

---

## PROTOCOLO DE VALIDACIÓN SECUNDARIA/VERIFICACIÓN DE DESEMPEÑO DE PRUEBAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS DE DETECCIÓN CUALITATIVA DE ANTÍGENO SARS-CoV-2 (Versión 2)

---

### Elaborado por:

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

**Gabriela Zabaleta.** Bac, Micro Ind, MS(c) Epidemiología.  
Grupo de Microbiología. Subdirección de Investigación  
Científica y Tecnológica del Instituto Nacional de Salud

## 1. INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2 es un coronavirus altamente contagioso que genera un síndrome respiratorio agudo severo conocido como COVID-19. SARS-CoV-2 es un virus ARN de la familia beta coronavirus. La estructura del coronavirus está compuesta principalmente por cuatro tipos de proteínas estructurales unas más conservadas que otras entre los diferentes tipos de coronavirus. Las proteínas estructurales principales son la de membrana (M), la envoltura (E), la espiga (S) y la nucleocápside (N); esta última recubre el ARN del virus y lo protege al interior de la envoltura (1) (2). Sin embargo, la proteína N es más conservada entre diferentes coronavirus lo que puede generar mayor reactividad cruzada, dando falsos positivos (3). La proteína S se encuentra compuesta por dos dominios el primero S1 que es responsable de la unión al receptor (RBD) de la célula a infectar que es el ACE2, y el segundo dominio es el S2 responsable de la fusión del virus al interior de la célula a infectar, esta estructura S1 es variable entre diferentes coronavirus a diferencia de la S2 la cual se conserva un poco más (4).

Las pruebas rápidas de antígeno inmunocromatográficas para COVID-19 detectan en la muestra del tracto respiratorio de un individuo proteínas específicas del coronavirus SARS-CoV-2, son útiles debido a que brindan resultados en un menor tiempo y para su ejecución no es necesario el uso de equipos robustos, como tampoco

de profesionales especializados en biología molecular a diferencia de la prueba confirmatoria por PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-PCR) establecida como gold standard. Sin embargo, estas pruebas tienden a tener una sensibilidad más baja que la RT-PCR y, por lo tanto, una prueba rápida negativa puede no ser capaz de descartar infección (5).

A diferencia de las pruebas rápidas inmunocromatográficas serológicas que detectan anticuerpos con una mayor sensibilidad pasados 11 días desde el inicio de síntomas, la prueba rápida de antígeno presenta mayor sensibilidad en la detección de casos positivos confirmados por RT-PCR en la fase inicial de la enfermedad reportando resultados positivos desde el primer día desde el inicio de los síntomas (6). Según la dinámica del SARS-CoV-2 se conoce la replicación viral en la faringe es más alta durante los primeros días desde la aparición de síntomas y luego disminuye (7) (8) (9).

Existe poca información sobre el uso de pruebas rápidas de antígeno (10), siendo necesarios estudios que demuestren la sensibilidad y la especificidad en la detección de antígeno por estas pruebas, por tal motivo el presente documento detalla el protocolo de validación de pruebas rápidas de detección cualitativa de antígenos en población colombiana, para su implementación dentro de la estrategia de control en la transmisión del virus SARS-CoV-2 y mitigar el impacto en la salud pública.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Evaluar el desempeño operativo de pruebas rápidas de detección cualitativa de antígeno de SARS-CoV-2, en diferentes espectros de la enfermedad usando como prueba de referencia RT-PCR.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar los atributos del método que aplican para el uso previsto.
- Evaluar los resultados para generar un concepto técnico relacionado con el uso previsto de la nueva metodología a implementar.
- Comprobar el desempeño de las pruebas rápidas en términos de exactitud y concordancia diagnóstica frente a RT-PCR, realizando un estudio de comparación de métodos para determinar el grado de acuerdo con el índice Kappa o porcentaje de concordancia.
- Determinar la exactitud diagnóstica, sensibilidad y especificidad y la confiabilidad de la misma mediante el cálculo de concordancia entre los dos métodos.

## 3. ALCANCE

El presente protocolo de verificación de desempeño es aplicable a las pruebas rápidas de detección cualitativa de antígeno de SARS-CoV-2 que cuenten con validación reportada previamente por el fabricante.

## 4. CONDICIONES GENERALES

### 4.1 Definición de las pruebas involucradas en el estudio

**Prueba de referencia (*gold standard*):** La prueba de PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-PCR), consiste en una reacción en cadena de la

polimerasa que previamente ha tenido una fase de transcripción reversa, su sigla en inglés RT (Reverse Transcription). Mediante la RT se obtiene cADN a partir de una cadena de RNA. En consecuencia la técnica de RT-PCR realiza la detección y amplificación de una secuencia a partir de una hebra de RNA.

Se puede realizar la validación secundaria con los protocolos existentes como el reportado por el Instituto de Virología de Charité (Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR Charité Virology, Berlin, Germany), el Seegene Allplex™2019-nCoV Assay (Seegene, Seoul, South Korea), entre otros que demuestren alta sensibilidad y especificidad y no tengan reactividad cruzada con otros coronavirus ni con virus respiratorios estacionales.

**Nota:** Para el informe de validación se debe citar el protocolo utilizado e informar cuales son los genes blancos específicos en cada RT-PCR utilizada para la validación secundaria (gen RdRP, gen E, gen N, Orf1a, etc.).

**Prueba a evaluar (prueba Índice):** Pruebas rápidas de detección cualitativa de antígeno de SARS-CoV-2.

Las pruebas rápidas de detección de antígeno de SARS-CoV-2 son un ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitativa rápida de proteínas estructurales del virus en muestras de tracto respiratorio. Los tipos de pruebas disponibles en el mercado pueden tener varias diferencias metodológicas, además del tipo de proteína diana del SARS-CoV-2, la concentración del límite de detección a identificar y el tipo de anticuerpos utilizados por la técnica, estas pruebas también se diferencian en la forma de recolección y los tipos de muestra que permiten analizar como saliva, hisopado o aspirado nasofaríngeo, entre otros. Asimismo se puede hallar diferencias en el diseño de uso de la tira de nitrocelulosa encontrándose de forma suelta o dispuesta dentro de un casete; y la forma de lectura del resultado también puede variar entre interpretación visual o mediante uso de un equipo de lectura automatizada como el utilizado en pruebas que emiten fluorescencia.

Las pruebas rápidas deben ser procesadas en el laboratorio según lo descrito en el ítem 4.5 de este

documento “Procesamiento de muestras”, usando todos los elementos de protección personal adecuados para la manipulación de virus respiratorios. Se debe seguir el procedimiento dado por fabricante según inserto, registrando lote y fecha de vencimiento de los componentes de la prueba evaluada así como la fecha en la que fue realizada la validación. Se debe tener en cuenta para el informe de resultados especificar el tipo de muestra empleado en la validación.

## 4.2 Población de estudio

La validación se realizará de manera prospectiva, en población colombiana o extranjera que se encuentren en territorio Colombiano, en mujeres u hombres que sean mayores de edad, que acepten ser parte de la validación al firmar el consentimiento informado y suministren su información completa, se diligencie la ficha epidemiológica o se pueda tener acceso a su historial clínico.

No entraran en el estudio mujeres en embarazo y menores de edad. Tampoco se incluirán muestras duplicadas, muestras con información faltante o que no cumplan cadena de frío o algún otro factor que declare pueda modificar el resultado.

### 4.2.1 Grupo de positivos

**Positivos sintomáticos:** Individuos con 11 días o menos de inicio de alguno de los siguientes síntomas de la enfermedad: anosmia, dolor de garganta, dolor de cabeza, tos, fiebre, dificultad respiratoria u otro síntoma característico para COVID-19, con un resultado positivo de RT-PCR para SARS-CoV-2 (prueba de referencia) tomado paralelamente para el estudio de validación.

**Positivos asintomáticos:** Individuos que no hayan manifestado ningún síntoma de la enfermedad al momento de recolección de la muestra pero sea un caso sospechoso por haber tenido contacto o exposición con un caso positivo anteriormente confirmado por RT-PCR, que tenga 11 días o menos entre la exposición al virus y la toma de la muestra y un resultado positivo de RT-PCR para SARS-CoV-2 (prueba de referencia) tomado paralelamente para el estudio de validación.

### 4.2.2 Grupo de negativos

**Negativos:** Individuos que no hayan manifestado ningún síntoma característico de COVID-19 en el último mes previo a la toma de la muestra, declare no tener contacto cercano con casos positivos de COVID-19 confirmado en los últimos 15 días previos a la toma de la muestra y tenga un resultado negativo de RT-PCR para SARS-CoV-2 (prueba de referencia) tomado paralelamente para el estudio de validación.

#### Criterios de inclusión

- Sujeto que haya sido identificado por una red prestadora de servicios de salud o por vigilancia epidemiología.
- Sujeto que haya sido notificado al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública Sivigila.
- Sujetos que firmen el formulario de consentimiento informado requerido para aceptar ser parte de la validación y suministren su información completa o se pueda tener acceso a su historial clínico.

#### Criterios de exclusión:

1. Mujeres en embarazo.
2. Menores de edad.
3. Individuos que previo a la toma de la muestra hayan usado spray o gotas nasales
4. Muestras duplicadas o con información faltante.

## 4.3 Tamaño de muestra

Para determinar exactitud de la prueba y concordancia diagnóstica se propone un  $n = 250$  con la siguiente distribución, a partir de las prevalencias de los grupos como se distribuyen en el escenario actual (11) (12) (13).

- Muestras positivas:
  - Sintomáticas: 16 - 48 individuos RT-PCR positivos con síntomas.
  - Asintomáticas: 16 - 48 individuos RT-PCR positivos sin síntomas.
- Muestras negativas: 112-144 individuos RT-PCR y síntomas negativos.

#### 4.4 Procedimiento toma de muestra

A los sujetos que cumplen los criterios de estudio se explicará detalladamente la información pertinente del motivo para la toma de muestra, así como los objetivos de la validación, los beneficios individuales y colectivos del mismo, la metodología a realizar en la toma de muestra, las molestias y posibles riesgos que se pueden presentar, sus derechos y responsabilidades, según lo explica el consentimiento informado. El sujeto acepta ser parte del estudio firmando el consentimiento y posteriormente se procede a realizar la toma de muestras.

Para cumplir con el fin del estudio se realizará doble toma de muestra de tracto respiratorio, recolectando una primera muestra para realizar la prueba rápida de antígeno a evaluar y la segunda muestra para realizar prueba molecular confirmatoria por RT-PCR.

La toma de muestra se realizará por personal capacitado siguiendo las directrices de laboratorio para la detección y diagnóstico de la infección con el nuevo coronavirus 2019 (14), teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad y debido uso de los equipos de protección personal adecuada para virus respiratorios, como los son respirador N95, gorro, visor, careta o monogafas, bata manga larga antifluido, guantes no estériles, vestido quirúrgico debajo de la bata que se retira al final de la toma de la muestra. Es importante tener en cuenta que dentro de las recomendaciones de los fabricantes esta desechar el hisopo utilizado en la toma una vez se sumerja en la solución diluyente del ensayo, este descarte debe hacerse cuidadosamente en condiciones de bioseguridad (Ver cada una de las especificaciones según tipo de prueba).

Luego de la toma de muestra, se deben cumplir las condiciones de almacenamiento y de refrigeración de la misma. Para realizar la prueba rápida de antígeno se debe tener en cuenta las especificaciones de uso del fabricante en el inserto (depende de cada prueba) como la temperatura, tiempo y demás condiciones específicas de almacenamiento antes de la realización final de la prueba dentro del laboratorio. La muestra realizada para la prueba de RT-PCR debe mantenerse

refrigerada entre  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$  por un tiempo máximo de 72 horas antes de su procesamiento, si las muestras se sabe no serán procesadas durante las primeras 48 horas luego de la toma de la muestra deben permanecer congeladas (temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ ), asegurando se mantenga la cadena de frío (14).

Se deben seguir todas las recomendaciones de embalaje emitidas por la Asociación Internacional del Transporte Aéreo (IATA), para el transporte de muestras infecciosas categoría B, en caso de que las muestras se envíen por vía aérea (15).

#### 4.5 Procesamiento de muestras

Una vez recolectadas las muestras de acuerdo a los procedimientos antes definidos y manteniendo estrictamente la cadena de frío se realiza el procesamiento de la prueba de RT-PCR para SARS-CoV-2 de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio de biología molecular. Las pruebas rápidas de antígeno serán realizadas exclusivamente por personal profesional de bacteriología y laboratorio clínico, y deben ser procesadas en el laboratorio clínico en cabina de flujo laminar clase II, no se deben procesar al aire libre u otro tipo de ambiente diferente al laboratorio, usando todos los elementos de protección personal adecuados para la manipulación de virus respiratorios. Se debe seguir el procedimiento según lo establecido por el fabricante. Adicionalmente las muestras y los materiales del kit de reacción deben ser descontaminados y desechados como material infeccioso en un contenedor de riesgo biológico con bioseguridad y posteriormente autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  por una hora.

Una vez pasado el tiempo de reacción de la prueba de antígeno (dependiendo del fabricante) la lectura de resultados se realizará por dos observadores independientes quienes no conocen antecedentes de los sujetos de estudio ni los resultados de la prueba estándar. Se realizará evaluación de concordancia inter-observador, determinando el grado de concordancia mediante coeficiente kappa (K). Los resultados obtenidos se anotarán en una base de datos destinada para este fin exclusivamente.

#### 4.6 Análisis estadístico de los datos

Inicialmente se realizará revisión de la base de datos por dos observadores independientes con el ánimo de establecer errores de transcripción o incongruencias. Se realizará un análisis descriptivo de las diferentes variables demográficas y clínicas evaluando su distribución. Se emplearán resúmenes gráficos y tablas según sea pertinente para cada variable. El análisis estadístico tendrá por objeto describir los estimativos puntuales y

por intervalos de 95% de las características operativas de las pruebas con respecto al estándar de referencia (Sensibilidad, especificidad, razones de verosimilitud y valores predictivos) y la concordancia por conformidad mediante índice de Kappa. Igualmente se evaluará la concordancia por consistencia entre las diferentes pruebas convencionales y modificadas que se reportaran mediante índices de kappa. El análisis de datos se llevará a cabo a través del programa estadístico SPSS® V. 16.1.

## 5. REFERENCIAS

- (1). Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., ... & Tong, S. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *science*, 300(5624), 1394-1399.
- (2). Infantino, M., Damiani, A., Gobbi, F. L., Grossi, V., Lari, B., Macchia, D., ... & Cappelletti, P. (2020). Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives. *Isr Med Assoc J*, 22, 203-210.
- (3). Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135.
- (4). Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011-1033.
- (5). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – seventh update, 25 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020.
- (6). Porte, L., Legarraga, P., Vollrath, V., Aguilera, X., Munita, J. M., Araos, R. & Weitzel, T. (2020). Evaluation of novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *International Journal of Infectious Diseases*.
- (7). Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., ... & Qian, S. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.
- (8). Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., ... & Hoelscher, M. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465-469.
- (9). Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., ... & Guo, Q. (2020). SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177-1179.
- (10). J.E. Gomez-Marin, et al. Consenso de grupo Ad-hoc sobre recomendaciones para la evaluación y controles de calidad para el diagnóstico molecular y serológico de la infección humana por SARS CoV-2. *Infectio* 2020; 24(3) Suplemento COVID 19: 5-10 <http://dx.doi.org/10.22354/in.v24i3.86>
- (11). Hajian-Tilaki, K. (2014). Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *Journal of biomedical informatics*, 48, 193-204
- (12). Bujang, M. A., & Baharum, N. (2017). Guidelines of the minimum sample size requirements for Kappa agreement test. *Epidemiology, Biostatistics and Public Health*, 14(2).
- (13). Shan, G. (2018). Sample size calculation for agreement between two raters with binary endpoints using exact tests. *Statistical methods in medical research*, 27(7), 2132-2141.
- (14). Organización Panamericana de la Salud (PAHO) Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV), febrero 2020 <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-nuevo-coronavirus-2019>
- (15). Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2019 (WHO/WHE/CPI/2019.20). Licencia: CC BY-NCSA 3.0 IGO