Articulo Original

Estudio comparativo de diferentes metodologías diagnosticas para detección de Síndrome Respiratorio Agudo por Coronavirus 2 (SARS-COV-2)

Evaluation of different diagnostic tests for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-COV-2)

Zaffanella, Belén [1]; Psenda, Laura [1]; Spina, Julieta [1]; Tacchella, María Eugenia [1]; Fuenzalida, Sabrina [1,2]; Juez, Karina [1]; Cuccaro, Clara [1]; Schneider, Viviana [1]; Moller, Alejandra [1]; Gentile, Luciano [1,2]; Weis, María del Carmen [1,2]; Diamanti, Mariana [1,2]; Draghi, Virginia [1,2]; Grand, Marina [1,2]; Mondini, Silvina [1,2]; Caputo, German Augusto [1]; Waimann, Christian Alfredo [1,22]

Palabras claves:
-SARS-COV-2
-COVID-19
-Diagnostico
-Reacción cadena polimerasa
-Test de antígeno rápido
-Amplificación isotérmica

Instituciones:
[1] Hospital Dr. Héctor Cura
[2] UNCPBA – Facultad de Ciencias de la Salud
Contacto del autor:
Belén Zafanella
Email:Belen.zaffanella@olavarria.gov.ar

Conflictos de interés: los autores declaran que no existe conflicto de interés.

RESUMEN

Introducción: la aparición del Síndrome Respiratorio Agudo por Coronavirus 2 (SARS-COV-2), y su expansión mundial, represento un desafío para el rápido desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas.
Objetivo: comparar la sensibilidad y especificidad de test rápido inmunocromatográfico para detección de Antígeno, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y Reacción de Cadena Polimerasa en tiempo real (RT-PCR), para el diagnóstico de COVID-19.
Material y métodos: se incluyeron pacientes consecutivos ambulatorios con síntomas compatibles con COVID-19, con 1 a 5 días de evolución de los síntomas. Se comparó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y razones de verosimilitud (likelihood ratio) positivo y negativo de NEOKIT-TECNOAMI COVID-19 y PANBIO™ COVID-19 Ag Rapid Test Device utilizando como estándar de oro detección por reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT- PCR). Se calculó el desempeño global de los test diagnósticos y estratificado por valores de corte de umbral de ciclo (Ct) de >25, >30, >33.
Resultados: se incluyeron un total de 101 pacientes. Las tres pruebas tuvieron una concordancia del 89%, presentando el NeoKit y Test de Antígeno una especificidad del 100%. Estos últimos presentaron una sensibilidad de 86% y 69% respectivamente. Utilizando distintos puntos de corte de Ct, la sensibilidad del Test de Antígeno se incrementó a 93% y 86% para Ct >30 y >33, respectivamente.
Conclusión: el estándar de oro para el diagnóstico de SARS-CoV-2 continúa siendo la PCR en tiempo real, sin embargo, la detección de test de antígeno y test de PCR mediante amplificación molecular isotérmica, representan opciones válidas y confiables, especialmente cuando la tecnología RT- PCR no está disponible.

Keywords:
-SARS-COV-2
-COVID-19
-Diagnosis
-Real Time Polymerase Chain Reaction
-Antigen Rapid Test
-Isothermal amplification

ABSTRACT

Introduction: The emergence and worlwide spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-COV-2) have been represented a great diagnostic challenge.
Objectives: To compare sensitivity and specificity of Antigen Rapid Test, Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), for diagnosis of SARS-COV-2.
Material and methods: We included consecutive patients with 1 to 5 days of COVID-19 symptoms. We calculate sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative predictive values and likelihood ratios for NEOKIT-TECNOAMI COVID-19 and PANBIO™ COVID-19 Ag Rapid Test Device, compared to RT- PCR. Several cut-off of cycle threshold (Ct) were evaluated >25, >30, >33.
Results: 101 patients were included. The 3 test had a concordance of 89%, with an Sp=100% for NEOKIT and Rapid Antigen Test. Sensitivity were 86% and 69%, respectively. Rapid Test Antigen sensitivity improve to 93% and 86% using a cut-off Ct of >25 and >30, respectively.
Conclusion: RT-PCR is the gold standard for SARS-COV-2 diagnosis. Rapid Antigen Test and isothermal amplification are valid options, especially when RT-PCR is not available.

INTRODUCCION

La aparición del SARS-COV-2, y su expansión mundial, represento un desafío para el rápido desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas. Estas técnicas surgieron en el mercado en forma secuencial, encontrándose actualmente diferentes opciones disponibles [1-4]. El estándar de oro para el diagnóstico de SARS-CoV-2 continúa siendo la PCR en tiempo real [5]. Sin embargo, la logística y tecnología necesaria y el tiempo de procesamiento, dificulta su uso masivo en la población. Esto se suma a que la detección de RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, no brinda conclusiones definitivas acerca de la contagiosidad de pacientes y momento temporal de la infección, siendo una aproximación a esta cuestión la cuantificación de umbral del ciclo (Ct) [6]. Diversos estudios encontraron una asociación entre carga viral y aumento del riesgo de transmisión viral, lo que refleja la importancia de priorizar el seguimiento de pacientes con Ct bajo (alta carga viral), que representarían a los pacientes con mayor probabilidad de generar casos secundarios [6,7].

Es así como surge la necesidad, de una prueba simple y rápida, priorizando la rápida detección de pacientes que puedan propagar la enfermedad.

El desarrollo pruebas de antígeno ofrecen la oportunidad de implementación de centros de testeos ambulatorios, con acceso a test diagnósticos rapidos y un mínimo equipamiento tecnológico [8].

Otra opción a la prueba de antígeno, es la detección SARS-CoV-2 mediante amplificación molecular isotérmica. Esta técnica si bien requiere instalaciones de bioseguridad y extracción de material similares a RT-PCR, no requiere la complejidad en aparatología para la realización de esta, reduciendo costos y aumentando la accesibilidad a los mismos [9].

En base a lo mencionado nos proponemos como objetivo comparar la sensibilidad y especificidad de test rápido inmunocromatográfico para detección de Antígeno, NeoKit (amplificación isotérmica) y RT-PCR en tiempo real, para el diagnóstico de COVID-19 en pacientes ambulatorios con síntomas de reciente aparición, que acuden espontáneamente al centro de testeo hospitalario. Este estudio nos permitirá comparar y validar estas nuevas técnicas para el diagnóstico de COVID-19, ayudando a una adecuada toma de decisiones y utilización de las mismas.

MATERIAL Y METODOS:

Selección de la muestra

La muestra se tomó por conveniencia, incluyendo pacientes consecutivos que concurrían espontáneamente al centro de hisopado para SARS-COV-2 del hospital municipal "Dr. Héctor Cura" de la ciudad de Olavarría, entre los meses de noviembre y diciembre de 2020. Los criterios de inclusión fueron: a) Paciente con síntomas compatibles con COVID-19 (tos, falta de olfato/ gusto, fiebre >=37.5, dolor de garganta, falta de aire, diarrea, mialgia y/o cefalea.); b) Comienzo de los síntomas entre el 1° y 5° día previo a la fecha de toma de muestra; c) Consentir en forma oral la participación en el estudio; d) Edad mayor o igual a 18 años.

Los pacientes que asentían a participar se le realizó la toma muestra en forma secuencial:

- 1° muestra: hisopado nasofaríngeo de una sola fosa nasal para diagnóstico por test rápido de Antígeno, tubo delgado con medio de transporte del kit.
- 2° muestra: hisopado combinado de fauces más las dos fosas nasales para PCR, tubo grande con solución fisiológica.

Se utilizaron y compararon tres métodos diagnósticos:

- DisCoVery SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Kit Rox: El kit fue diseñado para detección de ARN de SARS-COV-2, utilizando tecnología de PCR en tiempo real, utilizando como antígenos a las regiones ORF1ab y gen N. El valor de corte de Ct determinado como positivo fue ≤38. Para la amplificación y detección se utilizó el equipo m2000 de Abbott.

En todas las muestras se amplificó el control interno [10].

- NEOKIT-TECNOAMI COVID-19: Este método de detección de COVID-19 se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), lo cual incluye retro transcripción del genoma del SARS-COV-2 (ARN) seguida de una amplificación molecular especifica de cuatro fragmentos del ADN resultante, a partir del ARN aislado de la muestra de hisopado nasofaríngeo. La síntesis de un ADNc (retro transcripción) seguida de amplificación específica del fragmento (amplificación molecular isotérmica) ocurren a temperatura constante (64ºC), en un único paso operativo. El resultado se revela a través de un simple cambio de color. En la mezcla de reacción se encuentra presente el Azul de hidroxinaftol, un colorante indicador que vira de color violeta a color azul cuando la reacción de amplificación positiva. Dicho viraje, se debe al cambio de concentración de Mg2+ libre en solución conforme disminuyeron los dNTPs y aumenta el pirofosfato producto de la polimerización. El kit cuenta con cuatro juegos de genes cebadores (genes ORF 1Aa y 1Ab, E y N) que presentan 100% de homología con la secuencia de los genomas evaluados de SARS-COV-2 [9].
- PANBIO™ COVID-19 Ag rapid test device (Abbott): prueba rápida de diagnóstico in vitro para la detección cualitativa del antígeno de SARS CoV-2 en muestras de hisopados nasofaríngeos. Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device contiene una tira de membrana, que está pre-revestido con anticuerpo anti-SARS-CoV-2 inmovilizado en la línea de prueba e IgY anti-pollo monoclonal de ratón en la línea de control. Dos tipos de conjugados (IgG humana específica para el conjugado de oro de SARS-CoV-2 Ag y el conjugado de oro de IgY de pollo) se desplazan hacia arriba en la membrana cromatográficamente y reaccionan con el anticuerpo anti-SARS-CoV-2 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgY de pollo pre-revestido respectivamente. Para obtener un resultado positivo, la IgG humana específica para el conjugado de oro SARS-CoV-2 Ag y el anticuerpo anti-SARS-CoV-2 formarán una línea de prueba en la ventana de resultados. Ni la línea de prueba, ni la línea de control son visibles en la ventana de resultados antes de aplicar la muestra del paciente. Se requiere una línea de control visible para indicar que el resultado de una prueba es válido [8].

Para la extracción del RNA viral a utilizarse en la amplificación molecular en los dos primeros métodos diagnósticos, se utilizaron las columnas de extracción GENEAID.

Análisis estadístico:

Se realizó estadística descriptiva analizando característica de la muestra. Se comparó la precisión diagnóstica de test de antígeno y Neokit, versus RT-PCR. Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y razones de verosimilitud (likelihood ratio) positivo y negativo, para la totalidad de la muestra y estratificando por el valor del umbral de ciclo (Ct), definido por el menor valor de los dos genes analizados (ORF y N). Se establecieron los valores de corte de Ct reportados en la literatura como umbral de contagiosidad: >25, >30, >33. Por último, se realizó un análisis de múltiples escenarios evaluando falsos negativos, de acuerdo con la prevalencia estimada en la población.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 101 pacientes, el 51% sexo masculino y una media de edad de 38 ± 15 años. En la tabla 1, se detallan los resultados para las tres pruebas diagnósticas. Un 36% de los pacientes fueron positivos para RT-PCR. Las tres pruebas tuvieron una concordancia del 89%, presentando el NeoKit y Test de Antígeno una especificidad del 100% y por lo tanto un VPP del 100%, siendo la detección por cualquiera de las

tres técnicas confirmatoria para diagnóstico de COVID-19.

Al comparar el RT-PCR con Neokit, 6 (17%) de los pacientes con RT-PCR positivos resultaron negativos para Neokit, resultando en una sensibilidad del 86% para esta última técnica (tabla 2).

Tabla 1. Resultados test diagnósticos para COVID-19

RT-PCR	NeoKit	Test de antígeno	N (%)
+	+	+	25 (25%)
-	-	-	65 (64%)
+	-	-	5 (5%)
+	+	-	6 (6%)

Abreviaturas: RT-PCR= Reacción de Cadena Polimerasa en tiempo real

Tabla 2. Desempeño de Neokit en comparación con RT-PCR para diagnóstico de SAR-CoV-2

	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	86%	71% - 95%
Especificidad	100%	94% - 100%
VPP	100%	89% - 100%
VPN	93%	84% - 98%
LR +	-------	
LR -	0.14	

Abreviaturas: VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; LR= likelyhood ratio

Por otra parte, el test de antígeno rápido en comparación con RT-PCR presento una sensibilidad del 69% para diagnósticos de COVID-19. En este caso 11 (30%) de los pacientes con RT-PCR positivos resultaron negativos para test de Antígeno (tabla 3).

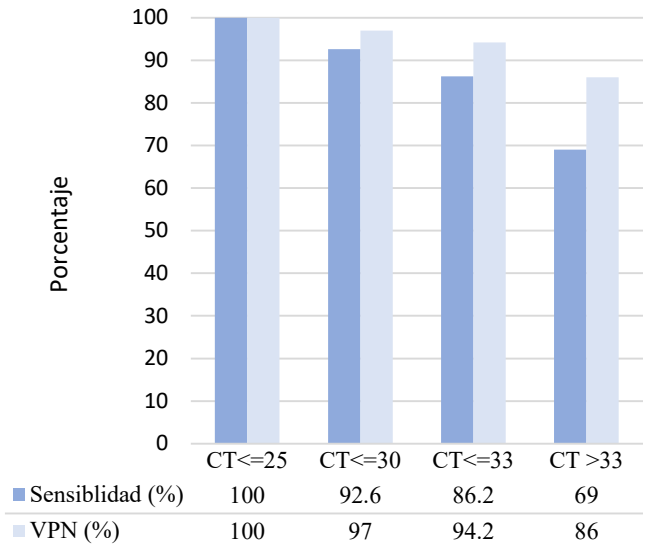
La distribución de Ct, extraído de la prueba de RT-PCR, evidencio un 24%, 27%, 29% y 7% de las muestras con Ct ≤25, 25-30, 30-33, >33, respectivamente. La sensibilidad de la prueba de Antígeno se incrementó al disminuir el punto de Ct (lo que se correlaciona con mayor carga viral), con un buen despeño incluso en niveles de Ct elevado de 30 y 33 (figura 1). El Neokit, tuvo un mejor desempeño que el test de Antígeno, presentando 100% de sensibilidad con umbral del ciclo ≤33.

Tabla 3. Desempeño de Test de antígeno en comparación con RT-PCR para diagnóstico de SAR-CoV-2

	Porcentaje	IC 95%
Sensibilidad	69%	52% - 84%
Especificidad	100%	94% - 100%
VPP	100%	86% - 100%
VPN	86%	76% - 93%
LR +	-------	
LR -	0.31	

Abreviaturas: VPP= Valor predictivo positivo; VPN= Valor predictivo negativo; LR= likelyhood ratio

Figura 1. Sensibilidad y VPN de test de antígeno en comparación con RT-PCR para detección de SARS-CoV-2.



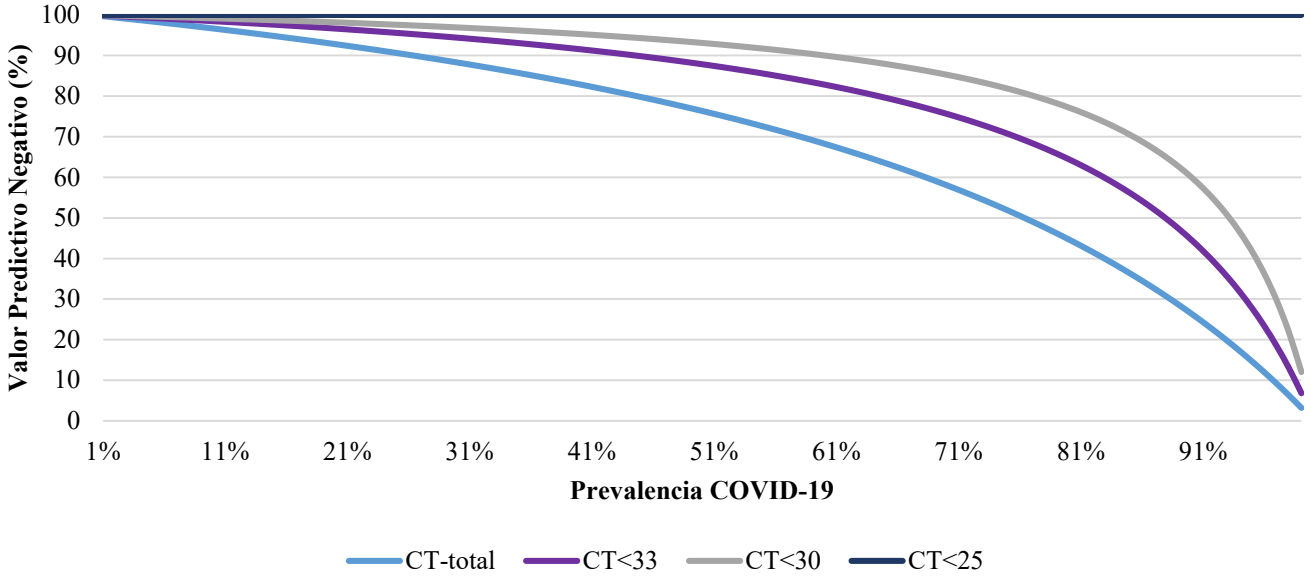
Abreviaturas: Ct, Umbral de Corte; VPN, Valor Predictivo Negativo.

Por último, evaluamos la variación del VPN, en base a la prevalencia estimada en la población. En la Figura 3 se muestra que el test de antígeno permite descartar el 90% de los casos con prevalencias inferiores a 30%, e incluso esto se eleva al 97% cuando se usa como punto de corte un Ct≤30.

DISCUSION

Diversos estudios han mostrado una asociación negativa entre riesgo de transmisión de SARS-CoV-2 y los

Figura 2. Variación de VPN de test de antígeno en comparación con RT-PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2.



Abreviaturas: Ct, Umbral de Corte.

valores de Ct (marcador indirecto de carga viral) [7]. A su vez, varios autores han sugerido como límite de trasmisión secundaria un valor de corte de Ct de 30 [11-15]. Sin embargo, elegir un valor de corte de Ct <30 representaría un porcentaje de casos no detectados, por lo cual la elección de este u otro punto corte debe basarse en la situación epidemiológica [6].

La prueba rápida para la detección cualitativa del antígeno de SARS-CoV-2 presentó un desempeño aceptable para diagnóstico de COVID-19. En comparación con RT-PCR, el test de antígeno presenta una menor sensibilidad. Sin embargo, en situaciones de umbral de ciclo elevados (30 y 33), definidos por muchos autores como límites de contagiosidad, el test presenta una sensibilidad de 92 y 86%, respectivamente, detectando al 100% todos los pacientes con alta carga viral (Ct<25). En cuanto al impacto de falsos negativos, estos aumentan en forma significativa con prevalencias de enfermedad por encima del 40%, situaciones en donde el testeo masivo carece de relevancia. No existe actualmente método validado para cuantificación de prevalencia de COVID-19 en la población, debido a la gran cantidad de casos asintomáticos de la misma [16]. En nuestra ciudad, el número de máximos de casos activos de COVID-19 fue alrededor de 4320 (enero 2022) [17]. Esto implica una prevalencia de COVID-19 menor al 10% [18]. Incluso periodos críticos de la pandemia, con alta prevalencia, la probabilidad de falsos negativos para COVID[19], utilizando el test de antígeno como prueba diagnóstica, sería del 4%, disminuyendo a 1% cuando se utiliza punto de Ct ≤30.

Otros estudios han evaluado la sensibilidad de pruebas de antígeno contra RT-PCR para detección de SARS-COV2, arrojando resultados similares a nuestro estudio. Pilarowski et al., utilizo como punto corte para definición de COVID-19 un Ct <30, mostrando una sensibilidad de 93.3% y especificidad 99.9% del test de antígeno, en comparación con RT-PCR [19].

En cuanto a los métodos de amplificación molecular isotérmica, NeoKIT. el mismo presentó al igual que la prueba de antígeno un 100% de especificidad, pero con valores similares de sensibilidad al RT-PCR utilizando como valores de corte un Ct≤33.

Otro punto a tener en cuenta, es la variación de la carga viral a lo largo de la enfermedad, con una baja carga luego de exposición, un pico en los primeros tres

días de inicio de síntomas, con un descenso posterior [20]. Por lo tanto, el valor de Ct varía de acuerdo al momento en que se desarrolla el test. Debido a esto, en nuestro estudio incluimos solo pacientes sintomáticos, con una duración de síntomas de 1 a 5 días, lo que permitió homogenizar la muestra e incluir el periodo con mayor carga viral y por lo tanto más sensibilidad de los test diagnósticos para SARS-COV2.

En conclusión, el estándar de oro para el diagnóstico de SARS-CoV-2 continúa siendo la PCR en tiempo real, sin embargo, la detección de test de antígeno y test de PCR mediante amplificación molecular isotérmica, son opciones válidas y confiables que cobran importancia en instituciones de salud que carezcan de personal altamente calificado y equipamiento adecuado y en aquellas situaciones donde resulta necesario incrementar el número de testeos a nivel poblacional, especialmente en periodos críticos de la pandemia, donde la demanda de testeos puede llegar a superar la oferta disponible. Esto permitiría localizar y aislar los pacientes con mayor carga viral, especialmente a nivel poblacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*. Mar 19 2020;91(1):157-160. doi:10.23750/abm.v91i1.9397
2. Greene CJ, Burleson SL, Crosby JC, Heimann MA, Pigott DC. Coronavirus disease 2019: International public health considerations. *J Am Coll Emerg Physicians Open*. Feb 27 2020;1(2):70-7. doi:10.1002/emp2.12040
3. Venter M, Richter K. Towards effective diagnostic assays for COVID-19: a review. *J Clin Pathol*. Jul 2020;73(7):370-377. doi:10.1136/jclinpath-2020-206685
4. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. Mar 2021;19(3):141-154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. Jan 2020;25(3)doi:10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045
6. Lyngse FP, Mølbak K, Træholt Franck K, et al. Association between SARS-CoV-2 Transmissibility, Viral Load, and Age in Households. *medRxiv*. 2021:2021.02.28.21252608. doi:10.1101/2021.02.28.21252608
7. Marks M, Millat-Martinez P, Ouchi D, et al. Transmission of COVID-19 in 282 clusters in Catalonia, Spain: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. May 2021;21(5):629-636. doi:10.1016/s1473-3099(20)30985-3
8. Fenollar F, Bouam A, Ballouche M, et al. Evaluation of the Panbio COVID-19 Rapid Antigen Detection Test Device for the Screening of Patients with COVID-19. *J Clin Microbiol*. 2021. vol. 2.
9. CONICET. Información relacionada a NEOKIT COVID 19. Accessed 29 Noviembre 2021, 2021. https://milstein.conicet.gov.ar/covid-19/
10. AP-Biotech. DisCoVery SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Kit Rox. Accessed 29 de Noviembre 2021, 2021. https://apbiotech.com.ar/pub/media/Content/Datasheet/APB-COV19R2ROX.pdf?v=20210111142935
11. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Jun 2020;39(6):1059-1061. doi:10.1007/s10096-020-03913-9
12. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis*. Dec 17 2020;71(10):2663-2666. doi:10.1093/cid/ciaa638
13. Brown CS, Clare K, Chand M, et al. Snapshot PCR surveillance for SARS-CoV-2 in hospital staff in England. *J Infect*. Sep 2020;81(3):427-434. doi:10.1016/j.jinf.2020.06.069
14. Prince-Guerra JL, Almendares O, Nolen LD, et al. Evaluation of Abbott BinaxNOW Rapid Antigen Test for SARS-CoV-2 Infection at Two Community-Based Testing Sites - Pima County, Arizona, November 3-17, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Jan 22 2021;70(3):100-105. doi:10.15585/mmwr.mm7003e3
15. Al Bayat S, Mundodan J, Hasnain S, et al. Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *J Infect Public Health*. Sep 2021;14(9):1201-1205. doi:10.1016/j.jiph.2021.08.013
16. Hu Y, Sun J, Dai Z, et al. Prevalence and severity of corona virus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol*. Jun 2020;127:104371. doi:10.1016/j.jcv.2020.104371
17. Olavarria Md. Cantidad de casos y testeos por COVID-19. Accessed 29 de Noviembre 2021, 2021. https://datosabiertos.olavarria.gov.ar/dataviews/258484/CANTI-DE-CASOS-Y-54904/
18. Olavarria Md. Población total por localidad. Accessed 29 de Noviembre 2021, 2021. https://datosabiertos.olavarria.gov.ar/dataviews/239538/poblacion-total-por-localidad/
19. Pilarowski G, Lebel P, Sunshine S, et al. Performance Characteristics of a Rapid Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antigen Detection Assay at a Public Plaza Testing Site in San Francisco. *J Infect Dis*. Apr 8 2021;223(7):1139-1144. doi:10.1093/infdis/jiaa802
20. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. May 2020;26(5):672-675. doi:10.1038/s41591-020-0869-5