VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN TIEMPO REAL (STRONG STEP®) PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES N, ORF1ab y S DE SARS-COV-2

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Getafe, Madrid. Marzo 2021.

Introducción/Objetivos

El principal método de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 es la detección de los ácidos nucleicos del virus en muestras de exudado nasofaríngeo. El elevado número de muestras y la importancia de un diagnóstico rápido y preciso hace necesario el desarrollo de técnicas de PCR rápidas, con una buena sensibilidad y especificidad y de fácil manejo a nivel de laboratorio.

El objetivo de este trabajo es la validación de una RT-PCR a tiempo real (Strong Step®, Liming Bio) para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo.

Material y métodos

Se seleccionaron 188 muestras de exudado nasofaríngeo recogidas en medio de transporte universal de virus conservadas a -80ºC. Se utilizó el sistema automatizado Genolution (Alifax) para la extracción de ARN. Con el eluido obtenido se realizaron dos RT-PCR a tiempo real: Strong Step® como técnica molecular a validar y Allplex SARS-Cov-2 Assay (Seegene) como técnica convencional empleada en la rutina de diagnóstico de SARS-CoV-2. La técnica de RT-PCR Allplex tiene como genes diana los genes E, N y RdRP y S en combinación. Para control de la extracción y de la reacción se emplea un control interno exógeno. Las muestras se consideran positivas cuando se detectan uno o más genes en un Ct≤40. La técnica de RT-PCR Strong Step® tiene como diana los genes N, ORF1ab y el gen S. Como control de la extracción y la reacción se emplea un control interno endógeno (RNAse P humana). Las muestras se consideran positivas cuando se detectan dos o más genes con un Ct≤38. Las muestras en las que solo se detecta un gen se consideran inconcluyentes y requieren una confirmación. Los resultados discrepantes se comprobaron con una tercera técnica de RT-PCR.

Resultados

De las 188 muestras seleccionadas, 81 muestras fueron positivas y 107 negativas, confirmando las discrepantes por una tercera RT-PCR que detecta los genes S y ORF1ab. De las 81 muestras positivas, por Strong Step® 70 fueron positivas, 10 inconcluyentes y 1 negativa. De las 107 muestras negativas, 105 fueron negativas por Strong Step® y 2 resultaron inconcluyentes.

Los resultados de sensibilidad y especificidad (considerando los resultados inconcluyentes como positivos) se muestran en la siguiente tabla:

	Total	Strong Step® +	Strong Step® -	
Positivas	81	80	1	Sensibilidad: 98,77%
Negativas	107	2	105	Especificidad: 98,13%

Conclusiones

La RT-PCR en tiempo real Strong Step® tiene una elevada sensibilidad y especificidad.

La detección de los genes S y ORF1ab específicos del genoma de SARS-CoV-2 aportan una gran especificidad a la técnica. Por otro lado, incorpora un control interno endógeno presente en las células epiteliales humanas. Esto permite tanto el control de la extracción y la reacción de PCR como el control de la calidad y la celularidad de la muestra.

Por todo ello, consideramos que Strong Step® es una técnica con una buena sensibilidad y especificidad, de fácil y rápida preparación dado que la master mix se encuentra liofilizada en el pocillo de reacción. Todo ello permite su empleo en los laboratorios de microbiología como método de diagnóstico de SARS-CoV-2.