.529 (Omicron), declarada por la OMS como una variante de riesgo [111]. Este cambio implica una inhibición en la amplificación de algunos ensayos de uso común en PCR para este gen. Este fenómeno se conoce como falla del objetivo del gen S (SGTF), esta variación ha sido utilizada como característica de esta variante y lo cual ha permitido su uso como diana de amplificación en nuevos métodos de detección del virus [112].

Por lo tanto, el surgimiento de nuevos linajes y variantes de virus ha generado que varios autores reevalúen la pertinencia de los protocolos diseñados en la fase inicial de la pandemia. En este sentido, Karmali et al en 2020, identificaron y recomiendan el gen ORF8 como un objetivo potencial de Detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, debido a su baja variabilidad [113].

Por otra parte, el uso de herramientas bioinformáticas como los métodos de alineamiento múltiple son una herramienta de gran importancia para realizar un aseguramiento de la vigencia de los ensayos para la detección de SARS CoV-2 establecidos. Estas herramientas permiten hacer una comparación entre las secuencias obtenidas actualmente del virus, con las dianas de amplificación empleadas comúnmente, lo que permite garantizar la eficiencia y confiabilidad de los métodos de análisis [114].

1.6.5 Ensayos de Aptitud de SARS CoV-2

Con el avance de la pandemia se han realizado ensayos de aptitud alrededor del mundo, la mayoría de estos con el objetivo de asegurar la validez de los resultados de detección dados por los laboratorios y así generar oportunidades de mejora. Los EA para la detección de SARS CoV-2 puede estar basados en métodos de PCR, serológicos o únicamente del tiempo antígeno.

La mayoría de los EA tienen una naturaleza del tipo cualitativo, basados únicamente en la capacidad de detección de las secuencias que componen el virus por parte de los laboratorios. Esto se debe a la criticidad que implica la detección de un caso positivo por contagio de SARS CoV-2, donde la cuantificación de la carga viral no está enteramente relacionada con la patogenicidad y transmisibilidad del virus, y no en todos los casos tiene el mismo impacto; por lo cual los casos son tomados con igual severidad [115].

.En la Tabla 4, se presenta un resumen de ensayos de aptitud realizados para evaluar la presencia de SARS CoV-2 por PCR. Algunos de los esquemas presentados fueron realizados por entidades nacionales, sin embargo los EA que se encuentran disponibles para inscripción en la actualidad tienen un costo de registro y envío altos, superando los \$600 dólares americanos en algunos casos, sin gastos de envío adjuntos, lo que limita la participación de laboratorios de ensayo en estos esquemas de evaluación de la calidad de los resultados.

País	Organizador	Participación	Tipo de muestra	Esquema	Participantes	Resultados positivos	Ref.
EE. UU.	American Proficiency Institute	Gratuito	RNA viral en solución	Cualitativo	346	97.4% de acierto	[116]
Alemania	INSTAND	Gratuito	Sobrenadante celular	Semi-cuantitativo	305	Variable	[117]
Corea	Center for Disease Control and Prevention	Gratuito	Sobrenadante celular	Cualitativo y Semi-cuantitativo	118	93,2% de acierto	[118]
Japón	Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards	Gratuito	RNA viral en solución	Cualitativo	563	94.1% de acierto	[119]
Reino Unido	Laboratory of the Government Chemist	Paga: €480	RNA viral en solución	Cualitativo	Disponible regularmente	No reporta	[120]

EE. UU.	College of American Pathologist	Paga: No reporta	RNA viral en solución	Cualitativo	Disponible regularmente	No reporta	[121]
Alemania	Merck	Pago: \$620	RNA viral en solución	Cualitativo	Disponible regularmente	No reporta	[122]
Australia	Royal College Pathologists	Gratuito	Sobrenadante celular	Semi-cuantitativo	101	95%	[123]

Tabla 4. Ensayos de Aptitud que se han desarrollado para la evaluación de la detección de SARS CoV-2 por RT-PCR

Los EA son de interés para todos los grupos de valor que presentan funciones asociadas al control de la enfermedad. Por un lado, a los laboratorios participantes, les permite verificar si los ensayos implementados están operando adecuadamente, y permite su comparación con otros laboratorios del sector. Para los organismos de inspección, vigilancia y control, como el INS, les brinda una herramienta para evaluar cómo están operando la red de laboratorios que ejecutan las actividades de detección, así mismo evalúa el panorama de los métodos e instrumentación empleada por los participantes. Finalmente, a los reguladores y a la ciudadanía en general les brinda un parte de confianza en los laboratorios que están adelantado este tipo de pruebas.

1.6.6 Materiales de Referencia de SARS CoV-2

El uso de MR en las mediciones realizadas para la detección de SARS CoV-2 desempeña un papel de gran importancia debido a que hacen parte del aseguramiento de la calidad de los resultados de un laboratorio. No obstante, el desarrollo y producción de estos suele ser un proceso que abarca largos periodos de tiempo, más teniendo en cuenta su naturaleza de origen biológico que puede alterar de manera significativa la estabilidad de los materiales.

El rápido avance de la pandemia conllevó al aceleramiento de estos procesos dada la necesidad del uso de controles adecuados y con una trazabilidad clara, lo sumado al número de laboratorios que desempeñan labores de medición, hicieron evidente la necesidad de un mayor número de ofertas para los MR de SARS CoV-2. La OMS ha destacado la importancia de la disponibilidad de MR, ya sean a nivel de ARN de SARS-

CoV-2 o serológicos a nivel de proteínas, para métodos de PCR o antígenos respectivamente [124].

En La Tabla 5 se presentan algunos de los MR que han sido desarrollados a para su uso en métodos de detección por PCR para la detección de SARS CoV-2. Su costo y disponibilidad han sido una limitante para su adquisición e implementación en los laboratorios de ensayo.

Nombre	Fecha	Fabricante	Presentación	Costo	Concentración	Referencia
International Standard for SARS-CoV-2 RNA 20/146	2021	National Institute for Biological Standards and Control	RNA - Liofilizado	£160.00	7.40-Log10 IU/ampolleta	[125]
Working Reagent for SARS-CoV-2 RNA - 20/138	2021	National Institute for Biological Standards and Control	RNA – 500uL Agua grado molecular	£120.00	6.73-Log10 IU/mL	[126]
CRM:2019 Novel Corona Virus GBW(E)091099	2020	National Insitute of Metrology, China	RNA en solución	US\$286.26	1.06×10 ³ copias/μL	[127]
SARS-CoV-2 Research Grade Test Material (RGTM-10169)	2020	National Institute of Standards and Technology	RNA en solución	No disponible	5.4×10 ⁶ copias/μL	[128]
(ssRNA) fragments of SARS-CoV-2 EURM-019	2020	Joint Reseach Centre	RNA en solución	€20.00	6×10 ⁷ copias/μL	[129]
ssRNA EURM-014	2022	Joint Reseach Centre	RNA liofilizado	€220.00	10 ⁷ copias	[130]
AccuPlex SARS-CoV-2 Reference Material	2022	SeraCare	RNA en solución	-	5000 copias/mL	[131]
SARS-CoV-2 packaged RNA reference material. RM 111–10-507	2021	Korea Research Institute of Standards and Science	RNA en solución	-	2.0× 10 ⁵ copias/mL	[132]
ssRNA fragments of SARS-CoV-2 – 1EA	2022	Merck	RNA en solución	US\$40.62	-	[133]
SARS-CoV-2 Standard- NA050	2021	National Measurement Institute of Australia	RNA en solución	No disponible	116.000 Copias/mL	[134]

Tabla 5. Materiales de Referencia de SARS CoV-2 nivel de RNA

Además de ser empleados para la calibración y la certificación de amplificación de ácidos nucleicos, el contar con MR específicos de SARS CoV-2 con concentración definida permite establecer una relación de la carga viral con la respuesta instrumental dada en la detección, definiendo de mejor manera los valores que son tomados como puntos de corte en los ensayos de diagnóstico por PCR. Asimismo, puesto que, los resultados obtenidos por los métodos de RT-qPCR usualmente están dados en valores de Ct y estos presentan una gran variabilidad al cambiar características de tiempo, lugar o un instrumento de medición. Los materiales de referencia basados en RNA pueden ser una herramienta de gran utilidad para caracterizar de mejor manera los métodos de medición, contribuyendo a la armonización de los ensayos por PCR.

1.6.7 Red de Laboratorios para la detección de SARS CoV-2 en Colombia

Al igual que otros países, la forma más eficiente para detectar la enfermedad ha sido a través del establecimiento de una red de laboratorios con alcance nacional que permita realizar los ensayos rápidamente con el objeto de consolidar la información en torno a la propagación de la enfermedad, realizar vigilancia virológica de la COVID-19 mediante la caracterización virológica del SARS-CoV-2, incluido el monitoreo genómico. Por lo tanto, en Colombia se estableció al Instituto Nacional de Salud (INS) como Laboratorio Nacional de Referencia y coordinador de la red ampliada de Laboratorios de diagnóstico SARS-CoV-2 en el marco de la respuesta a la emergencia sanitaria, desempeñando funciones de dirección, coordinación y supervisión de las actividades de laboratorio para el diagnóstico de SARS CoV-2.

Inicialmente la red estuvo conformada no solo por LSP, privados, sino por universidades que se unieron para apoyar las actividades de detección a nivel nacional. Con la ampliación de la red, Actualmente cuenta con 227 laboratorios designados con una capacidad de procesamiento máxima de 96.000 muestras diarias, que se distribuye entre laboratorios de Salud Pública (25.77%), las Entidades Administradoras de Planes de

Beneficios (Laboratorios de Ensayo Privados) con el 70.43% y el INS con el 3,8% [20].
El INS también emite informes sobre los métodos de uso actual para la detección de SARS CoV-2 mediante técnicas moleculares, inmunoensayos, y pruebas rápidas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Fortalecer la red nacional de laboratorios que realizan detección de SARS-CoV-2 por PCR a través del desarrollo de herramientas metrológicas para el aseguramiento de la calidad de los resultados de medición

2.2 Objetivos específicos

- Validar un conjunto de métodos por PCR tiempo real y PCR digital para ser empleados en la caracterización de un material de referencia
- Producir un material de referencia a nivel de ácidos nucleicos para ser empleado como ítem de ensayo en un ejercicio interlaboratorio para la detección de SARS CoV 2
- Realizar actividades de transferencia técnica a los laboratorio interesados, a través del diseño de un ejercicio interlaboratorio para la detección de SARS-CoV-2 con los materiales desarrollados

3. Materiales y métodos

La ejecución del proyecto se desarrolló en cinco etapas metodológicas, que dan respuesta a los 3 objetivos específicos planteados en el desarrollo de este trabajo. La primera etapa constó de la evaluación, optimización y validación de los métodos en RT-qPCR y RT-ddPCR para la detección de SARS CoV-2. La segunda en la producción y caracterización de dos pilotos de MR, en momentos diferentes. Los resultados obtenidos en esta etapa fueron la base para la ejecución de la tercera etapa en la cual se realizó la producción normalizada de los MR. En la cuarta, como parte de las actividades de transferencia del objetivo 3, se desarrolló un EA empleando como Ítem de Ensayo de Aptitud (IEA) uno de los MR producido en la etapa anterior con el objeto de apoyar la evaluación del desempeño de los laboratorios de ensayo encargados de la detección de SARS CoV-2 en Colombia. En la quinta etapa, se desarrolló un taller de transferencia técnica con laboratorios de ensayo pertenecientes a la red de salud pública, empleando el segundo MR producido en la etapa 3.

Todos los Materiales de Referencia producidos para la ejecución del EA y demás actividades están enmarcados dentro de los lineamientos establecidos por la norma ISO 17034:2016 y la guía ISO 35:2017.

En la Figura 14. se muestra un esquema general de la metodología planteada para la ejecución del proyecto. En las posteriores secciones se exponen y desarrollan cada una de estas etapas en profundidad.

Las actividades de producción de los Materiales de Referencia, así como el Ensayo de Aptitud realizadas con el Instituto Nacional de Salud, contaron con la cooperación internacional del Instituto de Estándares y Tecnología (NIST) de Estados Unidos, de la Unión Europea y de la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI).



Figura 14. Esquema general ejecución de actividades del proyecto.

3.1 Desarrollo de Métodos por PCR

3.1.1 Materiales e instrumentos

Materiales de Referencia

Se emplearon dos MR de RNA de SARS CoV-2 para la ejecución de las actividades planteadas en el proyecto, las características de estos materiales son descritas a continuación.

- **Material de referencia RGTM10169 donado por el Instituto de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST por sus siglas en inglés):** Compuesto por dos viales de RNA sintético del genoma de SARS-CoV-2 (Figura 15 y Tabla 6.), con una concentración nominal de 5×10^6 copias/ μ L en una matriz de 5 ng/ μ L de ARN Jurkat humano (Invitrogen AM7858). Los fragmentos fueron mezclados y diluidos en buffer citrato 1 mM pH 6,4 (Invitrogen, AM 7001) hasta una concentración de 1×10^5 copias/ μ L la cual fue empleada como solución de trabajo (SARS ST). En la Figura 15. se presenta la cobertura de los fragmentos de **RGTM10169** en el genoma de SARS CoV-2.

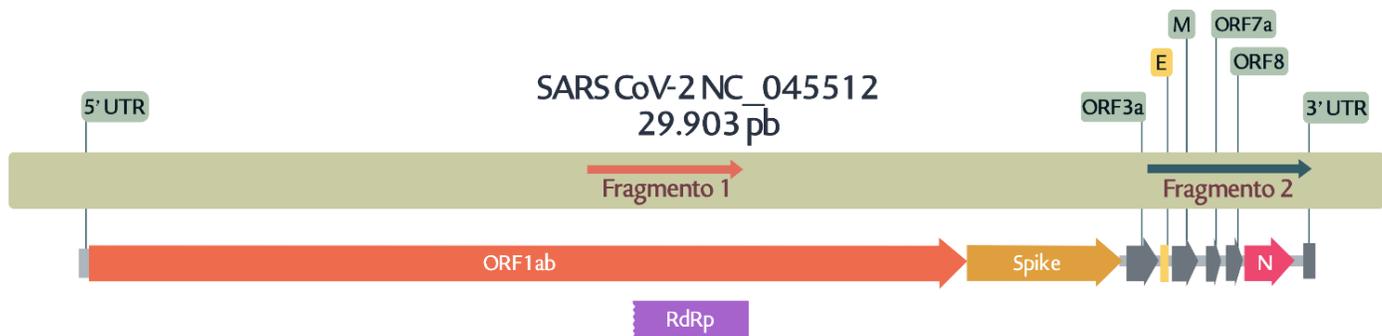


Figura 15: Distribución de fragmentos 1-2 de RNA que constituyen en material RGTM-10169, cobertura de dianas de amplificación para la detección de SARS CoV-2.

Fragmento	Tamaño (bases)	Región*	Observaciones
1	3985	25949 - 29698	Cubre (ORF3a, 7a, F8) genes E y N
2	3790	12409 - 15952	Cubre 90% del ORF RdRp

*GenBank MN985325.1

Tabla 6. Descripción fragmentos material RGTM10169

- **Material de referencia EURM-019:** Donado por Unión Europea y Producido por el laboratorio de investigación adjunto (JRC-IRMM) corresponde a un vial con 100µL, de una solución con un fragmento de ss-RNA sintético de 880 bases (Figura 16) del genoma de SARS CoV-2 -CoV-2 transcrito *in vitro* y almacenado en buffer Citrato pH 6.4, con una concentración promedio de $7 \times 10^7 \pm 0.5$ copias/uL. En la Figura 16. se muestra la distribución de las dianas de amplificación dentro del fragmento del material **EURM-019**. La Tabla 7. presenta los protocolos de amplificación recomendados por OMS aplicables a los materiales empleados.

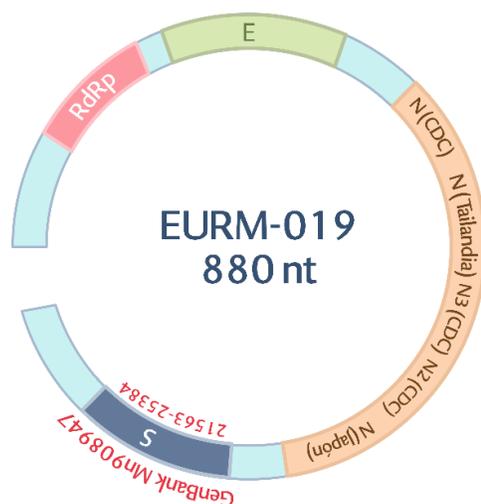


Figura 16: Distribución de dianas de amplificación del material EURM-019 de SARS CoV-2

Instituto	Gen Diana	RGTM-10169	EURM-019
China CDC	ORF1ab	✓	X
	N1-c	✓	X
Institute Pasteur, Paris Francia	RdRp-a	✓	✓
	RdRp-b	✓	X
US CDC, EE. UU.	N1-CDC	✓	✓
	N2-CDC	✓	✓
	N3-CDC	✓	✓
INEI, Japón	N	✓	✓
	S	X	X
Charité, Alemania	RdRp	✓	✓
	E	✓	✓
	N	✓	✓
HKU, Hong Kong SARS	ORF1b-nsp14	X	X
	N	✓	X
INS, Tailandia	N	✓	✓
JRC - Europa	S	X	✓

Tabla 7. Protocolos de amplificación aplicables a los MR de SARS CoV-2

ARN genómico

Se empleo un extracto de RNA obtenido a partir de un cultivo celular de SARS CoV-2 suministrado por el INS para verificación de la viabilidad de primers y sondas de los métodos mencionados anteriormente para qPCR y ddPCR previo a los ensayos de validación de métodos.

Mezclas de reacción PCR

Las reacciones de PCR fueron preparadas a partir de Kit's para PCR de la casa comercial BioRad. Cada mezcla presenta los componentes necesarios para la ejecución de un ensayo por PCR en un único vial, variando su composición de primers y sondas de la diana de detección a estudiar, según la técnica empleada. En la Tabla 8 se resume las mezclas de PCR empleadas y el uso dado en la ejecución de ensayos.

Reactivo	Catalogo	Función	Técnica	Uso
Script Reverse Transcription Supermix	BioRad, Cat 1708841	Síntesis de cDNA	RT-qPCR en dos pasos	Verificación de métodos
iTaq Universal Probes Supermix	BioRad, Cat 1725131	Reacción de qPCR por sondas		Verificación de métodos
iTaq Universal Probes One-Step Kit	BioRad, Cat 1725141	Síntesis de cDNA y amplificación por PCR con sondas	RT-qPCR en un único paso o OneStep	Validación de ensayos y caracterización de MR's.
ddPCR SuperMix for Probes	BioRad, Cat 186310	Amplificación de cDNA por ddPCR	RT-ddPCR en dos pasos, empleado el cDNA como plantilla	Verificación de métodos
One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes	BioRad, Cat 1864021	Síntesis de cDNA y Amplificación con Sondas	RT-ddPCR OneStep	Validación de ensayos y caracterización de MR's.

Tabla 8. Mezclas de reacción empleadas para el desarrollo de actividades experimentales.

Para la técnica de **ddPCR** es necesario emplear reactivos para la generación de la emulsión o gotas que permitan la compartimentalización de la muestra. En nuestro caso se utilizó el aceite

generador de gotas Oil for Probes *Cat:1863005*, Cartuchos droplet generator DG8 Cartridge & gasket *Cat:1864007*, y aceite para lectura de gotas dPCR Droplet Reader Oil *Cat:1863004*.

Por otra parte, se empleo el buffer citrato pH 6.4 (Invitrogen, AM 7001) para la dilución de los MR producidos y como solución de almacenamiento. Adicional a esto se empleo ARN humano de la línea human T-Cell Leukemia total RNA como agente fortificante de las muestras, con el fin de simular la matriz de una muestra humana. (Invitrogen, AM7858).

Dianas de detección

Se emplearon un total de siete dianas de detección para validación de métodos por PCR y caracterización de los MR producidos, siendo estos los métodos con mayor distribución de uso por los laboratorios. Los primers y sondas seleccionadas fueron sintetizados y purificados mediante HPLC por Biosearch Technologies, Petaluma, CA, United States. Se realizó la preparación de soluciones de almacenamiento en buffer TE 1X para primers y sondas en una concentración de 100 μ M, a partir las soluciones de almacenamiento se realizaron diluciones de trabajo en 20 μ M para Primer y 10 μ M para sondas. En la Tabla 9. se muestra la secuencia de oligonucleótidos y el gen asociado a los métodos seleccionados.

Equipos e instrumentos

La preparación de muestras, dilución de materiales y mezclas de reacción por PCR fue realizada de forma gravimétrica empleado la balanza Sartorius MSA 225.

La generación y lectura de gotas para la técnica de ddPCR se empleo el sistema de PCR digital en gotas QX200 BioRad *Cat:186-4003*. La amplificación de fragmentos mediante RT-qPCR y RT-ddPCR se realizó en un termociclador CFX96 touch deep well C1000/S1000™ (Bio-Rad), las reacciones de amplificación fueron realizadas en placas de PCR y selladas mediante el PX1 PCR Plate Sealer *Cat:1814000*. El procedimiento para la ejecución de ensayos por ddPCR es descrita en la sección 1.4.2: *Métodos basados en ácidos nucleicos*.

Como parte de la validación de métodos por RT-qPCR se realizó un estudio de equivalencia inter-plataforma, por lo que se empleó el termociclador FAST 7500 PCR System, Applied Biosystems *Cat:4351107*.

*BHQ1- Black hole quenchers, FAM- Fluoresceína, HEX-Hexacloro fluoresceína

Diana-Gen	Nombre/Código	Secuencia (5'-3')	Tamaño (nt)	Amplicon (nt)	Ref.
E	E_Sarbeco_F	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT	26	113	[9]
	E_Sarbeco_R	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A	26		
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-BHQ	26		
E	E-INM-F	CTTGCTTTGCTGGTATTCTTG	21	86	-
	E-INM-R	ACGTTAACAATATTGCAGCA	20		
	E-INM-P	FAM-CCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGT-BHQ	26		
Spike	S-F	F 5'-GACATACCCATTGGTGCAGG-3'	20	83	[11]
	S-R	5'-TGACTAGCTACACTACGTGCC-3'	21		
	S-P	5'-FAM-AGACTCAGACTAATTCTCCTCGGCG-TAMRA-3'	25		
N	N-China-F	GGG GAA CTT CTC CTG CTA GAA T	22	99	[9]
	N-China-R	CAG ACA TTT TGC TCT CAA GCT G	22		
	N-China-P	FAM-TTG CTG CTG CTT GAC AGA TT-BHQ	20		
N	2019-nCoV_N2-F	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	20	67	[11]
	2019-nCoV_N2-R	GCG CGA CAT TCC GAA GAA	18		
	2019-nCoV_N2-P	FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ	23		
RdRp	RdRp_SARSr-F	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG	22	100	[11]
	RdRp_SARSr-R	CAAATGTTAAAAACTATTAGCATA	26		
	RdRp_SARSr-P2	HEX-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BHQ	25		
RNasaP	RP-F	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	19	65	[11]
	RP-R	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	20		
	RP-P	HEX- TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ	23		

Tabla 9. Dianas de amplificación seleccionados para la validación y caracterización de MR.

3.1.2 Verificación de métodos de detección de SARS CoV-2 por PCR

A partir de los protocolos emitidos por centros de investigación, avalados por la OMS e implementados por el INS, se seleccionaron los principales métodos de amplificación usados para la detección de SARS CoV-2 por PCR en Colombia. Se procedió inicialmente a verificar los métodos descritos en La Tabla 9, cuyo objeto era establecer por un lado que los primers y sondas seleccionados presentarán amplificación positiva en las regiones de interés y tamaños de amplimeros esperados, y por otro lado establecer las condiciones de partida para iniciar el proceso de optimización por PCR digital. Cada uno de estos métodos fue optimizado y validado en las técnicas de qPCR y ddPCR.

Por otro lado, dadas las continuas mutaciones del virus y considerando su importancia en la efectividad de los métodos de detección por PCR, se verificó si dichas mutaciones pudiesen llegar a afectar las secuencias de hibridación de primer y sondas para cada uno de los métodos seleccionados (Tabla 9) mediante un Alineamiento Múltiple con la metodología ClustalΩ. Se seleccionaron ocho (8) variantes de interés actual y se comprobó la complementariedad que presentan los oligonucleótidos de los métodos seleccionados frente a las secuencias de las variantes escogidas, La Tabla 10, resume la información acerca de las variantes y La Figura 17 resume el procedimiento para la verificación de hibridación de los primers y sondas seleccionadas.

Figura 17. Esquema para la verificación de variación de regiones de las dianas de amplificación seleccionadas.



Tabla 10. Variantes de interés actual seleccionadas para la verificación in-silico de protocolos por PCR mediante alineamiento múltiple.

Cepa-SARS CoV-2	Clasificación OMS	GeneBank acceso
SARS CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	Reference Genome	(NC_045512.2)
hCoV-19/SouthAfrica/NICD-N21442/2021	B.1.1.529 (Omicron)	OL672836.1
hCoV-19/Colombia/MAG-UCCSMR-VG419/2021	Mu-H)	MZ849085.1
hCoV-19/Peru/LIM-UPCH-0942/2021	21G - Lambda	OL522357.1
hCoV-19/SouthAfrica/CERI-KRISP-K026946/2021	20H – Beta 2	OD942210.1
hCoV-19/Slovakia/UVZ_PL36_F7_17921/2021	21A – Delta	OV022505.1
hCoV-19/USA/CA-CDC-FG-174691/2021	21I – Delta	MZ741406.1
hCoV-19/Japan/PG-94107/2021	20I Alpha, V1	MW626456.1
hCoV-19/Guyana/GPR0359361/2021	20J Gamma, V3	MW887946.1
hCoV-19/Aruba/AW-RIVM-66022/2021	21A - Delta	MZ637375.1

A continuación, se describe el proceso de verificación por PCR de los protocolos de detección de SARS CoV-2 seleccionados, los kit de PCR mencionados son descritos en La Tabla 10.

3.1.2.1 Verificación de métodos por qPCR

Verificación de protocolos por RT-qPCR en dos pasos

Inicialmente se partió con la preparación de una mezcla de reacción para la Síntesis de cDNA mediante el kit Script Reverse Transcription Supermix descrito en la sección 3.1.1 *Mezclas de reacción PCR*, la mezcla contenía 40 µL de RNA SARS CoV-2 suministrado por el INS, 16 µL de iScript Mix, 4µL de iScript Reverse Transcriptase, y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 80µL. El perfil de amplificación de la reacción consistió en hibridación por 5 minutos a 25°C, seguido de una etapa de transcripción inversa por 20 minutos a 46°C, finalmente una etapa de desactivación de la enzima por 1 minuto a 95°C.

La segunda etapa del procedimiento es la amplificación por PCR de los fragmentos deseados a partir del cDNA generado, utilizando el kit iTaq Universal Probes Supermix, con las condiciones recomendadas por el fabricante: 1µL de cDNA de SARS CoV-2, primer directo y reverso con concentración final de 600 nM, sondas con concentración final de 200 nM y agua libre de

nucleasas en el buffer de reacción suministrado por el kit hasta un volumen final de 11 μ L. La reacción se inició con la activación de la polimerasa a 95 $^{\circ}$ C por 30 segundos, seguida de una segunda etapa de 45 ciclos a 95 $^{\circ}$ C por 10s seguido del anillamiento y extensión a 58 $^{\circ}$ C durante 30s, una tercera etapa de inactivación de la enzima a 98 $^{\circ}$ C por 30s, Finalizando con una etapa de enfriamiento de 4 $^{\circ}$ C.

Verificación de protocolos por RT-qPCR en un paso

Se realizó la verificación de la amplificación empleado un método con retro-transcripción y amplificación por PCR en un único paso mediante el kit iTaq Universal Probes One-Step Kit. Las mezclas de reacción contenían 2 μ L de RNA de SARS CoV-2, una concentración final de 800nM de primer reverso, 600nM para el primer directo, una concentración de 300nM de sonda, una concentración de 1X para el Buffer iTaq Universal, y 1X para la Enzima Transcriptasa inversa iScript. Se utilizó agua estéril y libre de nucleasas para a un volumen de reacción final de 11 μ L. El ciclaje utilizado fue: una primera etapa de Transcripción inversa a 50 $^{\circ}$ C por 10 minutos, una segunda etapa de activación de la polimerasa a 95 $^{\circ}$ C por 60s, una tercera etapa de amplificación de 40 ciclos a 95 $^{\circ}$ C por 10s y 56 $^{\circ}$ C por 30s, finalizando, con una etapa de terminación por

3.1.2.2 Verificación de métodos por ddPCR

Verificación de protocolos por RT-ddPCR en dos pasos

Se siguió la misma ruta de verificación empleada para RT-qPCR, iniciando con la obtención de cDNA empleando el mismo método en 3.1.2.1, seguido de la amplificación del cDNA mediante ddPCR empleando el kit *ddPCR SuperMix for Probes*. La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes: 4 μ L de cDNA de SARS CoV-2, una concentración de primer de 600nM, y una concentración de Sonda de 300nM. Se empleo el buffer de reacción presente en el kit a una concentración final de 1X y agua libre de RNasas y DNasas hasta un volumen final de 22 μ L. El protocolo de amplificación empleado consto de una primera etapa de activación de la enzima

a 95°C por 10 minutos, seguido de una etapa de amplificación por 40 ciclos con denaturación a 94°C por 30s, hibridación a 60°C por 1min, finalizando con una inactivación de la enzima a 98°C por 10 min. Se empleó una rampa de calentamiento de 2°C/s.

Verificación de protocolos por RT-ddPCR en un paso.

Se continuó con la verificación de los métodos empleando una reacción para la generación de cDNA y amplificación en un único paso para RT-ddPCR, mediante el uso del kit *One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes*. La mezcla de reacción empleada para la amplificación RT-ddPCR de un único paso constaba de 4µL de RNA de SARS CoV-2, una concentración de primer reverso de 900nM, el primer directo de 800nM, y 300nM para la sonda. El buffer Supermix RT-ddPCR oneStep presente en el kit a una concentración final de 1X, la enzima Transcriptasa Inversa a una concentración de 20U/µL, y 15mM de DTT. La mezcla se llevó a un volumen final de 22 µL con agua libre de RNasas y DNasas.

El perfil de aplicación empleado en el termociclador inicia con la etapa de Retro-transcripción a 50°C por 60 minutos, seguido de una segunda etapa de activación de la enzima a 95°C por 10 minutos. La tercera etapa de amplificación correspondió en 45 ciclos a 95°C por 15s, seguido de 30s a 56°C como temperatura de anillamiento. Finalizando con la etapa de inactivación de la enzima a 98°C por 10 minutos, la rampa de calentamiento empleado fue de 0.5°C/s.

Para todos los ensayos de ddPCR la generación de gotas se realizó empleando un cartucho, al cual se adicionaron 21 µL de la mezcla de reacción con 70 µL de aceite y se transfirieron 41 µL de la suspensión de gotas a la placa de ddPCR. Esta fue sellada al calor con una lámina perforable y dispuesta en el termociclador para amplificación de los fragmentos. Las Figuras 8, 9 y 10 describen el procedimiento para la realización de un ensayo de ddPCR.

Evaluación productos amplificación

La visualización de los productos y tamaño de los amplicones generados para cada uno de los genes seleccionados se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa Molecular Biology Agarose *Cat: #1613101* de baja electro endosmosis al 2% m/m, utilizando el marcador de carga EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler *Cat:1708353*, la amplificación se llevó cabo a 80V por 1

hora en la cámara *Sub-Cell GT Horizontal Electrophoresis System Cat:1704401*, la fuente *PowerPac Basic Power Supply Cat:1645050* y la visualización de productos mediante el transiluminador Dark Reader DR-89X.

La presencia de dímeros de primer y otros productos no deseados de PCR se evaluó mediante el estudio de curvas de fusión de los productos amplificados. La reacción de qPCR se realizó con la mezcla de reacción descrita en *Verificación de protocolos por RT-PCR* usando SYBR Green como fluoróforo en lugar de sondas, empleado el mismo perfil de amplificación, únicamente adicionando una rampa de calentamiento de 58°C a 95°C (0,1°C/ s) al finalizar la amplificación.

3.1.3 Optimización de métodos por PCR digital

A diferencia de la RT-qPCR, donde los datos son procesados a una curva de amplificación y un valor de C_q, asociado en gran medida a la eficiencia que presente la reacción y el efecto de productos no deseados, inhibidores y contaminantes de la muestra, los métodos por ddPCR obtienen resultados de fluorescencia medida al final de la reacción, lo que prácticamente elimina estos posibles inconvenientes. Sin embargo, depende de una separación óptima entre las poblaciones de particiones positivas y negativas, lo que conlleva intrínsecamente a la optimización experimental de los métodos.

Para la optimización de los métodos se partió de las condiciones empleadas en la verificación de métodos por RT-ddPCR en un único paso. Se empleó la solución de trabajo de ARN de SARS CoV-2 suministrada por el INS, las mezclas de reacción empleadas para la optimización métodos se prepararon gravimétricamente en una Balanza Sartorius MSA 225 con una resolución de 0,01 mg. Se utilizó como control negativo una reacción con todos los componentes de la mezcla de PCR, excepto ARN denominado NTC, el cual se cambió por buffer Citrato 1mM pH 6.4. En La Tabla 11 se muestran los parámetros que se evaluaron en la optimización de los métodos.

Tabla 11. Parámetros evaluados en la optimización de métodos por RT-ddPCR

Parámetro	Valores evaluados	Criterio
Temperatura de anillamiento	58 °C, 56 °C y 54°C.	Resolución y Porcentaje de lluvia
Rampa de Calentamiento	2 °C/s, 0.5 °C/s	Porcentaje de lluvia

La adquisición de datos se realizó utilizando el programa QuantaSoft (BioRad), definiendo el umbral de fluorescencia como un valor entre la fluorescencia de las particiones positivas y negativas, que distingue claramente las poblaciones. El análisis de resultados se realizó mediante el Software R [135] y el software QuantaSoft Analysis PRO para los ensayos tipo multiplex. Se usó un volumen de partición de $0,7726\text{nL} \pm 0,0223\text{nL}$ determinado previamente experimentalmente en el INM, para calcular la concentración de las muestras según la Ecuación 1.

Los parámetros seleccionados como criterios de aceptación fueron: 1) el porcentaje de lluvia en lo gráficos de Amplitud, 2) la resolución obtenida entre las poblaciones positivas y negativas y 3) el porcentaje de compartimentalización. Estos parámetros fueron evaluados con el Software R, utilizando la función desarrollada por Lievens et al [136].

3.1.4 Validación de métodos por PCR

La validación de los métodos por RT-qPCR y RT-ddPCR se realizó teniendo como objetivo su aplicación en la caracterización de los materiales a desarrollar, lo que incluye los estudios de homogeneidad, estabilidad y asignación de valor. Dado a la variedad de protocolos y kit's empleados en la detección de SARS CoV-2, se validaron los ensayos que cubrieran las principales regiones del genoma del virus.

Para desarrollar ese objetivo se realizó una validación intra-laboratorio de los métodos, estimando la concentración en número de copias/ μL de cada uno de los genes en modo simplex para la amplificación por PCR digital, y el valor de Ct asociado a un nivel de concentración determinado mediante RT-qPCR. Se validaron los ensayos a los cuales se les realizó el procedimiento de verificación (Tabla 12). Además se estimó la incertidumbre estándar combinada para el método

de ensayo por RT-ddPCR de cada uno de los genes evaluados, usando los datos de desempeño del método.

Los parámetros de validación evaluados para ambas metodologías se muestran en la Tabla 12:

Tabla 12: Parámetros evaluados en la Validación de métodos por RT-ddPCR

Parámetro	RT-ddPCR		RT-qPCR		Criterio de aceptación
	Número de niveles []	Intervalo copias/ μ L	Número de niveles	Intervalo copias/ μ L	
Intervalo Lineal	7 niveles Triplicado	0.1-4500	6 niveles triplicado	1.6-2.61X10 ⁵	-Coeficiente de variación -Regresión Simple -Prueba de falta de ajuste
Precisión: Repetibilidad	3 niveles Triplicado	Superior, medio e inferior del intervalo lineal	3 niveles triplicado:	Superior, medio e inferior del intervalo lineal	-Análisis de varianzas: Dispersión inferior al 30% como CV.
Precisión: Intermedia Variación en días	3 niveles Triplicado	Superior, medio e inferior del intervalo lineal	3 niveles triplicado	Superior, medio e inferior del intervalo lineal	-Análisis de varianzas: Dispersión inferior al 30% como CV.
Límite de Cuantificación	Nivel más bajo de concentración del intervalo lineal que cumpla con los criterios de precisión				
Límite de Detección	6 niveles Triplicado	2.5 a 0.28	5 niveles 6 replicas	0.2 y 7.1	Amplificación en todas las réplicas, conjunto al menos nueve particiones positivas en replicas. (ddPCR) [137] Menor concentración donde amplifiquen la totalidad de las réplicas. qPCR

3.2 Producción de pilotos y Materiales de Referencia de SARS-CoV-2

Como se mencionó previamente, la producción de un MR contempla como fase previa, un estudio o producción piloto, con el objeto de establecer y optimizar las condiciones para el desarrollo adecuado del propósito establecido.

En este orden de ideas, en el presente trabajo se desarrollaron dos materiales de referencia, cada uno con su estudio piloto, para ser empleados como ítem de ensayo y control positivo en un ensayo de aptitud y en un taller de transferencia técnica respectivamente.

Teniendo en cuenta que las etapas de producción son comunes a los dos materiales y sus pilotos, a continuación, se presenta la descripción detallada de la producción del piloto del material a ser empleado como ítem de ensayo. Las particularidades como la variación en la cantidad de unidades producidas, temperaturas evaluados en los estudios de estabilidad y demás factores de las tres producciones restantes se resumen en Las Tablas 14 y 16; No obstante, cada material tendrá una descripción general del material.

3.2.1 Producción piloto Ítem Ensayo MR SARS-CoV-2

Teniendo en cuenta que el material se requería como ítem para un ensayo de aptitud, donde una vez preparado tendría que ser transportado hasta los laboratorios, donde serían almacenados por una o dos semanas, para luego ser medidos mediante RT-PCR, el estudio piloto se diseñó para establecer las condiciones de preparación, embalaje, transporte, almacenamiento, así como de medición, de manera que fuese adecuado para este propósito por un término de al menos un mes, siendo este el tiempo presupuestado para la ejecución del EA.

Acorde con lo anterior, la producción del piloto se centró en la evaluación de la homogeneidad y la estabilidad del ítem de ensayo por un periodo de 4 semanas a diferentes temperaturas, así como definir actividades no contempladas previamente para el plan de producción.

La producción del piloto consistió en una dilución gravimétrica de la solución de trabajo (SARS ST) preparada a partir del MR RGTM-10169 de NIST, en 3 niveles de concentración nominal

(1000 copias/ μ L, 100 copias/ μ L y 10 copias/ μ L), con el objeto de tener suficientes unidades para evaluar la homogeneidad y estabilidad a corto plazo.

3.2.1.1 Preparación gravimétrica de los niveles seleccionados

8.0 mL de buffer citrato de sodio 1 mM pH 6.5 (Thermofisher AM 7001), se suplementaron con RNA total humano (Invitrogen, AM7858), a una concentración final de 0.5 ng/ μ L de manera que simule las muestras reales donde el RNA viral es extraído junto con RNA humano. Posteriormente se realizó la mezcla de los dos fragmentos que contienen el MR RGTM 10169, la que se diluyó gravimétricamente con el buffer suplementado con RNA total humano hasta obtener soluciones del valor nominal establecido. La Tabla 13. presenta la codificación asignada a cada uno de los niveles preparados.

Tabla 13. Resumen producción piloto Ítem Ensayo MR SARS-CoV-2

Nivel	Concentración nominal (copias/ μ L)	Código	Unidades preparadas
1	1000	MR-N1	22
2	100	MR-N2	22
3	10	MR-N3	24

3.2.1.2 Envasado y etiquetado

El envasado de los diferentes niveles se hizo en viales de 500 μ L de polipropileno con tapa rosca, libres de DNAsas y RNasa, en cada vial se dispensaron 80 μ L de la solución de RNA de SARS CoV-2. Todos los viales empleados para el material se etiquetaron previamente, utilizando etiquetas preimpresas, plastificadas y resistentes a refrigeración, con dimensiones 2 cm de ancho x 1cm de alto.

3.2.1.3 Almacenamiento

El almacenamiento del material se realizó a las temperaturas establecidas en el diseño del estudio de estabilidad: 4°C, -20°C y -70°C durante 30 días en cajas plásticas de almacenamiento.

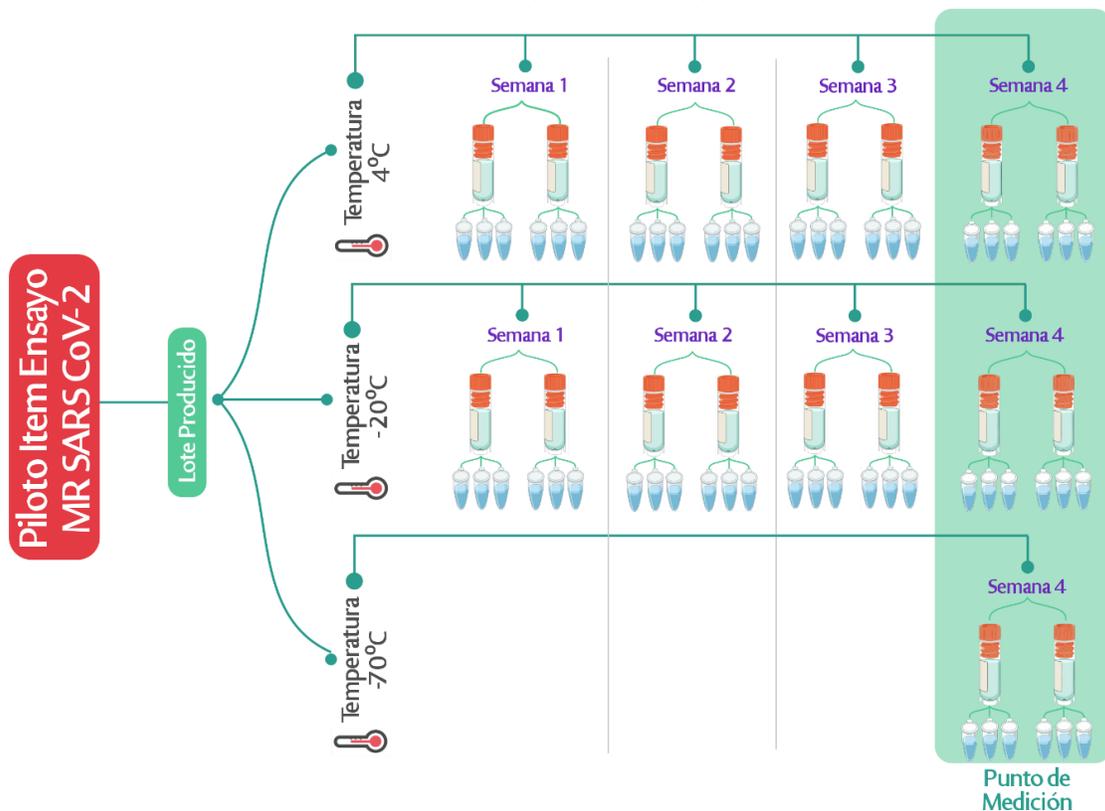
3.2.1.4 Homogeneidad

Para el estudio de homogeneidad se emplearon 3 viales por nivel, según el 10% de la cantidad total del lote acorde con la guía ISO-35, seleccionados mediante un esquema de aleatorización sistemático, y medidos por RT-dPCR y RT-qPCR, por triplicado empleando el ensayo E Charité. La evaluación del grado de heterogeneidad del material se evaluó a través de un análisis de varianza de un factor (Vial), realizando previamente la prueba de Hartley para verificar la homogeneidad de varianzas. El grado de homogeneidad se establecerá a partir de un ANOVA.

3.2.1.5 Estabilidad a corto plazo

Para la evaluación de la estabilidad se empleó un estudio isócrono, evaluando el material en los tres niveles de concentración a 4°C y 20°C, tomando como referencia -70°C. Se midieron 4 puntos en el tiempo en semanas; $t=1$, $t=2$, $t=3$ y $t=4$, por cada punto tiempo/temperatura se midieron dos unidades por triplicado. La evaluación se realizó por RT-ddPCR para los niveles 1 y 2, y por RT-qPCR para los 3 niveles (Figura 18). La evaluación de estabilidad se hizo mediante una regresión lineal simple evaluando la existencia de una correlación entre la variable tiempo y respuesta instrumental y la estimación de incertidumbre asociada a la estabilidad del material mediante la Ecuación 4.

Figura 18. Diseño experimental tipo **isócrono** del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos del piloto de IEA SARS CoV-2.



3.2.1.6 Caracterización

Se empleo un método en un solo laboratorio para hallar el valor de la propiedad, empleado el método de RT-ddPCR validado, la incertidumbre del material está compuesta por el modelo matemático empleado en la estimación y la precisión de los valores concentración obtenida.

3.2.1.7 Asignación de valor

Dado que el material producido es un piloto, se emplearon los datos obtenidos en el estudio de homogeneidad para hallar el valor de la propiedad mediante RT-ddPCR, empleando el gran promedio de las mediciones realizadas, por lo que no se consideró necesario realizar una asignación de valor adicional para calcular de manera independiente el valor de concentración de los niveles preparados. Por otra parte la incertidumbre se estimó por combinación de las incertidumbres asociadas al modelo de medición.

Los experimentos realizados por RT-ddPCR y RT-qPCR, se realizaron empleando el ensayo E Charité previamente validado en ambas técnicas.

3.2.2 Producción normalizada del Ítem de ensayo de Aptitud: Material de Referencia deSARS CoV-2

La Tabla 14. resume las condiciones para la preparación del material a ser empleado como ítem de ensayo, junto a su piloto. Se retoma la información mencionada en el numeral anterior como ejemplo detallado de la preparación.

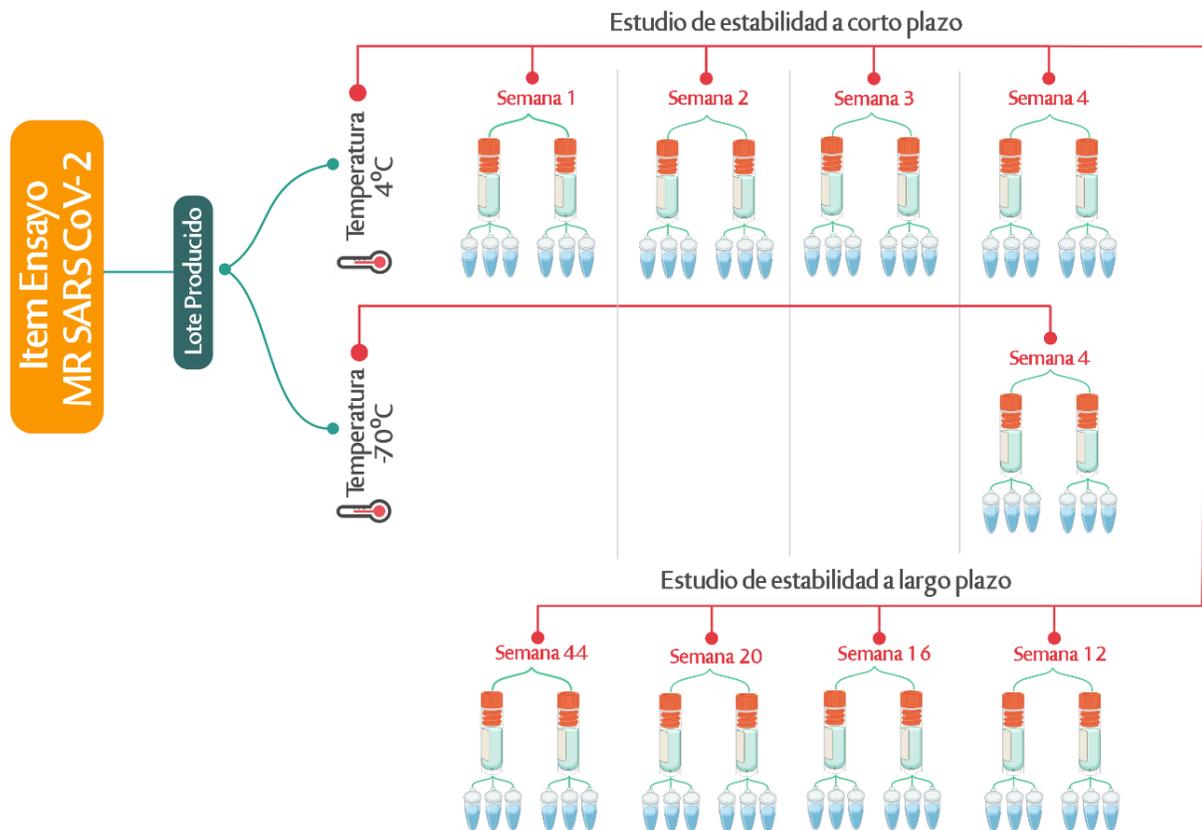
Tabla 14. Resumen producción MR-IEA SARS-CoV-2

Propiedad Material	Piloto Item Ensayo Aptitud	Ítem Ensayo Aptitud
Material de Partida	RGTM - 10169 NIST	RGTM - 10169 NIST
Concentración (copias/ μ L)	3 Niveles de Concentración 1000, 100 y 10 copias/ μ L	3 Niveles de Concentración SARS 1000, 100 y 10 copias/ μ L 2 Blancos: 1: Buffer citrato de sodio 1mM pH 6.4 2: Buffer +RNA humano 0.5 ng/ μ L
Unidades Producidas	22 unidades por nivel	200 unidades por nivel \longrightarrow 200 Paneles Cada panel contiene 5 materiales Uno por nivel de concentración
Envasado Etiquetado	Vial: 500 μ L de Polipropileno Contenido: 80 μ L ARN de SARS CoV-2 Etiquetado: 2cmx1cm	Vial: 500 μ L de Polipropileno Contenido: 80 μ L ARN de SARS CoV-2 Etiquetado: 2cmx1cm Cada panel almacenado en bolsas Mylar aluminizadas
Almacenamiento	4 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -70 $^{\circ}$ C Durante 30 días	4$^{\circ}$C: Paneles para distribución y caracterización -70$^{\circ}$C: Estudios de estabilidad
Homogeneidad	3 unidades por nivel: \longrightarrow Acorde al 10% del total producido	15 unidades por nivel: \longrightarrow Raíz cuadrada # de unidades producido
Estabilidad	18 unidades/nivel Estabilidad a Corto Plazo $t=1,2,3,4$ Semanas Diseño Isócrono RT-qPCR $T_{ref}=-70^{\circ}C$ $T_{est}=-20^{\circ}C$ y 4 $^{\circ}C$	10 unidades/nivel Estabilidad a Corto Plazo Diseño Isocrono $T_{ref}=-70^{\circ}C$ $t=1,2,3,4$ Semanas RT-qPCR $T_{est}=4^{\circ}C$ 8 unidades/nivel Estabilidad a Largo Plazo Diseño Clásico $T_{ref}=-70^{\circ}C$ $t=12,16,24,44$ Semanas RT-qPCR $T_{est}=4^{\circ}C$
Caracterización	Método de un único laboratorio.	Método de un único laboratorio.
Asignación de Valor	Se emplean valores de homogeneidad Incertidumbre a partir de: -Modelo Medición -Homogeneidad -Estabilidad	5 unidades/nivel RT-ddPCR Ensayo E Charite Incertidumbre a partir de: \longrightarrow Valores de Ct para Ensayos restantes RT-qPCR Ensayo E Charite -Modelo Medición -Homogeneidad -Estabilidad

La preparación del IEA-SARS COV-2 se realiza a partir del MR RGTM 10169; específicamente, se preparó una solución stock de trabajo, con una concentración aproximada de 5×10^5 copias/ μ L cuantificada por RT-ddPCR. Para diluir esta solución stock de trabajo, se fortificaron 80 mL de buffer citrato de sodio 1 mM pH 6.4 (Thermofisher AM 7001) con ARN total humano (Células T leucemia – Jurkat Thermofisher AM7858) a una concentración final de 0.5 ng/ μ L.

Posteriormente se diluyó gravimétricamente la solución stock de trabajo del material RGTM 10169 con el buffer fortificado hasta obtener tres soluciones de 20 mL de tres niveles de concentración diferentes, con valor nominal de 1000, 100 y 10 copias/ μL . Por separado, se prepararon dos blancos, uno con buffer citrato fortificado con ARN total humano, y otro únicamente con buffer citrato. Cada nivel de concentración preparado y previa al dispensado de la solución a cada vial, las diluciones se agitaron en un agitador orbital durante 10 minutos para asegurar su homogenización.

Figura 19. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos MR-IEA SARS CoV-2.



En la Figura 19 se muestra el diseño experimental empleado para el estudio de homogeneidad del material. La incertidumbre asociada a la heterogeneidad del material se estableció en un valor igual o inferior al 2%, en función de los resultados obtenidos en el piloto.

La caracterización del material se realizó mediante un método de único laboratorio empleado el ensayo E Charite por RT-ddPCR, por otro lado, se usó qPCR para hallar el valor informativo del material, mediante la obtención de los valores de Ct asociados a cada material, nivel de concentración y ensayo empleado.

3.2.3 Producción piloto del Control Positivo de SARS CoV-2

La producción de un piloto del Material de Referencia a ser utilizado como control positivo, se realizó para brindar información acerca de la evaluación de la homogeneidad y la estabilidad del Material por un periodo de 6 meses a diferentes temperaturas. Además evaluar el uso de un buffer alternativo al empleado en la producción del Piloto de IEA-MR SARS CoV-2, para establecer la aptitud para el fin previsto, y definir actividades no contempladas previamente con el objetivo de optimizar la futura producción normalizada del material.

Teniendo en cuenta que el buffer citrato de sodio, es empleado para el almacenamiento de RNA en solución, en el presente estudio se evaluó la estabilidad de un piloto en buffer citrato pH 6.3 preparado en el laboratorio y de un buffer comercial empleado en la producción del IEA-MR SARS CoV-2, (Thermofisher AM 7001). Se empleó el Material de Referencia EURM-019 del JRC para la producción de ambos pilotos.

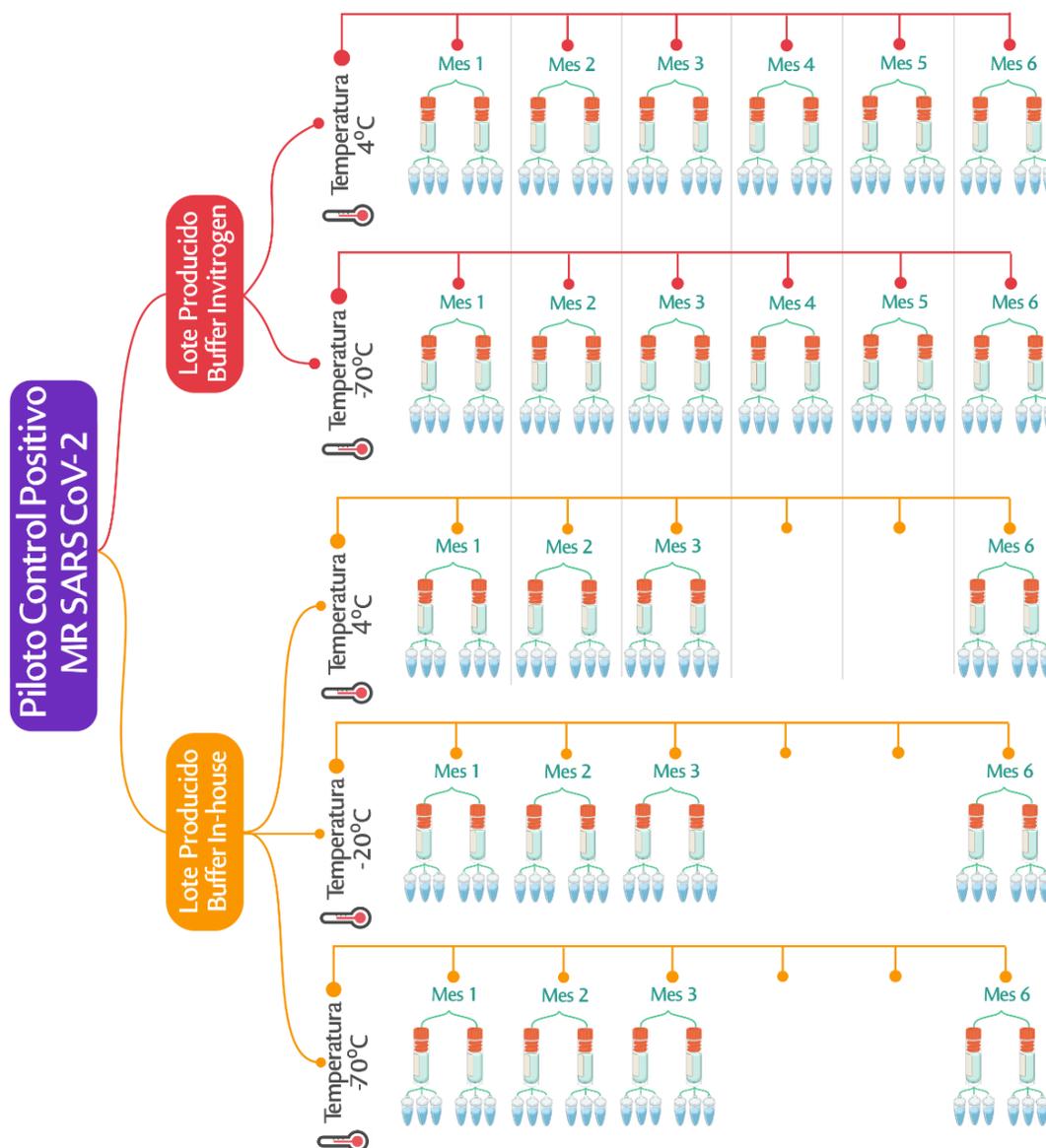
El primer piloto producido inicio con la preparación del buffer Citrato 1.1mM pH 6.3 a partir de Sodio citrato di-hidrato, Merck *Cat:234265*, seguido de un tratamiento con Dietil-piropirocarbonato (FisherScientific, *Cat: 10052140*) durante 24 horas finalizando con un proceso de auto-clavado durante 22 minutos a 105°C, esto con el fin de degradar las enzimas tipo RNAasa y DNAasa.

A partir del buffer citrato de sodio 1.1mM pH 6.3 preparado anteriormente y el MR EURM-19, se realizó una dilución de 4.1mL a una concentración de 1×10^6 copias/ μ L.

El segundo piloto producido se realizó a partir de 15.0 mL de buffer citrato de sodio 1 mM pH 6.5 (Thermofisher AM 7001), el que se fortificó con RNA total humano a una concentración final de 0.5 ng/ μ L. Se diluyó gravimétricamente el material MR EURM-19 con el buffer fortificado hasta obtener soluciones del valor nominal de 1000 copias/ μ L y 10 copias/ μ L.

En La Figura 20 se muestra el diseño experimental para la evaluación de estabilidad a largo plazo para un único nivel de concentración. El diseño utilizado fue similar al utilizada para revisar los demás niveles de concentración evaluados en el estudio de estabilidad.

Figura 20. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos del piloto MR Control Positivo SARS CoV-2.



3.2.4 Producción normalizada del Material de Referencia: Control Positivo SARS-CoV-2

La producción de un control positivo para la medición de SARS-CoV-2 se realizó con el objetivo de ser empleado en un taller de transferencia técnica para la verificación de algunos de los parámetros de desempeño implementados por los laboratorios que realizan detección de SARS CoV-2 por RT-qPCR como la precisión que obtienen en sus mediciones o los Límites de Detección asociados a sus métodos. Adicional a esto, los laboratorios no cuentan con un patrón o estándar de concentración conocida, por lo que puede ser empleado para este fin.

Debido a la variedad de métodos enfocados a distintas dianas de detección que emplean para la detección los laboratorios: E, RdRp, N, M ORF8, S, se decidió usar los materiales de EURM-019 JRC y RGTM10169 NIST con el fin de ampliar la cobertura de los métodos y brindar más alternativas a los laboratorios. La producción del material control positivo de SARS-CoV-2 se realizó acorde a los requisitos de la norma ISO 17034:2016 [86].

3.2.3.1 Dilución gravimétrica de niveles Control Positivo

A partir de los materiales de partida se prepararon dos niveles de concentración así: con el MR RGTM 10169 se prepararon los materiales NIPC-1 y NIPC-3, mientras que con el MR EURM-019 se prepararon los materiales JIPC-1 y JIPC-3. Se diluyeron gravimétricamente los materiales con el buffer citrato de sodio 1 mM pH 6.5 (Thermofisher AM 7001) hasta obtener dos soluciones, en alta y baja concentración. Las diluciones preparadas se agitaron en un orbital durante 40 min para asegurar su homogeneización antes de ser dispensadas en los viales.

En la Tabla 15. se muestra el resumen de la producción de los materiales y la cantidad de unidades por nivel de concentración.

Tabla 15. Resumen producción Control Positivo MR SARS-CoV-2

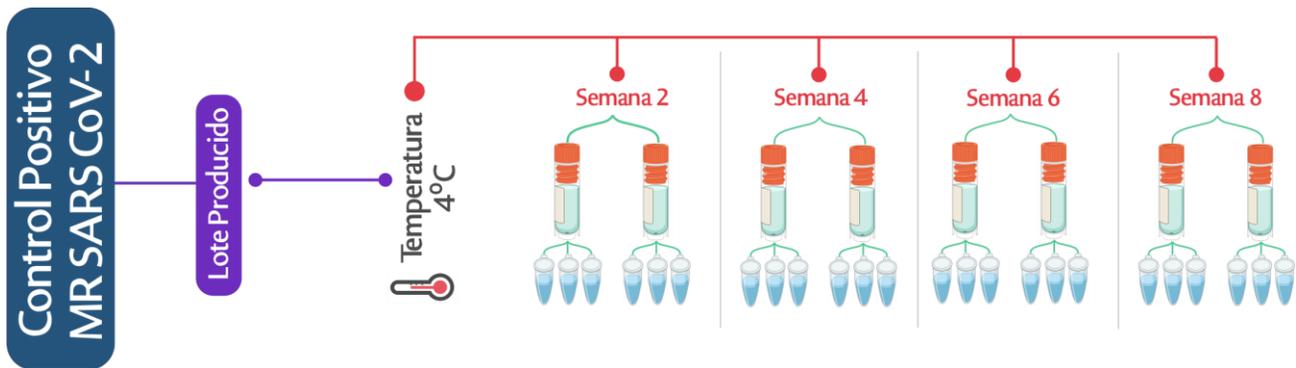
Material	Concentración	Unidades preparadas
NIPC-1	Alta	65
NIPC-3	Baja	65
JIPC-1	Alta	65
JIPC-3	Baja	65

NTC	Control negativo / Diluyente	65
-----	------------------------------	----

Los viales se empaclaron en paneles conformados por 5 viales compuestos por los cuatro niveles preparados, NIPC-1, NIPC-3, JIPC-1 y JIPC-3 y buffer citrato 1mM (NTC). La selección de los viales asignados a cada panel se realizó de forma aleatoria. En este empaque los 5 viales que componen cada panel se dispusieron en un soporte plástico para 6 tubos de 500 µl; este soporte plástico se empacó en una bolsa plástica transparente sellada por calor. Finalmente, se empacó en una bolsa aluminizada.

En la Figura 21. se muestra el diseño experimental para uno de los niveles y materiales (NIPC-1, NIPC-3, JIPC-1 y JIPC-3) empleado para en estudio de estabilidad del material. El esquema metodológico es el mismo para los demás niveles de concentración producidos.

Figura 21. Esquema del diseño experimental del estudio de estabilidad a corto plazo para uno de los niveles de concentración producidos Control Positivo MR-SARS CoV-2. El esquema aplica para los materiales NIPC y JIPC.



La Tabla 16. resume las condiciones para la preparación del control positivo, junto con sus pilotos. Se presentan las condiciones de almacenamiento, envasado y caracterización de los materiales producidos, el procedimiento detallado es similar al mencionado para el piloto del IEA-SARS CoV-2

Tabla 16. Resumen producción de Pilotos y MR Control Positivo SARS-CoV-2

Propiedad Material	Piloto Control Positivo	MR Control Positivo SARS CoV-2
Material de Partida	EURM-019 JRC	RGTM - 10169 NIST EURM-019 JRC
Concentración (copias/ μ L)	1 Niveles de Concentración 1×10^6 Buffer In-house	2 Niveles de Concentración 1000 y 10 Buffer Comercial
Unidades Producidas	40 unidades por nivel	2 Niveles de concentración por material de Partida: NIPC-1: 100.000 NIPC-3: 100 JIPC-1: 10.000 JIPC-3: 100 Blanco: Buffer citrato de sodio 1mM pH 6.4
Envasado Etiquetado	Vial: 500 μ L de Polipropileno Contenido: 80 μ L ARN de SARS CoV-2 Etiquetado: 2cmx1cm	65 unidades por nivel \longrightarrow Cada panel contiene 5 materiales Uno por nivel de concentración Vial: 500 μ L de Polipropileno Contenido: 100 μ L ARN de SARS CoV-2 Etiquetado: 2.5cmx1.5cm Cada panel almacenado en bolsas Plástica Sellada al calor.
Almacenamiento	4 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -70 $^{\circ}$ C Durante 6 Meses	4 $^{\circ}$ C: Paneles para distribución y caracterización
Homogeneidad	4 unidades por nivel: \longrightarrow Acorde al 10% del total producido	8 unidades por nivel: \longrightarrow Raíz cuadrada # de unidades producido
Estabilidad	12 unidades/nivel Estabilidad a Largo Plazo $t=1, 2, 3, 4, 5, 6$ Meses Diseño Clásico RT-qPCR $T_{ref}=-70^{\circ}C$ $T_{est}=-20^{\circ}C$ y $4^{\circ}C$	10 unidades/nivel Estabilidad a Largo Plazo $t=2,4,6,8$ Semanas Diseño Clásico RT-qPCR $T_{est}=4^{\circ}C$
Caracterización	Método de un único laboratorio.	Método de un único laboratorio.
Asignación de Valor	Se emplean valores de homogeneidad Incertidumbre a partir de: -Modelo Medición -Homogeneidad -Estabilidad	5 unidades/nivel RT-ddPCR Ensayo E Charite Incertidumbre a partir de: \longrightarrow Valores de Ct para Ensayos restantes RT-qPCR -Modelo Medición -Homogeneidad -Estabilidad

3.3 Actividades de transferencia técnica

3.3.1 Ensayo de Aptitud

Como un ejercicio externo a los laboratorios de la red ampliada para la detección de SARS-CoV-2, se desarrolló un Ensayo de Aptitud, como un ejercicio interlaboratorio, con el objeto de evaluar el desempeño de los laboratorios para la detección del virus SARS-CoV-2 por RT-qPCR. El ejercicio requiere que los laboratorios participantes midan la misma muestra o Ítem de Ensayo de Aptitud (IEA), por lo que la naturaleza y calidad de este debe ser adecuada, de manera que los resultados obtenidos por los laboratorios dependan de su desempeño, y no, como una consecuencia del IEA. En este sentido se empleó el Material Ítem de Ensayo MR-SARS CoV-2, desarrollado en la primera parte para la ejecución del EA, de acuerdo con los requisitos de la norma NTC ISO/IEC 17043:2010 y la NTC ISO 13528:2017.

La organización general de este ensayo de aptitud se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Metrología y el Instituto Nacional de Salud.

A pesar de la naturaleza del diseño del EA siendo este un ejercicio cualitativo, que solo evalúa la detección o no del IEA, se requería asegurar la concentración de las muestras enviadas a los laboratorios para tener certeza en la evaluación realizada a los laboratorios. Es importante mencionar el alcance que se contempló en la evaluación del EA, dado que únicamente se evaluó las etapas de detección por PCR a partir de una solución de ARN de SARS CoV-2, no se contempla la etapa de toma de muestras por alguno de los métodos existentes, o la etapa relacionada con la extracción de la muestra; Si no, únicamente la retrotranscripción del ARN a ADN y su posterior amplificación por técnicas de PCR. Adicional a esto se realizó una evaluación preliminar del comportamiento del material producido en las denominadas plataformas cerradas, que ejecutan un proceso de extracción y amplificación automatizada. El objetivo de esta

evaluación es validar el desempeño del IEA en estas plataformas asegurando que los procesos de extracción realizados por el instrumento no afectan la integridad del MR.

En la Figura 22. se muestra un diagrama que ejemplifica un procedimiento de rutina para la detección de virus mediante PCR, así como de delimitan las actividades del procedimiento que son cubiertas por el EA.

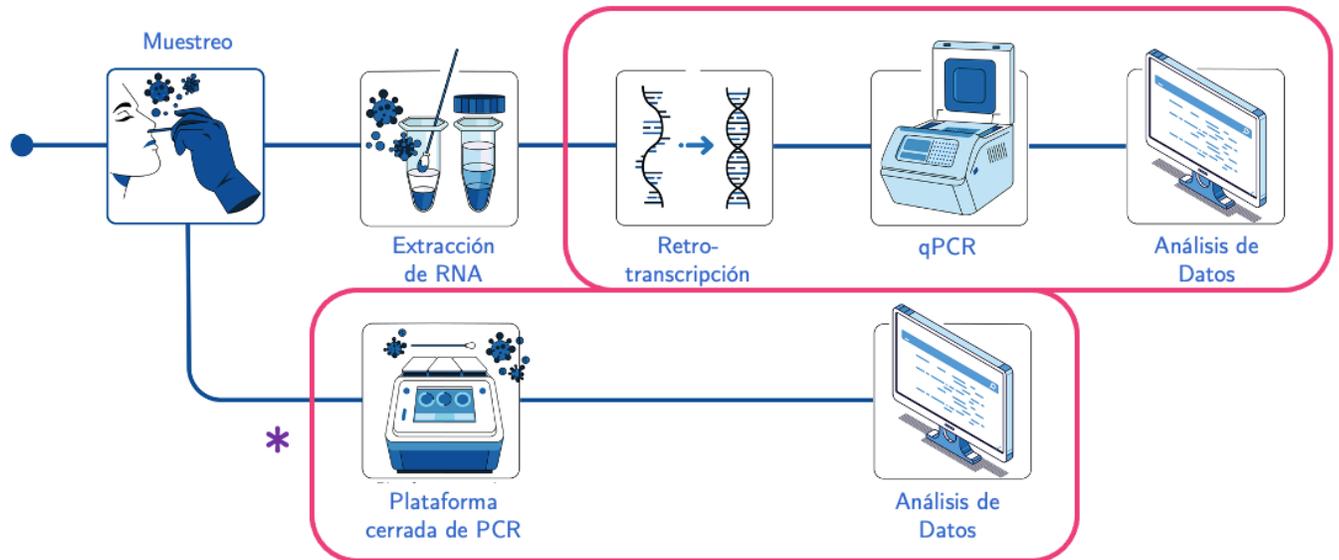


Figura 22. Esquema de cobertura del Ensayo de Aptitud para la detección de SARS CoV-2 mediante RT-qPCR, los recuadros Rosa indican las etapas contempladas para esta actividad. *Las Plataformas cerradas de PCR son aquellas que realizan el proceso de extracción de RNA, Retro-transcripción y amplificación en un único instrumento sin intervención del experimentador.

3.3.2 Taller de Transferencia técnica

Posterior a la ejecución del Ensayo de Aptitud se desarrolló un taller de transferencia técnica para la verificación de algunos de los parámetros de desempeño implementados por los laboratorios a partir del MR Control Positivo SARS CoV-2 descrito en la sección 3.3.4.

El ejercicio se realizó en colaboración con 38 laboratorios, en el que cada uno de ellos recibió un panel de cinco (5) viales, 2 viales marcados como NIPC-1 y NIPC-3 con etiqueta de color amarillo, dos viales marcados como JIPC-1 y JIPC-3 con etiqueta de color rojo, y un blanco

marcado como NTC de color azul. En la Figura 23. Se muestra la presentación del panel enviado a los laboratorios para su análisis.

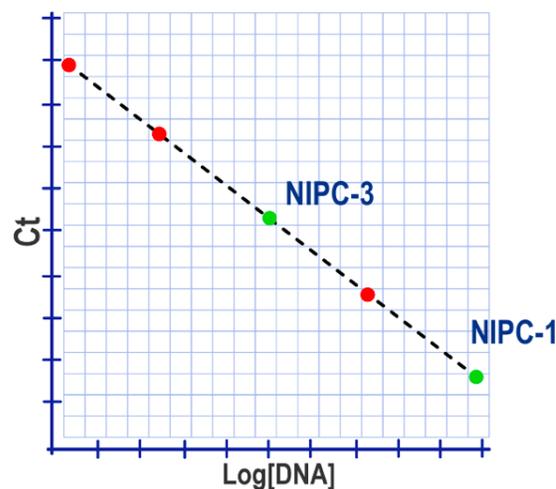


Figura 23. Panel de la actividad de Transferencia, el panel cuenta con 5 materiales de SARS CoV-2 de distinta concentración para la evaluación de parámetros de medición por qPCR. El objetivo del taller era que cada laboratorio participante preparara una curva de calibración que cubra un intervalo amplio de concentración a partir de los materiales suministrados de la siguiente manera:

Si se selecciona el material JIPC, a partir de este preparar una dilución 1:20 y del material JIPC-3 dos diluciones seriadas 1:10. Si se selecciona el material NIPC, a partir de este, preparar dos diluciones seriadas 1:20, y del material NIPC-3 una dilución 1:10.

Las diluciones del material se podían preparar volumétrica o gravimétricamente, dependiendo de las condiciones del laboratorio. En la Figura 24. se muestra la construcción de la curva de calibración a partir del Material NIPC-1 y NIPC-3 donde los puntos rojos son las diluciones a preparar por los laboratorios participantes.

Figura 24. Curva de Calibración ilustrativa a partir del material NIPC



Los laboratorios participantes reportaron los resultados obtenidos, en el un formato digital de captura de datos (Figura 25), el que permitió calcular la eficiencia de la reacción, así como la precisión por repetibilidad para cada uno de los niveles evaluados por gen o diana de detección evaluada, así como parámetros metodológicos como equipos, kits de amplificación y volúmenes empleados en sus ensayos experimentales. Por otro parte el formato permite el reporte de resultados de medición adicionales que sean realizados en el tiempo, funcionando como carta de control de los resultados obtenidos.

Figura 25. Formato de Captura de Datos compartido a los laboratorios para el reporte de los resultados obtenidos en los procesos de medición del taller de transferencia.

INMO Instituto Nacional de Metrología de Colombia		FORMATO PARA INFORME DE RESULTADOS TALLER DE TRANSFERENCIA SARS-CoV-2				INSTITUTO NACIONAL DE SALUD					
RESULTADOS											
SISTEMA DE MEDICIÓN											
1 Información del equipo de medición		2 Tipo de ensayo		3 Información Dianas de Detección			4 Volumen empleado en reacción de				
Plataforma de PCR		Ensayo Nombre / descripción		Número	Nombre	Límite de Detección	Unidades (LOD)	Componente	Volumen (uL)		
Marca / Fabricante	BioRad	Comercial (Kit)	Probes One - Step K	1	E	10	copias/reacción	ARN	5		
Referencia / Modelo	CFX-96	Protocolo in-house		2				Volumen total de reacción	16		
				3							
				4							
				5							
REPORTE INFORMACION DEL MATERIAL SUMINISTRADO											
5		Codigo de muestras (Unidad)				6		Observaciones			
Panel No.	NIPC-1	NIPC-3	JIPC-1	JIPC-3							
P-004	N1-026	N3-023	J1-041	J3-017							
REPORTE DE RESULTADOS GEN E											
7 Tipo de dilución del material			8 Estimación de la concentración				Curva de Calibración				
Materia	Diana de detección	Volumétrica	Avimétrica	Código Vial	Volumen corregido = RNA	Volumen corregido = Buffer	Dilución	Concentración (copias/uL)			
NIPC	E	X		NIPC-2a	4.98	34.80	0.050	8484.7			
				NIPC-2b	4.98	34.80	0.050	423.47			
				NIPC-4	3.80	83.80	0.098	3.247			
9 Datos curva de calibración			Precisión						Resumen resultados		
Nivel	Concentración estimada	Copias en reacción	Replica 1 PCR	replica 2 PCR	replica 3 PCR	Promedio PCR/dí	CV (Repetibilidad)	Pendiente	Intercept	R2	eficiencia (%)
NIPC-1	163019	845035	18.38	18.57	18.63	18.53	0.7%	-3.51	36.96	0.9394	93
NIPC-2	33	165	31.30	31.27	32.03	31.53	1.4%				
NIPC-3	8484.7	42423	23.33	23.30	23.28	23.30	0.1%				
NIPC-4	423.5	2117	27.75	27.76	27.60	27.70	0.3%				
NIPC-5	3.2	16	35.03	35.30	35.30	35.21	0.4%				
$e = 100 \times (10^{-1/\text{eficiencia}} - 1)$											
CARTA DE CONTROL											
Resultados en función del tiempo											
Material	Mez 1	Mez 2	Mez 3	Mez 4	Mez 5	Mez 6					

4. Resultados y discusión

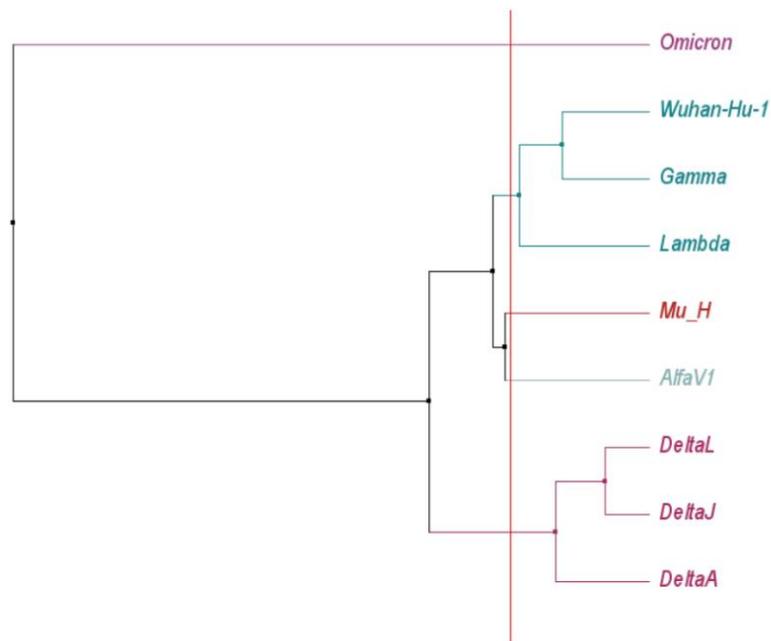
4.1 Verificación de métodos

4.1.1 Verificación in silico de oligonucleótidos

Las secuencias fueron obtenidas en formato FASTA en el NCBI para cada una de las 10 secuencias utilizadas. Por otra parte, a partir del genoma de referencia (NC_045512.2) se identificaron las regiones correspondientes a cada uno de los primers en cada uno de los genes de interés: E, N, RdRp y S, con la ubicación de estos se generaron formatos FASTA individuales con las secuencias de estas regiones para cada uno de los genomas.

Para estimar la cercanía entre las secuencias, se realizó la construcción de un árbol filogenético. Inicialmente se realizó un Alineamiento Múltiple de Secuencias mediante el Software JalView [138], se utilizó ClustalΩ como algoritmo de alineamiento, el MSA se realizó para la región que codifica al gen S en los 10 genomas seleccionados. Los árboles de filogenia generados se muestran en la Figura 26.

Figura 26. Árbol filogenético generado mediante ClustalO para las secuencias del gen S en variantes SARS CoV-2.



En la filogenia se observa un agrupamiento de acuerdo con la identidad, donde se evidencia que la variante Ómicron presenta mayor variabilidad del genoma, o sea mayor distancia respecto a las demás variantes. También se observa como las distintas sub-variantes Delta se agrupan en un solo grupo, mostrando su similitud. El genoma de referencia (Wuhan) se encuentra cercano a las variantes que de menor diversidad. A pesar de esto, es necesario contar con una mayor cantidad de secuencias para establecer un árbol filogenético más robusto [139] para establecer relaciones de mayor profundidad. Sin embargo, se puede concluir que las secuencias seleccionadas para verificar los oligonucleótidos seleccionados son correctas, ya que se presenta una separación por clados de acuerdo con la esperada dada la evolución de las variantes del virus[140].

Después, se realizó la verificación de los primers y sondas asociados a cada uno de los protocolos mediante la herramienta bioinformática EMBOSS Stretcher [141] la que permite calcular una alineación global óptima entre secuencias usando una modificación del algoritmo de programación dinámica. Se realizó el alineamiento entre los oligos y las secuencias asociadas a las regiones que codifican los genes en particular de cada ensayo, utilizando las secuencias complementarias de los primers Reversos, simulando en este caso la obtención de un cDNA. A continuación, se muestran los resultados de los alineamientos generados para cada uno de los protocolos (Figura 27). Se evidencian 5 mutaciones con respecto al genoma de referencia, estas se encuentran principalmente en la variante Omicron y Delta. Debido a la alta variabilidad genética del SARS CoV-2 es un resultado esperado, las mutaciones que presenta son Mutación C → T en la región del Primer F y A → G, T → C, T → A, A → T en la región del primer R. Para las demás variantes el ensayo muestra un alineamiento perfecto, demostrando su idoneidad como ensayo de detección de PCR.

Figura 27. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo E Charite.

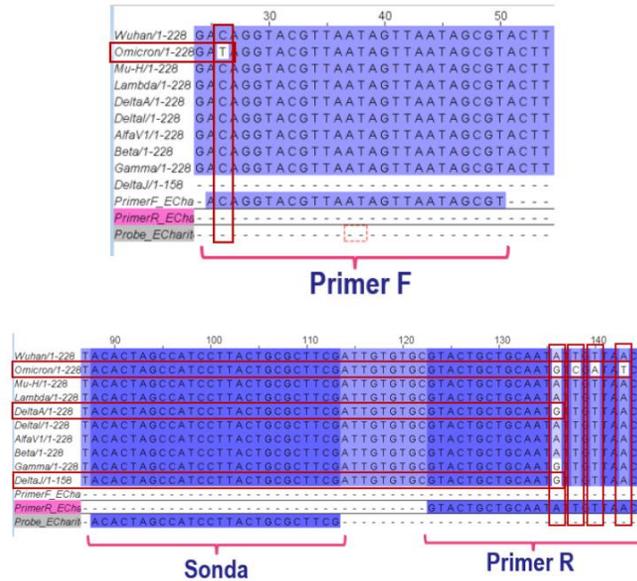
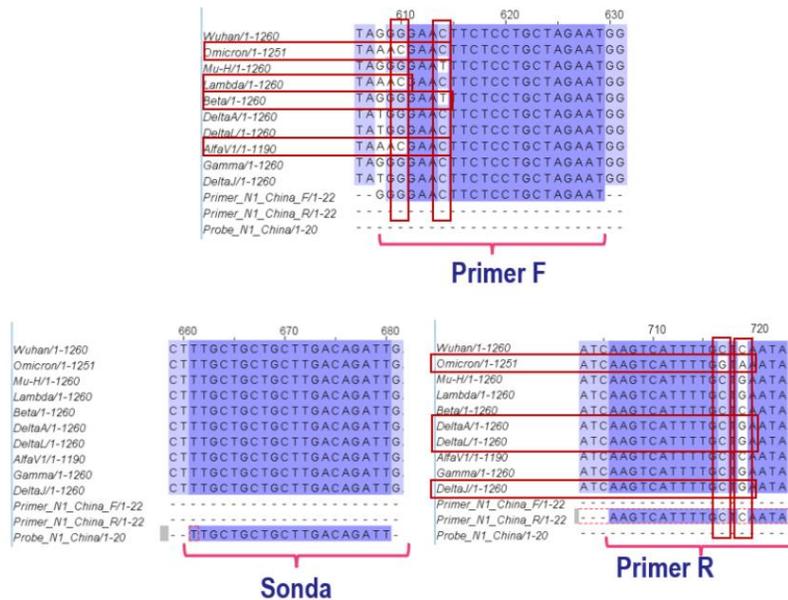


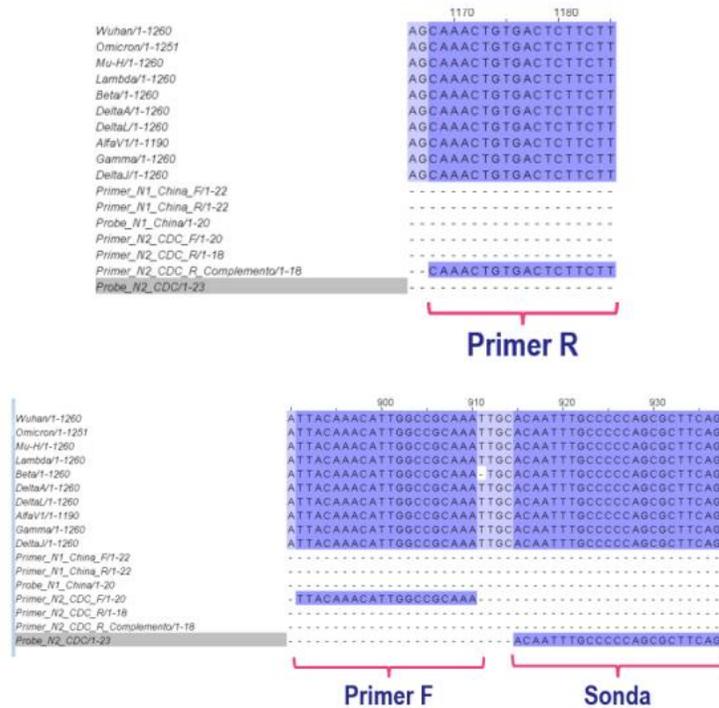
Figura 28. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo N1 (China).



La figura 28. evidencia un comportamiento similar al protocolo E charite, donde las mutaciones se presentan en las variantes ómicron y Delta, Aunque en menor medida lo cual da como indicio

un anillamiento con mayor favorabilidad en una medición por PCR, las mutaciones que presenta son $G \rightarrow C$, $C \rightarrow T$ en la región del Primer F y $C \rightarrow G$, $C \rightarrow A$ para la región del primer R

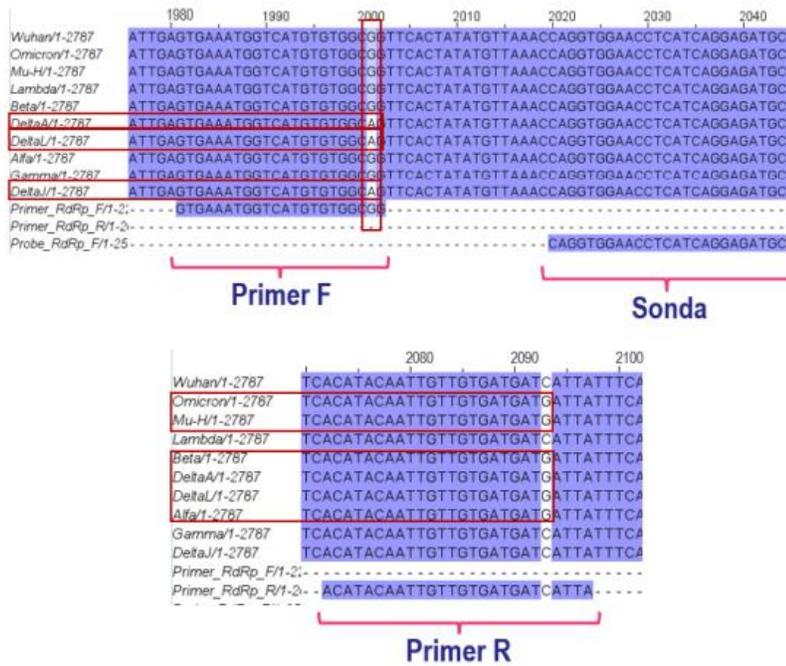
Figura 29. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primers y sondas del protocolo N2-(CDC-USA).



En la Figura 29 se muestra el alineamiento para el Protocolo desarrollado por el CDC de EEUU que amplifica la región del gen N, este a diferencia de los anteriores protocolos presenta un alineamiento total para todas las regiones de primer y sondas, lo que infiere una alta eficiencia en el anillamiento de primer para las variantes estudiadas.

Finalmente, en la Figura 30 se muestra el alineamiento para el protocolo que amplifica en gen RdRp, este presenta un bajo índice de mutaciones en la región estudiada con mutaciones puntuales de $G \rightarrow A$ en la región del primer F y $C \rightarrow G$ en la región del primer R y ambas se encuentran distanciadas de los extremos y sumado a que las mutaciones son en un solo nucleótido por primer es altamente probable en anillamiento de los primer durante la reacción de PCR.

Figura 30. Alineamiento Múltiple de las secuencias analizadas y las secuencias de primer y sondas del protocolo RdRp (Francia)



Al desarrollar las verificaciones de la complementariedad de los oligonucleótidos de primers y sondas utilizados en los principales métodos de detección de SARS CoV-2 frente a la secuencia genómica de algunas de las variantes comunes se evidencia que en algunos casos se presentan mutaciones en estas regiones del tipo SNP's, lo que es relativamente común dado la variabilidad genética que presenta esta familia de virus [142]. La región que codifica a la proteína S presenta un mayor número de variaciones, frente la secuencia complementaria de primer directo o forward (tres cambios), lo que podría afectar el apareamiento de este iniciador al molde de cDNA, o alterar la eficiencia de la reacción de PCR.

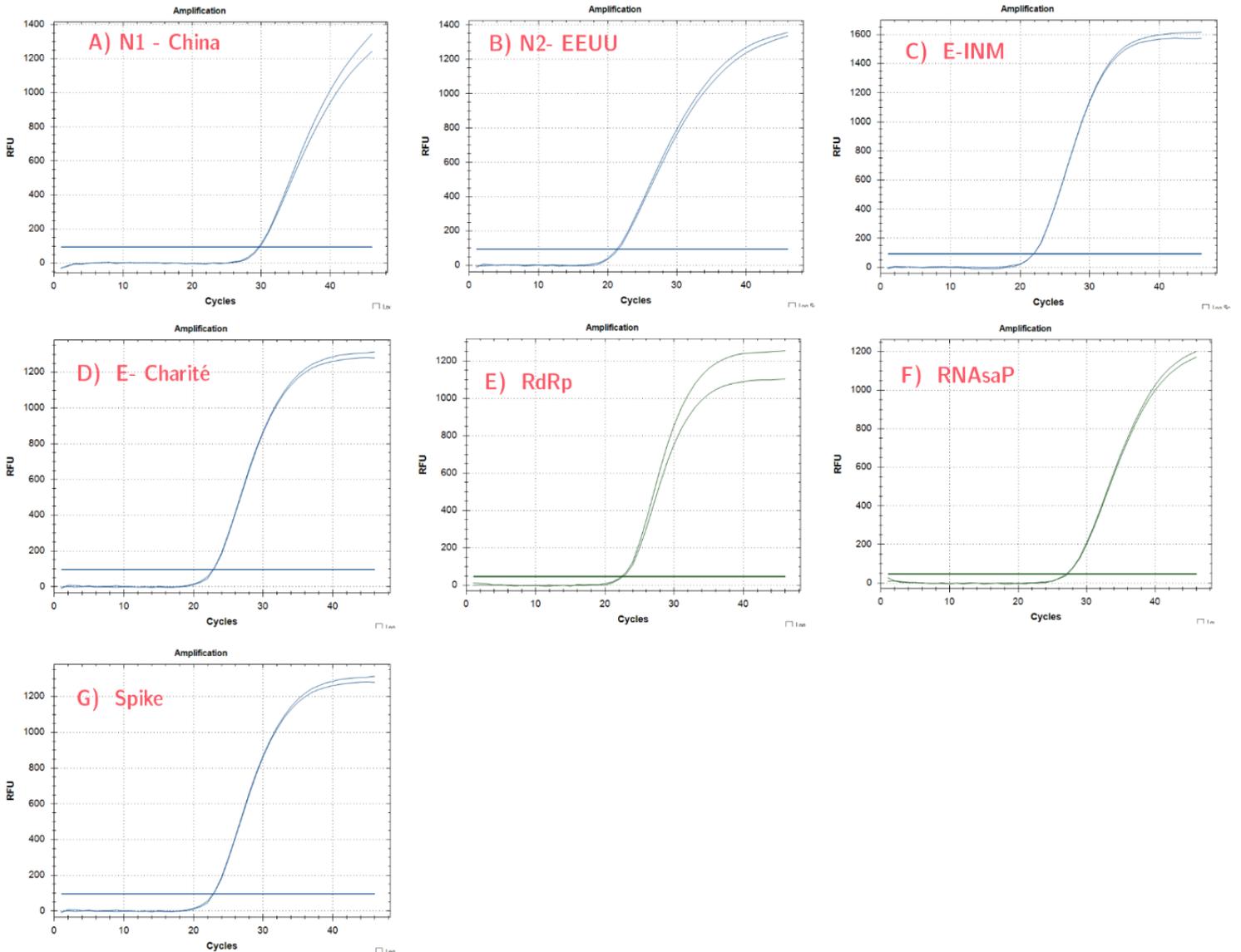
Por otro lado, los ensayos restantes presentan mutaciones tipo SNP's en menor medida, con una mutación. Al ser una mutación puntual, el anillamiento que ocurra en la reacción de PCR es muy probable y funcionaria como una especie de primer degenerado [143].

4.1.2 Verificación de métodos por PCR

Retrotranscripción y amplificación por qPCR en dos pasos

Al verificar los protocolos de qPCR recomendados por la OMS empleando una estrategia de amplificación y obtención de cDNA en dos pasos a partir del extracto de RNA de SARS CoV-2 suministrado por el INS, se observa una amplificación normal de comportamiento exponencial, En la Figura 31 se muestran las curvas de amplificación obtenidas, en azul se muestran los ensayos usando sondas marcadas con FAM y en verde las marcadas con sondas HEX.

Figura 31. Curvas de Amplificación de ensayos por qPCR empleado una metodología de retrotranscripción en dos pasos, para la detección de SARS CoV-2, Se emplea RNA de SARS CoV-2

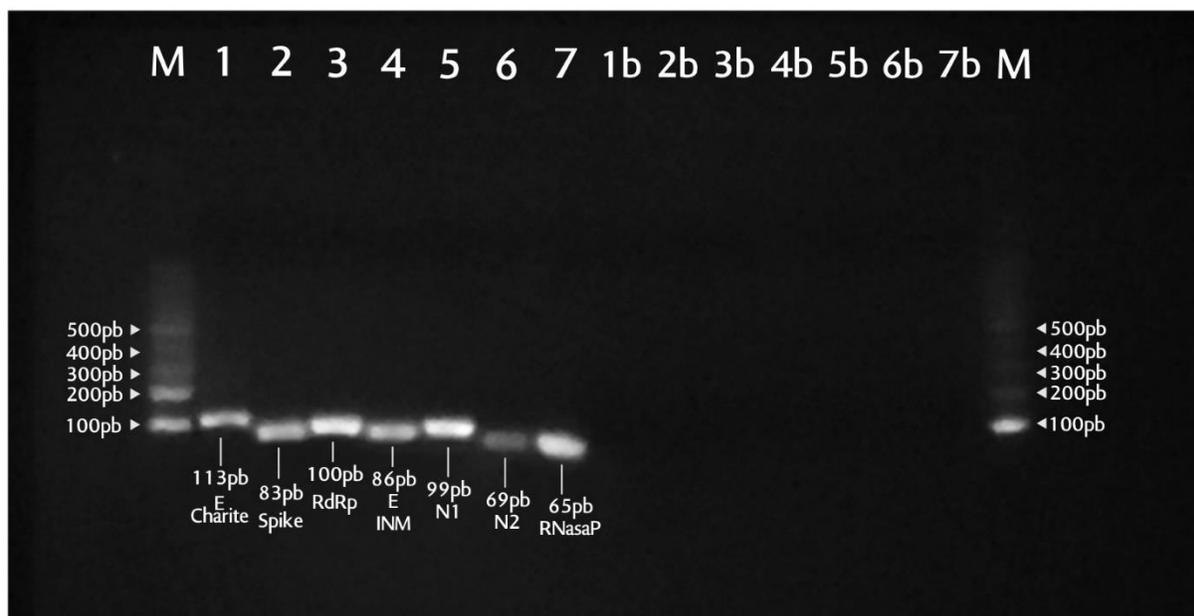


En relación con la fluorescencia máxima obtenida en las curvas de amplificación, la máxima es de 1200 UFR para ambos canales empleados. Los resultados obtenidos permiten soportar el correcto funcionamiento de los ensayos acorde a las condiciones reportadas en los protocolos de cada método.

Visualización de productos de amplificación por electroforesis

A partir de los productos de amplificación se revisaron mediante electroforesis en gel de agarosa, como se muestra en La Figura 32, el tamaño de los fragmentos es el esperado (Tabla 9), evidenciando una amplificación específica para los productos deseados. Los carriles 1-7 de la Figura 32, corresponden a los blancos de reacción de cada ensayo respectivamente, no se evidencian productos residuales o secundarios en los blancos que sean detectables mediante electroforesis.

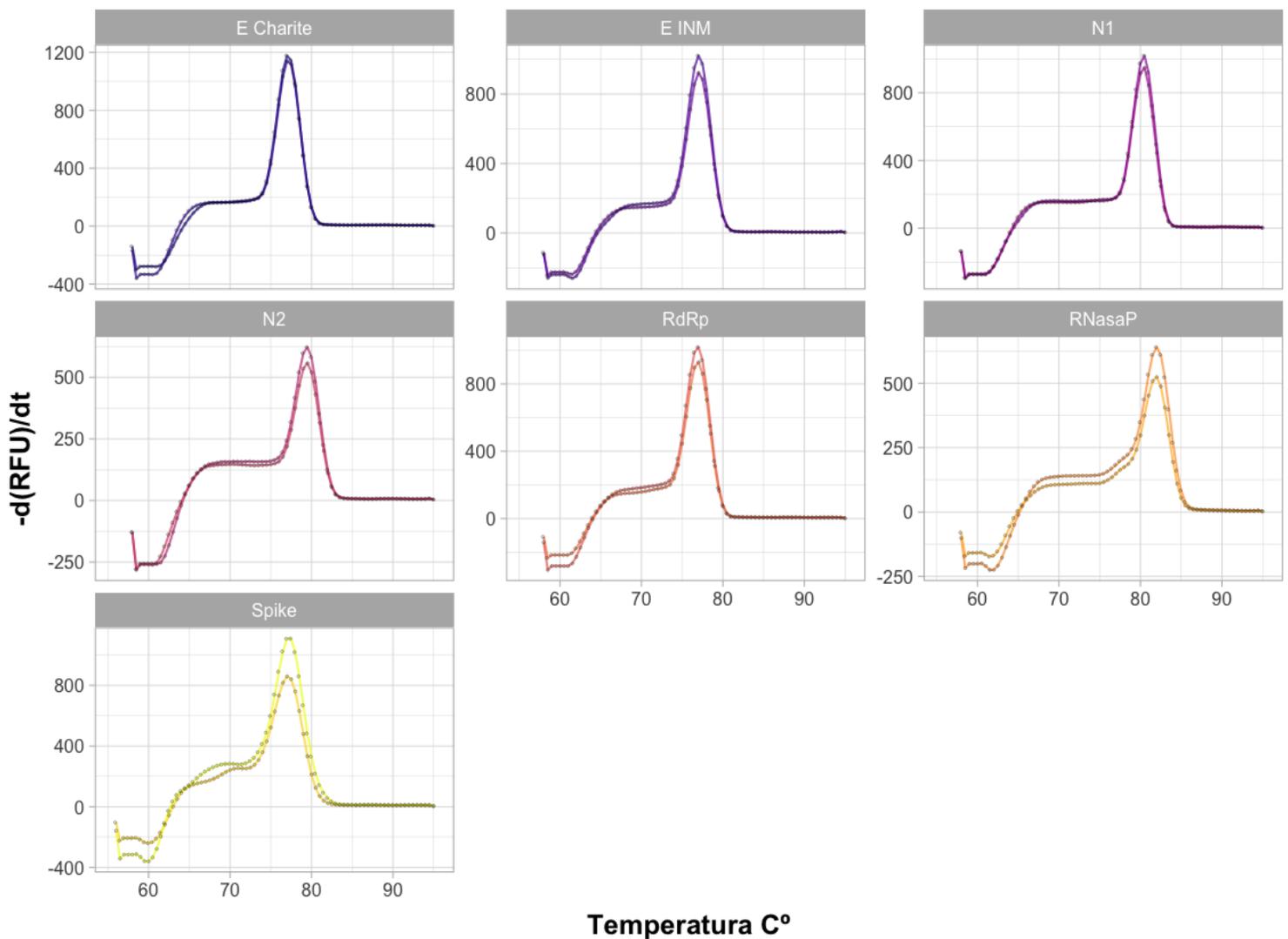
Figura 32. Gel de agarosa con productos de amplificación de SARS CoV-2 por PCR.



De igual manera de construyeron curvas de fusión o melting para cada uno de los ensayos para evidenciar la especificidad del ensayo [144]. Las curvas de fusión se obtuvieron utilizando SYBR® Green como fluoróforo, dada su naturaleza de agente intercalante, lo que hace posible

evidenciar fragmentos de ADN de doble cadena con mayor sensibilidad la obtenida mediante electroforéticas [145]. La particularidad que presentan los ensayos de fusión es la capacidad de obtener la temperatura específica a la cual el 50% del ADN tiene sus hebras separadas de los fragmentos debido al aumento de la temperatura y desestabilización de los puentes de hidrogeno, cada fragmento según su tamaño y naturaleza de los nucleótidos presentará una temperatura específica. La Figura 33. muestra las curvas de fusión obtenidas, con temperaturas de fusión de 77°C (*E Charite*), (*E INM*), (*RdRp*), 80.5°C (*N1-China*), 79.5°C (*N2-CDC*), 82°C (*RNAsaP*) y 77°C (*Spike*).

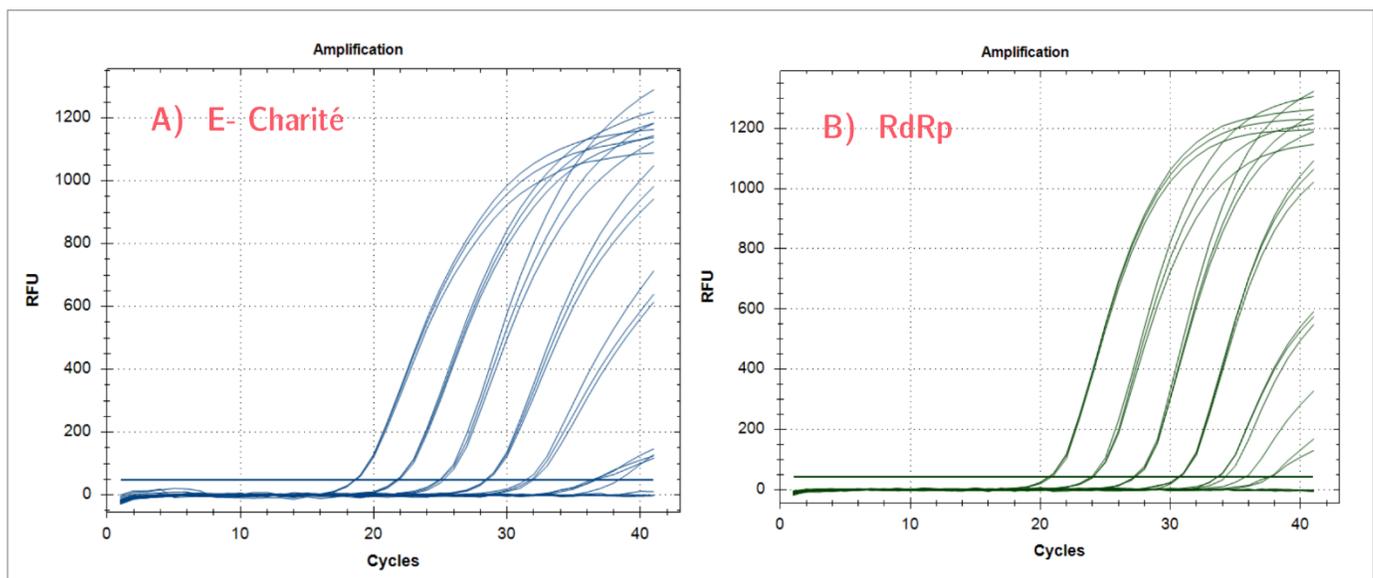
Figura 33. Gel de agarosa con productos de amplificación de SARS CoV-2 por PCR.



Retrotranscripción y amplificación en un paso *OneStep por RT-qPCR*

A partir de los resultados obtenidos en la amplificación en dos pasos (obtención de cDNA y posterior amplificación en experimentos individuales) se realizó el ensayo de verificación del montaje en un único paso empleado el kit iTaq Universal Probes One-Step Kit- Este kit permite la síntesis de cDNA y amplificación en el mismo vial de reacción, Minimizando el tiempo implicado en cada ensayo. En la Figura 34. se muestran dos curvas de amplificación con la diana E Charite y RdRp, cubriendo un intervalo de 2.4×10^5 a 2.5 copias/ μL distribuidos en siete niveles de concentración obtenidos en diluciones seriadas disminuyendo un orden de magnitud en cada una.

Figura 34. Curvas de Amplificación de ensayos por qPCR, para la detección de SARS CoV-2, Se emplea RNA de SARS CoV-2



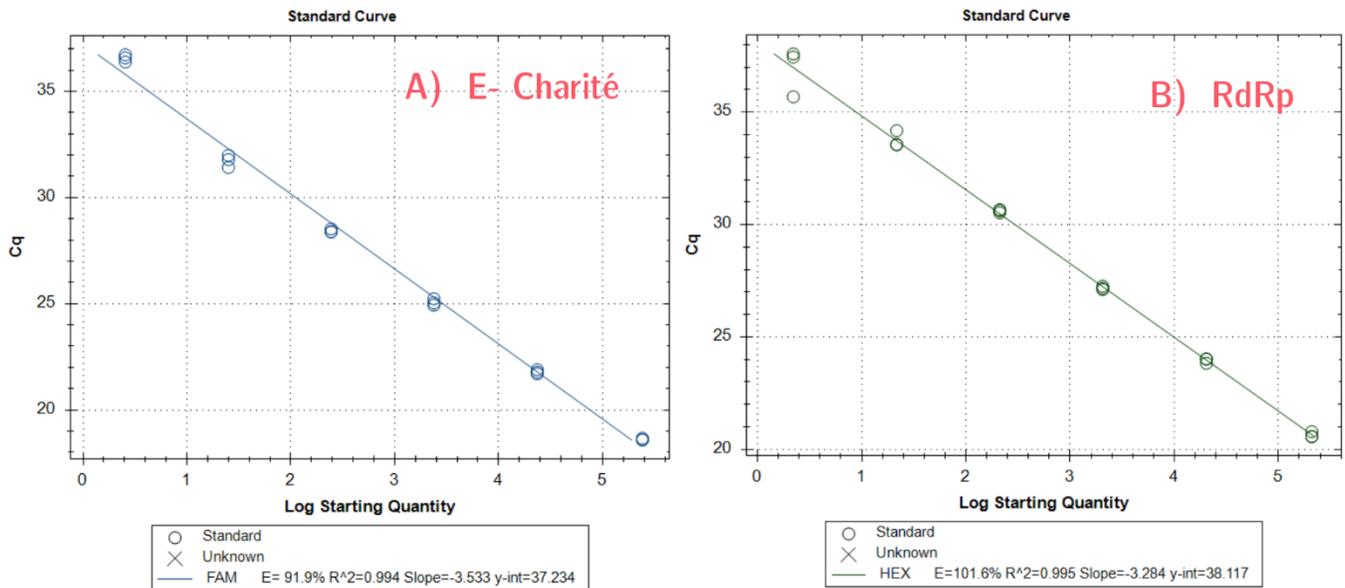
Se observa una amplificación óptima para un ensayo de qPCR, mostrando un comportamiento de amplificación sigmoide, con una disminución de ≈ 3.35 ciclos al disminuir un orden de magnitud en la concentración de las muestras evaluadas. A partir de los valores de C_t obtenidos se construyó una curva de calibración como evaluación preliminar del intervalo lineal, para así obtener información acerca de la eficiencia de la reacción. En la Figura 35 se presentan las curvas

obtenidas, con valores de eficiencia de 91.9% para la diana E Charite y 101.6% para RdRp, obtenidas mediante La Ecuación 6, donde m es la pendiente de la regresión lineal obtenida en las curvas de calibración.

$$\text{Ecuación 6. } \%E = \left(10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} - 1\right) \times 100$$

Los valores de eficiencia se encuentran dentro de los parámetros de un ensayo optimizado de qPCR [146], siendo este un resultado cercano a otros ensayos reportados y de uso común para la detección de SARS CoV-2. Por lo tanto, se concluye que no es necesaria una optimización del método por RT-qPCR, tomando estas condiciones como punto de partida para los ensayos de amplificación por ddPCR.

Figura 35. Curva de amplificación para la evaluación preliminar del intervalo lineal y la eficiencia de la reacción.



Retrotranscripción y amplificación por ddPCR en dos pasos

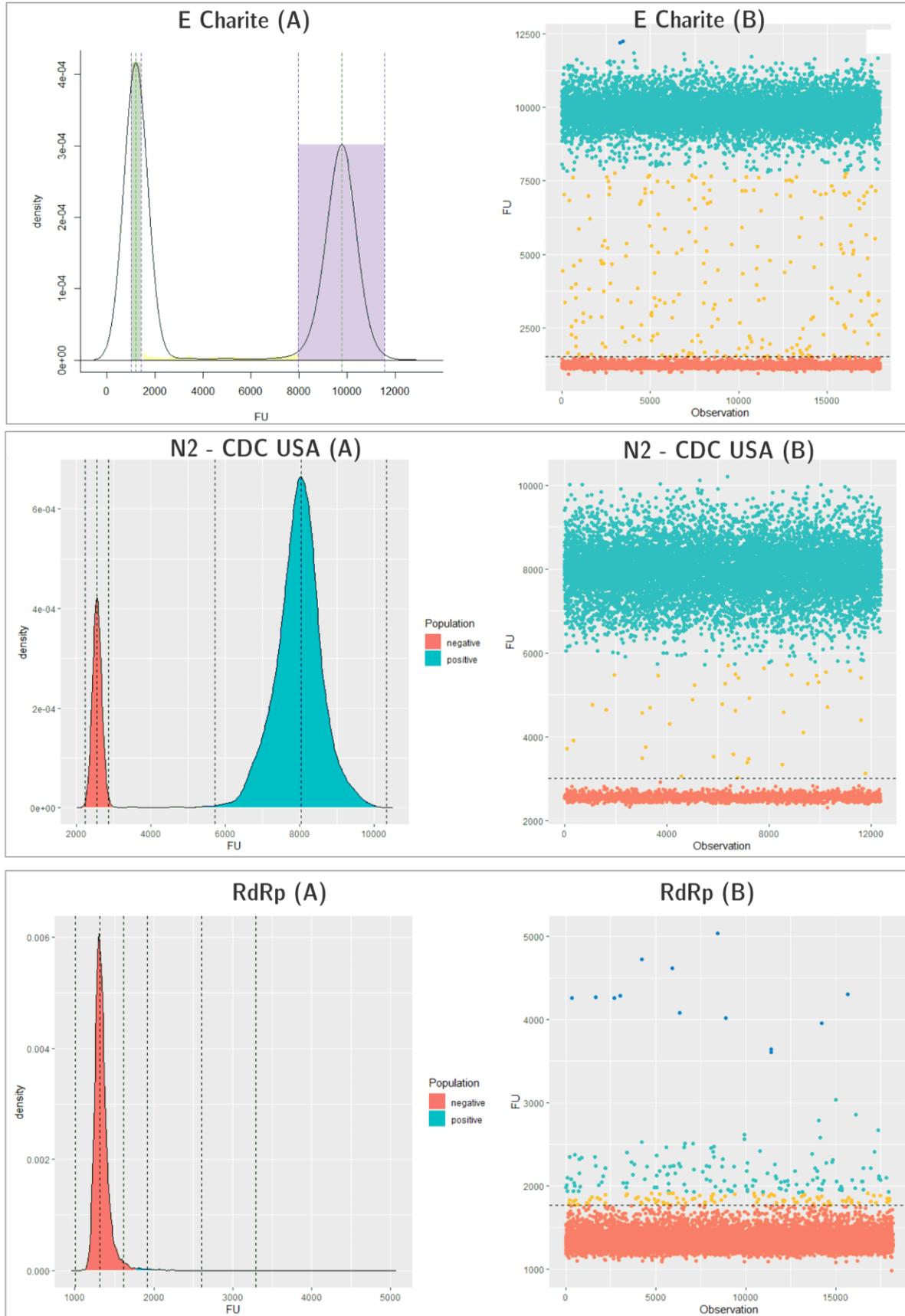
A partir de las condiciones de amplificación empleadas en RT-qPCR se realizó la verificación de métodos de detección de SARS CoV-2 por ddPCR en modo gotas. Inicialmente se partió con un cDNA generado a partir de ARN de SARSCoV-2, que se utilizó como molde de amplificación en la preparación de mezclas y generación de gotas para cada reacción. La verificación se realizó

inicialmente para los ensayos de E Charite, RdRp, N2, la temperatura de anillamiento usada durante el programa de amplificación fue de 58C^o para las tres dianas de detección.

La visualización de resultados por ddPCR se basa en una optima separación de las poblaciones o clusters positivos y negativos, en un esquema visual denominado gráfico de amplitud. En este el eje X se representa el número de particiones leídas por el instrumento y el eje Y representa la señal de fluorescencia asociada a cada una de las particiones. También es común la representación de resultados partir de un histograma de frecuencias en función de la fluorescencia de las particiones, este último siendo de gran ayuda en la designación de un umbral para la separación de las poblaciones positivas y negativas. La Figura 36. muestra los gráficos de amplitud y de frecuencia nombrados A y B respectivamente para la verificación de los ensayos E Charite, RdRp, N2. Las poblaciones Azules representan las amplificaciones positivas en la reacción, las rojas representan las poblaciones de particiones con amplificación negativa, y finalmente los puntos amarillos o lluvia, que representan particiones con reacciones incompletas que al finalizar el programa en el termociclador aun no contienen la misma cantidad de productos de PCR que se esperan. Se pondría considerar una eficiencia menor en la amplificación, ya sea por cADN degradado, una formación irregular de las gotas, o la presencia de inhibidores en la PCR.

Las gráficos de frecuencia, en el caso de ensayos optimizados muestran dos picos con alturas variables en función de la concentración de la muestra, uno para la población de negativos y otro para los positivos, como es el caso de los ensayos realizados para E Charite y N2, donde se evidencia la presencia de dos poblaciones tanto en los gráficos de frecuencia (A, C), como en los gráficos de amplitud (B,D), la separación entre ambas poblaciones es óptima para la cuantificación basado en copias/ μ L para las muestras a analizar.

Figura 36. Gráficos de amplitud (A) y frecuencia (B) para los ensayos preliminar de amplificación por ddPCR para los genes E, N y RdRp.



Sin embargo, para el ensayo enfocado en la diana RdRp, no se presenta un comportamiento de amplificación similar. En este no se presenta la bimodalidad vista anteriormente, Solo se observa un único pico asociado a particiones negativas y puntos sin resolver con valores de fluorescencia cercanos a la población de negativos y que llegan hasta un máximo de 5000 unidades de fluorescencia. Este tipo de resultado está asociado a la necesidad de optimización del método, principalmente el estudio de temperaturas de anillamiento, siendo el factor de mayor impacto en los ensayos por ddPCR [147], [137].

Finalmente, con relación a la lluvia presente en los resultados se observó pocos eventos entre la población de positivos y negativo para los ensayos E Charite, y N2, especialmente en este último, indicando que el ensayo no requiere una etapa de optimización. No obstante, a pesar del bajo número de ampliaciones intermedias (lluvia) para la diana E Charite, esta puede disminuirse a partir de ensayos de temperatura de anillamiento.

4.1.3 Optimización de métodos por ddPCR

Como primer parámetro de optimización, buscando mejorar tanto la separación de las poblaciones, como disminuir la cantidad de lluvia presente en el proceso de amplificación, se evaluó la temperatura de anillamiento para los genes E Charite y RdRp, dando especial atención a estos ensayos debido a que se plantearon como las dianas que serían utilizadas en la caracterización de los Material de Referencia a producir.

Se realizó un gradiente de temperatura en el termociclador cubriendo las temperaturas de 58°C, 56 °C y 54 °C con el fin de determinar las condiciones que permitan una distinción óptima entre las particiones positivas y negativas. Sin embargo, la temperatura de anillamiento también puede influir en la eficiencia de la amplificación [147], teniendo como consecuencia una disminución en la separación entre las poblaciones de positivos y negativos, afectando el rendimiento del ensayo.

La resolución de un ensayo mediante ddPCR es un parámetro equivalente al empleado en ensayos por HPLC, la cual es una medida cuantitativa de la separación de las poblaciones en una separación lineal. Se determina a partir del gráfico de frecuencias tomando la diferencia de

fluorescencia máxima entre los dos picos, dividida por los anchos combinado de los picos. En la Ecuación 7 se muestra la forma de obtención de la resolución en un ensayo por ddPCR [136].

$$\text{Ecuación 7.} \quad R_s = \frac{2 \times (F_p - F_N)}{A_P + A_N}$$

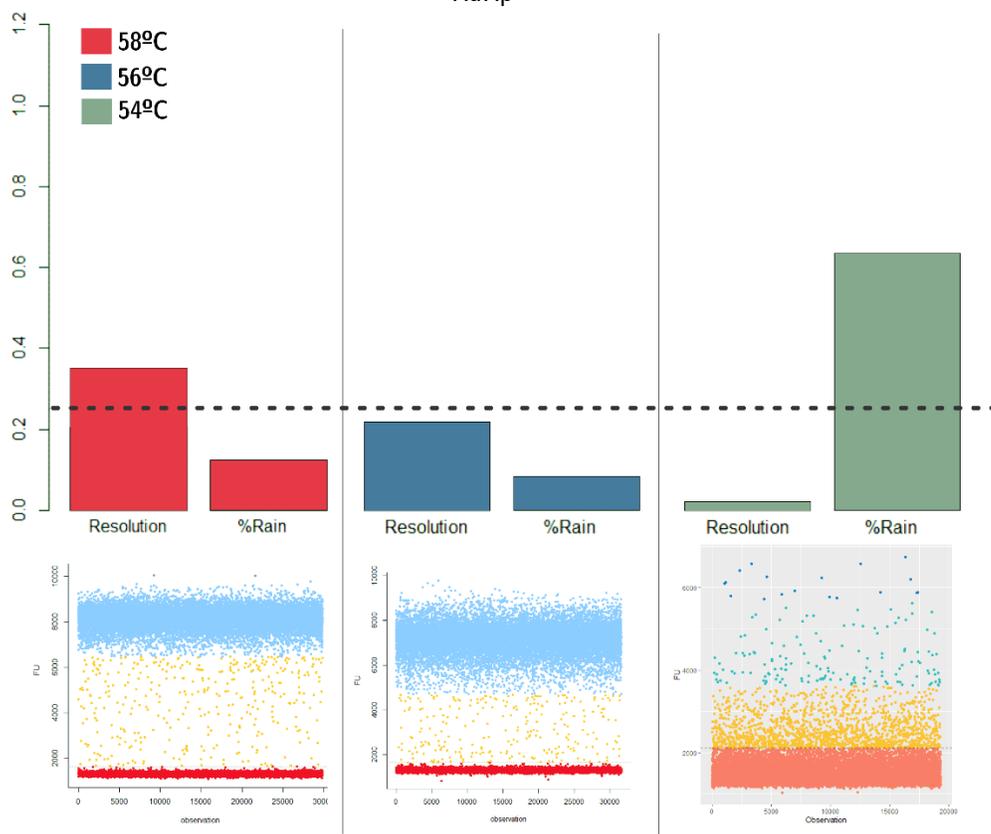
Donde R_s es el valor de resolución, F es el valor de fluorescencia máxima para la población de negativos y positivos y A en ancho de los picos de ambas poblaciones. En la literatura se reporta una valor de $R_s=2.25$ como valor óptimo de resolución óptimo para un ensayo optimizado por ddPCR[136].

El segundo parámetro evaluado en la optimización de métodos es el porcentaje de “lluvia”, el cual fue definido según los autores Lievens et al, como las particiones cuyas lecturas de fluorescencia están entre el valor máximo de fluorescencia para los negativos y el mínimo para la población positiva. A partir de estos valores se establece un número de desviaciones estándar alrededor de la mediana como el punto de corte para establecer las particiones que serán consideradas como lluvia, teniendo en cuenta el número total de particiones que son obtenida en un ensayo convencional por ddPCR de máximo de 20.0000 se considera un valor máximo permitido de lluvia del 2% según reportes en literatura, para un total de 400 particiones que serían consideradas como lluvia. En las Figuras 37 y 38 se presentan los resultados de la evaluación de la temperatura de anillamiento para los genes RdRp y E Charite.

Los valores de los parámetros mostrados en las Figuras fueron normalizados para su construcción, adicional a esto se muestra una línea punteada en 0.25 como valor máximo permitido para los parámetros de resolución y lluvia. Con relación a la Figura 37. se muestran los resultados del ensayo para la detección de la diana RdRp de SARS CoV-2. Allí se observa un rendimiento superior al seleccionar la temperatura de anillamiento de 58°C con respecto a las demás temperaturas estudiadas al comparar los parámetros de resolución y porcentaje de lluvia en la reacción. El valor de resolución se encuentra por encima del umbral, presentando un valor de 3.51 y un porcentaje de lluvia del 0.12% siendo este el valor seleccionado como el optimizado para la validación del método. Con relación a las temperaturas de 56°C y 54°C los valores evaluados se encuentran por encima del umbral, sin embargo, la temperatura de 56°C presenta

una resolución de 2.14, estando ligeramente por debajo del valor óptimo, por lo cual podría ser empleada para su amplificación en caso de ser empleada en una reacción multiplex a esta temperatura. A diferencia de la temperatura de 54°C que presenta una resolución baja y un alto porcentaje de lluvia, como se puede ver tanto en el gráfico de barras como en el gráfico de amplitud en la parte inferior de este evidenciando una nula separación de las poblaciones.

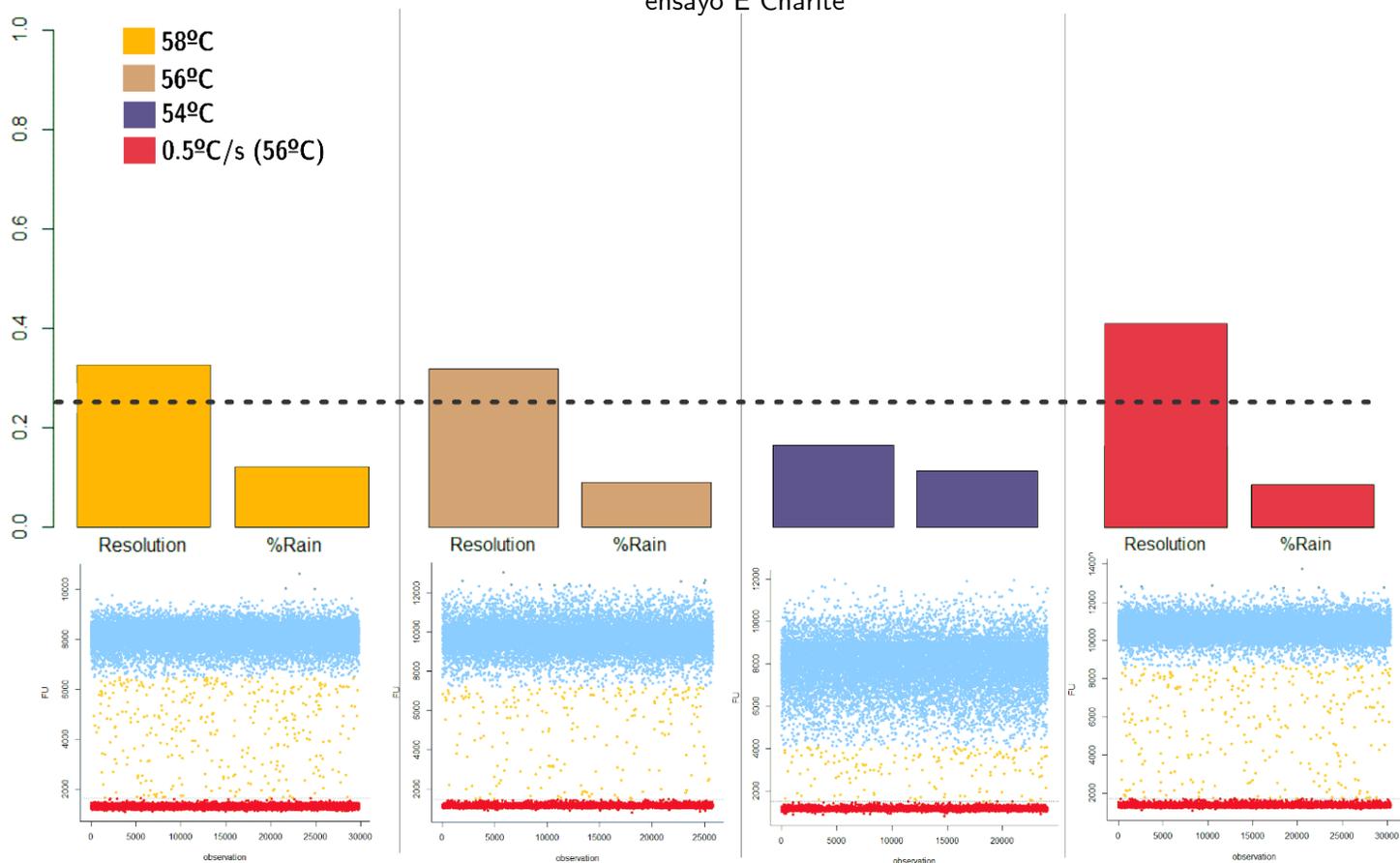
Figura 37. Parámetros de resolución y lluvia en el estudio de temperatura de anillamiento del gen RdRp



Con relación al ensayo E Charite, el estudio de la variación de temperaturas de anillamiento se muestra en la Figura 38, donde se observan dos temperaturas con una separación por encima del valor umbral para las temperaturas de 58°C y 56°C, con valores de 3.47 y 3.23. Aunque la temperatura de 56°C presenta un valor asociado a la lluvia ligeramente menor del 0.14% respecto al 0.18% de la temperatura superior, se define la temperatura óptima como 56°C, con la posibilidad de emplear la temperatura de 58°C en caso de ser necesario.

Adicional al estudio de la temperatura de anillamiento se realizó la evaluación del cambio en la rampa de calentamiento empleada en el programa de termociclador, se evaluó únicamente para el ensayo E Charite y los resultados de este fueron escalados a los demás ensayos. El valor definido por defecto en la mayoría de los ensayos de PCR es de $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$, siendo el valor de aumento entre la temperatura de anillamiento y la temperatura de desnaturalización en cada ciclo. La temperatura de estudio fue de 0.5°C . Un cambio en este valor es especialmente útil en ensayos por ddPCR debido a que este puede disminuir la lluvia en los ensayos, debido a que un calentamiento a menor velocidad permite estabilizar las gotas y permitir una mejor hibridación de los primers [148]. Se emplearon los mismos parámetros estudiados en la evaluación de temperatura de anillamiento, (Resolución y lluvia) empleado la temperatura de 56°C con el que se obtuvieron los mejores resultados. Se obtienen valores de $R_s=4.1$ y porcentaje de lluvia del 0.1%, evidenciando una mejora con respecto al uso de $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$ por lo que se definió este valor para todos los demás ensayos.

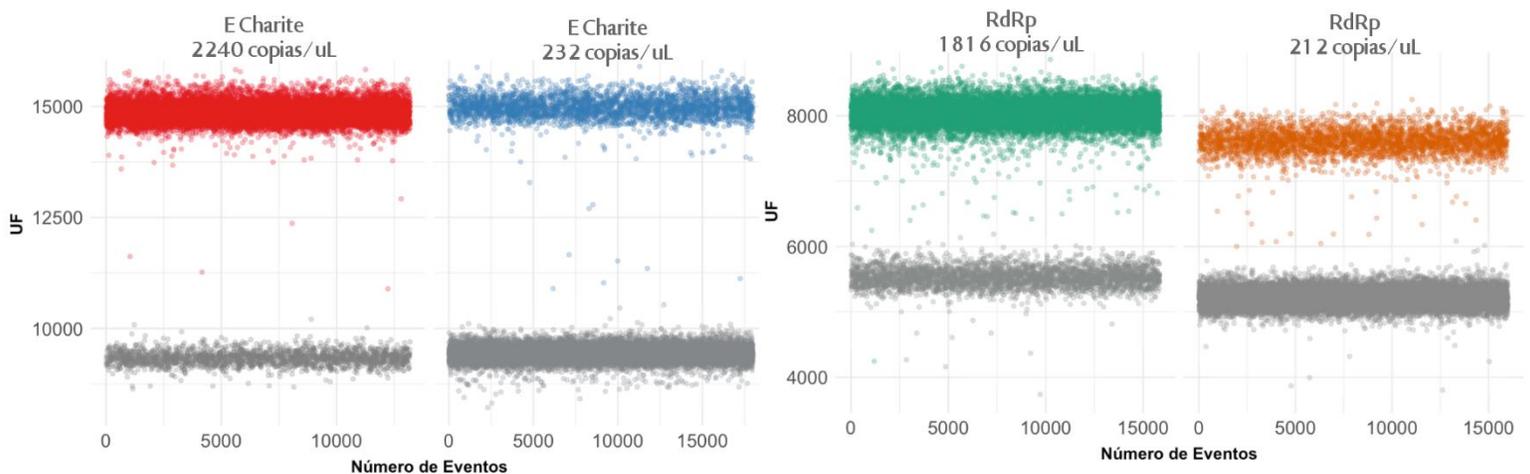
Figura 38. Parámetros de resolución y lluvia en el estudio de temperatura de anillamiento del ensayo E Charite



Retrotranscripción y amplificación en un paso *OneStep por RT-ddPCR*

A partir de las condiciones optimizadas se realizó la verificación de la amplificación los ensayos *E Charite*, y *RdRp*, empleado una mezcla de reacción de un único paso. La verificación de la amplificación se realizó en dos niveles de concentración, en la Figura 39. se muestran los resultados de amplificación para ambos ensayos, donde se muestra una amplificación óptima, con una clara separación de las poblaciones positivas y negativas, además de un bajo número de particiones intermedias (lluvia) en ambos niveles de concentración. A partir de esta verificación se decide realizar las mediciones posteriores empleado una metodología de un único paso para las mediciones por ddPCR

Figura 39. Gráficos de amplitud para los ensayos *E Charite* y *RdRp* empleando una metodología de Retrotranscripción y amplificar por ddPCR en un único paso.



4.2 Validación de métodos por PCR

Posterior a la verificación y optimización de los métodos de detección por PCR de SARS-CoV-2, se prosiguió a la validación de los métodos por RT-qPCR y RT-ddPCR, el primero con el fin previsto de realizar la caracterización de los MR a producir, además de tener una visión del comportamiento de medición de los laboratorios de ensayos que realizan mediciones asociadas a

SARS CoV-2. La técnica de RT-ddPCR se empleó principalmente para la asignación de valor de MR en copias/ μ L.

4.2.1 Validación de métodos por RT-qPCR

LA validación de método por esta técnica se realizó con un alcance aplicable a la detección y cuantificación de ARN de SARS-CoV-2 en buffer citrato (pH 6.5), por RTqPCR en un solo paso en modo simplex, en un intervalo entre 1 - 260000 copias/ μ L en la mezcla de reacción, como se describe en la sección 3.2.3

Intervalo lineal RT-qPCR

Se realizó un análisis de linealidad a partir de los valores de Ct para cada uno de los valores de concentración evaluados, cada uno por triplicado. La Figura 40. muestra las curvas de calibración generadas para los ensayos evaluados. Los genes presentaron un comportamiento según lo esperado para en todos los niveles de concentración, presentando coeficientes de correlación R^2 superiores a 0,9962, con un valor máximo de 0,9999 para el ensayo que identifica la proteína Spike. Los análisis estadísticos de la linealidad se realizaron a través del análisis de residuales y análisis de Varianza (ANOVA). En La Tabla 17, se resumen los resultados análisis de regresión lineal de genes validados

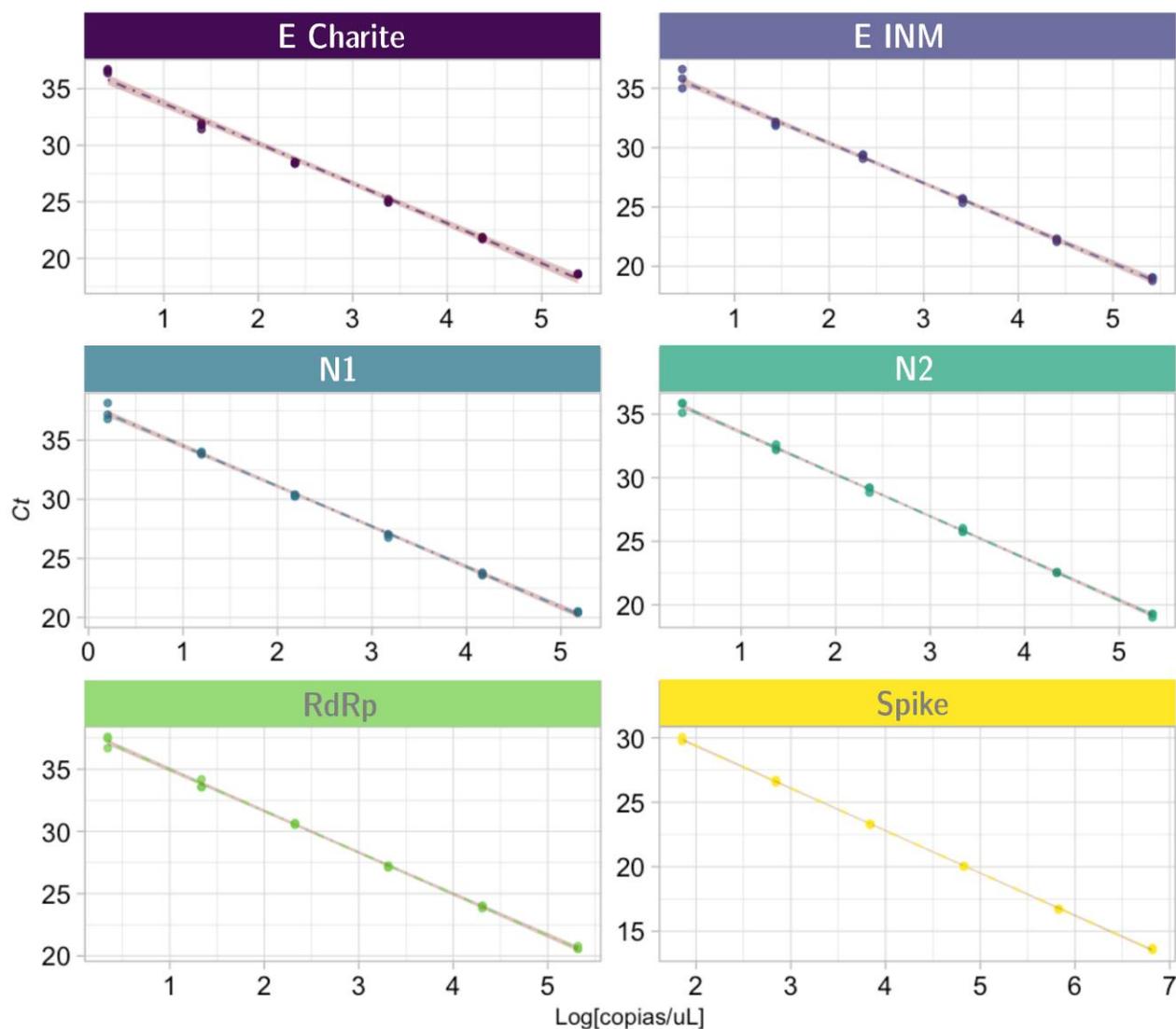
Tabla 17. Parámetros de la evaluación de la linealidad del método por RT-qPCR

Ensayo	Pendiente	Intercepto	R^2	<i>p</i> valor, regresión	<i>p</i> valor, Falta de Ajuste	Eficiencia (%)
E Charite	-3.533	37.234	0.9969	4.42×10^{-19}	7.6×10^{-6}	91.9
E INM	-3.370	37.116	0.9983	3.73×10^{-21}	0.707	98.1
N1	-3.408	37.923	0.9988	2.1×10^{-32}	0.6254	96.5
N2	-3.299	36.867	0.9994	8.9×10^{-25}	0.9997	101.1
RdRp	-3.332	38.308	0.9992	7.07×10^{-24}	0.9398	99.6
Spike	-3.287	35.946	0.9999	9.98×10^{-30}	0.3795	101.5

A partir de los análisis de regresión, particularmente de la pendiente del modelo lineal $y=mx+b$, se realizó la estimación de la eficiencia de reacción de acuerdo con la ecuación X, se observan valores entre 91.9% y 101.5%, correspondiente a comportamiento de reacciones de PCR

optimizadas. Estos valores varían dependiendo de distintos factores, como la presencia de inhibidores, la calidad del anillamiento de los oligonucleótidos, la calidad de la enzima empleada y factores de optimización del método [146]. Sumado a esto se realizó el análisis de los residuales obtenidos, mostrando una distribución aleatoria de los mismos, a excepción de los obtenidos para el gen E Charité, este mismo ensayo presenta una falta de ajuste al modelo como se muestra en la Tabla 17, por lo que se reduce el intervalo manejado para este, de 2.62×10^5 a 27.5 copias/ μL .

Figura 40. Intervalo lineal cuantificación de ARN de SARS CoV-2 por RT-qPCR



Finalmente, en la Tabla 18. se presenta el resumen de los intervalos lineales obtenidos para cada ensayo, también se obtuvo el coeficiente de variación para las réplicas de cada nivel.

Tabla 18. Resumen de los intervalos lineales validados por RT-qPCR

N1		N2		E Charite		RdRp		Spike		E INM	
copias/ μL	CV (%)	copias/ μL	CV (%)	copias/ μL	CV (%)						
1.51X10 ⁵	0.30	2.24X10 ⁵	0.83	2.62X10 ⁵	0.24	2.08X10 ⁵	0.61	6.56X10 ⁶	0.70	2.61X10 ⁵	0.9
1.47X10 ⁴	0.48	2.19X10 ⁴	0.17	2.54X10 ⁴	0.45	2.03X10 ⁴	0.46	6.72X10 ⁵	0.20	2.5X10 ⁴	0.6
1488.3	0.55	2215.8	0.60	2577.2	0.62	2054.5	0.28	6.7X10 ⁴	0.10	2577.2	0.8
153.1	0.29	227.74	0.75	227.7	0.28	211.16	0.24	6901.5	0.20	227.7	0.7
15.7	0.33	23.4	0.69	27.2	0.90	21.7	1.06	695.7	0.40	27.2	0.5
1.6	1.87	2.4	1.23	-	-	2.21	1.31	71.4	0.60	2.8	2.3

Los métodos de detección de SARS CoV-2 validados cubren un amplio intervalo de concentración, aprovechando la ventaja que presenta la técnica de qPCR y permitiendo la caracterización de material en alta y baja concentración, siendo este el fin previsto de los métodos por qPCR. Es importante resaltar que es común en los ensayos por qPCR una disminución en la repetibilidad instrumental en la variable de respuesta (Ct) de los métodos a medida que se reduce la concentración de las muestras evaluadas. El impacto de esta variación es particular a cada ensayo evaluado con un valor máximo de coeficiente de variación de 2.3% para el ensayo RdRp.

Precisión RT-qPCR

Los resultados asociados a la precisión de los métodos en los niveles de concentración evaluados son mostrados en La Figura 41. El análisis de precisión de los métodos por RT-qPCR se desarrolló mediante un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA), para la evaluación de precisión como repetibilidad, vista como la variación en unidad de concentración (copias/ μL) de una misma muestra replicando las condiciones de operación en una misma corrida experimental. Igualmente, se evaluó la precisión intermedia evaluada como la variación en función del tiempo de la respuesta instrumental. Ambos parámetros son obtenidos a partir de los coeficientes del

ANOVA, utilizando las Ecuaciones 8 y 9, correspondiendo a la desviación estandar de repetibilidad relativa y precision intermedia relativa, donde CME es el cuadrado medio entre grupos, CMD : cuadrado medio dentro del grupo, $n_{replicas}$ como el número de réplicas empleadas, $[copias/uL]_{promedio}$ es la concentración en copias/ μ L para cada nivel evaluado.

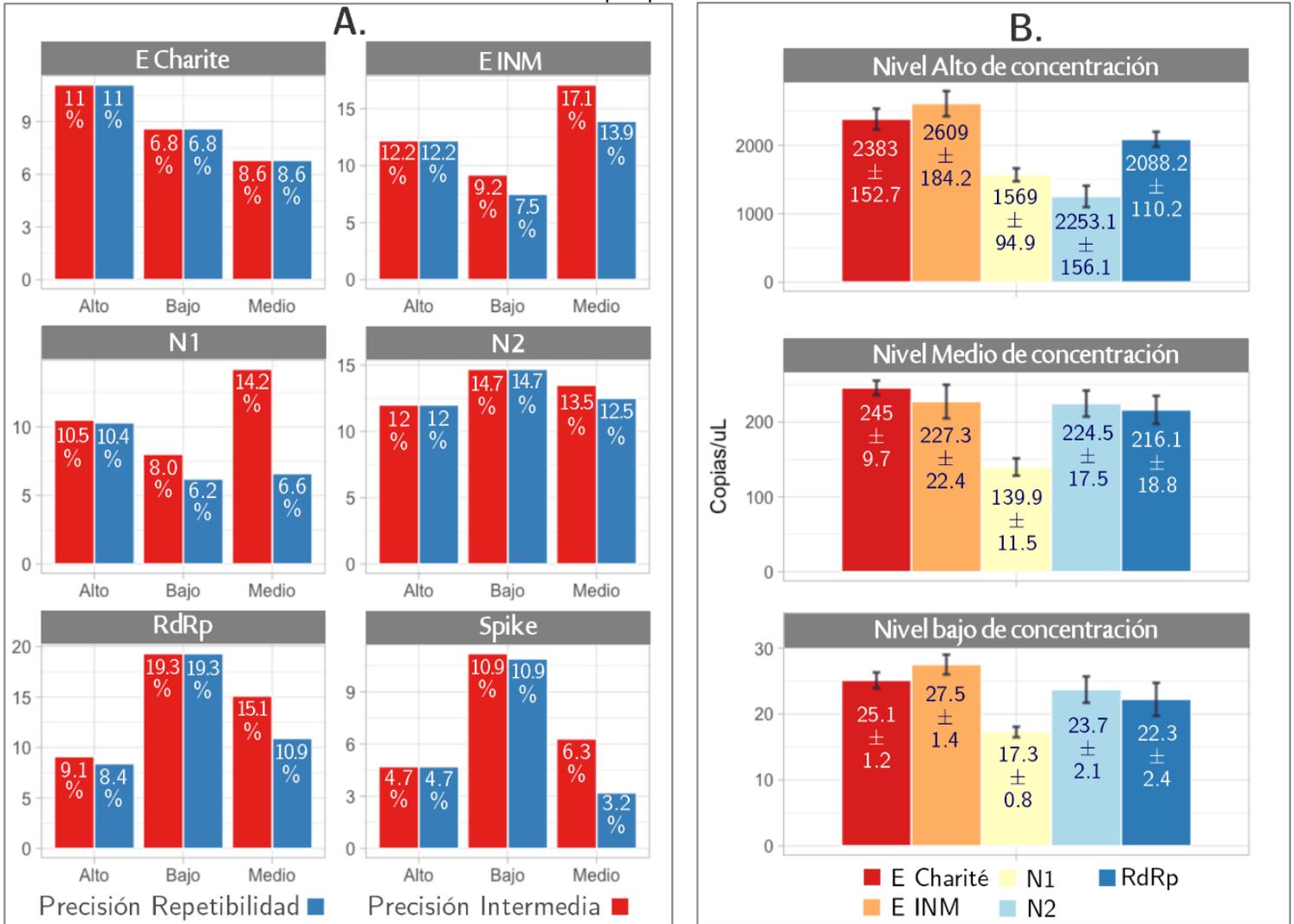
$$Prec_{rep} = \frac{\sqrt{CMD}}{[copias/uL]_{promedio}} \quad \text{Ecuación 8.}$$

$$Prec_{Inter} = \frac{\sqrt{\frac{CME-CMD}{n_{replicas}}}}{[copias/uL]_{promedio}} \quad \text{Ecuación 9.}$$

Es importante resaltar que la evaluación de precisión del método mediante ANOVA fue realizada a partir de la unidad de concentración de cada nivel, no mediante el uso de la respuesta instrumental (Ct) y la obtención matemática de la Coeficiente de Variación a partir de este [149]. La razón de esto es la naturaleza logarítmica con la que son expresados los valores en curvas de calibración con relación al Ct, el uso de estos conlleva a una subestimación de la varianza real de los valores. Una manera de expresar la precisión del método empleando coeficientes de variación es mediante el uso de la ecuación dada en la ISO 20395:2017, que emplea una transformación matemática de la eficiencia de reacción mediante el uso de anti-logartimos y la desviación estándar de las réplicas [150].

Con relación a los resultados de precisión obtenidos en los métodos se observa que varían entre valores del 4.7% al 19.3%, siendo el menor valor para el gen Spike en una concentración alta y el valor superior para RdRp en baja concentración, siendo este un comportamiento habitual en ensayos por qPCR, donde al disminuir la concentración analizada aumenta la dispersión de los resultados. Sin embargo, se observa que no todos los ensayos siguen esta premisa, donde en algunos casos como N1 e E INM el nivel bajo de concentración presenta una precisión mayor a la obtenidos en los niveles altos y medios de concentración.

Figura 41. Evaluación de precisión de métodos por RTqPCR, A: Precisión relativa Intermedia y como Repetibilidad. B: Niveles de concentración analizados con su incertidumbre por precisión.



Este comportamiento permite determinar que es posible realizar mediciones por RT-qPCR entre los intervalos de concentraciones evaluadas sin tener una variación por precisión claramente desviada hacia niveles altos y bajos de concentración. La dispersión de los datos por qPCR puede estar dada por diferencias de temperatura durante el proceso de termociclado, afectando los procesos de desnaturalización y anillamiento, las diferencias de concentración asociadas a variaciones en el pipeteo siendo este el factor de mayor impacto y finalmente la variación estocástica, dada la naturaleza de la PCR que se puede considerar un sistema estocástico, en el

12 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

que se incorpora un elemento de aleatoriedad en cada reacción en oposición a un sistema determinista [149].

Por otro lado, La Figura 41, particularmente la sección B. muestra la incertidumbre asociada únicamente a la precisión del método, esta fue calculada a partir de la Ecuación 10. empleado los valores del ANOVA, donde n es el número de replicas junto con las desviaciones estándar relativas estimadas en precisión

$$u_{prec} = \sqrt{\frac{S-Pre_{repetibilidad}^2 + S-Pre_{intermedia}^2}{n}} \quad \text{Ecuación 10.}$$

Los valores de Incertidumbre relativa asociada a cada nivel son mostrados en la Tabla 19, donde la precisión varía entre el 3.3% y 11.2%. El nivel en el que se presentó la menor incertidumbre es el de 6.51×10^6 copias/ μ L para el gen Spike y los genes que mostraron mayor incertidumbre fueron RdRp para 22.2 copias/ μ L. Para los demás valores de concentración no se observa una tendencia con relación a la incertidumbre al igual que ocurría con los valores de precisión intermedia y por repetibilidad.

Tabla 19. Incertidumbres relativas por precisión por RTqPCR

Ensayo	Copias/uL	uR (%)	Ensayo	Copias/uL	uR (%)	Ensayo	Copias/uL	uR (%)
RdRp	2088.2	5.30%	N1	1569	6.10%	E INM	2609.6	7.10%
	216.2	8.70%		139.9	8.22%		227.2	9.90%
	22.2	11.20%		17.3	4.60%		27.5	5.30%
E Charite	2383.7	6.40%	N2	2253.1	6.90%	Spike	6.51E+06	3.30%
	245.6	3.90%		224.6	7.80%		6886.2	4.50%
	25.1	4.90%		23.7	8.50%		71.9	7.70%

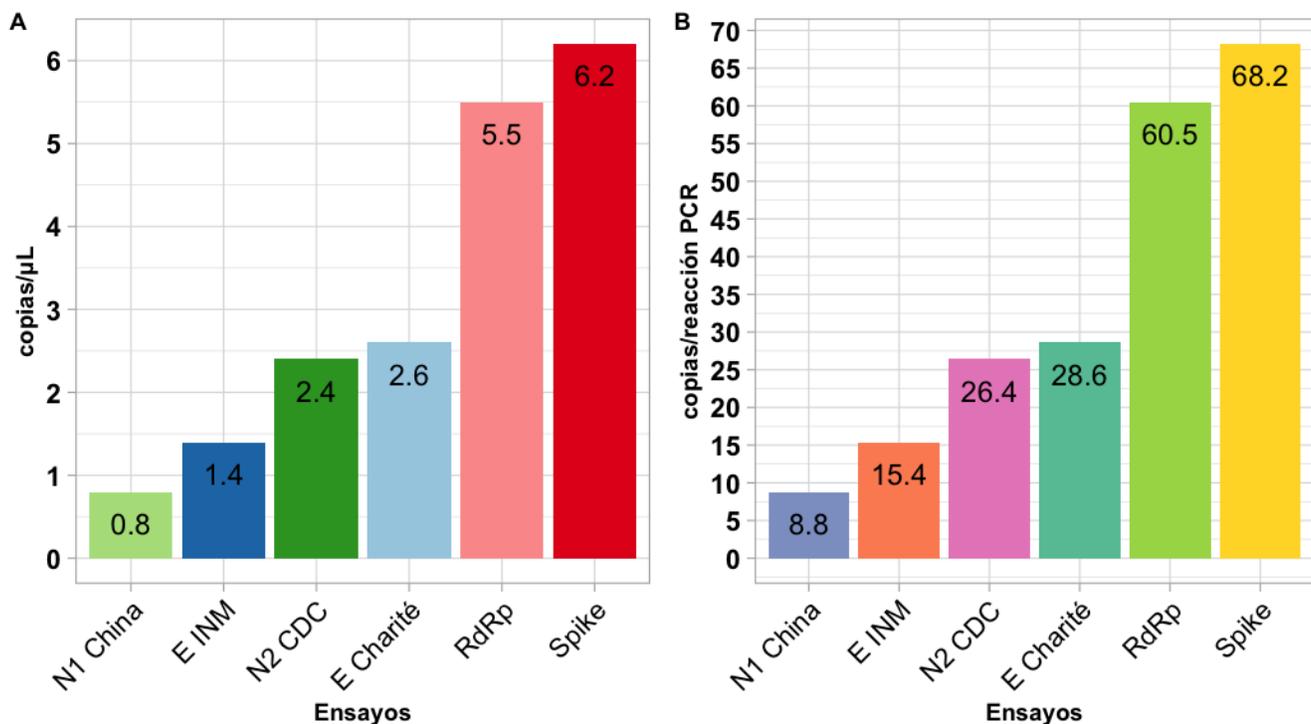
Límites de Detección por RT-qPCR

La estimación del Límite de detección se determinó como la menor concentración en copias/ μ L en el que se obtenga un porcentaje de amplificación positiva del 100% para las 4 réplicas

evaluadas. En total se hizo la evaluación de cinco niveles de concentración desde 0.25 - 7.0 copias/ μ L, si bien una estimación robusta del límite de detección por qPCR se realiza mediante un mayor número de replicas e incluso el uso de modelamientos matemáticos [151]–[153], la estimación realizada permite dar una visión del comportamiento del método cuando se miden bajas concentraciones de RNA de SARS CoV-2, y dado que el uso previsto de los métodos validados es la caracterización de MR en concentraciones que se encuentren dentro del intervalo lineal evaluado donde siempre se medirán muestras por encima de los valores determinados de LOD estimados se determina la estimación preliminar realizada como adecuada.

Por otra parte, el LoD es definido como la concentración más baja a la que se detecta el 95 % de las muestras positivas [149], para el caso de los ensayos evaluados por qPCR el criterio se basó en la total amplificación del número de replicas, compensado de esta manera en número de replicas empleadas.

Figura 42. Evaluación del Límite de Detección para los ensayos de detección de SARS CoV-2 por qPCR. Valores en copias/ μ L (A), Valores en Copias/reacción (B)

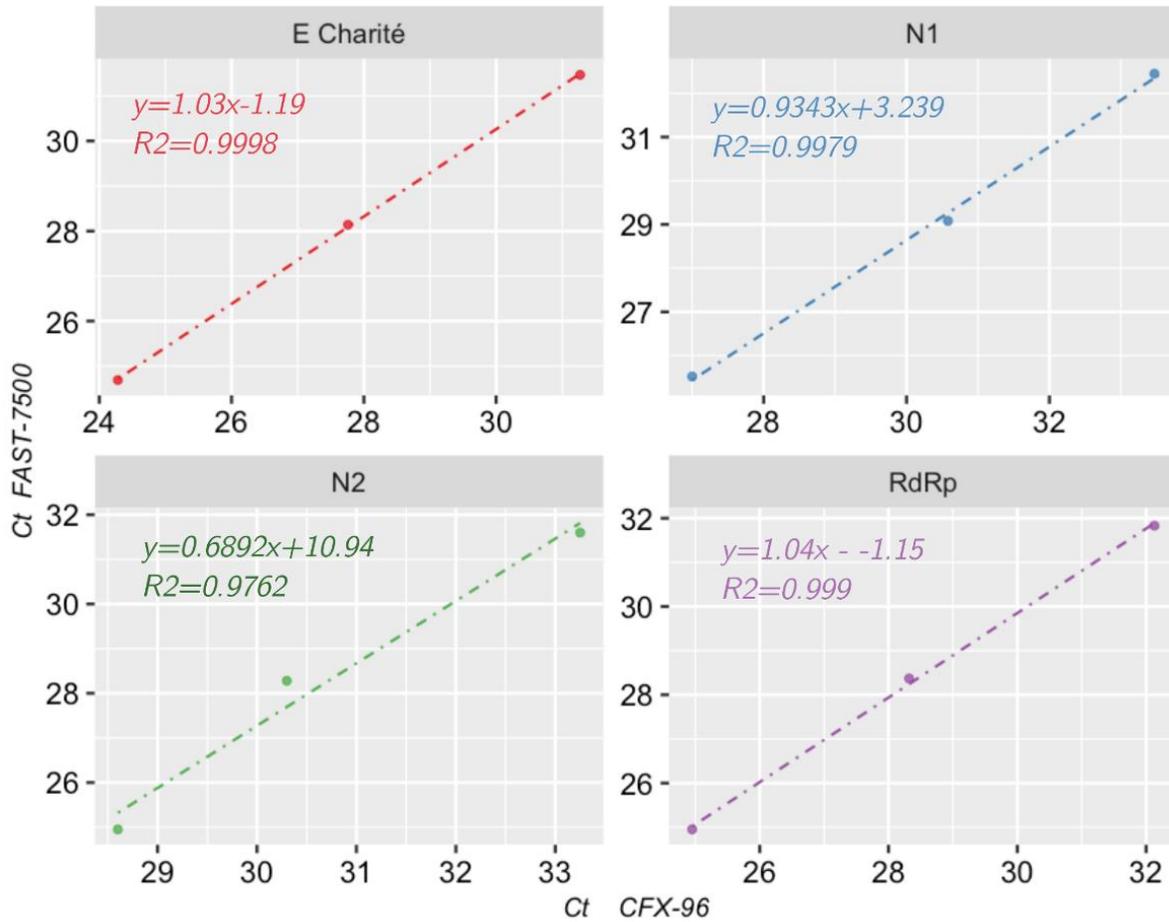


Los resultados de la estimación del LOD se muestra en La Figura 42, donde se observan los valores en unidad de concentración en copias/ μ L, con valores entre 0.8 y 6.2 (Figura 42-A), siendo el ensayo para región del gen Spike la que presenta LOD superior. Por otro lado, la Figura 42-B muestra los resultados para el LOD en copias por reacción con valores entre 8.8 y 68.2 copias/reacción de PCR. La representación de los resultados de esta forma facilita la interpretación, debido a que los métodos por PCR comúnmente varían los volúmenes empleados y una medida asociada al comportamiento general de un ensayo por PCR brinda más información, además de ser la unidad con la que comúnmente los ensayos o kit comerciales reportan sus LOD's.

Estudio de equivalencia Interplataforma

Como última etapa de la validación se evaluó la equivalencia del método mediante la variación de la plataforma de PCR empleada. En La Figura 43 se muestran los resultados obtenidos en un gráfico de dispersión con los valores de Ct obtenidos para los tres niveles de concentración evaluados en las plataformas CFX-96 BioRad en el eje X y FAST 7500 Applied BioSystems en el eje Y. El intervalo de concentración evaluado fue de 15 copias/ μ L a 2500 copias/ μ L. A partir de los coeficientes del modelo de regresión lineal podemos estimar con base a la pendiente si existe una disparidad claramente dada en los valores obtenidos por los métodos en ambas plataformas. Los ensayos E Charité y RdRp presentan una pendiente ≈ 1 , lo que nos indica que la relación entre los resultados obtenidos en ambas plataformas es equivalente entre los niveles de concentración evaluados: sin embargo, los resultados obtenidos por los ensayos N1-china y N2-CDC presentan valores $\neq 1$, siendo este último ensayo el que presenta una mayor diferencia con respecto a los demás ensayos con una pendiente de 0.6892. Es común ver diferencias en los resultados obtenidos en distintas plataformas de qPCR, el sistema óptico empleado, los procesos de estimación de umbrales asociados a cada software, que en ultima funcionan como puntos de corte para obtención de los valores de Ct son la causa de esa variaciones [154].

Figura 43. Evaluación del Límite de Detección para los ensayos de detección de SARS CoV-2 por qPCR



4.2.2 Validación de métodos mediante RT-ddPCR

La validación del método realizada es aplicable para la detección y cuantificación de ARN de SARS-CoV-2, por RTddPCR en un solo paso, en un intervalo entre 1 - 4000 copias/ μ L . A continuación, se muestran los resultados obtenidos con respecto a la evaluación de los parámetros descritos en la sección 3.2.3.

Intervalo lineal RT-ddPCR

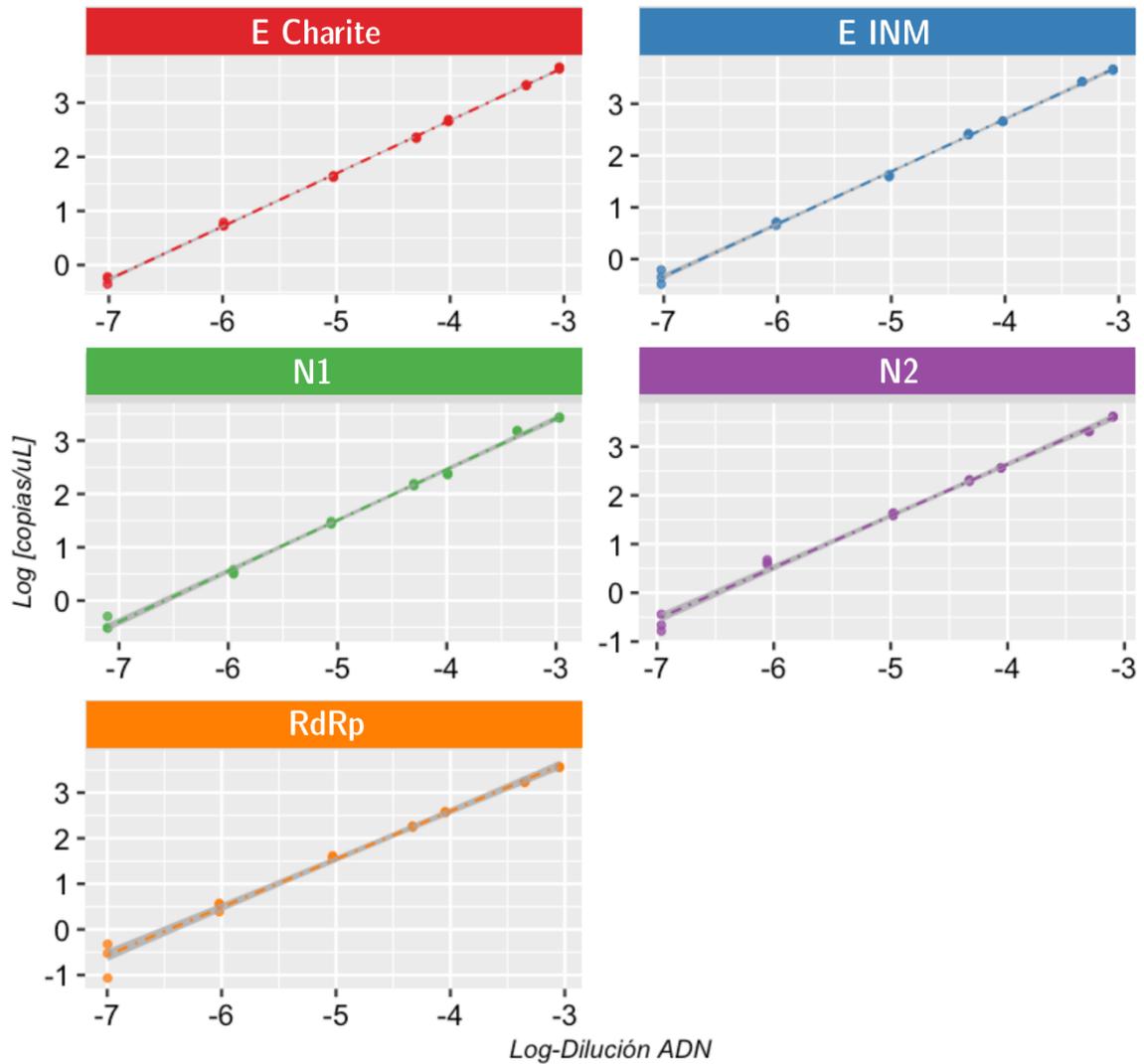
A partir de los resultados obtenidos de la cuantificación de los niveles de concentración por RT-ddPCR se realizó un análisis de la linealidad de la respuesta instrumental en copias de la diana evaluada con relación a la dilución correspondiente. Se evaluarán siete niveles de concentración, por triplicado. La Figura 44 muestra las curvas de calibración generadas para los ensayos evaluados. En el *eje-X* se muestra el logaritmo de la dilución de ADN y en el *eje-Y* se muestra el logaritmo de las copias/ μ L asociada a cada nivel, presentando coeficientes de correlación R^2 superiores a 0,9918, con un valor máximo de 0,9992 para el ensayo que identifica la región del gen E. Los análisis estadísticos de la linealidad se realizaron a través del análisis de residuales y análisis de Varianza (ANOVA). En La Tabla 20, se resumen los resultados análisis de regresión lineal de genes validados.

Tabla 20. Parámetros de la evaluación de la linealidad del método por RT-ddPCR

Ensayo	Pendiente	Intercepto	R^2	<i>p</i> valor, regresión	<i>p</i> valor, Falta de Ajuste
E Charite	0.980	6.593	0.9992	2.04×10^{-31}	0.1876
E INM	1.012	6.756	0.9983	6.45×10^{-28}	0.2769
N1	0.953	6.271	0.9977	6.12×10^{-25}	0.0618
N2	1.059	6.876	0.9948	4.30×10^{-23}	0.0311
RdRp	1.053	6.807	0.9918	6.05×10^{-21}	0.8010

El supuesto de linealidad se estableció mediante el análisis de regresión lineal simple, teniendo como criterios de aceptación el p -valor < 0.05 del modelo, un coeficiente de correlación lineal $R^2 \geq 0.990$, así como una prueba de falta de ajuste mediante el uso de p -valor de esta prueba. Además se realizó la verificación de homocedasticidad mediante la prueba de Levene y una estimación de la normalidad de los datos mediante gráficos tipo quantile-quantile.

Figura 44. Intervalo lineal para la cuantificación de ARN de SARS CoV-2 por RT-ddPCR



La transformación logarítmica en ambas variables se debe al amplio intervalo de concentración cubierto por los métodos, y de ser empleados los valores naturales, los puntos de mayor concentración tendrán un efecto mayoritario sobre los coeficientes ejerciendo un efecto pivote. Sumado a lo anterior no se mantendría la equidistancia entre los puntos, siendo este una recomendación este tipo de estudios. Con relación a los resultados presentados la Tabla 20, el supuesto de linealidad se cumple para los ensayos evaluados para un intervalo de concentración entre 0.6 copias/μL y 4500 copias/μL, cubriendo un intervalo de concentración según lo reportado para otros métodos por ddPCR [137], [155], por lo que se determina que en este rango de concentración. La relación entre respuesta y concentración es continua, reproducible y lineal

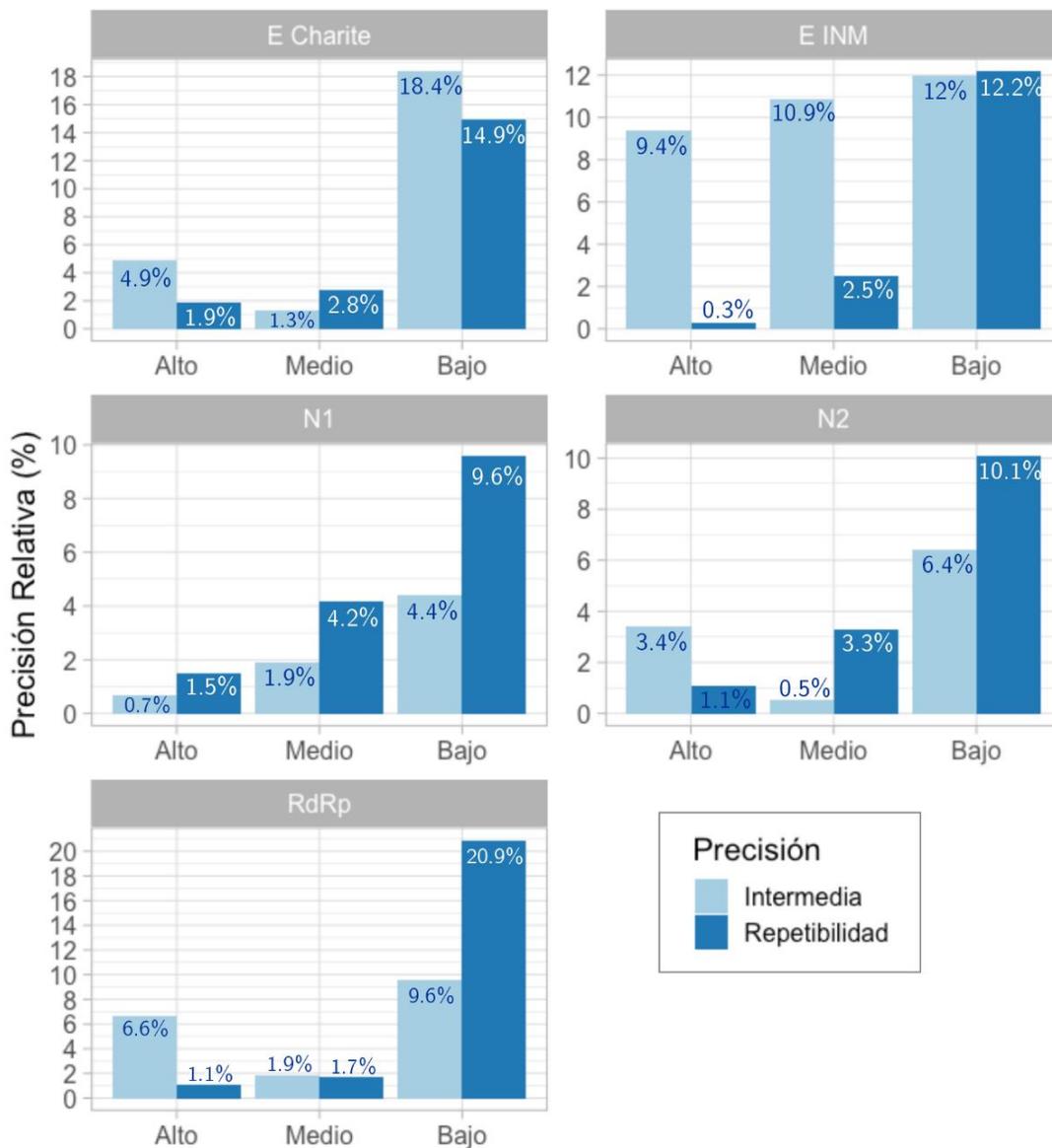
después de una adecuada transformación de datos para los ensayos; a excepción del ensayo N2-CDC, quien presenta un p-valor de Falta de Ajuste menor al valor de significancia del 0.05, lo que indica que el modelo aparentemente es inadecuado para el intervalo de concentración evaluado.

Precisión del método por RT-ddPCR

La evaluación de precisión se realizó para tres niveles de concentración, 2500 copias/ μL , 230 copias/ μL y 4 copias/ μL , evaluando de esta forma una concentración alta, media y baja. Los resultados asociados a la precisión de los métodos en los niveles de concentración evaluados son mostrados en La Figura 45. Al igual que la evaluación de precisión realizada para la validación de métodos por RT-qPCR, se empleó un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA). Se emplean las Ecuaciones 8 y 9 para estimar los valores de precisión como repetibilidad y precisión intermedia con el factor días; se emplean Las Ecuaciones 8 y 9.

Los valores de precisión obtenidos son característicos de cada ensayo, y no se observa una tendencia uniforme en todos los genes, a excepción de los niveles de baja concentración, donde la precisión tanto por repetibilidad como intermedia es muy superior con respecto a los niveles alto y medio de concentración. Esto posiblemente se debe al modelo de estimación empleado en la técnica, la distribución de poisson y la obtención del valor λ que es la relación entre positivos y negativos, siendo esta muy baja para los niveles de baja concentración. En otras palabras la mayoría de las particiones no presenta ninguna amplificación positiva y el error por estimación por el modelo estadístico es muy alto, además se ocasionan errores de partición y submuestreo, ya que ambos errores se basan en los mismos conceptos de procesos aleatorios binomiales y de Poisson [156]. En práctica, los errores de partición a menudo se contrarrestan mediante la realización de múltiples réplicas de la muestra en un experimento.

Figura 45. Valores de precisión como repetibilidad e Inter-días asociada a los métodos de medición por RT-ddPCR para SARS CoV-2



La precisión obtenida en los niveles bajos de concentración es especialmente marcada para el gen RdRp presentando valores de precisión por repetibilidad altos (20.9%), superando los valores de precisión intermedia, indicándonos que la variación dada durante un mismo experimento es muy superior a la variación de los resultados al variar el día del experimento. En general los valores de precisión por repetibilidad varían entre el 0.3% y el 20.9% para todos los niveles evaluados, los valores de precisión intermedia varían entre el 1.1% y 18.4%.

Con relación al ensayo N1 se observa que los valores de Repetibilidad son superiores a los valores de precisión intermedia obtenida para los tres niveles de concentración, indicando la sensibilidad del método a las modificaciones por efectos estocásticos y de cantidad de ADN presente en la mezcla de reacción, aunque es más robusto con las mediciones en el tiempo. Contrario al caso del ensayo E-INM donde los valores de precisión intermedia son muy superiores a los obtenidos por repetibilidad, indicando que el factor tiempo tiene un impacto considerable en los resultados obtenidos para este ensayo.

Límites de detección y cuantificación

Se evaluaron cuatro niveles de concentración por debajo del intervalo lineal, desde 0.52 a 0.04 copias/ μ L. El criterio de selección del límite de detección es la amplificación de todas las réplicas en las cuales la sumatoria de las particiones positivas en las réplicas debe ser ≥ 9 [137], la Figura 46 muestra las particiones positivas obtenidas para cada nivel de concentración, la línea horizontal representa el punto de corte en 9 particiones, los LOD en mezcla de PCR estimados para el Ensayo E charité fue de 0.12 copias/ μ L, E INM con 0.26 copias/ μ L, N1 presento un límite de 0.288 copias/ μ L, N2 presenta el menor LOD de los ensayos con un valor de 0.109 copias/ μ L y finalmente RdRp con el mayor valor LOD de 0.41 copias/ μ L. Al igual que los resultados por qPCR, es común el reporte de estos valores como las copias totales por reacción de PCR, siendo de este paso de 2.52, 5.46, 6.04, 2.28 y 8.6 copias para los ensayos E Charité, E NM, N1, N2 y RdRp respectivamente. Los LOD estimados están en línea con otros evaluaciones realizadas a métodos por la misma técnica [157], [158].

Adicional a la estimación del LOD se realizó la determinación del LOQ para los ensayos empleados, usando como criterio la mínima concentración de analito que puede cuantificarse con una probabilidad del 95 %, cuyo coeficiente de variación sea $\leq 15\%$. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos para siete niveles de concentración, además la Figura 47 se muestran los límites de cuantificación estimados para los métodos de medición, siendo el valor mayor para el ensayo E Charité con 5.6 copias/ μ L. Por consiguiente y con fin propuesto de los métodos de ser empleados para la caracterización de los MR, estos deben ser cuantificación con

valores por encima de los valores estimados con el fin trabajar dentro de las condiciones empleadas y estudiadas durante la validación.

Figura 46. Límites de Detección (LOD) por RT-ddPCR

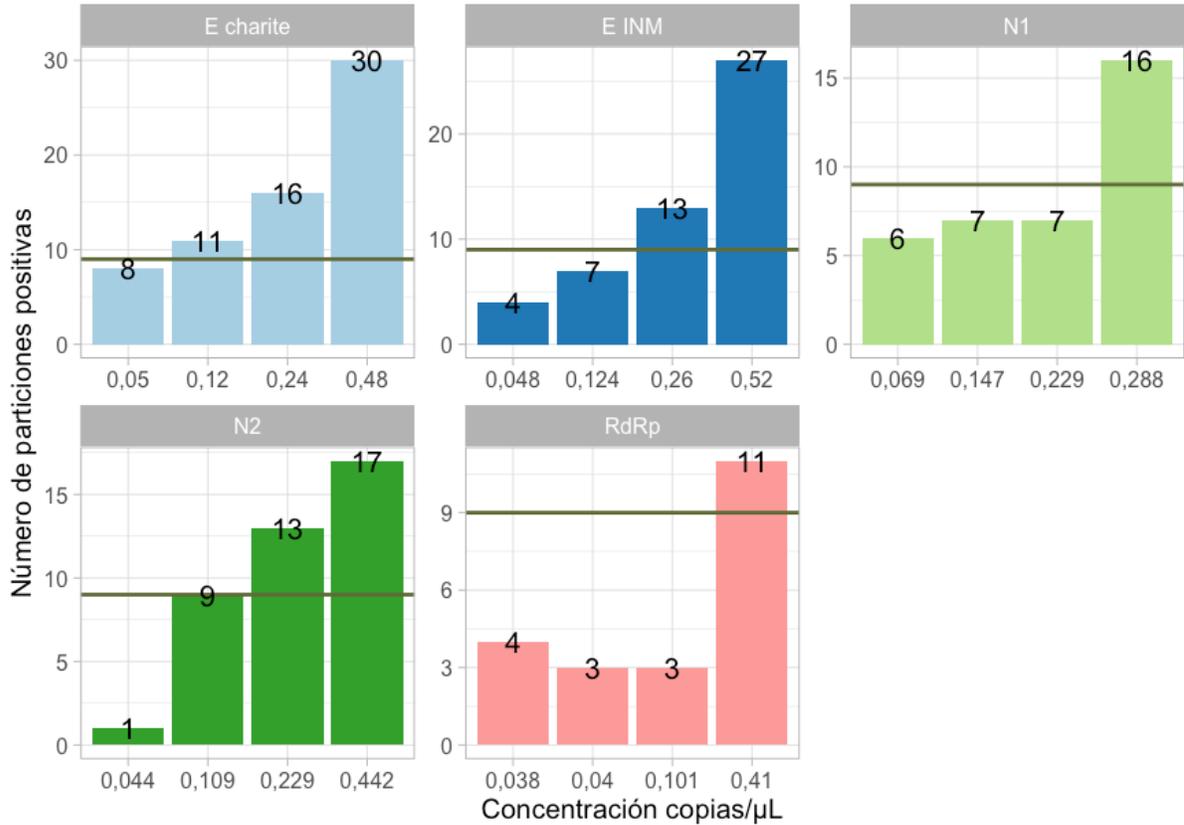
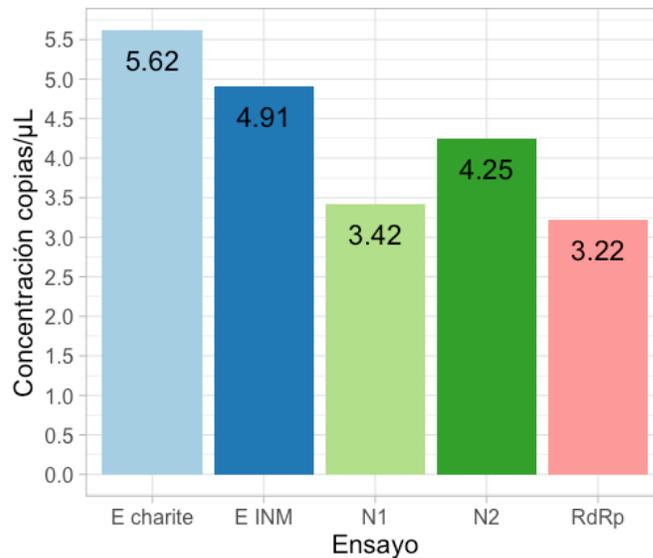


Tabla 21. Estimación del LOQ del método por RT-ddPCR

E Charite		N1		N2		E INM		RdRp	
copias/ μL	CV (%)								
4366.3	4.5%	2704.4	2.0%	4111.1	1.4%	4540.5	2.2%	3646.3	2.0%
2109.7	1.1%	1512.5	2.1%	2045.9	0.8%	2670.6	0.1%	1709.6	1.1%
463.9	4.8%	237.7	3.0%	365.9	0.7%	458.5	1.2%	374.4	2.3%
225.3	2.3%	149.7	4.7%	202.6	4.1%	257.2	3.1%	179.7	2.2%
43.4	3.4%	28.5	5.8%	40.8	7.1%	40.9	4.5%	38.9	5.3%
5.6	8.7%	3.4	10.2%	4.2	10.8%	4.9	7.8%	3.2	14.9%
0.5	15.9%	0.4	30.5%	0.2	41.2%	0.5	31.5%	0.3	68.0%

Figura 47. Límites de Detección (LOD) por RT-ddPCR representados en copias/ μ L



4.3 Producción de Materiales de Referencia

4.3.1 Producción Piloto del Ítem Ensayo de Aptitud de SARS CoV-2

A partir del MR RGTM-10169 de SARS CoV-2 se realizó la producción de 3 lotes codificados como MR-N1, MR-N2, MR-N3, el último número indicando el nivel de concentración del material siendo el número uno el nivel de concentración más elevado, y cada vial con un código único de identificación. La preparación y diluciones empleadas el material son descritas en la sección 3.3.1. Se obtuvieron 22 unidades por nivel de concentración, la evaluación y cuantificación del número de copias/ μ L se realizó con el ensayo E Charité en modo simplex, debido a la amplio uso que tiene este ensayo por parte de los laboratorios [118], [119], [123]. La Figura 48 muestra el diseño de etiquetas empleadas y la presentación final de los viales después del envasado, la etiqueta no mostro señales de degradación durante los procesos de caracterización del material, nu durante el almacenamiento a las temperaturas de estudio; demostrando así ser adecuada para el material.

Figura 48. Diseño etiquetas empleadas en la preparación del material



Estudio de Homogeneidad – Piloto IEA SARS CoV-2

Para el estudio de homogeneidad se emplearon 3 viales por nivel, seleccionados aleatoriamente, los que fueron cuatificados mediante RT-dPCR y RT-qPCR, por triplicado. La evaluación del grado de heterogeneidad del material se evaluó a través de un análisis de varianza de un factor empleado al Ecuación 2 y 3, descrita en la sección 1.5.1.1 del Marco Teórico, se realizó previamente la prueba de Hartley para verificar la homocedasticidad de los datos.

Las Tablas 22 y 23 resumen los resultados obtenidos para la estimación de la homogeneidad del piloto mediante RT-ddPCR y RT-qPCR respectivamente. Para el caso del MR-N2 uno de los viales analizados presentó valores atípicos en la concentración, siendo estos mucho menores a los demás viales evaluados del mismo lote, por lo que se realizó la prueba estadística de Grubbs para datos anómalos, lo que sugirió su descarte para el análisis de homogeneidad del lote. La incertidumbre estándar relativa obtenida por homogeneidad fue de 2.9% para el lote MR-N1, 7.6% para el lote MR-N2 y para el lote MR-N3 del 35.6%. En los casos en que factor dentro de del grupo, es decir las replicas de un mismo vial son mayor que la variación asociada al efecto entre viales, se empleó la Ecuación 2 descrita en la sección 1.5.1.1, tomada de la guía 35 para

13 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

calcular la desviación estándar asociada al efecto entre botellas. De acuerdo con ANOVA, no hay diferencias estadísticamente significativas, dado que la repetibilidad del método es mayor que la suma de cuadrados asociada al factor.

Tabla 22. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-ddPCR

Nivel	Copias/uL	Repetibilidad	Rep. relativa	Prec. Int	Prec. Int relativa	modelo	U _{hom-rel}
MR-N1	1291	17.8	1.4%	8.2	0.6%	2.5%	2.9%
MR-N2	112	3.0	2.7%	20.0	17.8%	7.1%	19.4%
MR-3	11.4	2.7	23.8%	1.2	10.9%	24.0%	35.6%

En el caso de los resultados obtenidos por RT-qPCR para el estudio de homogeneidad (Tabla 23) se observó que no existe homocedasticidad en los datos obtenidos para las replicas, en parte debido a que presentan varianzas muy bajas en relación con los valores de Ct obtenidos para en otros viales evaluados. A pesar de esto, se procedió a hacer un análisis de varianza, por ser este un estudio prospectivo tipo piloto, obteniendo valores en términos de la respuesta del sistema de medición la precisión no supera el 3% para los tres niveles de concentración estudiados, vista como la incertidumbre combinada a los componentes de precisión por repetibilidad e intermedia.

Tabla 23. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-qPCR

Nivel	Repetibilidad	Rep. relativa	Prec. Int	Prec. Int rel	U _{hom-rel}
MR-N1	0.18	0.68%	0.10	0.37%	2.62%
MR-N2	0.16	0.51%	0.44	1.45%	2.94%
MR-3	0.13	0.40%	0.05	0.15%	2.54%

Estudio de Estabilidad – Piloto IEA SARS CoV-2

La evaluación de estabilidad del piloto se realizó mediante un estudio tipo Isócrono durante 4 semanas, empleado dos viales por unidad de concentración y midiéndola por triplicado. Se utilizó -70°C como temperatura de referencia y se considerarán entre -20°C y 4°C como las

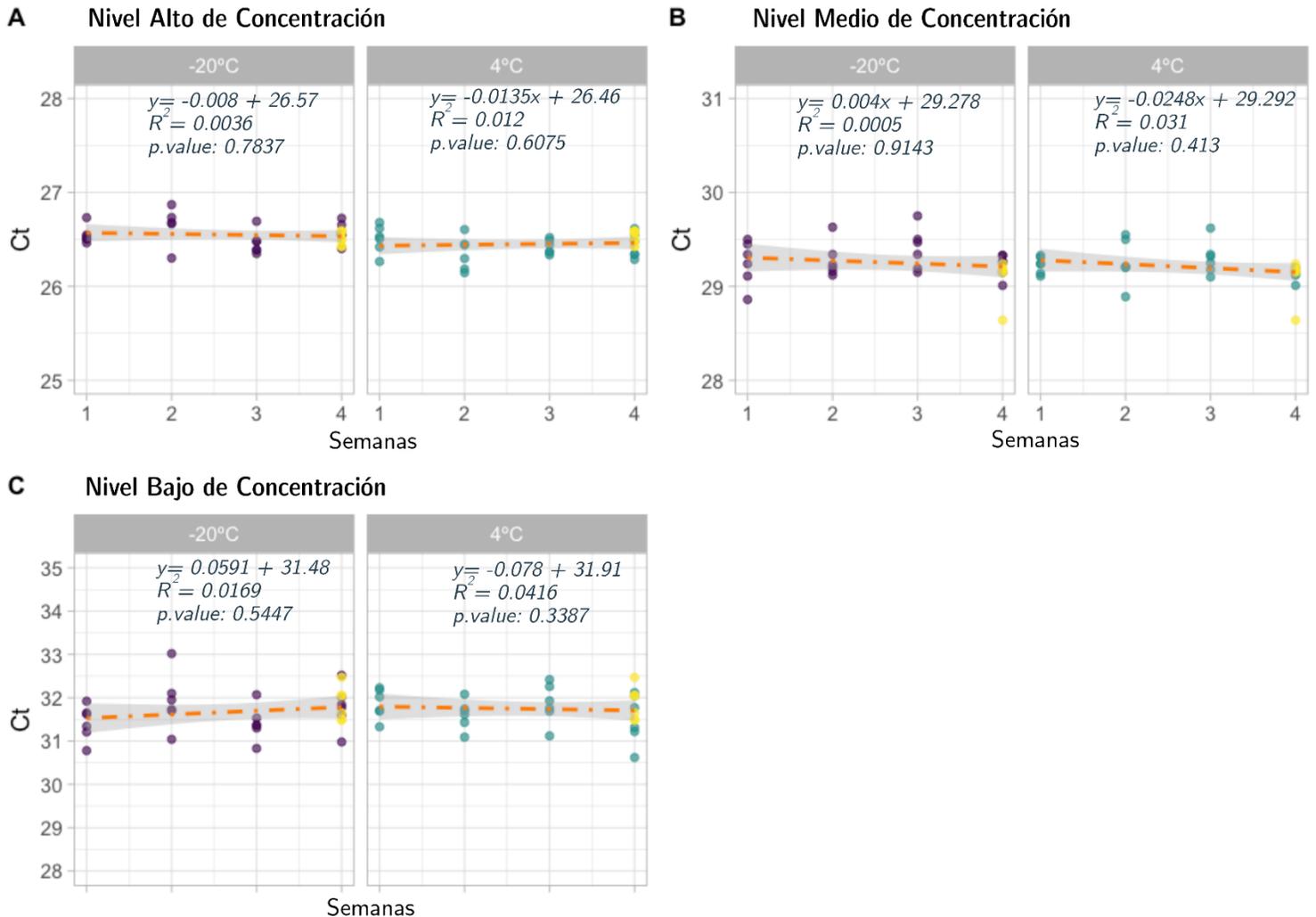
temperaturas de estudio. Los detalles del diseño empleado se muestran en la sección 3.3.1. La Figura 49. muestra los resultado obtenidos para el estudio de estabilidad a corto plazo.

Se empleó un modelo de regresión lineal simple para evaluar el cambio en la pendiente como factor indicativo de la variación de la concentración de la muestra, el p-valor <0.05 del modelo de regresión se empleó como criterio para establecer la estabilidad de los materiales. La técnica empleada para la evaluación de estabilidad del material fue RT-qPCR debido al enfoque que tendrá el Ensayo de Aptitud la cual evaluará los laboratorios que realizan detección de SARS CoV-2 por RT-qPCR.

Con relación a los resultados obtenidos mediante el análisis de regresión a cada temperatura se observa que no existe una regresión lineal de acuerdo con el p-valor, el que fue superior a 0.05 para todas las temperaturas evaluadas de -20°C y 4°C . Por otro lado los punto amarillos de la Figura 49 representan los resultados obtenidos para la temperatura de referencia, donde se evidencia valores próximos a los obtenidos para las demás temperaturas. Consecuencia de lo anterior se establece que no hay una tendencia de cambio en los valores de concentración para el intervalo de tiempo estudiado (4 semanas). Lo anterior indica la posibilidad de almacenar y transportar el material a una temperatura que no requiere refrigeración en temperaturas por debajo de 0°C , lo que facilita en gran medida el desarrollo de actividades de transporte del material, a lugares más lejanos, siempre y cuando se garanticen las condiciones de refrigeración durante el transporte. Adicional a lo anterior, el periodo de tiempo evaluado es el que se plantea como periodo de ejecución del Ensayo de Aptitud.

Finalmente, a partir de los estudios de homogeneidad y estabilidad se determinó que el material es homogéneo en los niveles de concentración de 1291 copias/ μL , 112 copias/ μL , 11,4 copias/ μL . Teniendo en cuenta el alcance de la comparación, los resultados de estabilidad obtenidos tanto por RT-qPCR, especialmente a 4°C se consideran adecuados para la preparación del MR a usado como IE en el EA para detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

Figura 49. Regresión lineal del estudio de estabilidad del Piloto IEA de SARS CoV-2, los puntos morados corresponden a la temperatura de estudio -20°C, los verdes a 4°C y los puntos amarillos corresponden a la temperatura de Referencia -70°C



Finalmente, a partir de los estudios de homogeneidad y estabilidad se determinó que el material es homogéneo en los niveles de concentración de 1291 copias/ μ L, 112 copias/ μ L, 11,4 copias/ μ L. Teniendo en cuenta el alcance de la comparación, los resultados de estabilidad obtenidos tanto por RT-qPCR, especialmente a 4 °C se consideran adecuados para la preparación del MR a usado como IE en el EA para detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

Evaluación del material en plataformas cerradas de PCR

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del material y determinar la aptitud de este para las plataformas cerradas de PCR se realizó una evaluación del piloto en tres plataformas cerradas de PCR, para lo que con el apoyo del INS, se envió una dilución del material piloto de menor concentración a 3 laboratorios que emplean plataformas de este tipo para la detección de SARS CoV-2. Los resultados se muestran en La Tabla 24., evidenciando una respuesta positiva y detectable en los niveles de 200, 400 y 600 copias totales en las plataformas evaluadas, por lo que fueron incluidas en la planeación del Ensayo de Aptitud provisto.

Tabla 24. Resultados del estudio del comportamiento del Piloto IEA de SARS-Co-V en plataformas cerradas de PCR

Dilución	Copias de RNA en 300 μ L	Plataforma Cerrada		
		BioFire [®] FilmArray [®] COVID-19 TEST v1.0	BioFire [®] FimArray [®] Respiratory Panel 2.1	Cobas [®] 6800 SARS-CoV-2 Test
1	200	Detectado	Detectado	Positivo (35.13, 36.42) *
2	400	Detectado	Detectado	Positivo (34.5, 35.29)
3	600	Detectado	Detectado	Positivo (36.22, 37.41)

*Resultados en paréntesis corresponden a valores de Ct para los genes ORF1ab y E.

4.3.2 Producción Ítem Ensayo de Aptitud de SARS CoV-2

A partir del MR RGTM-10169 de SARS CoV-2 se realizó la producción del panel a ser empleado como Ítem de Ensayo, constituido por 5 lotes de 200 unidades cada uno. La preparación y diluciones empleadas del material son descritas en la sección 3.3.2, la evaluación y cuantificación en número de copias/ μ L se realizó con el ensayo E Charité y RdRp en modo simplex. Las Figuras 50 y 51 muestran el diseño de etiquetas empleadas y la presentación final de los viales después del envasado. Se empleó vinilo autoadhesivo para las etiquetas, dado el comportamiento óptimo de estas durante el estudio piloto.

14 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

Figura 50. Diseño y presentación final del IEA SARS CoV-2



Figura 51. Presentación final de Panel de IEA SARS CoV-2



Estudio de Homogeneidad – Piloto IEA SARS CoV-2

Para el estudio de homogeneidad se emplearon 15 viales por nivel, seleccionados aleatoriamente, que correspondían a la raíz cuadrada del número de viales por nivel preparados, los que fueron medidos por RT-qPCR, por triplicado.

La evaluación del grado de heterogeneidad del material se evaluó a través de un análisis de varianza de un factor (vial), evaluando la homocedasticidad de los datos a partir de la prueba de Hartley. La Tabla 25. presenta los resultados obtenidos de la variación entre los viales evaluados.

Tabla 25. Evaluación de homogeneidad del Piloto IEA SARS CoV-2 por RT-ddPCR

Nivel	Valor de Ct	Repetibilidad	Rep. relativa	Prec. Int	Prec. Int relativa	$u_{(hom)}$ rel
Alto	25.75	0.18	0.7%	0.06	0.6%	0.9%
Medio	29.11	0.19	0.6	0.03	0.6%	0.9%
Bajo	32.49	0.34	1.1%	0.15	0.6%	1.2%

En el estudio de homogeneidad medido por RT-qPCR, no se observaron diferencias significativas entre los viales seleccionados para cada uno de los lotes evaluados. En términos de la respuesta del sistema de medición el componente de incertidumbre por homogeneidad no supera el 2% el que fue establecido como el valor máximo permitido asociado a homogeneidad con base en los resultados obtenidos en el piloto.

El nivel de menor concentración presenta un valor de u_{hom} de 1.2%, siendo este el más alto de los tres materiales. Como se ha discutido en la validación de métodos y la producción piloto es común un aumento en la variabilidad de los resultados al disminuir la concentración de la muestra analizada. A partir de lo anterior y teniendo en cuenta el valor máximo permitido se determina

que se cumple el parámetro establecido durante la planeación de la producción para el componente de homogeneidad.

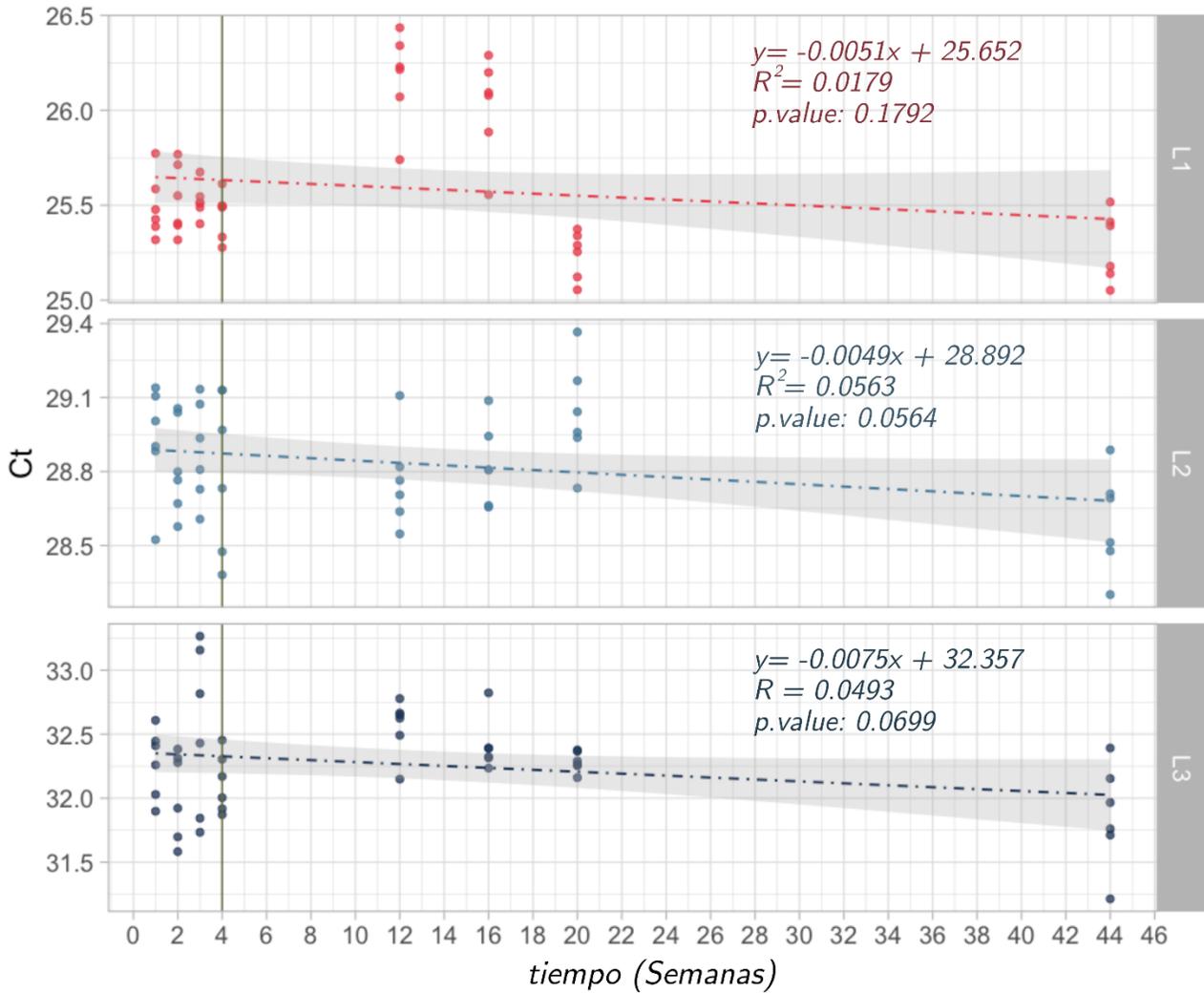
Estudio de Estabilidad – IEA SARS CoV-2

Para la evaluación de la estabilidad se empleó un estudio isócrono para los primeros 4 puntos en el tiempo evaluados, luego se estableció un diseño experimental clásico para la evaluación de estabilidad según su descrito en la sección 3.3.2, evaluando el material en los tres niveles de concentración a 4°C, tomando como referencia -70°C. Se midieron 7 puntos en el tiempo (semana 1, 2, 3, 4 y los meses 3, 4 y 5), por cada punto tiempo/temperatura se midieron dos unidades por triplicado. La Figura 52. resume los resultados obtenidos para el análisis de regresión, donde se incluyó el p-valor asociado a cada una de las regresiones para indicar si estas son o no significativas ($p < 0.05$ significativa).

En La Figura 52. se muestra un punto de corte a las 4 semanas, siendo este el periodo de ejecución del ensayo de aptitud. De acuerdo con el análisis de regresión, no se detectó inestabilidad del material en los tres niveles de concentración a 4°C durante este periodo de acuerdo con un p-valor de regresión < 0.05 , por lo que se garantizó la estabilidad del material durante el desarrollo del EA. Adicional a este estudio se realizó un estudio de estabilidad expandido para el mes (11); al igual que en el estudio de estabilidad inicial se evalúa mediante regresión si se presenta inestabilidad en el material, según el p-valor asociado a la regresión no se presenta una pendiente estadísticamente significativa por lo que no existe una correlación entre la variable de respuesta instrumental asociado a la concentración con el tiempo en el que se realizó el estudio. Se puede observar que las pendientes para los tres niveles de concentración son negativas, lo que indica un ligero cambio en los valores de Ct obtenidos, esta reducción puede ser resultado de la evaporación del material en el transcurso del tiempo, lo que aumentaría la cantidad de copias en el volumen del buffer concentrando la muestra. El componente de incertidumbre asociada a la estabilidad se determinó mediante La Ecuación 4, presentando

valores de relativos de 0.4% para el nivel alto de concentración, 0.6% para el nivel medio de concentración y 1.0% para el nivel de concentración bajo.

Figura 52. Evaluación de estabilidad del IEA SARS CoV-2 mediante Regresión Lineal



A partir de los estudios de estabilidad extendida se determinó que el material podría utilizarse como control positivo independiente del sistema de aseguramiento del laboratorio, con una validez máxima de 11 meses en los que se evaluó el MR. Una razón de este comportamiento probablemente este asociada al proceso de purificación y el tamaño del fragmento de ARN que presenta el MR-RGTM 10169 del NIST. Los factores anteriormente mencionados tienen un

impacto significativo en la estabilidad del material, ya que, al estar purificado, la presencia de RNAsas y demás elementos que puedan alterar el material están en una proporción reducida.

Caracterización del IEA SARS CoV-2

Posterior al estudio de estabilidad del material se prosiguió con la etapa de caracterización del material mediante la asignación de valor de propiedad y la estimación de su incertidumbre, para lo cual se utilizaron cinco paneles que fueron seleccionados al azar para ser medidos mediante RT-ddPCR empleando el ensayo E-Charite por triplicado en condiciones de repetibilidad. Para definir el valor del material se empleo la Ecuación 11, donde X_{car} se calculó a partir de la media de 5 viales seleccionados por nivel y los componentes asociadas a homogeneidad δ_{hom} y estabilidad δ_{stab} fueron cero.

$$X_{RM} = x_{char} + \delta_{hom} + \delta_{stab} \quad \text{Ecuación 11.}$$

La incertidumbre estándar del MR producido se calculó a partir de la combinación de los demás factores estudiados durante la producción (Estabilidad y homogeneidad), de acuerdo con la Ecuación 2 y 4.

$$u_{RM} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{hom}^2 + u_{stab}^2} \quad \text{Ecuación 12.}$$

El modelo empleado para la estimación de incertidumbre asociado a la caracterización se realizó mediante La Ecuación 13, donde d = Dilución de la muestra, V = Volumen de gotas, λ =relación de particiones positivas y negativas para la muestra analizada, esta ecuación se deriva de La Ecuación 1, descrita en la sección 1.4.2. Que desarrolla el modelo matemático empleado para ddPCR.

$$u_{C_{PTI}} = C_{PTI} * \sqrt{\left(\frac{u_{\lambda}}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_d}{d}\right)^2} \quad \text{Ecuación 13.}$$

Como se observó en la validación del método por RT-ddPCR los niveles bajos de concentración, presentan una precisión menor con respecto a muestras con niveles de concentración altos,

asociado a la estimación que se realiza mediante la distribución de Poisson, el modelo estadístico empleado para la estimación de incertidumbre mostrado en la Ecuación 11. introduce el valor λ , por lo que al observar la incertidumbre del modelo esta aumenta al disminuir la concentración de la muestra.

Tabla 26. Valor de Referencia e incertidumbres relativas del MR- Ítem Ensayo de Aptitud SARS CoV-2

Nivel	Valor asignado (copias/ μ L)	u_{char} (%)	u_{hom} (%)	u_{stab} (%)	u_{RM} (%)	U_{RM}^* (%)
Bajo	14.6	27.9	0.3	0.5	28.8	60.5
Medio	146	7.2	0.1	0.4	7.5	15.7
Alto	1417	3.9	0.2	0.6	4.5	9.4

Del proceso de caracterización, con un nivel de confianza del 95%, los niveles de concentración de número de copias bajo, medio y alto tienen un valor de concentración de número de copias de 14 ± 9 copias/ μ L, 141 ± 29 copias/ μ L y 1417 ± 220 copias/ μ L, respectivamente. Aunque la incertidumbre tiende a ser mayor, especialmente a niveles bajos de concentración, el material es adecuado para el EA considerando que: i) el EA es de tipo cualitativo, donde los laboratorios reportaron como detectado ó no detectado, ii) los laboratorios están midiendo en PCR en tiempo real, donde la respuesta instrumental está en valores de Ct/Cp.

Como forma de información adicional del material, se realizó la medición mediante RT-qPCR para los ensayos N1, N2, y RdRp, a manera de valores informativos en variable de respuesta de Ct, para conocer un estimado de los valores que presenta en material empleado esta técnica, La Tabla 27. muestra los valores de Ct de las tres muestras positivas con respuestas que oscilan entre 25 y 34 Ct, que corresponden a valore de respuesta instrumental comunes para las mediciones por qPCR. Esta información, junto con los estudios de homogeneidad y estabilidad (Figura 52.), demuestra que el material se ajusta al propósito del EA, donde cualquier clasificación errónea de las muestras positivas puede verse como una consecuencia del método de medición y no de la muestra.

Tabla 27. Valores de Ct para diferentes niveles producidos para los ensayos N1-china, N2-CDC y RdRp

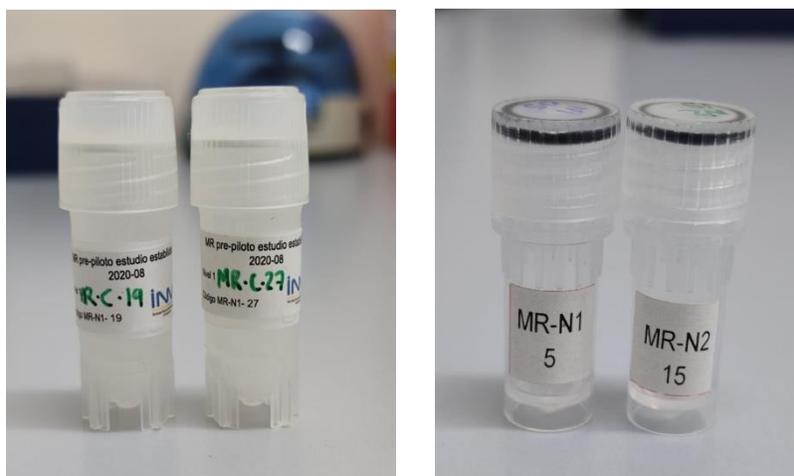
Nivel	N1	N2	RdRp	RNasa P
Alto	26.31	25.20	26.95	27.39
Medio	29.55	28.32	30.30	27.38
Bajo	32.78	32.10	33.37	27.20
Negativo-1	—	—	—	27.26

4.3.3 Producción Piloto Control Positivo de SARS CoV-2

A partir del MR EURM-019 de SARS CoV-2 se realizó la producción del piloto de MR Control positivo de SARS CoV-2. Se realizó la producción de 40 viales para los tres lotes, donde uno de estos se preparó empleando un buffer Citrato 1mM pH=6.3, preparado en el laboratorio y los dos restantes con un buffer citrato comercial, según se indica en la sección 3.3.3. Donde la evaluación y cuantificación en número de copias/ μ L se realizó con el ensayo E Charité y RdRp en modo simplex. La Figura 53. muestra la presentación final de los viales después del envasado, se empleó vinilo autoadhesivo para las etiquetas.

Figura 53. Presentación final materiales preparados

(Izquierda: Material con buffer Citrato in-house), (Derecha: Material buffer comercial Invitrogen)

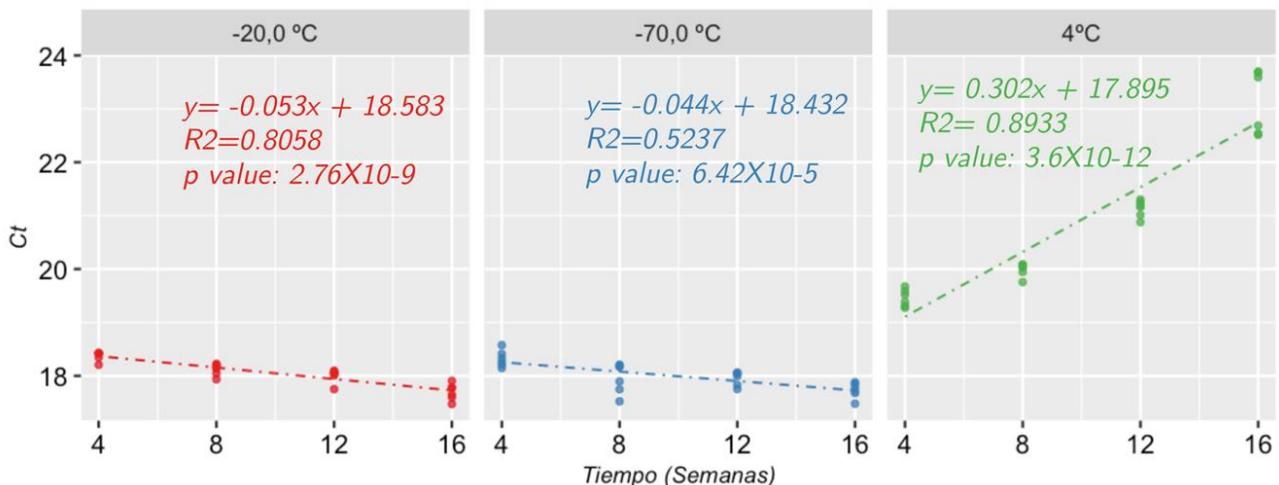


Con respecto a los resultados obtenidos para el material donde se empleó el buffer citrato in-house como diluyente (Figura 52. imagen izquierda), el buffer se cambió con el objetivo de usar

buffer estabilizante que pudiera ser preparado en el laboratorio disminuyendo el coste de la preparación de los MR. Para lograr asemejar las características presentadas por el buffer comercial.

Sin embargo al realizar los estudios de caracterización del material, este presentó inestabilidad en el plazo de tiempo evaluado de 6 meses (Figura 54), donde se observa un aumento de la respuesta instrumental Ct para la temperatura de 4°C con una pendiente positiva. Las temperaturas de -20°C y -70°C, muestran una tendencia negativa en su pendiente, y el análisis mediante regresión lineal simple para las tres temperaturas muestran un p-valor <0.05 evidenciando una tendencia de cambio del valor de Ct para las tres temperaturas, el valor de Ct esta inversamente relacionado con la concentración del material por lo sé que determina una variación en la concentración del Material. La razón de esto se debe a una posible degradación incompleta del DEPC en solución [159], [160], por lo hubo degradación del RNA de SARS CoV-2 después del envasado, por esta razón no fue considerado óptimo para la preparación del material, y se decidió continuar empleando el buffer comercial Invitrogen, AM 7001 para la preparación del Control Positivo de SARS CoV-2.

Figura 54. Estabilidad Control Positivo empleando buffer citrato in-house



En las siguientes secciones se muestra los resultados detallados de la producción del piloto del Control Positivo empleado el buffer Invitrogen, AM 7001.

Estudio de Homogeneidad – Piloto Control Positivo SARS CoV-2

Los resultados obtenidos por RT-qPCR, para los niveles 1 y 2 de acuerdo con la prueba de Levene, evidencian homocedasticidad para el conjunto de datos de ingreso, lo que induce a aplicar una prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA).

En la Tabla 28 se muestran los resultados por repetibilidad asociada y el factor de entre viales tomándolo como precisión intermedia, así como la incertidumbre asociada a cada nivel. De acuerdo con los resultados obtenidos, para el nivel alto y bajo no hay diferencias estadísticamente significativas, dado que la repetibilidad del método o Cuadrado Medio del Error es mayor que la suma de cuadrados asociada al factor o el tratamiento de los cuadrados medios entre Viales. En el nivel 2 se presenta una mayor dispersión en los resultados con respecto al nivel 1. Esto es consistente con lo evaluado en la validación del método en el cual la precisión de la variable de respuesta disminuye al bajar la concentración. Lo anterior se asocia a una menor sensibilidad en la técnica de RT-qPCR a bajas concentraciones, lo que genera como resultado una diferencia en las varianzas entre los niveles de concentración, lo que es reflejado en la incertidumbre asociada a la homogeneidad en el nivel bajo de concentración. Finalmente, la incertidumbre relativa por homogeneidad es de 0.18% para el nivel alto de concentración y 1.29% para el nivel bajo de concentración, estos valores similares a los observados para los materiales preparados a partir del MR RGTM-10169 del NIST.

Tabla 28. Evaluación de homogeneidad del Piloto Control Positivo SARS CoV-2 por RT-qPCR

Nivel	Valor de Ct	Repetibilidad	Rep. relativa	Prec. Int	Prec. Int relativa	$u_{(hom)}$ rel
Alto	26.93	0.027	0.101%	0.039	0.14%	0.18%
Bajo	32.49	0.255	0.78%	0.360	1.11%	1.29%

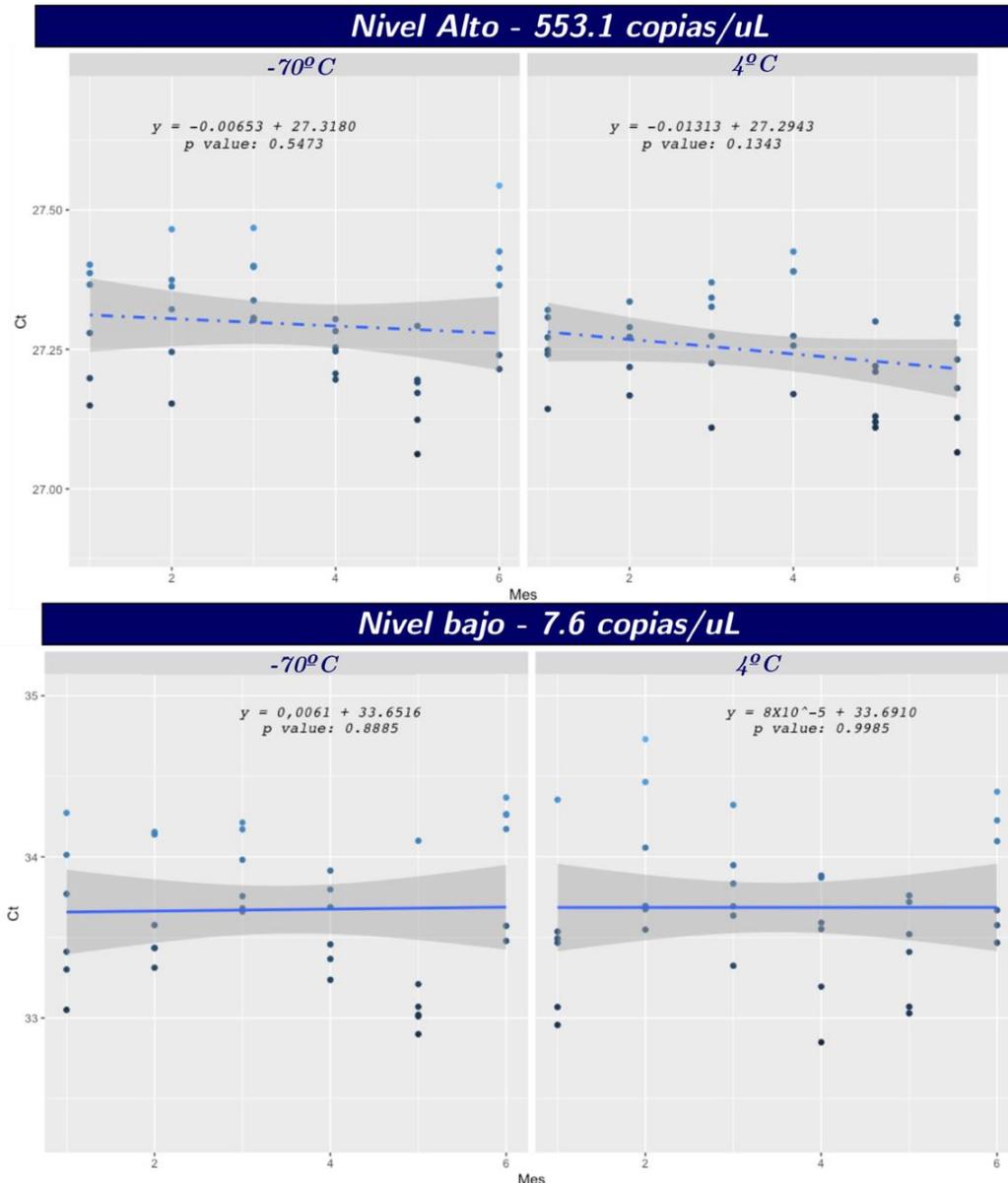
Adicional a lo anterior se realizaron mediciones por RT-ddPCR del material, con dos objetivos, por un lado, obtener los valores asociados a la incertidumbre por homogeneidad asociada a este material y por otro lado hacer una estimación de la concentración en copias/ μ L de los materiales producidos. Con relación a los valores de concentración obtenidos se estima una concentración

de 553.1 copias/ μ L para el nivel de alta concentración y de 20.4 copias/ μ L para el de baja concentración con de incertidumbres relativas por homogeneidad del 1.36% y de 6.3% respectivamente.

Estudio de Estabilidad – Piloto Control Positivo SARS CoV-2

De acuerdo con el análisis de regresión (Figura 55.), no se observa inestabilidad estadísticamente significativa teniendo en cuenta que para los dos materiales en ambas temperaturas se observan un p-valor <0.05 , para los viales de referencia a -70°C el material presenta un comportamiento constante adecuado para ser tomado como valor de referencia.

Figura 55. Estudio de estabilidad – Piloto Control Positivo SARS CoV-2



A pesar de observarse un incremento en valores de pendiente, este es insignificante con respecto a la escala de medición $<0,3Ct$ al mes, por lo que se determina como apto para el propósito del material de ser estable a $4C^{\circ}$ por un periodo de seis meses para ser empleado como control positivo en los laboratorios donde se realizan mediciones de SARS CoV-2 por RT-qPCR.

4.3.4 Producción Control Positivo de SARS CoV-2

Los MR a ser empleados como Control Positivo en mediciones de detección de SARS CoV-2 se produjeron a partir los dos Materiales empleados anteriormente, el MR RGTM 10169 de NIST y MR EURM-019 de JRC, la descripción detallada de la producción se muestra en la sección 3.3.3. Dado que ambos materiales contaban con producciones piloto que demostraron un desempeño óptimo y estabilidad deseada para el fin provisto se prepararon los materiales NIPC-1 y NIPC-3 con el MR RGTM 10169, mientras que con el MR EURM-019 de JRC se prepararon los materiales JIPC-1 y JIPC-3, cada uno de los materiales con dos niveles de concentración alto y bajo. En la Figura 56. se muestran la presentación final de los materiales y su almacenamiento por paneles, los materiales fueron distribuidos en paneles de cinco unidades, conteniendo una unidad de los materiales preparados y un vial que contenía únicamente buffer citrato 1mM $pH=6.4$ y finalmente sellados en una bolsa aluminizada.

Figura 56. Presentación final materiales preparados





Estudio de Homogeneidad –Control Positivo SARS CoV-2

La evaluación del grado de homogeneidad del material se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ANOVA, al ser una producción normalizada de la cual se tiene información obtenida por los pilotos a se estableció como incertidumbre objetivo por homogeneidad un valor $\leq 2.0\%$. En la Tabla 28 se muestran los valores de incertidumbre relativa para cada uno de los materiales producidos. Para los cuatro materiales se cumple el valor objetivo; Sin embargo, para los Materiales JIPC se presentan valores superiores a los obtenidos en su estudio piloto especialmente para el nivel de mayor concentración con un valor de 2.0%, Lo anterior se puede explicar parcialmente a la falta de homogenización durante la preparación del material, puesto que el Material JIPC-3 de menor concentración presenta valores de incertidumbre por homogeneidad menores, siendo contrario al comportamiento evidenciado para la técnica de PCR, resultado debido a que la varianza entre viales es muy superior a la repetibilidad de las mediciones.

Los materiales con codificación NIPC presentan valores de homogeneidad de 0.7% y 0.9% para los niveles alto y bajo de concentración respectivamente, estos valores son consistentes con los obtenidos en el Piloto de IEA SARS CoV-2.

A pesar de un aumento en los valores de incertidumbre por homogeneidad, el material cumple con el fin previsto del material de ser empleado como Control Positivo por los laboratorios por lo cual se continuó con la determinación del valor de la propiedad por RT-ddPCR.

Tabla 29. Evaluación de homogeneidad - Control Positivo SARS CoV-2 por RT-qPCR

Nivel	Prueba Hartley	Gran promedio	Repetibilidad	Rep. relativa	Prec. Int	Prec. Int relativa	u_{hom}
JIPC-1	Si	20.62	0,1	0,50%	0,4	1,90%	2.0%
JIPC-3	Si	29.62	0,24	0,80%	0,33	1,1%	1.4%
NIPC-1	Si	19.17	0,13	0,70%	0,02	0,10%	0.7%
NIPC-3	Si	31.86	0,26	0,80%	0,11	0,40%	0.9%

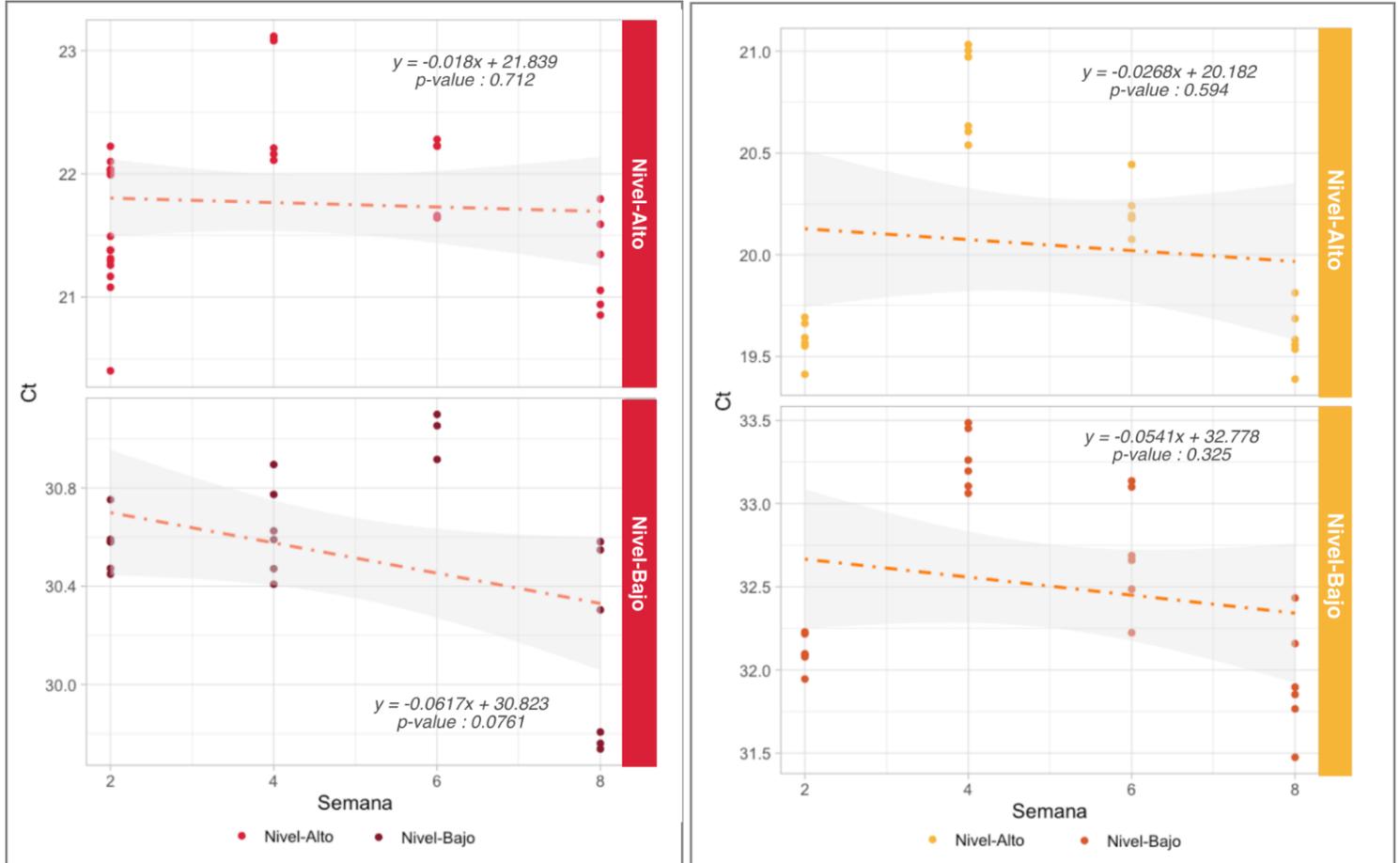
Estabilidad – Control Positivo SARS CoV-2

Con relación al estudio de estabilidad de los Materiales producidos se determinó que no hay una tendencia significativa entre la respuesta instrumental (Ct) y el tiempo, lo que coincide con el análisis de regresión simple, tomando el p-valor < 0.05 como valor crítico. Los cuatro materiales producidos presentan valores inferiores a este (Figura 57.), por lo que se concluye que los materiales conservaron el valor de la propiedad durante las 8 semanas que se realizó el estudio.

Teniendo en cuenta el uso previsto del Material de ser empleado como insumo en la relación de un taller de transferencia y que adicional a esto sea empleado como control positivo por los laboratorios en sus mediciones de rutina se establece como adecuado para este fin de acuerdo con la estabilidad

Finalmente, con relación a la incertidumbre por estabilidad se estimaron a partir de La Ecuación 4., obteniendo como resultado los valores de 0.40 (1.9%), 0.43 (1.32%) para los material NIPC-1 y NIPC-3, y de 0.38 (1.8%) y 0.43 (1.4%) para los materiales JIPC-1 y JIPC-3.

Figura 57. Estudio de Estabilidad -Control Positivo SARS CoV-2



Caracterización – Control Positivo SARS CoV-2

A partir de un análisis de varianza de un factor se estableció el valor de referencia para cada uno de los niveles evaluados empleado el ensayo N1-china y a partir de la dispersión de los resultados obtenidos se estimó un componente de precisión asociado a la medición por RT-ddPCR, el que al ser mayor que el componente obtenido en el estudio por RT-qPCR, se estableció como el componente de homogeneidad en la asignación de valor. En la asignación de valor no se empleó los valores de incertidumbre por estabilidad dado que fue evaluado por RT-qPCR.

Finalmente, se hizo la estimación de la incertidumbre a partir de las incertidumbres asociadas al modelo empleando la Ecuación 11. La Tabla 30. presenta los resultados del análisis de varianza

15 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

para la cuantificación por RT-ddPCR y la estimación de la incertidumbre para cada uno de los niveles preparados.

Tabla 30. Caracterización MR Control Positivo SARS CoV-2

Nivel	Rep.	Rep. Relativa	Prec. Int	Prec. Int relativa	u_{mod}	u_{hom}	$u_{MR\ rel}$	$u_{MR\ abs}$
JIPC-1	590	1.3%	8637	19.0%	4.68%	1.96%	19.75%	8957.67
JIPC-3	6	6,4%	7	7,4%	9,06%	1,21%	13,40%	13.31
NIPC-1	3359	2,0%	3740	2,2%	3,43%	0,39%	4,56%	7703.82
NIPC-3	3	9,7%	1	4,5%	14,78%	0,86%	18,28%	6.026

ASIGNACIÓN DE VALOR						
Lote	Valor asignado Copias/uL	u combinada	u relativa	k	U	U relativa
JIPC 1	45344	8958	19,8%	2,00	17900	39%
JIPC 3	99	13	13,4%	2,16	29	29%
NIPC 1	169019	7704	4,6%	2,20	16956	10%
NIPC 3	33	6	18,3%	2,16	13	39%

Con relación a la asignación de valor se obtuvieron los valores de 45344 ± 8958 copias/ μ L, 99 ± 13 copias/ μ L para los materiales con codificación JIPC 1-3. El valor de precisión intermedia obtenida para el material JIPC-1 es muy superior a los valores de repetibilidad, por lo que aumentó significativamente la incertidumbre total del MR, al igual que lo visto en el estudio de homogeneidad por RT-qPCR que para este nivel la homogenización del material no fue suficiente lo que influyo significativamente en una variación de la concentración de los viales. La asignación de valor para los materiales NIPC-1 e NIPC-3 fue de 169019 ± 7704 copias/ μ L y 33 ± 6 copias/ μ L. Los resultados obtenidos por este materiales son consistentes con los materiales anteriormente producidos.

Valores informativos por RT-qPCR

Debido a que los laboratorios emplean más de una diana de detección en sus ensayos, y que el material fue caracterizado únicamente empleado el ensayo N1-china, se realizó la medición del material con las dianas E Charité, Spike y RdRp, únicamente para obtener información del comportamiento de los materiales producidos con estas dianas de detección. En la Tabla 31, se muestran los resultados obtenidos, los valores de Ct son consistentes entre ellos y no existe una variación superior a una unidad de Ct, lo que indica valores muy próximos de concentración.

Tabla 31. Valores informáticos de Ct para MR Control Positivo SARS CoV-2

PROPIEDAD	Gen E	Gen S	Gen RdRp
Valor Ct RT-PCR JIPC 1	21.04 ± 0.07	20.66 ± 0.09	-
Valor Ct RT-PCR JIPC 3	29.76 ± 0.04	29.45 ± 0.19	-
Valor Ct RT-PCR NIPC 1	19.55 ± 0.18	-	20.36 ± 0.06
Valor Ct RT-PCR NIPC 3	32.06 ± 0.34	-	32.47 ± 0.24

4.4 Actividades de Transferencia

A partir de los materiales producidos y descritos en las secciones 3.4.1 y 3.4.2, se realizaron dos actividades de transferencia y mejora para los laboratorios encargados de la detección de SARS CoV-2 por PCR. La organización y gestión para el desarrollo de ambas actividades se realizó a través del Grupo de Ensayos de Aptitud del INM, en conjunto con el INS, como coordinador de la Red Nacional de Laboratorios.

En las siguientes secciones se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de estas actividades.

4.4.1 Ensayo de Aptitud para la detección de SARS CoV-2 por RT-qPCR

Los laboratorios participantes recibieron un panel del material IEA de SARS CoV-2, compuesto por cinco viales, tres de estos son muestras positivas de SARS CoV-2 y dos muestras negativas sin secuencia de RNA del virus. La evaluación de cada ítem es binaria positivo/negativo y el desempeño global se evaluó con base en la concordancia entre los resultados del laboratorio participante y el laboratorio de referencia de acuerdo con La Ecuación 16, donde el número de

15 FORTALECIMIENTO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS QUE REALIZAN DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR PCR A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS METROLÓGICAS PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN

soluciones asignadas correctamente corresponde a las soluciones cuyo resultado sea igual al valor de referencia.

$$\text{Resultado Laboratorio} = \frac{\text{Número de Muestras asignadas correctamente}}{5} \times 100 \quad \text{Ecuación 14.}$$

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

El EA realizado fue de carácter cualitativo, por lo cual se tuvieron en cuenta los lineamientos establecidos en el numeral 11 de la norma NTC ISO 13528:2017 “Diseños y análisis de programas de ensayos y aptitud cualitativos”. En concordancia, el valor asignado de los materiales empleados se determinó por el Instituto Nacional de Metrología ungiendo como laboratorio de referencia.

Dado que los laboratorios participantes reportaron resultados con diferente número de ensayos y dianas moleculares, la evaluación de desempeño se hizo para cada gen o ensayo que reporto cada laboratorio. Los valores de Ct/Cp/Cq reportados por los laboratorios participantes no afectaron su evaluación de desempeño del criterio cualitativo, pero si se tuvo en cuenta para realizar un análisis descriptivo que permitió brindar una idea general del comportamiento de estas variables en cada gen/ensayo.

En la actividad se registraron 124 laboratorios, de los cuales 121 reportaron resultados, la distribución del tipo de participantes fue: organismos públicos (33%) y privados (67%). En cuanto a su naturaleza, se pueden clasificar como laboratorios médicos (41%), Hospitales (18%), Universidades (23%), Laboratorios de Salud Pública que apoyan el control de vigilancia en el país (12%), centros de investigación (5%) y laboratorios de referencia (3%).

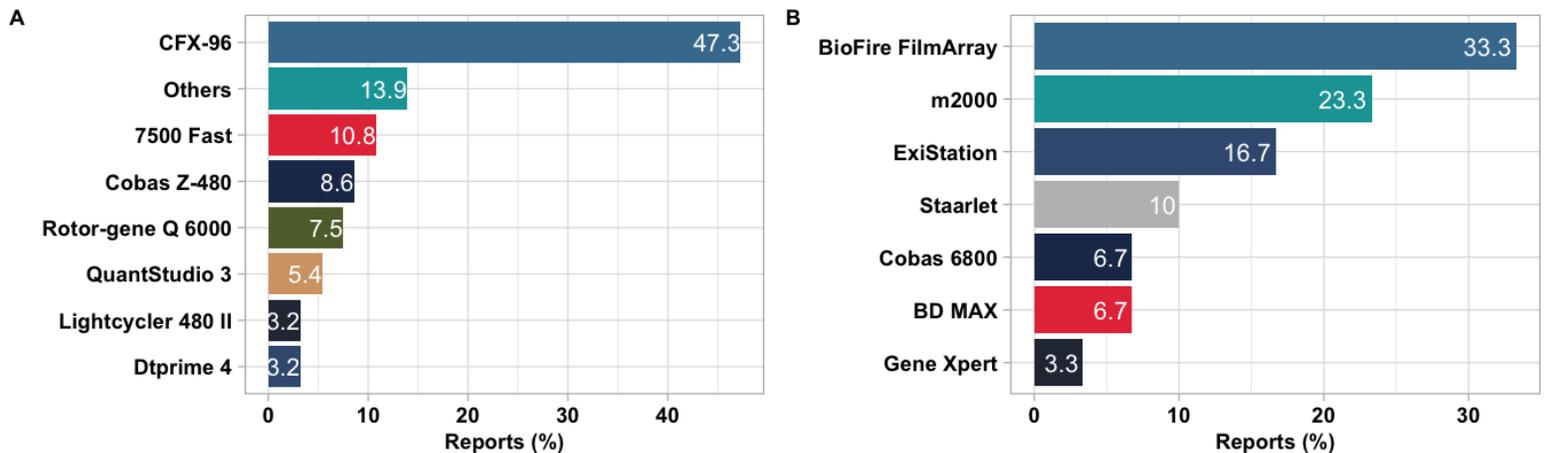
Plataformas de RT-qPCR

En cuanto a las plataformas de medición, el 74,4 % de los laboratorios participantes utilizaron plataformas de medición abiertas, que solo aplicaban la reacción de transcripción inversa y amplificación de la muestra, los cuales podrían considerar como método tradicionales de PCR, y donde el volumen de entrada de la muestra varía según los protocolos comerciales o implementados. El 25,6 % restante utilizó plataformas cerradas, donde la mayoría de los laboratorios prepararon una dilución de cada muestra contenida en el panel hasta un volumen final de 900 μ L, y de cada dilución tomaron el volumen requerido por su plataforma de medición, que osciló entre 250 μ L a 900 μ L.

Las plataformas abiertas empleadas se muestra en la Figura 58, las más comunes fueron la CFX-96 (Bio-Rad), seguida del sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), Cobas Z-480 (Roche), Rotor-gene Q 6000 (QIAGEN), QuantStudio™3 qPCR System (ThermoFisher Scientific), The LightCycler® 480, DTprime (DNA-Technology) y otros como StepOne™ Real time PCR system (ThermoFisher Scientific), AriaMx Real time PCR system (Agilent Technologies), Mini 8 Plus Real time PCR system (Coyote Biosciences), QuantStudio™ 5 Real time PCR system (Thermo Fisher Scientific), Line Gene-9660 (Bioer Technology), INGENIUS (ELITech) y SaCycler-96 Real time PCR system (Sacace Biotechnologie).

En cuanto a las plataformas cerradas, las más utilizadas fueron BioFire® FilmArray® Torch 2.0 (Biomérieux), ExiStation: ExiPrep 48, Exicycler 96 (Bionner) m2000 Real-time System (Abbott Molecular), Starlet (Seegene), BD max (BD), Cobas 6800 (Roche Diagnostics) y Gene Xpert (Cepheid)

Figura 58. Distribución de la plataforma de medición utilizada por los laboratorios, para plataformas abiertas (A) y cerradas (B)



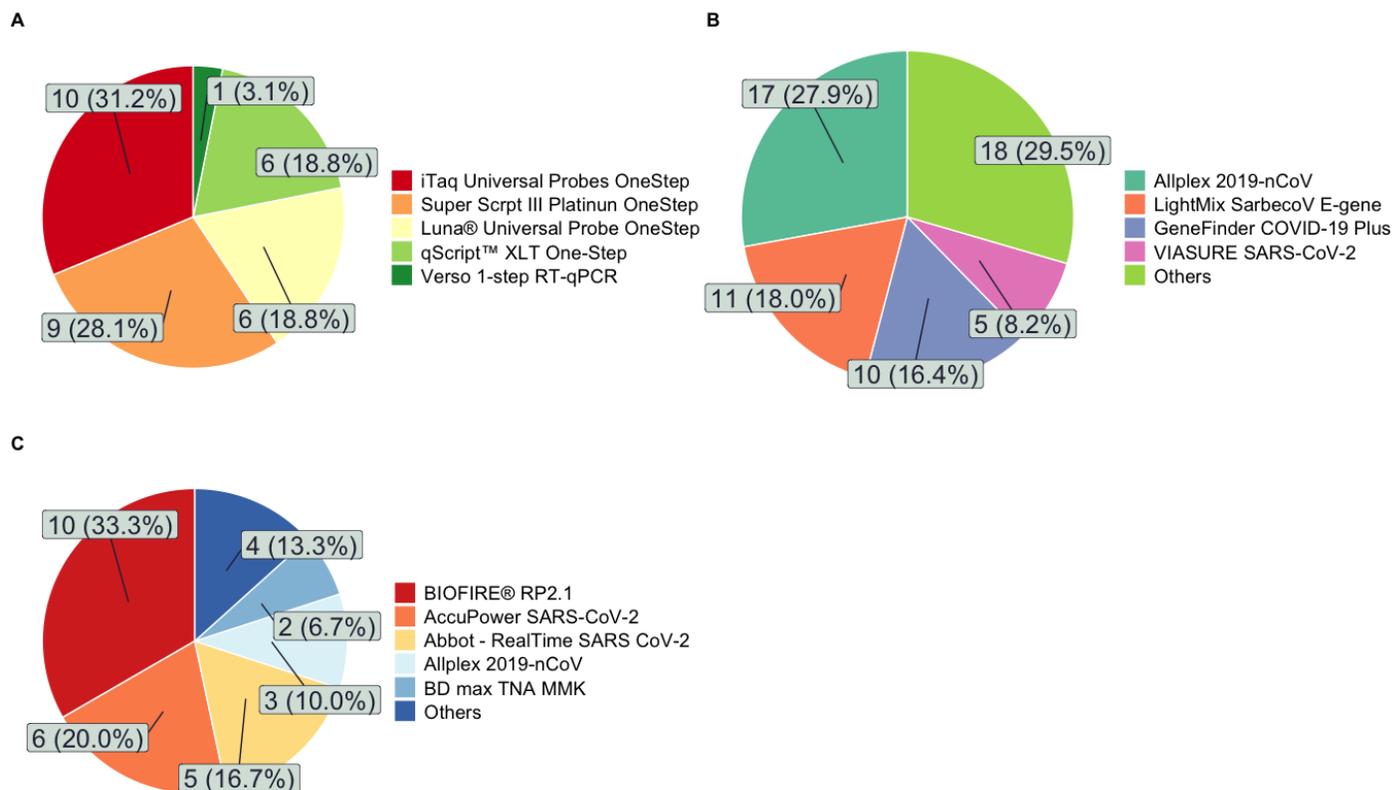
Para la detección de SARS-CoV-2, todos los laboratorios (con plataformas abiertas y cerradas) utilizaron RT-PCR en un solo paso. Los kits de RT-qPCR utilizados se clasificaron en tres categorías diferentes (Figura 59, como A, B y C), :

A. Protocolos internos: Compuestos por ADN polimerasa, ARN retrotranscriptasa, buffer, nucleótidos y cofactores, los cebadores y las sondas vienen por separado y son seleccionados por el laboratorio, generalmente de los protocolos informados por la OMS. Este tipo de kit fue utilizado por el 25% de los laboratorios participantes, y los kits más informados fueron: iTaq Universal Probes One-Step Kit (BioRad), SuperScript™ III One-Step RT-PCR system with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), Luna® Universal Probe One-Step Kit (NEB), qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix (Quantabium) y Verso 1-step RT-qPCR Kit (Thermo Scientific).

B. Uso de kits comerciales para la detección de SARS-CoV-2: Fuerón empleados por laboratorios con plataformas abiertas de medición, el kit contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación, con las condiciones especificadas en cada uno. Este tipo de kit fue utilizado por el 51% de los laboratorios participantes y los kits más utilizados fueron: Allplex™ 2019-nCoV Assay (Seegene), seguido de LightMix® SarbecoV E-gene plus (TIB MOLBIOL), kit GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp (GeneFinder), kit de detección de PCR en tiempo real VIASURE SARS-CoV-2 (CerTest Biotec) entre otros los cuales con menor uso dentro de la actividad.

C. Kit's comercial para la detección del SARS-CoV-2 para plataformas cerradas: Tienen un funcionamiento similar a las desarrolladas para plataformas abiertas. Este tipo de kit fue utilizado por el 24% de los laboratorios participantes y los más utilizados fueron: Panel BioFire® Respiratory 2.1 (RP2.1) de la casa matriz Biomérieux, AccuPower® SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Kit de Bioneer, Ensayo Abbott RealTime SARS CoV-2 de la casa matriz Abbott Molecular, Reactivos BD SARS-CoV2 para el sistema BD MAX™ (BD) entre otros con menor uso dentro del ensayo.

Figura 59. Distribución de los principales fabricantes de plataformas cerradas utilizadas por los laboratorios, A. Protocolos Internos, B. Kits comerciales para la detección de SARS CoV-2 en plataformas abiertas de PCR, C. Kits Comerciales para plataformas de PCR cerradas.

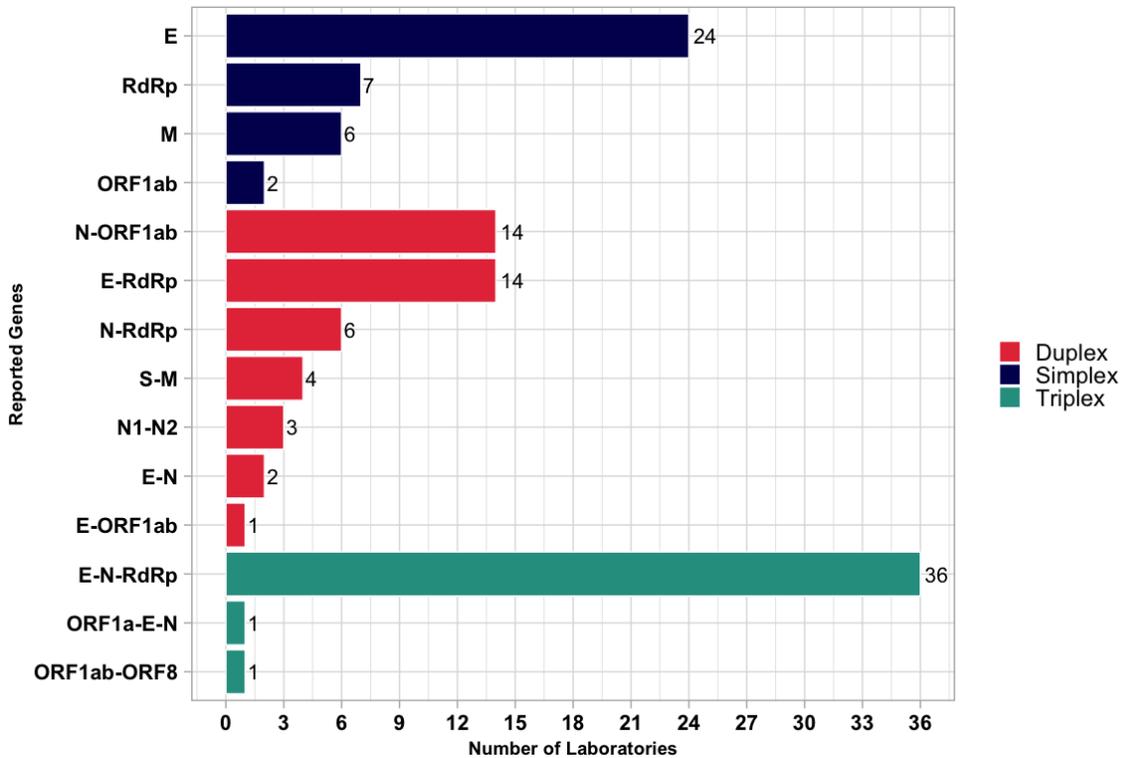


El uso de metodologías por protocolos internos tiene la ventaja de disminuir los costos de la medición, así como tener la ventaja de adaptar los protocolos según las necesidades del laboratorio y la instrumentación con la que se cuenta. Sin embargo, la facilidad que ofrecen los kits de detección hace que estos tengan un mayor uso por parte de los laboratorios con equipos de detección abiertos, que correspondió al 51% de los laboratorios participantes. En el caso de las plataformas cerradas, estas en su mayoría están ligadas a los kits que ofrecen las casas comerciales y que garantizan su funcionamiento en estas, por lo que no se reportó el uso de metodologías internas.

En referencia a las dianas de ARN empleadas por los participantes los resultados son mostrados en la Figura 60. El 32,2 % de los laboratorios reportaron un solo gen, siendo el gen E el más frecuente seguido de la región RdRp y el gen M, el 36,4% reportó dos genes en ensayos dúplex,

siendo E-RdRp y N-ORF1ab los más frecuentes, y el 31,4% restante de laboratorios reportaron tres genes, siendo E-N-RdRp el ensayo triplex el predominante.

Figura 60. Distribución de genes reportados por los laboratorios participantes del EA SARS CoV-2



La diversidad de dianas con las que son reportados los resultados está ligadas a la diversidad de kits empleados, como se discutía anteriormente, donde la mayoría de los kits comerciales están compuestos por ensayos en modalidades de amplificación tipo Multiplex donde se analiza más de una diana de detección.

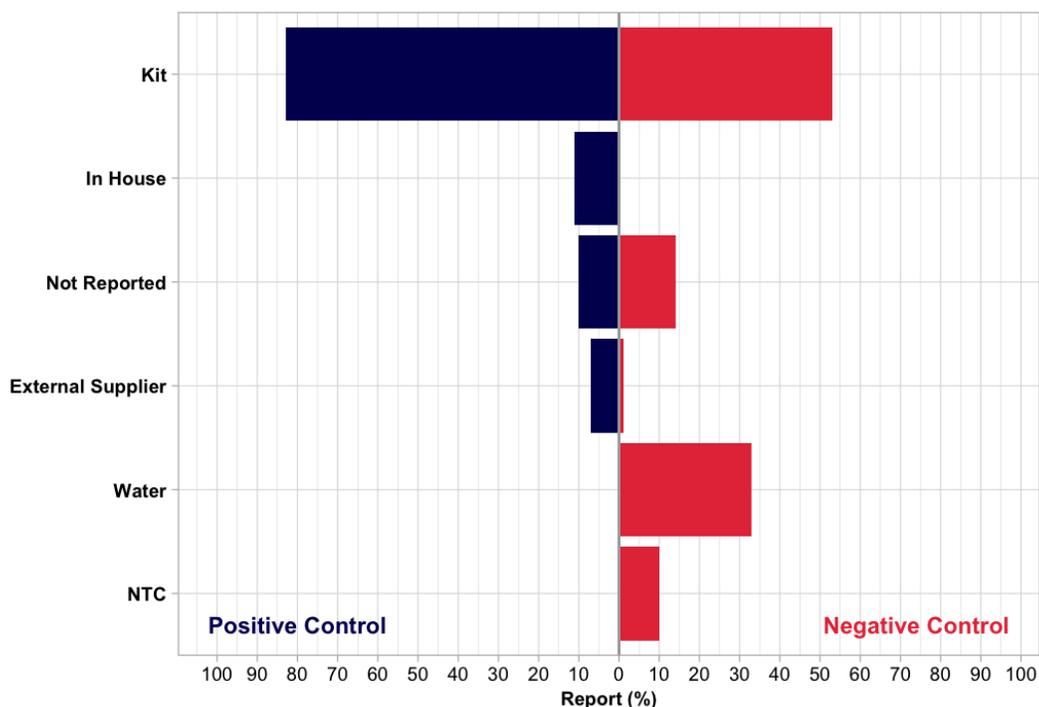
El gen de la RNasa P humana, utilizado como control interno en la mayoría de los ensayos comerciales, fue informado solo por 17 laboratorios. Sin embargo, la evaluación del desempeño de los laboratorios se realizó con base únicamente en la detección de genes virales.

Controles empleados

De los laboratorios participantes, 101 reportaron el uso de controles positivos, según métodos de medición implementados: 72,1% de los laboratorios utilizaron el control positivo incluido en el kit comercial. Para los protocolos internos, el 12,6% utilizó controles desarrollados internamente y el 6,3% controles adquiridos de un proveedor externo o diferente del fabricante del kit (NIST, INS, fabricantes como SeraCare, Eurofins y Vircell) (Figura 61, barras azules), el 4,5 % utilizó controles que cubren todo el procedimiento de medición (Extracción-RT-amplificación), el 11,7 % utilizó controles que cubrían la RT-amplificación, el 33,3 % utilizó controles que cubrían solo la amplificación, el 2,7 % utilizó diferentes controles con especies distintas al SARS-CoV-2 que cubre todo el procedimiento de medición. El 47,7% restante no especifica el paso del procedimiento de medición que cubre el control.

Como se observa en los resultados, el uso de controles positivos está depende principalmente de su presencia en el Kit comercial empleado, comúnmente la naturaleza de este no se especifica ni se tiene información detallada del mismo, lo que representa que no existe trazabilidad en los resultados obtenidos a partir de estos.

Figura 61. Controles Reportados por los participantes del EA SARS CoV-2



En cuanto a los controles negativos, los laboratorios utilizaron diferentes materiales. El 46,8 % utilizó el control negativo incluido en el kit comercial, el 29,7 % utilizó agua libre de nucleasas, el 1,8 % utilizó controles de proveedores externos o diferentes a los fabricantes del kit y el 9,0 % utilizó una NTC que no especifica su identidad (Figura 61), barras rojas).

Evaluación de Desempeño de los participantes del EA

La evaluación del desempeño en la prueba de competencia SARS-CoV-2 se realizó para cada ensayo informado por cada laboratorio participante de acuerdo con los criterios de evaluación seleccionados. Del total de participantes (121), 119 (98,3%) laboratorios tuvieron un desempeño satisfactorio en los diferentes ensayos informados (Figura 62, barras verdes), es decir asignó correctamente al menos cuatro de los cinco materiales presentes en el panel. Únicamente el 1,7 % restante tuvo un desempeño insatisfactorio errando en la asignación de menos dos muestras del panel (Figura 62, barra roja).

Figura 62. Desempeño de los laboratorios participantes de EA SARS CoV-2 según el gen empleado

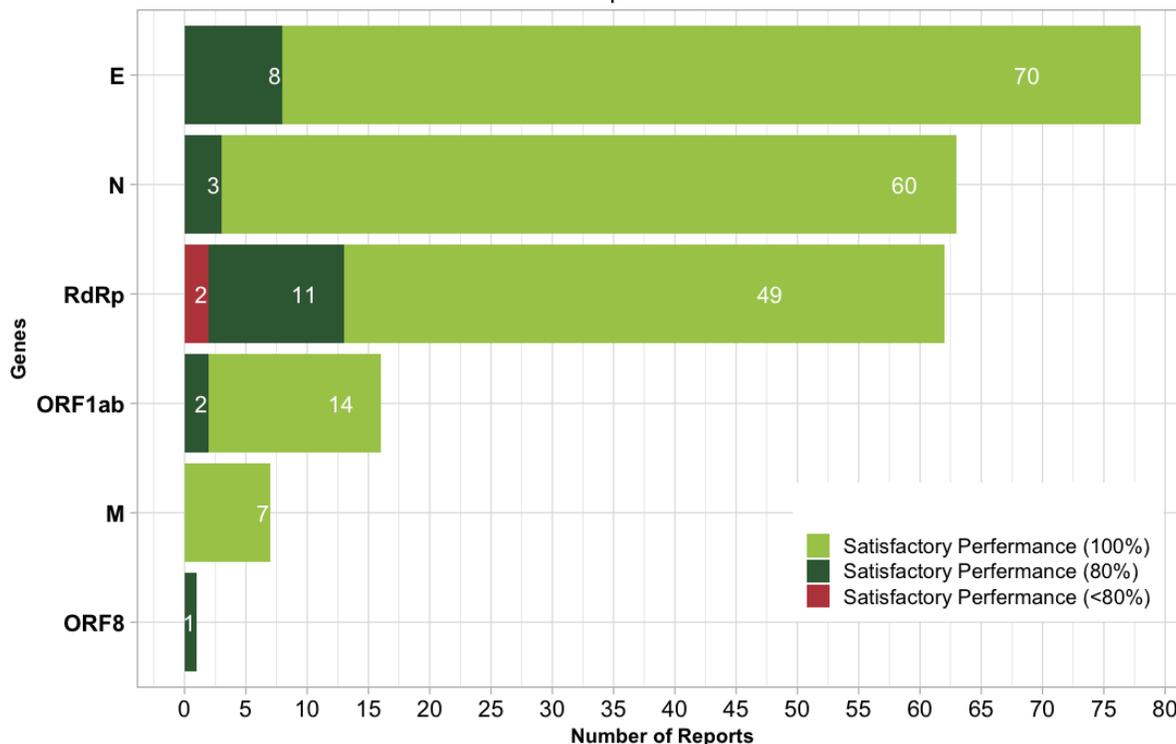
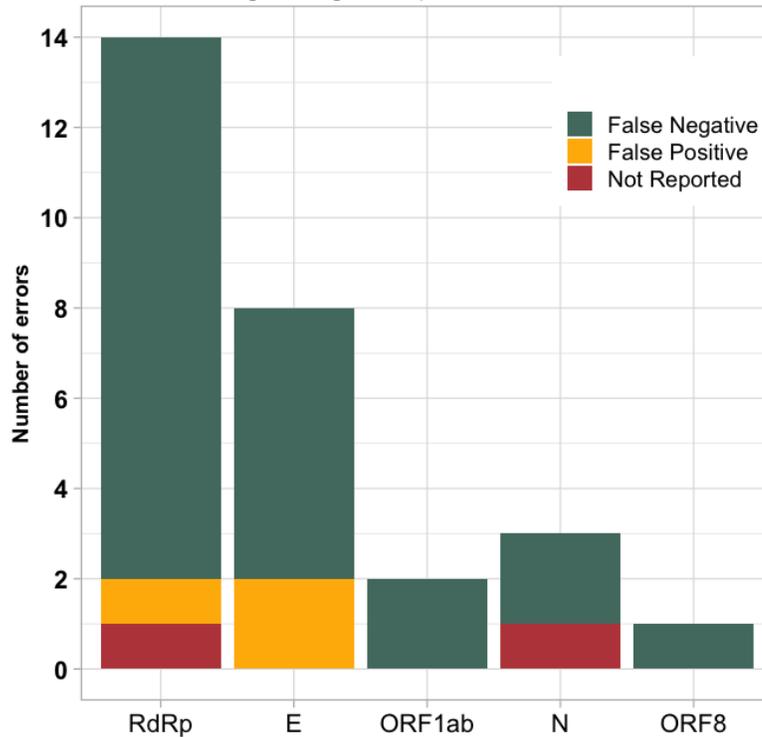


Figura 63. Principales fuentes de error de los laboratorios participantes de EA SARS CoV-2 según el gen empleado



La razón de la asignación errónea por parte de los laboratorios más frecuente fue la clasificación incorrecta de la muestra positiva incurriendo en un falso negativo, principalmente para el material con menor concentración de número de copias (14 copias/ μL), especialmente para ensayos de genes RdRp, E y N, con una frecuencia del 75%, 75 % y 67%, respectivamente (Figura 63). Los falsos positivos correspondientes a la clasificación positiva para una muestra negativa posiblemente por procesos de contaminación o carry over, y los resultados no informados fueron las otras causas de error identificadas

Límites de Detección reportados por los participantes del EA

Con relación a los LoD informado por los laboratorios fue en su mayoría es la información proporcionada en el kit de RT-PCR, en algunos casos el valor obtenido por procesos de verificación del método. La Tabla 32 presenta los resultados reportados por los laboratorios, evidenciando una gran variedad de valores y unidades de los cuales resalta copias/ μL , copias/mL, copias/reacción, equivalentes genómicos/mL, μM , ng/ μL y valores de Ct.

Algunos de las unidades reportadas, son probablemente no factibles desde el punto de vista técnico, en otros, es difícil transformar o incluso interpretar unidades de concentración como ng/ μ L y uM sin tener información clara del del peso molar de las dianas empleadas. En algunos casos, algunos protocolos reportaron un valor de respuesta instrumental, como el Ct, como el LoD, esto puede estar ligado al establecimiento de un punto de corte para la técnica de qPCR al asignar como positiva o negativa una muestra haciendo más difícil su transformación. Sumado a esto el reporte de valores de Ct requiere obligatoriamente el uso de materiales de referencia para la construcción de curvas de calibración. Todo esto refleja una falta de armonización entre los diferentes productores de Kit's para la detección de SARS CoV-2. La interpretación del LoD permite a los laboratorios ser conscientes de la cantidad mínima de secuencia de virus de ARN que sus métodos pueden detectar y permite la estimación de la probabilidad de cometer errores de tipo I o II.

Tabla 32. Límites de Detección reportado por los laboratorios participantes del EA SARS CoV-2

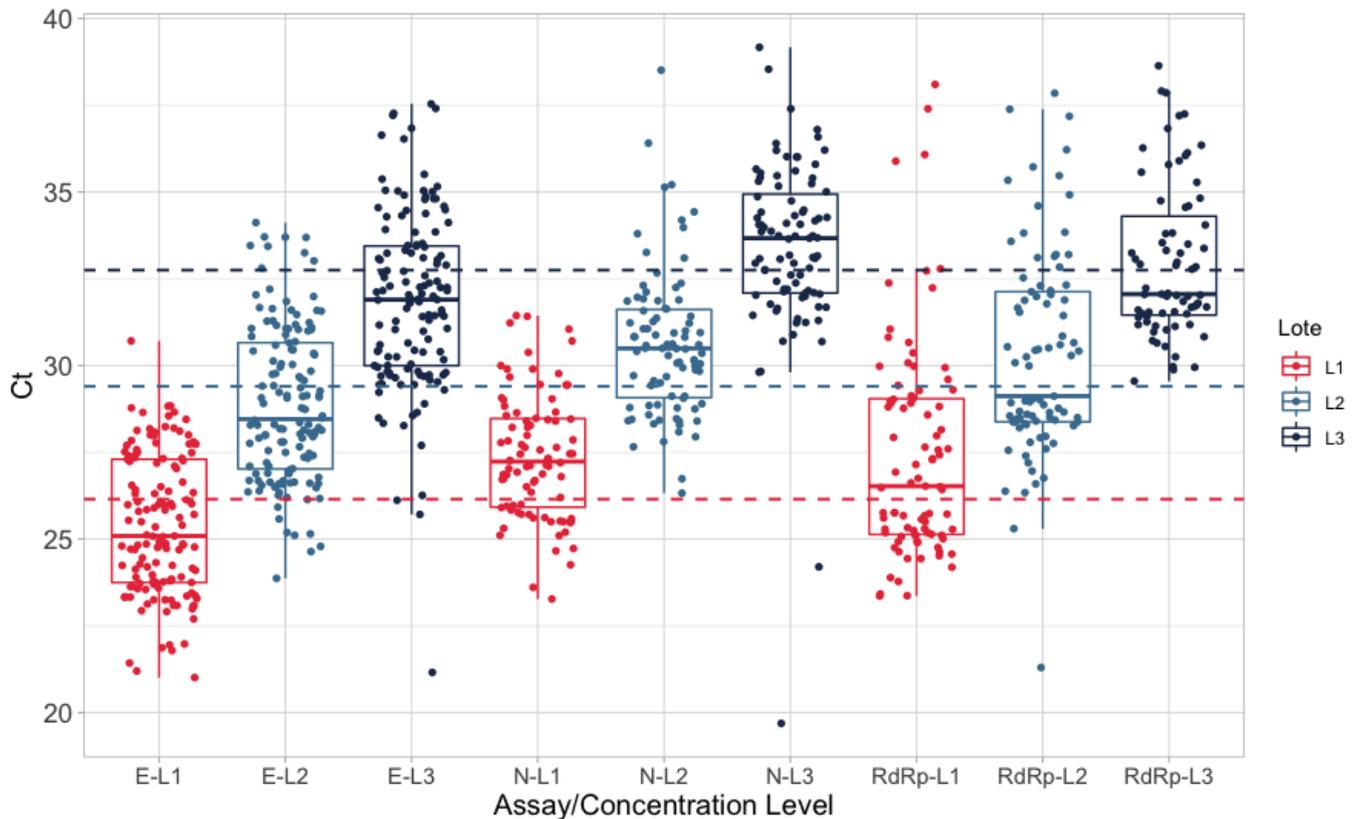
Unidad	Intervalo	Unidades Reportadas
Copias/reacción*	3.4 - 100	43%
Copias/mL	4.167 - 2000	19%
Ct	35 - 40	16%
Copias/ μ L	0.33 - 10	6%
GE/mL	40	2%
ng/ μ L	$1,0 \times 10^{-7}$	1%
μ M	$1,0 \times 10^{-6}$	1%
NA	-	12%

En referencia al volumen utilizado por los laboratorios participantes para plataformas abiertas de PCR, oscila entre 2 a 10 μ L por reacción de RT-PCR, equivalente a 28 a 140 copias por reacción de RT-PCR aproximadamente para el nivel de menor concentración. La mayoría de los laboratorios utilizaron 5 μ L de solución de los Materiales equivalente a 70 copias por reacción para el nivel inferior de concentración, teniendo en cuenta esto los métodos reportados por laboratorios participantes estaban en capacidad de detectar todos los materiales presentes en el panel.

Resultados semicuantitativos del EA

Teniendo en cuenta que la naturaleza de la actividad era netamente cualitativa se pidió a los laboratorios el reporte de las respuestas instrumentales de RT-qPCR en valores de Ct/Cp/Cq, el valor reportado no afectó su evaluación de desempeño y únicamente se empleó para dar cubrimiento al comportamiento de los métodos frente al material. Algunos de los laboratorios reportaron un solo valor de respuesta instrumental, otros reportados dos o tres replicas, para los diferentes ensayos evaluados.

Figura 64. Diagrama de cajas y bigotes de valores de Ct obtenidos por los laboratorios para el IEA con los genes E, N y RdRp



En la Figura 64. se muestra un diagrama de cajas y bigotes que brinda información de la distribución de los resultados de Ct obtenidos por los laboratorios, se observa cómo, de manera general, los valores asociados a la respuesta instrumental obtenidos por los laboratorios para

cada nivel, presentan una distribución similar para los genes evaluados, sumado a esto en la Figura se muestra con líneas punteadas el valor de referencia obtenida durante la caracterización del material, siendo esta consistente con los valores reportados por los participantes. También se observan algunos valores extremos reportados por los laboratorios, especialmente para los genes N y RdRp, varios de los cuales no parecen tener correlación con la concentración de la solución medida

En el caso de plataformas cerradas, dado que los laboratorios utilizaron diferentes volúmenes de mayor dilución, y teniendo en cuenta que estas plataformas desarrollan un proceso de extracción de ARN, no existe correlación entre los resultados cuantitativos en términos de Ct y niveles para el grupo. de laboratorios participantes.

Finalmente de acuerdo con los valores mostrados en la Figura 64, se realizó un análisis ANOVA y Tukey para el nivel de concentración con el objetivo de evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los valores reportados para cada uno de los ensayos, obteniendo que existe diferencia significativa especialmente para el gen E en todos los niveles, (No para N y RdRp). Además el gen E muestra la mayor dispersión y N la menor en los tres niveles de concentración, aunque ambos genes están en el mismo fragmento de ARN en el material fuente de ARN, la dispersión podría estar asociada con la accesibilidad de los primer a sitios específicos en la plantilla de ARN. También se presentaron algunos valores extremos de Ct los que fueron descartados mediante la prueba de Grubbs para valores atípicos, dado que no parecen tener ninguna correlación con la concentración de la solución medida especialmente para los genes N y RdRp, sin embargo, no afectaron la evaluación de los laboratorios. A pesar de las diferencias anteriores y teniendo en cuenta que los datos provienen de diferentes plataformas de medición, ensayos implementados ya sean comerciales o internos, el tipo de amplificación dada en los ensayos: simplex, dúplex o incluso triplex, existe una coherencia general entre los valores de Ct reportados por los laboratorios, que pueden verse como un primer paso en un proceso de armonización basado en este caso en el material de referencia utilizado como un Item de Ensayo de Aptitud.

4.4.2 Taller de transferencia técnica para mediciones de SARS-CoV-2 por RT-qPCR

El objetivo planteado en el desarrollo de esta actividad de transferencia y mejora no pretendió evaluar el desempeño técnico de los laboratorios, por el contrario, correspondió a una actividad de apoyo técnico dirigida a los laboratorios. La actividad propuesta fue la construcción de curvas de calibración a partir de alguno o ambos materiales (NIPC, JIPC) empleando el material NTC como diluyente, y su evaluación mediante RT-qPCR.

En la actividad realizada participaron 38 laboratorios de los 40 invitados inicialmente, estos reportaron sus resultados de medición, asociados a la cuantificación de cada una de las soluciones del material JIPC o NIPC. A partir de los resultados reportados por los laboratorios, valores de respuesta cuantitativos de RT-qPCR, y demás características de medición, fueron depurados y procesados según la información de las diluciones realizadas por los laboratorios.

Tabla 33. Genes reportado por los laboratorios en a ejecución del taller de SARS CoV-2

Material	Laboratorios	E	N1-china	N2-CDC	RdRp	OR1ab
NIPC	26	17	12	2	14	3
JIPC	10	11	-	-	3	-
NIPC/JIPC	2	-	-	-	-	-

El 68% de los laboratorios midió el material NIPC, con las dianas E, N, N2, RdRp y Orf1ab; el 26% uso JIPC con las dianas E y N; y el 5% reportaron datos para ambos materiales. El gen E más reportado es E seguido de RdRp y N (Tabla 33).

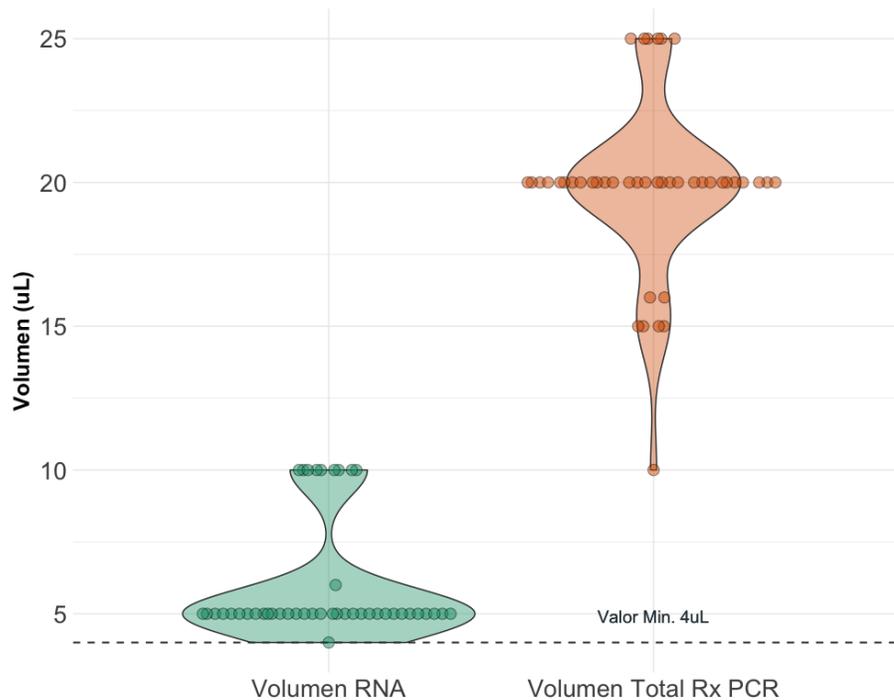
A partir de los resultados reportados por los laboratorios se determinaron las siguientes características relacionadas con la implementación de los diferentes protocolos para la detección del virus SARS-CoV-2 por RT-PCR como método de referencia:

Volumen total de reacción de RNA empleado en la PCR

La Figura 65 presenta la distribución del volumen de RNA, así como de mezcla de reacción reportado por los laboratorios, el primero varía de 4 μ L hasta 10 μ L, siendo 5 μ L el volumen más ampliamente utilizado por los laboratorios con 30 laboratorios reportando este valor. En relación con el volumen total, el intervalo de volúmenes empleado se encuentra entre los 10 μ L

y 25 μL , el volumen total de mayor uso en los métodos de amplificación utilizados por los laboratorios es de 20 μL , seguido de 15 μL , Únicamente un laboratorio reporto el uso de 10 μL como volumen total y 5 laboratorios el volumen de 25 μL .

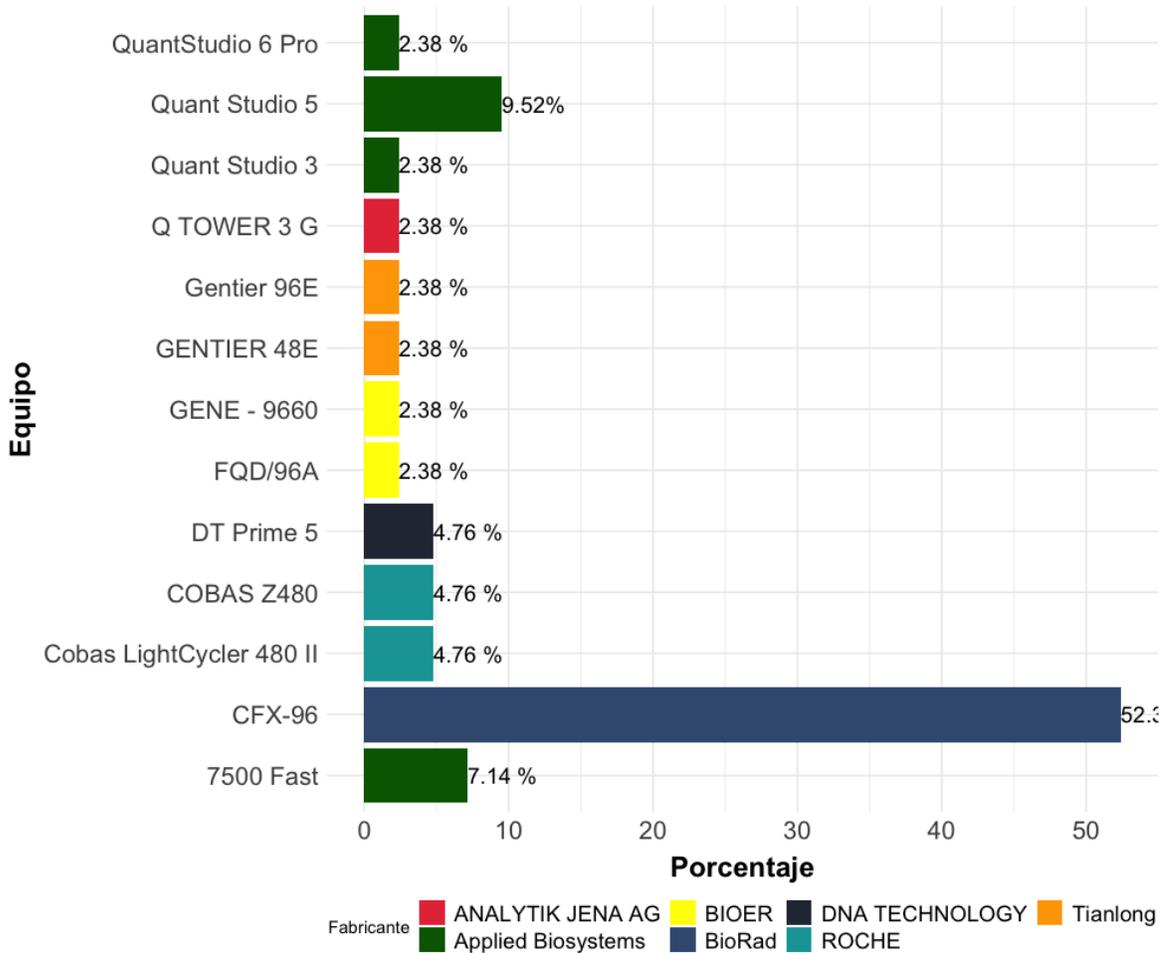
Figura 65. Volumen de RNA y volumen total de reacción de PCR empleada.



Plataformas de medición por PCR

La distribución de plataformas de PCR para la amplificación y detección de las secuencias de SARS CoV-2 se presenta en La Figura 66 el 52.4% de los laboratorios participantes en el taller emplearon la plataforma CFX96 de BioRad, seguidos de las plataformas QuantStudio 3, 4, 6 Pro y FAST 7500 de Applied Biosystems, con un 21.4%. el 26.4% restantes de los laboratorios (10) emplearon plataformas de Roche, DNA Technology, Analytic Jena, Bioer, y Tianlong.

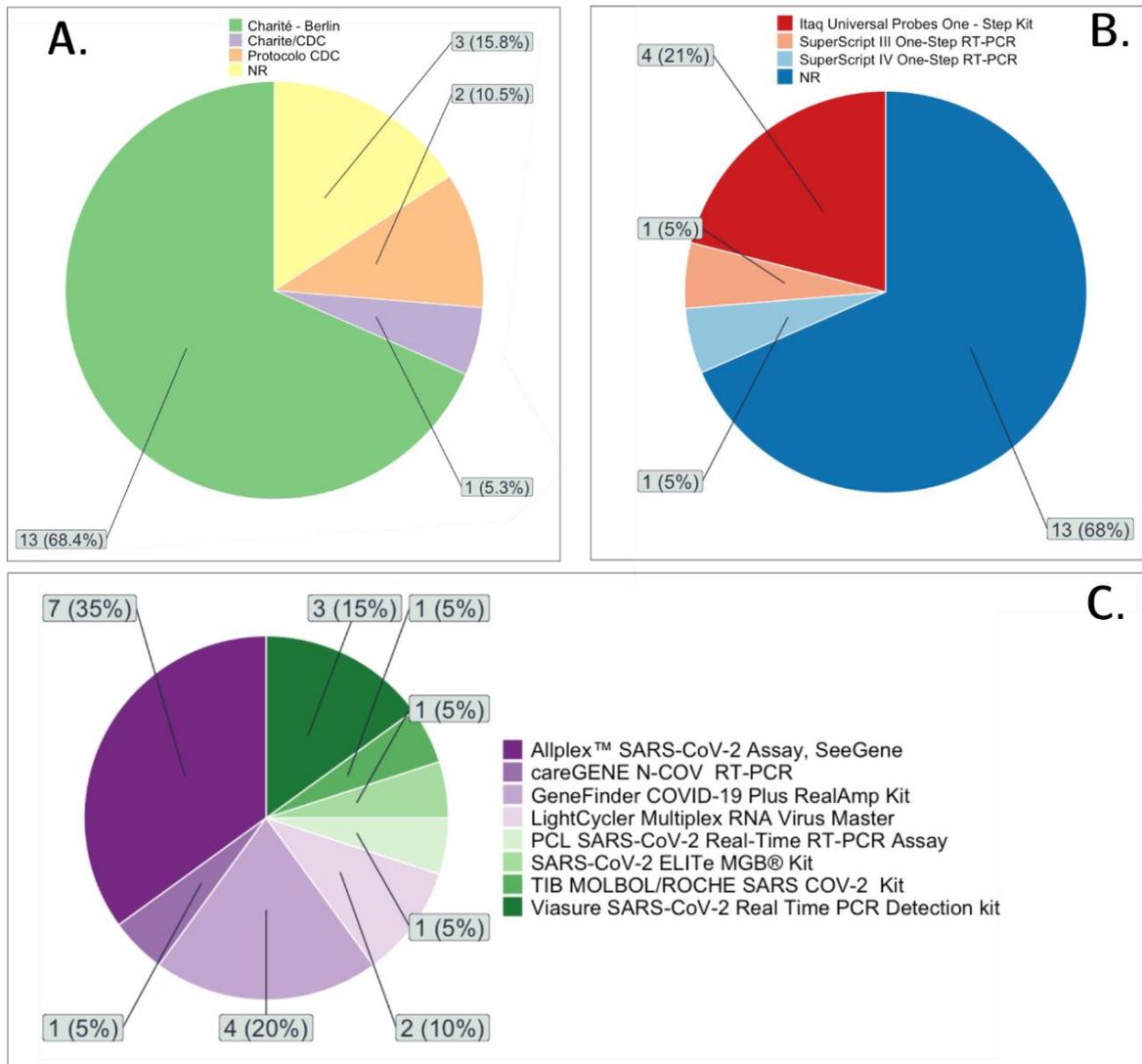
Figura 66. Plataformas de PCR empleadas por los laboratorios en la ejecución del taller de transferencia.



Distribución del uso de kits comerciales por RT-qPCR

En relación con los protocolos de amplificación utilizados por los laboratorios para realizar la detección por PCR 19 laboratorios reportaron el uso de kits o ensayos comerciales, 18 laboratorios usaron protocolos o métodos in-house, y un laboratorio reportó resultados con las dos alternativas. De los métodos in-house, 13 laboratorios usaron el protocolo de Charite-Berlin, 2 laboratorios reportaron usar el método del CDC de Estados Unidos, 1 reportó los dos protocolos, (aunque solo sometió un juego de resultados), y 3 laboratorios no reportaron información en este sentido (Figura 67-A). En cuanto a las MasterMix empleadas por estos protocolos, el 68% de los laboratorios no reportó información, las MasterMix producidas por BioRad y Applied BioSystems fueron las de mayor uso, en línea con las plataformas más empleadas (figura 67-B).

Figura 67. Distribución de protocolos para la detección de SARS CoV-2 (A), Mezclas de reacción por RT-PCR (B) Kit's comerciales para la detección de SARS CoV-2 (C)



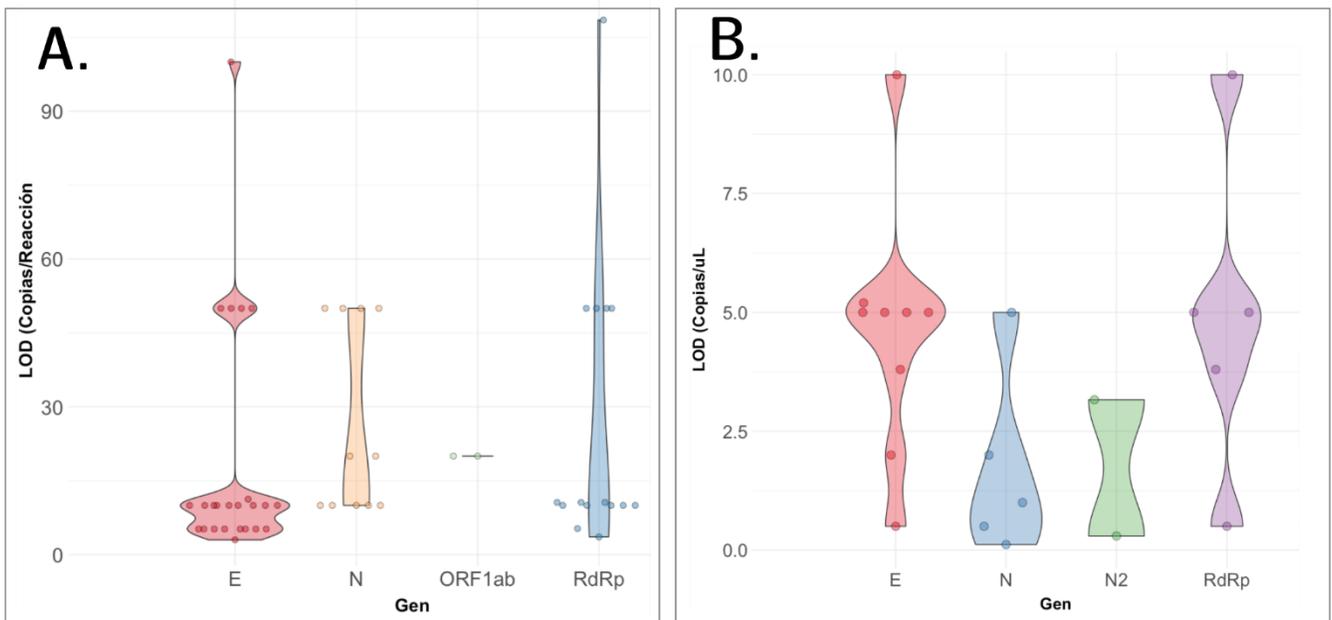
Distribución de los genes empleados

En relación con las dianas de detección, el gen que codifica para la proteína Envelope presenta la mayor frecuencia con 34 reportes, seguido de RdRp con 22, N con 19. Las demás dianas con un uso significativamente menor son ORF1ab, N2, y ORF-8 con 4, 2 y 1 reportes respectivamente.

Límites de detección asociados a los métodos de medición

Los límites de detección reportados por los laboratorios, y que corresponden a los relacionados en los protocolos de uso de los ensayos comerciales o a la información reportada para los métodos in-house, se encuentra en dos tipos de unidades: copias/ μL y copias/reacción, La Figura 68 presenta su distribución mediante gráficos tipo violín, de acuerdo con la diana de detección. Para los ensayos reportados en copias/ μL , el intervalo de los valores está entre 0.26-10 copias/ μL , siendo 5 copias/ μL el valor con mayor incidencia o la moda (10 laboratorios), únicamente la diana N presentan menores LOD's con valores inferiores a 2.5 copias/ μL .

Figura 68. Límites de Detección reportados por laboratorios participantes de taller de transferencia en Copias/reacción (A), Copias/ μL (B)



En el caso del límite de detección en copias/reacción (Figura 68-B), se presenta una mayor densidad en valores discretos, principalmente 5, 10 y 50 copias/reacción, debido a los valores reportados por los kits comerciales, los cuales normalmente reportan el mismo valor para todas las dianas en el ensayo multiplex.

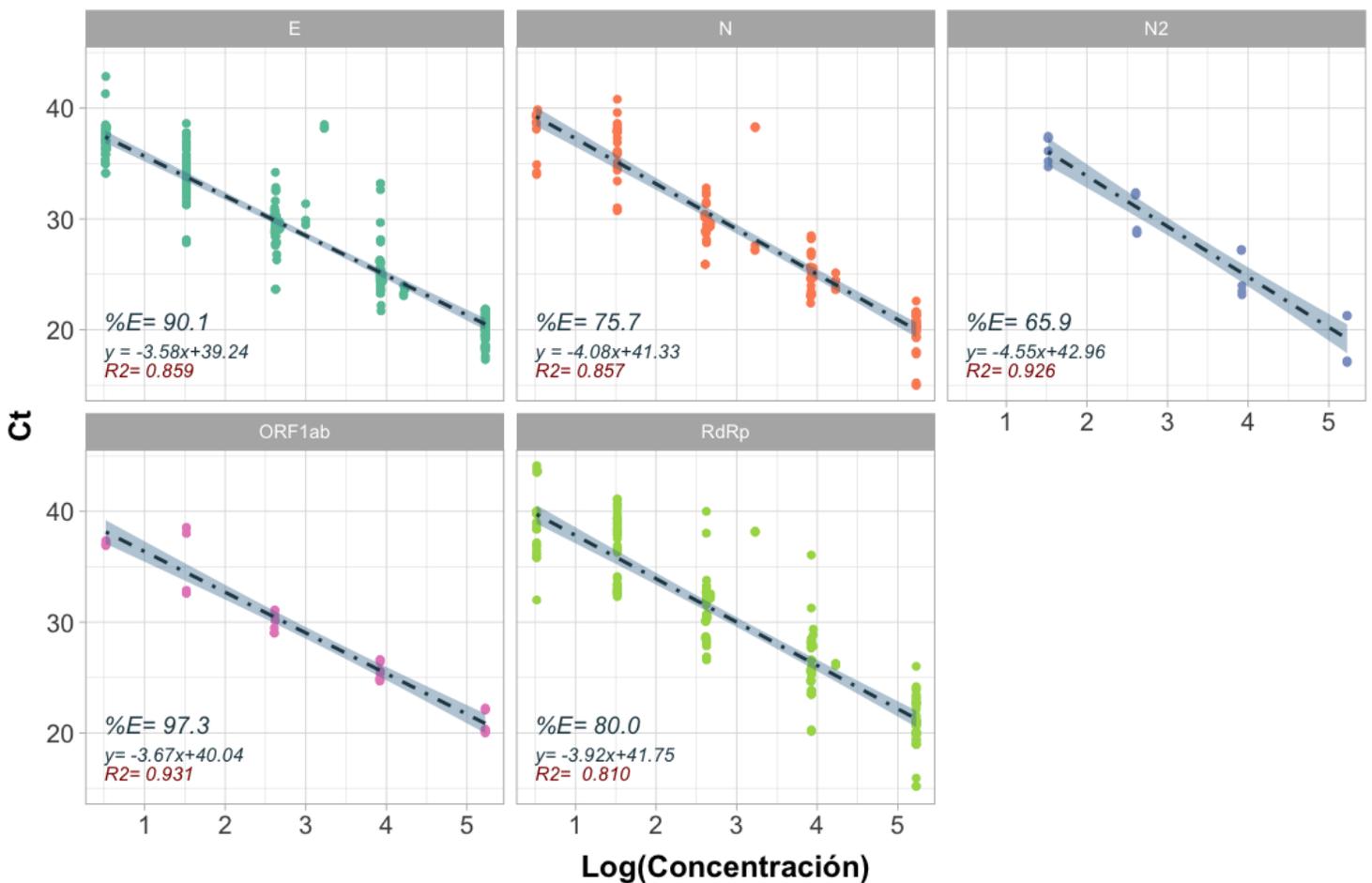
Análisis descriptivo de los datos:

Las Figuras 69.y 70 presentan el consolidado de los resultados experimentales (en Ct) para cada una de los materiales NIPC y JIPC medidos por los laboratorios en función de la diana de

detección. El valor en el recuadro de cada gráfica, corresponde a la eficiencia de la reacción calculada a partir de la pendiente global de los datos.

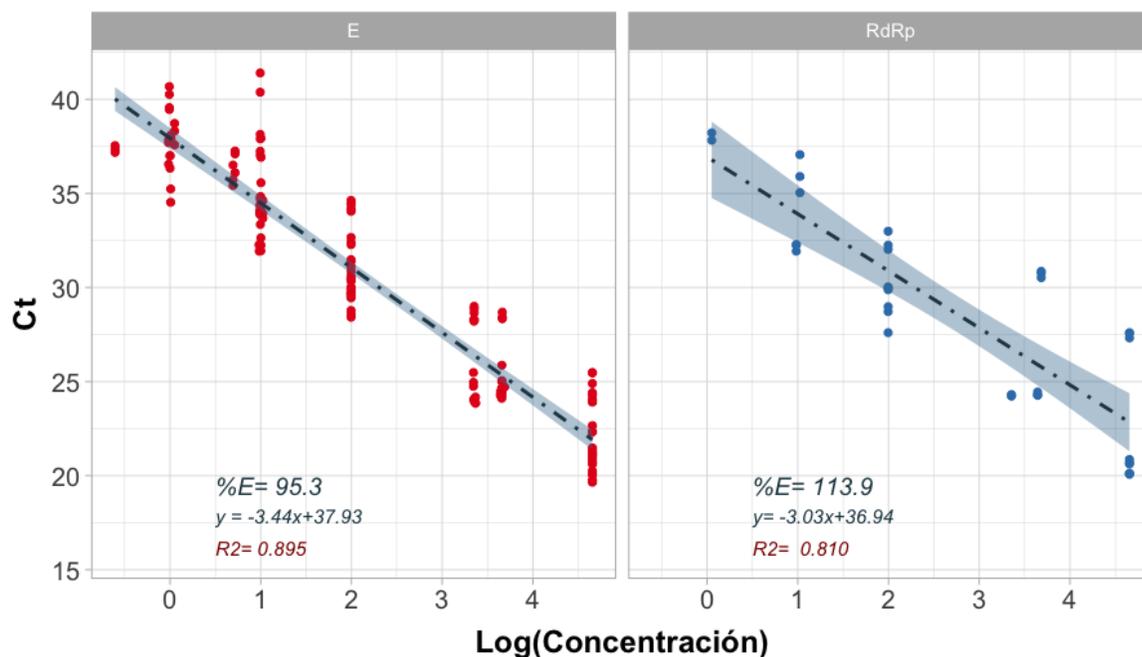
Se observa como para el material NIPC (Figura 69), la mayor dispersión de los datos está en los genes E, N y RdRp, dado que son los que tienen mayor número de datos (Tabla 33), mientras que aquellas con pocos datos aparentemente presentan una menor dispersión. Unas tendencias similares presentan los resultados asociados al material JIPC para el gen E (Figura 70), en cambio la dispersión aumenta para RdRp que solo cuenta con 3 juegos de datos.

Figura 69. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración para cada una de las dianas evaluadas por los laboratorios para el material NIPC.



Si se toman como límites de confianza para el valor de eficiencia (90-110%), es el gen E en ambos materiales el que presenta el mejor comportamiento; orf1ab y RdRp que pueden estar dirigidos a una misma región en el genoma, presentan un valor intermedio mayor o igual al 80%, mientras que N1-china y N2-CDC que también detectan una región similar, presentan la eficiencia más baja. Para el gen RdRp de JIPC el resultado es el opuesto, presentando una eficiencia más alta, aunque también por fuera del intervalo.

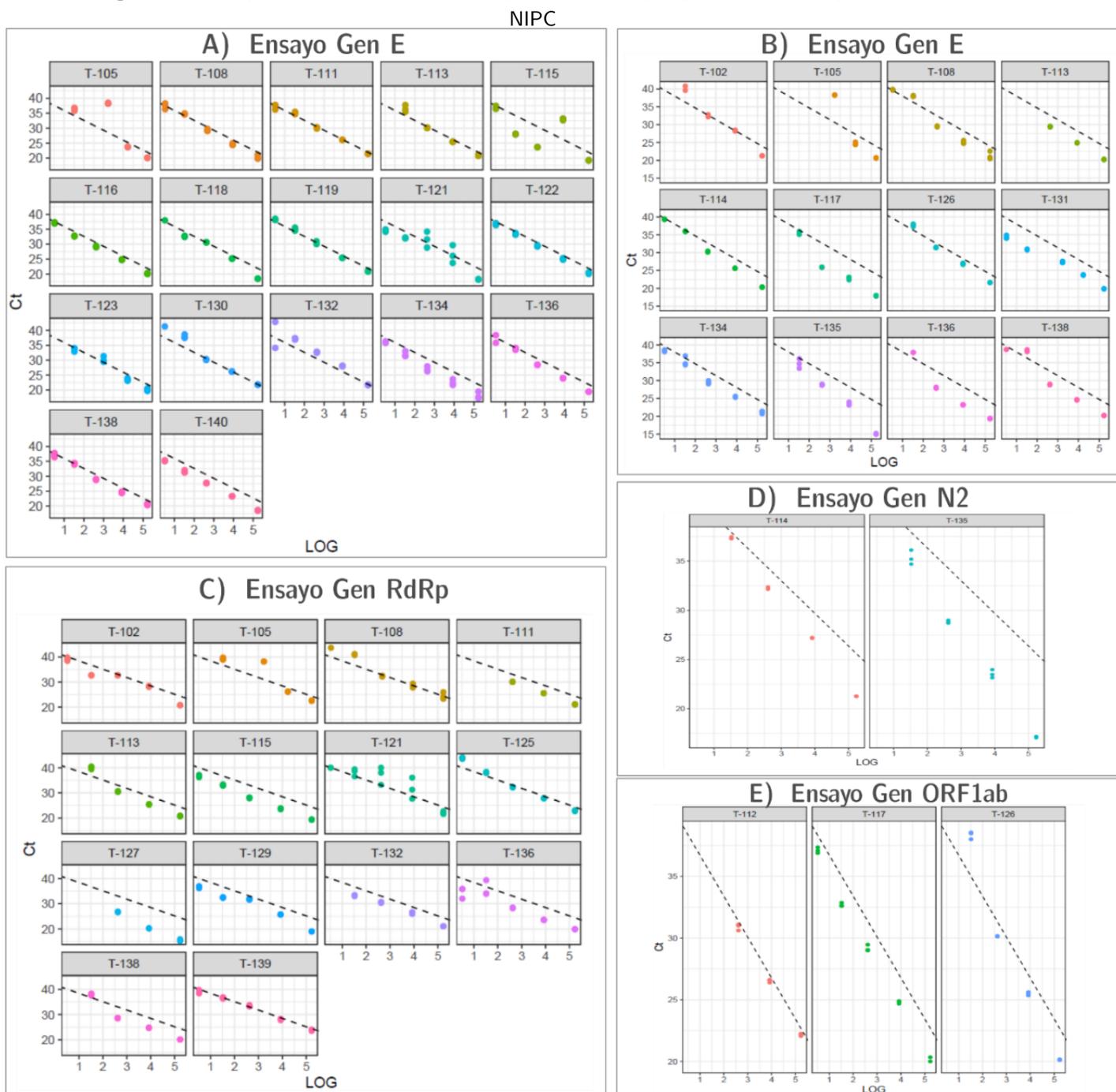
Figura 70. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración para cada una de las dianas evaluadas por los laboratorios para el material JIPC.



La Figura 71 despliega los resultados observados en la Figura 69, donde se permite evidenciar con un poco más de detalle los conjuntos de datos asociados a cada laboratorio con tendencias mayores y menores a la esperada para una eficiencia del 100%, hecho más evidente por ejemplo en el caso de N2. Se observa además, como algunos laboratorios presentan un grado de correlación menor entre el valor del logaritmo de concentración y la respuesta instrumental, por ejemplo T-105 y T-115, hecho que podría estar asociado a errores en la preparación de las diluciones o en la adición de las muestras a la mezcla de reacción. En otros casos se observa de manera general como la precisión de los resultados por muestra, diana y nivel de concentración

es similar, a excepción de algunos puntos como por ejemplo T121 en la medición de los niveles NIPC2a y 2b, con los genes E y RdRp, donde se evidencia una mayor dispersión para las réplicas evaluadas.

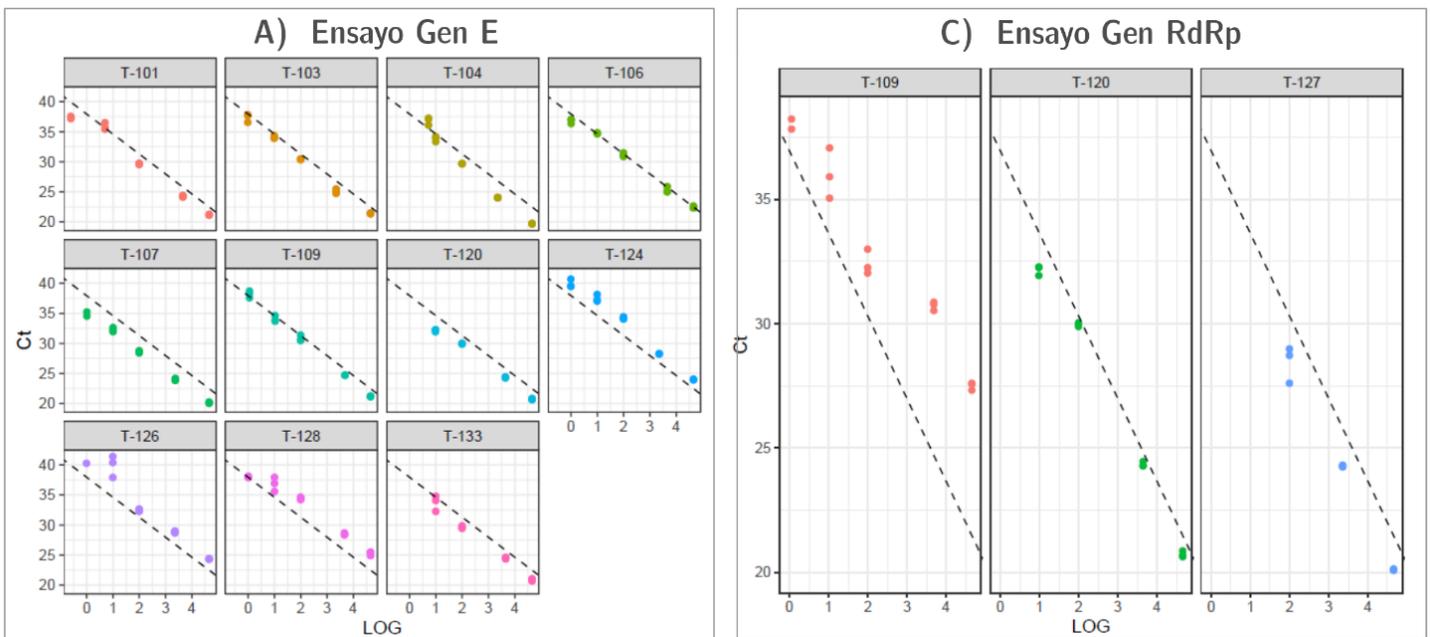
Figura 71. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración por gen y laboratorio para el material



Teniendo en cuenta el alcance del ensayo en condiciones normales de uso, cuyo objeto es determinar la presencia / ausencia de las secuencias de interés, el valor de la pendiente y por tanto de la eficiencia, podría llegar a ser más importante o relevante a bajas concentraciones, donde podría evitar detectar muestras de baja concentración, por ejemplo, para T114 y T135 en la detección del gen N2 (sin que esto signifique que esta pueda ser la única causa).

La Figura 72 presenta los resultados obtenidos por gen y laboratorio para el material JIPC, comparado con una tendencia correspondiente al 100%. Se observa como los datos obtenidos por el laboratorio T-109 halan la tendencia y generan una eficiencia de 113% (Figura 70). El análisis de los datos es similar al desarrollado para el material NIPC.

Figura 72. Respuesta instrumental Ct vs Log concentración por gen y laboratorio para el material JIPC



Limites de detección vs menor valor de concentración preparado

A partir de La Figura 73 se puede establecer como con respecto al gen E, la mayor parte de laboratorios pudo detectar los 5 niveles de concentración, especialmente el más bajo, el cual, teniendo en cuenta el volumen promedio de muestra empleada (5 μ L), así como la concentración de dicho nivel (3 copias/ μ L), corresponde a 15 copias / reacción, valor que está de acuerdo con

Finalmente, a partir de esta actividad se determina que el comportamiento con los diferentes genes no es sistemático, varía con el material, la dilución, el tipo de gen y que de manera general se podría afirmar que los protocolos ya sea comerciales o in-house implementados por los laboratorios están en capacidad de detectar muestras cercanas al límite de detección.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se validó un conjunto de métodos para las técnicas de PCR en tiempo real y PCR digital en modo gotas con retrotranscripción, que permiten la detección y cuantificación de ARN de SARS CoV-2 empleando las dianas de detecciones *E Charité*, *E INM*, *N1-China*, *N2-CDC*, *RdRp* y *Spike*, siendo estas las diana de mayor uso por parte de los laboratorios que ejecutan labores de detección del virus.

Cada ensayo validado presentó características particulares para cada gen evaluado, el diseño de primer, sondas, y los procesos de optimización tienen un papel fundamental en los ensayos, especialmente en aquellos por RT-ddPCR. En general los métodos validados son adecuados para el propósito previsto de ser empleados en la caracterización de Materiales de Referencia en unidad de concentración mediante ddPCR en un intervalo de 0.5 copias/ μ L y 4500 copias/ μ L, con una precisión entre 1.1% y 20.9% según la concentración empleada, y un límite de detección de 0.2 copias/ μ L. Los métodos validados por RT-qPCR permiten caracterizar materiales de Referencia en el intervalo de $1.6-1.5 \times 10^5$ copias/ μ L, con una precisión máxima 2.3% y un límite de detección mínimo del 2.3 copias/ μ L.

A partir de las metodologías previamente optimizadas y validadas, y gracias a la cooperación internacional, quienes suministraron los materiales de partida, se caracterizaron dos Materiales de Referencia a nivel de ARN genómico de SARS CoV-2: *i)* MR Ítem Ensayo de Aptitud SARS CoV-2, preparado en tres niveles de concentración con valores asignados de 1417 ± 220 copias/ μ L, 141 ± 29 copias/ μ L y 14.6 ± 9 copias/ μ L; y *ii)* Control Positivo SARS CoV-2, constituido por los materiales con código JIPC y NIPC, cada uno partiendo de un MR diferente con el objetivo de cubrir la totalidad del genoma del virus, preparados en dos niveles de

concentración: 169019 ± 7704 copias/ μL y 33 ± 6 copias/ μL para NIPC y 45344 ± 8958 copias/ μL y 99 ± 13 copias/ μL para JIPC.

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de homogeneidad, estabilidad y caracterización, se determinó que éstos fueron adecuados para el propósito. Adicionalmente, con base en el estudio de estabilidad estos demostraron tener una vigencia de 11 y 6 meses respectivamente a 4°C , lo que facilita los procesos de transporte y almacenamiento.

Se realizaron dos actividades de transferencia técnica con laboratorios que realizan detección de SARS CoV-2 por PCR. Se emplearon los MR producidos como Ítems de Ensayo en ambas actividades, el primero a través de la ejecución de un Ensayo de Aptitud cualitativo que evaluó la capacidad de detección de SARS CoV-2 por los laboratorios participantes y el segundo un taller de transferencia técnica que permitió la evaluación de algunos parámetros de desempeño por parte de los laboratorios y el uso de un control positivo de sus mediciones de rutina.

En el Ensayo de Aptitud se contó con la participación de 121 laboratorios de distintas partes del país, de los que el 98.3% de los participantes obtuvo un rendimiento satisfactorio, demostrando la capacidad de los laboratorios para realizar detección de SARS CoV-2 por PCR en los niveles de concentración evaluados. Adicionalmente se evidenció la gran variedad de métodos, kits y genes empleados para la detección, siendo los más comunes las dianas para la región del gen *E*, *N* y *RdRp*.

Con relación al taller de transferencia los 38 laboratorios participantes lograron desarrollar curvas de calibración a partir de los MR suministrados y formatos guía para la evaluación de los parámetros de eficiencia y precisión de sus métodos. Los resultados de esta actividad permitieron determinar que el comportamiento de los ensayos no es sistemático, y los parámetros de cada uno está ligado al kit empleado, la diana de detección que se utilice, los límites de detección del método e incluso el sistema de PCR. Sin embargo, los datos no son suficientes para establecer afirmaciones en torno a la causalidad o relación entre la no detección y el tipo de gen.

Este ejercicio, ha permitido demostrar la importancia del trabajo en equipo, y la forma en la que ante un evento como fue la pandemia del COVID-19, la organización, la cooperación, la unión de las capacidades técnicas de diferentes instituciones (Instituto Nacional de Salud, Universidad Nacional de Colombia, Instituto Nacional de Metrología), así como de la cooperación internacional (NIST, UE – JRC, ONUDI) han permitido desarrollar herramientas técnicas que contribuyen a fortalecer las estrategias y actividades orientadas al control y mitigación de la pandemia. Las actividades desarrolladas y la experiencia adquiridas pueden servir como modelo o base para el desarrollo de estrategias similares frente a la próxima pandemia.

5.2 Perspectivas

Los Materiales de Referencia producidos puede ser empleados por los laboratorios como controles de sus procesos de medición continua luego de finalizadas las actividades de transferencia. Para ello, los laboratorios cuentan con el formato de diligenciamiento de datos suministrado que funciona como carta control de los resultados obtenidos en las mediciones permitiéndoles continuar con el aseguramiento de la calidad de sus mediciones y brindando información suplementaria del comportamiento de los Materiales de Referencia.

Como actividad futura a desarrollar se plantea la ejecución de un ensayo de Aptitud con un ítem de Ensayo basado en RNA genómico de SARS CoV-2, permitiendo una aproximación real al genoma de SARS CoV-2 y permitiendo incluso a los laboratorios emplear sus propios métodos desarrollados.

Como parte de la evaluación integral del proceso de detección de SARS CoV-2 por PCR se puede realizar la producción de un MR en forma de sobrenadante celular mediante tecnologías de ADN recombinante, que permita incluir en los procesos de extracción de ARN dentro del marco de un Ensayo de Aptitud.

5.3 Recomendaciones

El monitoreo de la estabilidad de los materiales producidos debe continuar para evaluar la pertinencia de uso de estos por parte de los laboratorios que realizan mediciones de SARS CoV-2, así evaluar las condiciones de uso del materiales de condiciones extremas de temperatura superiores a 4°C.

El desarrollo de Materiales de Referencia a nivel de proteínas como herramienta metrología a los métodos basados en Antígeno/anticuerpo, que permitirían evaluar los métodos restantes empleados para la detección del virus.

A partir de la identificación de nuevos patógenos y dianas de interés se puede aplicar el modelo general desarrollado en esta actividad como punto de partida para el desarrollo de herramientas metrologías.

5.4 Agradecimientos finales

El desarrollo de este trabajo no hubiese sido posible sin la cooperación y trabajo conjunto de diversas entidades y programas, inicialmente quiero agradecer enormemente a la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto Nacional de Salud por apoyar todo el proyecto, a la organización de Naciones Unidas para el desarrollo industrial ONUDI a través del programa global de calidad y normas (GQSP), por brindar soporte y apoyo para el desarrollo del Ensayo de Aptitud de SARS CoV-2, al National Institute of Standards and Technology (NIST) y al Joint Research Centre (JRC) por brindar los Materiales de Referencia empleados en el desarrollo de las actividades de este proyecto. Al grupo de Ensayos de Aptitud del INM por la gestión y apoyo en la elaboración del Ensayo de Aptitud de SARS CoV-2. Finalmente agradecer al Grupo Técnico Temático de Bioanálisis de la Red Colombiana de Metrología por la colaboración y apoyo en el desarrollo del taller de transferencia de SARS CoV-2.

A. Anexo: Análisis Estadístico Producción de Materiales de Referencia

IEA MR SARS CoV-2 -RT-qPCR

Tabla-A1: Análisis de Homogeneidad Piloto IEA MR SARS CoV-2 -RT-qPCR

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F crítico
MR-N1-2	26.98	26.98	26.86	26.939	26.875	Factor - botellas	0.12487	2	0.06243	1.8919	0.23063	5.143
MR-N1-3	27.08	27.01	26.84	26.977		Repetibilidad	0.19801	6	0.0330			
MR-N1-20	27.03	26.52	26.58	26.710								
Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F crítico
MR-N2-5	30.58	30.46	30.11	30.381	30.556	Factor - botellas	1.2336	2	0.6168	25.4790	0.00117	5.143
MR-N2-19	30.28	30.15	30.22	30.216		Repetibilidad	0.1452	6	0.024			
MR-N2-21	31.01	31.18	31.02	31.070								
Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F crítico
MR-N3-5	33.74	33.87	33.52	33.711	33.614	Factor - botellas	0.0514	2	0.0257	1.4256	0.31149	5.143
MR-N3-16	33.59	33.44	33.55	33.527		Repetibilidad	0.1083	6	0.0180			
MR-N3-19	33.49	33.59	33.74	33.604								

Tabla-A2: Análisis de Homogeneidad Piloto IEA MR SARS CoV-2 RT-ddPCR

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F critico
MR-N1-2	798.77	796.97	863.90	819.879		Factor - botellas	46127.50	2	23063.752	2.0721	0.20692	5.143
MR-N1-3	749.19	781.99	872.45	801.208	860.8787	Repetibilidad	66784.29	6	11130.716			
MR-N1-20	770.22	1077.39	1037.03	961.548								

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F critico
MR-N2-5	76.61	82.57	104.08	87.7537		Factor - botellas	2830.954	2	1415.477	18.0128	0.00291	5.143
MR-N2-19	93.12	101.15	96.50	96.9248	80.0809	Repetibilidad	471.4911	6	78.581			
MR-N2-21	57.68	51.79	57.23	55.564								

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F critico
MR-N3-5	9.76	8.93	11.24	9.9753		Factor - botellas	2.2955	2	1.147	1.3865	0.31989	5.143
MR-N3-16	10.73	11.88	11.02	11.209	10.6179	Repetibilidad	4.966	6	0.827			
MR-N3-19	11.49	10.74	9.77	10.6691								

Tabla-A3: Análisis de Estabilidad Piloto IEA MR SARS CoV-2

Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N1(4°C)			Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N1(-20°C)		
	Estimacion lineal			Estimacion lineal	
m	-0.01346938	26.4620184	m	-0.00752282	26.57479717
s	0.025844587	0.070778316	s	0.027056899	0.074846318
R2	0.012195624	0.141556631	R2	0.003667669	0.147551001
F	0.271616265	22	F	0.07730458	21
ssreg	0.005442723	0.440842156	ssreg	0.001683021	0.457197253
t	0.521168173	373.8718303	t	0.278037012	355.058175
Probabilidad	0.607456473	2.46504E-43	Probabilidad	0.78358026	7.67461E-43

alpha	0.05	0.05	alpha	0.05	0.05
k	2.073873068	2.073873068	k	2.079613845	2.079613845
u B1	0.053598392	0.146785242	u B1	0.056267902	0.15565144
LS uB1	0.040129016	26.60880364	LS uB1	0.048745083	26.73044861
LI u B1	-0.06706777	26.31523316	LI u B1	-0.06379072	26.41914573
Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N2(4°C)			Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N2(-20°C)		
Estimacion lineal			Estimacion lineal		
m	-0.02483333	29.2925	m	0.004	29.27833333
s	0.029761552	0.081505368	s	0.036731073	0.100592186
R2	0.03067644	0.163010736	R2	0.000538761	0.201184372
F	0.696239847	22	F	0.011859128	22
ssreg	0.018500833	0.584595	ssreg	0.00048	0.890453333
t	0.834409879	359.3935068	t	0.108899623	291.0597185
Probabilidad	0.413019259	5.87652E-43	Probabilidad	0.914269285	6.07645E-41
alpha	0.05	0.05	alpha	0.05	0.05
k	2.073873068	2.073873068	k	2.073873068	2.073873068
u B1	0.061721682	0.169031787	u B1	0.076175583	0.208615425
LS uB1	0.036888349	29.46153179	LS uB1	0.080175583	29.48694876
LI u B1	-0.08655502	29.12346821	LI u B1	-0.07217558	29.06971791
Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N3(4°C)			Regresión Lineal piloto IEA SARS CoV-2 N3(-20°C)		
Estimacion lineal			Estimacion lineal		
m	-0.07833333	31.90666667	m	0.059166667	31.4875
s	0.080093695	0.219345618	s	0.096173573	0.263382176
R2	0.041666824	0.438691235	R2	0.016912668	0.526764351
F	0.956525504	22	F	0.378479801	22
ssreg	0.184083333	4.2339	ssreg	0.105020833	6.104575
t	0.978021219	145.4629776	t	0.615207121	119.5506109
Probabilidad	0.33869683	2.55348E-34	Probabilidad	0.544729849	1.90223E-32
alpha	0.05	0.05	alpha	0.05	0.05
k	2.073873068	2.073873068	k	2.073873068	2.073873068
u B1	0.166104157	0.454894969	u B1	0.199451782	0.546221201
LS uB1	0.087770824	32.36156164	LS uB1	0.258618449	32.0337212
LI u B1	-0.24443749	31.4517717	LI u B1	-0.14028512	30.9412788

Material de Referencia Item Ensayo de Aptitud SARS CoV-2

Tabla-A4: Análisis de Homogeneidad IEA MR SARS CoV-2 RT-qPCR

Nivel	Prueba Hartley	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P	F critico
Bajo	Si	32.49	Factor	1.2193422	14	0.0870959	0.7712	0.68996	2.037

Medio	Si	29.11	Rep.	3.3882763	30	0.1129425			
			Factor	0.52074	14	0.0371957	1.0842	0.40856	2.037
Alto	Si	25.75	Rep.	1.0291783	30	0.0343059			
			Factor	0.6066058	14	0.043329	1.3038	0.26205	2.037
			Rep.	0.9969644	30	0.0332321			

Tabla A-5: Análisis de Estabilidad IEA MR SARS CoV-2 RT-qPCR

Long term Stability – 186egresión values						
Concentration	Coefficients	Estimate	Std. Error	t-value	R ²	p-value
High	Intercept	25.6532	0.070004	366.454	0.03887	0.1792
	Slope	-0.005135	0.003765	-1.364		
Medium	Intercept	28.9823	0.04556	634.081	0.07588	0.0564
	Slope	-0.00479	0.002451	-1.957		
Low	Intercept	32.35755	0.075663	457.656	0.06962	0.06997
	Slope	-0.007549	0.004069	-1.855		
Short term Stability – 186egresión values						
Concentration	Coefficients	Estimate	Std. Error	t-value	R ²	p-value
High	Intercept	25.53175	0.07022	363.584	0.01225	0.06067
	Slope	-0.01339	0.02564	-0.522		
Medium	Intercept	28.93401	0.11712	247.047	0.02306	0.4787
	Slope	0.03082	0.04277	-0.04277		
Low	Intercept	32.22962	0.219735	146.675	0.0001573	0.9536
	Slope	0.004721	0.080236	0.059		

Tabla-A6: Estudio de Asignación de valor IEA MR SARS CoV-2 RT-ddPCR

Level	Mean	Source	Square sum	GF	Mean square	F	P	F table
Low	14.6	Factor	47.228956	4	11.80724	3.1601	0,06374	3,478
		Rep.	37.36338	10	3.736338			
Medium	146	Factor	256.25765	4	64.064414	0.7118	0.60236	3.478
		Rep.	900.05944	10	90.005944			
High	1417	Factor	51483.699	4	12870.924	1.9793	0.17381	3.478

Piloto de Material de Referencia Control Positivo de SARS CoV-2

Tabla-A7: Análisis de Homogeneidad Piloto MR Control Positivo SARS CoV-2 RT-qPCR

Nivel	Prueba Levene	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-valor	F crítico
Alto	Si	26,93	Factor	0,01967	3	0,00655	3,0234	0,0936	4,0661
			Rep	0,01735	8	0,00216			
Bajo	Si	33,69	Factor	1,70998	3	0,56999	3,1549	0,0860	4,0661
			Rep	1,44535	8	0,18066			

Tabla-A8: Análisis de Homogeneidad Piloto MR Control Positivo SARS CoV-2 RT-ddPCR

Nivel	Prueba Levene	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-valor	F crítico
1	Si	553,05	Factor	508,43	3	169,47	1,79	0,2258	4,066
			Rep	755,10	8	94,38			
2	Si	20,42	Factor	3,087	3	1,0290	0,311	0,8168	4,0661
			Rep	26,522	8	3,3044			

Tabla-A9: Análisis de Estabilidad Piloto MR Control Positivo SARS CoV-2 RT-ddPCR

Nivel Alto -70°C				
Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor Crit-F

Regresión	1	0.01542998	0.01542998	1.807764515	0.19752931
Residuos	16	0.13656631	0.00853539		
Total	17	0.15199629			
Nivel Alto 4°C					
<i>Grados de libertad</i>		<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor Crit-F</i>
Regresión	1	0.29501351	0.29501351	1.334484969	0.26496996
Residuos	16	3.537107	0.22106919		
Total	17	3.83212051			
Nivel Bajo -70°C					
<i>Grados de libertad</i>		<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor Crit-F</i>
Regresión	1	0.00109974	0.00109974	0.210846613	0.65228137
Residuos	16	0.08345301	0.00521581		
Total	17	0.08455275			
Nivel Bajo 4°C					
<i>Grados de libertad</i>		<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor Crit-F</i>
Regresión	1	0.22519137	0.22519137	1.704159229	0.21020575
Residuos	16	2.11427539	0.13214221		
Total	17	2.33946676			

Material de Referencia Control Positivo de SARS CoV-2:

Tabla-A10: Análisis de Homogeneidad Material de Referencia Control Positivo SARS CoV-2

Nivel	Prueba Hartley	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-valor	F critico
JIPC-1	Si	20.62	Factor Rep.	3.435 0.158	7 16	0,491 0,01	49,67	1,1E-09	2,66
JIPC-3	Si	29.62	Factor Rep.	2 0,613	5 12	0,393 0,051	7,7	1,9-03	3,11
NIPC-1	Si	19.17	Factor Rep.	0 0,252	7 16	0,017 0,016	1,09	4,1E-01	2,66
NIPC-3	Si	31.86	Factor Rep.	0 1,062	7 16	0,058 0,066	0,87	5,5E-01	2,66

Tabla-A11: Estudio de Asignacion de valor - Material de Referencia Control Positivo SARS CoV-2

Nivel	Gran promedio	Origen Varianza	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-valor	F critico
JIPC-1	45344	Factor	37773009560	22	1716954980	1641,7608	1,02E-54	1,801
		Rep.	43923638	42	1045801			
JIPC-3	99	Factor	1253,92	4	313,48	7,82	4,00E-03	3,48
		Rep.	401,05	10	40,10			
NIPC-1	169019	Factor	324934073	4	81233518	7,20	9,22E-03	3,84
		Rep.	90242464	8	11280308			
NIPC-3	33	Factor	17,93	4	4,48	0,43	0,78	3,48
		Rep.	103,22	10	10,32			

Tabla-A12: Análisis de Estabilidad - Material de Referencia Control Positivo SARS CoV-2

NIPC-1				
Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.71547	-0.44279	-0.04926	0.43308	0.95826
Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	20.18153	0.27172	74.28	<2e-16 ***
Semana	-0.02681	0.04961	-0.54	0.594
Signif. codes:	0.001 '***'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''
Residual standard error:	0.5434	22	degrees of freedom	
Multiple R-squared:	0.0131	Adjusted R-squared:		-0.03175
F-statistic:	0.2921	1 and 22 DF	p-value:	0.5943
NIPC-3				
Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.86643	-0.50899	-0.07345	0.56994	0.928
Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	30.82298	0.29455	111.268	<2e-16 ***
Semana	-0.06165	0.05378	-1.006	0.325
Signif. codes:	0.001 '***'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''
Residual standard error:	0.5891	22	degrees of freedom	
Multiple R-squared:	0.04398	Adjusted R-squared:		0.0005264
F-statistic:	1.012	1 and 22 DF	p-value:	0.07611

JIPC-1				
Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.4017		-0.5579	0.3939	1.3497
Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	21.83916	0.2317	94.256	<2e-16 ***
Semana	-0.01807	0.04841	-0.373	0.712
Signif. codes:	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''
Residual standard error:	0.6475	31	degrees of freedom	
Multiple R-squared:	0.004473	Adjusted R-squared:		-0.02764
F-statistic:	0.1393	1 and 31 DF	p-value:	0.7115
JIPC-3				
Residuals:				
Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.86643		-0.58244	0.56994	0.928
Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	32.7742	0.29455	111.268	<2e-16 ***
Semana	-0.0541	0.05378		
Signif. codes:	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''
Residual standard error:	0.5891	22	degrees of freedom	
Multiple R-squared:	0.04398	Adjusted R-squared:		0.0005264
F-statistic:	1.012	1 and 22 DF	p-value:	0.3253

Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud, 'La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia', *OMS*, Mar. 11, 2021. <https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia> (accessed Jan. 25, 2023).
- [2] S. Vilcek, 'SARS-CoV-2: Zoonotic origin of pandemic coronavirus', *Acta Virol*, vol. 64, no. 03, pp. 281–287, 2020, doi: 10.4149/av_2020_302.
- [3] World Health Organization, 'WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard', Jan. 24, 2023. <https://covid19.who.int> (accessed Jan. 25, 2023).
- [4] K. L. Candido *et al.*, 'Spike protein of SARS-CoV-2 variants: a brief review and practical implications', *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 53, no. 3, pp. 1133–1157, Sep. 2022, doi: 10.1007/s42770-022-00743-z.
- [5] Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias, 'Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2', Apr. 06, 2022. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
- [6] K. Shirato *et al.*, 'Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan', *Jpn J Infect Dis*, vol. 73, no. 4, pp. 304–307, Jul. 2020, doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.061.
- [7] National Institute For Viral Disease Control and Prevention, 'Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus', *China CDC*. Jan. 21, 2020. Accessed: Jan. 03, 2023. [Online]. Available: https://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html
- [8] M. of P. H. Department of Medical Sciences, 'Diagnostic detection of Novel coronavirus 2019 by Real time RTPCR', Thailand, Jan. 2020. Accessed: Jan. 03, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.pdf>
- [9] V. M. Corman *et al.*, 'Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR', *Eurosurveillance*, vol. 25, no. 3, Jan. 2020, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- [10] Division of Viral Diseases and Centers for Disease Control and Prevention (CDC), '2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel', Atlanta, GA, Jan. 2020.

- Accessed: Jan. 03, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf>
- [11] World Health Organization, 'Summary table of available protocols in this document', Jan. 24, 2020.
- [12] FDA, 'Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests', 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory->
- [13] P. Quevauviller, 'QUALITY ASSURANCE | Reference Materials', in *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, pp. 458–462. doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00509-4.
- [14] F. M. de Albano and C. S. ten Caten, 'Proficiency tests for laboratories: a systematic review', *Accreditation and Quality Assurance*, vol. 19, no. 4, pp. 245–257, Aug. 2014, doi: 10.1007/s00769-014-1061-8.
- [15] F. , Z. , Y. , C. M. , W. , S. G. , H. , T. W. , T. H. , P. Y. , Y. L. , Z. L. , D. H. , L. , W. M. , Z. J. , X. , H. C. and Z. Z. Wu, 'Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, co - Nucleotide - NCBI', *Nih.gov*. 2020. Accessed: Jan. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MN908947>
- [16] Joint Reseach Center, 'COVID-19 In Vitro Diagnostic Devices and Test Methods Database', Jan. 24, 2023.
- [17] Z. Iglói *et al.*, 'Comparison of commercial realtime reverse transcription PCR assays for the detection of SARS-CoV-2', *Journal of Clinical Virology*, vol. 129, p. 104510, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.jcv.2020.104510.
- [18] S. Woloshin, N. Patel, and A. S. Kesselheim, 'False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection — Challenges and Implications', *New England Journal of Medicine*, vol. 383, no. 6, p. e38, Aug. 2020, doi: 10.1056/NEJMp2015897.
- [19] L. M. Kucirka, S. A. Lauer, O. Laeyendecker, D. Boon, and J. Lessler, 'Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure', *Ann Intern Med*, vol. 173, no. 4, pp. 262–267, Aug. 2020, doi: 10.7326/M20-1495.
- [20] Instituto Nacional de Salud, 'COVID-19 en Colombia', Jan. 24, 2023. <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-laboratorios.aspx> (accessed Jan. 25, 2023).
- [21] H. J. Maier, E. Bickerton, and P. Britton, 'Coronaviruses.', *Methods Mol Biol*, vol. 1282, p. v, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7.

- [22] L. Zhao *et al.*, 'Antagonism of the Interferon-Induced OAS-RNase L Pathway by Murine Coronavirus ns2 Protein Is Required for Virus Replication and Liver Pathology', *Cell Host Microbe*, vol. 11, no. 6, pp. 607–616, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.04.011.
- [23] D. R. Beniac, A. Andonov, E. Grudeski, and T. F. Booth, 'Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike', *Nat Struct Mol Biol*, vol. 13, no. 8, pp. 751–752, Aug. 2006, doi: 10.1038/nsmb1123.
- [24] J. Cui, F. Li, and Z.-L. Shi, 'Origin and evolution of pathogenic coronaviruses', *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, no. 3, pp. 181–192, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- [25] S. K. P. Lau *et al.*, 'Coronavirus HKU1 and Other Coronavirus Infections in Hong Kong', *J Clin Microbiol*, vol. 44, no. 6, pp. 2063–2071, Jun. 2006, doi: 10.1128/JCM.02614-05.
- [26] R. L. Graham and R. S. Baric, 'SARS-CoV-2: Combating Coronavirus Emergence', *Immunity*, vol. 52, no. 5, pp. 734–736, May 2020, doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.016.
- [27] N. Zhong *et al.*, 'Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003', *The Lancet*, vol. 362, no. 9393, pp. 1353–1358, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14630-2.
- [28] Y. Guan *et al.*, 'Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome', *The Lancet*, vol. 363, no. 9403, pp. 99–104, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(03)15259-2.
- [29] M. Wang *et al.*, 'SARS-CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet', *Emerg Infect Dis*, vol. 11, no. 12, pp. 1860–1865, Dec. 2005, doi: 10.3201/eid1112.041293.
- [30] WHO, 'Summary of probably SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003', 2004. Accessed: Jan. 25, 2023. [Online]. Available: http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/ (2004).
- [31] E. de Wit, N. van Doremalen, D. Falzarano, and V. J. Munster, 'SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses', *Nat Rev Microbiol*, vol. 14, no. 8, pp. 523–534, Aug. 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
- [32] J. Wise, 'Patient with new strain of coronavirus is treated in intensive care at London hospital', *BMJ*, vol. 345, no. sep24 2, pp. e6455–e6455, Sep. 2012, doi: 10.1136/bmj.e6455.
- [33] World Health Organization, 'Coronavirus infections: disease outbreak news.', 2016. Accessed: Jan. 25, 2023. [Online]. Available: <http://www.who.int/csr/don/26-april-2016-mers-saudi-arabia/en/> (2016)

- [34] J. S. Kahn and K. McIntosh, 'History and Recent Advances in Coronavirus Discovery', *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 24, no. 11, pp. S223–S227, Nov. 2005, doi: 10.1097/01.inf.0000188166.17324.60.
- [35] L. E. Gralinski and V. D. Menachery, 'Return of the Coronavirus: 2019-nCoV', *Viruses*, vol. 12, no. 2, p. 135, Jan. 2020, doi: 10.3390/v12020135.
- [36] Q. W. Z. Z. Tao Zhang, 'Pangolin homology associated with 2019-nCoV', *bioRxiv*, 2020.
- [37] K. G. Andersen, A. Rambaut, W. I. Lipkin, E. C. Holmes, and R. F. Garry, 'The proximal origin of SARS-CoV-2', *Nat Med*, vol. 26, no. 4, pp. 450–452, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- [38] E. Callaway, H. Ledford, and S. Mallapaty, 'Six months of coronavirus: the mysteries scientists are still racing to solve', *Nature*, vol. 583, no. 7815, pp. 178–179, Jul. 2020, doi: 10.1038/d41586-020-01989-z.
- [39] J. Zheng, 'SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat', *Int J Biol Sci*, vol. 16, no. 10, pp. 1678–1685, 2020, doi: 10.7150/ijbs.45053.
- [40] E. I. Azhar *et al.*, 'Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus', *New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 26, pp. 2499–2505, Jun. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1401505.
- [41] K. B. Anand, S. Karade, S. Sen, and R. M. Gupta, 'SARS-CoV-2: Camazotz's Curse', *Med J Armed Forces India*, vol. 76, no. 2, pp. 136–141, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.mjafi.2020.04.008.
- [42] S. Kang *et al.*, 'Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 55, no. 5, p. 105950, May 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105950.
- [43] R. J. Mason, 'Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective', *European Respiratory Journal*, vol. 55, no. 4, p. 2000607, Apr. 2020, doi: 10.1183/13993003.00607-2020.
- [44] E. M. Saied *et al.*, 'A Comprehensive Review about the Molecular Structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Insights into Natural Products against COVID-19', *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 11, p. 1759, Oct. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13111759.
- [45] F. Wu *et al.*, 'A new coronavirus associated with human respiratory disease in China', *Nature*, vol. 579, no. 7798, pp. 265–269, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.

- [46] D. A. Brian and R. S. Baric, 'Coronavirus Genome Structure and Replication', 2005, pp. 1–30. doi: 10.1007/3-540-26765-4_1.
- [47] P. S. Masters, 'The Molecular Biology of Coronaviruses', 2006, pp. 193–292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
- [48] S. Stertz *et al.*, 'The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus', *Virology*, vol. 361, no. 2, pp. 304–315, May 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.11.027.
- [49] D. Schoeman and B. C. Fielding, 'Coronavirus envelope protein: current knowledge', *Virol J*, vol. 16, no. 1, p. 69, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12985-019-1182-0.
- [50] K. Pervushin *et al.*, 'Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel', *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 7, p. e1000511, Jul. 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000511.
- [51] G. Mariano, R. J. Farthing, S. L. M. Lale-Farjat, and J. R. C. Bergeron, 'Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be', *Front Mol Biosci*, vol. 7, Dec. 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.605236.
- [52] W. T. Harvey *et al.*, 'SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape', *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 7, pp. 409–424, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00573-0.
- [53] A. A. T. Naqvi *et al.*, 'Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1866, no. 10, p. 165878, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.
- [54] M. F. ur Rehman *et al.*, 'Novel coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A recent mini review', *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 19, pp. 612–623, 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2020.12.033.
- [55] World Health Organization, 'WHO announces simple, easy-to-say labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern', 2021, Accessed: Jan. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>
- [56] S. Khare *et al.*, 'GISAID's Role in Pandemic Response', *China CDC Wkly*, vol. 3, no. 49, pp. 1049–1051, 2021, doi: 10.46234/ccdcw2021.255.
- [57] A. Rahimi, A. Mirzazadeh, and S. Tavakolpour, 'Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection', *Genomics*, vol. 113, no. 1, pp. 1221–1232, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.ygeno.2020.09.059.

- [58] B. Jackson *et al.*, 'Generation and transmission of interlineage recombinants in the SARS-CoV-2 pandemic', *Cell*, vol. 184, no. 20, pp. 5179–5188.e8, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.08.014.
- [59] S. Duffy, L. A. Shackelton, and E. C. Holmes, 'Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants', *Nat Rev Genet*, vol. 9, no. 4, pp. 267–276, Apr. 2008, doi: 10.1038/nrg2323.
- [60] M. F. Boni *et al.*, 'Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic', *Nat Microbiol*, vol. 5, no. 11, pp. 1408–1417, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0771-4.
- [61] C. Kemena and C. Notredame, 'Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era', *Bioinformatics*, vol. 25, no. 19, pp. 2455–2465, Oct. 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp452.
- [62] D.-F. Feng and R. F. Doolittle, 'Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees', *J Mol Evol*, vol. 25, no. 4, pp. 351–360, Aug. 1987, doi: 10.1007/BF02603120.
- [63] J. Daugelaite, A. O' Driscoll, and R. D. Sleator, 'An Overview of Multiple Sequence Alignments and Cloud Computing in Bioinformatics', *ISRN Biomath*, vol. 2013, pp. 1–14, Aug. 2013, doi: 10.1155/2013/615630.
- [64] S. Pickering *et al.*, 'Comparative performance of SARS-CoV-2 lateral flow antigen tests and association with detection of infectious virus in clinical specimens: a single-centre laboratory evaluation study', *Lancet Microbe*, vol. 2, no. 9, pp. e461–e471, Sep. 2021, doi: 10.1016/S2666-5247(21)00143-9.
- [65] M. di Domenico, A. de Rosa, and M. Boccellino, 'Detection of SARS-COV-2 Proteins Using an ELISA Test', *Diagnostics*, vol. 11, no. 4, p. 698, Apr. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11040698.
- [66] G. Sapkal *et al.*, 'Development of indigenous IgG ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG', *Indian Journal of Medical Research*, vol. 151, no. 5, p. 444, 2020, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_2232_20.
- [67] M. A. MacMullan *et al.*, 'ELISA detection of SARS-CoV-2 antibodies in saliva', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 20818, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-77555-4.
- [68] A. Padoan, C. Cosma, L. Sciacovelli, D. Faggian, and M. Plebani, 'Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and

- antibody kinetics', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 58, no. 7, pp. 1081–1088, Jun. 2020, doi: 10.1515/cclm-2020-0443.
- [69] W. M. Freeman, S. J. Walker, and K. E. Vrana, 'Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential', *Biotechniques*, vol. 26, no. 1, pp. 112–125, Jan. 1999, doi: 10.2144/99261rv01.
- [70] S. F. C. Hawkins and P. C. Guest, 'Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR', 2017, pp. 125–133. doi: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- [71] J. Olmsted and D. R. Kearns, 'Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids', *Biochemistry*, vol. 16, no. 16, pp. 3647–3654, Aug. 1977, doi: 10.1021/bi00635a022.
- [72] F. Ponchel *et al.*, 'Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions', *BMC Biotechnol*, vol. 3, no. 1, p. 18, 2003, doi: 10.1186/1472-6750-3-18.
- [73] N. Younes *et al.*, 'Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2', *Viruses*, vol. 12, no. 6, p. 582, May 2020, doi: 10.3390/v12060582.
- [74] A. S. Basu, 'Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR', *SLAS Technol*, vol. 22, no. 4, pp. 369–386, Aug. 2017, doi: 10.1177/2472630317705680.
- [75] L. B. Pinheiro *et al.*, 'Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification', *Anal Chem*, vol. 84, no. 2, pp. 1003–1011, Jan. 2012, doi: 10.1021/ac202578x.
- [76] I. Hudecova, 'Digital PCR analysis of circulating nucleic acids', *Clin Biochem*, vol. 48, no. 15, pp. 948–956, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.03.015.
- [77] J. Pavšič, J. Žel, and M. Milavec, 'Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification', *Anal Bioanal Chem*, vol. 408, no. 1, pp. 107–121, Jan. 2016, doi: 10.1007/s00216-015-9107-2.
- [78] L. Deprez *et al.*, 'Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material', *Biomol Detect Quantif*, vol. 9, pp. 29–39, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.bdq.2016.08.002.
- [79] S. Bhat and K. R. Emslie, 'Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials', *Biomol Detect Quantif*, vol. 10, pp. 47–49, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.bdq.2016.04.001.

- [80] M. C. Kline, E. L. Romsos, and D. L. Duewer, 'Evaluating Digital PCR for the Quantification of Human Genomic DNA: Accessible Amplifiable Targets', *Anal Chem*, vol. 88, no. 4, pp. 2132–2139, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03692.
- [81] D. G. Burke *et al.*, 'Digital Polymerase Chain Reaction Measured pUC19 Marker as Calibrant for HPLC Measurement of DNA Quantity', *Anal Chem*, vol. 85, no. 3, pp. 1657–1664, Feb. 2013, doi: 10.1021/ac302925f.
- [82] W. Richter, 'Primary methods of measurement in chemical analysis', *Accreditation and Quality Assurance*, vol. 2, no. 8, pp. 354–359, Dec. 1997, doi: 10.1007/s007690050165.
- [83] JCGM, 'Vocabulario Internacional de Metrología Edición del VIM 2008 con inclusión de pequeñas correcciones'. 2008. Accessed: Jan. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
- [84] J. H. E. S. Tania Nolan, 'Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)', 2013.
- [85] International Organization for Standardization, 'ISO Guide 35:2017, Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability', Geneva. 2017.
- [86] International Organization for Standardization, 'ISO 17034:2016(es) Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia'. 2016.
- [87] JCGM 100, 'Evaluación de datos de medición Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida'. 2008.
- [88] International Organization for Standardization, 'ISO/IEC 17025:2017(es) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración'. 2017.
- [89] International Organization for Standardization, 'ISO/IEC 17011:2017(es) Evaluación de la conformidad — Requisitos para los organismos de acreditación que realizan la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad'. 2004.
- [90] International Organization for Standardization, 'ISO/IEC 17043:2010(es), Evaluación de la conformidad — Requisitos generales para los ensayos de aptitud', 2010.
- [91] G. H. White, 'Metrological traceability in clinical biochemistry', *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, vol. 48, no. 5, pp. 393–409, Sep. 2011, doi: 10.1258/acb.2011.011079.

- [92] Q.-X. Long *et al.*, 'Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections', *Nat Med*, vol. 26, no. 8, pp. 1200–1204, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.
- [93] I. A. Mattioli, A. Hassan, O. N. Oliveira, and F. N. Crespilho, 'On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies', *ACS Sens*, vol. 5, no. 12, pp. 3655–3677, Dec. 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c01382.
- [94] J. Kashir and A. Yaqinuddin, 'Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19', *Med Hypotheses*, vol. 141, p. 109786, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
- [95] U. Ganbaatar and C. Liu, 'CRISPR-Based COVID-19 Testing: Toward Next-Generation Point-of-Care Diagnostics', *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, Apr. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.663949.
- [96] B. Merrick *et al.*, 'Real-world deployment of lateral flow SARS-CoV-2 antigen detection in the emergency department to provide rapid, accurate and safe diagnosis of COVID-19', *Infection Prevention in Practice*, vol. 3, no. 4, p. 100186, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.infpip.2021.100186.
- [97] I. N. de S. MinSalud, 'LINEAMIENTOS PARA EL USO DE PRUEBAS MOLECULARES RT-PCR, PRUEBAS DE ANTÍGENO Y PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA SARS-CoV-2 (COVID-19) EN COLOMBIA', Aug. 2020.
- [98] J. Santaella-Tenorio, 'SARS-CoV-2 diagnostic testing alternatives for Latin America', *Colomb Med*, pp. 1–7, May 2020, doi: 10.25100/cm.v51i2.4272.
- [99] D. N. Marcone, G. Carballal, C. Ricarte, and M. Echavarría, 'Diagnóstico de virus respiratorios utilizando un sistema automatizado de PCR múltiples (FilmArray) y su comparación con métodos convencionales', *Rev Argent Microbiol*, vol. 47, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ram.2014.12.003.
- [100] C. Camacho *et al.*, 'BLAST+: architecture and applications', *BMC Bioinformatics*, vol. 10, no. 1, p. 421, Dec. 2009, doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- [101] George Quellhorst and Sam Rulli, 'A systematic guideline for developing the best real-time PCR primers', *QIAGEN*, 2018.
- [102] A. Rodríguez, M. Rodríguez, J. J. Córdoba, and M. J. Andrade, 'Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods', 2015, pp. 31–56. doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3.
- [103] GenScript, 'Real-time PCR (TaqMan) Primer and Probes Design Tool', Jan. 23, 2023.

- [104] R. J. Dikdan *et al.*, 'Multiplex PCR Assays for Identifying all Major Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants', *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 24, no. 4, pp. 309–319, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.01.004.
- [105] L. Peñarrubia *et al.*, 'Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak', *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 97, pp. 225–229, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.ijid.2020.06.027.
- [106] K. Wernike, M. Keller, F. J. Conraths, T. C. Mettenleiter, M. H. Groschup, and M. Beer, 'Pitfalls in SARS-CoV-2 PCR diagnostics', *Transbound Emerg Dis*, vol. 68, no. 2, pp. 253–257, Mar. 2021, doi: 10.1111/tbed.13684.
- [107] H. Tombuloglu, H. Sabit, E. Al-Suhaimi, R. al Jindan, and K. R. Alkharsah, 'Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2', *PLoS One*, vol. 16, no. 4, p. e0250942, Apr. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0250942.
- [108] T. Phan, 'Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2', *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 81, p. 104260, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260.
- [109] L. van Dorp *et al.*, 'Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2', *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 83, p. 104351, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
- [110] I. Saha, N. Ghosh, A. Pradhan, N. Sharma, D. Maity, and K. Mitra, 'Whole genome analysis of more than 10 000 SARS-CoV-2 virus unveils global genetic diversity and target region of NSP6', *Brief Bioinform*, vol. 22, no. 2, pp. 1106–1121, Mar. 2021, doi: 10.1093/bib/bbab025.
- [111] J. R. C. Pulliam *et al.*, 'Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa', *Science (1979)*, vol. 376, no. 6593, May 2022, doi: 10.1126/science.abn4947.
- [112] T. McMillen, K. Jani, E. v. Robiloti, M. Kamboj, and N. E. Babady, 'The spike gene target failure (SGTF) genomic signature is highly accurate for the identification of Alpha and Omicron SARS-CoV-2 variants', *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 18968, Nov. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-21564-y.
- [113] R. K. Kakhki, M. K. Kakhki, and A. Neshani, 'COVID-19 target: A specific target for novel coronavirus detection', *Gene Rep*, vol. 20, p. 100740, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.genrep.2020.100740.

-
- [114] J. Brodin *et al.*, 'A multiple-alignment based primer design algorithm for genetically highly variable DNA targets', *BMC Bioinformatics*, vol. 14, no. 1, p. 255, Dec. 2013, doi: 10.1186/1471-2105-14-255.
- [115] C. Aranha, V. Patel, V. Bhor, and D. Gogoi, 'Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients', *J Med Virol*, vol. 93, no. 12, pp. 6794–6797, Dec. 2021, doi: 10.1002/jmv.27206.
- [116] D. C. Edson, D. L. Casey, S. E. Harmer, and F. P. Downes, 'Identification of SARS-CoV-2 in a Proficiency Testing Program', *Am J Clin Pathol*, vol. 154, no. 4, pp. 475–478, Sep. 2020, doi: 10.1093/ajcp/aqaa128.
- [117] L. Vierbaum *et al.*, 'RNA reference materials with defined viral RNA loads of SARS-CoV-2—A useful tool towards a better PCR assay harmonization', *PLoS One*, vol. 17, no. 1, p. e0262656, Jan. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0262656.
- [118] S. Asai *et al.*, 'Nationwide external quality assessment of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification tests in Japan', *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 115, pp. 86–92, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.ijid.2021.11.022.
- [119] H. Sung *et al.*, 'Nationwide External Quality Assessment of SARS-CoV-2 Molecular Testing, South Korea', *Emerg Infect Dis*, vol. 26, no. 10, pp. 2353–2360, Oct. 2020, doi: 10.3201/eid2610.202551.
- [120] LGC Standards, 'SARS-CoV-2 Clinical Scheme - Proficiency Testing', 2023.
- [121] College of American Pathologist, 'SARS-COV-2 MOLECULAR Proficiency testing', 2021.
- [122] Merck, 'SARS-CoV-2 Proficiency Testing Kit', 2023.
- [123] K. A. Lau, A. Kaufer, J. Gray, T. Theis, and W. D. Rawlinson, 'Proficiency testing for SARS-CoV-2 in assuring the quality and overall performance in viral RNA detection in clinical and public health laboratories', *Pathology*, vol. 54, no. 4, pp. 472–478, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.pathol.2022.01.006.
- [124] World of Health Organization, 'Collaborative Study for the Establishment of a WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA', Nov. 2020.
- [125] National Institute for Biological Standards and Control, 'First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA 20/146'.
- [126] National Institute for Biological Standards and Control, 'Working Reagent for SARS-CoV-2 RNA 20/138'.

- [127] National Sharing Platform for Reference Materials, 'Certified Reference Material of 2019 Novel Corona Virus (2019-nCoV) Ribonucleic Acid Genome', *China*.
- [128] National Institute of Standards and Technology, 'SARS-CoV-2 Research Grade Test Material'.
- [129] Joint Research Centre, 'EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2'.
- [130] Joint Research Centre, 'EURM-014 ssRNA'.
- [131] SeraCare, 'AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit'.
- [132] S.-S. Lee, S. Kim, H. M. Yoo, D.-H. Lee, and Y.-K. Bae, 'Development of SARS-CoV-2 packaged RNA reference material for nucleic acid testing', *Anal Bioanal Chem*, vol. 414, no. 5, pp. 1773–1785, Feb. 2022, doi: 10.1007/s00216-021-03846-y.
- [133] Merck, 'Single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2'.
- [134] National Measurement Institute, 'SARS-CoV-2 Standard', 2021.
- [135] R Core Team, 'R: A Language and Environment for Statistical Computing'. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.
- [136] A. Lievens, S. Jacchia, D. Kagkli, C. Savini, and M. Querci, 'Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization', *PLoS One*, vol. 11, no. 5, p. e0153317, May 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153317.
- [137] C. Villamil, M. N. Calderon, M. M. Arias, and J. E. Leguizamon, 'Validation of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Salmonella spp. Quantification', *Front Microbiol*, vol. 11, Jul. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01512.
- [138] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, 'Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench', *Bioinformatics*, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191, May 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- [139] G. A. Pavlopoulos, T. G. Soldatos, A. Barbosa-Silva, and R. Schneider, 'A reference guide for tree analysis and visualization', *BioData Min*, vol. 3, no. 1, p. 1, Dec. 2010, doi: 10.1186/1756-0381-3-1.
- [140] V. R. Flores-Vega, J. V. Monroy-Molina, L. E. Jiménez-Hernández, A. G. Torres, J. I. Santos-Preciado, and R. Rosales-Reyes, 'SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants', *Viruses*, vol. 14, no. 4, p. 653, Mar. 2022, doi: 10.3390/v14040653.

- [141] E. W. Myers and W. Miller, 'Optimal alignments in linear space', *Bioinformatics*, vol. 4, no. 1, pp. 11–17, 1988, doi: 10.1093/bioinformatics/4.1.11.
- [142] F. Yuan, L. Wang, Y. Fang, and L. Wang, 'Global SNP analysis of 11,183 SARS-CoV-2 strains reveals high genetic diversity', *Transbound Emerg Dis*, vol. 68, no. 6, pp. 3288–3304, Nov. 2021, doi: 10.1111/tbed.13931.
- [143] A. Mendes *et al.*, 'Identification of mutations in SARS-CoV-2 PCR primer regions', *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 18651, Nov. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-21953-3.
- [144] R. E. Thompson, 'An Analysis of Efficiency and Melt Curve Effects on Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Inhibition', Florida International University, 2010. doi: 10.25148/etd.FI10122001.
- [145] S. Fellahi *et al.*, 'Comparison of SYBR green I real-time RT-PCR with conventional agarose gel-based RT-PCR for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in Morocco', *BMC Res Notes*, vol. 9, no. 1, p. 231, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13104-016-2037-z.
- [146] D. Svec, A. Tichopad, V. Novosadova, M. W. Pfaffl, and M. Kubista, 'How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments', *Biomol Detect Quantif*, vol. 3, pp. 9–16, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.bdq.2015.01.005.
- [147] J. Maier, T. Lange, M. Cross, K. Wildenberger, D. Niederwieser, and G.-N. Franke, 'Optimized Digital Droplet PCR for BCR-ABL', *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 21, no. 1, pp. 27–37, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.08.012.
- [148] B. Derendinger *et al.*, 'Widespread use of incorrect PCR ramp rate negatively impacts multidrug-resistant tuberculosis diagnosis (MTBDRplus)', *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 3206, Feb. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21458-y.
- [149] S. A. Bustin *et al.*, 'The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments', *Clin Chem*, vol. 55, no. 4, pp. 611–622, Apr. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- [150] International Organization for Standardization, 'ISO 20395:2019 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR', 2019.
- [151] A. Frootan, R. Sjöback, J. Björkman, B. Sjögreen, L. Linz, and M. Kubista, 'Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)', *Biomol Detect Quantif*, vol. 12, pp. 1–6, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001.

- [152] D. Hospodsky, N. Yamamoto, and J. Peccia, 'Accuracy, Precision, and Method Detection Limits of Quantitative PCR for Airborne Bacteria and Fungi', *Appl Environ Microbiol*, vol. 76, no. 21, pp. 7004–7012, Nov. 2010, doi: 10.1128/AEM.01240-10.
- [153] G. B. Barra, T. H. Santa Rita, P. G. Mesquita, R. H. Jácomo, and L. F. A. Nery, 'Analytical Sensitivity and Specificity of Two RT-qPCR Protocols for SARS-CoV-2 Detection Performed in an Automated Workflow', *Genes (Basel)*, vol. 11, no. 10, p. 1183, Oct. 2020, doi: 10.3390/genes11101183.
- [154] P. N. Patrone, E. L. Romsos, M. H. Cleveland, P. M. Vallone, and A. J. Kearsley, 'Affine analysis for quantitative PCR measurements', *Anal Bioanal Chem*, vol. 412, no. 28, pp. 7977–7988, Nov. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02930-z.
- [155] L. Deprez *et al.*, 'Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material', *Biomol Detect Quantif*, vol. 9, pp. 29–39, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.bdq.2016.08.002.
- [156] A. S. Basu, 'Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR', *SLAS Technol*, vol. 22, no. 4, pp. 369–386, Aug. 2017, doi: 10.1177/2472630317705680.
- [157] H. N. Vasudevan *et al.*, 'Digital droplet PCR accurately quantifies SARS-CoV-2 viral load from crude lysate without nucleic acid purification', *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 780, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80715-1.
- [158] C. Schulze, A.-C. Geuthner, and D. Mäde, 'Development and validation of a method for quantification of common wheat, durum wheat, rye and barley by droplet digital PCR', *European Food Research and Technology*, vol. 247, no. 9, pp. 2267–2283, Sep. 2021, doi: 10.1007/s00217-021-03786-y.
- [159] R. E. Farrell, 'Resilient Ribonucleases', in *RNA Methodologies*, Elsevier, 2010, pp. 155–172. doi: 10.1016/B978-0-12-374727-3.00007-3.
- [160] J. T. Millard, 'Molecular Probes of DNA Structure', in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, 1999, pp. 81–103. doi: 10.1016/B978-0-08-091283-7.00158-2.