

## Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba rápida “INNOVITA® 2019-nCoV Ab test (Colloidal Gold)”

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba “INNOVITA® 2019-nCoV Ab test (Colloidal Gold)” frente al estándar de referencia RT-PCR (“Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR Charité Virology, Berlin, Germany”), en un total de doscientas noventa y tres (293) muestras que incluyeron: (i) Cien (100) muestras de sueros negativos históricos, (ii) Cien (100) muestras de sueros negativos por RT-PCR, (iii) Treinta y seis (36) 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 y protegidos de la luz solar directa. Los kits utilizados registraron fecha de vencimiento del 2021.04.08, con número de lote 20200402. La validación se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud, el día 15 de mayo 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 293 sueros a evaluar del biobanco COVIDCOL, los cuales estaban almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se descongelaron a temperatura de refrigeración ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) y finalmente se llevaron a temperatura ambiente 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. Se mezcló la muestra 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 la base de datos específica para la validación de la prueba en medio magnético.

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

De un total de 193 muestras evaluadas con RT-PCR (93 positivas y 100 negativas), 34 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba rápida y 159 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=193	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgM		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	1	99	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	0	100	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	8	28	36
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	26	31	57
<b>Total</b>		<b>35</b>	<b>258</b>	<b>293</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% 94.5 – 99.8%).

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. 26 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 31 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	1	8	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	25	23	48
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>31</b>	<b>57</b>

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

De un total de 193 muestras evaluadas con RT-PCR, 28 muestras fueron positivas para SARS CoV-2 con la prueba serológica rápida “INNOVITA® 2019-nCoV Ab test (Colloidal Gold)” y 165 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=193	Prueba Serológica. Inmunocromatografía para IgG		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	0	100	<b>100</b>
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	0	100	<b>100</b>
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	3	33	<b>36</b>
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	25	32	<b>57</b>
<b>Total</b>		<b>28</b>	<b>265</b>	<b>293</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% (I.C.95% 96.3 – 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. 25 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 32 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	2	7	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	23	25	48
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>32</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 “INNOVITA® 2019-nCoV Ab test (Colloidal Gold) frente a RT-PCR para SARS-CoV-2-COVID-19. Utilidad y recomendaciones para su uso de acuerdo a escenarios de aplicación de la prueba**

Escenarios	Descripción		N	Sen	Esp	Exactitud	LR+	LR-	Kappa	Recomendación	Utilidad para escenario (Detección)
Escenario 1	Prueba aplicada a población sintomática y asintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	193	36,5%	100%	69.4%	N.C.	0.63	0.374	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es <b>muy baja</b> .	No es útil
		IgG	193	30.1%	100%	66.2%	N.C.	0.69	0.309		
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	157	45.6. %	100%	80.2%	N.C.	0.54	0.517	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es <b>baja</b> tanto para la IgM e IgG.	No es útil
		IgG	157	43.8%	100%	79.6%	N.C.	0.56	0.499		
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días de inicio síntomas)	IgM	109	11.11%	100%	92.62%	N.C.	0.88	0.187	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no es adecuada para detectar casos. Sensibilidad <b>muy baja</b> para IgM e IgG.	No es útil*
		IgG	109	22.2%	100%	93.8%	N.C.	0.77	0.344		
Escenario 2.b	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días de inicio síntomas)	IgM	148	52.08%	100%	84.5%	N.C.	0.47	0.595	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. La prueba tiene <b>baja</b> sensibilidad para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, tanto para IgM como para IgG.	No es útil
		IgG	148	49.7%	100%	83.1%	N.C.	0.52	0.554		
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	IgM	136	22.2%	100%	79.4%	N.C.	0.71	0.296	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición o momento de infección es <b>muy baja</b> .	No es útil
		IgG	136	8.33%	100%	75.2%	N.C.	0.91	0.118		

Escenario 4	Prueba aplicada a población asintomática y sintomática independiente del tiempo de exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	293	36.5%	100%	79.8%	N.C.	0.63	0.440	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es <b>baja</b> .	No es útil
		IgG	293	30.1%	100%	77.8%	N.C.	0.69	0.370		
Escenario 5	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del tiempo a la exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	257	45.6%	100%	87.9%	N.C.	0.54	0.566	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es <b>baja</b> .	No es útil
		IgG	257	43.8%	100%	87.5%	N.C.	0.56	0.549		
Escenario 5.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	209	11.1%	100%	96.2%	N.C.	0.88	0.193	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, adicionalmente entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue adecuada para detectar casos. Sensibilidad <b>muy baja</b> .	No es útil*
		IgG	209	22.2%	100%	96.6%	N.C.	0.77	0.602		
Escenario 5.b	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	248	52.1%	100%	90.7%	N.C.	0.47	0.637	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Sin embargo, su desempeño para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, tanto para IgM como para IgG es <b>baja</b> .	No es útil
		IgG	248	47.9%	100%	89.9%	N.C.	0.52	0.597		
Escenario 6	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (incluyendo sueros históricos)	IgM	236	22.2%	100%	88.1%	N.C.	0.77	0.326	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, sin embargo su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición es <b>muy baja</b> .	No es útil
		IgG	236	11.5%	100%	89.8%	N.C.	0.88	0.134		
LR+: Razón de verosimilitud positiva		Sen: Sensibilidad; Esp: Especificidad; NC: no calculable. *Probable no circulación de anticuerpos en sangre. Coincide con la literatura sobre generación de anticuerpos posterior al día 9, con mejor rendimiento después del día 11.									
LR-: Razón de verosimilitud Negativa											

En este informe se presentan los resultados de validez y concordancia (frente a la RT-PCR) de la prueba serológica rápida **“INNOVITA® 2019-nCoV Ab test (Colloidal Gold)”**. La prueba en mención demostró:

1. Un buen rendimiento en la especificidad con sueros negativos con RT-PCR y con sueros negativos históricos tanto para IgM como para IgG, presentando criterio divergente del 99% y 100% respectivamente.
2. Un desempeño bajo y muy bajo frente a sueros positivos asintomáticos y sintomáticos en general (menos de 11 días y más de 11 días de inicio de síntomas).
3. Aunque la concordancia entre observador en la lectura de la prueba aquí evaluada obtuvo un Kappa igual a uno, se observó una reacción de bandas débil y muy débil en el 66,66% de las pruebas IgM positivas y el 49,12% de las pruebas IgG positivas. Esto dificulta la lectura e incrementa la variabilidad dependiente del observador, disminuyendo el desempeño del método.

#### 4. Discusión

Es cada vez más frecuente el uso de pruebas rápidas en el escenario de la pandemia de 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.

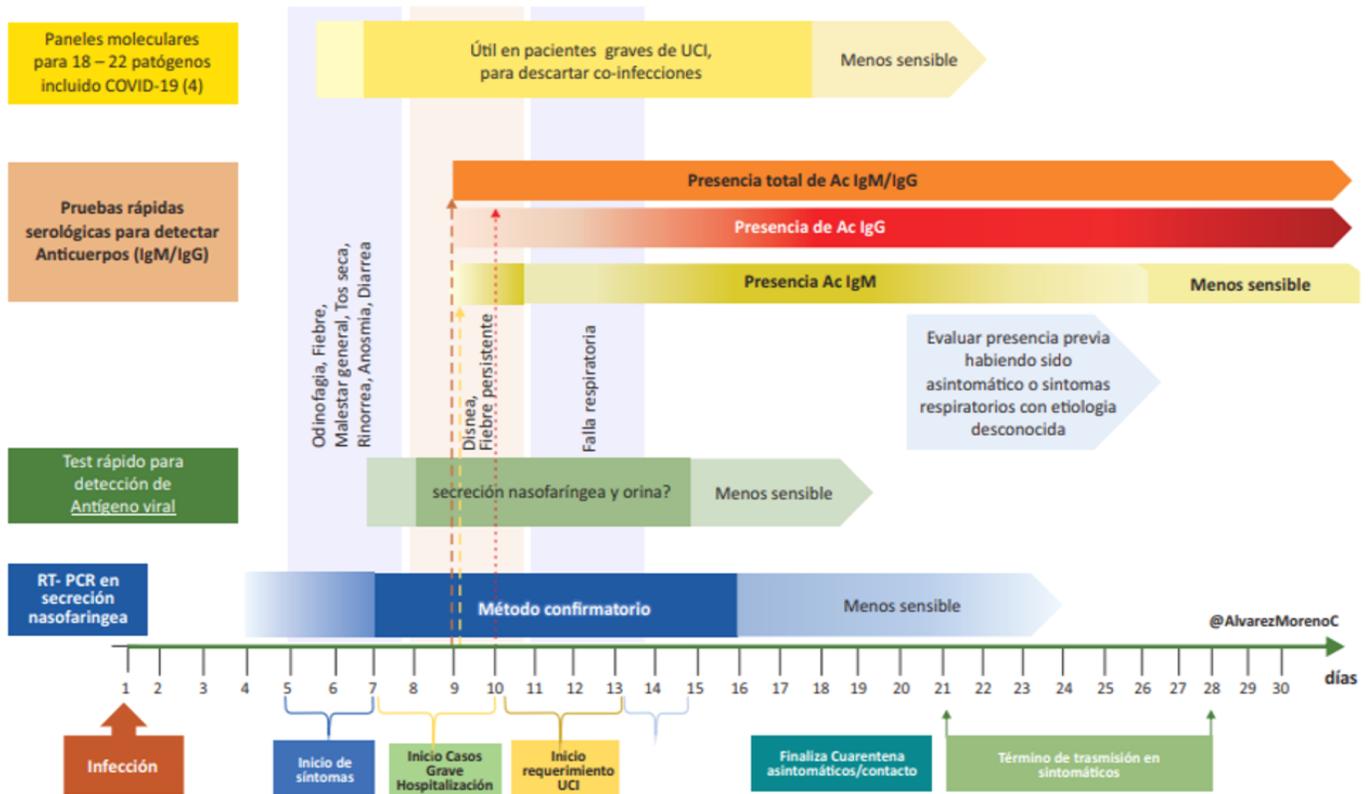
Recientemente se ha publicado en la literatura el comportamiento de la generación de anticuerpos para SARS-CoV-2 considerando los datos disponibles hasta hoy (ver figura 1). A partir del mismo, se puede concluir que la presencia total de IgM e IgG en sangre ocurre a partir del día 9 después del inicio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

## 5. Conclusiones y recomendaciones

1. La prueba en estudio demostró ser altamente específica frente a muestras RT-PCR negativas y muestras negativas históricas.
2. La sensibilidad frente a muestras de pacientes asintomáticos y sintomáticos fue menor a los valores mínimos establecidos en los lineamientos nacionales para su utilización.
3. Otros escenarios específicos con sus resultados y utilidad respectiva, se encuentran detallados en la tabla 5.

## 6. 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.

## 7. 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.

**Kelly Estrada Orozco.** MD MSC Epidemiología Clínica. PhDc, Coordinadora de la Unidad de Síntesis de Evidencia. Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud-IETS.

**Adriana Robayo.** MD Esp Nefrología. Directora Ejecutiva. Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud-IETS.

**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 Inmunohematología. Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud-IDCBIS.