



Identificación de pruebas comerciales de PCR útiles para detectar virus SARS-CoV-2 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos durante el primer año de pandemia de COVID-19 en México

Identification of useful commercial PCR tests to detect SARS-CoV-2 viruses at the Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference during the first year of the COVID-19 pandemic in Mexico

* Maestría en Investigación Biomédica Básica.

† Doctorado en Ciencias.

§ Química Farmacéutica Bióloga.

¶ Maestra en Gestión de la Salud.

|| Bióloga.

** Maestra en Ciencias.

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México.

Correspondencia: CGB, cguzmanbracho@hotmail.com

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Citar como: Gómez PC, Guzmán BC, Gordillo MM, Ramírez GJE, Hernández RL, López MI et al.

Identificación de pruebas comerciales de PCR útiles para detectar virus SARS-CoV-2 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos durante el primer año de pandemia de COVID-19 en México. Rev CONAMED. 2022; 27(2): 68-79. <https://dx.doi.org/10.35366/106227>

Financiamiento: Se tuvo financiamiento federal.

Recibido: 10/06/2022

Aceptado: 13/06/2022

Disclaimer "This Boletín CONAMED is published by CONAMED, which is a WHO Collaborating Centre; it is not a publication of the World Health Organization. The Revista CONAMED and the author of the article are responsible for the views expressed in this article, and the views do not necessarily represent the decisions or policies of the World Health Organization."

Disclaimer "Este Boletín CONAMED es publicado por CONAMED, que es un Centro Colaborador de la OMS, no es una publicación de la Organización Mundial de la Salud. La Revista CONAMED y el autor del artículo son responsables de los puntos de vista expresados en este artículo, y los puntos de vista no representan necesariamente las decisiones o políticas de la Organización Mundial de la Salud."

Claudia Gómez Palomino,* Carmen Guzmán Bracho,†
Maricela Gordillo Marín,§ J Ernesto Ramírez González,†
Lucía Hernández Rivas,¶ Irma López Martínez,|| Gisela Barrera Badillo,**
Noé Escobar Escamilla,† Hiram Olivera Díaz,* Grupo de Evaluación††

‡‡ Integrantes del Grupo de Evaluación del InDRE:

Elizabeth Andrade Montiel, Marcos Aparicio Antonio, Dayanira Sarith Arellano Suarez, Elvia Arzate Figueroa, Javier Belmont Ruiz, Elizabeth Adriana Brito Martínez, Nervain Benjamín Contreras González, María Natividad Cruz Ortiz, Gabriela Marien de la Rosa Ríos, Jaime Israel Falcón Acosta, Hilario Flores Aguilar, David Esaú Fragoso Fonseca, José Pablo García Ruiz, Betsy Annel González-Quezada, Maricela Gordillo Marín, Carlos Hernández Alcántara, Jaime Venancio Hernández Flores, Mayra Jiménez Morales, Lourdes Lloret Sánchez, Mayra G Meléndez Hernández, Nancy Muñoz Hernández, Andrea J Munguía Saldaña, América del Pilar Mandujano Martínez, Tatiana Ernestina Núñez García, Fernanda Pérez Villagómez, María Inés Prado Godínez, Araceli Rodríguez Castillo, Beatriz Adriana Rodríguez López, Juan Luis Téllez Rendón, Alejandra Vázquez Abundes.

RESUMEN

Desde la fase inicial de la dispersión del virus SARS-CoV-2 en Wuhan, China, la confirmación etiológica de casos de infección respiratoria aguda se ha realizado a través de la identificación del ARN viral, principalmente mediante pruebas de RT-PCR en tiempo real. Desde la aparición del primer caso fuera de China en enero de 2020, en el InDRE (el laboratorio nacional de referencia para la vigilancia epidemiológica en México) se estandarizó una de las primeras técnicas moleculares para la identificación del nuevo coronavirus a nivel mundial. Después, a partir del 3 de febrero, el InDRE y la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública implementaron en todo el país una de las pruebas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico. A mediados de marzo, como parte de la respuesta diagnóstica durante la contingencia, el InDRE inició la evaluación preliminar de las pruebas de diagnóstico molecular en proceso de introducción al mercado comercial en el país. La evaluación consiste en la verificación por laboratorio de los criterios analíticos específicos y definidos por los fabricantes. Hasta marzo de 2021 se identificaron 84 pruebas de PCR útiles incluidas en un listado disponible en la página oficial de la Secretaría de Salud. Se trata de productos de alto rendimiento, que respaldan la oferta y demanda de pruebas comerciales con buen desempeño analítico y ofrecen al usuario mayor probabilidad de identificar correctamente a individuos positivos o negativos. El reto asumido para realizar la evaluación en el laboratorio, y no sólo documental, ha sido un desafío exitoso,

de manera que el liderazgo y rectoría del InDRE han quedado fortalecidos en este evento pandémico, tanto a nivel nacional como regional.

Palabras clave: PCR, SARS-CoV-2, InDRE, México, verificación.

ABSTRACT

Since the initial phase of the spread of the SARS-CoV-2 virus in Wuhan, China, the etiological confirmation of cases of acute respiratory infection has been carried out through the identification of viral RNA mainly through real-time RT-PCR tests. Since the appearance of the first case outside China in January 2020, one of the first molecular techniques for the identification of the new coronavirus worldwide has been standardized at InDRE (the national reference laboratory for epidemiological surveillance in Mexico). Later, as of February 3, the InDRE and the National Network of Public Health Laboratories implemented one of the tests recommended by the WHO for diagnosis throughout the country. In mid-March, as part of the diagnostic response during the contingency, the InDRE began the preliminary evaluation of molecular diagnostic tests in the process of being introduced to the commercial market in the country. The evaluation consists of the laboratory verification of the specific analytical criteria defined by the manufacturers. As of March 2021, 84 useful PCR tests have been identified, included in a list available on the official website of the Ministry of Health. These are high-performance products that support the supply and demand of commercial tests with good analytical performance, and offer the user a greater probability of correctly identifying positive or negative individuals. The challenge assumed to carry out the evaluation in the laboratory, and not just a documentary one. It has been a successful challenge, so that the leadership and stewardship of the InDRE have been strengthened in this pandemic event, both at the national and regional levels.

Keywords: PCR, SARS-CoV-2, InDRE, Mexico, method verification.

INTRODUCCIÓN

Durante el invierno de 2019-2020 del hemisferio norte, la presencia de un nuevo virus de alta transmisibilidad y letalidad perturbó al mundo. El SARS-CoV-2 fue identificado en Wuhan, ciudad capital de la provincia de Hubei, China, que alberga grandes centros de desarrollo científico, tecnológico y de investigación. El primer caso de COVID-19 se reportó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 31 de diciembre de 2019. A finales de enero de 2020, el virus se había dispersado hacia diferentes zonas geográficas del mundo, produciendo poco más de 100 casos: en Asia Pacífico (Tailandia, Singapur, Japón, Taiwán, Corea del Sur, entre otros) y en América (Estados Unidos y Canadá), en Oceanía (Australia) y en Europa (Francia, Alemania, Italia y Finlandia).¹ En México, el primer caso fue confirmado el 27 de febrero de 2020 en un viajero mexicano infectado en Italia.^{2,3}

Los laboratorios de diagnóstico son el mejor recurso para identificar al recién llegado coronavirus SARS-CoV-2, agente capaz de producir curvas epidémicas de crecimiento acelerado. Desde la fase inicial de la dispersión viral en Wuhan, la confirmación etiológica de casos de infección res-

piratoria aguda se ha realizado mediante la identificación del ARN viral con pruebas de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) en muestras de secreciones de vías respiratorias altas (VRA).⁴

Los Centros de Control de Enfermedades de Estados Unidos y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades de la Unión Europea pusieron a disposición sendos protocolos; la Organización Panamericana de la Salud promovió el uso del protocolo desarrollado por el grupo del Dr. Christian Drosten en Berlín para implementar el diagnóstico en los laboratorios de referencia de América Latina en apoyo a la emergencia en salud pública.^{5,6}

En México, desde los primeros días de enero de 2020 se inició el diseño de una prueba para el diagnóstico molecular de COVID-19 en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), laboratorio de referencia nacional para la vigilancia epidemiológica en el país.^{7,8} A partir del 3 de febrero se implementó una RT-qPCR basada en el **protocolo de Berlín** como prueba de referencia para México.

Además de los protocolos aplicables en las redes de laboratorios oficiales en el mundo, se han desarrollado múltiples reactivos comerciales con desempeños variables dependientes del diseño de la prueba, de la calidad de la toma y el manejo de la muestra. Los estimadores de desempeño pueden variar para una misma prueba de acuerdo con el ámbito de su aplicación y a las características de la población blanco.⁹ De ahí la importancia de evaluar las nuevas metodologías con protocolos inclusivos de criterios específicos para la correcta aplicabilidad por los usuarios finales, públicos o privados, de los estuches de diagnóstico incorporados al mercado comercial.

Derivado de lo anterior, durante el primer bimestre del año, en el InDRE se visualizó extender la cobertura de servicios homogéneos de diagnóstico por laboratorio a participantes externos a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP). El 28 de febrero se inició la identificación de pruebas útiles para la detección del virus SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR que los fabricantes y distribuidores deseaban poner a disposición en el mercado comercial mexicano. Se evaluaron las pruebas ingresadas al InDRE hasta el 20 de octubre de 2020, cuando la recepción de solicitudes de evaluación de pruebas de PCR exclusivas para COVID-19 se suspendió temporalmente. A partir de esta fecha, en previsión a la temporada invernal de influenza, sólo se aceptaron solicitudes de pruebas multiplexadas, diseñadas para detectar y diferenciar de manera simultánea el ácido nucleico de los virus SARS-CoV-2 e influenza y en algunos casos otros virus respiratorios adicionales.

Este artículo describirá el proceso de las evaluaciones técnicas comparativas de pruebas moleculares para COVID-19 en el InDRE dirigido a identificar las pruebas útiles, se comentarán los obstáculos superados, los desafíos cumplidos, las enseñanzas obtenidas, así como los retos que nos estimulan en el corto y mediano plazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Utilidad de la prueba de RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2. Desde su implementación a mediados de enero de 2020, la RT-PCR constituye la prueba de referencia para el diagnóstico del nuevo agente etiológico. La metodología detecta

la presencia y cantidad de virus en una muestra de la VRA; la carga viral suele ser elevada en los casos sintomáticos, incluso desde unos días previos al desarrollo de síntomas.¹⁰

En general, las pruebas moleculares son utilizadas por los laboratorios de salud pública y en menor medida por laboratorios privados y académicos, ya que se requiere personal profesional especializado no sólo en el manejo de la metodología, sino también en el conocimiento y experiencia de trabajo con medidas de bioseguridad nivel 2 y 3.^{11,12}

La Organización Mundial de la Salud ha recomendado priorizar el uso de estas pruebas basadas en la detección de ácidos nucleicos en cualquiera de sus modalidades de operación: en plataformas abiertas o cerradas.¹³

Si bien la prueba molecular es el estándar de oro para el diagnóstico del virus SARS-CoV-2, la necesidad de identificar casos de manera más económica y rápida, a pie de cama o en aplicación masiva, ha desencadenado investigación intensa e implementación de desarrollos tecnológicos novedosos dirigidos a la búsqueda de anticuerpos o antígenos en los pacientes y población en riesgo de infección.

La utilidad de la prueba molecular y la detección de anticuerpos o antígenos está relacionada con la historia natural de la enfermedad. Hay tres fases postinfección en el ser humano útiles para comprender la aplicación diferencial de las pruebas de laboratorio: 1) periodo de ventana o de infección temprana que se caracteriza por la replicación viral, 2) enfermedad caracterizada por la respuesta inflamatoria, leve o grave que puede llevar a la muerte, y 3) convalecencia que marca la reducción del fenómeno inmunopatológico y la eliminación del virus.^{14,15} De manera muy general, la carga viral se incrementa a partir de la infección y se espera, en promedio, un pico al décimo día descendiendo de manera acelerada en la siguiente semana. Por ello, la prueba molecular es ideal, es en esta etapa temprana de la infección cuando aún no hay daño en el paciente, detecta cargas virales altas y bajas, en casos ambulatorios y hospitalizados; las pruebas de antígeno son positivas en los primeros siete días de la enfermedad y se mantienen así durante el periodo de alta carga viral. Con la aparición de los pródromos alrededor del séptimo día, los anticuerpos IgM se incrementan

hasta tener concentración elevada entre la segunda y tercera semana postinfección, la IgG tiene un incremento tardío al mes postinfección. Estas últimas pruebas, hasta marzo de 2021, no se consideran diagnósticas, sirven para estudios de seroprevalencia. En el paciente recuperado el virus es indetectable, en consecuencia, las pruebas de PCR y de antígeno no son útiles en esta etapa. Por el contrario, los anticuerpos tipo IgG se mantienen en concentraciones detectables, aunque en 2020 aún se desconoce con precisión el tiempo en que los anticuerpos se mantienen en esta condición, incluso es necesario tomar en cuenta que la presencia-ausencia de anticuerpos es dependiente de variables asociadas a cada individuo, a la evolución clínica y a las características de la prueba serológica utilizada.^{16,17}

Desde los primeros meses de la pandemia se describió que las secreciones de VRA obtenidas mediante hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo permiten mayor sensibilidad en las pruebas moleculares. Aunque hay variabilidad de este parámetro entre pruebas, se reconoce alta especificidad. Por ello, es importante considerar que un resultado negativo en una prueba de RT-PCR realizada en una muestra de VRA obtenida de un individuo con sintomatología compatible con COVID-19, no excluye la presencia de infección por SARS-CoV-2.^{13,16}

El diagnóstico por laboratorio del SARS-CoV-2 en México. El InDRE y la RNLSP cuentan con amplia experiencia en la respuesta ante eventos de interés epidemiológico, locales, regionales y nacionales. Por su magnitud y etiología, la participación en la pandemia de influenza de 2009 dejó enseñanzas útiles para enfrentar al nuevo coronavirus.

La respuesta realizada por el componente de laboratorio, ante la inminente entrada del virus causante de la infección respiratoria aguda actual a nuestro país, permitió que el Sistema de Salud tuviera con oportunidad las capacidades técnicas necesarias para la confirmación de casos. Inicialmente, desde mediados de enero de 2020 fue posible hacer la identificación etiológica de SARS-CoV-2 en los individuos con sospecha clínico-epidemiológica en el InDRE.¹⁸ Días después, los integrantes de la red de diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios –ubicados en los 32 Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y cinco Laboratorios de

Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica– que forman parte de la RNLSP^{8,19} implementaron la RT-PCR en sus laboratorios.

A partir de febrero de 2020, la confirmación etiológica de casos sintomáticos mediante esta prueba se llevó a cabo en los laboratorios de la RNLSP, cuya infraestructura y sistematización de procesos inciden de manera positiva en la atención de un evento emergente de tan gran impacto. Por otro lado, la aplicación de esta tecnología diagnóstica en un mayor número de laboratorios públicos y privados es dependiente no sólo de aspectos económicos y de infraestructura, sino también de la disponibilidad de las pruebas con rendimiento aceptable en el mercado nacional.²⁰

Después de la implementación del diagnóstico molecular en los laboratorios de salud pública en todo el país, el InDRE inició, a mediados de marzo, la evaluación preliminar de las pruebas de diagnóstico molecular en proceso de introducción en el mercado comercial en el país. El propósito fue identificar las pruebas de PCR útiles para reconocer a los individuos con el virus SARS-CoV-2 en VRA, y poner la información detallada de los resultados a disposición de los usuarios finales, para facilitar la toma de decisiones con respecto a la selección de productos con fines de diagnóstico.²¹

Recepción de solicitudes y evaluación documental. El proceso de evaluación preliminar de pruebas moleculares se inició en febrero de 2020 con la publicación en línea de una convocatoria.²²

Las solicitudes de evaluación entregadas por fabricantes o distribuidores en la Unidad de Documentación en Trámite del InDRE, de acuerdo con los requisitos establecidos en la convocatoria, fueron recolectadas por el personal de la Coordinación de Gestión de Evaluación de Pruebas Diagnósticas Comerciales (GEPD) para cotejar el cumplimiento de los requisitos administrativos y la información técnica necesaria. Todas las solicitudes con deficiencias en la documentación fueron rechazadas. Una copia del expediente de cada solicitud aceptada por la GEPD fue entregada al responsable del área técnica designado para este proceso durante la emergencia epidemiológica.

Después de un minucioso análisis de la información técnica facilitada por el solicitante para identificar las características del diseño de

la prueba, el contenido del estuche comercial, los insumos no incluidos y de asegurarse de la disponibilidad del material biológico necesario en el biobanco correspondiente, se elaboró el protocolo para la evaluación técnica comparativa incluyendo, en todos los casos, la RT-qPCR del InDRE como prueba de referencia para confrontar los resultados.⁶ Cada protocolo elaborado fue expuesto en sesión específica al solicitante para su conocimiento y aprobación. El solicitante recibió un oficio de aceptación de evaluación para tramitar el permiso de importación de los reactivos e insumos requeridos en la evaluación ante la Comisión Federal para Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), organismo regulatorio encargado de la autorización para importación y comercialización de estos productos.

Biobanco de COVID-19 y material de control.

Para determinar las características de desempeño de las pruebas comerciales en evaluación se obtuvo material biológico de algunos biobancos del InDRE y de materiales de referencia de SARS-CoV-2 comerciales.

El biobanco de COVID-19 dependiente del Laboratorio de Virus Respiratorios (LVIR) se integra de material biológico con resultados positivos o negativos a SARS-CoV-2 obtenido de individuos con sospecha de padecer esta enfermedad en cualquiera de las diferentes fases de evolución, asintomáticos y bajo manejo terapéutico en evaluación, residentes en México. También se obtuvo material para otros patógenos del biobanco de LVIR. En su mayoría, las muestras resguardadas en la institución son recolectadas por personal de los laboratorios de la RNLSP. Este material biológico cuenta con trazabilidad, desde la toma de muestra hasta el reporte de resultados, almacenamiento y cadena de custodia.

El panel de evaluación para obtener los datos necesarios en la estimación de los parámetros de desempeño se integró por:

1. Muestras negativas a SARS-CoV-2.
2. Control positivo del reactivo.
3. Muestras positivas 2019-nCoV provenientes de población mexicana.
4. Panel de referencia positivo comercial AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit o control positivo sintético.

5. Muestras positivas para otras enfermedades respiratorias virales y bacterianas o panel de referencia NATtrol Respiratory Verification Panel 2 (23 × 0.6 mL) (Ea) CATALOG# NATRVP2-BIO.

Preparación de analistas e infraestructura.

Posterior a la recepción de los reactivos por el solicitante, se programó la capacitación del personal seleccionado para cada evaluación, basado en un registro nominal integrado por profesionales con experiencia en pruebas de PCR.

Los reactivos y equipos necesarios para cada evaluación fueron recibidos y custodiados de acuerdo con procedimientos institucionales vigentes. Se asignaron áreas específicas, verificadas previamente, para cada evaluación. Los equipos de mesa o piso se instalaron y calificaron de acuerdo con los requisitos del fabricante. Cuando se requirió utilizar algún equipo del InDRE, se aseguró su buen funcionamiento.

Con el personal capacitado y el equipo instalado en correcta operación se dio inicio a la evaluación. A ningún solicitante se le permitió participar durante la evaluación para evitar conflicto de intereses. Con los resultados obtenidos se elaboró el informe de resultados, dirigido al solicitante y firmado por las autoridades institucionales. Los resultados han sido entregados a los solicitantes mediante oficios. En la página de gobierno (www.gob.mx/salud) se encuentra el listado de las pruebas útiles para consulta del público interesado y dar transparencia a este proceso.

Base de datos. Con la información administrativa y técnica disponible en los documentos entregados por los solicitantes se alimentó una base de datos diseñada exprofeso. Los datos obtenidos en las etapas del proceso de cada evaluación se fueron integrando al registro estructurado para apoyar la coordinación, identificar problemas y emitir informes.

Para reportar los resultados en este artículo, se tomó el corte del 16 de marzo de 2021.

Parámetros de evaluación preliminar. Para la identificación de las pruebas útiles se determinaron: sensibilidad y especificidad analítica, precisión (repetibilidad o reproducibilidad) y, en el caso de las plataformas automatizadas, los porcentajes de acuerdo con positivo y negativo en muestras con resultado diagnóstico previo, determinado por las

técnicas de referencia utilizadas en el InDRE y bajo criterios de aceptación preestablecidos (Tabla 1).

1. Determinación de sensibilidad analítica. La sensibilidad analítica se define como la capacidad del ensayo para detectar sistemáticamente una secuencia diana determinada en las muestras biológicas analizadas.

Con la finalidad de establecer la sensibilidad analítica de la prueba (límite de detección o LoD) se utilizó una muestra de SARS-CoV-2 cuantificada contra transcritos de concentración conocida, el mismo día de su determinación.

Para los estuches de RT-PCR en tiempo real, este parámetro se determina mediante el análisis de series de diluciones base 10 de la muestra cuantificada, en concentraciones desde 10^6 copias hasta el número de copias por ensayo declarado como límite de detección por el fabricante. Cada dilución fue probada en cuadruplicado o triplicado de manera simultánea para cada marcador genético viral incluido en el ensayo.

En el caso de las plataformas automatizadas se realizó un ensayo de sensibilidad comparativa, con muestras positivas al SARS-CoV-2 o a los virus influenza (dependiendo del alcance diagnóstico del ensayo) de valores de CT (*cycle threshold*) conocidos y determinados por las técnicas de referencia del InDRE. Estas muestras son diluidas hasta alcanzar valores de CT cercanos a los límites de detección de las pruebas estándar. Se determina si la plataforma evaluada detecta esos niveles de concentración y si su sensibilidad es equiparable a la prueba de referencia.

2. Determinación de especificidad analítica. En esta evaluación se considera a la especificidad analítica en su característica de exclusividad. Es decir, como la capacidad de la prueba para detectar una secuencia genómica de SARS-CoV-2 y excluir todos los demás microorganismos conocidos que pudieran dar una reacción cruzada.

Para ello se analizaron inicialmente muestras positivas a distintos patógenos respiratorios virales y bacterianos como: otros coronavirus, virus sincicial respiratorio, *Rhinovirus*, virus de la influenza, virus de parainfluenza, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Tabla 1: Parámetros evaluados a las pruebas moleculares para identificar SARS-CoV-2.

Parámetro	Criterio de aceptación
Sensibilidad analítica	Límite de detección ≤ 250 copias
Especificidad analítica	100%
Precisión, repetibilidad o reproducibilidad	$\geq 95\%$

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), 2020.

mophilus influenzae. A partir de junio de 2020, se incorporó el uso de un control de referencia independiente disponible comercialmente con 22 agentes patógenos distintos (panel de verificación NATtrol Respiratory Verification Panel 2 marca ZeptoMetrix con número de catálogo NATRVP2-BIO).

3. Determinación de precisión. De acuerdo con el protocolo EP15-A2 (CLSI), la precisión de la prueba se evaluó con el control positivo o con muestras positivas, realizando 20 determinaciones por cada lote disponible (generalmente dos) del reactivo con dos diferentes analistas.

RESULTADOS

La primera solicitud para la evaluación de una prueba molecular para COVID-19 fue registrada en la GEPD del InDRE el 21 de febrero de 2020. A la fecha del corte realizado para este artículo, 16 de marzo de 2021, se sumaron 389 días de trabajo ininterrumpido con 253 solicitudes de evaluación recibidas. De ellas, 83 (32.8%) fueron rechazadas durante la revisión documental; la causa principal fue la duplicidad de la prueba con productos ya evaluados o en evaluación (43/83), seguida del incumplimiento en los requisitos establecidos en la convocatoria (34/83) y la deficiente presentación del producto (1/83). A partir de la apertura del servicio, la entrada de solicitudes creció rápidamente. Abril de 2020 fue el mes con mayor ingreso de solicitudes (63), de las cuales 59% cumplieron con todos los requisitos, el restante 41% de las pruebas fueron rechazadas en la revisión documental. Después de mayo, cuando

la proporción de rechazos fue importante (49%), la adhesión de los solicitantes al listado de requisitos se mejoró. En los últimos cuatro meses sólo se recibieron pruebas moleculares multiplexadas para el diagnóstico diferencial de COVID-19 e influenza (Figura 1). Fueron aceptadas las 169 solicitudes que cubrieron los requisitos documentales. De acuerdo con los procedimientos vigentes, esta revisión fue dictaminada por el Comité de Evaluación del InDRE, que fue suspendido a partir del 10 de abril del mismo año, asignándose esta responsabilidad a la GEPD. Durante este paso fueron canceladas 29 solicitudes por los interesados.

A la fecha de corte, 130 solicitudes cumplieron los criterios documentales y pasaron a la evaluación técnica; se terminó el proceso analítico y se entregaron resultados de 101 evaluaciones, las restantes se encontraban en proceso, ya sea en importación, capacitación o en laboratorio.

Para la evaluación técnica se contó con un registro de analistas (Figuras 2 y 3). Los grupos de trabajo de analistas por prueba se integran de acuerdo con las necesidades establecidas en el protocolo de cada una de las pruebas a evaluar. Todos los inte-

grantes del grupo de trabajo reciben la capacitación por parte del solicitante para asegurar la correcta interpretación de las instrucciones indicadas en los insertos de las pruebas en evaluación. Los grupos de trabajo realizan actividades de inactivación de muestras, corrimiento de pruebas y registro de resultados, en un esquema de trabajo de 7 x 7.

Las pruebas evaluadas fueron diseñadas en plataformas manuales o en metodologías automatizadas. Los blancos principales correspondieron a regiones específicas de los genes codificantes para las proteínas de envoltura (E), nucleocápside (N), la región RdRP y el ORF1ab del virus SARS-CoV-2.

De acuerdo con los criterios establecidos se identificaron a la fecha de corte 84/101 pruebas útiles; dos de ellas corresponden a pruebas de uso interno en el InDRE y no están disponibles comercialmente; 1/101 está en proceso de elaboración de informe. Las restantes 16 pruebas fueron reportadas como no útiles para la detección de SARS-CoV-2. Poco más del 80% de las pruebas útiles procedieron de fabricantes de Corea, Estados Unidos, China, Alemania, España, México o Reino Unido (Tabla 2).

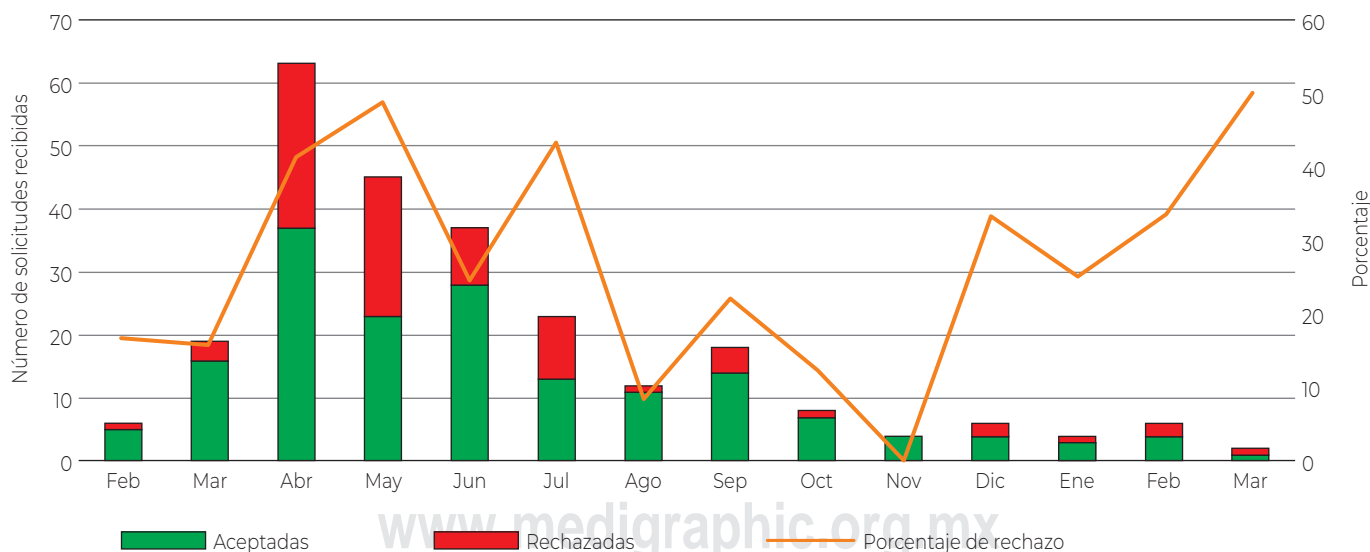


Figura 1: Solicitudes de evaluación recibidas por mes, 2020-2021. En el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) se recibieron solicitudes para la evaluación en el laboratorio de pruebas de RT-PCR para la identificación del virus SARS-CoV-2 del 21 de febrero de 2020 al 16 de marzo de 2021. A partir de la apertura del servicio, la afluencia de solicitudes creció rápidamente. Abril fue el mes con mayor ingreso de solicitudes (63), dos terceras partes cumplieron con todos los requisitos, el restante 41% de las solicitudes se rechazaron en la revisión documental. Después de mayo, cuando se alcanzó la proporción más alta de rechazos (49%), se logró mayor adhesión al listado de requisitos. En los últimos cuatro meses sólo se recibieron pruebas moleculares multiplexadas para el diagnóstico diferencial de COVID-19 e influenza.

Figura 2:

Reunión de trabajo del grupo de evaluadores, integrado por analistas y personal de apoyo técnico-administrativo. Plaza principal del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), 15 de agosto de 2020.



Con base en las características de desempeño establecidas por el fabricante, cada prueba se verificó haciendo los corrimientos de acuerdo con lo establecido en el inserto correspondiente.

La sensibilidad analítica en las 84 pruebas útiles identificadas osciló de 2.23 a 250 copias por reacción. Los genes más frecuentes a los que están dirigidas son: N, ORF1ab, E y RdRP, con diversas combinaciones. Cada prueba incluyó uno o hasta cuatro genes blanco distintos; incluso algunas incluían un control endógeno (gen humano) para asegurar la buena calidad de la muestra procesada.

La especificidad analítica del total de pruebas útiles fue del 100% cuando se enfrentaron a un panel de 23 muestras, 22 positivas a igual número de agentes causales de infecciones respiratorias virales y bacterianas más una negativa a todos ellos incluido SARS-CoV-2 (*Tabla 3*).

En resumen, el 90% de las pruebas evaluadas fueron clasificadas como útiles para la identificación del virus SARS-CoV-2, el 8% fueron calificadas como no útiles. El restante 2% corresponde a las pruebas de RT-PCR del InDRE.

En cumplimiento a uno de los objetivos del proceso, los resultados de cada prueba están publicados con libre acceso en la página web del instituto.²³

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Ante la amenaza de expansión de la epidemia descrita en Wuhan, era imprescindible que en el InDRE se contara con la herramienta de diagnóstico. En este contexto, en los primeros meses de la epidemia nacional, el InDRE montó una respuesta oportuna de laboratorio. Primero, con el diseño y estandarización de una de las primeras pruebas moleculares de detección para identificar al virus en probables casos importados;

**Figura 3:** Equipo de analistas en un día de capacitación.

después, con la rápida implementación de una de las pruebas recomendadas por la OMS (protocolo de Berlín)⁶ como prueba de referencia nacional tanto de forma centralizada como expandida en la RNLSP y en algunos laboratorios privados. El desarrollo y validación de la prueba de laboratorio enfrentó la carencia de los controles y estándares necesarios para evitar y corregir desviaciones; fue superada con la síntesis del material requerido en el laboratorio. Así se llega a la identificación del primer caso en México y a la fase de transmisión comunitaria.

Luego, la adquisición de plataformas automatizadas permitió cubrir la demanda creciente de diagnóstico. Además, en un proceso que duró hasta el 17 de abril de 2020, el InDRE otorgó el reconocimiento a la competencia técnica a 131 laboratorios (67 particulares, 44 académicos y 20 en hospitales públicos) para realizar la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR para aumentar la cobertura diagnóstica y la vigilancia epidemiológica durante la contingencia.²³ Por otra parte, el

Tabla 2: País de procedencia de las pruebas de PCR útiles para identificar SARS-CoV-2 de acuerdo con la evaluación realizada.

País del fabricante	n (%)
Corea	18 (21.4)
Estados Unidos	17 (20.2)
China	9 (10.7)
Alemania	9 (10.7)
España	6 (7.1)
México	5 (6.0)
Italia	3 (3.6)
Reino Unido	3 (3.6)
Singapur	3 (3.6)
Canadá	2 (2.4)
Austria	1 (1.2)
Finlandia	1 (1.2)
Francia	1 (1.2)
Inglaterra	1 (1.2)
Luxemburgo	1 (1.2)
Malasia	1 (1.2)
Suecia	1 (1.2)
Taiwán	1 (1.2)
Turquía	1 (1.2)
Total general	84 (100.0)

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), 2020.

laboratorio requirió de medidas de bioseguridad superiores a lo requerido para virus influenza, diferenciando su aplicación en procedimientos virales propagativos y no propagativos, de acuerdo con las recomendaciones y actualizaciones de la OMS emitidas durante el proceso.^{4,24,25}

Ya en fase epidémica local, a mediados de marzo, los procedimientos habituales de evaluación de pruebas para otros diagnósticos fueron suspendidos para atender la demanda prioritaria de atención a la emergencia de COVID-19 y se implementó la evaluación preliminar de estuches comerciales de diagnóstico para SARS-CoV-2. Los retos iniciales fueron: definir una estrategia de laboratorio con criterios técnicos uniformes para lograr la comparabilidad de los resultados

obtenidos entre las diferentes pruebas evaluadas y destinar a un grupo técnico encargado tanto de la revisión documental de las solicitudes ingresadas por los proveedores como de la ejecución de la evaluación por laboratorio. Esta estrategia es utilizada por pocos países, pues implica destinar recursos humanos y materiales para la verificación del desempeño de los estuches de forma previa a su comercialización, y puede retrasar el ingreso de reactivos para el diagnóstico debido a que la autorización por la entidad regulatoria local depende completamente de los resultados del laboratorio. No obstante, ante la oferta creciente de estuches de diagnóstico, el logro principal de esta estrategia en el InDRE fue

Tabla 3: Composición del panel de muestras positivas a agentes causales de infecciones respiratorias virales y bacterianas.

1	Adenovirus tipo 1
2	Adenovirus tipo 18
3	Adenovirus tipo 3
4	Adenovirus tipo 31
5	<i>Bordetella parapertussis</i> cepa A747
6	<i>Bordetella pertussis</i> cepa A639
7	<i>Chlamydia pneumoniae</i> cepa CWL-029
8	Coronavirus 229E
9	Coronavirus HKU-1
10	Coronavirus NL63
11	Coronavirus OC43
12	Influenza A H1N1pdm cepa A/NY/02/09
13	Influenza A H3 cepa A/Brisbane/10/07
14	Influenza B cepa B/Florida/02/06
15	Metapneumovirus 8 cepa Perú 6-2003
16	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> cepa M129
17	<i>Rhinovirus</i> 1 ^a
18	Virus parainfluenza tipo 1
19	Virus parainfluenza tipo 2
20	Virus parainfluenza tipo 3
21	Virus parainfluenza tipo 4
22	Virus sincicial respiratorio A2
23	Negativo

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), 2020.

identificar los reactivos con probabilidad de tener mejor desempeño en campo y evitar que los de desempeño analítico desfavorable ingresaran al mercado nacional. Se identificaron los estuches con mayor probabilidad de aportar certeza diagnóstica en campo. Por esta razón, es importante resaltar que, en acuerdo con los solicitantes, los resultados de la evaluación de los estuches comerciales son públicos, representando un avance en materia de transparencia de la información para la toma de decisiones por parte de los potenciales usuarios durante la contingencia, ya sean laboratorios clínicos públicos, privados o académicos.¹⁹

A la fecha de corte, la evaluación técnica comparativa de pruebas comerciales para detectar el virus SARS-CoV-2 del InDRE había identificado 84 pruebas útiles disponibles en el mercado comercial mexicano, respaldadas en parámetros de desempeño adecuados para establecer el diagnóstico de COVID-19 para la vigilancia epidemiológica en los laboratorios integrantes de la RNLSP, en los laboratorios clínicos y académicos para la atención médica; 39 pruebas estaban en proceso.

La homogeneidad y rigor científico de las evaluaciones realizadas en el InDRE dan certeza de la calidad del producto a inversionistas y a usuarios. Además, la ausencia de conflicto de intereses y la transparencia del proceso de evaluación técnica son parte de los valores institucionales permanentes. El reconocimiento de la calidad en las evaluaciones técnicas del InDRE provee seguridad de la funcionalidad de las pruebas para el uso establecido y limita la introducción al mercado comercial mexicano de productos con desempeño analítico inferior al requerido.

En lo que respecta al trámite administrativo de las solicitudes y al trato con los proveedores, se logró reducir de manera considerable el tiempo de la etapa en el laboratorio durante la contingencia, en gran medida por la intensa y comprometida participación de los integrantes del grupo de evaluadores, tanto analistas como personal de apoyo técnico-administrativo.

Si bien lo consideramos un proceso exitoso, la actividad especial en periodo de emergencia permitió mejorar la comunicación con nuestros usuarios externos, guiándolos con descripciones más comprensibles de los requerimientos nece-

sarios. Las dudas técnicas y administrativas fueron resueltas de manera personal al usuario por el responsable correspondiente, con apertura para dar y recibir retroalimentación amable y cordial. Aunque los frecuentes momentos de saturación laboral limitaron, en ocasiones, la respuesta inmediata a la asesoría requerida por el usuario, ésta fue resuelta en cierta medida con publicaciones en el sitio web correspondiente. En este sentido, la apertura de comunicación vía remota con los usuarios será una alternativa que deberá gestionarse en el corto plazo a fin de hacer más fluida y expedita la respuesta.

Cabe resaltar que la robustez de la evaluación técnica ha permitido identificar pruebas no útiles (16/101). La verificación del desempeño en el laboratorio evidenció su importancia sobre la aprobación de pruebas basada exclusivamente en la revisión documental. Por ejemplo, la agencia regulatoria de Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), ha aprobado el uso de algunas de las pruebas con bajo desempeño en México (5/15). Dicha discrepancia abona a intereses comerciales que pueden impactar de manera negativa en los países de menor ingreso en la región.

Por último, México es uno de los pocos países a nivel global generadores de evidencia de laboratorio sobre el desempeño de las pruebas diagnósticas previo a su comercialización. Sin duda, el esfuerzo realizado en el InDRE para identificar productos de alto rendimiento en este periodo de contingencia respalda la oferta de productos con buena calidad analítica que brindan certeza diagnóstica en la población, además de fortalecer el liderazgo y rectoría del InDRE como institución emblemática de la salud pública mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores y el grupo técnico de evaluaciones agradecen al Comando de Incidencias de COVID-19 del InDRE el apoyo brindado y expresan gran reconocimiento a los participantes de todos los procesos transversales al diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la pandemia: recepción de muestras, medicina laboral, bioseguridad, ingeniería biomédica, captura de resultados y manejo de bases de datos, etcétera.

REFERENCIAS

- European Centre for Disease Prevention and Control. An agency of the European Union. COVID-19 situation update worldwide. 2020. Available in: <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>
- Secretaría de Salud. Aviso epidemiológico. 27 de febrero del 2020.
- Secretaría de Salud. Nota de Prensa # 077. Se confirma en México caso importado de coronavirus COVID-19. Secretaría de Salud. 28 de febrero de 2020 [Consultado el 13 de marzo de 2020].
- World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. 2020. Available in: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-(2019-ncov)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020)
- Organización Panamericana de Salud. Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV). 2020. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-nuevo-coronavirus-2019>
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25 (3): 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- Secretaría de Salud. 057. México, sede del Taller de Diagnóstico y Detección por Laboratorio del nuevo coronavirus COVID-19. 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/057-mexico-sede-del-taller-de-diagnostico-y-deteccion-por-laboratorio-del-nuevo-coronavirus-covid-19>
- Guzmán-Bracho MC, Ramírez-Hernández JA, Rodríguez-Pérez ME, Viesca-Treviño C, Díaz-Quiñonez JA. Desde el ISET al InDRE. IV. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos: nueva orientación, 1990-2012. *Gac Méd Méx.* 2020; 156 (2): 125-132.
- Deeks JJ. Systematic reviews in health care: Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. *BMJ.* 2001; 323 (7305): 157-162. doi: 10.1136/bmj.323.7305.157.
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (4): 411-412. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4.
- Secretaría de Salud. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Documentos de apoyo para el laboratorio. 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/documentos-de-apoyo-para-el-laboratorio?state=published>
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Protocolo de bioseguridad y biocustodia para la toma y manejo de muestras en el laboratorio para la enfermedad respiratoria viral. 2021. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/674821/Protocolo_Bioseguridad_Biocustodia_Enfermedad_Viral_InDRE_V8_12082021.pdf
- Organización Mundial de la Salud. Orientaciones provisionales. Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2. 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335830/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-spa.pdf>
- Chiappell F. Putative natural history of CoViD-19. *bioinformatics.* 2020; 16 (5): 398-403. doi: 10.6026/97320630016398.
- Dos Santos WG. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129: 110493. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110493.
- WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 Interim guidance. 2020. Available in: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
- Houlihan CF, Beale R. The complexities of SARS-CoV-2 serology. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20 (12): 1350-1351. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30699-X.
- Secretaría de Salud. Comunicado de prensa. 28 de marzo del 2020. Secretaría de Salud informa. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/secretaria-de-salud-informa-239153?idiom=es>
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la influenza y otros virus respiratorios. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487580/LVL_Influenza_y_otros_virus_4T.pdf
- Secretaría de Salud. Informe técnico reunión de expertos sobre uso de pruebas de laboratorio para identificar SARS-COV-2. 2020. Disponible en: https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2020/06/Docto_InfTec-SARS-COV2_26jun2020.pdf
- Secretaría de Salud. Criterios para la aceptación de pruebas moleculares para el diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la contingencia de COVID-19 en México. 2020. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/547178/Criterios_para_la_aceptaci_n_de_pruebas_moleculares_para_el_diagn_stico_de_SARS-CoV-2.pdf
- Secretaría de Salud. Evaluaciones provisionales en apoyo a la emergencia por la pandemia de la enfermedad por Coronavirus COVID 19. Informes de evaluación comparativa preliminar. 2022. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/evaluaciones-provisionales-en-apoyo-a-la-emergencia-por-la-pandemia-de-la-enfermedad-covid-19?state=published>
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Laboratorios con reconocimiento por parte del InDRE, para realizar el diagnóstico de COVID 19, con fines de Vigilancia Epidemiológica. 2020. Disponible en: <http://www.pjetam.gob.mx/doc/comunicado/laboratorios.pdf>

24. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020. World Health Organization; 2020. Available in: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
25. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization; 2020. Available in: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331500>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.