

## Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba rápida “HIGHTOP One Step rapid test” SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody rapid Test (immunochromatography)

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba “HIGHTOP One Step rapid test” frente al estándar de referencia RT-PCR (“Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR Charité Virology, Berlin, Germany”), con seguimiento de los casos positivos (sintomáticos y asintomáticos) a los 7, 14 y 21 días posterior a la prueba positiva por RT-PCR. En un total de doscientas noventa y cinco (295) muestras que incluyeron: (i) Cien (100) muestras de sueros negativos históricos, (ii) Cien (100) muestras de sueros negativos por RT-PCR, (iii) Treinta y ocho (38) muestras de suero de pacientes asintomáticos con pruebas de RT-PCR positiva y (iv) Cincuenta y siete (57) muestras de suero de pacientes sintomáticos, con pruebas de RT-PCR positiva (Tabla 1 y 3).

### 1. Procedimiento de la prueba

Para llevar a término la validación, los kits con anterioridad fueron almacenados bajo llave únicamente al alcance de personal autorizado, a temperatura ambiente ( $14 \pm 7^\circ\text{C}$ ) y protegidos de la luz solar directa. Los kits utilizados por caja de 40 unidades registraron fecha de vencimiento del 2021/03, con número de lote COV1252003C junto con el diluyente usado por caja. La validación se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud, el día 03 de Junio del 2020 por personal capacitado, teniendo en cuenta todas las instrucciones de uso de la prueba registradas en el inserto del kit.

Se seleccionó un vial de trabajo de los 295 sueros a evaluar del biobanco COVIDCOL, los cuales estaban en congelación. Posteriormente se descongelaron a temperatura de refrigeración ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y finalmente se llevaron a temperatura ambiente ( $14 \pm 7^\circ\text{C}$ ) hasta el momento del montaje. Antes

de realizar el montaje primero se verificó que el empaque del dispositivo estuviera sellado correctamente y no presentara ninguna anomalía, posteriormente se marcó cada dispositivo en la parte superior con el número de la muestra correspondiente para cada vial. Antes de la adición de muestra fue homogenizada y se recolectaron 10  $\mu\text{l}$  de suero con ayuda de una micropipeta (equipo calibrado), adicionando en el pocillo de muestra del dispositivo, e inmediatamente se depositaron 2 gotas de diluyente de muestra en el pocillo del dispositivo destinado para este mismo. Con un cronómetro se contabilizaron 15 minutos y pasado este tiempo se realizó la lectura del resultado. Los resultados fueron leídos por dos observadores con una concordancia de  $K=1$ , teniendo como base de interpretación lo descrito según inserto. La información se registró en una base de datos específica para la validación de la prueba en medio magnética.

### 2. Análisis de los grupos de estudio para la IgM

De un total de 195 muestras evaluadas con RT-PCR (95 positivas y 100 negativas), 33 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba rápida y 162 muestras fueron clasificadas como negativas, para anticuerpos tipo IgM. Se excluyen los negativos históricos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación diagnóstica de los grupos en estudio para la prueba rápida de IgM

Grupos	RT-PCR n=195	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgM		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	0	100	<b>100</b>
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	2	98	<b>100</b>
Asintomáticos RT-PCR Positivos	38	7	31	<b>38</b>
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	24	<b>33</b>	<b>57</b>
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>262</b>	<b>295</b>

\*Negativo histórico: Sueros de personas tomados entre 2017-2018, para uso en vigilancia en salud pública u otro fin, con autorización para otro tipo de análisis por consentimiento informado.

La validez de criterio divergente, al realizar evaluación con los sueros históricos de antes de la pandemia, fue calculada en 100% (IC95% 96,6 – 100%).

De acuerdo con la fecha de inicio de síntomas el grupo de pacientes sintomáticos con RT-PCR positiva (n=57), fue dividido en dos grupos para el análisis, considerando la fecha de inicio de síntomas: i) entre 8 y 11 días y ii) más de 11 días. 24 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 33 como negativas (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación diagnóstica del grupo de sintomáticos para la prueba de IgM

Sintomáticos RT-PCR Positivos	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgM		Total
	Positiva	Negativa	
Entre 8 y 11 días de inicio de síntomas	2	7	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	22	26	48
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>33</b>	<b>57</b>

### 3. Análisis de los grupos de estudio para la IgG

De un total de 195 muestras evaluadas con RT-PCR, 40 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba serológica rápida **"HIGHTOP One Step rapid test"** y 155 muestras fueron clasificadas como negativas, para anticuerpos tipo IgG por esta prueba. Se excluyen los negativos históricos (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación diagnóstica de los grupos en estudio para la prueba rápida de IgG

Grupos	RT-PCR n=195	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgG		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	1	99	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	4	96	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	38	6	32	38
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	30	27	57
<b>Total</b>		<b>41</b>	<b>254</b>	<b>295</b>

\*Negativo histórico: Sueros de personas tomados entre 2017-2018 para uso en vigilancia en salud pública u otro fin con autorización para otro tipo de análisis por consentimiento informado.

La validez de criterio divergente, al realizar evaluación con los sueros históricos de antes de la pandemia, fue calculada en 99% (IC95% 97 – 100%).

De acuerdo con la fecha de inicio de síntomas el grupo de pacientes sintomáticos con RT-PCR positiva (n=57), fue dividido en dos grupos para el análisis, considerando la fecha de inicio de síntomas: i) entre 8 y 11 días y ii) más de 11 días. 30 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 27 como negativas (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación diagnóstica del grupo de sintomáticos para la prueba de IgG

Sintomáticos RT-PCR Positivos	Prueba Serológica. Inmunocromatografía para IgG		Total
	Positiva	Negativa	
Entre 8 y 11 días de inicio de síntomas	1	8	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	29	19	48
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>57</b>

A partir del análisis se obtuvieron los siguientes datos de exactitud:

**Tabla 5. Resultados de exactitud diagnóstica y concordancia de la prueba serológica rápida "HIGHTOP One Step rapid test" frente a RT-PCR para SARS-CoV-2-COVID-19. Utilidad y recomendaciones para su uso de acuerdo con escenarios de aplicación de la prueba**

Escenarios	Descripción		N	Sen	Esp	Exactitud	LR+	LR-	Kappa	Recomendación	Utilidad para escenario
Escenario 1	Prueba aplicada a población sintomática y asintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	195	32.63%	98.00%	66.15%	16.32	0.69	0.311	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es muy baja	No es útil
		IgG	195	37.89%	96.00%	67.69%	9.47	0.65	0.344		
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	157	42.11%	98.00%	77.71%	21.05	0.59	0.454	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero. Sin embargo su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es baja para la IgM e IgG	Es útil solo combinada con RT-PCR
		IgG	157	52.63%	96.00%	80.25%	13.16	0.49	0.533		
		Acs Totales IgM/ IgG	257	58%	97%	88,32%	19.3	0.43	0.61		
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días de inicio síntomas)	IgM	109	22.22%	98.00%	91.74%	11.11	0.79	0.271	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero. Entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en detectar casos. Sensibilidad muy baja para IgM e IgG	No es útil*
		IgG	109	11.11%	96.00%	88.99%	2.78	0.93	0.090		
Escenario 2.b:	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días de inicio síntomas)	IgM	148	45.83%	98.00%	81.08%	22.92	0.55	0.504	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero La prueba es más sensible para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas para IgM Sensibilidad baja y para IgG moderada.	Es útil solo combinada con RT-PCR**
		IgG	148	60.42%	96.00%	84.46%	15.10	0.41	0.614		
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	IgM	138	18.42%	98.00%	76.09%	9.21	0.83	0.215	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición o momento de infección es muy baja	No es útil
		IgG	138	15.79%	96.00%	73.91%	3.95	0.88	0.153		
Escenario 4	Prueba aplicada a población asintomática y sintomática independientemente del tiempo de exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	295	32.63%	99.00%	77.63%	32.63	0.68	0.382	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es muy baja	No es útil
		IgG	295	37.89%	97.50%	78.31%	15.16	0.64	0.416		
Escenario 5	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del tiempo a la exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	257	42.11%	99.00%	86.38%	42.11	0.58	0.510	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es baja	No es útil
		IgG	257	52.63%	97.50%	87.55%	21.05	0.49	0.582		
Escenario 5.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	209	22.22%	99.00%	95.69%	22.22	0.79	0.289	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, adicionalmente entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en detectar casos. Sensibilidad muy baja	No es útil
		IgG	209	11.11%	97.50%	93.78%	4.44	0.91	0.102		
Escenario 5.b	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	248	45.83%	99.00%	88.71%	45.83	0.55	0.553	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero La prueba es más sensible para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas para IgG con sensibilidad moderada.	Es útil solo combinada con RT-PCR**
		IgG	248	60.42%	97.50%	90.32%	24.17	0.41	0.651		
Escenario 6	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (incluyendo sueros históricos)	IgM	238	18.42%	99.00%	86.13%	18.42	0.82	0.252	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero La prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición es poco sensible tanto para IgM como para IgG. Sensibilidad muy baja.	No es útil
		IgG	238	15.79%	97.50%	84.45%	6.32	0.86	0.186		
LR+: Razón de verosimilitud positiva		Sen: Sensibilidad, Esp: Especificidad, *Probable no circulación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 en sangre. Coincide con la literatura sobre generación de anticuerpos posterior al día 9, con mejor rendimiento después del día 14; **Probable circulación de anticuerpos en sangre, por lo que su detección es recomendable.									
LR-: Razón de verosimilitud Negativa											

En este informe se logró evaluar la validez y concordancia diagnóstica de la prueba serológica rápida **“HIGHTOP One Step rapid test”**. La prueba en mención demostró:

1. Alta especificidad con sueros negativos con RT-PCR y con sueros negativos históricos tanto para IgM como para IgG, presentando validez de criterio del 99% y 100% respectivamente.
2. Sensibilidad moderada 60.42% en pacientes sintomáticos (leve a moderado) de más de 11 días de inicio de síntomas
3. Aunque la concordancia entre observadores obtuvo un Kappa igual a uno, se observaron bandas de reacción tenue y muy tenue en el 69.7% de pruebas IgM positivas y en 6.3% de las pruebas de IgG positivas, lo cual disminuye el desempeño del método.

## Discusión

Es cada vez más frecuente el uso de pruebas rápidas en el escenario de la pandemia de la COVID-19. Estas pruebas se dividen en pruebas rápidas moleculares y pruebas rápidas serológicas. Estas últimas han generado expectativa sobre su alcance diagnóstico y su uso se hace a nivel mundial con mayor frecuencia.

La aplicación de pruebas alternativas a las pruebas moleculares RT-PCR para uso poblacional, es recomendada para separar individuos ya expuestos a la infección que han tenido presentaciones asintomáticas o leves, para considerarlos como no susceptibles y priorizar su retorno a actividades laborales en comunidad que pueden ser consideradas de alto riesgo para adquirir la infección por el contacto repetido con otras personas (1). Por lo anterior, la detección de anticuerpos en este grupo poblacional es crítica en el marco de la vigilancia epidemiológica de esta pandemia.

Las pruebas serológicas permiten la identificación de anticuerpos específicos contra antígenos del virus generados a partir de la respuesta inmunológica del individuo. Las proteínas estructurales de nucleocápside (N) y la proteína de espiga (S) son frecuentemente empleadas en estas metodologías por su papel inmunogénico. Siendo útiles para evaluar la seroprevalencia de enfermedades infecciosas de manera retrospectiva tras las fases epidémicas iniciales (1-3). Esto se confirma con los hallazgos de estudios de validación, en los que se demuestra que es posible lograr una adecuada clasificación de sujetos sintomáticos por COVID-19, cuando se conocen los tiempos desde la exposición (post-infección) o inicio de síntomas.

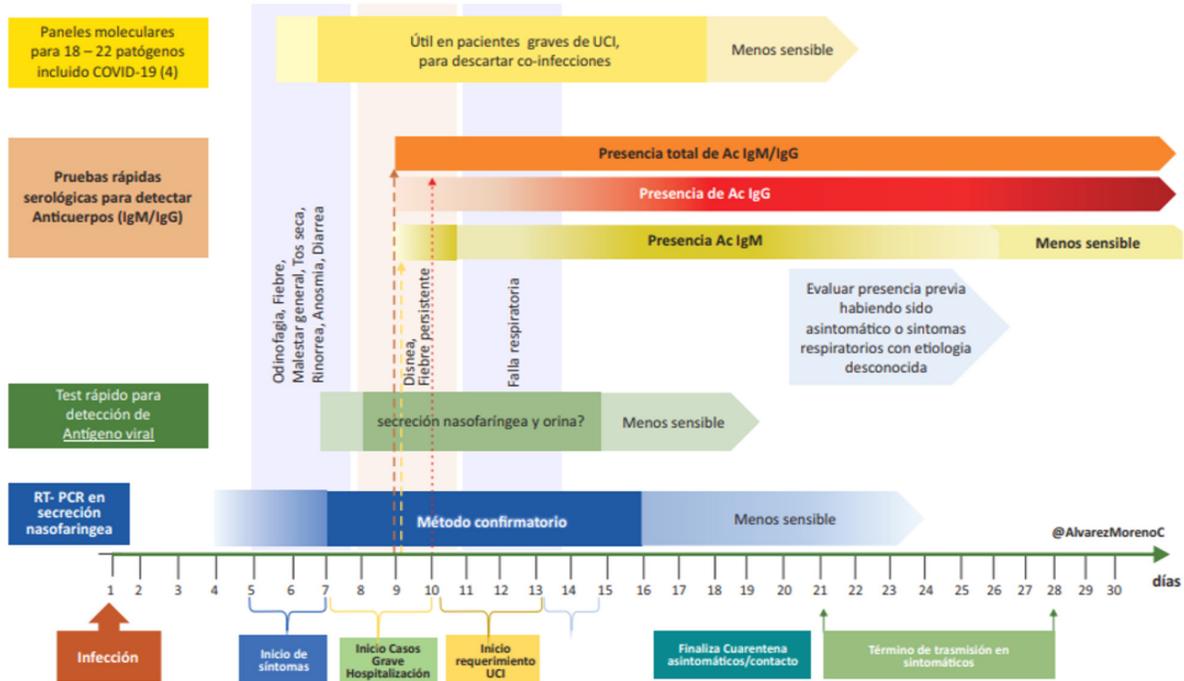
Recientemente se ha publicado en la literatura el comportamiento de la generación de anticuerpos para SARS-CoV-2 considerando los datos disponibles hasta hoy (ver figura 1). A partir del mismo, se puede concluir que la presencia total de IgM e IgG en sangre ocurre a partir del día 9 después del inicio de síntomas o de iniciada la infección.

Aunque un método analítico representado en una prueba o test de laboratorio haya sido normalizado previamente, es necesario confirmar si funciona adecuadamente, antes de proceder a su uso rutinario. A este procedimiento mediante el cual se evalúa el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto (establecido como resultado de la validación, en este caso, la inmunocromatografía para identificar IgG e IgM, específicas para proteínas de SARS-CoV-2) se le denomina verificación o validación secundaria. Cuando se trata de procedimientos cualitativos o de pruebas subjetivas (relacionadas con las capacidades o adiestramiento del observador), se deben incorporar a los procesos de verificación, controles positivos y negativos, siempre que sea posible. La validación además se hace necesaria cuando se busca demostrar equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos (por ejemplo, contrastar la inmunocromatografía con el ELISA o con la quimioluminiscencia). Dado que títulos mayores de anticuerpos y así como una mayor seroconversión son detectados en la mayoría de los individuos con COVID-19 sintomático, los sueros controles positivos deben ser colectados de individuos hospitalizados con cuadros graves o críticos de COVID-19. Esta tendencia pudiera ser

problemática si se tiene en cuenta que el uso de las pruebas serológicas inmunocromatográficas se ha sugerido como estrategia para identificar posibles portadores infecciosos asintomáticos. En estudios se han reportado que sólo uno de cinco individuos positivos para SARS-CoV-2, identificados por RT-PCR logró una seroconversión. Esta situación puede

deberse a que la carga viral en asintomáticos es menor que la reportada en pacientes COVID-19 grave a crítico, carga viral (carga antigénica) que puede ser la responsable de la respuesta inmune, representada en anticuerpos detectables o en una escasa o nula seroconversión, respectivamente (4).

Figura 1. Historia Viral e inmunológica de la infección SARS-CoV-2/COVID-19



Fuente: Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-CoV-2/COVID-19 en establecimientos de atención en salud. Recomendaciones basadas en consenso de expertos e informadas en evidencia.

## Conclusiones y recomendaciones

1. La prueba en estudio demostró ser altamente específica y con sensibilidad moderada en pacientes sintomáticos con más de 11 días después de inicio de los mismos. La concordancia entre esta prueba serológica rápida IgG e IgM con la RT-PCR teniendo en este escenario fue moderada para clasificación de pacientes COVID-19 positivos y negativos tanto para IgM como para IgG.
2. La utilidad de la prueba como apoyo diagnóstico es limitado en los pacientes asintomáticos o sintomáticos que tengan 11 días o menos desde el inicio de síntomas o hayan tenido contacto cercano con casos confirmados de SARS CoV2-COVID 19, dado el alto riesgo de falsos negativos.
3. Otros escenarios específicos con sus resultados y recomendación respectiva, se encuentran detallados en la tabla 5.

## Referencias

1. Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud. Disponible en <https://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/853/905>
2. Long Q, Deng H, Chen J, Hu J, Liu B, Liao P, et al. Antibody responses to SARSCoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. medRxiv. 2020 Mar 20;2020.03.18.20038018.
3. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). Clin Infect Dis. 2020 Mar 21.
4. Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. Emerg Microbes Infect. 2020;1-14.

## Autores

**Marcela Mercado Reyes.** Bacterióloga, MS Epidemiología Clínica. Directora de Investigación en Salud Pública (E) Instituto Nacional de Salud.

**Gabriela Delgado M.** Bacterióloga, PhD Ciencias Farmacéuticas. Asesora Despacho en Secretaría Distrital de Salud. Profesora Titular en Universidad Nacional de Colombia.

**Gabriela Zabaleta.** Bacterióloga, Micro Ind, Candidata a magister en Epidemiología. Grupo de Microbiología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud.

**Adriana Arévalo.** Bacterióloga, MSc en Microbiología. Grupo de Parasitología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud.

## Pruebas realizadas por:

**Lida Muñoz Galindo.** Bacterióloga y laboratorista clínico. Especialista en Epidemiología. Grupo de Parasitología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud

**Vivian Vanesa Rubio.** Bacterióloga y laboratorista clínico. MSc en Ciencias. Grupo de Micobacterias. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud.

**Paula Gaviria.** Bacterióloga y laboratorista clínico. MSc en Ciencias Biológicas. Líder Unidad Avanzada de Inmunoematología. Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud-IDCBIS.