**TÍTULO ESTUDIO:** VALIDACIÓN DEL KIT DE PCR EN TIEMPO REAL MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES RdRp (Orf1ab), S Y N DE SARS-COV-2 (StrongStep® Kit)

**CÓDIGO ESTUDIO:** 2061

**PROMOTOR:** IHT

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** DAVID MOLINA ARANA

**CENTRO:** SERVICIO MICROBIOLOGÍA HOSPITAL UNIVERSITARIO GETAFE

## Introducción y objetivo principal

La prueba de laboratorio estándar para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 es la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (**R**everse **T**ranscription **P**olymerase **C**hain **R**eaction, **RT-PCR**).

Las Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el protocolo desarrollado por el Hospital Charité-Berlín para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. Este protocolo se basa en la detección de 3 marcadores diferentes: genes E (envuelta), N (nucleocápsida) y RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN, región Orf1ab). Los ensayos para los genes E y N se entienden como protocolos de cribado para la detección de cualquier beta-coronavirus asociado a murciélagos (no detectados en coronavirus humanos comunes). El ensayo para RdRp es específico para la detección de SARS-Cov-2. En un principio se sugirió la realización de una primera PCR con detección de genes E y N como herramienta de cribado seguido de un ensayo de confirmación de los casos positivos con la detección del gen RdRp. Actualmente se dispone de kit de PCR que detectan simultáneamente los 3 genes en una misma reacción de PCR.

Por todo ello, este estudio pretende, como principal objetivo, validar un nuevo kit de PCR múltiple para el diagnóstico de la infección por SARS-Cov-2, basada en la detección de los genes S (espícula), N y RdRp (región Orf1ab) y Ribonucleasa P humana (RnasaP, como control interno de extracción y pureza del ácido nucleico, así como marcador de inhibición de PCR), y comparar los resultados con el kit de PCR múltiple actualmente utilizado en nuestro

laboratorio que detecta los genes E, N y RdRp (región Orf1ab) expresados por SARS-Cov-2 (Seegene, Werfen).

# Metodología

Se analizará la sensibilidad, especificidad, así como la comparación de los ciclos umbrales de amplificación (Cycle threshold, Ct) utilizando las dos técnicas de amplificación.

**Diseño y Población de estudio**

Estudio retrospectivo en el que se analizarán 200 muestras al azar con resultado conocido (100 muestras con resultado positivo para la detección de SARS-CoV-2 y 100 muestras negativas) y se compararán con los resultados obtenidos con el kit de RT-PCR utilizado en nuestro laboratorio (Seegene, Werfen).

**Procedimiento**

Extracción de ARN: La extracción de ARN viral se realizará a partir de muestras de exudado nasofaríngeo tomadas de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2 utilizando un sistema de extracción de ácidos nucleicos con bolas magnéticas (Genolution, Alifax) con el fin de obtener un eluido de 50 µL.

El ARN extraído se almacenará a -80ºC hasta su utilización en la reacción de RT-PCR.

La amplificación del RNA extraído se llevará a cabo mediante la realización de RT-PCR en un termociclador CFX-96 (BioRad) siguiendo las condiciones de amplificación suministradas por el fabricante (documentación aportada).

**Ventajas de la PCR en tiempo real de estudio frente a las implementadas en el laboratorio**

Las ventajas de la RT-PCR en estudio son las siguientes:

- Detección de 2 genes específicos de SARS-CoV-2 (gen S y Orf1ab) en comparación con la utilizada en el laboratorio (gen Orf1ab).
- MasterMix liofilizada en el pocillo con el consecuente ahorro de tiempo a la hora de preparar e iniciar el proceso de amplificación, ventaja importante ya que no hay que preparar MasterMix y únicamente hay que rehidratar la mezcla con agua libre de RNasas.

- Control interno que con amplificación de Ribonucleasa P que permite obtener información sobre la celularidad y en consecuencia tener una idea de la calidad de la muestra recogida.

**Análisis de los resultados**

Se compararán los resultados obtenidos entre la técnica a validar y la técnica actualmente utilizada en el laboratorio (Seegene, Werfen), Para ello, se diseñará una tabla de Excel con los resultados obtenidos por ambos métodos de las muestras convenientemente anonimizadas. En la tabla figurará el código de cada muestra y los valores de Ct por ambas técnicas. Finalmente se darán datos de sensibilidad y especificidad.

Una vez que el estudio sea aprobado por el CEIM se realizará la validación de la nueva técnica siguiendo el siguiente cronograma:

| | Periodo de una semana | | | | | Periodo de una semana | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L | M | X | J | V | L | M | X | J | V |
| Selección de las muestras y elaboración base de datos | X | X | | | | | | | | |
| Extracción ác nucleicos | | | X | X | | | | | | |
| Realización de RT-PCR | | | | | X | | | | | |
| Análisis de datos | | | | | | X | X | | | |
| Elaboración de tablas | | | | | | | | X | | |
| Elaboración de informe y conclusiones finales | | | | | | | | | X | X |

**Aspectos éticos y legales**

En este trabajo no intervienen pacientes o sujetos humanos ni está incluido en un ensayo clínico.

Se diseñará una base de datos, asignando un código a cada muestra de manera que los datos sean anonimizados.

Este estudio se va a realizar conforme a la legislación de la UE sobre datos personales, en concreto la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, el Real Decreto 1720/2007, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. Se respetarán las normativas en materia de

bioética según la declaración de Helsinki, el informe de Belmont, el convenio de Oviedo sobre los derechos humanos y la biomedicina y la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. Se mantendrá absoluta confidencialidad y reserva sobre cualquier dato que pudiera conocer con ocasión de la realización del trabajo, especialmente los de carácter personal, que no se utilizará con fin distinto al que esté determinado, ni tampoco ceder a otros ni siquiera a efectos de conservación.

**Conflicto de intereses**

IHT Medical S.A. proporciona el kit “Strong Step” Multiplex Real Time PCR para la detección de tres genes de SARS-Cov-2 para su uso en el estudio sin estar implicado en el análisis de los resultados ni en la selección de las muestras del estudio.

También aporta una cantidad de 1500 € al Sº de Microbiología para el desarrollo del estudio.