

Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba rápida “COVID-19 IgG/IgM Duo”

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia diagnóstica de la prueba “COVID-19 IgG/IgM Duo” 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 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

La prueba serológica inmunocromatográfica rápida “COVID-19 IgG/IgM Duo” está configurada por dos casetes separados, uno para cada inmunoglobulina (IgM e IgG).

Análisis de los grupos de estudio para la IgM

Del un total de 193 muestras evaluadas con RT-PCR, 55 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2, luego de la aplicación de la prueba serológica rápida y 138 muestras fueron clasificadas como negativas, para anticuerpos tipo IgM por esta prueba. 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	4	96	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	6	94	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	9	27	36
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	40	17	57
Total		59	234	293

*Negativo histórico: Sueros de personas tomados entre 2017-2018, para uso de 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 96% (IC95% 92 – 99 %).

De acuerdo a 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. 40 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 17 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	4	5	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	36	12	48
Total	40	17	57

Análisis de los grupos de estudio para la IgG

Del un total de 193 muestras evaluadas con RT-PCR, 49 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 luego de la aplicación de la prueba serológica rápida “COVID-19 IgG/IgM Duo” y 144 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	1	99	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	0	100	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	6	30	36
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	43	14	57
Total		50	243	293

*Negativo histórico: Sueros de personas tomados entre 2017-2018 para uso de 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% 98 – 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. 43 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 14 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	3	6	9
Mas de 11 días de inicio de síntomas	40	8	48
Total	43	14	57

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

Tabla 5. Resultados de exactitud diagnóstica y concordancia de la prueba serológica rápida “COVID-19 IgG/IgM Duo” 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	
Escenario 1	Prueba aplicada a población sintomática y asintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	193	52.7%	94.0%	74.1%	8.8	0.50	0.474	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es baja	No se recomienda
		IgG	193	52,7%	100%	77.20%	-	0.47	0.536		
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	157	70.17%	94.0%	85.35%	11.69	0.31	0.670	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es moderada	Se recomienda su uso combinado con RT-PCR
		IgG	157	75.43%	100%	91.08%	-	0.24	0.796		
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días de inicio síntomas)	IgM	109	44.44%	94.0%	89.90%	7.40	0.59	0.366	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, sin embargo, aún entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en confirmar casos. Sensibilidad muy baja	No se recomienda*
		IgG	109	33.33%	100%	94.49%	-	0.66	0.478		
Escenario 2.b:	Prueba aplicada a población sintomática (mas de 11 días de inicio síntomas)	IgM	148	75.00%	94.0%	87.83%	12.5	0.26	0.713	La prueba es mas sensible y específica para detectar casos y para descartar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, especialmente para el test de IgG. Sensibilidad y especificidad alta	Se recomienda**
		IgG	148	83.33%	100%	94.59%	-	0.16	0.871		
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	IgM	136	25.0%	94.0%	75.76%	4.16	0.79	0.234	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición, momento de infección, es muy baja	No se recomienda
		IgG	136	16.66%	100%	77.94%	-	0.83	0.227		

Escenario 4	Prueba aplicada a población asintomática y sintomática independientemente del tiempo de exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	293	52.68%	95.0%	81.57%	10.53	0.49	0.529	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es baja	No se recomienda
		IgG	293	52.68%	99.5%	84.64%	105.3	0.47	0.596		
Escenario 5	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del tiempo a la exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	257	70.17%	95.0%	89.49%	14.03	0.31	0.682	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es moderada	Se recomienda su uso combinado con RT-PCR
		IgG	257	75.43%	99.5%	94.16%	150.8	0.24	0.816		
Escenario 5.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	209	44.44%	95.0%	92.82%	8.88	0.58	0.312	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, sin embargo, entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en confirmar casos. Sensibilidad muy baja	No se recomienda
		IgG	209	33.33%	99.5%	96.65%	66.66	0.67	0.447		
Escenario 5.b	Prueba aplicada a población sintomática (mas de 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	248	75.00%	95.00%	91.127%	15.00	0.26	0.711	La prueba fue sensible y específica para detectar, confirmar y descartar casos por encima de 11 días de inicio de síntomas especialmente para el test de IgG. Sensibilidad y especificidad alta	Se recomienda
		IgG	248	83.33%	99.5%	96.37%	166.66	0.16	0.877		
Escenario 6:	Prueba aplicada a población asintomática independientemente del tiempo de exposición (incluyendo sueros históricos)	IgM	236	25.00%	95.00%	84.32%	5.00	0.78	0.248	La prueba es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de confirmar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición es muy baja	No se recomienda
		IgG	236	16.66%	99.5%	86.86%	33.33	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											

Discusión

En este estudio se logró demostrar la validez y concordancia diagnóstica de la prueba serológica rápida “COVID-19 IgG/IgM Duo” específicamente en población sintomática siempre y cuando la muestra sea tomada luego de los 11 días de inicio de síntomas, en donde la sensibilidad encontrada en este estudio con sueros de pacientes colombianas, alcanzó el 83 %. El uso de la misma, en pacientes sintomáticos (leve a moderado) y asintomáticos sin reconocimiento de los días desde la exposición (infección), no mostró adecuados resultados, y la sensibilidad fue de baja a muy baja. En todos los casos la prueba demostró una alta especificidad, sin embargo, esta debe ser interpretada adecuadamente en el contexto de circulación o ausencia de anticuerpos en sangre, puesto que, si su toma ocurre antes del periodo de presencia total de IgM o IgG, el riesgo de falsos negativos es elevado. En los sueros de individuos asintomáticos positivos el porcentaje de sensibilidad fue del 25 % para IgM y del 17 % para IgG, mientras que en sintomáticos positivos, dicho porcentaje fue del 75 % para IgM y del 83 % para IgG, después del día 11 posterior a la aparición del síntoma (17 días post-infección)

Es cada vez más frecuente el uso de pruebas serológicas 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 contra antígenos del virus como la nucleoproteína (N) y la proteína S (spike) a partir de la respuesta inmunológica

del individuo, son 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 este estudio, 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.

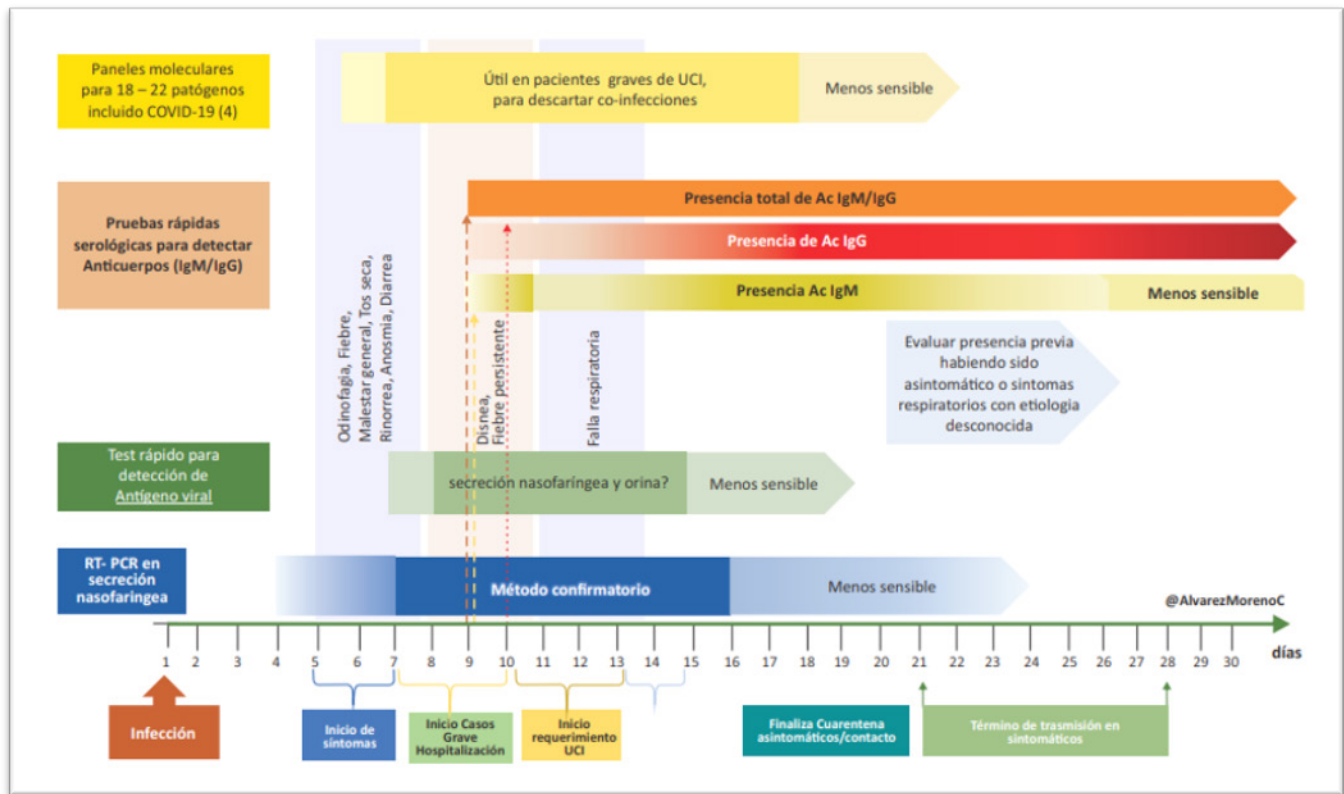
Recientemente se ha publicado en la literatura el comportamiento de la generación de anticuerpos para SARS CoV-2 considerando los datos disponibles hasta hoy (ver figura 1). A partir del mismo, se puede concluir que la presencia total de IgM e IgG en sangre ocurre a partir del día 9 después del inicio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

Aunque un método de análisis 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 sensible y específica en pacientes sintomáticos con 11 o más días después de inicio de los mismos. La concordancia entre métodos diagnósticos IgG e IgM frente a RT-PCR en este escenario fue muy buena, para clasificación de pacientes COVID-19 positivo y negativos especialmente con el test de IgG.
2. No se recomienda el uso de la prueba en los pacientes sintomáticos o asintomáticos que tenga menos de 11 días desde el inicio de síntomas o contacto cercano con casos confirmados de SARS CoV2-COVID 19, dado el alto riesgo de falsos negativos.
3. Otros escenarios específicos con sus resultados y recomendación respectiva, se encuentran 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.

Responsales

Marcela Mercado Reyes. Bacterióloga, MS Epidemiología Clínica. Directora de Investigación en Salud Pública (E) 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.

Gabriela Zabaleta. Bacterióloga, Micro Ind, Candidata a magister en Epidemiología. Grupo de Microbiología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del 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.

Pruebas realizadas por:

Lida Muños 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.