

Laccurate

Validación secundaria y verificación del desempeño de la prueba rápida “SARS-CoV-2 Antibody Test (colloidal gold immunochromatography)”

Se realizó el análisis de exactitud y concordancia de la prueba “SARS-CoV-2 Antibody Test (colloidal gold immunochromatography)” 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 doscientas noventa y tres (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 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 20 unidades registraron fecha de vencimiento del 2021/03/17, con número de lote 20CG2504X. La validación se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Salud, el día 15 de mayo del 2020 por personal capacitado, teniendo en cuenta todas las instrucciones de uso de la prueba registradas en el inserto del kit.

Se seleccionó un vial de trabajo de los 293 sueros a evaluar del biobanco COVIDCOL, los cuales estaban almacenados a -70°C . Posteriormente se descongelaron a temperatura de refrigeración ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) y finalmente se llevaron a temperatura ambiente 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. Se mezcló la muestra 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 diluyente de muestra 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 193 muestras evaluadas con RT-PCR (93 positivas y 100 negativas), 78 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba rápida y 115 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=193	Prueba Serológica Inmunocromatografía para IgM		Total
		Positiva	Negativa	
Negativos históricos*	N/A	16	84	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	11	89	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	17	19	36
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	50	7	57
Total		94	199	293

*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 84% (IC95% 75,4 – 91,4%).

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. 50 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 7 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	5	4	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	45	3	48
Total	50	7	57

3. Análisis de los grupos de estudio para la IgG

De un total de 193 muestras evaluadas con RT-PCR, 75 muestras fueron positivas para SARS-CoV-2 con la prueba serológica rápida “SARS-CoV-2 Antibody Test (colloidal gold immuno-chromatography)” y 118 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	14	86	100
Negativos COVID-19 confirmado con RT-PCR	100	13	87	100
Asintomáticos RT-PCR Positivos	36	15	21	36
Sintomáticos RT-PCR Positivos	57	47	10	57
Total		89	204	293

*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 86% (IC95% 77,7 – 91,6%).

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. 47 muestras fueron clasificadas por la prueba serológica rápida como positivas y 10 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	2	7	9
Más de 11 días de inicio de síntomas	45	3	48
Total	47	10	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 "SARS-CoV-2 Antibody Test (colloidal gold immunochromatography)" 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	193	72.04%	89.0%	80.8%	6.54	0.31	0.614	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es moderada	No es útil
		IgG	193	66.6%	87%	77.2%	5.12	0.38	0.687		
Escenario 2	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del inicio de síntomas o exposición	IgM	157	87.0%	89.0%	88.5%	7.97	0.13	0.756	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, sin embargo su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es alta para la IgM e IgG	Es útil solo combinada con RT-PCR
		IgG	157	82.4%	87%	85.3%	6.34	0.20	0.687		
Escenario 2.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días de inicio síntomas)	IgM	109	55.5%	89.0%	86.2%	5.05	0.49	0.33	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero. Entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en detectar casos. Sensibilidad muy baja para IgM e IgG	No es útil*
		IgG	109	22.2%	87%	81.6%	1.70	0.89	0.071		
Escenario 2.b:	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días de inicio síntomas)	IgM	148	93.75%	89.0%	90%	8.5	0.07	0.79	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero La prueba es más sensible para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, tanto para IgM como para IgG. Sensibilidad alta .	Es útil combinada con RT-PCR**
		IgG	148	93.7%	87%	89.1%	7.2	0.71	0.766		
Escenario 3	Prueba aplicada a población asintomática independiente del tiempo de exposición (post-infección)	IgM	136	47.2%	89.0%	77.9%	4.3	0.6	0.1	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición o momento de infección es baja	No es útil
		IgG	136	41.6%	87%	75%	3.20	0.67	0.31		

Escenarios	Descripción		N	Sen	Esp	Exactitud	LR+	LR-	Kappa	Recomendación	Utilidad para escenario
Escenario 4	Prueba aplicada a población asintomática y sintomática independiente mente del tiempo de exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	293	72.04%	86.5%	81.9%	5.33	0.32	0.58	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas ni de la exposición es moderada	No es útil
		IgG	293	66.6%	86.5%	80.2%	4.93	0.38	0.54		
Escenario 5	Prueba aplicada a población sintomática independientemente del tiempo a la exposición o síntomas (incluyendo sueros históricos)	IgM	257	87.7%	86.5%	86.7%	6.49	0.14	0.66	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre el inicio de síntomas es alta	Es útil combinado con RT-PCR
		IgG	257	87.7%	86.5%	86.7%	6.5	0.14	0.66		
Escenario 5.a	Prueba aplicada a población sintomática (entre 8 y 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	209	55.5%	86.5%	85.2%	4.11	0.51	0.19	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero, adicionalmente entre 8 y 11 días de inicio de síntomas, no fue efectiva en detectar casos. Sensibilidad baja a muy baja	No es útil
		IgG	209	22.2%	86.5%	83.7%	2,64	0.89	0.042		
Escenario 5.b	Prueba aplicada a población sintomática (más de 11 días después de inicio síntomas). (incluyendo sueros históricos)	IgM	248	93.7%	86.5%	87.9%	6.94	0.07	0.674	La prueba no presenta una adecuada especificidad para descartar la presencia de anticuerpos IgM e IgG, cuando estos no están presentes en suero La prueba es más sensible para detectar casos en sintomáticos por encima de 11 días de inicio de síntomas, tanto para IgM como para IgG. Sensibilidad alta .	Es útil***
		IgG	248	93.7%	86.5%	87.5%	6.94	0.07	0.674		
Escenario 6	Prueba aplicada a población asintomática independiente mente del tiempo de exposición (incluyendo sueros históricos)	IgM	236	47.2%	86.5%	80.5%	3.49	0.61	0.31	La prueba no es adecuada para descartar la presencia de anticuerpos, cuando estos no están presentes en suero, y su capacidad de detectar casos cuando no se tiene claridad sobre la exposición es muy baja	No es útil
		IgG	236	41.6%	86.5%	79.6%	3.08	0.67	0.264		
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. ***Su uso en zonas endémicas de arbovirus debe ser considerado, dado la modesta especificidad en este contexto, con un número de falsos positivos cercano al 20%.									
LR-: Razón de verosimilitud Negativa											

En este estudio se logró evaluar la validez y concordancia diagnóstica de la prueba serológica rápida **“SARS-CoV-2 Antibody Test (colloidal gold immnochromatography)”**. La prueba en mención demostró:

1. Sensibilidad del 93,7 % en población sintomática en muestras tomadas por encima de los 11 días de inicio de síntomas.
2. Sensibilidad baja a muy baja en pacientes sintomáticos (leve a moderado) y asintomáticos sin reconocimiento de los días desde la exposición (infección).
3. Especificidad moderada, esta prueba debe ser interpretada cuidadosamente, ya que puede estar generando reacción cruzada con anticuerpos producidos por otro patógeno endémico y en el contexto de una real ausencia de anticuerpos en sangre, un falso positivo podría generar una falsa seguridad de inmunidad y ser blanco de posible infección si no se toman las medidas correspondientes.
4. Sensibilidad del 47.2 % para IgM y del 41.6 % para IgG en los sueros de individuos asintomáticos positivos (por la RT-PCR), mientras que en sintomáticos positivos, dicho porcentaje fue del 87.7 % para IgM y del 82.4 % para IgG, porcentajes que aumentan después del día 11, posterior a la aparición del síntomas.
5. Aunque la concordancia entre observadores obtuvo un Kappa igual a uno, se observó una banda de reacción débil y muy débil en el 21.8% de pruebas IgM positivas, lo cual disminuye el desempeño del método.

4. 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.

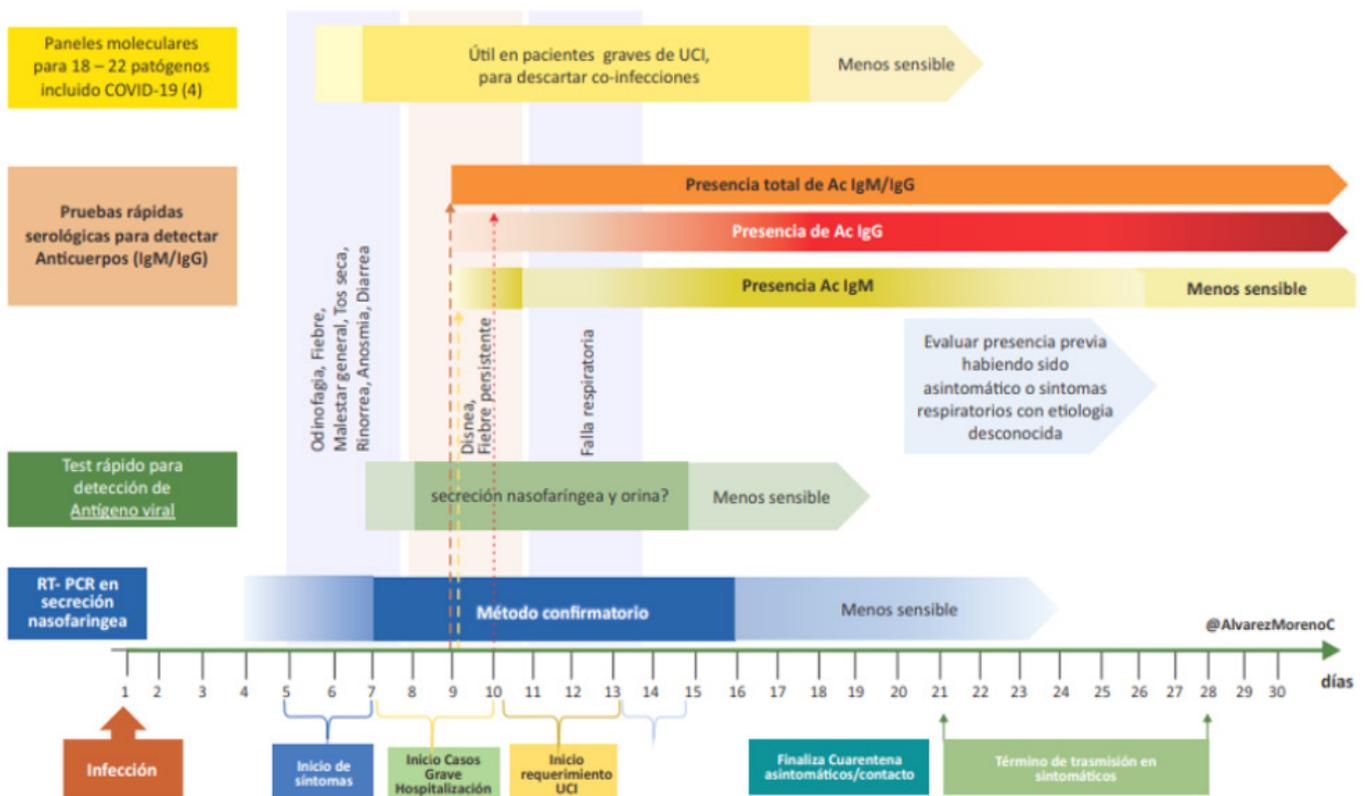
Las pruebas serológicas permiten la identificación de anticuerpos específicos contra antígenos del virus generados a partir de la respuesta inmunológica del individuo. Las proteínas estructurales de nucleocápside (N) y la proteína de espiga (S) son frecuentemente empleadas en estas metodologías por su 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, cuando se conocen los tiempos desde la exposición (post-infección) o inicio de síntomas.

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



5. Conclusiones y recomendaciones

1. La prueba en estudio demostró ser sensible y moderadamente específica en pacientes sintomáticos con más de 11 días después de inicio de los mismos. La concordancia entre esta prueba serológica rápida IgG e IgM con la RT-PCR en este escenario fue moderada para clasificación de pacientes COVID-19 positivos y negativos tanto para IgM como para IgG.
2. No se recomienda el uso de la prueba 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, dado el alto riesgo de falsos negativos.
3. No se recomienda el uso de la prueba en los pacientes asintomáticos o sintomáticos que se ubiquen en zonas endémicas, dado el importante número de falsos positivos, que puede deberse a reacción cruzada con otros anticuerpos.
4. Otros escenarios específicos con sus resultados y recomendación respectiva, se encuentran detallados en la tabla 5.

6. 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.

7. 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, Candidata a magister en Epidemiología. Grupo de Microbiología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica del 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.

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.