

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección temprana y eficiente de variantes Delta y Ómicron de SARS- Cov- 2 COVID-19 mediante tamizaje por RT-qPCR

Early and efficient detection of the Delta and Omicron variants of SARS-CoV-2 through RT-qPCR screening

Manzur, María Jimena¹; Campos, Ludmila Estefanía¹; Arias, José Luis¹; Leporati, Marianela¹; Juri Ayub, Maximiliano^{1*}

¹Laboratorio de Desarrollo de Diagnósticos Moleculares, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. San Luis, Argentina.

*Contacto: Juri Ayub, Maximiliano. Área de Biología Molecular, Facultad de Química,

Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. Av. Ejército de los Andes 950, San Luis Capital, Argentina; mjuriayub@hotmail.com.

Resumen Introducción: Durante la pandemia de enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19, por sus siglas en inglés), el surgimiento de las llamadas *variantes de preocupación* ha sido un problema recurrente. La secuenciación genómica es la herramienta de referencia para la identificación de nuevas variantes, así como para detectar la circulación de las ya conocidas. Sin embargo, la capacidad del sistema de vigilancia genómica es limitada y se requieren estrategias de tamizaje previo para la selección de muestras. Objetivos: Diseñar, validar y aplicar estrategias de transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) para el tamizaje de variantes delta, ómicron y la emergencia de posibles nuevas variantes. Materiales y Métodos: Se diseñaron oligonucleótidos específicos (*primers* y sondas) que permiten discriminar entre las diferentes variantes de SARS-Cov-2, al hibridar con regiones correspondientes a deleciones específicas. Se emplearon ensayos de amplificación y *melting* de sondas fluorescentes y se validaron con muestras de diferentes variantes de preocupación. Resultados: Los ensayos permitieron identificar variantes de preocupación de manera rápida y eficiente, empleando metodologías estándar en laboratorios de diagnóstico molecular. La asignación de variantes con este método coincidió completamente con los datos provenientes de la secuenciación. Conclusiones: Los protocolos validados en este trabajo posibilitaron la detección temprana de variantes delta y ómicron en la provincia de San Luis, así como en otras jurisdicciones donde se transfirió la metodología.

Palabras clave: SARS-CoV-2, variantes, deleciones, secuenciación, qPCR.

Abstract Introduction. During the COVID-19 pandemic, the rise of so-called variants of concern (VOCs) has been a recurring problem. The gold standard approach for the identification of new and current variants is genomic sequencing. However, the capacity of the genomic surveillance system is limited and prior screening strategies are required for sample selection. Objectives. To design, validate and apply Reverse-Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) strategies for the screening of the Delta and Omicron variants, as well as for the detection of eventual emergence of new variants. Materials and methods. Specific oligonucleotides (primers and probes) were designed to allow the discrimination between the different variants of SARS-Cov2, by hybridizing with regions corresponding to specific deletions. Amplification and melting assays of fluorescent probes were used and validated with samples of different variants. Results. The assays allowed identifying VOCs quickly and efficiently, using standard methodologies in molecular diagnostic laboratories. Variant assignment with this method was in complete agreement with data from sequencing. Conclusions. The protocols validated in this work allowed the early detection of the Delta and Omicron variants in the province of San Luis, as well as in other jurisdictions of Argentina where the methodology was transferred.

Keywords: SARS-CoV 2, variants, deletions, sequencing, qPCR.

Introducción

Durante la pandemia por COVID-19, el surgimiento de las llamadas variantes de preocupación (VOCs, *variants of concern*) ha sido un problema recurrente. Estas variantes más transmisibles han tensionado en forma reiterada los sistemas de salud. Hasta el momento, la OMS ha clasificado seis variantes como VOCs; alfa, beta, gamma, lambda, delta y ómicron (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>). La secuenciación genómica es la herramienta de referencia para la identificación de nuevas variantes, así como para detectar la circulación de las ya conocidas. En nuestro país, el Proyecto Argentino Interinstitucional de Genómica de SARS-CoV-2 (PAIS) publica periódicamente reportes con los datos de vigilancia genómica (<http://pais.qb.fcen.uba.ar/reports.php>). Sin embargo, la secuenciación posee algunas limitaciones para la toma de decisiones oportunas en un contexto de emergencia sanitaria. Por su alto costo, requerimiento de equipamiento especializado y personal capacitado, en la mayoría de los países, incluida Argentina, no es factible secuenciar un porcentaje alto de las muestras SARS-CoV-2 positivas. De esta manera, los resultados de la secuenciación pueden demorar al menos dos semanas, al requerir la logística de transporte, ya que no todas las provincias cuentan con capacidad de secuenciación genómica.

Por lo mencionado, era y es deseable contar con herramientas de tamizaje para la identificación confiable y rápida de VOCs, que permitan procesar mayor número de muestras y que empleen equipamiento disponible localmente en todos los centros de diagnóstico. Con esta meta, en este estudio se analizaron *in silico* las secuencias genómicas de las diferentes VOCs, a medida que estas fueron reportadas en bases de datos. Producto de la evolución de los diferentes linajes del SARS-Cov-2, cada VOC posee polimorfismos propios y compartidos con otras variantes, incluyendo tanto sustituciones nucleotídicas como pequeñas deleciones genómicas. En particular, estas deleciones son una herramienta valiosa para diseñar oligonucleótidos específi-

cos que permitan discriminar mediante PCR entre la secuencia de referencia (Wuhan; GenBankNC_045512) y la que posee la deleción. Por ejemplo, de manera casual, se observó que la variante alfa genera ausencia de señal de amplificación del gen S (*Spike Gene Target Failure; SGTF*), al emplear el kit comercial *TaqPath PCR assay*, debido a una deleción en dicho gen.¹

A lo largo de la pandemia, en nuestro laboratorio, se desarrollaron RT-qPCRs específicas para la detección de variantes alfa, beta, gamma, lambda, delta y ómicron. En el presente trabajo, se describe en detalle la estrategia de tamizaje empleada para la detección de VOCs delta y ómicron, empleando reacciones que detectan las deleciones características de cada variante esquematizadas en la figura 1. Es de destacar que la deleción #1, ubicada sobre el gen *ORF1ab*, está presente en todas las VOCs, a excepción de delta.

Materiales y Métodos

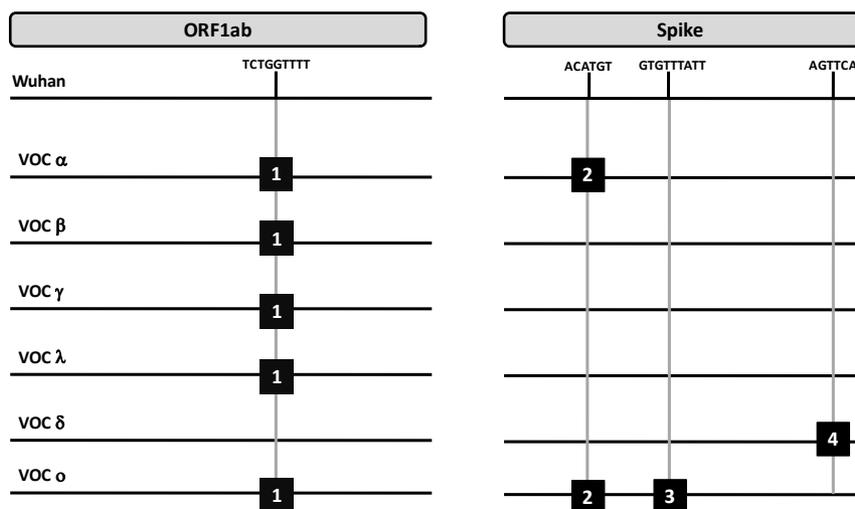
1. Diseño metodológico

Se diseñaron oligonucleótidos (*primers* y sondas de hidrólisis) que permiten detectar específicamente la presencia de las diferentes deleciones. Para ello se emplearon dos estrategias alternativas. En la primera (Figura 2A), uno de los *primers* se diseña de tal forma que sus nucleótidos 3' coincidan con la secuencia delecionada en la VOC, de manera que la amplificación solo ocurre en presencia de la secuencia de referencia (WT). En la segunda estrategia (Figura 2B), los *primers* se diseñan flanqueando la deleción, y la región central de la sonda de hidrólisis coincide con la región delecionada en la VOC. De esta manera, la amplificación siempre tiene lugar (ya que los *primers* coinciden con regiones conservadas). Sin embargo, en presencia de la deleción, la sonda no se une al producto por lo que no se detecta señal de fluorescencia. Alternativamente, la deleción puede detectarse mediante *melting* de la sonda con un pico a menor temperatura que la secuencia no delecionada. En la tabla 1, se describen los oligonucleótidos diseñados y empleados en este

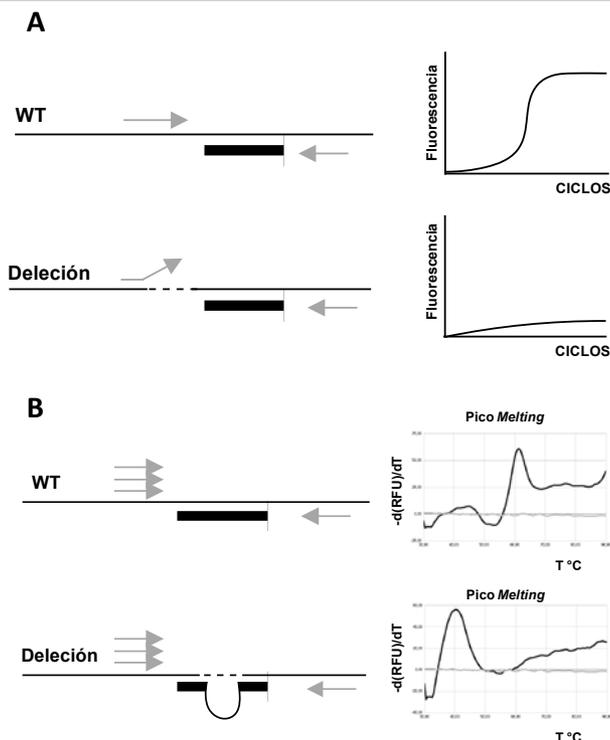
Tabla 1. Primers y sondas utilizados en este estudio para detección de deleciones específicas.

NOMBRE OLIGO	SECUENCIA	FLUORÓFORO	DELECIÓN	REFERENCIA
2019-nCoV N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT			Panel de CDC (*)
2019-nCoV N1-R	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG			
2019-nCoV N1-P	ACCCCGCATTCAGTTGGTGGAC	FAM		
Del #1 Fw WT	ATGGTTGATACTAGTTTG TCTGGT		#1	Este trabajo
Del #1 Rev	CTCCTAGCACCATCATCATACA			
Del #1 Probe Hex	ACTGTGTTATGTATGCATCAGCTGTAGTGT	HEX		
Del #2 Fw WT	GTTACTTGGTCCATG CTATACATG		#2	Este trabajo
Del #2 Rev	GTTAGACTTCTCAGTGGAGCAAA			
Del #2 Probe Cy5	ACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCACCA	Cy5		
Del #3 Fw	GAAGACCCAGTCCCTACTTTATG		#3	Este trabajo
Del #3 Rev	ACTCTGAACACTTTCATCC			
Del #3 Probe del FAM	AATGATCCATTTTGGACCACAAAAC	FAM		
Del #3 Probe WT Cy5	ATCCATTTTGG GTGTTTATT ACCACA	Cy5		
Del #4 Fw	ACCCAGTCCCTACTTATTGTTA		#4	Este trabajo
Del #4 Rev	GGCTGAGAGACATATTTCAA			
Del #4 Probe FAM	AGAATAAACTC TGAAC TCACTTTCCAT	FAM		

► *El panel CDC de primers y sonda N1 se describe en <https://www.fda.gov/media/134922/download>; las regiones en negrita y subrayadas en primers y sondas son las que permiten diferenciar entre la secuencia de referencia y las delecionadas.

Figura 1. Esquema de las cuatro deleciones relevantes para el presente trabajo.

► Las diferentes VOCs poseen pequeñas deleciones respecto del genoma de referencia de SARS- Cov-2 [Wuhan; GenBankNC_045512]. Estas deleciones (una localizada en el gen ORF1ab y tres en el gen Spike) son indicadas mediante cuadros negros y numeradas en orden creciente de posición genómica.

Figura 2. Representación esquemática del diseño metodológico para detección de deleciones.

► A. Uno de los primers es diseñado de manera que su extremo 3' coincida con la región delecionada, para que solo ocurra amplificación en la secuencia sin deleción [WT; wild type]. B. La sonda fluorescente es complementaria, en su región central, a la región delecionada y, luego de una amplificación asimétrica, se analiza la temperatura a la cual la sonda se disocia del amplicón mediante un gradiente de temperatura, con la observación de un pico de melting a menor temperatura para la secuencia delecionada.

trabajo.

2. Condiciones generales de los ensayos de RT-qPCR

Se emplearon muestras de ARN purificado mediante kits comerciales, a partir de hisopados naso-orofaríngeos, que fueron cedidas por el Laboratorio de Salud Pública Provincial de San Luis y el Hospital Central de la Provincia de Mendoza. En todos los casos, las amplificaciones se llevaron a cabo empleando 5 UI de muestra, con el kit para RT-qPCR en una etapa *Light-Cycler® Multiplex RNA Virus Master* (Roche) en un termociclador Bio-Rad CFX96.

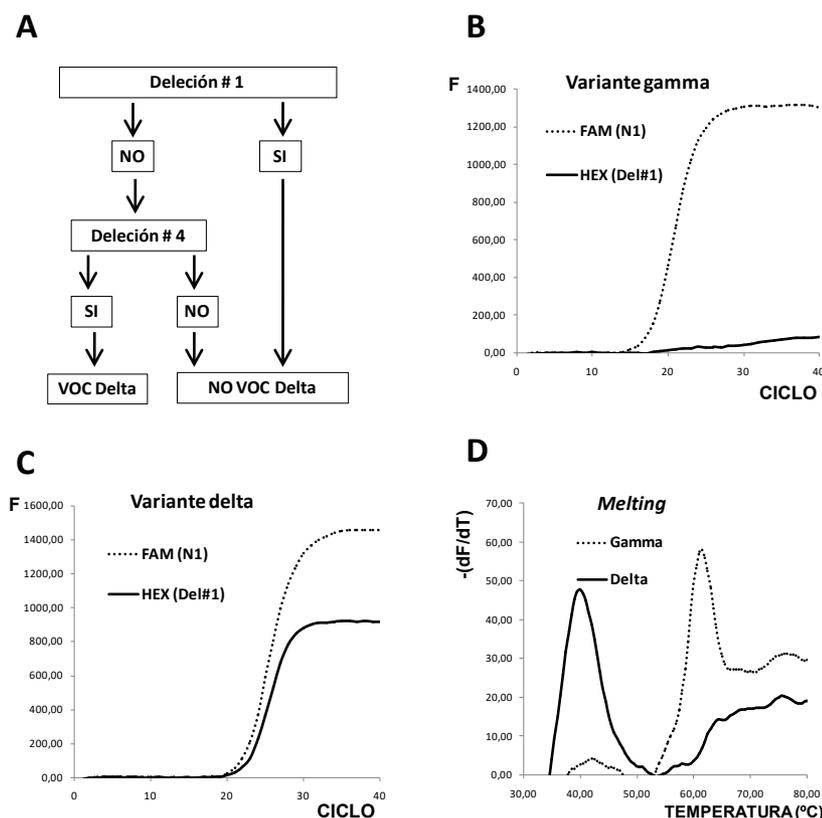
3. Detección de deleción #1¹¹²⁸⁸TCTGGTTTT¹¹²⁹⁶ (ORF1ab)

Se llevó a cabo la amplificación mediante RT-qPCR en formato dúplex, en un volumen de 20 UI, empleando como molde ARN de muestras positivas por RT-qPCR para SARS-CoV-2 y los siguientes oligonucleótidos: Del #1_Fw_WT (500 nM), Del #1_Rev (500 nM), Del #1_Probe_Hex (125 nM), 2019-nCov_N1-F (200 nM), 2019-nCov_N1-R (200 nM) y 2019-nCov_N1-P (100 nM). La retrotranscripción y amplificación se llevaron a cabo empleando las siguientes condiciones: 10 minutos [min] a 55 °C, 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos, que incluían 5 segundos [seg] a 95 °C y 30 seg a 60 °C. Las lecturas se realizaron en los canales FAM y HEX.

La amplificación del gen N (FAM) indica integridad de la muestra y confirma la positividad de la misma, mientras que la detección de señal HEX evidencia la presencia de nucleótidos ¹¹²⁸⁸TCTGGTTTT¹¹²⁹⁶. Por el contrario, la ausencia de señal HEX indica deleción de estos nucleótidos.

4. Detección de deleción #1¹¹²⁸⁸TCTGGTTTT¹¹²⁹⁶ (ORF1ab) en muestras agrupadas (pools)

Ha sido reportada la utilidad de emplear muestras agrupadas (pools) cuando la incidencia de casos positivos es baja.^{2,3} Basados en esta experiencia, cuando la variante para la que se realiza el tamizaje posee la secuencia ¹¹²⁸⁸TCTGGTTTT¹¹²⁹⁶,

Figura 3. Estrategia de tamizaje para detección de variante delta.

► A. Algoritmo para tamizaje de muestras en busca de variante delta. B. Resultado de amplificación dúplex N1-ORF1ab en una muestra que posee la delección #1 (por ejemplo, gamma). C. Resultado de amplificación dúplex N1-ORF1ab en una muestra correspondiente a VOC delta. D. Análisis de la delección #4 mediante melting de sonda posterior a la amplificación para una muestra VOC delta (línea continua; $T_m=40^\circ\text{C}$) y una muestra de otra variante, en este caso, gamma (línea de puntos; $T_m=60^\circ\text{C}$).

y las variantes de circulación predominante presentan la delección #1, se optimizó un método de análisis que emplea 5 muestras agrupadas. De esta manera, la ausencia de amplificación implica que todas las muestras de la mezcla poseen la delección. Por el contrario, en caso de detectarse amplificación, implica que al menos una muestra de la mezcla posee los nucleótidos ¹¹²⁸⁸TCTGGTTT¹¹²⁹⁶, por lo que *a posteriori* se analizan las mismas de manera individual.

5. Detección de delección #3 ²¹⁹⁸⁷GTGTTTATT²¹⁹⁹⁵ [Spike].

Las muestras se analizaron empleando dos *primers* que flanquean la delección #3 (Del #3_Fw y Del #3_Rev; 500 nM cada uno) junto con dos sondas diferentes: la primera, complementaria a la secuencia con la delección (Del #3_Probe_del_FAM; 125 nM) y la segunda, complementaria a la correspondiente secuencia sin delección (Del #3_Probe_WT_Cy5; 250 nM). De esta manera, la detección de señal FAM implica la presencia de la delección, mientras que la señal Cy5 implica una secuencia sin delección. La retrotranscripción y la amplificación se realizaron mediante 10 min a 55°C , 5 min a 95°C , seguidos de 40 ciclos que incluían 5 seg a 95°C y 30 seg a 56°C . Las lecturas se llevaron a cabo en los canales FAM y Cy5.

6. Detección de delección #4 ²²⁰²⁹AGTTCA²²⁰³⁴ [Spike] mediante *melting*

Se llevó a cabo una amplificación asimétrica (con exceso de *primer* sentido) que generó un producto enriquecido en la cadena complementaria a la sonda. La presencia o ausencia de la delección #4 se evidenció mediante hibridación seguida de *melting* de una sonda específica y complementaria a la región ²²⁰²⁹AGTTCA²²⁰³⁴. La amplificación asimétrica se realizó en un volumen de 20 μL , ARN de muestras SARS- Cov- 2 positivas y los siguientes oligonucleótidos: Del #4_Fw (1.000 nM), Del #4_Rev (100 nM) y Del #4_Probe_FAM (200 nM). La retrotranscripción y la amplificación procedieron mediante 10 min a 55°C , 5 min a 95°C , seguidos de 40 ciclos que incluían 5 seg a 95°C y 30 seg a 60°C . Posteriormente, se llevó a cabo la desnaturalización entre 30°C y 95°C , con lecturas cada 0,5 seg en el canal FAM. La delección #4 fue detectada como un pico de *melting* a 40°C , mientras que la secuencia no delecionada muestra un pico de *melting* a 60°C .

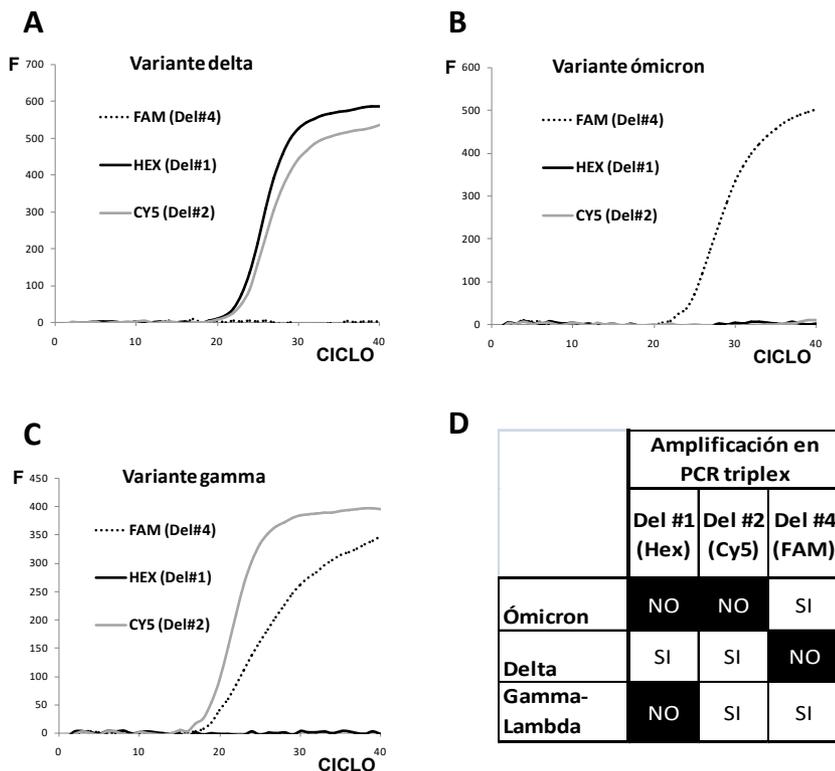
7. Detección de delecciones #1, #2 y #4 en formato triplex.

Cada muestra se analizó mediante RT-qPCR empleando los siguientes oligonucleótidos y concentraciones: Del #1_Fw_WT (250 nM), Del #1_Rev (250 nM), Del #1_Probe_Hex (100 nM), Del #2_Fw_WT (250 nM), Del #2_Rev (250 nM), Del #2_Probe_Cy5 (100 nM), Del #4_Fw (250 nM), Del #4_Rev (250 nM), Del #4_Probe_FAM (100 nM). La retrotranscripción y la amplificación se llevaron a cabo empleando 10 min a 55°C , 5 min a 95°C , seguidos de 40 ciclos que incluían 5 seg a 95°C y 30 seg a 60°C . Las lecturas se hicieron en los canales FAM, HEX y Cy5. La existencia de cada delección se evidenció como ausencia de señal en el canal correspondiente.

Resultados

1. Tamizaje de muestras para detección de variante delta de SARS-CoV-2

En la figura 3A, se muestra un esquema del algoritmo empleado para la búsqueda de variante delta entre muestras previamente clasificadas como positivas para SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR. Las variantes circulantes al momento de iniciar el tamizaje fueron mayoritariamente gamma y lambda. Estas variantes carecen de los nucleótidos ¹¹²⁸⁸TCTGGTTT¹¹²⁹⁶ (presentan la delección #1) en el gen *ORF1ab* (ver Figura 1 e Introducción). Esta secuencia, por el contrario, se encuentra presente en el genoma de la variante delta (única VOC que no posee la delección #1). Por lo tanto, las muestras (en forma individual o agrupadas de a cinco, de acuerdo con el número de ca-

Figura 4. Resultados típicos de amplificaciones de muestras.

► Resultados típicos de amplificaciones de muestras delta (A), ómicron (B) y gamma (C) leídas en canales HEX, Cy5 y FAM. D. Interpretación de los resultados de acuerdo con la presencia/ausencia de señal de amplificación en cada canal.

sos positivos diarios] se analizaron como se describe en “Métodos” [secciones 3 y 4]. La ausencia de amplificación [Figura 3B] confirma la existencia de la deleción #1, descartando la posibilidad de que la muestra corresponda a la VOC delta. Cuando hubo amplificación [Figura 3C], la muestra fue analizada posteriormente para la deleción #4, exclusiva de la variante delta [22029AGTTCA²²⁰³⁴], mediante PCR asimétrica y *melting*, como se describe en “Métodos” [sección 6]. Como muestra la figura 3D, un pico de *melting* a 40°C confirma la presencia de VOC delta, mientras que un pico de 60°C descarta dicha variante.

Este método, empleando PCRs en *pools* de 5 muestras, permitió analizar en nuestro laboratorio más de 900 antes de hallar la primera correspondiente a VOC delta en la provincia de San Luis, por lo que representó una herramienta práctica y potente para contar con información confiable y rápida sobre la presencia o ausencia de circulación comunitaria de esta variante, así como para el análisis de potenciales casos importados.

2. Identificación de variantes delta y ómicron mediante PCR en formato triplex

Al momento de iniciar el tamizaje para búsqueda de ómicron, la variante dominante era delta, con una mínima prevalencia de variantes gamma y lambda. Por esta razón, desarrollamos un formato de RT-qPCR triplex para detectar simultáneamente las deleciones #1, #2 y #4. De esta manera, empleando el mencio-

nado protocolo descrito en “Métodos” [sección 7], se pudo discriminar de manera rápida entre variantes delta y ómicron, y a ambas, diferenciarlas de otras correspondientes a estadios previos de la pandemia [gamma/lambda]. A continuación, se muestra un resultado típico de este ensayo para cada tipo de muestra en los diferentes canales [Figura 4 A-C], así como un esquema de la interpretación de los resultados [Figura 4D].

3. Tamizaje para subvariante ómicron-BA.2

Hasta aquí, hemos empleado ómicron como sinónimo de ómicron BA.1 [la subvariante más extendida actualmente en el mundo]. Sin embargo, se ha descrito una subvariante llamada BA.2, la cual ha mostrado mayor transmisibilidad que BA.1 y, en algunos países, ha adquirido circulación significativa.⁴ Una de las características de BA.2 es que no presenta la deleción #3 característica de BA.1.⁵ Por este motivo, decidimos diseñar un protocolo sencillo para la detección de la deleción #3, que permita confirmar o descartar rápidamente la identidad de una muestra como ómicron BA.1. En este caso, diseñamos dos sondas con distinta marca, que reconocen la secuencia con o sin deleción #3, y dos oligonucleótidos flanqueantes para amplificar dicha región. De esta manera, una señal de amplificación en el canal FAM implica que la muestra corresponde a la variante ómicron BA.1, mientras que una señal de amplificación en el canal Cy5 corresponde a otras variantes incluyendo ómicron BA.2. Debido a la falta de muestras BA.2 disponibles, en la figura 5 se muestra la validación de dicha técnica con una muestra BA.1 [posee deleción #3] y una muestra delta [sin deleción #3].

Discusión

Las estrategias y protocolos aquí descritos, de rápida y fácil implementación en cualquier laboratorio de diagnóstico que cuente con equipamiento para qPCR, complementan y potencian al sistema de vigilancia genómica a la vez que permiten detectar rápidamente variantes previamente descritas y priorizar la secuenciación de determinadas muestras. Los protocolos de tamizaje para variante delta y ómicron han sido transferidos e implementados en el Laboratorio de Salud Pública provincial de San Luis, así como en otras jurisdicciones, entre ellas, Formosa, Mendoza y provincia de Buenos Aires, con resultados robustos y reproducibles en todos los casos. Finalmente, todas las muestras detectadas mediante esta estrategia, que fueron posteriormente secuenciadas [al menos 20 de cada variante], confirmaron la correcta asignación de va-

riantes (información suministrada a los autores por referentes de Salud Pública Provincial).

El uso de la deleción #1 [localizada en el *ORF1ab* y compartida por muchas variantes de preocupación] permite un primer barrido altamente eficiente, ya que, en una sola reacción de PCR, se confirma la integridad de la muestra (mediante amplificación de una región conservada del gen N) y se descartan linajes que no coincidan con el resultado esperado. Más aún, cuando la/s variante/s de circulación mayoritaria presentan esta deleción y la variante para la cual se realiza el tamizaje no la posee, es posible realizar los ensayos en un formato de muestras agrupadas, lo cual permite mayor optimización de recursos.

Para la detección de ómicron [BA.1], se empleó una RT-qPCR tríplice que permite una discriminación en un solo paso entre las diferentes variantes (delta, ómicron y gamma/lambda) mediante la caracterización simultánea de las deleciones #1, #2 y #4.

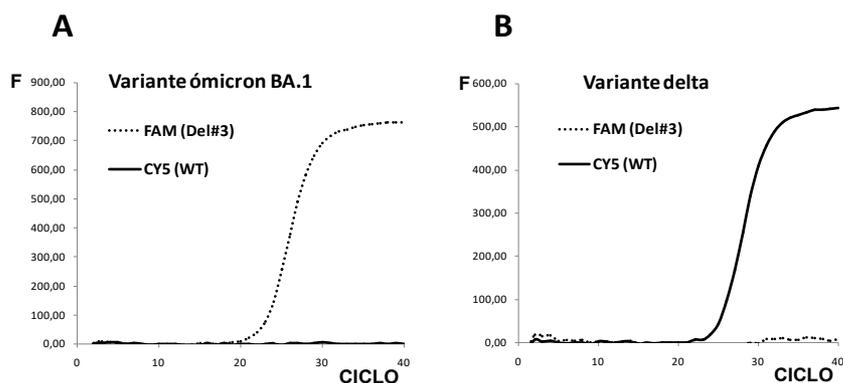
La aparición de futuras variantes de preocupación es un escenario posible en 2022. La aún alta circulación comunitaria del virus, así como la baja cobertura de vacunación en ciertas regiones del planeta pueden contribuir a ello. Es más, el hallazgo de que SARS-CoV-2 infecta diferentes animales domésticos, de granja e incluso salvajes sugiere que la circulación críptica (por fuera del radar de la vigilancia genómica) puede ser un reservorio de aparición y evolución de nuevas variantes de preocupación. De hecho, se ha postulado que este mecanismo ha sido el responsable del surgimiento de la variante ómicron⁶ y, más recientemente, se ha reportado evidencia de múltiples eventos de transmisión de SARS-CoV-2 de humanos a ciervos de cola blanca^{6,7}, así como un potencial evento de transmisión de ciervos a humanos.⁷

Las reacciones de RT-qPCR específicas descritas en este trabajo podrán ser usadas en caso de aparición de estas potenciales nuevas variantes, y podrán diseñarse e implementarse nuevas opciones *ad hoc* empleando las mismas metodologías.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Juan Talía y la Bioquímica Agustina Lacaze (Laboratorio de Salud Pública “Dalmiro Pérez Laborda”, provincia de San Luis) por su continua colaboración; al Dr. Roberto Etchenique (DQIAyQF - INQUIMAE - FCEyN - UBA) y la Dra. Daniela Hozbor (IBBM - UNLP - CONICET) por sus comentarios y sugerencias respecto al uso de muestras agrupadas; a la Dra. Viviana Re (Universidad Nacional de Córdoba) por proveer muestras de SARS-CoV-2 variante delta; al Dr. Humberto Debat (IPAVE-CIAP-INTA) por su colaboración en el análisis de secuencias de VOCs, y a los Bioquímicos Mauricio Figueredo (Hospital de Alta Complejidad “Pte. Juan Domingo Perón”, For-

Figura 5. Resultado típico del ensayo para la detección de la deleción #3.



► Resultado típico del ensayo para la detección de la deleción #3 sobre una muestra que posee dicha deleción [variante ómicron BA.1] (A) y sobre una muestra sin deleción #3 [en este caso, variante delta] (B). En ambos casos, se muestran las lecturas en los canales FAM (específico para detección de deleción #3) y Cy5 (específico para detección de secuencia sin deleción #3).

mosa) y Abelardo Manzur (Hospital Central de Mendoza) por sus aportes durante la implementación de estas metodologías.

Este trabajo se llevó a cabo con fondos de la Universidad Nacional de San Luis y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación correspondientes al Proyecto Institucional “Implementación de herramientas para diagnóstico, epidemiología y otras necesidades de la provincia de San Luis”.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Brown KA, Gubbay J, Hopkins J, Patel S, Buchan SA, Daneman N, et al. S-Gene Target Failure as a Marker of Variant B.1.1.7 Among SARS-CoV-2 Isolates in the Greater Toronto Area, December 2020 to March 2021. *JAMA*. 2021;325 (20):2115-6.
2. Ambrosio N, Aispuro PM, Belhart K, Bottero D, Crisp RL, Dansey MV, et al. Active Surveillance of Asymptomatic, Presymptomatic, and Oligosymptomatic SARS-CoV-2-Infected Individuals in Communities Inhabiting Closed or Semi-closed Institutions. *Front. Med.* 2021; 8:e640688.
3. Marceca F, Rocha Viegas L, Pregi N, Barbas MG, Hozbor DF, Pecci A, et al. Pool Strategy for Surveillance Testing of SARS-CoV-2. *Science Review from the end of the world*. 2021;2(2):41-54.
4. Mahase E. Omicron sub-lineage BA. 2 may have “substantial growth advantage,” UKHSA reports. *BMJ* 2022; 376:o263.
5. Abbas Q, Kusakin A, Sharrouf K, Jyakhwo S, Komissarov AS. Follow-up investigation and detailed mutational characterization of the SARS-CoV-2 Omicron variant lineages [BA. 1, BA. 2, BA. 3 and BA. 1.1]. *bioRxiv*. 2022.
6. Wei C, Shan K-J, Wang W, Zhang S, Huan Q, Qian W. Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *JGG*. 2021;48:1111-1121.
7. Kuchipudi SV, Surendran-Nair M, Ruden RM, Yon M, Nissly RH, Vandegrift KJ, et al. Multiple spillovers from humans and onward transmission of SARS-CoV-2 in white-tailed deer. *PNAS*. 2022;119(6):e2121644119.