



Evaluación del kit de detección de SARS-CoV2 "Isopollo COVID-19 DETECTION kit" (Monitor, South Korea)

Informe 2

En el presente informe se detallan los resultados del segundo estudio de evaluación de sensibilidad y especificidad del kit "Isopollo COVID-19 detection kit" (Monitor, South Korea), utilizando como referencia o "gold standard" el protocolo del "Centre for Disease Control and Prevention" (CDC) de USA, utilizando el kit "2019-nCoV CDC EUA kit" (IDT, USA) (1,2).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, en esta segunda validación se utilizó un volumen final de reacción de 25uL tal como aparece reflejado en la Tabla 1.

Se seleccionaron para la evaluación un total de 92 muestras de RNA extraídos de hisopados nasofaríngeos que fueron previamente analizadas según el protocolo del CDC (1,2). Los valores de Ct para las sondas N1, N2 y RP incluidos en el kit "2019-nCoV CDC EUA" aparecen detallados en el Anexo 1. A partir de los valores de Ct para N1 se procedió al cálculo de la carga viral (copias de RNA viral por uL) para las muestras positivas para SARS-CoV-2 (2).

De las 92 muestras seleccionadas, 71 fueron SARS-CoV2 positivas y 21 SARS-CoV2 negativas según el protocolo del CDC (1,2). El límite de detección (LOD) del protocolo CDC es de 2 copias de RNA viral/uL para nuestras condiciones experimentales. Ver Tabla 2.

Las 92 muestras fueron a continuación analizadas utilizando el kit "Isopollo COVID-19 detection kit" siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Las 21 muestras negativas para el "protocolo CDC" también fueron negativas para el "protocolo Isopollo", indicativo de una especificidad para "Isopollo COVID-19 detection kit" de 100% (sin embargo hacemos notar que el panel de muestras negativas incluidas en el estudio no incluye muestras confirmadas positivas para otros virus respiratorios, pues la ausencia de reactividad cruzada para "2019-nCoV CDC EUA kit" ya ha sido probada por el CDC).

- De las 71 muestras positivas para el "protocolo CDC", 26 muestras resultaron negativas para el "protocolo Isopollo" (ver Tabla 2). Por tanto, para LOD = 2 copias/uL la sensibilidad obtenida fue de 63.4%.

Sin embargo, como se observa en la Tabla 2, la distribución de "falsos negativos" para el "protocolo Isopollo" no es uniforme y se concentra en valores bajos de carga viral. En ese sentido, detallamos a continuación los valores de sensibilidad para valores mayores de LOD:



- Para LOD = 250 copias/uL, del total de 39 muestras positivas para el "protocolo CDC", 6 muestras fueron negativas para el "protocolo Isopollo", resultando una sensibilidad de 84.6%. Del total de 33 muestras positivas para el "protocolo CDC" con cargas virales menores a 250 copias/uL, 22 muestras fueron negativas para el "protocolo Isopollo" resultando una sensibilidad para cargas virales menores a 250 copias/uL de 33.3%.

- Para LOD = 500 copias/uL, del total de 35 muestras positivas para el "protocolo CDC", 4 muestras fueron negativas para el "protocolo Isopollo", resultando una sensibilidad de 88.5%. Del total de 36 muestras positivas para el "protocolo CDC" con cargas virales menores a 500 copias/uL, 22 muestras fueron negativas para el "protocolo Isopollo" resultando una sensibilidad para cargas virales menores a 500 copias/uL de 38.9%.

Adicionalmente, con objeto de determinar la potencial utilidad del "protocolo Isopollo" para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en población no hospitalizada por sintomatología compatible con COVID-19, detallamos datos de distribución de carga viral para los 859 individuos diagnosticados como SARS-CoV2 positivos en nuestro laboratorio:

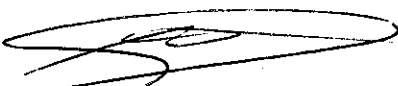
- Cargas virales menores a 250 copias/uL corresponden al 45.05% del total de individuos SARS-CoV2 positivos.

- Cargas virales menores a 500 copias/uL corresponden al 51.69% del total de individuos SARS-CoV2 positivos.

Nuestros cálculos de carga viral en copias/uL hacen referencia a la concentración de partículas virales en la solución de RNA extraído de la muestra de hisopado nasofaríngeo. Dado que en nuestro protocolo de extracción se utilizan 200uL de muestra de solución de transporte de hisopado nasofaríngeo, y que la elución final en la extracción de RNA se hace en 40uL, el factor de conversión de copias/uL de solución de RNA extraído a copias/mL de muestra es 200. Es decir, a modo de ejemplo, 500 copias/uL de solución de RNA correspondería a 10^5 copias/mL de muestra.

Valores similares a los obtenidos por nuestro laboratorio para la distribución de frecuencias de cargas virales han sido reportados en otros estudios (3,4).

En Quito, 8 de Julio de 2020.


Miguel Ángel García Bereguain, PhD.
One Health Research Group.
Universidad de Las Américas. Quito. Ecuador
miguel.garcia.bereguain@udla.edu.ec

2/6

Tabla 1. Mezcla de reacción de 25uL para "protocolo Isopollo".

| Componente | Stock | Unidad | Ci | Conc. Final | Vol x 1 (µL) |
|---------------------------|-------|--------|------|-------------|--------------|
| Agua MQ | 1 | | 1 | 1 | 0,5 |
| Reaction Buff | 2 | X | 2 | 1 | 12,5 |
| Detection PR | 12,5 | uM | 12,5 | 1 | 2,0 |
| Enzyme Mix | 25 | X | 25 | 1 | 1,0 |
| Template | 25 | ng/uL | 25 | 9 | 9,0 |
| Volumen final Mix | | | | | 16,0 |
| Volumen final de reacción | | | | | 25 |

Tabla 2. Valores de Ct y carga viral (copias/uL de solución de RNA) para las 92 muestras procesadas por protocolo CDC y protocolo Isopollo.

| n | ID | Viral load (c/uL) | C _T N1 | C _T N2 | C _T RP | CDC Result | C _T N | C _T RdRP | Isopollo Result |
|---|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | 6837 | 4,09E+06 | 16,72 | 17,72 | 25,39 | Positivo | 16,54 | 13,37 | Positivo |
| | 4870 | 3,18E+05 | 20,89 | 22,37 | 23,11 | Positivo | 20,14 | 16,26 | Positivo |
| | 4876 | 3,05E+05 | 20,96 | 22,27 | 23,66 | Positivo | 20,34 | 16,82 | Positivo |
| | 4885 | 1,97E+05 | 21,19 | 22,18 | 27,66 | Positivo | 19,53 | 16,62 | Positivo |
| | 6736 | 1,05E+05 | 22,23 | 23,18 | 21,28 | Positivo | 24,55 | 21,06 | Positivo |
| | 4892 | 9,85E+04 | 22,21 | 23,56 | 21,61 | Positivo | 28,64 | 23,61 | Positivo |
| | 6543 | 6,34E+04 | 22 | 25,14 | 24,96 | Positivo | 19,47 | 17,26 | Positivo |
| | 4882 | 5,21E+04 | 23,15 | 24,13 | 25,54 | Positivo | 20,68 | 16,19 | Positivo |
| | 6691 | 4,24E+04 | 21,15 | 24,03 | 23,32 | Positivo | 20,52 | 16,71 | Positivo |
| | 4898 | 4,07E+04 | 24,09 | 25,15 | 21,6 | Positivo | 24,68 | 19,6 | Positivo |
| | 4883 | 2,40E+04 | 24,29 | 25,28 | 26,92 | Positivo | 22,82 | 18,77 | Positivo |
| | 6712 | 2,38E+04 | 22,23 | 24,82 | 18,15 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| | 4935 | 1,30E+04 | 25,87 | 27,66 | 25,57 | Positivo | 24,87 | 19,58 | Positivo |
| | 4896 | 1,19E+04 | 25,33 | 26,35 | 28,1 | Positivo | 23,7 | 18,64 | Positivo |
| | 6535 | 7,43E+03 | 26,74 | 35,02 | 27,2 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6839 | 3,65E+03 | 27,07 | 28,02 | 24,89 | Positivo | 25,69 | 22,19 | Positivo |
| | 6541 | 3,08E+03 | 27,15 | 29,39 | 28,83 | Positivo | 22,05 | 18,24 | Positivo |
| | 4879 | 2,80E+03 | 27,46 | 28,57 | 24,75 | Positivo | 27,8 | 21,48 | Positivo |
| | 4917 | 2,36E+03 | 27,71 | 29,11 | 25,76 | Positivo | 27,36 | 22,5 | Positivo |
| | 4865 | 1,72E+03 | 29,01 | 30,4 | 26,85 | Positivo | 28,32 | 24,63 | Positivo |
| | 4848 | 1,66E+03 | 28,23 | 29,95 | 27,41 | Positivo | 24,44 | 22,79 | Positivo |
| | 4924 | 1,63E+03 | 29,09 | 30,82 | 29,21 | Positivo | 28,35 | 26,7 | Positivo |
| | 6531 | 1,37E+03 | 29,36 | 31,02 | 29,11 | Positivo | 29,59 | 24,1 | Positivo |
| | 1658 | 1,12E+03 | 27,82 | 28,32 | 20,51 | Positivo | 38,76 | N/A | Positivo |
| | 1703 | 1,01E+03 | 27,99 | 29,39 | 22,85 | Positivo | 30,28 | 25,45 | Positivo |

udla

| | | | | | | | | |
|------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|
| 6831 | 9,35E+02 | 29,07 | 30,92 | 20,09 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6735 | 8,37E+02 | 29,14 | 31,03 | 22,74 | Positivo | 27,14 | N/A | Positivo |
| 6832 | 7,84E+02 | 29,33 | 31,18 | 23,4 | Positivo | N/A | 31,03 | Positivo |
| 6706 | 7,24E+02 | 28,8 | 32,69 | 20,84 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6714 | 7,22E+02 | 28,8 | 30,81 | 23,12 | Positivo | 35,86 | 29,36 | Positivo |
| 758 | 7,17E+02 | 28,53 | 29,82 | 28,06 | Positivo | 25,08 | 21,45 | Positivo |
| 1698 | 7,06E+02 | 28,56 | 30,12 | 26,26 | Positivo | 25,25 | 24,45 | Positivo |
| 4937 | 6,24E+02 | 30,59 | 32,22 | 27,05 | Positivo | N/A | 31,29 | Positivo |
| 1669 | 5,57E+02 | 28,93 | 30,32 | 23,6 | Positivo | N/A | 29,79 | Positivo |
| 1712 | 5,30E+02 | 29,01 | 30,28 | 25,25 | Positivo | 34,62 | 19,34 | Positivo |
| 4887 | 3,64E+02 | 30,46 | 31,74 | 27,17 | Positivo | 34,76 | 37,24 | Positivo |
| 6530 | 3,35E+02 | 31,55 | 33,39 | 27,4 | Positivo | 26,64 | 35,3 | Positivo |
| 6528 | 2,46E+02 | 32,04 | 33,39 | 24,32 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6812 | 2,45E+02 | 31,05 | 33,3 | 25,43 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6717 | 2,33E+02 | 30,92 | 33,34 | 21,15 | Positivo | N/A | 38,68 | Positivo |
| 4886 | 2,05E+02 | 31,31 | 33,23 | 22,75 | Positivo | N/A | 27,84 | Positivo |
| 6519 | 1,66E+02 | 32,65 | 34,24 | 23,65 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6694 | 1,54E+02 | 31,7 | 34,81 | 24,38 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 1662 | 1,43E+02 | 31,09 | 32,5 | 25,54 | Positivo | 32,63 | 33,18 | Positivo |
| 6759 | 1,42E+02 | 31,87 | 35,3 | 25,79 | Positivo | 39,94 | 23,59 | Positivo |
| 4931 | 1,36E+02 | 32,96 | 34,24 | 29,46 | Positivo | N/A | 30,1 | Positivo |
| 6726 | 1,06E+02 | 32,1 | 33,57 | 25,17 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4863 | 8,24E+01 | 32,65 | 36,71 | 27,01 | Positivo | N/A | 24,12 | Positivo |
| 1691 | 7,68E+01 | 32,08 | 34,28 | 25,53 | Positivo | N/A | 24,93 | Positivo |
| 2278 | 6,31E+01 | 32,39 | 34,88 | 23,03 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 755 | 5,88E+01 | 32,5 | 34,3 | 28,61 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 1659 | 4,97E+01 | 32,77 | 35 | 24,41 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6834 | 4,38E+01 | 33,59 | 35,11 | 22,51 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 6375 | 4,26E+01 | 33,4 | 37,2 | 24,6 | Positivo | N/A | 33,63 | Positivo |
| 6539 | 3,86E+01 | 34,6 | 38,5 | 24,51 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 1696 | 3,55E+01 | 33,3 | 36,12 | 31,21 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 2289 | 3,31E+01 | 33,41 | 34,96 | 25,52 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4867 | 2,70E+01 | 35,47 | 37,6 | 28,29 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 5229 | 2,20E+01 | 35,56 | 37,1 | 25,86 | Positivo | N/A | 32,81 | Positivo |
| 1699 | 1,88E+01 | 34,32 | 36,55 | 26,24 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4895 | 1,86E+01 | 34,85 | 35,96 | 26,65 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4894 | 1,76E+01 | 34,93 | 35,62 | 22,93 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4841 | 1,66E+01 | 35,01 | 38,25 | 29,58 | Positivo | N/A | 35,17 | Positivo |
| 763 | 1,56E+01 | 34,61 | 35,64 | 26,46 | Positivo | N/A | 39,4 | Positivo |
| 6517 | 1,04E+01 | 36,96 | 39,15 | 26,04 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 1704 | 8,90E+00 | 35,5 | 36,34 | 28,53 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| 4859 | 7,92E+00 | 36,1 | 37,23 | 28,57 | Positivo | 36,02 | 39,14 | Positivo |
| 6548 | 7,29E+00 | 37,43 | 39,55 | 23,29 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |

4/6

udla

| | | | | | | | | | |
|--|------|----------|-------|-------|-------|----------|-----|-----|----------|
| | 2286 | 6,28E+00 | 36,05 | 40,58 | 26,46 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6524 | 4,12E+00 | 37,07 | 36,67 | 29,18 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6525 | 3,91E+00 | 37,15 | 37,19 | 27,26 | Positivo | N/A | N/A | Negativo |
| | 5296 | 0 | N/A | N/A | 29,13 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 5297 | 0 | N/A | N/A | 26,12 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 5298 | 0 | N/A | N/A | 28,63 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 5299 | 0 | N/A | N/A | 26,38 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6813 | 0 | N/A | N/A | 25,16 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6814 | 0 | N/A | N/A | 24,31 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6815 | 0 | N/A | N/A | 23,01 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6816 | 0 | N/A | N/A | 25,86 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6817 | 0 | N/A | N/A | 25,3 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6818 | 0 | N/A | N/A | 23,16 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6819 | 0 | N/A | N/A | 27,35 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6820 | 0 | N/A | N/A | 26,76 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6821 | 0 | N/A | N/A | 27,71 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6822 | 0 | N/A | N/A | 29,07 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6823 | 0 | N/A | N/A | 26,11 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6824 | 0 | N/A | N/A | 27,17 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6825 | 0 | N/A | N/A | 27,98 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6827 | 0 | N/A | N/A | 27,57 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6828 | 0 | N/A | N/A | 26,39 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6829 | 0 | N/A | N/A | 24,17 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |
| | 6830 | 0 | N/A | N/A | 27,18 | Negativo | N/A | N/A | Negativo |

5/6

Referencias.

1. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Center for Diseases Control and Prevention, USA. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
2. Byron Freire-Paspuel, Patricio Vega-Mariño, Alberto Velez, Paulina Castillo, Marilyn Cruz, Miguel Angel Garcia-Bereguain. Evaluation of nCoV-QS (MiCo BioMed) for RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2 From Nasopharyngeal Samples Using CDC FDA EUA qPCR Kit as a Gold Standard: An Example of the Need of Validation Studies. *J Clin Virol.* 2020 May 22;128:104454. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104454.
3. Enrico Lavezzo et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature*. Accelerated Article Preview Published online 30 June 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2488-1> (2020).
4. Steven Kleiboeker, Scott Cowden, James Grantham, Jamie Nutt, Aaron Tyler, Amy Berg, Michelle Altrich. SARS-CoV-2 Viral load Assessment in Respiratory Samples. *J Clin Virol.* 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104439>.