

ARTÍCULO ORIGINAL

Método rápido y directo para detección de variantes delta y ómicron BA.1 por RT-PCR en tiempo real

Fast and direct method for the detection of the SARS-CoV-2 Delta and Omicron BA.1 variants by real-time RT-PCR

Chialva, Constanza Soledad^{1*}; Galdi, Mónica Ana María¹; Buscalia, María Laura¹, Quiroz, Héctor Magno¹

¹Biocientífica S.A. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Constanza Soledad Chialva, Biocientífica S.A., Iturri 232, CABA; chialva@biocientifica.com.ar

Resumen Introducción: La mayoría de las pruebas de RT-PCR utilizadas por los laboratorios comerciales y de salud pública detectan si una persona porta el virus SARS-CoV-2, pero no pueden determinar de qué variante se trata. Debido a esto, puede resultar de interés contar con pruebas que faciliten la identificación de una de las dos variantes de preocupación, con mayor circulación en la actualidad: delta y ómicron. Objetivos: Desarrollar una prueba comercial, de uso exclusivo en investigación, para la detección de las variantes delta y ómicron BA.1. Materiales y métodos: Se seleccionaron cebadores y sondas para detectar una región única y específica, con mutaciones del gen que codifica para la proteína *Spike* en las variantes delta y ómicron BA.1, y su versión sin mutación. Se diseñó un producto que contiene todos los componentes necesarios para detectar y amplificar ARN viral mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Se llevaron a cabo las validaciones analíticas, empleando material sintético de cada variante, y las validaciones clínicas, usando un panel de 110 muestras positivas para SARS-CoV-2, previamente secuenciadas para clasificación de sus variantes. Resultados: Se desarrolló y validó un método rápido, directo y accesible para la detección de las variantes delta y ómicron BA.1 mediante RT-PCR en tiempo real, con un límite de detección menor que 10 cp/μL y una alta sensibilidad y especificidad (100%). Conclusiones: Las pruebas basadas en RT-PCR en tiempo real se pueden usar para monitorear rápidamente las variantes de preocupación de SARS-CoV-2 en países de recursos limitados, pero requieren actualizaciones a medida que surgen nuevas variantes.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, variantes.

Abstract Introduction: Most of the RT-PCR tests used by commercial and public health laboratories detect if a person carries the SARS-CoV-2 virus but cannot determine the variant. Thus, it may be of interest to have tests that facilitate the identification of one of the two main variants of concern with the highest circulation today: Delta and Omicron. Objectives: The aim of this study was to develop a commercial test, for research use only, for the detection of the Delta and Omicron BA.1 variants. Materials and methods: Primers and probes were selected to detect a unique and specific region with mutations of the gene encoding the *Spike* protein in the Delta and Omicron BA.1 variants, and its version without mutation. A product containing all the necessary components was designed to detect and amplify viral RNA using the real-time RT-PCR technique. Analytical validations were performed with synthetic material of each variant and clinical validations with a panel of 110 samples positive for SARS-CoV-2, previously sequenced for classification of its variants. Results: A fast, direct, and accessible method was developed and validated for the detection of the Delta and Omicron BA.1 variants by real-time RT-PCR, with a detection limit of less than 10 cp/μL and high sensitivity and specificity (100%). Conclusions: Real-time RT-PCR-based tests can be used to rapidly monitor SARS-CoV-2 variants of concern in resource-limited countries, although they require updates as new variants emerge.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, variants.

Introducción

La mayoría de las pruebas de RT-PCR utilizadas por los laboratorios comerciales y de salud pública detectan si una persona porta el virus SARS-CoV-2, pero no pueden determinar de qué variante se trata. Para llevar a cabo la identificación de variantes, es necesario recurrir a un ensayo adicional para el diagnóstico en vigilancia epidemiológica. Por esto, una vez determinada la presencia del virus en la muestra, puede resultar de interés la identificación de una de las dos variantes de preocupación (VOC), con mayor circulación en la actualidad: delta y ómicron, no solo por su peligrosidad para el paciente, sino también por la alta transmisibilidad en la comunidad, lo que constituye uno de los mayores problemas para controlar los brotes de COVID-19^{1,3}.

Actualmente, la técnica *gold standard* para la identificación de variantes de SARS-CoV-2 consiste en la secuenciación de genoma completo junto a la secuenciación de próxima generación (NGS), sin embargo, estas técnicas son muy costosas, y los resultados se obtienen a partir de 3-5 días en laboratorios de alta complejidad y poco accesibles a la comunidad; asimismo, estas tecnologías presentan dificultades, si se consideran la instrumentación específica, recursos y habilidades de análisis de datos⁴.

Por otro lado, la técnica basada en RT-PCR en tiempo real puede proveer resultados rápidos en la identificación de VOC y/o variantes de interés (VOI), al tratarse de un método directo, en el mismo formato de RT-PCR en tiempo real que las pruebas usadas para el diagnóstico clínico, de fácil interpretación y que puede ser realizado por el mismo laboratorio que hizo el diagnóstico inicialmente⁵⁻⁷.

En este trabajo, reportamos el desarrollo de una prueba comercial y de uso exclusivo en investigación (RUO) para la detección rápida, directa y accesible de las variantes de circulación comunitaria en Argentina, delta [linaje B.1.617.2] y ómicron [linaje B.1.1.529, sublinaje BA.1]⁸. Esta prueba se diferencia de otros productos europeos, asiáticos o de Estados Unidos que dominan el mercado^{9,10}, porque estos están diseñados para detectar variantes frecuentes en esos países, pero que son de escasa o nula circulación en Argentina. Los kits desarrollados por la empresa responden a la identificación de las variantes de circulación actual, según los informes epidemiológicos nacionales, y utilizan para la validación muestras de pacientes residentes en el país. De este modo, los resultados de las pruebas permiten la asignación provisional de casos como posibles VOC y también, comprender rápidamente la dinámica de contagios que ocurre en la población local.

Materiales y métodos

Se seleccionaron cebadores y sondas para detectar una región única y específica, con mutaciones del gen que codifica para la proteína *Spike* (S) en las variantes delta (clados 21A, 21I, 21J) y ómicron BA.1 (clado 21K)¹¹ y en su versión sin mutación, de acuerdo con el procedimiento *in silico* que se describe a continuación. Se crearon alineamientos múltiples de secuencias mediante *Clustal Omega 2.0.12*¹², utilizando da-

tos de secuenciación del genoma de referencia de SARS-CoV-2 [GenBank, número de acceso NC_045512.2] y de cada una de las variantes con relevancia en la región geográfica: alpha, gamma, delta, lambda y ómicron (N=100)¹³. Se verificó la presencia de las mutaciones reportadas para delta y ómicron BA.1 que no estuvieran presentes en las secuencias de las otras variantes. Luego, se diseñaron diversos modelos de cebadores y sondas que permitieran amplificar específica e inequívocamente dichas regiones, empleando la herramienta *Primer-BLAST* disponible en la página web del Center for Biotechnology Information [NCBI] y el programa *Oligo Explorer 1.4* [Gene LinkTM]. Para evaluar el correcto alineamiento de los cebadores y sondas con el genoma de interés, se utilizó la herramienta *online* para el análisis de secuencias *MultAlin*¹⁴. El análisis de las características de los cebadores y sondas como formación de dímeros, temperatura de fusión o *melting* y el contenido de GC fue llevado a cabo con el programa *Oligo Analyzer 1.0.2* [Gene LinkTM]. La especificidad teórica del sistema se investigó usando *BLAST* contra la base de datos de nucleótidos del NCBI. Para la formulación de los demás componentes de la prueba, se utilizó el diseño para el producto Schep SARS-CoV-2 RT-PCR Duo, que fuera anteriormente desarrollado, aprobado por ANMAT y comercializado por Biocientífica S.A. [inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica [R.P.P.T.M.] bajo el número PM 78-222].

Para el desarrollo y la validación analítica del desempeño de la prueba y para proveer al usuario como control positivo (CP) específico incluido en la prueba, se utilizaron fragmentos génicos [gBlocks[™], IDT] de ADN de doble cadena de 200 - 250 pb, diseñados de acuerdo con la región genómica a detectar tanto para la variante delta como para la ómicron BA.1. Se validó analíticamente el desempeño respecto de muestras sin mutación o *wild type*, utilizando material de referencia que fuera provisto por ATCC- ítem NR-52285 [ARN genómico de SARS-CoV-2, aislamiento USA-WA1/2020, GenBank, número de acceso MN985325]. Todos los ensayos fueron realizados en un equipo Rotor Gene Q [QIAGEN GmbH; Hilden, Alemania], siguiendo el programa térmico previamente establecido para el producto Schep SARS-CoV-2 RT-PCR Duo [Biocientífica S.A.]. Un resultado positivo para la presencia de material genético del blanco a detectar se indica mediante la presencia de una curva de amplificación de PCR en tiempo real y un valor de umbral de ciclo asociado [*Cycle threshold*, Ct]. Los resultados se analizaron por medio del programa de visualización *Rotor-Gene Q Pure Detection 2.3.1*, que interpreta automáticamente la cinética de la prueba para proporcionar un resultado cualitativo para la presencia o ausencia de la mutación del virus SARS-CoV-2.

Para llevar a cabo la validación clínica de detección de variantes de SARS-CoV-2, se utilizó un panel conformado por 110 muestras de ARN extraído a partir de hisopados nasofaríngeos, recolectadas durante el período 2020-2022 y cedidas por el Laboratorio de Virología / Secuenciación del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Todas estas muestras informadas como positivas para el virus SARS-CoV-2 fueron clasificadas de acuerdo

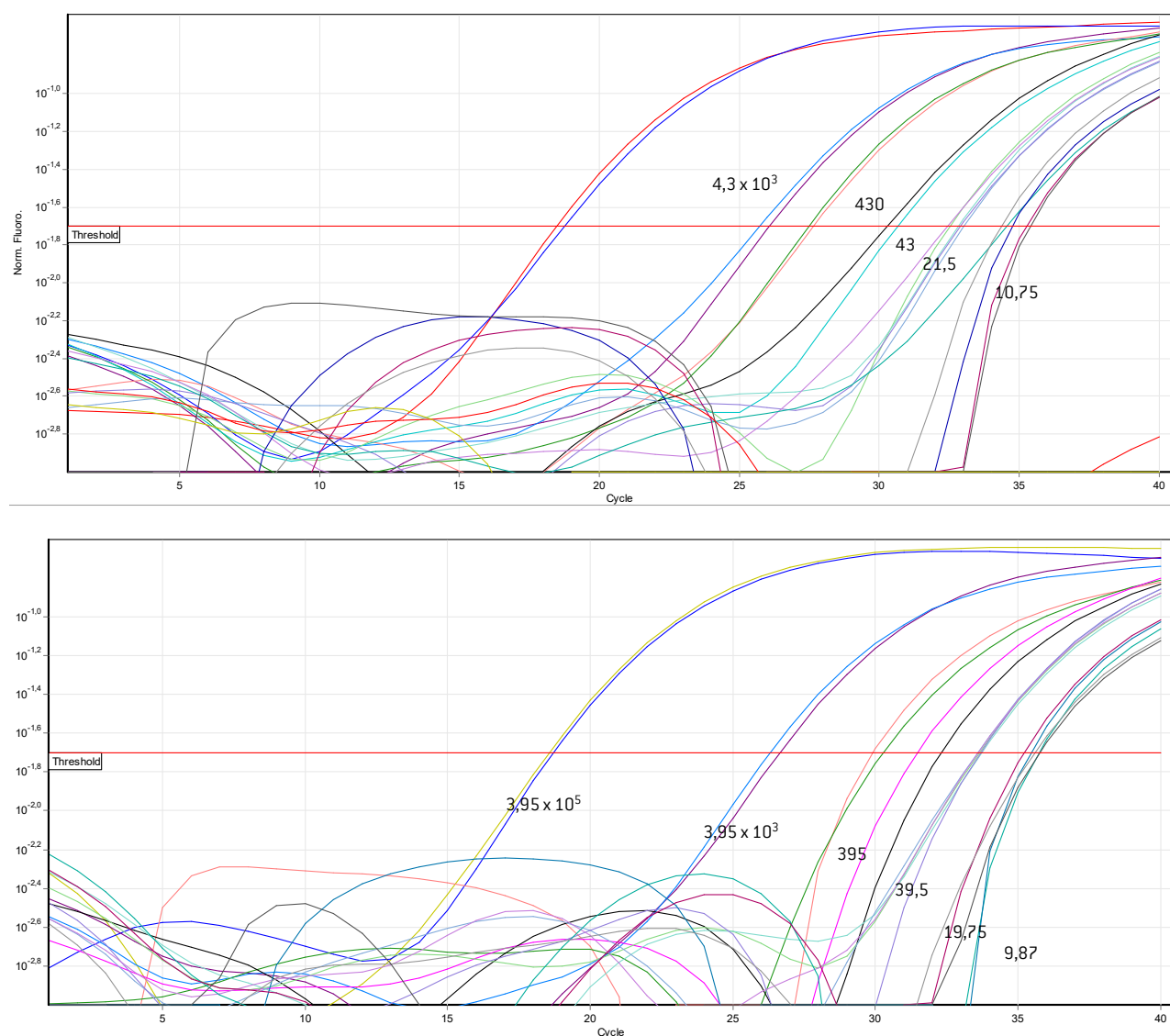
con la presencia de mutaciones detectadas por secuenciación parcial del gen S o del genoma completo e incluían 15 muestras correspondientes a la variante alpha [B.1.1.7], 21 a la variante gamma [P.1], 25 a la variante delta [B.1.617.2], 19 a la variante lambda [C.37] y 30 a la variante ómicron BA.1 [B.1.1.529]. Asimismo, se empleó un número de ocho muestras negativas, aunque la intención de la prueba no sea de diagnóstico clínico.

La extracción de ARN total de las muestras clínicas fue realizada de manera manual, automatizada o mediante perlas magnéticas, con métodos basados en columnas de sílice. La detección de SARS-CoV-2 se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, empleando un termociclador CFX (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y pruebas diagnósticas basadas en la amplificación de diversos genes de SARS-CoV-2 [E, ORF1ab, RdRp, S y/o N]. Las muestras con un Ct <40 para al menos dos obje-

tivos genéticos se definieron como positivas. Asimismo, se emplearon pruebas de antígeno para la detección de muestras positivas [4/110]. Algunas muestras fueron realizadas por secuenciación parcial del gen que codifica para la proteína S por método tradicional de Sanger, siguiendo el protocolo de secuenciación recomendado por el CDC¹⁵, mediante un secuenciador ABI 3500 (ThermoFisher Scientific). Para otras muestras, se llevó a cabo la secuenciación de genomas completos y se utilizó el protocolo de amplificación y secuenciación de ARTIC para MinION modificado¹⁶ y de Midnight para MinION¹⁷ [Oxford Nanopore Technologies]. También se utilizó el kit Illumina COVIDSeq Test IVD¹⁸ en un secuenciador NextSeq [Illumina].

Para establecer el rango de uso del kit, se aplicó un análisis de regresión lineal, que se realizó con el programa Prism, versión 7 [GraphPad Software, San Diego, CA, USA].

Figura 1. Curvas de amplificación de concentraciones decrecientes de los controles positivos específicos de cada variante.



► Las curvas de amplificación muestran la típica forma sigmoidea en escala logarítmica, en todo el rango de concentraciones ensayado. En el gráfico superior (A), se muestran las curvas para la detección de la variante delta y en el gráfico inferior (B), se muestran las curvas para la detección de la variante ómicron BA.1. Las concentraciones se expresan en número de copias por microlitro [cp/μL].

Tabla I. Panel de muestras empleadas para la validación clínica. Se incluyen los valores de Ct de las determinaciones diagnósticas iniciales y de las determinaciones para la identificación de variantes con las pruebas desarrolladas

CÓDIGO	MUESTRA POSITIVA: VARIANTE	CT	KIT DELTA - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT DELTA - DETECCIÓN WT (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN WT (CT)	CÓDIGO	MUESTRA POSITIVA: VARIANTE	CT	KIT DELTA - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT DELTA - DETECCIÓN WT (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN WT (CT)
1	ALPHA	23,30	-	23,51	-	24,00	56	DELTA	24,20	25,59	-	-	25,70
2	ALPHA	24,18	-	25,60	-	26,15	57	DELTA	22,00	21,63	-	-	22,20
3	ALPHA	24,36	-	24,72	-	25,87	58	DELTA	19,00	17,87	-	-	18,66
4	ALPHA	19,00	-	19,34	-	22,54	59	DELTA	20,00	19,65	-	-	20,49
5	ALPHA	<30	-	27,68	-	29,75	60	DELTA	19,00	19,03	-	-	19,68
6	ALPHA	22,00	-	22,34	-	24,67	61	DELTA	19,00	19,60	-	-	20,59
7	ALPHA	21,00	-	21,98	-	23,57	62	DELTA	14,00	13,82	-	-	15,50
8	ALPHA	21,00	-	21,87	-	22,98	63	DELTA	23,00	22,29	-	-	23,16
9	ALPHA	22,57	-	20,77	-	23,71	64	DELTA	18,00	17,90	-	-	17,66
10	ALPHA	18,26	-	19,39	-	25,25	65	DELTA	21,50	21,54	-	-	21,90
11	ALPHA	20,00	-	18,68	-	23,45	66	DELTA	16,40	15,75	-	-	16,40
12	ALPHA	<30	-	28,90	-	30,56	67	DELTA	24,00	22,97	-	-	22,99
13	ALPHA	<30	-	27,84	-	29,63	68	DELTA	21,00	19,42	-	-	21,30
14	ALPHA	test de ag positivo	-	25,60	-	27,20	69	DELTA	19,00	17,59	-	-	19,20
15	ALPHA	test de ag positivo	-	27,61	-	28,95	70	DELTA	22,40	21,34	-	-	25,63
16	LAMBDA	test de ag positivo	-	28,64	-	30,02	71	DELTA	20,00	20,25	-	-	21,00
17	LAMBDA	31,00	-	31,56	-	32,98	72	DELTA	28,00	27,01	-	-	28,20
18	LAMBDA	20,00	-	21,17	-	23,25	73	DELTA	23,00	23,68	-	-	23,50
19	LAMBDA	16,10	-	17,65	-	19,32	74	DELTA	26,00	22,25	-	-	26,00
20	LAMBDA	27,00	-	28,56	-	29,67	75	DELTA	19,00	20,58	-	-	21,00
21	LAMBDA	21,00	-	21,96	-	23,58	76	DELTA	26,00	24,02	-	-	26,12
22	LAMBDA	20,50	-	21,48	-	23,87	77	DELTA	23,00	19,89	-	-	22,90
23	LAMBDA	24,00	-	24,97	-	26,58	78	DELTA	21,00	19,72	-	-	21,30
31	LAMBDA	19,10	-	20,48	-	22,67	79	DELTA	23,00	22,37	-	-	23,20
32	LAMBDA	13,70	-	13,50	-	15,62	80	DELTA	21,00	23,40	-	-	23,60
33	LAMBDA	17,00	-	18,45	-	19,52	81	OMICRON	21,00	-	22,30	26,09	-
34	LAMBDA	19,00	-	19,57	-	20,11	82	OMICRON	16,00	-	16,20	17,79	-

CÓDIGO	MUESTRA POSITIVA: VARIANTE	CT	KIT DELTA - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT DELTA - DETECCIÓN WT (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN WT (CT)	CÓDIGO	MUESTRA POSITIVA: VARIANTE	CT	KIT DELTA - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT DELTA - DETECCIÓN WT (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DETECCIÓN WT (CT)
35	LAMBDA	14,30	-	18,41	-	16,70	83	OMICRON	17,00	-	16,85	16,87	-
36	LAMBDA	19,70	-	18,90	-	21,06	84	OMICRON	26,00	-	25,90	32,85	-
42	LAMBDA	17,00	-	17,94	-	18,21	85	OMICRON	13,69	-	14,12	18,88	-
43	LAMBDA	20,00	-	21,54	-	21,99	86	OMICRON	18,22	-	19,30	20,91	-
45	LAMBDA	17,00	-	18,26	-	18,94	87	OMICRON	21,75	-	23,04	29,28	-
51	LAMBDA	21,70	-	22,02	-	22,89	88	OMICRON	17,49	-	19,00	21,45	-
55	LAMBDA	21,00	-	21,90	-	22,37	89	OMICRON	16,06	-	18,25	19,72	-
24	GAMMA	25,49	-	26,03	-	27,00	90	OMICRON	17,41	-	17,60	22,13	-
25	GAMMA	25,00	-	25,25	-	26,04	91	OMICRON	17,00	-	18,96	22,99	-
26	GAMMA	17,00	-	18,33	-	19,10	92	OMICRON	20,60	-	22,31	25,15	-
27	GAMMA	18,00	-	18,54	-	19,14	93	OMICRON	18,50	-	20,30	25,12	-
28	GAMMA	19,30	-	19,24	-	20,48	94	OMICRON	18,80	-	23,50	25,04	-
29	GAMMA	24,50	-	24,66	-	28,16	95	OMICRON	22,40	-	23,60	25,08	-
30	GAMMA	23,80	-	27,39	-	31,86	96	OMICRON	21,10	-	22,30	27,20	-
37	GAMMA	21,20	-	20,10	-	22,32	97	OMICRON	21,00	-	22,96	28,48	-
38	GAMMA	21,00	-	21,25	-	23,27	98	OMICRON	20,10	-	21,36	26,12	-
39	GAMMA	17,00	-	17,93	-	18,99	99	OMICRON	17,60	-	19,40	25,77	-
40	GAMMA	27,00	-	27,89	-	29,35	100	OMICRON	16,60	-	18,50	20,47	-
41	GAMMA	test de ag positivo	-	26,54	-	28,14	101	OMICRON	26,00	-	27,85	31,42	-
44	GAMMA	22,00	-	21,95	-	24,14	102	OMICRON	30,00	-	30,04	34,96	-
46	GAMMA	16,00	-	16,54	-	18,54	103	OMICRON	23,00	-	21,00	24,82	-
47	GAMMA	21,00	-	22,15	-	24,68	104	OMICRON	24,00	-	24,92	31,38	-
48	GAMMA	17,00	-	17,94	-	20,87	105	OMICRON	24,00	-	22,91	29,74	-
49	GAMMA	18,00	-	18,67	-	21,34	106	OMICRON	23,00	-	21,54	29,18	-
50	GAMMA	20,60	-	20,34	-	23,01	107	OMICRON	24,00	-	20,74	27,38	-
52	GAMMA	20,00	-	19,95	-	22,98	108	OMICRON	19,00	-	21,00	28,45	-
53	GAMMA	18,00	-	18,12	-	20,14	109	OMICRON	24,00	-	26,41	26,20	-
54	GAMMA	22,00	-	22,68	-	24,87	110	OMICRON	22,70	-	22,00	24,23	-

CÓ- DIGO	MUESTRA	CT	KIT DELTA - DETEC- CIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT DELTA - DETEC- CIÓN WT (CT)	KIT OMICRON BA.1 - DE- TECCIÓN MUTACIÓN (CT)	KIT OMI- CRON BA.1 - DETEC- CIÓN WT (CT)
1054	Negativa	-	-	-	-	-
1061	Negativa	-	-	-	-	-
1090	Negativa	-	-	-	-	-
1093	Negativa	-	-	-	-	-
1094	Negativa	-	-	-	-	-
1096	Negativa	-	-	-	-	-
1136	Negativa	-	-	-	-	-
1137	Negativa	-	-	-	-	-
1138	Negativa	-	-	-	-	-
1140	Negativa	-	-	-	-	-

Resultados

Se desarrolló una prueba comercial RUO para la detección rápida y directa de las variantes delta y ómicron BA.1, utilizando la misma muestra sobre la que se hace el diagnóstico original. La prueba está basada en la tecnología *One-Step* RT-PCR, que combina en un solo paso la retrotranscripción de ARN para generar ADN complementario (ADNc) mediante la enzima transcriptasa reversa (RT) y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias específicas con la hidrólisis de sondas para la detección en tiempo real⁵⁻⁷. Todos los componentes de la prueba son entregados como un conjunto de reactivos listos para usar. Se escoge el formato duplex para la detección de cada variante y la prueba se basa en las diferencias de la secuencia génica entre la variante y la secuencia original de SARS-CoV-2 (NC_045512.2). En el diseño de las sondas se utilizó el fluoróforo FAM (canal verde, longitud de onda de emisión: 520 nm) para identificar la presencia de

la variante y el fluoróforo Texas Red (canal naranja, longitud de onda de emisión: 603 nm) para identificar la presencia de material viral *wild type*. Entre los componentes se entrega, además, un control positivo (CPD o CP01) que contiene ADN de doble cadena, correspondiente a la mutación a detectar (delta u ómicron BA.1, en cada prueba), un CP con ARN correspondiente al virus sin la mutación (CP *wild type*) y un control negativo (CN) para validar cada ensayo.

A continuación, se informan las principales características de desempeño diagnóstico de las pruebas. Para confirmar la funcionalidad de los conjuntos de cebadores y sondas, se demostró la existencia de una relación lineal entre el valor de Ct obtenido mediante la amplificación de material genético y el logaritmo de su concentración. Para ello se realizaron curvas de amplificación, utilizando concentraciones decrecientes del CP de las variantes delta u ómicron BA.1, en un rango de detección comprendido entre 10^5 cp/μL y 10^1 cp/μL (Figura 1).

La regresión lineal para el conjunto de oligos para delta u ómicron BA.1 demostró un alto grado de linealidad ($R^2=0,98$ y $R^2=0,99$, respectivamente), con un valor de la pendiente de $-3,1 \pm 0,21$ y $-3,4 \pm 0,2$, respectivamente, lo que indica una eficiencia del 93,4% y del 102,4%, respectivamente (Figura 2). El alto valor de los coeficientes de regresión obtenidos y la observación de curvas típicas de fluorescencia con una baja dispersión de valores de Ct en réplicas indica la utilidad de cada prueba en un rango de detección superior a 4 órdenes de magnitud ($10^5 - 10^1$ cp/μL) o unidades logarítmicas, con valores de Ct menores o iguales a 38, con desvíos estándar para un mismo nivel menores o iguales a 1 unidad, hasta concentraciones de 10 cp/μL. Los valores de Ct obtenidos para la detección de bajos niveles de material genético específico dan una idea de la sensibilidad analítica de la técnica, con una estimación de que el LOD para ambas pruebas será inferior a 10 cp/μL.

A fin de demostrar la capacidad de la prueba para detectar

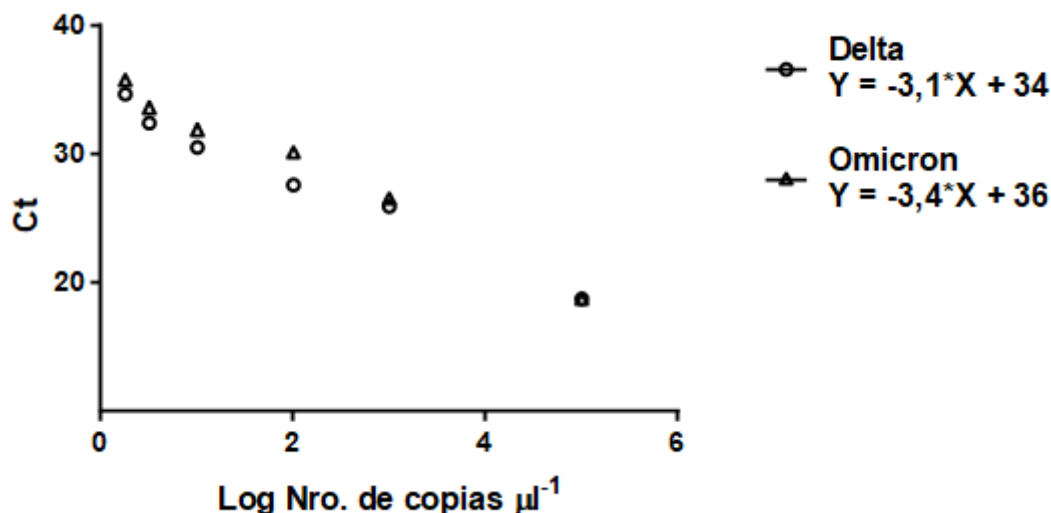
Tabla II. Muestras identificadas por secuenciación como variante delta.

110 muestras	Resultado de muestras secuenciadas	Sensibilidad		Especificidad
		Positivas	Negativas	
Prueba de detección de delta	Positivas	25	0	100 %
	Negativas	0	85	100 %

Tabla III. Muestras identificadas por secuenciación como variante ómicron BA.1.

110 muestras	Resultado de muestras secuenciadas	Sensibilidad		Especificidad
		Positivas	Negativas	
Prueba de detección de ómicron BA.1	Positivas	30	0	100 %
	Negativas	0	80	100 %

Figura 2. Curva de calibración para el conjunto de cebadores y sondas utilizados para la cuantificación de la sensibilidad analítica.



► La regresión lineal se utilizó para calcular la eficiencia de la reacción de amplificación. Los valores de Ct fueron graficados contra el Log del número de copias μl^{-1} .

concentraciones bajas de material genético sin mutación, se utilizaron diluciones del CP *wild type* provisto con el *kit*, así como diluciones del material de referencia certificado de concentración similar. De acuerdo con los resultados obtenidos en estas experiencias, es posible detectar material genético correspondiente al linaje Wuhan, cuando este está presente, en una concentración de al menos 2,3 cp/ μL para la prueba de la variante delta y de al menos 23,5 cp/ μL para la prueba de la variante ómicron BA.1 (Figura 3). Estos resultados se obtuvieron al ensayar concentraciones aproximadas a 2350 cp/mL del CP *wild type* en la prueba de la variante delta, que obtuvo 10/10 valores aceptables de CT, mientras que para la prueba de ómicron BA.1, en la concentración 2350 cop/mL se obtuvieron solo 2/10 valores aceptables, por lo que se ensayó una concentración 10 veces mayor, para la cual se obtuvieron 10/10 resultados aceptables. Asimismo, se comprobó que los ensayos no presentan amplificación en el canal específico para la mutación en estudio, cuando se utiliza como muestra el control *wild type*, por lo que se infiere que la prueba es analíticamente específica.

Por otro lado, los análisis de alineamiento llevados a cabo sobre las secuencias de genoma completo de las variantes presentes en la región geográfica, con las secuencias de los cebadores y sondas para detectar cada mutación, demostraron que no hay reacción cruzada sobre un N=100 de secuencias de genomas para alfa, gamma, lambda, y delta y ómicron BA.1 para las pruebas respectivas.

A fin de evaluar la sensibilidad clínica de cada prueba, se recurrió a un panel de 110 muestras de ARN. Estas correspondían a 110 casos que fueron confirmados como positivos para SARS-CoV-2 por RT-PCR y prueba de antígeno, secuenciados y clasificados en VOC o VOI (Tabla I).

Discriminación de mutantes y no mutantes para prueba

variante delta

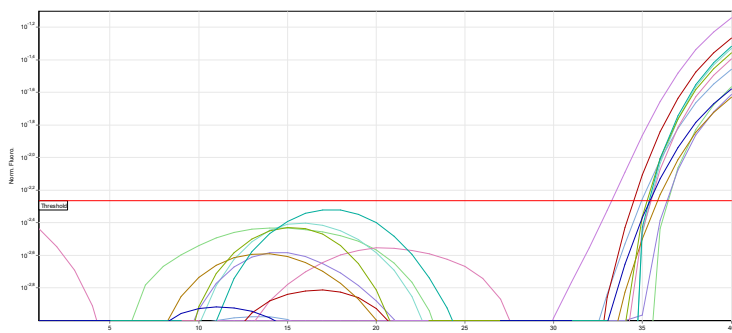
Entre las 110 muestras clínicas clasificadas, 25 contenían la mutación de la variante delta y 85 no contenían dicha mutación [*wild type*]. La prueba de detección arrojó que, en presencia de ARN de una muestra clínica clasificada como *delta* o cuando se agregó el CP para delta, hubo detección con la sonda específica para la mutación de delta (canal verde); mientras que en presencia de muestras *wild type* para la mutación o del CP *wild type*, hubo detección con la sonda específica para la secuencia sin mutación (canal naranja). Con un formato dualplex, se obtuvieron resultados concordantes para las 25 muestras de delta clasificadas por secuenciación con un 100% de certeza, y se logró la discriminación entre presencia o ausencia de la mutación para dicha variante (Tabla II). A modo ejemplo, se representa la amplificación de la muestra de un paciente, clasificada como variante delta, y sus respectivos controles (Figura 4).

Discriminación de mutantes y no mutantes para prueba variante ómicron BA.1

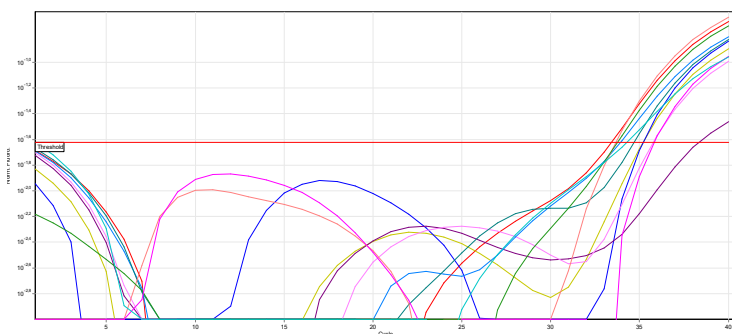
Entre las 110 muestras clínicas clasificadas, 30 contenían la mutación de la variante ómicron BA.1 y 80 eran *wild type*. El ensayo llevado a cabo, en presencia de muestras clínicas clasificadas como variante ómicron BA.1 o cuando se agregó el CP para ómicron BA.1, mostró detección con la sonda específica para la mutación ómicron BA.1 (canal verde). Por el contrario, para muestras sin la mutación o el CP *wild type*, hubo detección con la sonda específica para la secuencia sin mutación (canal naranja). La prueba permitió clasificar las 30 muestras de ómicron BA.1, discriminando si contenían o no contenían la mutación, en concordancia con los resultados de secuenciación. Los resultados del formato

Figura 3. Curvas de amplificación para la cuantificación de la sensibilidad analítica para el control positivo sin la mutación (*wild type*).

Prueba Detección Omicron BA.1			
Réplica	Muestra	Ct	Promedios Ct
1	CP Wild type	33,43	34,985
2	CP Wild type	35,2	
3	CP Wild type	35,21	
4	CP Wild type	38,34	
5	CP Wild type	35,77	
6	CP Wild type	33,95	
7	CP Wild type	34,71	
8	CP Wild type	33,65	
9	CP Wild type	33,77	
10	CP Wild type	35,82	
11	Material de referencia 23500 cop/mL	34,3	34,35
12	Material de referencia 23500 cop/mL	34,5	
13	Material de referencia 23500 cop/mL	34,25	



Prueba Detección Delta			
Réplica	Muestra	Ct	Promedios Ct
1	CP Wild type	36,39	35,26
2	CP Wild type	35,39	
3	CP Wild type	34,96	
4	CP Wild type	36,34	
5	CP Wild type	33,25	
6	CP Wild type	35,43	
7	CP Wild type	34,48	
8	CP Wild type	35,84	
9	CP Wild type	35,23	
10	CP Wild type	35,32	
11	Material de referencia 2350 cop/mL	35,41	34,92
12	Material de referencia 2350 cop/mL	34,33	
13	Material de referencia 2350 cop/mL	35,01	



▶ Las curvas de amplificación conservan la típica forma sigmoidea en escala logarítmica, usando el nivel mínimo de material genético correspondiente al linaje Wuhan que es posible detectar en cada prueba de detección.

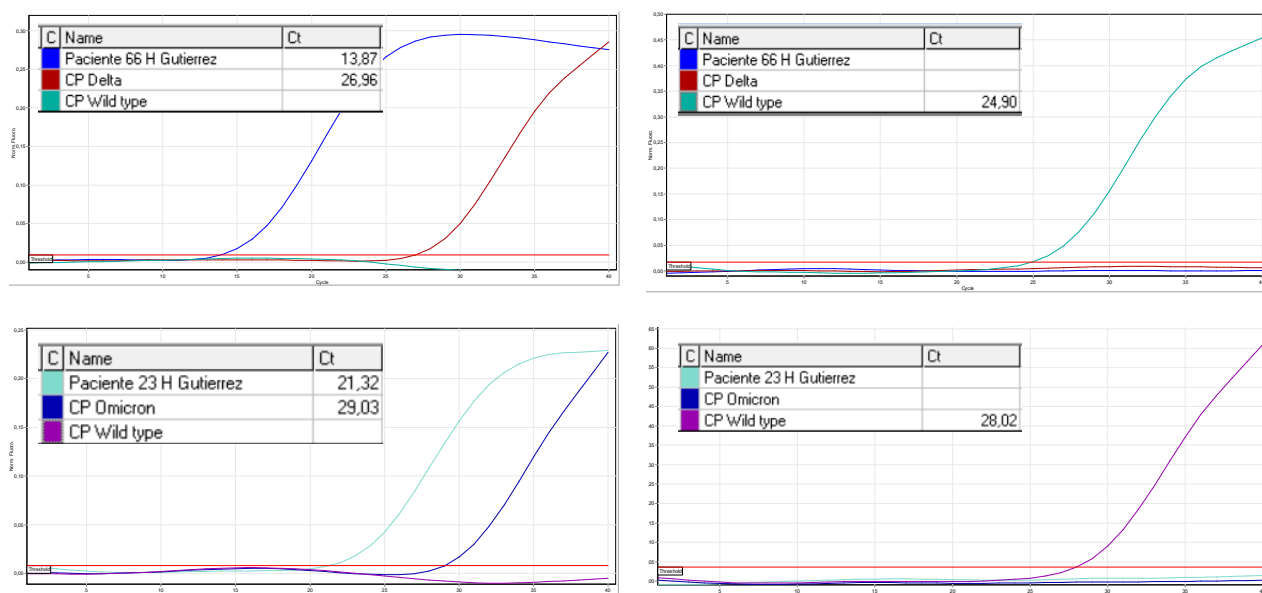
dualplex se obtuvieron con un 100 % de certeza (Tabla III). A modo de ejemplo, se representa la amplificación de la muestra de un paciente, clasificada como variante ómicron BA.1, y sus respectivos controles (Figura 4).

La concordancia de los resultados arrojados por la prueba de variantes sobre el panel de 110 muestras comparado con la clasificación por secuenciación correspondió a un 100 %. Debido a que la discrepancia entre los resultados de secuenciación y pruebas de RT-PCR para discriminar variantes subyace en la carga viral¹⁹, se establece una sensibilidad relativa del 100 % (110/110) y una especificidad del 100 % (110/110), considerando valores de Ct entre 15 - 38 para la prueba de identificación. Sin embargo, si se reduce el rango de detección hasta un Ct ≤32, la sensibilidad de la prueba es de 98,18 % y la especificidad sigue siendo de 100 %, lo cual significa que no hay falsos positivos (Tabla I, II y III). Cabe destacar que la especificidad clínica fue confirmada realizando la prueba con muestras de ARN viral de variantes que no fueran delta u ómicron BA., para los ensayos de detección respectivos. También se incluyó en el panel un grupo de ocho muestras negativas. Ninguno de los virus de variantes previamente clasificadas por secuenciación mostró reactividad cruzada en la detección positiva de la prueba para las mutaciones de delta u ómicron BA.1. Al no haber existido ningún caso de falso positivo (Tabla I), este ensayo refuerza la especificidad observada en la validación clínica.

Discusión

La aparición recurrente de mutaciones en la proteína S del virus SARS-CoV-2 ha aumentado la actividad comprometida con el diagnóstico y control de infecciones del virus, incluidas las actividades de secuenciación sobre el genoma viral para vigilancia epidemiológica, en pacientes COVID-19 con reinfecciones o fallas de vacunación y en investigaciones de brotes¹. La identificación de variantes del virus, especialmente si los cambios afectan a la proteína S, proteína común en todas las vacunas aprobadas hasta la fecha, tiene importancia epidemiológica y clínica. En consecuencia, la detección rápida de variantes por métodos directos y más accesibles como RT-PCR en tiempo real resulta de importancia para las organizaciones sanitarias en el monitoreo de la epidemiología local, la toma de acciones y la adopción de medidas específicas para disminuir la transmisión comunitaria.

En nuestro país, la tercera ola fue inicialmente impulsada por la variante delta, sin embargo, la mayor transmisibilidad de ómicron resultó en el total desplazamiento de delta entre las semanas 1 - 3 de 2022, en todas las provincias del país estudiadas, y es actualmente la variante mayoritariamente detectada²⁰. De acuerdo con la información brindada por el proyecto PAIS en el último informe⁸, en las semanas del 09-11-21 al 15-02-22, de 1139 casos diagnosticados positivos, 915 casos correspondieron a la variante ómicron (80 %); 219 casos, a la variante delta (19 %) y tres casos (0,3 %), a las variantes mu (2) y lambda (1), mientras que otros dos fueron indeterminados. Estos datos se hallaron en con-

Figura 4. Ensayo de amplificación utilizando muestras clínicas.

► La curva de amplificación en el canal verde (A) y (C) muestra la amplificación por parte del conjunto de cebadores y sondas dirigidos a la secuencia con la mutación, en una muestra clínica positiva para SARS-CoV-19, clasificada como variante delta, y el control sintético CP delta (A), a la vez que en una muestra clínica positiva para SARS-CoV-19, clasificada como variante ómicron BA.1, y el control sintético CP ómicron BA.1 (C). La curva para la sonda dirigida a la secuencia sin mutación [control wild type] permanece sin señal de amplificación. La curva de amplificación en el canal naranja (B) y (D) muestra la detección por parte de la sonda dirigida a la secuencia sin mutación, usando el control wild type en ambas pruebas (B) y (D). En contraste, la sonda para las secuencias con la mutación permanece sin señal de amplificación.

sonancia con lo informado en el Reporte N° 29 de PAIS, y en ambos casos, el cambio de predominio de delta a ómicron fue abrupto. Además, todas las secuencias de la variante ómicron pertenecieron al sublinaje BA.1 o su derivado BA.1.1. Solo se detectó el sublinaje BA.2 en un caso.

En este trabajo, se demuestra que las pruebas desarrolladas por Biocientífica S.A. presentan un límite de detección menor que 10 cp/μL y una alta sensibilidad y especificidad clínica (100%) para detectar mutaciones en el gen que codifica para la proteína S de las variantes delta y ómicron BA.1, que es comparable con los resultados de secuenciación. A fin de lograrlo, se validó la capacidad de la prueba para identificar dicho material viral en un panel de 110 muestras clínicas con diagnóstico positivo obtenido por RT-PCR en tiempo real y/o pruebas de antígeno, posteriormente secuenciadas para ser clasificadas de acuerdo con su linaje.

Respecto de otras pruebas presentes en el mercado y de origen extranjero, los kits desarrollados por Biocientífica S.A. presentan la ventaja de identificar exclusivamente las variantes que circulan en la actualidad en nuestro territorio y lo hacen a partir de una única reacción. Esto se debe a que se utilizó información epidemiológica brindada por organismos de referencia nacionales y a que los kits se validaron con muestras clínicas secuenciadas de pacientes locales; por otro lado, las pruebas extranjeras^{9,10} requieren reacciones sucesivas para concluir la identificación de variantes, ya que se basan en la detección de múltiples mutaciones en una región del genoma que, por descarte, permiten realizar

la identificación. En cuanto a los parámetros de sensibilidad y especificidad, el análisis de cinco kits de origen extranjero para variantes arrojó una especificidad y sensibilidad del 100% y 96-100%, respectivamente⁹. Estos valores son comparables con los resultados obtenidos en la validación de los kits desarrollados por la empresa, teniendo en cuenta que se alcanza el 100% de especificidad y el 100% de sensibilidad al considerar un Ct de 38 como límite de rango de detección.

En entornos de recursos limitados, estos ensayos dual-plex de variantes son útiles como herramientas de detección rápida, directa y relativamente más económicas para identificar muestras que, de lo contrario, se identificarían por secuenciación. Nosotros sugerimos que esta prueba pueda ser implementada como una estrategia de *screening* para detectar mutaciones de SARS-CoV-2 con efectos biológicos patogénicos. Sin embargo, los fabricantes debemos estar atentos a responder a la aparición de nuevas variantes clave y reconocemos que NGS sigue siendo el estándar de oro.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Laura Valinotto y a la Dra. Mariana Viegas del Laboratorio de Virología / Secuenciación del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, quienes nos cedieron muestras clasificadas de SARS-CoV-2 de acuerdo con los lineamientos de WHO.

Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Guidance for surveillance of SARS-CoV-2 variants: interim guidance [Internet]. World Health Organization; 2021 Aug 09 [cited 2022 Mar 01]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343775>
2. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 Variants [Internet]. World Health Organization; 2022 [cited 2022 Mar 01]. Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
3. Islam SR, Prusty D, Manna SK. Structural basis of fitness of emerging SARS-CoV-2 variants and considerations for screening, testing and surveillance strategy to contain their threat. medRxiv 2021.
4. Armstrong GL, MacCannell DR, Taylor J, Carleton HA, Neuhaus EB, Bradbury RS, et al. Pathogen genomics in public health. *New England Journal of Medicine* 2019; 381: 2569-80.
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25: 2000045.
6. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson, SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): A systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed*. Online 2020; 41: 483–99.
7. Esbin MN, Whitney ON, Chong S, Maurer A, Darzacq X, Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA* 2020; 26: 771–83.
8. PAIS. Reporte N°30 - Vigilancia activa de variantes de SARS-CoV-2 [Internet]. Proyecto Argentino Interinstitucional de genómica de SARS-CoV-2; 2022 Feb 24 [cited 2022 Mar 01]. Available from: <http://pais.qb.fcen.uba.ar/reports.php#reporte30>
9. De Pace V, Bruzzone B, Orsi A, Ricucci V, Domnich A, Guarona G, et al. Comparative Analysis of Five Multiplex RT-PCR Assays in the Screening of SARS-CoV-2 Variants. *Microorganisms* 2022; 10: 306.
10. Kami W, Kinjo T, Arakaki W, Oki H, Motooka D, Nakamura S. Rapid and simultaneous identification of three mutations by the Novaplex™ SARS-CoV-2 variants I assay kit. *Journal of Clinical Virology* 2021; 141: 104877.
11. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* 2018; 34: 4121–3.
12. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science* 2018; 27: 135-45.
13. Khare S, Gurry C, Freitas L, Schultz MB, Bach G, Diallo A, et al. GISAID's Role in Pandemic Response. *China CDC Weekly* 2021; 3: 1049-51.
14. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res*. 1988; 16: 10881-90
15. Paden CR, Ta Y, Queen K, Zhang J, Li Y, Uehara A, et al. Rapid, Sensitive, Full-Genome Sequencing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases* 2020; 26: 2401-5.
16. Quick, J. nCoV-2019 sequencing protocol [Internet]. University of Birmingham; 2020 Aug 25 [cited 2022 Mar 01]. Available from: <https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-v3-locost-bp2l6n26rgqe/v3>
17. Oxford Nanopore Technologies. PCR tiling of SARS Cov-2 virus with rapid barcoding and midnight [Internet]. Oxford Nanopore Technologies; 2021 Mar [cited 2022 Mar 01]. Available from: <https://community.nanoporetech.com/protocols/pcr-tiling-of-sars-cov-2-virus-with-rapid-barcoding-and-midnight>
18. Illumina. Illumina COVIDSeq Test IVD Documentation [Internet]. Illumina; 2022 Feb 07 [cited 2022 Mar 01]. Available from: <https://support.illumina.com/clinical/support/clinical/kits/illumina-covidseq-test-ivd/documentation.html>
19. Miguères M, Lhomme S, Trémeaux P, Dimeglio, C, Ranger N, Latour J et al. Evaluation of two RT-PCR screening assays for identifying SARS-CoV-2 variants. *Journal of Clinical Virology* 2021; 143: 104969.
20. Adam. What scientists know about new, fast-spreading coronavirus variants. *Nature* 2021; 594: 19–21.