

Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (ABBOTT) Octubre 27 de 2020

1. INTRODUCCIÓN

Las pruebas rápidas para la detección de antígenos son frecuentemente usadas en el diagnóstico de infecciones respiratorias, y recientemente las oficinas de regulación en Colombia [1] y en el mundo, han autorizado su uso para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 [2]. Las pruebas rápidas de antígeno (Ag) se basan en un formato de inmunocromatografía, en el que anticuerpos específicos acoplado a perlas de oro [3], migran en un sustrato de celulosa después de reconocer el antígeno del virus presente en las secreciones respiratorias. Para el caso de la infección por SARS-CoV-2, las pruebas rápidas de detección de antígeno se desarrollan usando una muestra de las secreciones respiratorias tomadas mediante hisopado nasofaríngeo, que se lleva directamente al buffer de dilución e inactivación y luego es adicionada al dispositivo plástico en el que ocurre la reacción y la migración, hasta obtener una banda de señal visible (en el caso de ser positivo), en conjunto con la respectiva banda del control interno de la prueba.

El desempeño clínico de las pruebas rápidas de antígeno depende varios factores, principalmente del momento en que se toma la muestra en personas sintomáticas de acuerdo con el curso clínico de la infección viral. Debido a que estas pruebas pretenden la identificación de las proteínas virales se recomienda tomar muestras tempranamente, en la primera semana de evolución de los síntomas, cuando se presume que es alta la carga viral en las secreciones, procesando la muestra en el sitio de toma de muestra, para ofrecer el resultado en el menor tiempo posible. Para la presente prueba, la casa fabricante ha reportado sensibilidad analítica del 93,3% y una especificidad analítica del 99,4% y según las recomendaciones del fabricante, el test muestra mejor desempeño si se realiza durante la primera semana de síntomas o de la exposición o contacto con un caso confirmado.

El presente proceso de validación secundaria, se realizó siguiendo las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud (Colombia), que aparecen descritas en el “Protocolo de validación secundaria/verificación de desempeño de pruebas inmunocromatográficas de detección cualitativa de antígeno SARS-CoV-2 (Versión 2)” [4], comparando los resultados con la detección del RNA viral en muestras tomadas simultáneamente y procesadas por RT-PCR en tiempo real usando el protocolo de la Universidad de Charité (Berlín, Alemania) [5].

2. PROCEDIMIENTO.

La toma y procesamiento de las muestras se realizó en instituciones prestadoras de servicios de salud, debidamente habilitadas para la atención clínica de pacientes, toma, procesamiento y reporte de muestras siguiendo las recomendaciones del Ministerio de Salud de Colombia en cuanto a las normativas para la atención de pacientes COVID19. Las muestras se tomaron en espacios privados con restricción de acceso, y los profesionales de salud encargados usaron los respectivos elementos de protección personal recomendados para la toma de muestras de hisopados nasofaríngeos (bata larga de manga larga, overol desechable, gorro, doble par de guantes, respirador N95 y careta). A todos los pacientes y voluntarios se les realizó entrevista clínica, documentación de signos y síntomas y registro de ficha epidemiológica 346 acorde con los lineamientos establecidos [6].

Cada caja contiene 25 dispositivos plásticos empacados en bolsas individuales con desecante, un frasco gotero con el buffer, un hisopo de control negativo y un hisopo de control positivo. Se incluyen también 25 hisopos estériles y 25 tubos goteros de extracción con doble tapa. Todos los pacientes y voluntarios leyeron, entendieron y firmaron el consentimiento informado antes del procedimiento de toma de muestras, las cuales consistieron en doble hisopado nasofaríngeo, el primero con el hisopo flexible de nylon para la colecta de muestra nasofaríngea en medio VTM (para RT-PCR) y el segundo con el hisopo incluido en el kit para **Antígeno Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device**. Se adicionaron 8 gotas de solución tampón hasta la línea de llenado (300 µL) en cada tubo de extracción y después de tomar la muestra nasofaríngea, el hisopo se depositó en este tubo de extracción, girándolo cinco veces, y luego exprimiendo el hisopo apretando el tubo de extracción con los dedos; se quebró el hisopo en la línea de ruptura y se cerró firmemente la tapa del tubo de extracción.

Inmediatamente, se depositaron verticalmente 5 gotas en el pocillo de muestra (S) del dispositivo, sin manipular ni mover. Se realizó la lectura a los 15 minutos, y se anotó el resultado, así: una banda C, (control), resultado negativo y dos bandas (C y T de cualquier intensidad), resultado positivo. Los materiales usados en la prueba se descartaron como infecciosos, siguiendo las recomendaciones de la Secretaria de Salud de Bogotá. Los hisopos de control positivo y negativo fueron procesados cada día al iniciar la recolección de muestras.

3. ANÁLISIS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba inmunocromatográfica rápida para la detección cualitativa de antígenos **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device - Abbott** frente al estándar de referencia RT-PCR Berlín 2020, con detección del Gen E de SARS-CoV-2, amplificando simultáneamente el control interno humano en cada muestra [5]. Según las recomendaciones del protocolo oficial, se reclutaron tres grupos diferentes individuos (a) **asintomáticos sin antecedente de contacto** (n=115), (b) **asintomáticos con antecedente de contacto** (11 días o menos de exposición, n=66), que suman 181 **asintomáticos** y (c) **sintomáticos** (con registro de fecha de inicio de síntomas de 11 días o menos, n=81) cuyas muestras fueron procesadas por ambas técnicas. En total, se incluyeron doscientos sesenta y dos muestras (n=262). Según el resultado en la prueba *gold estándar*, estos individuos se distribuyeron así: (i) doscientos veintiuna (221) muestras de hisopados nasofaríngeos con resultado negativo en la RT-PCR y (ii) cuarenta y una (41) muestras de hisopados nasofaríngeos positivos para SARS-CoV-2 por RT-PCR (Tabla 1).

En el análisis usando los resultados con el total de los individuos reclutados, la prueba arroja una sensibilidad de **46,3% (IC 95 32,0 – 61,3)**, por lo que no se debe recomendar para población general.

Tabla 1. Descripción general del diagnóstico en los grupos de estudio.

Grupos	RT-PCR n: 262	Prueba para Antígeno	
		Positiva	Negativa
SARS-CoV-2 Negativos confirmado con RT-PCR	221	3	218
Asintomáticos RT-PCR Positivos	19	3	16
Sintomáticos RT-PCR Positivos	22	16	6
Total	262	22	240

4. ANÁLISIS DEL DESEMPEÑO DE LA PRUEBA EN INDIVIDUOS ASINTOMÁTICOS.

Tabla 2. Comportamiento de la prueba de antígeno en el grupo de individuos asintomáticos, con 11 días o menos de exposición.

Prueba para Antígeno	Asintomáticos RT-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Prueba de Ag positiva	3	1	4
Prueba de Ag negativa	16	161	177
Total	19	162	181

De un total de 181 muestras de individuos asintomáticos evaluados por RT-PCR, 19 fueron positivos y 162 negativas en la RT-PCR. De estas muestras, cuatro (n=4) presentaron resultado positivo en la prueba de antígeno Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device - Abbott. En el análisis desarrollado con los datos provenientes de los individuos asintomáticos, la prueba arrojó una sensibilidad de **15,8% (IC 95 5,5 – 37,6)**, por lo que no se recomienda su uso para el diagnóstico de SARS-CoV-2 en personas que no presentan síntomas.

5. ANÁLISIS DEL DESEMPEÑO DE LA PRUEBA EN INDIVIDUOS SINTOMÁTICOS

Tabla 3. Comportamiento de la prueba de antígeno en el grupo de individuos sintomáticos ≤11 días de inicio de síntomas

Prueba para Antígeno	RT-PCR en Sintomáticos (con inicio de síntomas ≤ 11 días)		Total
	Positivo	Negativo	
Prueba de Ag positiva	16	2	18
Prueba de Ag negativa	6	57	63
Total	22	59	81

De un total de 81 muestras de pacientes en los que se registraron síntomas de duración ≤11 días, y que fueron evaluados RT-PCR (22 positivas y 59 negativas), se identificaron 18 muestras positivas y 63 negativas en la prueba de antígeno Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott. En este caso, el análisis de sensibilidad en el grupo de sintomáticos respiratorios arrojó una cifra de **72,7% (IC 95 51,8 – 86,8)**, lo cual sugiere que es posible usar la prueba en personas con síntomas, y procesar por la técnica de RT-PCR aquellos pacientes cuyo resultado de antígenos sea negativo,

6. ANÁLISIS DE LA PRUEBA DE ANTÍGENO “Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott” CORRELACIONADO CON LOS VALORES DE C_T DE LA RT-PCR

Se evaluó el desempeño de la prueba Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott, en las muestras positivas para la presencia de SARS-CoV-2 según el C_T obtenido en la RT-PCR, y en los grupos de análisis propuestos en esta validación. Se encontró que en las muestras de individuos sintomáticos con alta carga viral (C_T menor de 25) la concordancia de la prueba de antígenos y la RT-PCR fue muy alta. Por la misma razón, valores de C_T mayores de 26 (con menor carga viral) arroja valores de sensibilidad moderado a bajos, lo cual se relaciona con una menor cantidad de partículas virales en la muestra. No se detectaron muestras con C_T menores de 25 en individuos asintomáticos.

7. DISCUSIÓN

La confirmación de la infección por SARS CoV-2 constituye un punto crítico en las instituciones de salud y en los entes responsables de la vigilancia epidemiológica en las diferentes regiones geográficas afectadas por la infección. El incremento en el número de casos sospechosos (contactos de individuos positivos, infecciones asintomáticas), sumado al aumento en el número de individuos que requieren atención intrahospitalaria conducen a un aumento significativo en el volumen de muestras para confirmación de la infección. La prueba de RT-PCR ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad para la confirmación de la infección, pero solo se realiza en laboratorios altamente calificados que cuentan con la infraestructura y el personal idóneo para el desarrollo de estas. El alto volumen de muestras registrado en los últimos meses ha evidenciado un retraso en los resultados de la prueba molecular, por lo que se hace necesario la aplicación de pruebas de diagnóstico para SARS-CoV-2 de fácil acceso para todas las instituciones de salud, que permita identificar tempranamente los casos, y establecer el diagnóstico.

En la última década, la elaboración e implementación de las pruebas de inmunocromatografía han demostrado un desempeño óptimo para el apoyo diagnóstico de diferentes enfermedades, principalmente en infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana y la infección por virus dengue, entre otras.

Desde la aparición de la infección en humanos por SARS-CoV-2 se han diseñado, implementado y puesto en práctica en la población mundial numerosas técnicas diagnósticas que se han enfocado en la identificación del RNA viral y las proteínas virales en las secreciones. El desarrollo y validación de las pruebas de inmunocromatografía para la detección de antígeno y anticuerpos para SARS CoV2, ha presentado un avance importante durante el curso de la epidemia, identificando infecciones recientes y activas, permitiendo detectar los casos de forma temprana para realizar un manejo oportuno de la enfermedad.

Las pruebas inmunocromatográficas para la detección de antígenos virales de primera generación han demostrado en diversos estudios científicos una capacidad diagnóstica aceptable en comparación con los métodos moleculares, principalmente en individuos sintomáticos, en los primeros 11 días de la enfermedad, permitiendo detectar y confirmar de forma eficaz los casos sospechosos de infección por SARS CoV-2, facilitando su manejo clínico, confinamiento y seguimiento.

En el marco de la situación de pandemia en Colombia, se han autorizado por parte del Ministerio de Salud el uso de test rápidos directos para la identificación de proteínas virales [8], sin el requerimiento de cabinas de bioseguridad, por parte de personal de salud vinculado a las instituciones prestadoras de servicios de salud y laboratorios clínicos habilitados. Estas pruebas se indican en pacientes con síntomas respiratorios de menos de 11 días, que sean atendidos en ámbito de urgencias u hospitalización, donde por las condiciones territoriales no se tenga la capacidad para realizar pruebas moleculares de RT-PCR, en servicios ambulatorios o domiciliarios y a sus convivientes o contactos cercanos en el caso de búsquedas epidemiológicas incluyendo personas que vivan en zonas rurales dispersas.

Esto ha facilitado la identificación de casos de pacientes con menos de 11 días de síntomas, en consideración a la temprana presencia del virus en las secreciones respiratorias, cuyo pico generalmente se observa entre los días 3 y 7 de síntomas, cuando existen altas cargas virales de SARS CoV-2 en las fases agudas y con alta probabilidad de contagio de la enfermedad. En el presente estudio de validación de la prueba **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott**, se ha podido evidenciar la utilidad de la prueba en pacientes con síntomas agudos de la enfermedad y en particular aquellos con altas cargas virales, con C_T menores de 25, lo cual indica la capacidad de detectar casos en la primera semana de síntomas, demostrando que el presente test, cumple con las especificaciones del fabricante y puede ser realizado en el territorio nacional de acuerdo con las normativas actuales de su uso en la situación actual de Pandemia por SARS-CoV-2.

46,3% (IC 95 32,0 – 61,3),
sensibilidad de 15,8% (IC 95 5,5 – 37,6),

72,7% (IC 95 51,8 – 86,8)

CONCLUSIONES.

En el presente informe de validación se demuestran los resultados de la prueba de inmunocromatografía rápida para antígeno **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott** para detección cualitativa de antígenos comparado con los resultados de la prueba de diagnóstico de RT-PCR para SARS CoV-2 protocolo Universidad de Charité de Berlín, en muestras de hisopado nasofaríngeo realizadas en paralelo en ambientes clínicos a pacientes y voluntarios. La prueba en mención demostró:

a.- La prueba **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott** presenta alta especificidad (96,6%, IC95 88,5 – 99,1) respecto de las muestras de hisopado nasofaríngeo de individuos sintomáticos respiratorios, procesadas para la detección de RNA de SARS-CoV-2 por RT-PCR

b.- La sensibilidad observada de la prueba es moderada (72,7%; IC 95 51,8 – 86,8) en las muestras analizadas de individuos sintomáticos con registro de inicio de síntomas igual o menor a 11 días y positivas por RT-PCR (Escenario 3). La prueba de antígenos **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device – Abbott** presenta una baja sensibilidad (15,8%; IC95 5,5 – 37,6), en las muestras de individuos asintomáticos que reportaron exposición menor a 11 días (Escenario 2).

c.- La concordancia de la prueba (Valor kappa: 0,7353 IC95 0,6 – 0,9) en la comparación frente al estándar de referencia RT-PCR, fue moderada [7], específicamente en el análisis de individuos sintomáticos con ≤ 11 días de síntomas (Escenario 3, Tabla 4).

d.- La prueba de antígeno **Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device**, en individuos sintomáticos tiene una sensibilidad alta cuando las muestras positivas por RT-PCR tienen un valor de $C_T < 25$.

Procesamiento y Análisis:

Carolina Coronel-Ruiz, BLC, MSc; (Instituto de Virología, U. El Bosque)

Sigrid J. Camacho-Ortega, BLC, MSc; (Instituto de Virología, U. El Bosque)

Jhann A. Arturo, MD, MSc (Inmugen Corp.);

Jaime E. Castellanos, MSc, PhD. (Instituto de Virología, U. El Bosque)

Tabla 4. Utilidad y recomendaciones de la prueba de antígeno de acuerdo con los diferentes escenarios de aplicación de la prueba.

Escenarios	Descripción	N	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	Exactitud	LR+	LR-	Kappa (IC 95%)	Recomendación	Utilidad para escenario
Escenario 1	Prueba aplicada a población sintomática y asintomática, con menos de 11 días de inicio de síntomas o de exposición	262	46.3% (32.%-61.3%)	98,6% (96,1%-99,5%)	90,5%	34,1	0,5	0,5545 (0,39-0,72)	La prueba presenta alta especificidad para descartar SARS CoV2, con baja capacidad para detectar casos	No es útil
Escenario 2	Prueba aplicada a población asintomática, con 11 días o menos de exposición.	181	15,8% (5,5%-37,6%)	99,4% (96,6%-99,9%)	90,6%	25,6	0,9	0,2329 (-0,11-0,6)	La prueba presenta alta especificidad para descartar SARS CoV2, con baja capacidad para detectar casos, aun cuando se tiene claridad de la fecha de exposición	No es útil
Escenario 3	Prueba aplicada a población sintomática, con 11 días o menos de inicio de síntomas	81	72.7% (51.8%-86,8%)	96,6% (88,5%-99,1%)	90,1%	21,4	0,3	0,7353 (0,6-0,9)	La prueba presenta alta especificidad para descartar SARS CoV2, con moderada capacidad para detectar casos en población sintomática, independiente del inicio	Es útil*

*Se debe realizar en conjunto con prueba de RT-PCR, en individuos sintomáticos, con manifestaciones clínicas sugestivas de COVID-19, cuyo resultado de la prueba de antígeno sea negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Resolución 001463 2020, 25 de Agosto 2020. Ministerio de Salud y Protección Social . Colombia 2020.
2. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S et al., Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Cochrane Database of Syst Rev. 2020; 8 : CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.
3. Castellanos, JE, Coronel-Ruiz, C. (2014) Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. Revista de la Facultad de Medicina, 62 (4). pp. 617-629. ISSN 2357-3848
4. Protocolo de validación secundaria/verificación de desempeño de pruebas inmunocromatográficas de detección cualitativa de antígeno sars-cov-2 (Versión 2)
<https://www.ins.gov.co/pruebas%20de%20antgenos/3.%20Protocolo%20de%20Validaci%C3%B3n%20de%20pruebas%20inmunocromatograficas%20de%20ant%C3%ADgeno%20SARS-CoV-2.pdf>
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D, 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
6. Lineamientos para el manejo clínico de pacientes con infección por nuevo coronavirus COVID-19. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, Julio 2020.
7. McHugh M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. Biochemia medica, 22(3), 276–282.
8. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Lineamientos para el uso de pruebas moleculares RT-PCR, pruebas de antígeno y pruebas serológicas para SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia, Agosto 2020.