

COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test

Para Autodiagnóstico

INFORME DE VALIDACIÓN

BIOLAN
HEALTH

Fecha: 29/04/2022

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVO	3
3. PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS	3
3.1. Evaluación clínica	3
Especificidad y Sensibilidad Diagnóstica	4
3.2. Resultados analíticos	6
Límite de Detección (Sensibilidad Analítica)	6
Reactividad Cruzada (Especificidad Analítica)	7
Sustancias Interferentes (Especificidad Analítica)	10
Efecto Gancho	11
Precisión	11
3.3. Requisitos adicionales para autodiagnóstico: estudio de usabilidad	11
Ejercicio de ejecución del autotest	12
Ejercicio de interpretación de los resultados del test	13

1. INTRODUCCIÓN

El SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) es un coronavirus nuevo que provoca la enfermedad COVID-19, una enfermedad respiratoria que puede abarcar desde un resfriado común hasta enfermedades más graves que pueden provocar la muerte. Fue detectado por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad china de Wuhan y desde entonces, se ha propagado rápidamente por el mundo¹. De acuerdo con las pruebas actuales, la transmisión entre humanos del virus de la COVID-19 se realiza, básicamente, a través de gotas de la respiración y por contacto². Aunque el período de incubación de la COVID-19 abarca entre 1 y 14 días, como media, transcurren entre 5 y 6 días desde que una persona se infecta con el virus hasta que comienzan a aparecer los síntomas³. Además, la carga viral del SARS-CoV-2 en vías respiratorias superiores tiende a alcanzar su nivel máximo en la primera semana después del inicio de los síntomas⁴ por lo que el paciente tiende a ser más infeccioso en esta fase de la enfermedad⁵. Por tanto, resulta fundamental la detección y el aislamiento tempranos de estos pacientes para evitar la propagación del virus.

Hasta la fecha, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) sigue siendo el método estándar para la detección de SARS-CoV-2. A pesar de su elevado nivel de sensibilidad y especificidad, la muestra debe enviarse a un laboratorio central para que éste realice el análisis y hay que esperar unas cuantas horas para obtener el resultado. En este contexto, el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH, es un inmunoensayo de flujo lateral que permite la detección rápida (15-20 min) y sencilla del antígeno de la nucleoproteína del SARS-CoV-2, un antígeno detectable generalmente en muestras de hisopos nasales durante la fase aguda de la infección. Por lo tanto, el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH puede ser una herramienta extremadamente útil para la detección precoz de personas infectadas y, por lo tanto,

¹ <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019>

² <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>

³ <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>

⁴ Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*. 2021;2(1):e13-e22. doi:10.1016/S2666-5247(20)30172-5.

⁵ Cheng HY, Jian SW, Liu DP, Ng TC, Huang WT, Lin HH. Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods before and after Symptom Onset. *JAMA Internal Medicine*. 2020;180(9):1156-1163. doi:10.1001/jamainternmed.2020.

para prevenir la propagación de la COVID-19 gracias a la identificación y el aislamiento tempranos de casos potencialmente infecciosos.

2. OBJETIVO

Evaluar la aplicabilidad del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH S.L. para la detección de SARS-CoV-2 en muestras clínicas tomadas con hisopo nasal, y su usabilidad como test de autodiagnóstico para la población general.

3. PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS

El estudio de validación se ha diseñado conforme a los criterios establecidos en el *MDCG guidance document dedicated to the performance evaluation of SARS-CoV-2 in vitro diagnostic medical devices*⁶ y siguiendo los procedimientos estandarizados de acuerdo a las guías del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, en particular:

- User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance - 2nd Edition. CLSI document EP12-A2.
- Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures - 2nd Edition. CLSI document EP17-A2.
- Interference Testing in Clinical Chemistry – 3rd Edition. CLSI document EP07.
- Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures – 3rd Edition. CLSI document EP05-A3.

3.1. Evaluación clínica

El desempeño clínico del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH se evaluó en un estudio prospectivo realizado en el Hospital Universitario de Cruces en el que se realizaron pruebas a un total de 568 voluntarios. Entre los voluntarios, que reflejan la población diana para la que está dirigido el nuevo dispositivo IVD (como donantes de sangre, embarazadas, pacientes hospitalizados⁷, etc.) algunos presentaban síntomas compatibles con una infección por SARS-CoV-2 (en el plazo de 7 días a partir del inicio de los síntomas) y otros eran asintomáticos con o sin contacto estrecho positivo conocido.

⁶ *Guidance on performance evaluation of SARS-CoV-2 in vitro diagnostic medical devices. MDCG 2021-21 Rev.1 – February 2022.*

⁷ *Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test en uno de los usuarios diana para los que el test está dirigido, en el estudio, se incluyeron 103 pacientes hospitalizados que dieron negativo en la prueba PCR previa a la hospitalización.*

Se recogió un hisopo nasal directo de todos los voluntarios, que fue manipulado y analizado *in situ* con el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH por personal cualificado (enfermera) y de acuerdo con las instrucciones descritas en el prospecto del dispositivo a evaluar. En este estudio, los resultados del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* se compararon con los obtenidos en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de hisopos nasofaríngeos. Para ello, además del hisopo nasal, el mismo profesional sanitario recogió una muestra de hisopo nasofaríngeo de todos los voluntarios. Este hisopo fue eluido y guardado en un medio de transporte de virus (MTV DeltaSwab virus de Deltalab) para realizar la RT-PCR (TaqPath™ COVID 19 CE IVD RT PCR Kit de Applied Biosystems) en el laboratorio central del Hospital Universitario de Cruces.

Además, con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH para ser utilizado como Test de Autodiagnóstico por la población general, 293 voluntarios⁸ (no especializados) de los 568 que participaron en este estudio, realizaron el test ellos mismos siguiendo las instrucciones de uso descritas en el prospecto, y los resultados, fueron comparados con los obtenidos por el profesional sanitario.

Los resultados obtenidos con ambos métodos (RT-PCR y *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test*), junto con la información del paciente (si es asintomático y el tiempo transcurrido desde que comenzaron los síntomas) fueron introducidos (de forma anonimizada) en un excel para el análisis de los datos.

Especificidad y Sensibilidad Diagnóstica

El desempeño clínico fue analizado siguiendo los protocolos recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁹, donde el desempeño de una prueba cualitativa se describe en términos de sensibilidad y especificidad. El análisis estadístico recoge el cálculo de la sensibilidad, la especificidad el porcentaje de concordancia global y el intervalo de confianza al 95% basado en el método Wilson (siguiendo los protocolos recogidos en el ANEXO I).

La Tabla 1 recoge los resultados obtenidos, donde se comparan los resultados del

⁸ Voluntarios que desconocen el resultado del profesional sanitario y que, siguiendo las instrucciones de uso, realizan la toma de muestra, la prueba, la lectura y la interpretación de los resultados por sí mismos.

⁹ CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline, 2nd Edition. CLSI document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test con los de la RT-PCR (Verdaderos Positivos (VP) y Verdaderos Negativos (VN)).

Tabla 1. Desempeño clínico del COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test frente a la RT-PCR.

COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test	Método de Referencia RT-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	121	8	129
Negativo	26	413	439
Total	147	421	568
Sensibilidad: 82,3% (IC 95%: 75,5 – 87,5%)			
Especificidad: 98,1% (IC 95%: 96,4-99,0%)			
Porcentaje de Concordancia Global: 94,0% (IC 95%: 91,8–95,7%)			

Explicación de los términos:

IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%.

Sensibilidad = Verdaderos positivos/Verdaderos positivos + Falsos negativos. Porcentaje de concordancia observado entre los valores positivos obtenidos con el método de estudio y el método de referencia.

Especificidad = Verdaderos negativos/Verdaderos negativos + Falsos positivos. Porcentaje de concordancia observado entre los valores negativos obtenidos con el método de estudio y el método de referencia.

Porcentaje de Concordancia Global = Verdaderos positivos + Verdaderos negativos/ Total de muestras. Porcentaje de concordancia observado entre los valores totales obtenidos con el método de estudio y el método de referencia.

Asimismo, basándonos en estudios previos, los resultados positivos de la RT-PCR fueron categorizados en base al valor Ct obtenido (que está inversamente relacionado con la carga viral) y se calculó la sensibilidad en base a 3 umbrales de Cts: $Ct \leq 25$, $Ct \leq 30$ ad $Ct \leq 35$.

Al igual que con el resto de test de antígenos, la sensibilidad en la población analizada depende de la carga viral de la persona y, por tanto, la detección de casos positivos, puede disminuir a medida que se reduzca la carga viral. Tal y como se muestra en la Tabla 2, donde se recoge la correlación entre los resultados del COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test y el valor Ct RT-PCR, la sensibilidad del COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test aumenta con la carga viral y se sitúa en un **97,2%** (69/71) (IC 95%: 91,1 – 98,4%) para valores de **Ct RT-PCR ≤ 25** .

Tabla 2. Desempeño clínico del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* frente al valor Ct de la RT-PCR.

COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test	Método de Referencia RT-PCR		
	Positivo		
	Ct ≤ 25	Ct ≤ 30	Ct ≤ 35
Positivo	69	107	121
Negativo	2	14	23
Total	71	121	144
Sensibilidad Ct ≤ 25: 97,2% (IC 95%: 91,1-98,4%)			
Sensibilidad Ct ≤ 30 : 88,4% (IC 95%: 81,7-92,8%)			
Sensibilidad Ct ≤ 35: 84,0% (IC 95%: 77,3-89%)			

Nuestros resultados (**sensibilidad del 97,2% para valores de Ct RT-PCR ≤ 25 y especificidad del 98,1%**) muestran que el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH cumple los criterios definidos por la OMS¹⁰ y por el *Health Security Committee* de la Comisión Europea¹¹, con una sensibilidad mayor del 80% (y >90% para valores de Ct RT-PCR ≤ 25) y una especificidad superior al 98%, lo que demuestra que el test cumple los requisitos para su aplicación en la práctica clínica.

Por otro lado, los datos de secuenciación, confirman que el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* es eficaz en la detección de diferentes variantes del **SARS-CoV-2**, entre las que se incluyen: Alpha (102/147, el 69,4% de las muestras positivas analizadas en este estudio), Delta (14/147, el 9,5% de las muestras positivas analizadas en este estudio), y Omicron (31/147, el 21,1% de las muestras positivas analizadas en este estudio).

3.2. Resultados analíticos

Límite de Detección (Sensibilidad Analítica)

El Límite de Detección (LOD) se determinó siguiendo los protocolos establecidos en la guía CLSI EP-17-A2¹², donde el LOD se define como la concentración más baja del analito que puede ser detectada con fiabilidad (por lo general, el 95% de las

¹⁰ Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays: Interim guidance, 11 September 2020, WHO.

¹¹ https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/preparedness_response/docs/covid-19_rat_common-list_en.pdf

¹² CLSI. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures - 2nd Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

muestras analizadas en un tipo de muestra concreta, como por ejemplo, plasma, sangre u orina).

Para ello, se adicionó el material inicial (una muestra de virus SARS-CoV-2 inactivada por calor con una concentración de $1 \times 10^{4,95}$ TCID₅₀/mL) en un pool de muestras nasales de donantes sanos confirmados como negativos para SARS-CoV-2¹³.

Posteriormente, se realizó un ensayo con cada dilución de virus añadiendo 50 µL de la muestra al hisopo y siguiendo el procedimiento descrito en el prospecto.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio preliminar en el que se analizaron por quintuplicado diluciones seriadas (1/10) de la muestra original, y se seleccionó una concentración entre la última dilución en proporcionar 5 resultados positivos y la primera en proporcionar 5 resultados negativos. Utilizando esta concentración, se delimitó aún más el LoD. Para verificar el LoD, la última dilución que demostró una positividad del 100 %, fue posteriormente ensayada en otras 20 réplicas. Finalmente, el LoD se determinó como la concentración de virus más baja que se detectó ≥ 95 % de las ocasiones.

Concentración del material inicial	LOD estimado	No. Positivos/Total	% Positivos
$1 \times 10^{4,95}$ TCID ₅₀ /mL	$3,5 \times 10^{2,5}$ TCID ₅₀ /mL	19/20	95%

En este estudio, se confirmó que el LoD del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH (la concentración de virus con la que, como mínimo, 19/20 replicados arrojaron resultados positivos) es de $3,5 \times 10^{2,5}$ TCID₅₀/mL.

Reactividad Cruzada (Especificidad Analítica)

La reactividad cruzada del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* se evaluó con un panel de muestras con potencial de reactividad cruzada, entre las que se incluyeron, muestras positivas de otros coronavirus humanos endémicos, de influenza A y B, de RSV y otros patógenos respiratorios de alta prevalencia que pueden estar presentes en la cavidad nasal y que puedan presentar reacciones cruzadas con el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test*. Cada una de las muestras con potencial de reactividad

¹³ Como se parte de un material inactivado, se llevó a cabo un ensayo que nos permitiera analizar el efecto de la inactivación y confirmar la concentración del material de partida. En concreto, las diluciones preparadas, fueron analizadas con otros test de antígeno comerciales (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device de Abbott y SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test de Roche).

cruzada fue testada por triplicado añadiendo 50 µL de la muestra al hisopo y siguiendo el procedimiento descrito en el prospecto.

La concentración final de cada organismo aparece documentada en la siguiente tabla. No se observó reactividad cruzada.

Sustancia de reactividad cruzada	Concentración testada	Concentración final en el test	Reactividad cruzada
HCoV-229E	1,26 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	1,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	No
HCoV-NL63	3,55 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	5,07 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
HCoV-OC43	1,7 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	2,43 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
HCoV-HKU1 nucleoproteína*	0,25 mg/mL	35,7 µg/mL	No
Adenovirus Tipo 01	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	5,96 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Adenovirus Tipo 05	4,07 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	5,81 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	No
Adenovirus Tipo 07A	1,05 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	1,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	No
Adenovirus Tipo 17 (Especie D)	1,05 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	1,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	No
Adenovirus Tipo 20	1,51 x 10 ⁶ U/mL	2,16 x 10 ⁵ U/mL	No
Virus BK	1,41 x 10 ⁵ U/mL	2,02 x 10 ⁴ U/mL	No
Coxsackievirus Tipo A09	6,61 x 10 ⁶ U/mL	9,44 x 10 ⁵ U/mL	No
Coxsackievirus Tipo A10	4,07 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	5,81 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	No
Coxsackievirus Tipo A16	1,26 x 10 ⁶ U/mL	1,80 x 10 ⁵ U/mL	No
Coxsackievirus Tipo B03	4,07 x 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	5,81 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	No
Citomegalovirus (CMV) Lisado	2,82 mg/mL	0,4029 mg/mL	No
Citomegalovirus (CMV) Cepa: AD-169	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	5,96 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Citomegalovirus (CMV) Cepa: Towne	1,26 x 10 ⁶ U/mL	1,80 x 10 ⁵ U/mL	No
Virus Dengue Tipo 1	7,24 x 10 ⁵ U/mL	1,03 x 10 ⁵ U/mL	No
Enterovirus Tipo 68 (Cepa 2007)	5,01 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	7,16 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Enterovirus Tipo 68 Grupo Principal (Cepa 2 09/2014)	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	5,96 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Enterovirus Tipo 71 (Cepa 2003)	4,17 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	5,96 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Epstein-Barr (EBV)	2,80 x 10 ⁸ cp/mL	4,00 x 10 ⁷ cp/mL	No
Herpesvirus Humano Tipo 6B (HHV-6B)	6,16 x 10 ⁸ cp/mL	8,80 x 10 ⁷ cp/mL	No
Metapneumovirus Humano (hMPV) 03 Tipo B1	1,70 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	2,43 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No
Metapneumovirus Humano (hMPV) 04 Tipo B2	3,80 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	5,43 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	No
Metapneumovirus Humano (hMPV) 16 Tipo A1	1,41 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	2,01 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL	No

Metapneumovirus Humano (hMPV) 27 Tipo A2	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,96 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus T-Linfotrópico Humano Tipo I (HTLV-I) Lisado	1,86 mg/mL	0,2657 mg/mL	No
Virus Ilheus	$9,55 \times 10^6$ U/mL	$1,36 \times 10^6$ U/mL	No
Influenza A H1N1 (Nueva California/20/99)	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,96 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza A H1N1 (Islas Solomon/03/06)	$1,41 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$2,01 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza A H1N1pdm (NY/02/09)	$1,26 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$1,80 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza A H3N2 (HK/8/68)	$1,51 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$2,16 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza A H3N2 Cepa: Suiza/9715293/13	$1,26 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$1,80 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza A HiNipdm (Nueva York/18/09)	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,96 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza B (Florida/02/06)	$4,68 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	$6,69 \times 10^3$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza B (Lee/40)	$1,41 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$2,01 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza B (Victoria/2/87)	$1,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$1,67 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Influenza B (Yamagata/16/88)	$1,41 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$2,01 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Measles	$4,57 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$6,53 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
MERS-COV (Cepa: Florida/USA-2_Saudi Arabia_2014)	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,96 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Mumps (Cepa 1)	$1,15 \times 10^7$ TCID ₅₀ /mL	$1,64 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Parainfluenza Tipo 1	$1,26 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$1,80 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Parainfluenza Tipo 3	$1,26 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$1,80 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Parainfluenza Tipo 4A	$3,55 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,07 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Sincitial Respiratorio Tipo A (RSV-A)	$1,05 \times 10^6$ TCID ₅₀ /mL	$1,50 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Sincitial Respiratorio Tipo B (RSV-B)	$1,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$1,67 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Rhinovirus A16	$1,41 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$2,01 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Rhinovirus Tipo 1A	$4,17 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL	$5,96 \times 10^4$ TCID ₅₀ /mL	No
Virus Rubella	$6,61 \times 10^6$ U/mL	$9,44 \times 10^5$ U/mL	No
Escherichia coli BL21 DE3 star	$6,48 \times 10^8$ CFU/mL	$9,26 \times 10^7$ CFU/mL	No
Pseudomonas aeruginosa 108	$1,06 \times 10^8$ CFU/mL	$1,52 \times 10^7$ CFU/mL	No
Agrupación de muestra nasal humana	N/A**	N/A**	No

*Nota: El SARS-CoV HKU1 no se pudo testar por falta de disponibilidad.

**Nota: Concentración no reportada por el proveedor. Se testaron las soluciones recibidas sin diluir.

Sustancias Interferentes (Especificidad Analítica)

La susceptibilidad del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* a sustancias interferentes fue evaluada siguiendo los protocolos recogidos en la guía CLSI EP07¹⁴. Para ello, las sustancias potencialmente interferentes fueron añadidas a un pool negativo de muestras nasales (de donantes confirmados como negativos para SARS-CoV-2) dopado con la nucleoproteína del SARS-CoV-2. Cada una de las muestras, fue testada por triplicado añadiendo 50 µL de la muestra al hisopo y siguiendo el procedimiento descrito en el prospecto. Las sustancias interferentes, fueron testadas a una concentración 3 veces mayor de la concentración reportada o esperada en muestras clínicas. Si una réplica de todas las analizadas para una categoría muestra una interferencia, se considera que la sustancia interfiere en la señal.

Las siguientes sustancias, que pueden estar presentes naturalmente en las muestras respiratorias o que pueden ser introducidas artificialmente en la cavidad nasal o nasofaringe, fueron evaluadas con el *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH en las concentraciones listadas a continuación y se observó que no interfieren en el resultado del test.

Sustancias Potencialmente Interferentes	Concentración testada	Concentración final en el test	Interferencias
Ibuprofeno	175 mg/dL	25 mg/dL	No
Amoxicilina	35 mg/dL	5 mg/dL	No
Hemoglobina	700 mg/L	100 mg/L	No
Ácido acetilsalicílico	70 mg/dL	10 mg/dL	No
Mucina	4% (v/v)	1% (v/v)	No
Biotina	1 mg/mL	100 µg/mL	No
Benzocaína	1 mg/mL	0,14 mg/mL	No
Tobramicina	140 µg/mL	20 µg/mL	No
Acetaminofen	21 mg/dL	3 mg/dL	No
Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>	175 ng/mL	25 ng/mL	No

¹⁴ CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document EP07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2005.

Efecto Gancho

No se observó ningún efecto gancho hasta la concentración más alta de SARS-CoV-2 inactivado por calor disponible en stock: $1 \times 10^{4,95}$ TCID₅₀/mL.

Precisión

La precisión se determinó siguiendo la guía CLSI EP05-A3¹⁵, utilizando un protocolo basado en el estudio de 3 lotes x 3 analistas x 5 días x 3 réplicas. Para ello, 3 analistas, analizaron 3 lotes del COVID-19 *Antigen Rapid Test. Self Test* siguiendo el procedimiento descrito en el prospecto, realizando 3 réplicas de cada uno de los lotes en 5 días diferentes, utilizando el siguiente material de control:

- Muestra Negativa del Antígeno SARS-CoV-2
- Muestra Positivo Leve del Antígeno SARS-CoV-2
- Muestra Positivo Medio del Antígeno SARS-CoV-2
- Muestra Positivo Alto del Antígeno SARS-CoV-2

La Tabla 3 recoge los resultados obtenidos, que demuestran que los 3 lotes identifican el 100% de las muestras correctamente como positivo y negativo.

Tabla 3. Resultados del estudio de precisión.

Muestras Control Testadas	Lote 1	Lot e2	Lot e3
Positivo Alto	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas
Positivo Medio	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas
Positivo Leve	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas	45+/45 réplicas
Negativo	45-/45 réplicas	45-/45 réplicas	45-/45 réplicas

3.3. Requisitos adicionales para autodiagnóstico: estudio de usabilidad

Con el objetivo de evaluar la viabilidad del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* para ser utilizado como test de autodiagnóstico por la población general, se ha llevado a cabo un estudio de usabilidad, que incluye, por un lado, “*un ejercicio de interpretación de los resultados del test*” y por otro, “*un ejercicio de ejecución del*

¹⁵ CLSI. *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – 3rd Edition*. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

autotest", en los que participaron 100 y 293 voluntarios (no especializados) respectivamente.

Ejercicio de ejecución del autotest

En el estudio de "ejecución de autotest", los participantes siguieron las instrucciones de uso para realizar, por si solos, la toma de muestra nasal, la prueba, la lectura y la interpretación de los resultados. Durante la prueba, todos los participantes fueron supervisados por un profesional cualificado (enfermera o personal de laboratorio), al que podían solicitar ayuda en caso de duda. Solo 6 de los 293 participantes (2,04%) necesitó ayuda verbal para realizar o interpretar la prueba y, el **100% indicó que es relativamente fácil entender la instrucciones de uso, recoger la muestra nasal y realizar la prueba.**

Tabla 4. Desempeño clínico del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* realizado por un profesional sanitario vs. usuario no especializado.

Resultados Autotest	Resultados del test realizado por el Profesional Sanitario		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	41	0	41
Negativo	1	251	252
Total	42	251	293
Porcentaje de Concordancia Positiva: 97,6% (95% CI: 87,7-99,6%)			
Porcentaje de Concordancia Negativa: 100% (95% CI: 98,5-100%)			
Porcentaje de Concordancia Global: 99,7% (95% CI: 98,1-99,9 %)			

Tal y como se recoge en la Tabla 4, los resultados obtenidos en el autotest, **se correlacionaron en un 99,7% (292/293)** con aquellos obtenidos en los test realizados e interpretados por un profesional sanitario. El **porcentaje de concordancia positiva** entre el autotest y el test realizado por el profesional sanitario, fue del **97,6%** (41/42; IC 95%: 87,7 – 99,6%), mientras que el **porcentaje de concordancia negativa**, fue del **100%** (251/251; (IC 95%: 98,5 - 100%)). Un único paciente fue diagnosticado como positivo por el profesional sanitario, pero no por el autotest. En este caso concreto, el profesional indicó que el falso negativo podía ser debido a una inadecuada toma de muestra realizada por el voluntario no especializado. Por otro lado, cabe destacar, que el porcentaje de **resultados invalidos fue del 0%** (0/293), lo que indica que todos los participantes añadieron suficiente volumen de muestra (5 gotas) al pocillo de muestra del test y que fueron capaces de obtener un resultado válido e interpretable (con una línea de control visible).

Ejercicio de interpretación de los resultados del test

Con el objetivo de confirmar que los resultados pueden ser interpretados de la misma manera por un profesional sanitario y por un usuario no especializado, 100 de los 293 voluntarios que participaron en el estudio de “*ejecución del autotest*” realizaron la lectura y la interpretación de los resultados obtenidos en 6 tests¹⁶ que, tal y como se muestra en la Figura 1, cubren un rango amplio de posibles resultados que podemos obtener al realizar el test: negativo, positivo, positivo débil e inválido.

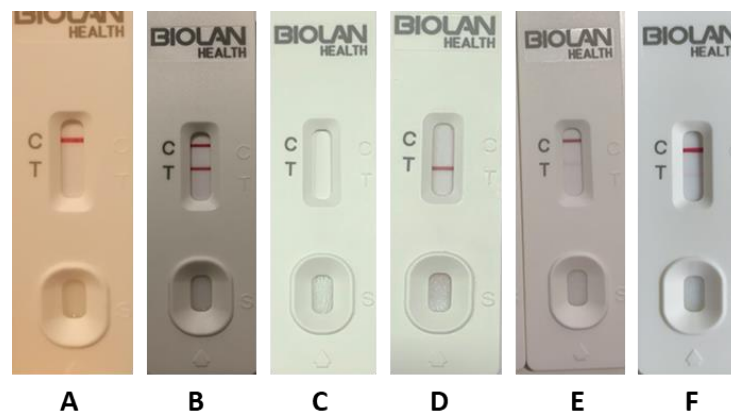


Figura 1. Test utilizados en el estudio de interpretación de resultados: negativo (A), positivo (B), inválido (C y D) y positivo débil (E y F).

La mayoría de los voluntarios, mostró una gran capacidad para interpretar correctamente los resultados de las pruebas. En concreto, el **98%** de los participantes (98/100) **interpretó correctamente el test**, y solo el 2% (2/100) de los resultados fueron malinterpretados. En ambos casos, los resultados de la prueba malinterpretados se referían a una **banda positiva débil** (los test E y F de la Figura 1), leída **como negativa**. Pero cabe destacar que, a pesar de haber malinterpretado el resultado de los “positivos débiles”, estos mismos participantes, interpretaron correctamente los resultados de los otros tests. En cuanto a la facilidad en la lectura e interpretación del resultado, la mayoría de los participantes indicó que era fácil. Solo 5 de los 100 participantes comentó que le resultó algo difícil hacer la lectura de algunas bandas (en concreto las positivas débiles) e interpretar el resultado. Pero a pesar de ello, en la mayoría de los casos (3/5), esto no afectó a la capacidad de interpretar correctamente el resultado.

¹⁶ Obtenidos de muestras nasales de donantes positivos y negativos y un buffer de extracción dopado con nucleoproteína.

En resumen, los resultados del estudio de usabilidad llevado a cabo, nos indican que las instrucciones de uso pueden ser entendidas correctamente y que el test puede realizarse fácilmente por personas sin formación específica, lo que demuestra la viabilidad del *COVID-19 Antigen Rapid Test. Self Test* de BIOLAN HEALTH para ser utilizado como test de autodiagnóstico por la población general.

Informe publicado el 29 de Abril del 2022.



BIOLAN
HEALTH
Parque Tecnológico de Bizkaia
Laida Bidea - Edificio 409
48170 Zamudio (Bizkaia)
CIF: B95788725

Larraitz Añorga
Directora General de BIOLAN HEALTH

ANEXO I

Protocolo para calcular la especificidad y la sensibilidad

De acuerdo a lo establecido en la guía CLSI EP17, el desempeño de un test cualitativo se describe en términos de sensibilidad y especificidad. La Tabla 1 muestra una tabla de 2 x 2 o tabla de contingencia y las ecuaciones requeridas para determinar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas. La Tabla 1 compara los resultados de un test cualitativo respecto al resultado del criterio de exactitud diagnóstica.

Tabla 1. Tabla de contingencia 2 x 2

Método X	Criterio de Exactitud Diagnóstica		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	VP	FP	VP + FP
Negativo	FN	VN	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	n
Sensibilidad estimada = 100 x [VP / (VP + FN)]			
Especificidad estimada = 100 x [VN / (FP + VN)]			

*VP: Verdadero Positivo, FN: Falso Negativo, VN: Verdadero Negativo, FP: Falso Positivo.

Si el porcentaje de Verdaderos Positivos es equivalente al porcentaje de Falsos Positivos, el test no tiene valor diagnóstico. Por el contrario, si la especificidad y la sensibilidad están cerca del 100%, el test tiene un alto valor diagnóstico.

Para el cálculo de los límites de confianza, se adopta el intervalo de confianza al 95% basado en el método de Wilson que recomienda el CLSI E17.

El intervalo de confianza del 95% para la sensibilidad se calcula de la siguiente manera:

$$[100 \times (Q_{1,se} - Q_{2,se})/Q_{3,se}; 100 \times (Q_{1,se} + Q_{2,se})/Q_{3,se}]$$

donde $Q_{1,se}$, $Q_{2,se}$ y $Q_{3,se}$ se calculan a partir de los datos de la Tabla 1 utilizando las siguientes fórmulas:

Para la sensibilidad,

$$Q_{1,se} = 2 \times VP + 1.96^2 = 2 \times VP + 3.84$$

$$Q_{2,se} = 1.96 \sqrt{1.96^2 + 4 \times VP \times FN / (VP + FN)} = 1.96 \sqrt{3.84 + 4 \times VP \times FN / (VP + FN)}$$

$$Q_{3,se} = 2(VP + FN + 1.96^2) = 2(VP + FN) + 7.68$$

El intervalo de confianza del 95% para la especificidad se calcula de la siguiente manera:

$$[100 \times (Q_{1,sp} - Q_{2,sp})/Q_{3,sp}; 100 \times (Q_{1,sp} + Q_{2,sp})/Q_{3,sp}]$$

donde $Q_{1,sp}$, $Q_{2,sp}$ y $Q_{3,sp}$ se calculan a partir de los datos de la Tabla 1 utilizando las siguientes fórmulas:

Para la especificidad,

$$Q_{1,sp} = 2 \times VN + 1.96^2 = 2 \times VN + 3.84$$

$$Q_{2,sp} = 1.96 \sqrt{1.96^2 + 4 \times FP \times VN / (FP + VN)} = 1.96 \sqrt{3.84 + 4 \times FP \times VN / (FP + VN)}$$

$$Q_{3,sp} = 2(FP + VN + 1.96^2) = 2(FP + VN) + 7.68$$

En las fórmulas de arriba, 1.96 es el valor del percentil de la distribución normal estándar que corresponde al 95% de confianza.

Protocolo para estimar el Porcentaje de Concordancia Global

Para calcular el Porcentaje de Concordancia Global entre el método candidato y el método comparativo, se utilizan las ecuaciones y la Tabla 2x2 que compara los resultados de ambos métodos (ver Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de contingencia 2 x 2

Método candidato	Método Comparativo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n
Porcentaje de Concordancia Global = $100 \times (a + d)/n$			

El intervalo de confianza del 95% para el Porcentaje de Concordancia Global se calcula de la siguiente manera:

$$[100 \times (Q_1 - Q_2)/Q_3; 100 \times (Q_1 + Q_2)/Q_3]$$

donde Q_1 , Q_2 , y Q_3 , se calculan a partir de los datos de la Tabla 2 utilizando las siguientes fórmulas:

$$Q_1 = 2(a+d) + 1.96^2 = 2 \times (a+d) + 3.84$$

$$Q_2 = 1.96 \sqrt{1.96^2 + 4 \times (a+d)(b+c)/n} = 1.96 \sqrt{3.84 + 4 \times (a+d)(b+c)/n}$$

$$Q_3 = 2(n + 1.96^2) = 2n + 7.68$$

En las fórmulas de arriba, 1.96 es el valor del percentil de la distribución normal estándar que corresponde al 95% de confianza.