

Un acercamiento a las pruebas rápidas para la determinación de antígenos de SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo

An approach to rapid SARS-COV-2 antigen determination test in nasopharyngeal swab specimens

Francisco Rodríguez Amador¹, Marvin Roberto Durán Delgado¹

¹Laboratorio clínico, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica

Correspondencia: marvin2640@hotmail.com

Recibido: 22/12/2020; aceptado para publicación: 24/05/2021

Resumen

El virus SARS-CoV-2 ha causado una pandemia que ha tenido importantes consecuencias en el ámbito de salud, en lo económico y en lo social. La estrategia de los sistemas de salud para amortiguar su impacto se basa en captar los casos de manera oportuna para indicar aislamiento, estudio de contactos y seguimiento de la evolución clínica a los sujetos que han contraído la enfermedad para mitigar la dispersión del virus y ofrecer atención oportuna a quien la requiera. Desde diciembre de 2019, se describió una técnica de RT-PCR capaz de detectar el ARN viral y confirmar la infección con una alta sensibilidad y especificidad. Para los propósitos de diagnóstico, toma de decisiones y vigilancia epidemiológica, las técnicas moleculares tienen la desventaja de que requieren de laboratorios y personal especializados y tienen un alto costo. Como alternativa se ha propuesto la determinación del antígeno del virus SARS-CoV-2 que se basa en una técnica de inmunocromatografía de flujo lateral y arroja resultados en pocos minutos; esta técnica no requiere laboratorios ni personal altamente especializados para su ejecución, pero se sabe que su sensibilidad es menor respecto a la RT-PCR dado que no realiza ningún tipo de amplificación del material a detectar. Esta investigación pretende abordar el estado de la cuestión de los métodos basados en inmunocromatografía de flujo lateral desde su fundamento hasta los principales estudios que han valorado su desempeño analítico a nivel global.

Palabras clave

Pruebas rápidas de diagnóstico, COVID-19, antígenos SARS-COV-2

Abstract

The SARS-CoV-2 virus has caused a pandemic with important consequences in health, economic and social fields. The health system strategy to face the impact is based on capturing cases in an early manner, aimed to set isolation, study the contacts and follow-up of the clinical evolution of sick subjects to mitigate the spread of the virus, and offer proper care to those who require it. Since December 2019, an RT-PCR technique capable of detecting viral RNA and confirming infection with high sensitivity and specificity has been described. For the

purposes of diagnosis, decision making, and epidemiological surveillance, molecular techniques require laboratories and specialized staff which means a high cost. As an alternative it has been proposed to determine the antigen of the SARS-CoV-2 virus that by a lateral flow immunochromatography technique which yields results in a few minutes. This technique does not require laboratories or highly specialized staff to perform it; but, it is known that its sensitivity is lower than RT-PCR, since it does not perform any amplification of the material to be detected. This research aims to address the state of the art of lateral flow immunochromatography-based methods from its foundation to the main studies that have assessed its analytical performance at a global level.

Keywords

Rapid diagnostic test, COVID-19, antigen SARS-COV-2

Introducción

Los coronavirus son una familia de virus con genoma de ARN monocatenario; son virus zoonóticos que, previo al 2019, se habían caracterizado en seis agentes que causaban patología en humanos, de los cuales SARS-CoV-1, en 2002, y MERS-CoV, en 2012, causaron brotes importantes que cursaron con enfermedad grave con mortalidades mayores al 9 y 30%, respectivamente (1). En diciembre del 2019, se registró en Wuhan, China, una serie de casos de neumonía atípica de etiología desconocida; posteriormente, se aisló e identificó un virus emergente de esta familia que se denominó SARS-CoV-2 (por sus siglas en inglés, *Severe Acute Syndrome Coronavirus 2*) y se describió una técnica de reacción en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR) como prueba de elección para evidenciar la presencia del virus en muestras del tracto respiratorio (2).

La enfermedad causada por SARS-CoV-2 se denomina COVID-19. Esta enfermedad se caracteriza por la existencia de tres etapas: fase virológica, fase pulmonar y fase inflamatoria (3). Los sujetos en los cuales la enfermedad progresa desde la fase virológica hasta la fase inflamatoria suelen presentar complicaciones severas como coagulopatía sistémica, síndrome de distrés respiratorio, fallo multiorgánico e incluso la muerte. Para principios de diciembre del

2020, se registran alrededor de 64 millones de casos con cerca de 1.5 millones de fallecidos, lo que representa una mortalidad aproximada del 2.3% a nivel mundial (4). Actualmente, la estrategia global para el manejo de la pandemia se basa en la identificación temprana de casos, el distanciamiento social y la vacunación; para lograr este objetivo, las herramientas de laboratorio son de vital importancia.

Herramientas para el diagnóstico de la COVID-19 basado en laboratorio

El objetivo del diagnóstico basado en el laboratorio es contribuir al manejo y contención de la pandemia. Uno de los pilares fundamentales de la contención de la pandemia es la detección oportuna de sujetos infectados por SARS-CoV-2 para apoyar decisiones clínicas como seguimiento, aislamiento y estudio de contactos (5). La figura 1 resume los tres principales tipos de pruebas de laboratorio; se indica su fundamento y su principal diana molecular.

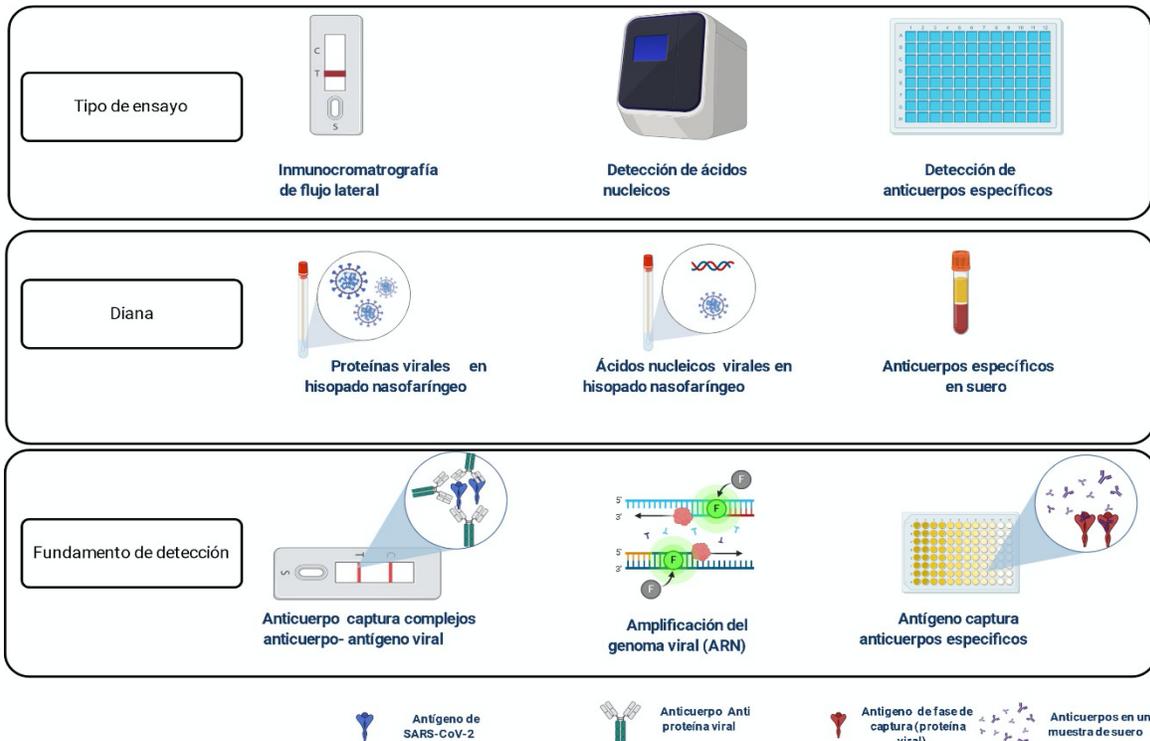


Figura 1. Herramientas de laboratorio para el diagnóstico de COVID-19. Los métodos de detección directa del virus SARS-CoV-2 incluyen la detección de proteínas virales y la detección de ácidos

nucleicos; esta última tiene la ventaja de que la diana molecular se amplifica facilitando la detección aún de pequeñas cantidades. Los anticuerpos por su lado evidencian de manera indirecta la exposición de los sujetos al virus, pero no discriminan entre una exposición pasada o reciente.

Actualmente, el principal pilar del diagnóstico de la infección activa por SARS-CoV-2 es la RT-PCR; esta es la única técnica con evidencia de poseer suficiente especificidad y sensibilidad para discriminar entre sujetos sanos y sujetos infectados (6). Su probabilidad de detección máxima es durante la primera semana de evolución y decae durante la segunda y tercera semana posterior a la infección (7). Como limitantes se tiene que su ejecución requiere de laboratorios y personal altamente especializados. Las técnicas moleculares tienen un alto costo y actualmente la capacidad de proceso está al límite por la gran demanda del servicio.

Por otro lado, la detección de antígeno de SARS-CoV-2 para el diagnóstico de la COVID-19 (SARS-CoV-2 Ag-RDT) tiene potencial para detectar enfermedad activa y se podría emplear como primera opción en el abordaje rápido de los pacientes sospechosos de COVID-19, siempre y cuando se cuente con un respaldo para la detección del virus por RT-PCR en el caso de las muestras negativas ya que estas pruebas suelen tener una sensibilidad baja que compromete principalmente la captación de sujetos infectados con una baja carga viral (8); por otro lado, las muestras positivas no requieren una confirmación por biología molecular ya que la especificidad de la detección de antígenos suele ser muy buena (9). El SARS-CoV-2 Ag-RDT es una prueba diseñada para arrojar resultados en menos de 30 minutos, tiene un menor costo respecto a las pruebas moleculares y permitiría descentralizar el proceso, y de esta forma aliviar la presión de los laboratorios especializados, lo que permite la regionalización del diagnóstico.

Finalmente, se tiene la determinación de anticuerpos; esta prueba indica exposición al virus

con una limitada capacidad de discriminar una infección activa de una infección pasada. Su probabilidad de detección es baja durante la primera semana y aumenta durante la segunda y tercera semana hasta alcanzar una sensibilidad que puede rondar entre el 80 y 95% (10,11). La figura 2 resume el impacto de la historia natural del virus en la sensibilidad de las distintas pruebas.

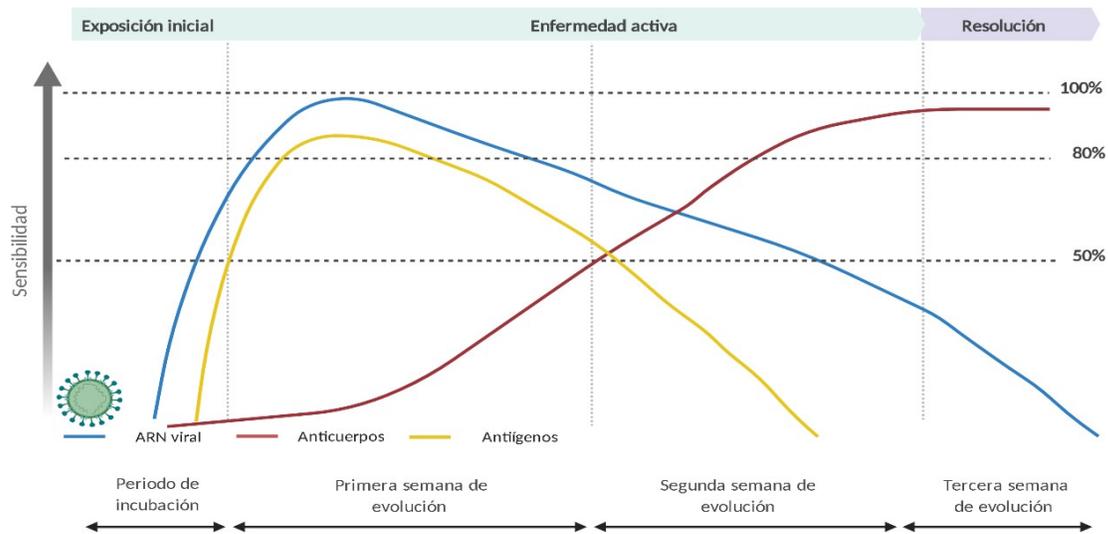


Figura 2. Impacto de la historia natural del virus en la sensibilidad de las distintas pruebas diagnósticas para determinar la infección por SARS-CoV-2. Durante la enfermedad activa, la RT-PCR tiene la mayor probabilidad de detectar el virus, se mantiene razonablemente alta durante la segunda semana y a la tercera semana decae. La prueba de detección de antígenos del SARS-CoV-2 tiene buena probabilidad de detectar el virus durante la primera semana, especialmente en los primeros cinco días donde se supone que la carga viral es mayor. La probabilidad cae al final de la primera semana alcanzando sensibilidades inaceptables durante la segunda semana. La probabilidad de detectar anticuerpos aumenta desde mediados de la primera semana de evolución y alcanza su nivel máximo hacia el final de la segunda semana.

Detección de antígeno de SARS-CoV-2

Las pruebas de SARS-CoV-2 Ag-RDT se enfocan en la detección de las proteínas virales en secreciones respiratorias. Estas proteínas se producen de manera activa durante la primera semana de evolución y conforme la respuesta inmune del hospedero controla la replicación viral la cantidad de proteínas producida disminuye. Se sabe que el virión del SARS-CoV-2 está compuesto de varias proteínas principales; la nucleocápside (N) y la espícula (S) son las

más importantes (12). También se sabe que la proteína N es la más abundante y por ello ha sido la preferida por los fabricantes como diana diagnóstica (13).

La figura 3 resume el procedimiento para detectar las proteínas en secreciones respiratorias. En primer lugar, se debe recolectar una muestra de células de la nasofaringe mediante un hisopado nasofaríngeo. La muestra colectada es sometida inmediatamente a una lisis donde se liberan los viriones de las células, el buffer empleado adicionalmente inactiva rápidamente las partículas virales exponiendo las proteínas y ácidos nucleicos virales, seguidamente se colocan unas gotas del lisado sobre la ventanilla de aplicación de muestra y se espera entre 15 a 30 minutos. Para lograr la detección de las proteínas virales, el fabricante fija un anticuerpo conjugado (anticuerpo anti-anticuerpo anti-SARS-CoV-2) en la fase de captura de una placa de inmunocromatografía de flujo lateral con especificidad por el complejo antígeno-anticuerpo anti-SARS-CoV-2.

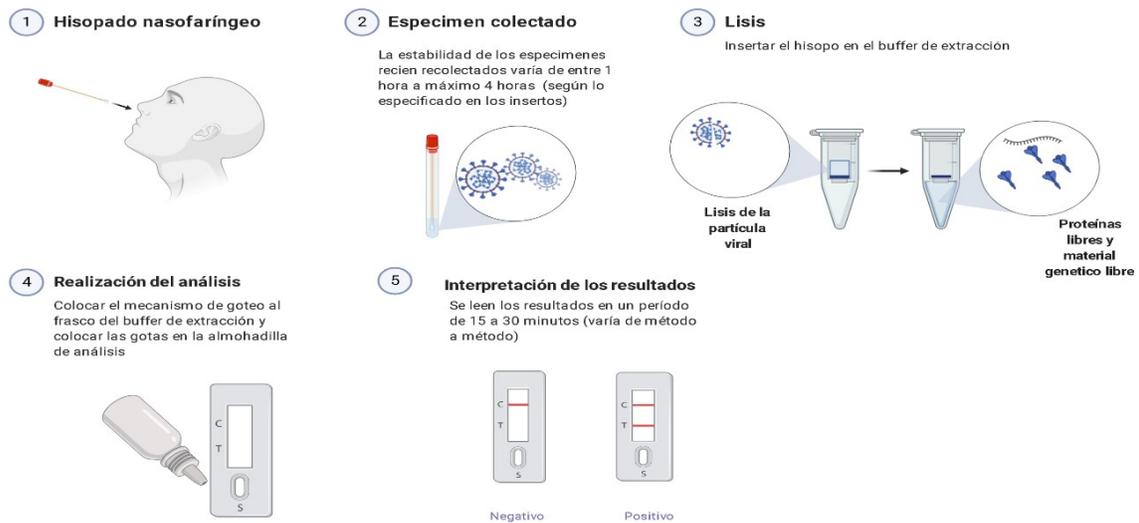


Figura 3. Procedimiento estándar para la detección de antígenos del SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo

La aplicación de estas pruebas rápidas ha ganado relevancia en el marco de la poca

accesibilidad a los recursos necesarios para ejecutar la técnica de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) al ritmo que demanda el desarrollo de la pandemia (14), de modo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promocionado la inclusión de esta herramienta ya que es más económica, sencilla de ejecutar y que provee resultados más rápidos (13). La guía provisional de la OMS ha establecido varios requisitos técnicos mínimos que se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resumen de algunos requisitos técnicos de la OMS para la aprobación de una prueba de SARS-CoV-2 Ag-RDT (13)

Característica	Requisito técnico
Uso esperado	En áreas donde se haya confirmado la transmisión comunitaria o el desarrollo de brotes de SARS-CoV-2 donde los ensayos moleculares no están disponibles o los servicios están al límite de su capacidad
Población diana	Pacientes que cumplan la definición de caso sospechoso de COVID-19
Muestra	Hisopado nasofaríngeo (recomendado), hisopado orofaríngeo, hisopado nasal
Sensibilidad	80% o más, basado en el análisis de 100 positivos
Especificidad	99% o más, basado en el análisis de 400 negativos que preferiblemente incluya especímenes positivos por otros patógenos respiratorios

La preocupación más prevalente en la comunidad científica es el tema de la sensibilidad. La capacidad de la prueba de detectar las proteínas virales depende de muchos factores y el riesgo de falsos negativos es de considerable magnitud. El factor más importante a considerar es la carga viral (15).

Las pruebas de SARS-CoV-2 Ag-RDT están diseñadas para detectar sujetos con cargas virales altas mayores a 10^6 copias/ml o bien al emplear un indicador de carga viral como el umbral de ciclo (Ct, por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*). Se considera alta carga viral en casos

donde este es mayor a 25 (13). Esta limitante existe principalmente debido a que esta prueba no amplifica la diana molecular que detecta. La carga viral es máxima durante los primeros 5 a 7 días de evolución y luego comienza a disminuir paulatinamente; esto varía según el tipo de muestra (16), por lo tanto, definir los días de evolución previo a la aplicación de la prueba es un factor importante para predecir su éxito. Otra situación que puede comprometer la carga viral es la calidad de la muestra, se requiere que las muestras de hisopado nasofaríngeo contengan una buena cantidad de células para que sea más probable la detección viral.

Un factor adicional que puede comprometer la sensibilidad es la estabilidad de las muestras recolectadas. Cada kit de detección de antígeno trae su propio hisopo y la recomendación inicial del fabricante es tomar el hisopo y montar de manera inmediata la prueba con el espécimen fresco. En el caso de los fabricantes de la prueba STANDARD Q SARS-CoV-2 Ag y Panbio-ABBOTT SARS-CoV-2 Ag, se indican tiempos de estabilidad máxima que varían entre las dos horas y las cuatro horas a partir de los especímenes frescos. Una alternativa que los fabricantes están explorando es colocar las muestras en medio de transporte viral, pero la estabilidad máxima que se logra es de 12 horas en refrigeración (17, 18). Sobre esta limitante de la estabilidad del antígeno, una posibilidad es que las proteínas se desnaturalicen con rapidez perdiendo su conformación tridimensional, de modo que si los anticuerpos detectan epítomos conformacionales estos ya no van a estar presentes. Algunos grupos han descrito que la proteína de la nucleocápside de los coronavirus tiene muchos epítomos conformacionales y muchos de los anticuerpos tienen especificidades dirigidas contra estos epítomos (19).

Datos actuales sobre el desempeño analítico de las pruebas de detección de antígeno de SARS-CoV-2

La Fundación para la Innovación en el Diagnóstico (FIND, por sus siglas en inglés) publicó

varios resultados de estudios independientes efectuados por distintos grupos a nivel mundial, realizados con el objetivo evaluar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de SARS-CoV-2 Ag-RDT. Para ello, se reclutaron individuos sintomáticos a los cuales se les tomó dos muestras de hisopado nasofaríngeo; el primer hisopado era para efectuar la prueba de RT-PCR y el segundo hisopado para la prueba SARS-CoV-2 Ag-RDT, de modo que la técnica molecular se emplea como estándar de referencia para establecer las características analíticas de la prueba de detección de proteínas virales (20). El cuadro 2 resume los principales hallazgos de estas pruebas para las dos principales metodologías del mercado.

Cuadro 2. Resumen de los principales resultados de las evaluaciones efectuadas por FIND para las pruebas comerciales de SARS-CoV-2 Ag-RDT

	Panbio™ ABBOTT SARS-CoV-2 Ag	STANDARD Q SD- Biosensor SARS-CoV- 2 Ag	STANDARD Q SD- Biosensor SARS-CoV-2 Ag	STANDARD Q SD- Biosensor SARS-CoV- 2 Ag
País	Suiza	Brasil	Alemania	Suiza
Sensibilidad (≤ 7 días de evolución)	85.6% (n=111)	90.7% (n=97)	80% (n=35)	89.8% (n=176)
Especificidad	100% (n=411)	97.6% (n=294)	99.3% (n=1212)	99.7% (n=398)

Como se puede apreciar, ambas pruebas han cumplido satisfactoriamente los requisitos técnicos de sensibilidad resumidos en el cuadro 1, con una sensibilidad superior al 80%. La especificidad también tuvo un rendimiento adecuado, aunque en el estudio brasileño se tuvo una especificidad menor a la indicada por la OMS. Es importante notar que en el diseño de estos estudios se realizaron los análisis bajo dos condiciones vitales, que buscan aumentar la probabilidad de éxito de la prueba: se aplicaron en población sintomática y con siete o menos días de evolución.

Lineamiento nacional e interpretación de los resultados

A inicios de diciembre del 2020, nuestro país se preparó para la implementación de esta prueba a nivel nacional a través de un plan coordinado de varias etapas. El objetivo principal era aumentar la capacidad de diagnosticar los casos activos de COVID-19 de forma rápida en toda el área de cobertura de la Caja Costarricense del Seguro Social. Otro de los objetivos es descentralizar el diagnóstico, ya que a diferencia de la RT-PCR esta prueba se puede aplicar en todos los laboratorios de la institución. Al respecto, el Ministerio de Salud Pública desarrolló un lineamiento técnico, documento **LS-SS-012 Lineamientos generales para el uso de pruebas de antígeno para diagnóstico de COVID**, que sirve de guía para la interpretación de los resultados. En este lineamiento se indica que los resultados negativos no descartan el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 y deben ser remitidos a RT-PCR para su confirmación mientras que los resultados positivos confirman el diagnóstico (21).

Conclusiones y perspectivas

La detección de antígeno de SARS-CoV-2 tiene potencial para detectar y diagnosticar COVID-19 en su fase activa. Mediante el diseño de una estrategia adecuada en tiempo y forma se puede garantizar el éxito del empleo de esta prueba a nivel nacional. Si se sabe que los principales factores que limitan la prueba se relacionan con la carga viral, su uso debe restringirse únicamente a sujetos sintomáticos, que consulten entre el primer y quinto día de evolución y su aplicación se debe realizar siguiendo de forma estricta las recomendaciones del fabricante, en establecimientos de la red de servicios de salud de la CCSS.

Si los resultados se comunican a los pacientes de manera pronta y expedita, la implementación de esta prueba puede llegar a tener un impacto positivo en el manejo de la pandemia actual. Al informar oportunamente a los sujetos sobre su diagnóstico, estos se pueden poner en

autoaislamiento y comunicarles a sus contactos cercanos que deben acudir a un centro médico a realizarse el chequeo respectivo. Del mismo modo, el personal de salud puede iniciar el seguimiento del sujeto recién diagnosticado y determinar el nivel de riesgo del sujeto a desarrollar formas complicadas de la COVID-19, permitiendo realizar un manejo oportuno de los casos con las herramientas disponibles.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no presentan conflictos de interés.

Figuras

Todas las figuras de este artículo son originales y fueron generadas con el software Biorender.

Referencias

1. Petrosillo N, Viceconte G, Ergonul O, Ippolito G, Petersen E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(6), 729-734. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.026
2. Zhu N, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 382 (8), 727–733.
3. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J. Hear. Lung Transplant.* 2020; 39(5), 405–407.
4. Johns Hopkins University & Medicine. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. *Johns Hopkins Coronavirus Resource Center* 1. 2020. Disponible en: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. (Accessed: 1st December 2020)
5. The Organization for Economic Cooperation and Development. Flattening the covid-19 peak: Containment and mitigation policies Flattening the COVID-19 peak: Containment and mitigation policies. 2020; 1-27. Disponible en: https://read.oecd-ilibrary.org/view/?ref=124_124999-yt5ggxirhc&title=Flattening_the_COVID-19_peak-Containment_and_mitigation_policies. (Accessed: 1st December 2020)
6. Stegeman I, et al. Routine laboratory testing to determine if a patient has COVID- 19. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020. doi:10.1002/14651858.CD013787
7. Yang Y, et al. Laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019- nCoV infections. *The Innovation.* 2020;1(3), 2–6.
8. Mak GC, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS CoV-2 virus. *J. Clin. Virol.* 2020. 129 (104500), 1-4.
9. Corman VM, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid Point-of-Care Antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *The Lancet Microbe.* 2021;5247(21): 1–9. doi:10.1101/2020.11.12.20230292

10. Zhao J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(16), 2027-2034doi:10.1093/cid/ciaa344
11. Whitman JD, et al. Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.* 2020; 38(10), 1174–118.
12. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(3), 181–192.
13. World health organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays Interim guidance, 11 September 2020. *World Health Organization* (2020). Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>.
14. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking Covid-19 Test Sensitivity — A Strategy for Containment. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(22). doi:10.1056/nejmp2025631
15. Dinnes J. et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020.
16. World health organization. WHO Emergency use assessment Coronavirus disease (COVID-19) IVDs public report STANDARD Q COVID-19 Ag. 2020. Disponible en: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual/eul_0563_117_00_standard_q_covid19_ag_ifu.pdf. (Accesado: 2 de diciembre de 2020)
17. World Health Organization. WHO Emergency use assessment Coronavirus disease (COVID-19) IVDs public report Panbio ABBOTT COVID-19 Ag. 2020. Disponible en: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual/eul_0564_032_00_panbi_covid19_ag_rapid_test_device.pdf. (Accessed: 2nd December 2020)
18. Liang Y, et al. Comprehensive antibody epitope mapping of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: Insight into the humoral immunity of SARS. *Clin. Chem.* 2005. 51(8), 1382–1396.
19. FIND. FIND evaluation of SARS-COV-2 antigen (Ag) detecting tests. 2020. Disponible en: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-antigen/>.
20. Ministerio de Salud de Costa Rica. LS-SS-012. Lineamientos generales para el uso de pruebas de antígeno para diagnóstico de COVID-19. 2020. Disponible en: https://www.ministeriodesalud.go.cr/sobre_ministerio/prensa/docs/ls_ss_012_lineamientos_generales_uso_pruebas_antigenos_28092020.pdf.