

Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba rápida “Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette Rapid test”

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba “Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette 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 trescientos (300) 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) sesenta y dos (62) 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 por caja de 25 unidades registraron fecha de vencimiento del 25/10/2022, con número de lote DHSZ20200428W1106C y buffer de dilución con misma fecha de vencimiento y con número de lote 20200428W1006. La validación se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud, el día 8 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 seleccionaron 300 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 mezclada y se recolectaron 10 μl de suero con ayuda de una micropipeta (equipo calibrado), adicionando en el pocillo de muestra del dispositivo, e inmediatamente se depositaron 2 gotas de tapón de detección 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 magnético.

2. Análisis de los grupos de estudio para la IgM

De un total de 200 muestras evaluadas con RT-PCR (100 positivas y 100 negativas), 60 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba rápida y 140 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=200	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgM		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	5	95	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	3	97	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	38	14	24	38
Sintomáticos RT-PCR Positivos	62	43	19	62
Total	200	65	235	300

*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 95% (IC95% 90.7 – 99.3%).

De acuerdo con la fecha de inicio de síntomas el grupo de pacientes sintomáticos con RT-PCR positiva (n=62), 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. 43 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 19 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	9	5	14
Más de 11 días de inicio de síntomas	34	14	48
Total	43	19	62

2. Análisis de los grupos de estudio para la IgG

De un total de 200 muestras evaluadas con RT-PCR, 54 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba serológica rápida “**Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette Rapid test**” y 146 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=200	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgG		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	1	99	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	2	98	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	38	7	31	38
Sintomáticos RT-PCR Positivos	62	45	17	62
Total	200	55	245	300

*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=62), 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. 45 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 17 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	5	9	14
Más de 11 días de inicio de síntomas	40	8	48
Total	45	17	62

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

Tabla 5. Resultados de exactitud diagnóstica y concordancia de la prueba serológica rápida "Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette 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	200	57.00%	97.00%	77.00%	19.00	0.44	0.540	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 ni de la exposición es baja .	No es útil
		IgG	200	52.00%	98.00%	75.00%	26.00	0.49	0.500		
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	162	69.35%	97.00%	86.42%	23.12	0.32	0.698	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 moderada para IgM e IgG	Es útil combinada con PCR
		IgG	162	72.58%	98.00%	88.27%	36.29	0.28	0.740		
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días de inicio síntomas)	IgM	114	64.29%	97.00%	92.98%	21.43	0.37	0.653	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 la sensibilidad fue moderada para IgM y muy baja para IgG.	No es útil*
		IgG	114	35.71%	98.00%	90.35%	17.86	0.66	0.429		
Escenario 2.b:	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días de inicio síntomas)	IgM	148	70.83%	97.00%	88.51%	23.61	0.30	0.721	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 capacidad de detectar casos (Sensibilidad) con conocimiento de fecha de inicio de síntomas y superior a 11 días es moderada para para IgM y Alta para IgG.	Es útil combinado con RT-PCR**
		IgG	148	83.33%	98.00%	93.24%	41.67	0.17	0.841		
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	IgM	138	36.84%	97.00%	80.43%	12.28	0.65	0.408	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 capacidad de detectar casos (Sensibilidad) cuando no se tiene claridad sobre la exposición o momento de infección es muy baja .	No es útil
		IgG	138	18.42%	98.00%	76.09%	9.21	0.83	0.215		
Escenario 4	Prueba aplicada a población asintomática y sintomática independiente mente del tiempo de exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	300	57.00%	96.00%	83.00%	14.25	0.45	0.581	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, su capacidad de detectar casos (Sensibilidad) cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es baja .	No es útil
		IgG	300	52.00%	98.50%	83.00%	34.67	0.49	0.569		
Escenario 5	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del tiempo a la exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	262	69.35%	96.00%	89.69%	17.34	0.32	0.696	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 (Sensibilidad) cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es moderada para IgM e IgG.	Es útil combinada con PCR
		IgG	262	72.58%	98.50%	92.37%	48.39	0.28	0.771		
Escenario 5.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	214	64.29%	96.00%	93.93%	16.07	0.37	0.548	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, la sensibilidad fue moderada para IgM y muy baja para IgG.	No es útil
		IgG	214	35.71%	98.50%	94.39%	23.81	0.65	0.427		
Escenario 5.b	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	248	70.83%	96.00%	91.13%	17.71	0.30	0.702	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 sensibilidad de la prueba para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, para IgM moderada y para IgG es alta .	Es útil combinado con RT-PCR**
		IgG	248	83.33%	98.50%	95.56%	55.56	0.17	0.852		
Escenario 6	Prueba aplicada a población asintomática independiente mente del tiempo de exposición (incluyendo sueros históricos)	IgM	238	36.84%	96.00%	86.55%	9.21	0.66	0.396	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando inmunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 no están presentes en suero, sin embargo su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición es muy baja .	No es útil
		IgG	238	18.42%	98.50%	85.71%	12.28	0.83	0.241		
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.									
LR-: Razón de verosimilitud Negativa											

En este informe se presentan los resultados de validez y concordancia (con la RT-PCR) de la prueba serológica rápida **“Cellex qSARS-CoV-2 IgG/IgM Cassette 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 96% en ambos.
2. Sensibilidad moderada para IgM e IgG alcanzando el 70.8% y 83.3% respectivamente, este desempeño se refiere a muestras de población sintomática tomadas por encima de los 11 días de inicio de síntomas (Escenario 2b y 5b).
3. Una sensibilidad baja a muy baja para IgM e IgG, cuando la prueba se usa en la caracterización de pacientes con síntomas leves a moderados y asintomáticos, sin reconocimiento de los días desde la exposición (infección) (Escenario 3 y 6).
4. 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 5b, escenarios de pacientes sintomáticos con más 11 días desde el inicio de la infección.

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 las más frecuente 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, pero se insiste en los tiempos desde la exposición (post-infección) o inicio de síntomas, para que el desempeño de la prueba sea adecuado.

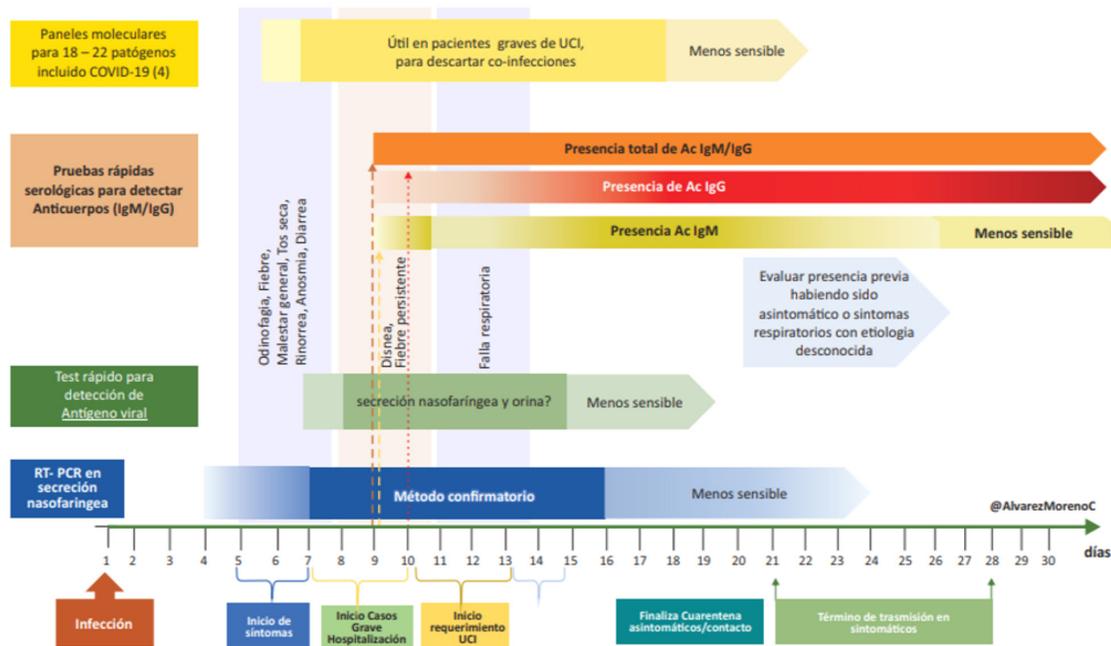
Recientemente se ha publicado en la literatura el comportamiento de la generación de anticuerpos para SARS CoV-2 considerando los datos disponibles hasta hoy (ver figura 1). A partir del mismo, se puede concluir que la presencia total de IgM e IgG en sangre ocurre a partir del día 9 después del inicio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

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 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 11 días de inicio de síntomas. No es útil 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 y sean asintomáticos, 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 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, MS(c) 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 Inmunohematología. Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud-IDCBIS.