

## Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba serológica “SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott”

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott, 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 al inicio de síntomas o a la prueba positiva por RT-PCR. En un total de quinientas veintiuna (521) muestras que incluyeron: (i) Ciento diez (110) muestras de sueros negativos históricos, (ii) Ciento once (111) muestras de sueros negativos por RT-PCR, (iii) ochenta y nueve (89) muestras de suero de pacientes asintomáticos con pruebas de RT-PCR positiva y (iv) doscientos once (211) muestras de suero de pacientes sintomáticos, con pruebas de RT-PCR positiva.

### 1. Principio de la prueba

La prueba SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott, es un inmunoensayo quimioluminiscente automatizado de dos pasos, que utiliza tecnología de micropartículas (CMIA) para la detección cualitativa en suero o plasma de anticuerpos IgG contra el virus SARS-CoV-2. En la primera fase se mezclan e incuban el suero o plasma a evaluar, con las micropartículas paramagnéticas recubiertas de antígenos recombinantes de la nucleocápside del SARS-CoV-2 y el diluyente de muestra, durante este tiempo los anticuerpos IgG presentes en la muestra del paciente se unen a la fase sólida, formando un complejo inmune.

En la segunda fase y posterior al lavado realizado para eliminar impurezas y antígenos o anticuerpos que no se hayan unido a las micropartículas, se agrega a la reacción el conjugado de anticuerpos anti-IgG marcados con acridinio, dicha reacción se incubaba nuevamente y seguido de otro ciclo de lavado se agregan las soluciones preactivadora

y activadora, generadoras de luz.

La reacción quimioluminiscente se mide en unidades relativas de luz (URL), existiendo una relación directamente proporcional entre la cantidad de anticuerpo IgG anti SARS-CoV-2 presentes en la muestra y las URL detectadas por el sistema óptico del ARCHITECT iSystem. La presencia o ausencia de anticuerpos IgG en la muestra se determina comparando la señal quimioluminiscente de la reacción, con la señal del punto de corte determinada a partir de la calibración. Si la señal quimioluminiscente de la reacción es superior o igual a la señal del punto de corte, el espécimen se considera como positivo.

Los resultados se expresan como el valor índice entre las URL detectadas en la muestra y las URL detectadas del calibrador y como negativo o positivo y en función del punto de corte que corresponde a un índice (S/C) de 1.4. (tabla 1)

Tabla 1. Valores índice de URL para interpretación de resultados

Resultado numérico	Resultado	Interpretación
Índice < 1.4	Negativo	Negativo para anticuerpos IgG antiSARSCoV2
Índice ≥ 1.4	Positivo	Positivo para anticuerpos IgG antiSARSCoV2

## 2. Procedimiento de la prueba

El procesamiento de las pruebas para la presente validación se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud entre los días 9 y 16 julio de 2020, por el personal capacitado en el uso del equipo Architect i1000, en compañía de un observador, de acuerdo con lo indicado por el inserto de la prueba y el manual de uso del analizador en mención y teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

**2.1 Reactivos:** desde la recepción y hasta su uso, los reactivos, controles, calibradores y soluciones, se almacenaron en las siguientes condiciones controladas:

Tabla 2. Condiciones de almacenamiento de reactivos

Reactivo	Lote	Fecha de vencimiento aaaa/mm/dd	Condición de almacenamiento
Architect SARS-CoV-2 IgG Reactivo	16311FN00	2020-07-16	Refrigeración 2 a 8 °C
Architect SARS-CoV-2 IgG Calibrador	17097FN00	2020-07-14	
Architect SARS-Cov-2 IgG Controles	17100FN00	2020-07-24	
Architect Solución Pre activadora	14548FN00	2021-03-06	Temperatura ambiente 15 a 25 °C
Architect Solución Activadora	14001FN00	2021-08-12	
Architect Solución Buffer	11490FN01	2020-11-02	

**2.2 Muestras:** para la evaluación se seleccionaron 521 sueros del biobanco COVIDCOL, almacenados en congelación a - 80°C. Para su procesamiento estos sueros se descongelaron paulatinamente transfiriéndolos de - 80°C a - 20 °C y de aquí a refrigeración entre 2 a 8 °C, por último, se centrifugaron a 3500 RPM durante 10 minutos.

**2.3 Analizador:** con el fin de poner a punto el equipo Architect i1000 para la validación, el día 2020-05-21 el proveedor llevó a cabo el correspondiente mantenimiento preventivo y la instalación de la prueba SARS-CoV-2 IgG. Por otra parte, tanto para el ejercicio de precisión como para el procesamiento de las muestras, el operador del instrumento ejecutó a satisfacción, los mantenimientos mensuales, semanales y diarios necesarios para el adecuado funcionamiento del equipo.

**2.4 Precisión:** se realiza ejercicio con los dos niveles de control del reactivo, procesando 5 réplicas de cada uno, durante cinco días, utilizando el mismo lote de control y de reactivo, así como el mismo instrumento. Se obtiene la siguiente información a partir de un análisis de varianza (ANOVA)

Tabla 3. Resultados de pruebas de precisión

Control	n	Media (Indice S/C)	Intraserial		Intralaboratorio	
			D.E.(Indice S/C)	C.V. (%)	D.E. (Indice S/C)	C.V. (%)
Control Positivo	25	3,3980	0,05544	1,632	0,06062	1,784
Control Negativo	25	0,0616	0,00400	6,494	0,00369	5,987

**2.5 Procedimiento:** para el procesamiento de las muestras y del ejercicio de precisión, se llevaron a cabo las siguientes actividades generales, teniendo en cuenta de que, por tratarse de un procedimiento automatizado, posterior al acondicionamiento de las muestras, su rotulación y programación en el analizador, el operador no interviene en su procesamiento, hasta la revisión de los resultados obtenidos o en caso de ser necesario la evaluación y solución de alertas:

- Se calibró el lote de reactivo a utilizar obteniendo resultados satisfactorios.
- A diario se corrieron los dos controles de la prueba, para cada uno de los estuches de reactivo a utilizar, obteniendo resultados dentro de los rangos esperados.
- Se sirvieron con micropipeta, 500 uL de cada una de las muestras y se programaron en el equipo con el número consecutivo asignado, corroborando su adecuada identificación y ubicación en las gradillas. Dando inicio a la ejecución automatizada de la prueba.
- Los resultados obtenidos para la totalidad de las muestras y reportados por el procesador se extrajeron del analizador en archivo Excel® y la información se registró en una base de datos específica para la validación de la prueba en medio magnético.

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

De un total de 411 muestras evaluadas con RT-PCR (300 positivas y 111 negativas), 172 muestras fueron positivas para anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2 con la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott y 239 muestras fueron clasificadas como negativas. Se excluyen los negativos históricos (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación diagnóstica de los grupos en estudio para la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott

Grupos	RT-PCR n=521	Prueba Serológica		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	0	110	110
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	111	3	108	111
Asintomáticos RT-PCR Positivos	89	26	63	89
Sintomáticos RT-PCR Positivos	211	143	68	211
<b>Total</b>		<b>172</b>	<b>349</b>	<b>521</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% 95,8 – 99,9%).

De acuerdo con la fecha de inicio de síntomas el grupo de pacientes sintomáticos con RT-PCR positiva (n=211), fue dividido en dos grupos para el análisis, considerando la fecha de inicio de síntomas: i) menor de 14 días y ii) de 14 días o más. 143 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica como positivas y 68 como negativas (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación diagnóstica del grupo de sintomáticos para la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott

Sintomáticos RT-PCR Positivos	Prueba Serológica		Total
	Positiva	Negativa	
Menor de 14 días de inicio de síntomas	16	46	62
14 días o mas de inicio de síntomas	127	22	149
<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>68</b>	<b>211</b>

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

Tabla 6. Resultados de exactitud diagnóstica y concordancia de la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG para uso en Architect – Abbott . 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	411	56.3% (50.5%, 61.9)	97.3% (91.7%, 99.3)	67.4% (62.6%, 71.8%)	20.8	0.45	0.39	La prueba presenta una <b>alta</b> especificidad para descartar la presencia de anticuerpos 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 ni de la exposición es <b>baja</b> .	<b>No es útil*</b>
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	322	67.8% (60.9%, 73.9%)	97.3% (91.7%, 99.3)	77.9% (72.9%, 82.2%)	25.1	0.33	0.57	La prueba presenta una <b>alta</b> especificidad para descartar la presencia de anticuerpos 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 <b>moderada</b> .	<b>Es útil combinada con PCR</b>
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (menos de 14 días de inicio síntomas)	173	25.81%	97.3% (91.7%, 99.3)	71.6% (64.2%, 78.1%)	9.55	0.76	0.27	La prueba presenta una <b>alta</b> especificidad para descartar la presencia de anticuerpos 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 <b>moderada</b> .	<b>No es útil*</b>
Escenario 2.b:	Prueba aplicada a población sintomática (más de 14 días de inicio síntomas)	260	85.2% (78.2%, 90.3%)	97.3% (91.7%, 99.3)	90.3% (85.9%, 93.5%)	31.54	0.15	0.81	La prueba presenta una <b>alta</b> especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero. La capacidad de detectar casos (Sensibilidad) con fecha de inicio de síntomas superior a 14 días es <b>alta</b> .	<b>Es útil**</b>
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	200	29.2% (20.3%, 39,9%)	97.3% (91.7%, 99.3)	67% (59.9%, 73.3%)	10.81	0.73	0.28	La prueba presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero. La capacidad de detectar casos (Sensibilidad) cuando no se tiene claridad sobre la exposición o momento de infección es <b>muy baja</b> .	<b>No es útil*</b>
Escenario 4	Prueba aplicada a población con antecedente de hospitalización	147	97.2% (83.8%, 99.8%)	97.3% (91.7%, 99.3)	97.2% (92.7%, 99.1%)	35.97	0.03	0.93	La prueba presenta una <b>alta</b> especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgG, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero. La capacidad de detectar casos (Sensibilidad) en sujetos con antecedente de hospitalización es <b>alta</b> .	<b>Es útil***</b>
LR+: Razón de verosimilitud positiva	Sen: Sensibilidad, Esp: Especificidad, *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 14; **Probable circulación de anticuerpos en sangre, por lo que su detección es recomendable. *** Para la determinación de este escenario se tomaron las muestras de pacientes recuperados que hacen parte del estudio Estudio multicéntrico de casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) que requieren ingreso hospitalario o en unidades de cuidado crítico en Colombia. "CORHUCO".									
LR-: Razón de verosimilitud Negativa										

En este informe se presentan los resultados de validez y concordancia (con la RT-PCR) de la prueba serológica SARS-CoV-2 IgG Architect Abbott”

La prueba en mención demostró:

1. Alta especificidad con sueros negativos con RT-PCR y con sueros negativos presentando validez de criterio de 100%.
2. Sensibilidad alta para IgG alcanzando el 85,2%. Este desempeño está determinado para muestras de población sintomática tomadas por encima de los 14 días de inicio de síntomas (Escenario 2b).
3. Sensibilidad alta para IgG alcanzando el 97,2%. Este desempeño está determinado para muestras de población con antecedente de hospitalización (Escenario 4).
4. Una sensibilidad moderada para IgG, cuando la prueba se usa en la caracterización de pacientes sintomáticos, independientemente del inicio de síntomas o de exposición (Escenario 2).
5. La concordancia de la prueba en estudio frente al estándar de referencia RT-PCR, medida como kappa, fue muy buena específicamente para IgG en los escenarios 2b y 4, escenarios de pacientes sintomáticos con más 14 días desde el inicio de la infección.

#### 4. Discusión

La aplicación de pruebas complementarias 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); sin embargo deben mantener las medidas de bioseguridad, ya que no se descarta el riesgo de reinfección (2). Por lo anterior, la detección de anticuerpos en este grupo poblacional es crítica, en el marco de la vigilancia epidemiológica de esta pandemia.

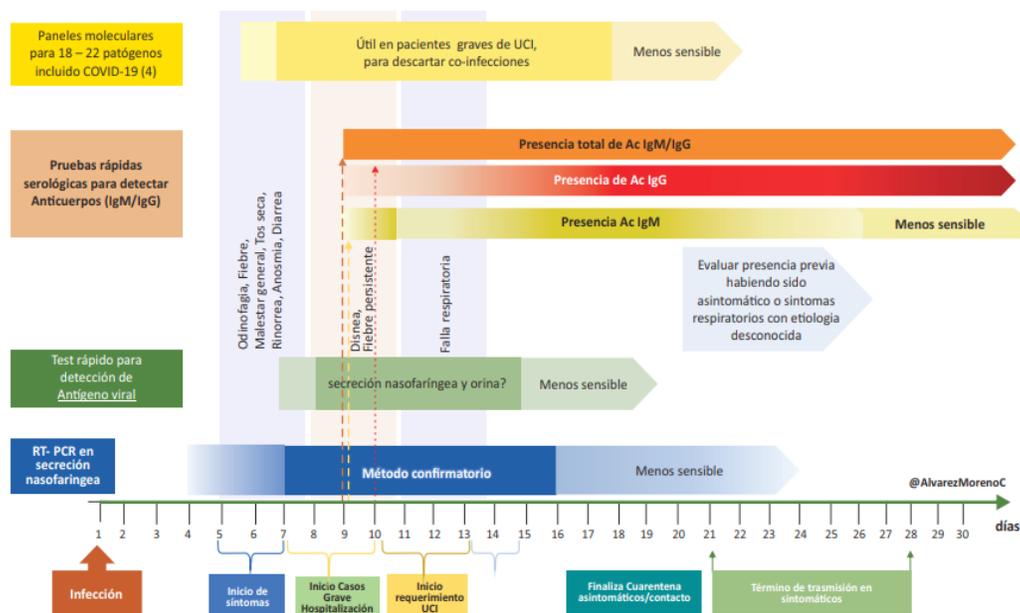
Las pruebas serológicas permiten la identificación de anticuerpos específicos contra antígenos del virus, generados a partir de la respuesta inmunológica del individuo, las proteínas estructurales de nucleocápside (N) y la proteína de espiga (S) son las más frecuentes empleadas en estas metodologías por su papel inmunogénico. Siendo útiles para evaluar la seroprevalencia de enfermedades infecciosas de manera retrospectiva tras las fases epidémicas iniciales (1-4). 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, pero se insiste en los tiempos desde la exposición (post-infección) o inicio de síntomas, para que el desempeño de la prueba sea adecuado.

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, sin embargo, hay poca información sobre el mantenimiento de los niveles de inmunoglobulinas en el tiempo.

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 quimioluminiscencia para identificar IgG, específica 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 e incluir en la verificación pacientes ambulatorios COVID-19 con síntomas leves y moderados (5). Esta tendencia pudiera ser mejor aprovechada si se tiene en cuenta un adecuado uso de las pruebas serológicas, las cuales deben usarse preferiblemente después 14 días de inicio de síntomas cuando ya se haya dado biológicamente la aparición de los anticuerpos, lo que ayudaría mucho 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 (6).

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 utilidad de la prueba como apoyo diagnóstico mejora en pacientes sintomáticos con más de 14 días de inicio de síntomas y en pacientes con antecedente de hospitalización. No es útil en los pacientes asintomáticos o sintomáticos que tengan 14 días o menos desde el inicio de síntomas o desde el contacto cercano con casos confirmados de SARS CoV2-COVID-19, dado el riesgo de falsos negativos. Se recomienda usar en combinación con pruebas de RT-PCR.
3. Otros escenarios específicos con sus resultados y recomendación respectiva, se encuentran detallados en la tabla 6.

## 6. Referencias

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>

1. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(5):319. Published 2020 May 19. doi:10.3390/diagnostics10050319.
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. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, Adriano A, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Ditttrich S, Emperador D, Hooft L, Leeflang MMG, Van den Bruel A. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020, Issue 6. Art. No.: CD013652. DOI: 10.1002/14651858.CD013652.
5. 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. Instituto Nacional de Salud.

**Gabriela Zabaleta.** Bacterióloga, Micro Ind, MS(c) Epidemiología. Grupo de Microbiología. 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.

**Helly Casallas Cifuentes.** Bacterióloga, Grupo de Nutrición. Subdirección de investigación científica y tecnológica. Instituto Nacional de Salud.

**Andrea Herrera Hernández.** Bacterióloga, Especialista en Hematología y Banco de Sangre. Grupo Banco de Sangre. Subdirección red nacional de trasplantes y bancos de sangre.

## 8. Pruebas realizadas por:

**Helly Casallas Cifuentes.** Bacterióloga, Grupo de Nutrición. Subdirección de investigación científica y tecnológica. Instituto Nacional de Salud.

**Andrea Herrera Hernández.** Bacterióloga, Especialista en Hematología y Banco de Sangre. Grupo Banco de Sangre. Subdirección red nacional de trasplantes y bancos de sangre.