

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 603**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2021** **PCT/EP2021/055695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2021** **WO21176099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2021** **E 21709989 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024** **EP 3990667**

54 Título: **Métodos para la detección específica y sensible del SARS-CoV-2**

30 Prioridad:

05.03.2020 WO PCT/EP2020/055939
05.03.2020 US 202016809717

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2024

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (100.0%)
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR

72 Inventor/es:

ENOUF, VINCENT;
DONATI, FLORA;
ALBERT, MÉLANIE;
BEHILLIL, SYLVIE;
VAN DER WERF, SYLVIE;
SIMON-LORIERE, ETIENNE;
LEMOINE, FRÉDÉRIC;
MALABAT, CHRISTOPHE;
MARCHIO, AGNÉS y
PINEAU, PASCAL

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 970 603 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la detección específica y sensible del SARS-CoV-2

5 Sector de la técnica

La invención se refiere a un método para detectar la presencia o ausencia de variantes del nuevo coronavirus 2019 (SARS-CoV-2, 2019-nCov o COVID-19) en una muestra como se define en las reivindicaciones. El método es útil para analizar muestras en busca de la presencia o ausencia de variantes del SARS-CoV-2 y, por lo tanto, puede usarse para evaluar sujetos a fin de identificar individuos infectados por variantes del SARS-CoV-2, entre otros usos.

Estado de la técnica

En diciembre de 2019, se informó de pacientes que presentaban neumonía viral en Wuhan, China. Posteriormente se identificó un nuevo coronavirus como agente causal y se denominó provisionalmente nuevo coronavirus 2019 (2019-nCov o SARS-CoV-2) (Zhu N *et al.*, N Engl J Med., 24 de enero de 2020). El virus se propagó rápidamente dentro y fuera de China, lo que llevó a la OMS a declarar una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional el 30 de enero de 2020. Con el objetivo de desarrollar rápidamente un ensayo para la detección de la presencia y/o ausencia de SARS-CoV-2 en una muestra, y basándose en la tecnología de RT-PCR en tiempo real del estado de la técnica, los inventores identificaron en el presente documento dos dianas, los genes del virus en la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o nsp12) y de la proteína de unión a ARN monocatenario (nsp9). Desde mediados de 2020, en varios países se notificaron variantes emergentes del SARS-CoV-2 que suscitaban preocupación debido a su mayor transmisibilidad y/o menor sensibilidad a los anticuerpos neutralizantes y que actualmente se están propagando por todo el mundo. Para detectar estas nuevas variantes del SARS-CoV-2 específicamente, los inventores identificaron dos dianas adicionales en los genes nsp6 y N en el presente documento.

Los coronavirus son virus encapsulados de ARN monocatenario de sentido positivo. Se han identificado coronavirus en varios huéspedes mamíferos como murciélagos, camellos o ratones, entre otros. Varios coronavirus son patógenos para los humanos, lo que conlleva a una gravedad variable de los síntomas (Cui *et al.*, Nat Rev Microbiol. marzo de 2019; 17(3):181-92). Las variantes altamente patógenas incluyen el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) que surgió en China en 2002, provocando ~8000 infecciones humanas y más de 700 muertes (Peiris *et al.*, Nat Med., diciembre de 2004;10(12 Supl.):S88-97) y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), detectado por primera vez en Arabia Saudita en 2012 y responsable de ~2500 infecciones humanas y más de 850 muertes (Zaki *et al.*, N Engl J Med., 8 de noviembre de 2012;367(19):1814-20; Lee *et al.*, BMC Infect Dis. 14 de julio de 2017;17(1):498).

El genoma del SARS-CoV-2 comprende los siguientes marcos de lectura abiertos u ORF, desde su extremo 5' hasta su extremo 3': ORF1a y ORF1b correspondientes a las proteínas no estructurales que forman el complejo transcripción-replicación, y ORF-S, ORF-E, ORF-M y ORF-N correspondientes a las cuatro proteínas estructurales principales, glicoproteína de superficie de la espícula (S), proteína de la envoltura (E), glicoproteína de membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N). También comprende varias proteínas accesorias como ORF intercaladas o superpuestas entre los genes estructurales y correspondientes a proteínas de función desconocida.

El genoma de ARN del SARS-CoV-2 tiene una caperuza metilada en 5' y una cola poliadenilada en 3', lo que permite que el ARN se una al ribosoma de la célula hospedadora para su traducción. ORF1b codifica una proteína llamada ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o nsp12), que permite que el genoma vírico se transcriba en nuevas copias de ARN utilizando la maquinaria de la célula hospedadora. La RdRp es la primera proteína que se produce; una vez que se traduce el gen que codifica la RdRp, la traducción se detiene mediante un codón de terminación. La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, RDR) es una enzima que cataliza la replicación de ARN a partir de una plantilla de ARN. Esto contrasta con una típica ARN polimerasa dependiente de ADN, que cataliza la transcripción de ARN a partir de una plantilla de ADN. RdRp es una proteína esencial codificada en los genomas de todos los virus que contienen ARN sin una etapa de ADN. Cataliza la síntesis de la cadena de ARN complementaria a una plantilla de ARN determinada. El proceso de replicación del ARN es un mecanismo de dos etapas. En primer lugar, la etapa de iniciación de la síntesis de ARN comienza en el extremo 3' de la plantilla de ARN o cerca del mismo mediante un mecanismo independiente del cebador (de novo) o dependiente del cebador que utiliza un cebador ligado al genoma de una proteína vírica (VPg). La iniciación de novo consiste en la adición de un nucleósido trifosfato (NTP) al 3'-OH del primer NTP iniciador. Durante la ahora llamada fase de elongación, esta reacción de transferencia de nucleótido se repite con NTP posteriores para generar el producto de ARN complementario. La proteína nsp9 codificada por ORF1a puede participar en la replicación vírica actuando como proteína de unión a ARN monocatenario. La proteína nsp6, también codificada por ORF1a, desempeña un papel en la inducción inicial de autofagosomas del retículo del hospedador y luego limita la expansión de estos fagosomas que ya no pueden transportar componentes víricos a los lisosomas.

A principios de 2020, la OMS publicó los distintos protocolos disponibles para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR diseñados por Institutos Nacionales de Enfermedades Infecciosas de todo el mundo: CDC de China, China; Instituto Pasteur, París, Francia; CDC de EE. UU., EE.UU.; Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón;

Charité, Alemania; HKU, SAR de Hong Kong; Instituto Nacional de la Salud, Tailandia (Equipo de la OMS: "Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols).

Desde mediados de 2020 han surgido varias variantes del SARS-CoV-2 que presentan mutaciones en la proteína Espícula con un impacto previsto en la epidemiología de la enfermedad Covid-19 y que actualmente se están extendiendo por todo el mundo. Estas variantes que suscitan preocupación se notificaron por primera vez en el Reino Unido (linaje B.1.1.7; mutaciones notables N501Y, 69-70del, P681H) y VOC-202102/02 (B.1.1.7 con E484K); Sudáfrica (SA) (linaje B.1.351; mutaciones notables N501Y, E484K, K417N); Brasil (BR) (linaje P.1; mutaciones notables N501Y, E484K, K417T); UK y Nigeria (linaje B.1.525; mutaciones notables E484K, F888L, 69-70del) y actualmente se están extendiendo a varios países alrededor del mundo.

Todas estas nuevas variantes del SARS-CoV-2 se caracterizan por una mayor transmisibilidad de persona a persona en comparación con variantes anteriores del virus. Las variantes de UK, SA y BR comparten la mutación N501Y en la región de unión al receptor (RBD), se predice que esta mutación aumentará la afinidad de unión de la espícula hacia el receptor ACE2 humano. Las variantes SA y BR comparten una mutación adicional en esta región (K417T/N) que se sospecha contribuye a una mayor afinidad de unión a hACE2. La variante de UK presenta otra mutación fuera de la RBD (del69/70) con un impacto previsto en la transmisibilidad.

Adicionalmente, las variantes SA y BR comparten una mutación adicional en la RBD (E484K) que, según se informa, mejora la capacidad del SARS-CoV-2 para escapar de la respuesta inmunitaria (tanto natural como inducida por la vacuna). Se informa que los anticuerpos monoclonales y derivados del suero son de 10 a 60 veces menos efectivos para neutralizar el virus que porta la mutación E484K. En estudios anteriores se demostró que la mutación distintiva L452R portada por la variante californiana mejora la capacidad de evasión inmunitaria del SARS-CoV-2. Es posible que algunas vacunas vean reducida su eficacia contra estas variantes.

Por consiguiente, estas variantes emergentes del SARS-CoV-2 son motivo de preocupación debido a su mayor transmisibilidad (UK, BR, SA). Adicionalmente, la sensibilidad reducida a los anticuerpos neutralizantes de las variantes portadoras de la mutación E484K (SA, BR) puede comprometer la eficacia de la vacuna.

Existe una necesidad urgente de nuevos métodos y reactivos para identificar con especificidad y mayor sensibilidad la presencia y/o ausencia del SARS-CoV-2, incluidas sus variantes en las muestras. También es necesario identificar específicamente las variantes emergentes del SARS-CoV-2, en particular, UK, BR y SA, y distinguir aquellas que pueden comprometer la eficacia de la vacuna, en particular, BR y SA).

En la actualidad se sabe que las mutaciones específicas del gen S afectan a la eficacia de las vacunas y los anticuerpos neutralizantes. Por añadidura, la evolución convergente parece indicar que las cepas que albergan N501Y o E484K, o ambas, están evolucionando y extendiéndose rápidamente con un número creciente de mutaciones fuertemente asociadas y coexistentes en diferentes regiones de genes del SARS-CoV-2. Existe la preocupación de que las pruebas actuales no sólo no detecten a todos los pacientes positivos a Covid-19, sino también que la detección específica de cepas que albergan mutaciones en el gen S sólo será válida durante un breve periodo de tiempo. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar pruebas basadas en PCR que sean robustas y estables en el tiempo para detectar el SARS-CoV-2 y sus variantes, y que se proporcionen en formato simplex o multiplex, detecciones específicas adicionales de variantes que albergan mutaciones en el gen S; tales como las variantes N501Y y/o E484K

El ensayo para detectar la presencia y/o ausencia del SARS-CoV-2 en una muestra basado en el análisis de los genes RdRP (nsp12) y nsp9 del virus, como se describe a continuación, fue diseñado y probado por el Centro Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Instituto Pasteur París, en paneles de pacientes en Francia sospechosos de estar infectados por SARS-CoV-2 o en estrecho contacto con individuos que se sabe que están infectados por SARS-CoV-2. Tras los resultados, esta prueba de PCR mostró una detección 100 % positiva de al menos tan solo 100 copias de ARN diana por reacción en singleplex o 10 copias en multiplex usando los 2 pares de cebadores seleccionados que se describen a continuación. Esta prueba no es reactiva a otros coronavirus, ni a otros virus que causan infecciones respiratorias y malestar en algunos pacientes. Esta prueba que ahora utiliza de forma rutinaria el Centro Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, del Instituto Pasteur de París ha sido validada inicialmente en un panel de SARS-CoV-2 de 600 pacientes positivos y negativos, incluyendo individuos de contacto asintomáticos, individuos que regresan de la zona epidémica y pacientes sintomáticos. Dentro de los pacientes sintomáticos, ya que también hubo una epidemia simultánea de gripe en Francia, se confirmó que los pacientes negativos con la prueba SARS-CoV2 de la infección estaban infectados por gripe u otras enfermedades respiratorias. La validación de esta prueba permitió el envío para diagnóstico a hospitales de referencia en Francia y en el extranjero, y dentro de la red internacional del Instituto Pasteur en todo el mundo.

Objeto de la invención

Los inventores han diseñado un método que comprende cebadores y sondas de ácido nucleico y que se basa en parte en el descubrimiento de los inventores de que estos cebadores y sondas de ácido nucleico permiten la detección de la presencia o ausencia de SARS-CoV-2, incluidas variantes del mismo con una sensibilidad y especificidad muy deseables.

Los inventores han identificado dianas, en los genes de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP o nsp12) y de la proteína de unión a ARN monocatenario (nsp9) del virus, que se encuentran entre las regiones más conservadas con menos del 0,1 % de mutaciones entre todas las variantes secuenciadas (más de 449.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID). Por lo tanto, una de las principales ventajas del método de la invención es que, a pesar de la aparición de variantes del SARS-CoV-2, todavía permite la detección de la presencia de una variante de ARN del SARS-CoV-2 existente en una muestra. El hecho de que las regiones diana identificadas por los inventores estén conservadas y sean invariables no sería obvio en la fecha de prioridad de la presente solicitud, ya que el análisis de secuencias es un análisis retrospectivo realizado en secuencias, para las cuales la mayor parte, sólo estuvieron disponibles después de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Adicionalmente, se encontraron posteriormente mutaciones de puntos caliente en el gen RdRp (Pachetti *et al.*, Journal of Translational Medicine, 2020, 18, 179; Publicado en línea: 22 de abril de 2020).

La invención proporciona un método multiplex para la detección específica de la presencia o ausencia de un ARN de SARS-CoV-2 en una muestra como se define en la reivindicación 1, que comprende:

(A) una primera reacción de transcripción inversa con un primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una primera copia de ADNc del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra; amplificar cualquier primer ADNc resultante con el primer cebador inverso y un primer cebador directo específico del SARS-CoV-2; y detectar cualquier primer producto amplificado con una primera sonda específica del SARS-CoV-2; en donde el primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAGGGAG-3' (SEQ ID NO: 11) y su equivalente de ARN; el primer cebador directo específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO: 10) y la primera sonda específica del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-TACCGGCAGCACAAAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 12) o su complemento; y

(B) una segunda reacción de transcripción inversa con un segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una segunda copia de ADNc del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra; amplificar cualquier segundo ADNc resultante con el segundo cebador inverso y un segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2; y detectar cualquier segundo producto amplificado con una segunda sonda específica del SARS-CoV-2; en donde el segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO: 14) y su equivalente de ARN, el segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-3' (SEQ ID NO: 13), y la segunda sonda específica del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CCTGGCGTGGTTTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 15) o su complemento; y

en donde dicho SARS-CoV-2 se elige entre variantes del aislado del SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 que portan mutaciones en la proteína Espícula que se prevé que aumentan la afinidad de unión de las partículas víricas hacia el receptor ACE2 humano y/o reducen la sensibilidad de las partículas víricas a los anticuerpos neutralizantes.

En algunas realizaciones del método, dichas variantes portan una o más mutaciones predichas en la proteína Espícula seleccionada del grupo que consiste en: E484K, K417N, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H, del69/70 y del144/145.

En una realización más preferida del método,

- el primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2), y no tiene más de 21 bases de longitud; y
- el primer cebador directo específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), y no tiene más de 21 bases de longitud; y
- la primera sonda específica del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-AGATGTCTTGCTGCCGTA-3' (SEQ ID NO: 3) o su complemento, y no tiene más de 24 bases de longitud.

En otra realización preferida del método,

- el segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5), y no tiene más de 23 bases de longitud; y
- el segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2 consiste en o comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), y no tiene más de 22 bases de longitud; y
- la segunda sonda específica del SARS-CoV-2 consiste en o comprende la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento, y no tiene más de 22 bases de longitud.

En una realización preferida, el método es un método de RT-PCR, preferentemente una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (QRT-PCR).

En una realización preferida del método, la sonda está marcada con 6-carboxi-fluoresceína (6FAM) o hexacloro-6-carboxi-fluoresceína (HEX) en el extremo 5'.

En una realización preferida del método, la sonda está marcada con un black hole quencher 1 (BHQ1) en el extremo 3'.

En una realización preferida, la muestra es una muestra ambiental o una muestra biológica, preferentemente una muestra de fluido corporal, más preferentemente secreciones bucales o del tracto respiratorio.

Descripción detallada de la invención

Según la práctica habitual en el campo de la virología, las secuencias del genoma del coronavirus (ARN monocatenario de sentido positivo) o fragmentos del mismo (secuencias diana para la amplificación del ARN del SARS-CoV-2) se divulgan en forma de ADN. Por lo tanto, la secuencia SEQ ID NO: 19 es el equivalente de ADN del ARN del SARS-CoV-2 y las secuencias SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 son el equivalente de ADN de las secuencias diana del ARN del SARS-CoV-2 para la amplificación de ARN del SARS-CoV-2.

Como se utiliza en el presente documento, SARS-CoV-2 se refiere a cualquier aislado, cepa, linaje o variante del SARS-CoV-2.

Todas las secuencias están indicadas en su orientación de 5' a 3'.

Como se utiliza en el presente documento, NC_045512 o NC_045512.2 se refiere al número de acceso a GenBank NC_045512.2, consultado el 18 de julio de 2020, correspondiente a la secuencia completa del genoma del aislado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. NC_045512.2 se utiliza como secuencia de referencia del genoma del SARS-CoV-2.

El aislado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 también es conocido como BetaCoV_Wuhan_WIV04_2019 (EPI_ISL_402124) o BetaCoV_Wuhan_IVDC-HB-05_2019 EPI_ISL_402121.

Como se utiliza en el presente documento, las posiciones X a Y de la secuencia genómica del SARS-CoV-2 número de acceso a GenBank NC_045512.2 (secuencia de referencia), significa que las posiciones indicadas se determinan mediante alineación con la secuencia de referencia o según la numeración de la secuencia de referencia. Por una simple alineación con la secuencia de referencia, un experto en la materia puede determinar con facilidad las posiciones correspondientes en la secuencia genómica de otro aislado, linaje, cepa o variante de SARS-CoV-2.

Como se utiliza en el presente documento, las posiciones en la proteína Espícula del SARS-CoV-2 se indican de acuerdo con la numeración de la secuencia de la proteína Espícula del aislado del SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 NCBI YP_009724390.1, consultada el 18 de julio de 2020.

Como se utiliza en el presente documento, la variante del SARS-CoV-2 se refiere a una variante emergente del SARS-CoV-2 que suscita preocupación debido a su mayor transmisibilidad y/o mayor capacidad para escapar de la respuesta inmunitaria (natural y/o inducida por la vacuna). Concretamente, la variante del SARS-CoV-2 porta mutaciones en la proteína Espícula que se prevé que aumentarán la afinidad de unión de las partículas de la espícula y/o del virus hacia el receptor ACE2 humano y/o reducirán la sensibilidad de las partículas víricas del SARS-CoV-2 a los anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos séricos, en particular anticuerpos séricos humanos. Ejemplos de tales mutaciones incluyen en particular, E484K; K417T/N, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H, del69/70 y del144/145. Ejemplos de mutaciones que aumentan la afinidad de unión de la espícula hacia el receptor ACE2 humano incluyen, en particular, N501Y, K417T/N en el dominio de unión al receptor (RBD) y 69-70del fuera de RBB. Ejemplos de mutaciones que reducen la sensibilidad del virus SARS-CoV-2 a los anticuerpos neutralizantes incluyen, en particular, E484K, presente en las variantes de SA y BR. Las variantes preferidas del SARS-CoV-2 incluyen la variante de UK (linaje B.1.1.7; mutaciones notables N501Y, 69-70del, P681H; Número de acceso epi a GISAID B.1.1.7 - EPI_ISL_1001329); variante de Sudáfrica (SA) (linaje B.1.351; mutaciones notables N501Y, E484K, K417N; Número de acceso epi a GISAID B.1.351-EPI_ISL_1001390); variante de Brasil (BR) (linaje P.1; mutaciones notables N501Y, E484K, K417T; Número de acceso epi a GISAID P.1 - EPI_ISL_1001385).

Basándose en las primeras secuencias de SARS-CoV-2 disponibles en la base de datos GISAID el 11 de enero de 2020 (SEQ ID NO: 19), se diseñaron cebadores y sondas (nCoV_IP2 y nCoV_IP4) dirigidos a los genes nsp9 y RdRp que abarcan los nt 12621-12727 y 14010-14116, respectivamente (posiciones según SARS-CoV, NC_004718). Estas posiciones corresponden a los nt 12669-12776 y 14059-14165 en la secuencia del SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 19) o a los nt 12690 a 12797 y 14080 a 14186 en NC_045512.2.

La siguiente tabla enumera realizaciones preferidas de secuencias de ácido nucleico del SARS-CoV-2 de esta divulgación, que fueron identificadas por los inventores como se describe en los ejemplos. La columna cebador/sonda enumera las secuencias del cebador directo, del cebador inverso y de la sonda usados en el Ejemplo. La columna Secuencia diana (complemento inverso) enumera el complemento inverso (es decir, la diana) de la secuencia del

cebador/sonda. Las secuencias se representan como ADN pero, en realizaciones alternativas, al menos uno de los nucleótidos puede ser un nucleótido de ARN.

Tabla 1: Cebadores y sondas específicos para la diana de los genes nsp9 y RdRp

<i>gen nsp9/nCoV_IP2</i>	Cebador/Sonda	Secuencia diana (complemento inverso)
nCoV_IP2-12669Fw	ATGAGCTTAGTCCTGTTG (SEQ ID NO: 1)	CAACAGGACTAAGCTCAT (SEQ ID NO: 10)
nCoV_IP2-12759Rv	CTCCCTTTGTTGTGTTGT (SEQ ID NO: 2)	ACAACACAACAAAGGGAG (SEQ ID NO: 11)
nCoV_IP2-12696bSonda(+)	AGATGTCTTGTGCTGCCGG TA (SEQ ID NO: 3)	TACCGGCAGCACAAGACAT CT (SEQ ID NO: 12)
<i>Gen RdRp/nCoV_IP4</i>		
nCoV_IP4-14059Fw	GGTAACTGGTATGATTTG (SEQ ID NO: 4)	CGAAATCATACCAGTTACC (SEQ ID NO: 13)
nCoV_IP4-14146Rv	CTGGTCAAGGTTAATATAG G (SEQ ID NO: 5)	CCTATATTAACCTTGACCA G (SEQ ID NO: 14)
nCoV_IP4-14084Sonda(+)	TCATACAAACCACGCCAGG (SEQ ID NO: 6)	CCTGGCGTGGTTTGTATGA (SEQ ID NO: 15)

5

La invención hace referencia a un método para la detección específica del SARS-CoV-2 tal como se define en las reivindicaciones. El método se puede utilizar para determinar si el SARS-CoV-2 está presente o no en la muestra.

10

La invención proporciona un método multiplex para detectar la presencia o ausencia de un ARN del SARS-CoV-2 en una muestra, que comprende: someter la muestra a dos reacciones de amplificación simultáneas:

15

(A) una primera reacción de transcripción inversa con un primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una primera copia de ADNc específica del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra, en donde el primer cebador inverso se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAAGGGAG-3' (SEQ ID NO:11) y su equivalente de ARN; amplificar cualquier primer ADNc resultante con el primer cebador inverso y un primer cebador directo específico del SARS-CoV-2, en donde el primer cebador directo específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO: 10); y detectar cualquier primer producto amplificado con una primera sonda específica del SARS-CoV-2 que se hibrida con la secuencia: 5'-TACCGGCAGCACAAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 12) o su complemento; y

20

(B) una segunda reacción de transcripción inversa con un segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una segunda copia de ADNc del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra, en donde el segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO:14) y su equivalente de ARN; amplificar cualquier segundo ADNc resultante con el segundo cebador inverso y un segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2, en donde el segundo cebador directo se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-3' (SEQ ID NO: 13); y detectar cualquier segundo producto amplificado con una segunda sonda específica del SARS-CoV-2 que se hibrida con la secuencia: 5'-CCTGGCGTGGTTTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 15) o su complemento.

25

30

En una realización preferida del método, el primer cebador inverso comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2) y no tiene más de 21 bases de longitud; y/o el primer cebador directo comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), y no tiene más de 21 bases de longitud; y/o la sonda comprende la secuencia 5'-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-3' (SEQ ID NO: 3) o su complemento, y no tiene más de 24 bases de longitud.

35

En una realización más preferida del método, el primer cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2); y/o el primer cebador directo consiste en la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1); y/o la primera sonda consiste en la secuencia 5'-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-3' (SEQ ID NO: 3), o su complemento.

40

En una realización todavía más preferida del método, el primer cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2); el primer cebador directo consiste en la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1); y la primera sonda consiste en la secuencia 5'-

AGATGTCTTGTGCTGCCGTA-3' (SEQ ID NO: 3), o su complemento.

En una realización preferida del método, el segundo cebador inverso comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5) y no tiene más de 23 bases de longitud; y/o el segundo cebador directo comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), y no tiene más de 22 bases de longitud; y/o la sonda comprende la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento, y no tiene más de 22 bases de longitud.

En una realización más preferida del método, el segundo cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5); y/o el segundo cebador directo consiste en la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4); y/o la segunda sonda consiste en la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento.

En una realización todavía más preferida del método, el cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5); el cebador directo consiste en la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4); y la sonda consiste en la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento.

En las diversas realizaciones, el método de la divulgación puede comprender una etapa preliminar que consiste en proporcionar una muestra, antes de someter la muestra a la reacción de transcripción inversa.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra ambiental, tal como aire, suelo, alimento, bebidas, piensos, agua (por ejemplo, agua dulce, agua salada, aguas negras y agua potable), aguas residuales, lodos y superficies o muestras obtenidas a partir de frotis superficiales. En las realizaciones preferidas, la muestra es una muestra biológica, por ejemplo, heces, muestra de tejido y fluido corporal. Los fluidos corporales incluyen secreciones mucosas, tales como, sin limitaciones, secreciones del tracto bucal y respiratorio (esputos, saliva y similares), sangre, plasma, suero, orina y líquido cefalorraquídeo. Las muestras incluyen hisopos tales como hisopos bucales o nasofaríngeos (NP), aspirato, lavada o lavado. Se pueden tomar muestras para pruebas de diagnóstico de SARS-CoV-2 del tracto respiratorio superior (hisopos nasofaríngeos/orofaríngeos, aspirados nasales, lavado nasal o saliva) o del inferior (esputo o aspirado traqueal o lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones particulares, la muestra biológica es una muestra clínica procedente de un individuo humano sospechoso de tener SARS-CoV-2, preferentemente una muestra de fluido corporal, más preferentemente secreciones bucales o del tracto respiratorio.

La muestra puede someterse a protocolos de aislamiento y purificación bien conocidos o utilizarse directamente. Por ejemplo, la muestra puede someterse a un tratamiento para liberar/extraer los ácidos nucleicos de la muestra y/o eliminar proteínas y otros componentes no ácidos nucleicos de la muestra usando técnicas convencionales, tales como las descritas en los Ejemplos.

La transcripción inversa del ARN de una cepa de coronavirus se puede realizar con un "cebador inverso" específico para el coronavirus. Un "cebador inverso" es aquel que, basándose en su orientación 5'-3', puede unirse a un ARN monocatenario y estar destinado a iniciar la generación de una copia de ADN complementario (ADNc) del ARN. La transcripción inversa se puede realizar utilizando métodos rutinarios y bien conocidos. La mezcla de reacción para la transcripción inversa contiene los reactivos para la reacción, por ejemplo, un cebador inverso, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón y una transcriptasa inversa. Las condiciones de reacción a modo de ejemplo se exponen en los ejemplos.

La amplificación de la copia de ADNc de una cepa de coronavirus generada mediante transcripción inversa se puede realizar con un "cebador directo" específico para el coronavirus. Un "cebador directo" es aquel que, basándose en su orientación 5'-3', puede unirse a una copia de ADN antisentido monocatenario de un ARN generado mediante transcripción inversa y estar destinado a iniciar la generación de una copia de ADN bicatenario del ARN. La amplificación se puede lograr utilizando métodos rutinarios y bien conocidos. La mezcla de reactivos para la amplificación contiene los reactivos para la reacción, por ejemplo, un cebador directo, un cebador inverso, dNTPs, un tampón y una ADN polimerasa.

Concretamente, el método de la divulgación se realiza utilizando una única mezcla de reactivos de RT-PCR que contiene los reactivos para las reacciones de amplificación y transcripción inversa. El cebador inverso utilizado para la reacción de transcripción inversa también se utiliza para la reacción de amplificación.

Concretamente, las reacciones de transcripción inversa y amplificación se realizan en un recipiente de plástico o vidrio, lo más preferentemente en el mismo recipiente.

Los métodos de amplificación conocidos en la técnica incluyen RCA, MDA, NASBA, TMA, SDA, LCR, ADN-b, PCR (todas las formas, incluida la RT-PCR), RAM, LAMP, ICAN, SPIA, replicasa QB o Invader. Un método de amplificación preferido es la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, p. ej., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Eds. Linis, *et al.*, Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res.

19, 4967 (1991); Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (Eds. McPherson *et al.*, IRL Press, Oxford); y las patentes de Estados Unidos N.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, 4.965.188 y 5.333.675. Los métodos de PCR preferido es PCR en tiempo real, PCR-HRM (forma siglada de *High-Resolution DNA Melting*, fusión de ADN de alta resolución) (véase Andrianantoanirina *et al.* Journal of Microbiological Methods, 78: 165 (2009)) y PCR acoplada a reacción de detección de ligasa basada en microesferas fluorescentes (microesferas Luminex®).

Las técnicas de amplificación incluyen en particular métodos isotérmicos y técnicas basadas en PCR. Las técnicas isotérmicas incluyen métodos tales como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), la amplificación dependiente de helicasa (HDA, por sus siglas en inglés), la amplificación de círculo rodante (RCA) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), la reacción de amplificación exponencial (EXPAR, por sus siglas en inglés), la amplificación iniciada por cebadores isotérmica y química de ácidos nucleicos (ICAN, por sus siglas en inglés), la amplificación mediada por señal de tecnología de ARN (SMART, por sus siglas en inglés) y otras (véase, por ejemplo, Asiello y Baeumner, Lab Chip; 11(8): 1420-1430, 2011).

Concretamente, la técnica de PCR mide cuantitativamente las cantidades iniciales de ADN, ADNc o ARN. Ejemplos de técnicas basadas en PCR de acuerdo con la invención incluyen técnicas tales como, aunque no de forma limitativa, PCR cuantitativa (Q-PCR), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (QRT-PCR) o PCR digital. Estas técnicas son tecnologías bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, el método es un método de RT-PCR, preferentemente una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (QRT-PCR).

Preferentemente, el método es un ensayo de RT-PCR en tiempo real de una sola etapa, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

Se utiliza una sonda para detectar el producto amplificado. La sonda se puede marcar con un marcador fluorescente, radioactivo o enzimático. El producto amplificado se puede detectar con una química de detección específica, como sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés), sondas de TAQMAN, balizas moleculares, sondas de Scorpion, cebadores marcados fluorescentemente (u otros marcados), sondas Lightup o una química basada en colorantes, ADN, APN, LNA o ARN que incluye bases modificadas que se unen al producto amplificado para detectar la secuencia de interés.

La detección de los productos amplificados puede realizarse en tiempo real (durante el proceso de amplificación) o de punto final (después del proceso de amplificación). El método permite la detección de los productos de amplificación en el mismo recipiente en el que se produce la amplificación.

Concretamente, se utiliza un control interno de ADN para supervisar la reacción de amplificación.

De manera específica, se utiliza un control interno de ARN para supervisar las reacciones de amplificación y transcripción inversa.

Concretamente, el método comprende transcripción inversa y amplificación de un control positivo interno. Concretamente, el cebador inverso de control positivo interno comprende la secuencia 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' (SEQ ID NO: 8), y tiene de 19 a 25 bases de longitud; y/o el cebador directo de control positivo interno comprende la secuencia 5' ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' (SEQ ID NO: 7), y tiene de 23 a 29 bases de longitud; y/o la sonda de control positivo interno comprende la secuencia 5' AACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG 3' (SEQ ID NO: 9), o su complemento, y tiene de 23 a 29 bases de longitud.

En algunas realizaciones del método, la sonda y la sonda de control positivo interno están marcadas con 6-carboxi-fluoresceína (6FAM) o hexafluoro-6-carboxi-fluoresceína (HEX) en el extremo 5'.

En algunas realizaciones del método, la sonda y la sonda de control positivo interno están marcados con el black hole quencher 1 (BHQ1) en el extremo 3'.

En algunas realizaciones del método, el coronavirus es SARS-CoV-2 y no es otro coronavirus, ni otros virus que causen enfermedades respiratorias.

Los cebadores de la divulgación se usan tanto para la transcripción inversa de ARN como para la amplificación de los productos resultantes. Las secuencias del cebador son selectivas para el SARS-CoV-2 dentro de los coronavirus y también para otros virus prevalentes que causan enfermedades respiratorias. Adicionalmente, los cebadores de la divulgación se dirigen a secuencias que se encuentran entre las regiones más conservadas con menos del 0,1 % de mutaciones entre todas las variantes secuenciadas (más de 449.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID). Por lo tanto, una de las principales ventajas de los cebadores de la divulgación es que, a pesar de la aparición de variantes del SARS-CoV-2, todavía permiten detectar la presencia de una variante de ARN

del SARS-CoV-2 existente en una muestra.

Concretamente, los cebadores están en un conjunto de un cebador directo y de un cebador inverso.

- 5 El "cebador inverso" es un cebador antisentido, que es el cebador para la transcripción inversa y se conserva entre las cepas de coronavirus. El cebador inverso es específico para el SARS-CoV-2.

El primer cebador inverso se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAAGGGAG-3' (SEQ ID NO: 11) y su equivalente de ARN y el segundo cebador inverso se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO: 14) y su equivalente de ARN.

- 10 En una realización preferida, el primer cebador para la transcripción inversa comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2), y no tiene más de 21 bases de longitud, o el segundo cebador para la transcripción inversa comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5), y no tiene más de 23 bases de longitud. Preferentemente, el primer cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2) o el segundo cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTGGTCAAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5).

- 15 En este contexto, el término "se hibrida con" se refiere a la capacidad del cebador para formar una molécula híbrida bicatenaria con ARN de SARS-CoV-2 (es decir, que comprende el equivalente de ARN de la SEQ ID NO: 11 o 14) suficiente para producir un ADNc y para promover la amplificación del ADNc en condiciones de amplificación y transcripción inversa estándar tales como las expuestas en el ejemplo.

- 20 El "cebador directo" es un cebador sentido, que es específico para un subconjunto de SARS-CoV-2.

- 25 El primer cebador directo se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO: 10) y el segundo cebador directo se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-3' (SEQ ID NO: 13).

- 30 En una realización preferida, el primer cebador directo comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), y no tiene más de 21 bases de longitud, o el segundo cebador directo comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), y no tiene más de 22 bases de longitud. Preferentemente, el primer cebador directo consiste en la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1) o el segundo cebador directo consiste en la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4).

- 35 En este contexto, el término "se hibrida con" se refiere a la capacidad del cebador para formar una molécula híbrida bicatenaria con ARN de SARS-CoV-2 (es decir, que comprende el equivalente de ARN de la SEQ ID NO: 10 o 13) suficiente para producir un ADNc y para promover la amplificación del ADNc en condiciones de amplificación y transcripción inversa estándar tales como las expuestas en el ejemplo.

- 40 El cebador (inverso o directo) se hibrida con la secuencia diana o su complemento y puede extenderse aún más en presencia de una polimerasa de ácido nucleico para amplificar específicamente la secuencia diana. La secuencia cebadora es sustancialmente complementaria a la secuencia diana o a su complemento. Sustancialmente complementaria significa que la secuencia del cebador es al menos un 80 % idéntica, preferentemente al menos el 85 %, 90 %, 95 % y 98 % idéntica a la secuencia diana o a su complemento. El cebador puede comprender secuencias adicionales (no complementarias a la secuencia diana) en su extremo 5'. Concretamente, el cebador comprende una secuencia de al menos 5, preferentemente de 10 a 15 nucleótidos consecutivos que sean 100 % idénticos a la secuencia diana o a su complemento. Más en particular, la secuencia de cebador es 100 % idéntica a la secuencia diana o a su complemento. Opcionalmente, al menos un cebador del par incluye un marcador (fracción detectable). En algunas realizaciones más preferidas, el cebador inverso y directo es como se describe anteriormente.

- 50 La divulgación proporciona un primer conjunto de cebadores para su uso en la amplificación de un ARN de SARS-CoV-2 en una muestra, en donde el conjunto de cebadores comprende: un primer cebador inverso que se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAAGGGAG-3' (SEQ ID NO: 11) y su equivalente de ARN; y un primer cebador directo que se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO: 10).

- 55 Concretamente, el conjunto de cebadores comprende: un primer cebador inverso que comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2), que no tiene más de 21 bases de longitud; y un primer cebador directo que comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), que no tiene más de 21 bases de longitud.

- 60 En particular, el primer cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2); y el primer cebador directo consiste en la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1).

- 65 La divulgación proporciona un segundo conjunto de cebadores, en donde el conjunto de cebadores comprende: un segundo cebador inverso que se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO: 14) y su equivalente de ARN; y un segundo cebador directo que se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-

3' (SEQ ID NO: 13).

Concretamente, el conjunto de cebadores comprende: un segundo cebador inverso que comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5) que no tiene más de 23 bases de longitud; o un segundo cebador directo que comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), que no tiene más de 22 bases de longitud.

En particular, el segundo cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5); y el segundo cebador directo consiste en la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4).

La divulgación proporciona un conjunto de cebadores para su uso en la amplificación de un ARN de SARS-CoV-2 en una muestra, en donde el conjunto de cebadores comprende: un primer cebador inverso que se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAAGGGAG-3' (SEQ ID NO:11) y su equivalente de ARN; un primer cebador directo que se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO:10); un segundo cebador inverso que se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO:14) y su equivalente de ARN; y un segundo cebador directo que se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-3' (SEQ ID NO: 13).

Concretamente, el conjunto de cebadores comprende: un primer cebador inverso que comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2), que no tiene más de 21 bases de longitud; un primer cebador directo que comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), que no tiene más de 21 bases de longitud; un segundo cebador inverso que comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5), que no tiene más de 23 bases de longitud; y un segundo cebador directo que comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), que no tiene más de 22 bases de longitud.

En particular, el primer cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2); el primer cebador directo consiste en la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1); el segundo cebador inverso consiste en la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5); y el segundo cebador directo consiste en la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTCG-3' (SEQ ID NO: 4).

Las sondas de la divulgación son útiles para la detección de ácidos nucleicos de coronavirus. Como se cita en el presente documento, la "sonda" de la divulgación está unida a un marcador detectable adecuado para su uso en el método de la invención. La sonda es específica para cepas de SARS-CoV-2. Las secuencias de la sonda son selectivas para el SARS-CoV-2 dentro de los coronavirus y también para otros virus prevalentes que causan enfermedades respiratorias. Adicionalmente, al igual que los cebadores, las sondas de la divulgación se dirigen a secuencias que se encuentran entre las regiones más conservadas con menos del 0,1 % de mutaciones entre todas las variantes secuenciadas (más de 449.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID). Por lo tanto, una de las principales ventajas de las sondas de la divulgación es que, a pesar de la aparición de variantes del SARS-CoV-2, todavía permiten detectar la presencia de una variante de ARN del SARS-CoV-2 existente en una muestra.

Un "marcador detectable" como se utiliza en el presente documento es una fracción, que se puede detectar directa o indirectamente. En algunas realizaciones, la detección del marcador implica detectar directamente una emisión de energía por parte del marcador (por ejemplo, radiactividad, luminiscencia, óptica). Un marcador también puede detectarse indirectamente por su capacidad para unirse o escindir otra fracción, que, a su vez, puede emitir o absorber luz de una longitud de onda particular (por ejemplo, biotina, avidina, etiqueta de epítipo tal como el epítipo FLAG, etiqueta enzimática tal como peroxidasa de rábano picante). Marcadores detectables particulares incluyen marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y etiquetas de epítipos. En particular, la sonda está marcada con los colorantes fluorescentes 6-carboxi-fluoresceína (6FAM) o hexacloro-6-carboxi-fluoresceína (HEX), más particularmente en el extremo 5'. Más en particular, la sonda está marcada en su extremo 3' con black hole quencher 1 (BHQ1).

En particular, la sonda se utiliza en la detección de productos de amplificación de un ARN del SARS-CoV-2 en una muestra.

Concretamente, la primera sonda se hibrida con la secuencia: 5'-TACCGGCAGCACAAAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 12) o su complemento, o la segunda sonda se hibrida con la secuencia 5'-CCTGGCGTGGTTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 15) o su complemento.

En particular, la primera sonda consiste en o comprende la secuencia: 5'-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-3' (SEQ ID NO: 3), o su complemento y no tiene más de 24 bases de longitud.

En particular, la segunda sonda consiste en o comprende la secuencia: 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento y no tiene más de 22 bases de longitud.

Más en particular, la primera sonda consiste en la secuencia 5'-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-3' (SEQ ID NO: 3), o su complemento; o la segunda sonda consiste en la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6),

o su complemento.

Concretamente, la sonda está marcada con 6-carboxi-fluoresceína (6FAM) o hexafluoro-6-carboxi-fluoresceína (HEX) en el extremo 5'.

Concretamente, la sonda está marcada con el black hole quencher 1 (BHQ1) en el extremo 3'.

El método de la divulgación abarca la inclusión de controles para las reacciones de amplificación y/o transcripción inversa. El control de ADN de la invención es útil para controlar la reacción de amplificación.

Concretamente, el control es un control positivo interno, por ejemplo, en donde el cebador inverso de control positivo interno comprende la secuencia 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' (SEQ ID NO: 8) y tiene una longitud de 19 a 25 bases; y/o en donde el cebador directo de control positivo interno comprende la secuencia 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' (SEQ ID NO: 7) y tiene una longitud de 23 a 29 bases; y/o en donde la sonda de control positivo interno comprende la secuencia 5'-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-3' (SEQ ID NO: 9), o su complemento, y tiene de 23 a 29 bases de longitud.

Concretamente, un ensayo de RT-PCR en tiempo real incluye además de muestras desconocidas:

Dos muestras negativas que agrupan entre corchetes muestras desconocidas durante la extracción de ARN (controles de extracción negativos); y/o

Controles positivos (por duplicado); cuando se usan transcritos sintetizados *in vitro* como controles incluyen cinco controles positivos de cuantificación (por duplicado), incluyendo 10^5 , 10^4 y 10^3 copias de equivalentes genómicos (ge) de transcritos de ARN sintetizados *in vitro*; y/o un control de amplificación negativo.

El método de acuerdo con la invención y como se ha descrito anteriormente se puede poner en práctica en diferentes muestras; humanos y animales no humanos, superficies, suelos, para diagnóstico, epidemiología, vigilancia, así como para examinar los bancos de sangre y tejidos que puedan necesitar pruebas frente al SARS-CoV2 como parte de la detección del HIV1, HIV2, VHB, VHC, etc.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales, que se encuentran entre las técnicas de la materia. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que no son limitativos, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Figuras

Figura 1: Gráficos de amplificación de RT-qPCR del gen nsp6 del SARS-CoV-2 en variantes UK-SA-BR utilizando diferentes combinaciones de cebadores sentido e inverso. El número de copias del SARS-CoV-2 varió de $4,0 \cdot 10^4$ a 40 copias. La eficiencia de amplificación (E) se determinó representando gráficamente los valores medios de Cq frente a diluciones de cinco veces el número de copias. Los 4 conjuntos de cebadores-sonda tienen una eficacia cercana al 100 %: (A) Cebadores MUT-As y MUT-Ar con sonda MUT-sondaA, (B) Cebadores MUT-Bs y MUT-Br con sonda MUT-sondaA, (C) cebadores MUT-Cs y MUT-Cr con sonda MUT-sondaA y (D) cebadores MUT-Ds y MUT-Dr con sonda MUT-sondaA.

Figura 2: Gráficos de amplificación de RT-qPCR de genes ORF8-N del SARS-CoV-2 y región intergénica en variantes de UK utilizando diferentes combinaciones de cebadores sentido e inverso (A a E). Se utilizó una sonda común para cada reacción (UK-sonda B). El número de copias del SARS-CoV-2 en cada reacción varió de $4,0 \cdot 10^5$ a 40 copias. La eficiencia de amplificación (E) se determinó representando gráficamente los valores medios de Cq frente a diluciones de cinco veces el número de copias.

Figura 3: Amplificación y curvas estándar de UK-As+Ar (eficiencia, $E=101,1$) y UK-Bs+Br ($E=101,9$). UK-Cs+Cr (parte inferior) no es específica ($E = 348,2$ y consulte la curva de fusión). El ARN utilizado fue CIBU-200132 (muestra clínica, linaje ancestral) en un intervalo de dilución de $1,0 \cdot 10^{-3}$ a $1,0 \cdot 10^{-6}$. Las reacciones se hicieron con EVA verde, no con una sonda específica, razón por la que se puede utilizar un ARN ancestral del SARS-CoV-2.

Figura 4: Ilustración de las especificidades de la prueba. Variantes UK-SAf-Br durante la prueba MUT (MUT: MUT-As+MUT-Ar+MUT-sonda A) detectan solamente las 3 variantes. Igualmente, la prueba específica de UK (UK-as+UK-Cr+UKsonda-B) detecta solo variantes de UK, no los clados ancestrales ni las variantes SA-BR. El ADNc utilizado es el mismo que anteriormente (CIBU-200132, linaje ancestral detectado en los hospitales del Gran París en marzo de 2020).

Ejemplos

1. Detección del SARS-CoV-2

Este protocolo describe procedimientos para la detección del SARS-CoV-2 para dos dianas en los genes nsp9 y RdRp (IP2 e IP4). Basándose en las primeras secuencias de SARS-CoV-2 disponibles en la base de datos GISAID el 11 de enero de 2020 (SEQ ID NO: 19), se diseñaron cebadores y sondas (nCoV_IP2 y nCoV_IP4) dirigidos al gen nsp9 que abarca los nt 12621-12727 y al gen RdRp 14010-14116 (posiciones según SARS-CoV, NC_004718). Estas posiciones corresponden a los nt 12669-12776 y 14059-14165 en la secuencia del SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 19) o a los nt 12690 a 12797 y 14080 a 14186 en NC_045512.2.

Como ensayo confirmatorio, se utilizó el ensayo del gen E del protocolo Charité. (Corman VM, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020;25.)

A. Kits

Kit de extracción NucleoSpin Dx Virus (Macherey Nagel 740895.50).

Sistema de RT-PCR cuantitativa de una sola etapa Superscript™ III Platinum®. (Invitrogen 1732-020).

B. Cebadores y sondas

Tabla 2: Secuencias de cebadores y sondas

Nombre	Secuencias (5'-3')	Longitud (bases)	Tamaño del producto de PCR	Ref.
<i>gen nsp9/nCoV_IP2</i>				
nCoV_IP2-12669Fw	ATGAGCTTAGTCCTGTTG (SEQ ID NO: 1)	18	108 pb	1
nCoV_IP2-12759Rv	CTCCCTTTGTTGTGTTGT (SEQ ID NO: 2)	18		
nCoV_IP2-12696bSonda(+)	AGATGTCTTGTGCTGCCGTA [5']Hex [3']BHQ-1 (SEQ ID NO: 3)	21		
<i>Gen RdRp/nCoV_IP4</i>				
nCoV_IP4-14059Fw	GGTAACTGGTATGATTTTCG (SEQ ID NO: 4)	19	107 pb	1
nCoV_IP4-14146Rv	CTGGTCAAGGTTAATATAGG (SEQ ID NO: 5)	20		
nCoV_IP4-14084Sonda(+)	TCATACAAACCACGCCAGG [5']Fam [3']BHQ-1 (SEQ ID NO: 6)	19		
<i>Gen E/E_Sarbeco (CoV E)</i>				
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT (SEQ ID NO: 7)	26	113 pb	2
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA (SEQ ID NO: 8)	22		
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG [5']Fam [3']BHQ-1 (SEQ ID NO: 9)	26		

1. Centro Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Instituto Pasteur, París.

2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 2020;25

Los conjuntos de cebadores nCoV_IP2 y nCoV_IP4 pueden ser multiplexados. Ambas mezclas de reacción se describen a continuación.

Regiones de amplificación por PCR (posiciones según SARS-CoV, NC_004718):

nCoV_IP2: 12621-12727. El amplicón (108 pb) tiene la secuencia SEQ ID NO: 16 que corresponde a las posiciones 12669-12776 en la secuencia del SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 19)

nCoV_IP4: 14010-14116. El amplicón (107 pb) tiene la secuencia SEQ ID NO: 17 que corresponde a las posiciones

14059-14165 en la secuencia del SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 19)

Gen E: 26141-26253. El amplicón (113 pb) tiene la secuencia SEQ ID NO: 18 que corresponde a las posiciones 26249-26361 en la secuencia del SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 19).

C. Extracción de ácido nucleico

El ARN se extrae de las muestras utilizando NucleoSpin Dx Virus (Macherey Nagel ref. 740895.50). El ARN extraído de 100 µl de una muestra original, se eluye en 100 µl de tampón de elución.

D. Preparación de la mezcla para todas las combinaciones de cebador/sonda distintas

Todos los cebadores y sondas que se describen a continuación se validaron en las siguientes condiciones.

Kit de mezcla de RT-PCR: Sistema de qRT-PCR de una sola etapa Superscript™ III Platinum® de Invitrogen (ref. 11732-088).

Equipos de PCR en tiempo real: LightCycler 480 (96).

Es posible que sean necesarios ajustes para el uso de otros kits u otros instrumentos de PCR en tiempo real. Todos los Ensayos utilizaron las mismas condiciones. Las secuencias de cebadores y sondas, así como las concentraciones optimizadas se muestran en la siguiente tabla. Se preparó una reacción de 25 µl que contenía 5 µl de ARN.

Tabla 3: Mezcla simplex

Mezcla simplex	Volumen (µl)	[final]
H ₂ O PPI	3,60	
Mezcla de reacción 2X	12,50	Mg 3 mM
MgSO ₄ (50 mM)	0,40	Mg 0,8 mM
Cebador directo (10 µM)	1,00	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	1,00	0,4 µM
Sonda (10 µM)	0,50	0,2 µM
Mezcla Superscript III RT/Platinum Taq	1,00	
Volumen final	20,00	

Tabla 4: Mezcla multiplex

Mezcla multiplex (nCoV_IP2 e IP4)	Volumen (µl)	[final]
H ₂ O PPI	1,3	
Mezcla de reacción 2X	12,50	Mg 3 mM
MgSO ₄ (50 mM)	0,40	Mg 0,8 mM
Cebador directo (10 µM)	1,00	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	1,00	0,4 µM
Cebador directo (10 µM)	1,00	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	1,00	0,4 µM
Sonda (10 µM)	0,4	0,16 µM
Sonda (10 µM)	0,4	0,16 µM
Mezcla Superscript III RT/Platinum Taq	1,00	
Volumen final	20,00	

E. Controles

Cada ensayo de RT-PCR en tiempo real incluye además muestras desconocidas:

Dos muestras negativas que agrupan entre corchetes muestras desconocidas durante la extracción de ARN (controles de extracción negativos).

Controles positivos (por duplicado); cuando se usan transcritos sintetizados *in vitro* como controles incluyen cinco controles positivos de cuantificación (por duplicado), incluyendo 10⁵, 10⁴ y 10³ copias de equivalentes genómicos (ge) de transcritos de ARN sintetizados *in vitro*.

Un control de amplificación negativo.

F. Ciclos de amplificación (Sistema Lightcycler)

Tabla 5: Ciclos de amplificación

Transcripción inversa	55 °C	20 min	x1	
Desnaturalización	95 °C	3 min	x1	
Amplificación	95 °C	15 s	x50	Adquisición
	58 °C	30 s		
Enfriamiento	40 °C	30 s	x1	

G. Sensibilidad

5 RT-PCR en tiempo real de nCoV_IP y E_Sarbeco

La sensibilidad, en términos de una tasa de aciertos del 95 % es de aproximadamente 100 copias de equivalente genómico de ARN por reacción (siempre se detecta esta cantidad de secuencias diana), la probabilidad de detectar menores cantidades de virus disminuye, pero las muestras que contienen 10 copias se pudieron detectar con un ensayo multiplex.

Tabla 6: Sensibilidad

Copias del transcrito de ARN	Multiplex (valores de Ct)		Simplex (valores de Ct)
	nCoV_IP2	nCoV_IP4	E_Sarbeco
1,00E+07	21,67	21,97	24,72
1,00E+06	24,97	25,12	28,19
1,00E+05	28,00	27,88	30,96
1,00E+04	31,84	30,51	33,33

Los valores de Ct pueden variar de un instrumento a otro hasta en 2 ciclos, mientras que el intervalo entre dos etapas de dilución es constante (ΔCt).

H. Especificidad

La reactividad cruzada con otros virus respiratorios se analizó con muestras que se sabía que eran positivas para un panel de virus respiratorios (gripe A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B-Victoria, B-Yamagata; gripe C; VRS A, B; hBoV; hPIV; hMPV; HRV/enterovirus; adenovirus; hCoV (HKU1, OC43, 229E y NL63); MERS-CoV. Ninguno de los virus analizados mostró reactividad con PCR2 y PCR4 utilizando los conjuntos de cebadores y sondas IP2 e IP4 descritos en la Tabla anterior.

I. Control positivo para RT-PCR en tiempo real del SARS-CoV-2

El control positivo para RT-PCR en tiempo real es un ARN transcrito *in vitro* derivado de la cepa BetaCoV_Wuhan_WIV04_2019 (EPI_ISL_402124). El transcrito contiene las regiones de amplificación del gen RdRp y E como cadena positiva. Cada microtubo contiene 1011 copias de secuencias diana diluidas en ARNt de levadura y liofilizadas.

Reconstitución del ARN transcrito

Añadir 100 µl de H₂O libre de RNasa/DNasa para obtener una solución a una concentración de 109 copias/µl. Conservar a -80 °C. Diluir para preparar un banco maestro con 2x10⁶ copias/µl. Conservar a -80 °C.

A partir de esto, preparar un banco de trabajo de reactivo con 2x10⁴ copias/µl para evitar ciclos de congelación/descongelación. Los tubos de trabajo pueden almacenarse a -20 °C durante menos de una semana.

Esta prueba, que ahora está validada en un panel de SARS-CoV-2 de 600 pacientes positivos y negativos, incluyendo individuos de contacto asintomáticos, individuos que regresan de la zona epidémica y pacientes sintomáticos. Dentro de los pacientes sintomáticos, ya que también hay una epidemia simultánea de gripe en Francia, se confirmó que los pacientes negativos con la prueba SARS-CoV2 de la invención estaban infectados por gripe u otras enfermedades respiratorias. La validación de esta prueba permite ahora el envío para diagnóstico a hospitales de referencia en Francia y en el extranjero, y dentro de la red internacional del Instituto Pasteur en todo el mundo.

J. Conservación de la región amplificada por los conjuntos de cebadores nCoV_IP2 y nCoV_IP4

Más de 433.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 procedentes de la base de datos GISAID recuperadas el 6 de febrero de 2021 se alinearon para evaluar el grado de conservación de las secuencias de genes a las que se dirigen los conjuntos de cebadores nCoV_IP2 y nCoV_IP4.

La alineación de secuencias múltiples comprendió el 26 % de las secuencias genómicas de la variante del UK, el 0,5 % de las secuencias genómicas de la variante SA y el 0,1 % de las secuencias genómicas de la variante BR.

Tabla 7: Conservación de las dianas de los genes nsp9 y RdRp

Genes	Inicio (NC_045512)	Final (NC_045512)	tamaño de la región	conservación (en 433 425 genomas compl.)	Conjunto de cebadores
nsp8-nsp9	12401	12865	465	0,999007799	nCoV_IP2
NIRAN-RDRP-nsp12	13764	14340	577	0,999188415	nCoV_IP4

Las secuencias de SARS-CoV-2 que abarcan los nt 12401-12865 y 13764-14340 (posiciones según el aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512) se encuentran entre las regiones más conservadas con menos del 0,1 % de mutaciones entre todas las variantes secuenciadas. Estas regiones comprenden las secuencias a las que se dirigen los conjuntos de cebadores nCoV_IP2 y nCoV_IP4 respectivamente.

Como ejemplo, la región menos conservada en el gen RdRp es una secuencia de 101 nt que abarca los nt 14362-14462 con una conservación de 0,9933455.

K. Conservación de regiones del SARS-CoV-2 hibridadas mediante conjuntos de cebadores y sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4

Más de 450.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID recuperadas el 1 de febrero de 2021 se alinearon para evaluar el grado de conservación de cada nucleótido de las regiones hibridadas por los conjuntos de cebadores y sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4.

Entre las 451.405 secuencias disponibles, las secuencias genómicas derivadas de muestras de hospedadores no humanos, las muestras de hospedadores desconocidos, las muestras ambientales, los cultivos celulares, las muestras con fecha posterior al 1 de febrero de 2021, las muestras duplicadas (mismo individuo, misma muestra), así como las secuencias inferiores a 10 nt o más de 40.000 nt, y las secuencias con un código de letras no estándar se eliminaron antes de la alineación (~1000 secuencias). La distribución de las secuencias alineadas entre los clados fue la siguiente:

Tabla 8: Distribución de las secuencias alineadas entre los clados

Ocurrencias de Nb	%	Clado
16914	3,75 %	19A
9079	2,01 %	19B
87153	19,31 %	20A
11933	2,64 %	20A.(UE2)
105420	23,36 %	20B
48354	10,72 %	20C
5092	1,13 %	20D
99046	21,95 %	20E (EU1)
12605	2,79 %	20F
16207	3,59 %	20G
774	0,17 %	20H/501Y.V2 (variante de SA)
38590	8,55 %	20I/501Y.V1 (variante de UK)
59	0,01 %	20J/501Y.V3 (variante de BR)

El grado de conservación de cada nucleótido de las regiones hibridadas por los conjuntos de cebadores y sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4 y las regiones adyacentes se presenta en las **Tablas 27 a 32** (uno por cebador y sonda).

Los nucleótidos en las regiones a las que se dirigen los cebadores y conjuntos de sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4 se conservan desde al menos un 99,5 % hasta un 99,9 %.

A pesar de la aparición de variantes del SARS-CoV-2, los conjuntos de cebadores y sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4 aún permiten la detección de la presencia de la variante de ARN del SARS-CoV-2 existente en una muestra, incluso si fueron diseñados basándose en las primeras secuencias del SARS-CoV-2 disponibles en la base de datos GISAID el 11 de enero de 2020.

2. Detección de las variantes UK, SA y BR del SARS-CoV-2

Más de 433.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID recuperadas el 6 de febrero de 2021 se alinearon para identificar una característica de secuencia específica de la variante de Brasil (BR) (también conocida como P.1), de la variante del Reino Unido (UK) o de la variante de Kent (también conocida como B.1.1.7) y de la variante de Sudáfrica (SA) (también conocida como B.1.351).

El alineamiento de secuencias múltiples comprendió 111.416 secuencias genómicas de la variante de UK, 2423 de las secuencias genómicas de la variante de SA y 429 secuencias genómicas de la variante de BR.

Una delección de 9 nucleótidos en el gen ORF1a nsp6 que abarca los nt 11288-11296 (posiciones según el aislado de

SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512) está presente solo en las variantes de BR, UK y SA.

Este protocolo describe procedimientos para la detección de esta delección de 9 nucleótidos.

- 5 Basándose en las secuencias del SARS-CoV-2 disponibles en la base de datos GISAID del Centro Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Instituto Pasteur, París (Tabla 9), los cebadores y sondas se diseñaron para dirigirse a la eliminación en el gen nsp6 que abarca los nt 11288-11296 (posiciones según el aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512).

- 10 **Tabla 9:** Números de acceso a GISAID de los genomas de UK, SA y BR utilizados como referencias para el presente estudio y número de genomas variantes utilizados en la alineación para identificar una característica de secuencia específica de estas 3 variantes

Variante	Número de acceso epi a GISAID	Nb de secuencias alineadas
UK	B.1.1.7-EPI_ISL_1001329	11416
SA	B.1.351-EPI_ISL_1001390	2423
BR	P.1 - EPI_ISL_1001385	429

A. Kits

- 15 Kit avanzado de síntesis de ADNc iScript™ para RT-qPCR (Bio-Rad) para la etapa de transcripción inversa.

iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) o

- 20 EurobioGreen qPCR Mix (Eurobio) para la etapa de amplificación y cuantificación del ADN.

B. Cebadores y sondas

- 25 Los cebadores se diseñaron para permitir la amplificación de todos los virus del SARS-CoV-2, mientras que las sondas se diseñaron para detectar específicamente la delección en el gen nsp6 que abarca los nt 11288-11296 (posiciones según el aislado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 NC_045512).

Tabla 10: Secuencias de cebadores y sondas

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Orientación sobre el genoma	Posición NC_045512	Posición NC_045512	SEQ ID NO
MUT-As	GCTAGTTGGGTGATGCGTATT	DIR	11234	11254	20
MUT-Bs	TGGTCTATATGCCTGCTAGTTG	DIR	11220	11241	21
MUT-Cs	GATGCGTATTATGACATGGTTGG	DIR	11245	11267	22
MUT-Ds	TCTCTTGCCACTGTAGCTTATT	DIR	11192	11213	23
MUT-Fs	GTGATGCGTATTATGACATGGTT	DIR	11243	11265	24
MUT-Ar	CTCCTAGCACCATCATCATACAC	INV	11363	11385	25
MUT-Br	GCTGATGCATACATAACACAGTC	INV	11306	11328	26
MUT-Cr	CAGTTCTTGCTGTCATAAGGATTAG	INV	11339	11363	27
MUT-Dr	GATTAGTAACACTACAGCTGATGC	INV	11321	11344	28
MUT-sondaA	TGGTTGATACTAGTTTGAAGCT	DIR	11271	11301	29
MUT-sondaB	GCTTCAAACCTAGTATCAACCATATC C	INV	11266	11297	30

- 30 **C. Extracción de ácidos nucleicos y extractos de variantes del SARS-CoV-2**

El ARN se extrae de las muestras utilizando NucleoSpin Dx Virus (Macherey Nagel ref. 740895.50). El ARN extraído de 100 µl de una muestra original, se eluye en 100 µl de tampón de elución.

Tabla 11: Cepas variantes del SARS-CoV-2 utilizadas para analizar cebadores y sondas

Origen	Variante	Clados	Linajes Pango	
Francia	CIBU-200132			CIBU, Instituto Pasteur, París
Francia	D614G	G		NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
UK	20I/501Y.V1	GR	B.1.1.7	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
SA	20H/501Y.V2	GH	B.1.351	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
BR	20J/501Y P1	GR	P.1	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París

D. Preparación de la mezcla

Todos los cebadores y sondas que se describen a continuación se validaron en las siguientes condiciones.

Se transcribió de forma inversa un volumen variable de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc Avanzado iScript para RT-qPCR (Bio-Rad) con 4 µl de 5x Mezcla de Reacción Avanzada de iScript y 1 µl de Transcriptasa Inversa Avanzada iScript en un volumen final de 20 µl durante 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C en un termociclador T100 (Bio-Rad)

Es posible que sean necesarios ajustes para el uso de otros kits u otros instrumentos de PCR en tiempo real.

Todos los Ensayos utilizaron las mismas condiciones. Las secuencias de cebadores y sondas, así como las concentraciones optimizadas se muestran en la siguiente tabla. Se preparó una reacción de 20 µl que contenía 2 µl de ARN, 400 nM de cebadores y opcionalmente 200 nM de sonda.

Tabla 12: Mezcla simplex

Mezcla simplex con colorante SYBRGreen®		Volumen (µl)	[final]
	H ₂ O PPI	6,4	
	Mezcla SYBR green 2X	10	1X
	Cebador directo (10 µM)	0,8	0,4 µM
	Cebador inverso (10 µM)	0,8	0,4 µM
	Volumen final	20,00	

Tabla 13: Mezcla multiplex

Mezcla simplex con una sonda		Volumen (µl)	[final]
	H ₂ O PPI	6	
	Mezcla SYBR green 2X	10	1X
	Cebador directo (10 µM)	0,8	0,4 µM
	Cebador inverso (10 µM)	0,8	0,4 µM
	Sonda (10 µM)	0,4	0,2 µM
	Volumen final	20,00	

E. Controles

Todos los cebadores y sondas se analizaron mediante RT-qPCR con un extracto de ARN de la línea celular humana HEK-293T (riñón embrionario humano) o sin plantilla de ARN (H₂O).

F. Ciclos de amplificación

Tabla 14: Ciclos de amplificación

Desnaturalización	95 °C	2 min	x1	
Amplificación	95 °C	5 s	X40	Adquisición
	60 °C	30 s		
Enfriamiento	40 °C	30 s	x1	

G. Especificidad analítica de los pares de cebadores

Dado que las sondas diseñadas se dirigen a la delección de 9 nucleótidos, fue posible seleccionar los mejores pares de cebadores sobre el ARN ancestral del SARS-CoV-2 (extraído de la muestra clínica de las cepas CIBU-200132) con un colorante intercalante de ADN antes de analizar combinaciones de los mejores pares de cebadores con una sonda.

La especificidad de los pares de cebadores se evaluó mediante diluciones seriadas de 10 veces del SARS-CoV-2 genómico y analizando la curva de fusión.

5 H. Eficiencias de amplificación

Basándose en los mejores pares de cebadores, se analizaron las siguientes combinaciones:

- MUT-As, MUT-Ar, MUT-sondaA
- MUT-Bs, MUT-Br, MUT-sondaA
- MUT-Bs, MUT-Br, MUT-sondaB
- MUT-Cs, MUT-Cr, MUT-sondaA
- MUT-Ds, MUT-Dr, MUT-sondaA
- MUT-Ds, MUT-Dr, MUT-sondaB
- MUT-Fs, Mut-Cr, sin sonda.

Todas las combinaciones se analizaron en un extracto de ARN de la variante de UK, SA o BR, SARS-CoV-2 ancestral y controles (HEK-293T y H₂O) (Figura 1 y 4).

Se obtuvieron los siguientes valores del ciclo de cuantificación (Cq)

Tabla 15: Valores de Cq obtenidos con cada combinación de cebadores y sondas para muestras de ARN de las variantes de UK, SA y BR frente a SARS-CoV-2 ancestral. (nd: no detectado)

Origen	Prueba (copias)	Cq MUT-As MUT-Ar MUT-sondaA	Cq MUT-Bs MUT-Br MUT-sondaA	Cq MUT-Cs MUT-Cr MUT-sondaA	Cq MUT-Ds MUT-Dr MUT-sondaA
Francia (ancestral)	3,0 10 ⁵	nd	nd	nd	nd
UK	1,0 10 ⁵	30,165	29,355	29,15	28,475
SA	7,5 10 ⁴	31,725	30,965	30,575	29,89
BR	no hay titulación disponible	34,9	33,86	33,6	33,33
BR	no hay titulación disponible	32,92	32,225	31,925	31,195

No se detectó amplificación en los controles.

La eficiencia de amplificación (E) se determinó representando gráficamente los valores medios de Cq frente a cinco números de copias diferentes (diluciones de 10 veces).

Tabla 16: Valores de Cq obtenidos con cada combinación de cebadores y sondas para un número de copias determinado del ARN de UK, siendo el intervalo de dilución utilizado como curva estándar.

Intervalo de ARN de UK (Copia nb)	Cq Cebadores MUT-A MUT-sonda-A	Cq Cebadores MUT-B MUT-sonda-A	Cq Cebadores MUT-C MUT-sonda-A	Cq Cebadores MUT-D MUT-sonda-A
4,10 ⁵	26,49	25,98	26,98	26,36
4,10 ⁴	30,02	29,14	30,25	29,45
4,10 ³	33,27	32,50	33,55	33,06
4,10 ²	36,53	36,12	36,66	35,99
40	39,71	38,05	39,02	N/A

Tabla 17: Eficiencia de los conjuntos de cebadores para detectar simultáneamente las variantes de UK, SA y BR.

Conjunto de cebadores (con sonda MUT-sondaA)	Eficiencia (%)
MUT-A	100,5
MUT-B	105,6
MUT-C	110,0
MUT-D	104,2

Entre las combinaciones analizadas, sólo los 4 conjuntos siguientes tienen una eficiencia de amplificación de al menos el 100 %:

- MUT-As, MUT-Ar, MUT-sondaA
- MUT-Bs, MUT-Br, MUT-sondaA
- MUT-Cs, MUT-Cr, MUT-sondaA
- MUT-Ds, MUT-Dr, MUT-sondaA

Dado que estos 4 conjuntos de cebadores y sondas no detectan el virus ni los controles del SARS-CoV-2 ancestral, permiten la detección específica de las variantes de UK, SA y BR.

3. Detección de la variante de UK del SARS-CoV-2

Más de 433.000 secuencias genómicas del SARS-CoV-2 de la base de datos GISAID recuperadas el 6 de febrero de 2021 se alinearon para identificar una característica de secuencia específica de la variante del Reino Unido (UK) o de la variante de Kent (también conocida como B.1.1.7).

El alineamiento de secuencias múltiples comprendió 111.416 secuencias genómicas de la variante de UK, 2423 de las secuencias genómicas de la variante de SA y 429 secuencias genómicas de la variante de BR.

Las mutaciones de 3 nucleótidos consecutivos (GAT en CTA) que abarcan los nt 28280-28282 (posiciones según el aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512) correspondientes al tercer codón del gen de la nucleocápside (N), y que dan lugar a una mutación del tercer aminoácido (ASP en LEU) en la proteína N, están presentes sólo en la variante de UK.

Este protocolo describe procedimientos para la detección de esta mutación de codones.

Basándose en las secuencias genómicas de las variantes del SARS-CoV-2 disponibles en la base de datos GISAID del Centro Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Instituto Pasteur, París (Tabla 18) y la secuencia genómica del aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1 (NC_045512), se diseñaron cebadores y sondas para dirigirse a la mutación del codón en el gen N que abarca los nt 28280-28282 (posiciones según el aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512).

Tabla 18: Números de acceso a GISAID de los genomas de UK, Genomas de SA y BR utilizados como referencias para el diseño de sondas y cebadores y número de genomas variantes utilizados en el alineamiento de secuencias múltiples para identificar una característica de secuencia específica de la variante de UK.

Variante	Número de acceso epi a GISAID	Nb de secuencias alineadas
UK	B.1.1.7-EPI_ISL_1001329	111416
SA	B.1.351-EPI_ISL_1001390	2423
BR	P.1 - EPI_ISL_1001385	429

A. Kits

Kit avanzado de síntesis de ADNc iScript™ para RT-qPCR (Bio-Rad) para la etapa de transcripción inversa.

iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) o EurobioGreen qPCR Mix (Eurobio) para la etapa de amplificación y cuantificación del ADN.

B. Cebadores y sondas

Los cebadores se diseñaron para permitir la amplificación de todos los virus SARS-CoV-2, mientras que las sondas se diseñaron para detectar específicamente la mutación del codón en el gen N que abarca los nt 28280-28282 (posiciones según el aislado de SARS-CoV Wuhan-Hu-1, NC_045512).

Se verificaron los cebadores y la especificidad de la sonda para todas las variantes o la variante de UK, respectivamente *in silico* mediante análisis BLAST de las secuencias genómicas recuperadas de la base de datos GISAID.

Tabla 19: Secuencias de cebadores y sondas

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Orientación	Posición NC_045512	Posición NC_045512	SEQ ID NO
UK-As	AGTGC GTTGTTC GTTCTATGA	DIR	28190	28210	31
UK-Bs	AGTATCATGACGTTTCGTGTTGT	DIR	28222	28243	32
UK-Cs	CGTTGTTTC GTTCTATGAAGACTTT	DIR	28194	28217	33
UK-Ds	TCATGACGTTTCGTGTTGTTTT	DIR	28226	28246	34
UK-D2s	TGCGTTGTTTC GTTCTATGAAG	DIR	28192	28212	35
UK-Es	TTCTCCATTCTGGT TACTGC	INV	28347	28366	36
UK-Fs	TGACGTTTCGTGTTGTTTTAG	INV	28229	28248	37
UK-Ar	AGGGTCCACCAAACGTAATG	INV	28315	28334	38
UK-Br	GCGTTCTCCATTCTGGT TACT	INV	28349	28369	39
UK-Cr	GAATCTGAGGGTCCACCAA	INV	28322	28341	40
UK-Dr	CTGCGTTCTCCATTCTGGTT	INV	28352	28371	41
UK-Er	GTAGTGCGTTGTTCTGTTCTA	INV	28188	28207	42
UK-Fr	CTGGT TACTGCCAGTTGAAT	INV	28338	28357	43
UK-sondaA	TGTCTCTAAATGGACCCCAAATCAGC	DIR	28275	28301	44
UK-sondaB	GCTGATTTTGGGGTCCATT TAGAG	INV	28278	28301	45
UK-sondaC	CTCTAAATGGACCCCAAATCAGC	DIR	28278	28301	46

C. Extracción de ácido nucleico

5 El ARN se extrae de los especímenes utilizando NucleoSpin Dx Virus (Macherey Nagel ref. 740895.50). El ARN extraído de 100 µl de una muestra original, se eluye en 100 µl de tampón de elución.

Tabla 20: Cepas variantes del SARS-CoV-2 utilizadas para analizar cebadores y sondas

Origen	Variante	Clados	Linajes Pango	
Francia	CIBU-200132			CIBU, Instituto Pasteur, París
Francia	D614G	G		NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
UK	20I/501Y.V1	GR	B.1.1.7	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
SA	20H/501Y.V2	GH	B.1.351	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París
BR	20J/501Y P1	GR	P.1	NRC para virus respiratorios, Instituto Pasteur, París

D. Preparación de la mezcla

10

Todos los cebadores y sondas que se describen a continuación se validaron en las siguientes condiciones.

15

Se transcribió de forma inversa un volumen variable de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc Avanzado iScript para RT-qPCR (Bio-Rad) con 4 µl de 5x Mezcla de Reacción Avanzada de iScript y 1 µl de Transcriptasa Inversa Avanzada iScript en un volumen final de 20 µl durante 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C en un termociclador T100 (Bio-Rad)

Es posible que sean necesarios ajustes para el uso de otros kits u otros instrumentos de PCR en tiempo real.

20

Todos los Ensayos utilizaron las mismas condiciones. Las secuencias de cebadores y sondas, así como las

concentraciones optimizadas se muestran en la siguiente tabla. Se preparó una reacción de 20 µl que contenía 2 µl de ARN, 400 nM de cebadores y opcionalmente 200 nM de sonda.

Tabla 21: Mezcla simplex

Mezcla simplex con colorante SYBRGreen®	Volumen (µl)	[final]
H ₂ O PPI	6,4	
Mezcla SYBR green 2X	10	1X
Cebador directo (10 µM)	0,8	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	0,8	0,4 µM
Volumen final	20,00	

5

Tabla 22: Mezcla multiplex

Mezcla simplex con una sonda	Volumen (µl)	[final]
H ₂ O PPI	6	
Mezcla SYBR green 2X	10	1X
Cebador directo (10 µM)	0,8	0,4 µM
Cebador inverso (10 µM)	0,8	0,4 µM
Sonda (10 µM)	0,4	0,2 µM
Volumen final	20,00	

E. Controles

- 10 Todos los cebadores y sondas se analizaron mediante RT-qPCR con un extracto de ARN de la línea celular humana HEK-293T (riñón embrionario humano) o sin plantilla de ARN (H₂O).

F. Ciclos de amplificación

15

Tabla 23: Ciclos de amplificación

Desnaturalización	95 °C	2 min	x1	
Amplificación	95 °C	5 s	X40	Adquisición
	60 °C	30 s		
Enfriamiento	40 °C	30 s	x1	

G. Especificidad analítica de los pares de cebadores

- 20 Dado que las sondas diseñadas se dirigen a la mutación de 3 nucleótidos, fue posible seleccionar los mejores pares de cebadores sobre el ARN ancestral del SARS-CoV-2 (extraído de la muestra clínica de las cepas CIBU-200132) con un colorante intercalante de ADN antes de analizar combinaciones de los mejores pares de cebadores con una sonda (Figura 3).

Se analizaron 16 combinaciones de pares de cebadores, incluidos los siguientes pares:

25

- UK-As, UK-Ar,
- UK-Bs, UK-Br,
- UK-Cs, UK-Cr,
- UK-Ds, UK-Cr,
- 30 • UK-D2s, UK-Cr,
- UK-D2s, UK-Dr, UK-Es, UK-Er,
- UK-Fs, UK-Fr,
- UK-As, UK-Br,
- UK-As, UK-Cr,
- 35 • UK-Bs, UK-Ar,
- UK-Bs, UK-Cr,
- UK-Ds, UK-Ar,

La especificidad de los pares de cebadores se evaluó mediante diluciones seriadas de 10 veces del SARS-CoV-2 genómico y analizando la curva de fusión.

40

H. Eficiencias de amplificación

Basándose en los mejores pares de cebadores, se analizaron 16 combinaciones de cebadores y sondas, incluidas las siguientes combinaciones:

45

- MUT-As, MUT-Ar, MUT-sondaA
- MUT-Bs, MUT-Br, MUT-sondaA
- MUT-Bs, MUT-Br, MUT-sondaB
- MUT-Cs, MUT-Cr, MUT-sondaA
- 5 • MUT-Ds, MUT-Dr, MUT-sondaA
- MUT-Ds, MUT-Dr, MUT-sondaB
- UK-As, UK-Br, UK-sondaB
- UK-As, UK-Cr, UK-sondaB
- UK-Bs, UK-Ar, UK-sondaB
- 10 • UK-Bs, UK-Cr, UK-sondaB
- UK-Ds, UK-Ar, UK-sondaB

Todas las combinaciones se analizaron en un extracto de ARN de la variante de UK, SA o BR, SARS-CoV-2 ancestral y controles (HEK-293T y H₂O) (Figura 2 y 4).

Se obtuvieron los siguientes valores del ciclo de cuantificación (Cq):

Tabla 24: Valores de Cq obtenidos con cada combinación de cebadores y sondas para muestras de ARN de la variante de UK frente al SARS-CoV-2 ancestral.

Origen	Copias	Cq UKAs-Br UK-sonda B	Cq UKAs-Cr UK-sonda B	Cq UKBs-Ar UK-sonda B	Cq UKBs-Cr UK-sonda B	Cq UKDs-Ar UK-sonda B
Francia (ancestral)	3,10 ⁵	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UK	3,10 ⁵	29,28	29,15	29,14	28,90	28,97

No se detectó amplificación en los controles ni con muestras de ARN de las variantes SA o BR.

La eficiencia de amplificación (E) se determinó representando gráficamente los valores medios de Cq frente a cinco números de copias diferentes (diluciones de 10 veces).

Tabla 25: Valores de Cq obtenidos con cada combinación de cebadores y sondas para un número de copias determinado del ARN de UK, siendo el intervalo de dilución utilizado como curva estándar. (nd: no detectado)

Intervalo de ARN de UK (Copia nb)	Cq UK As-Br UK-sonda B	Cq UK As-Cr UK-sonda B	Cq UK Bs-Ar UK-sonda B	Cq UK Bs-Cr UK-sonda B	Cq UK Ds-Ar UK-sonda B
4,10 ⁵	27,41	27,38	27,74	27,63	27,88
4,10 ⁴	30,46	30,41	31,44	30,83	31,03
4,10 ³	33,67	34,11	35,11	33,56	34,31
4,10 ²	37,37	37,03	37,48	36,98	37,12
40	nd	39,62	nd	nd	39,67

Tabla 26: Eficiencia de los cebadores para detectar específicamente la variante de UK.

Conjuntos de cebadores (con sonda UK-sondaB)	Eficacia (%)
UK As+Br	100,5
UK As+Cr	107,2
UK Bs+Ar	103,2
UK Bs+Cr	108,6
UK Ds+Cr	104,2

Entre las 16 combinaciones de cebadores y sondas analizadas, sólo los 5 conjuntos siguientes tienen una eficacia de al menos el 100 %:

- UK-As, UK-Br, UK-sondaB
- UK-As, UK-Cr, UK-sondaB
- UK-Bs, UK-Ar, UK-sondaB
- UK-Bs, UK-Cr, UK-sondaB
- UK-Ds, UK-Ar, UK-sondaB

Dado que estos 5 conjuntos de cebadores y sondas no detectan el virus SARS-CoV-2 ancestral, las variantes de SA o BR o los controles, permiten la detección específica de la variante de UK.

- 5 **Tablas 27 a 32:** Conservación de cada nucleótido de las regiones hibridadas por los conjuntos de cebadores y sondas nCoV_IP2 y nCoV_IP4 y regiones adyacentes (*código de letras según los códigos estándar IUB/IUPAC para ácidos nucleicos.

Contexto de nCoV IP2-12669Fw																
sito	T	G	C	A	-	N	K	Y	W	R	S	M	H	B		
	0	449004	1	11	2	1293	1089	1	4	0	0	0	0	0	0	0
1	1	449003	0		1	1294	1098	8	0	0	0	0	0	0	0	0
2	80	1	448928		0	1294	1087	0	14	0	0	1	0	0	0	0
3	449014	0	3		1	1293	1092	0	2	0	0	0	0	0	0	0
4	5	448948	0	60		1293	1091	3	0	0	4	0	0	0	1	0
5	449018	0	2		1	1293	1089	0	1	1	0	0	0	0	0	0
6	92	0	448915		3	1293	1088	0	9	0	0	0	4	1	0	0
7	1	1	0	449018		1293	1091	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	0	1	1	449020		1293	1086	0	0	0	4	0	0	0	0	0
9	0	6	1	449016		1294	1086	0	0	1	1	0	0	0	0	0
10	448994	1	23		0	1293	1094	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	449018	1	0		2	1294	1087	0	3	0	0	0	0	0	0	0
12	1	5	0	449015		1294	1087	0	0	2	1	0	0	0	0	0
13	3	2	449013		0	1294	1087	0	3	0	0	0	3	0	0	0
14	0	1	1	449020		1293	1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	32	448740	3	6		1293	1113	214	0	0	2	0	0	0	0	0
16	1	1	0	449020		1294	1089	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	3	1	449020		1293	1084	0	0	1	2	0	0	0	0	0
18	449014	0	6		3	1293	1085	0	4	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	0	449021		1293	1089	0	0	1	0	0	0	0	0	0
A	20	0	0	0	449021	1293	1091	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	21	449019	0	2	2	1293	1088	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G	22	0	449027	0	1	1294	1074	6	0	0	0	3	0	0	0	0
A	23	0	2	1	449034	1294	1073	0	0	1	0	0	0	0	0	0
G	24	1	448994	0	45	1293	1070	0	0	0	1	1	0	0	0	0
C	25	5	0	448999	2	1293	1096	0	7	0	0	0	3	0	0	0
T	26	449028	0	1	2	1293	1080	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T	27	449024	1	5	1	1293	1080	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A	28	2	11	1	448977	1294	1087	0	0	2	31	0	0	0	0	0
G	29	2	449024	0	5	1294	1076	2	0	0	2	0	0	0	0	0
T	30	449029	1	3	1	1293	1076	0	1	1	0	0	0	0	0	0
C	31	4	0	449025	1	1293	1078	0	3	0	0	0	1	0	0	0
C	32	2	1	449041	1	1293	1064	0	0	0	0	0	3	0	0	0
T	33	449013	8	10	1	1293	1078	0	2	0	0	0	0	0	0	0
G	34	4	449016	1	11	1293	1076	3	0	0	1	0	0	0	0	0
T	35	449020	2	8	1	1293	1076	1	3	1	0	0	0	0	0	0
T	36	449015	1	4	9	1293	1075	1	4	3	0	0	0	0	0	0
G	37	2	449022	0	4	1294	1080	1	0	0	1	1	0	0	0	0
38	125	1	448897		2	1293	1082	0	5	0	0	0	0	0	0	0
39	2	6	7	449007		1293	1088	0	0	0	2	0	0	0	0	0
40	270	0	448752		6	1293	1075	0	7	0	0	1	1	0	0	0
41	449081	0	2		1	1293	1026	0	2	0	0	0	0	0	0	0
42	1	11	0	449083		1295	1015	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	1	2	449077		4	1299	1008	0	9	0	0	0	5	0	0	0
44	1	449067	0		6	1296	1010	2	0	0	2	1	0	0	0	0
45	0	13	2	449084		1296	1006	0	0	0	4	0	0	0	0	0
46	3	1	449139		0	1295	965	0	1	0	0	0	1	0	0	0
47	1	2	0	449127		1295	979	0	0	0	0	0	1	0	0	0
48	4	449151	1	22		1295	927	4	0	0	0	1	0	0	0	0
49	0	22	4	449148		1295	932	0	0	0	3	0	1	0	0	0
50	449177	5	3		1	1293	926	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	14	449162	0	20		1292	905	8	0	0	2	2	0	0	0	0
52	449198	1	9		1	1292	902	0	2	0	0	0	0	0	0	0
53	9	2	449189		1	1292	900	0	11	0	0	0	1	0	0	0
54	449205	4	4		1	1292	896	1	2	0	0	0	0	0	0	0
55	449212	1	0		2	1292	892	3	3	0	0	0	0	0	0	0
56	2	449218	0		0	1293	890	1	0	0	0	1	0	0	0	0
57	449216	0	2		0	1293	892	0	2	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 970 603 T3

Contexto de nCoV_IP2-12696bSonda												
Site	T	A	G	C	-	N	M	R	S	Y	W	K
0	449024	1	1	5	1293	1080	0	0	0	1	0	0
1	2	448977	11	1	1294	1087	0	31	0	0	2	0
2	2	5	449024	0	1294	1076	0	2	0	0	0	2
3	449029	1	1	3	1293	1076	0	0	0	1	1	0
4	4	1	0	449025	1293	1078	1	0	0	3	0	0
5	2	1	1	449041	1293	1064	3	0	0	0	0	0
6	449013	1	8	10	1293	1078	0	0	0	2	0	0
7	4	11	449016	1	1293	1076	0	1	0	0	0	3
8	449020	1	2	8	1293	1076	0	0	0	3	1	1
9	449015	9	1	4	1293	1075	0	0	0	4	3	1
10	2	4	449022	0	1294	1080	0	1	1	0	0	1
11	125	2	1	448897	1293	1082	0	0	0	5	0	0
12	2	449007	5	7	1293	1088	0	2	0	0	0	0
13	270	6	0	448752	1293	1075	1	0	1	7	0	0
14	449081	1	0	2	1293	1026	0	0	0	2	0	0
15	1	449083	11	0	1295	1015	0	0	0	0	0	0
16	1	4	2	449077	1299	1008	5	0	0	9	0	0
17	1	6	449087	0	1296	1010	0	2	1	0	0	2
18	0	449084	13	2	1296	1006	0	4	0	0	0	0
19	3	0	1	449139	1295	965	1	0	0	1	0	0
A	20	1	449127	2	0	1295	979	1	0	0	0	0
G	21	4	22	449151	1	1295	927	0	0	1	0	0
A	22	0	449148	22	4	1295	932	1	3	0	0	0
T	23	449177	1	5	3	1293	926	0	0	0	0	0
G	24	14	20	449162	0	1292	905	0	2	2	0	8
T	25	449198	1	1	9	1292	902	0	0	0	2	0
C	26	9	1	2	449189	1292	900	1	0	0	11	0
T	27	449205	1	4	4	1292	896	0	0	0	2	0
T	28	449212	2	1	0	1292	892	0	0	0	3	0
G	29	2	0	449218	0	1293	890	0	0	1	0	1
T	30	449216	0	0	2	1293	892	0	0	0	2	0
G	31	1	20	449195	1	1293	892	0	1	0	0	2
C	32	13	1	0	449203	1293	893	0	0	0	2	0
T	33	449185	4	2	17	1293	900	0	0	0	1	3
G	34	2	21	449183	1	1304	889	0	4	0	0	1
C	35	0	2	1	449206	1295	898	0	0	0	3	0
C	36	586	85	0	448932	1295	491	4	0	0	12	0
G	37	0	31	449575	2	1308	480	0	3	1	0	5
G	38	0	2	449622	1	1303	474	0	0	0	0	3
T	39	449613	1	1	13	1293	483	0	0	0	1	0
A	40	2	449549	70	0	1293	488	0	3	0	0	0
41	46	2	0	449565	1293	488	0	0	0	10	0	1
42	449597	14	0	15	1292	485	0	0	0	2	0	0
43	2	449628	0	1	1292	482	0	0	0	0	0	0
44	221	24	0	449359	1292	479	0	0	0	30	0	0
45	1	449587	40	1	1293	483	0	0	0	0	0	0
46	0	1	1	449619	1292	488	1	0	0	3	0	0
47	2	449612	0	0	1292	497	0	1	0	0	1	0
48	1	449613	5	1	1293	490	0	1	0	0	0	0
49	1	449613	2	2	1292	492	0	3	0	0	0	0
50	135	76	4	449395	1291	483	0	0	0	21	0	0
51	449562	11	0	55	1291	483	0	0	0	2	1	0
52	2	11	449616	0	1291	480	0	3	2	0	0	0
53	55	1	2	449564	1291	488	0	0	0	4	0	0
54	449577	18	13	1	1291	486	0	0	0	3	16	0
55	449624	0	0	2	1291	487	0	0	0	0	1	0
56	2	7	449612	3	1291	487	0	0	1	0	0	2
57	166	1	0	449447	1291	491	1	0	0	8	0	0
58	1	449538	85	1	1291	486	0	3	0	0	0	0
59	234	6	1	449365	1291	488	1	0	1	18	0	0
60	449591	1	0	22	1291	499	0	0	0	1	0	0

ES 2 970 603 T3

Contexto de nCoV_IP2-12759Rv													
síto	T	G	A	C	-	N	K	W	Y	R	D	S	M
0	449541	1	1	70	1294	494	0	1	3	0	0	0	0
1	3	449606	13	1	1296	482	4	0	0	0	0	0	0
2	0	7	449614	2	1292	490	0	0	0	0	0	0	0
3	233	0	3	449364	1292	492	0	0	19	0	0	0	2
4	1	0	449622	0	1291	490	0	0	0	1	0	0	0
5	0	7	449615	1	1291	491	0	0	0	0	0	0	0
6	449601	2	3	11	1291	491	1	4	1	0	0	0	0
7	2	449617	3	0	1291	490	2	0	0	0	0	0	0
8	2	1	2	449612	1291	493	0	0	4	0	0	0	0
9	286	449295	23	0	1291	493	14	0	0	2	0	1	0
10	449617	1	0	5	1291	487	1	0	3	0	0	0	0
11	449619	2	0	3	1291	489	0	0	1	0	0	0	0
12	1	11	449562	26	1291	510	0	0	0	4	0	0	0
13	5	449612	0	1	1291	490	5	0	0	0	0	1	0
14	41	1	1	449575	1291	491	0	0	5	0	0	0	0
15	449597	1	3	8	1291	505	0	0	0	0	0	0	0
16	449606	1	1	0	1291	504	0	0	2	0	0	0	0
17	1	2	449612	0	1291	499	0	0	0	0	0	0	0
18	182	1	5	449393	1292	502	0	0	8	0	0	0	22
19	449614	0	2	9	1293	487	0	0	0	0	0	0	0
20	2	1	448428	0	1294	1680	0	0	0	0	0	0	0
21	501	0	1	447872	1317	1692	0	0	21	0	0	1	0
22	2	2	448385	0	1318	1698	0	0	0	0	0	0	0
23	2	1	448394	0	1317	1688	0	1	0	2	0	0	0
24	207	0	1	448205	1293	1690	0	0	9	0	0	0	0
25	2	2	448406	1	1293	1700	0	0	0	1	0	0	0
26	115	1	2	448299	1295	1685	0	0	8	0	0	0	0
27	2	19	448386	2	1298	1694	0	2	0	0	0	0	2
28	1	10	448408	0	1301	1682	0	0	0	2	0	0	1
29	397	1	5	447966	1299	1690	0	0	47	0	0	0	0
30	7	32	448368	2	1296	1690	0	4	0	5	0	0	1
31	2	0	448415	0	1301	1682	0	1	0	4	0	0	0
32	2	54	448342	4	1315	1684	0	2	0	1	1	0	0
33	140	448203	47	1	1339	1662	10	0	0	1	0	2	0
34	2	448306	81	1	1321	1675	7	0	0	11	0	1	0
35	0	448219	42	1	1296	1722	124	0	0	1	0	0	0
36	3	14	448273	20	1295	1797	0	0	0	1	0	0	2
37	126	448090	46	0	1295	1827	17	0	0	4	0	0	0
38	33	448243	3	0	1295	1828	3	0	0	0	0	0	0
39	448263	2	0	1	1295	1840	0	0	4	0	0	0	0
40	0	1	448257	1	1294	1851	0	0	0	1	0	0	0
41	1	448242	16	0	1295	1845	3	0	0	2	0	1	0
42	1	448241	13	0	1295	1839	16	0	0	0	0	0	0
43	448144	4	4	2	1295	1938	14	1	1	0	2	0	0
44	448161	2	0	1	1295	1946	0	0	0	0	0	0	0
45	448136	1	1	18	1294	1948	0	1	6	0	0	0	0
46	2	448106	52	0	1294	1946	2	0	0	2	0	1	0
47	448174	1	1	0	1294	1934	0	0	1	0	0	0	0
48	4	3	448170	0	1293	1934	0	0	0	1	0	0	0
49	1197	2	4	446950	1293	1945	0	0	14	0	0	0	0
50	448153	1	1	1	1293	1954	0	0	2	0	0	0	0
51	448135	9	8	10	1293	1948	2	0	0	0	0	0	0
52	13	448150	1	0	1293	1945	3	0	0	0	0	0	0
53	4	1	3	448146	1293	1952	0	0	6	0	0	0	0
54	2	2	448153	0	1293	1952	0	0	0	3	0	0	0
55	258	1	4	447889	1293	1948	0	0	12	0	0	0	0
56	448157	1	2	1	1293	1947	1	0	3	0	0	0	0
57	35	448075	47	2	1293	1946	2	0	0	5	0	0	0

ES 2 970 603 T3

Contexto de nCoV_IP4-14059Fw												
síto	T	A	G	C	-	N	K	Y	R	S	W	M
0	449497	0	1	2	1245	659	0	1	0	0	0	0
1	2	449462	33	0	1246	657	0	0	5	0	0	0
2	0	3	449495	0	1254	648	3	0	2	0	0	0
3	0	449505	1	1	1245	649	0	0	0	0	0	4
4	449469	2	0	32	1245	653	0	2	0	0	2	0
5	0	449496	0	1	1245	661	0	0	2	0	0	0
6	1	449501	0	1	1245	657	0	0	0	0	0	0
7	449450	1	0	48	1245	656	0	5	0	0	0	0
8	2	1	0	449482	1247	662	0	6	0	0	0	5
9	0	449499	1	1	1252	650	0	0	1	0	1	0
10	0	449487	2	1	1246	668	0	0	1	0	0	0
11	2	3	449478	0	1245	670	2	0	3	2	0	0
12	0	449492	1	1	1245	666	0	0	0	0	0	0
13	449443	1	0	45	1245	667	1	3	0	0	0	0
14	13	10	0	449467	1245	660	0	5	0	0	0	5
15	449493	1	1	0	1245	662	0	3	0	0	0	0
16	38	3	0	449448	1245	653	0	10	0	0	0	8
17	2	449501	3	1	1245	650	0	0	1	0	2	0
18	2	449503	8	1	1245	645	0	0	1	0	0	0
19	449456	16	0	38	1245	648	1	1	0	0	0	0
G	20	2	1	449500	2	1245	651	3	0	0	1	0
G	21	3	1	449498	1	1244	651	6	0	0	1	0
T	22	449495	1	0	11	1244	654	0	0	0	0	0
A	23	41	449468	3	1	1244	647	0	0	1	0	0
A	24	0	449245	256	1	1244	645	0	0	14	0	0
C	25	19	0	2	449486	1244	649	0	3	0	0	2
T	26	449506	0	1	1	1244	652	0	1	0	0	0
G	27	0	0	449501	1	1246	652	3	0	0	2	0
G	28	0	2	449512	0	1244	644	2	0	0	1	0
T	29	449510	0	0	0	1244	649	0	2	0	0	0
A	30	0	449510	1	0	1244	650	0	0	0	0	0
T	31	449496	0	0	13	1244	649	1	1	0	0	1
G	32	1	1	449507	0	1244	650	1	0	0	1	0
A	33	1	449508	0	2	1244	645	0	0	2	0	3
T	34	449497	0	0	11	1244	649	1	3	0	0	0
T	35	449512	1	0	1	1244	646	0	1	0	0	0
T	36	449507	1	1	0	1244	652	0	0	0	0	0
C	37	99	1	0	449398	1244	648	0	12	0	0	3
G	38	3	0	449501	1	1245	649	4	0	0	2	0
	39	0	1	449502	1	1244	646	6	1	0	4	0
	40	449281	2	0	227	1244	648	0	3	0	0	0
	41	1	0	449511	1	1244	644	3	0	0	1	0
	42	1	449523	0	0	1244	636	0	0	0	0	1
	43	449468	1	0	45	1244	642	0	5	0	0	0
	44	449486	1	0	22	1244	647	0	3	0	0	2
	45	449507	0	1	2	1244	648	0	2	0	0	1
	46	20	4	0	449486	1244	646	0	2	0	1	0
	47	25	449406	85	1	1244	640	0	0	1	0	2
	48	449511	1	1	0	1243	647	0	1	0	0	1
	49	1	449483	27	1	1244	648	0	0	1	0	0
	50	0	5	3	449491	1244	655	0	3	0	1	0
	51	2	449469	23	0	1246	662	0	0	2	0	1
	52	1	449501	4	0	1244	654	0	0	1	0	0
	53	0	449478	13	2	1244	661	0	0	5	0	1
	54	20	2	0	449484	1244	650	0	5	0	0	0
	55	24	3	0	449479	1244	649	0	3	0	0	3
	56	2	449466	40	0	1247	649	0	0	1	0	0
	57	261	3	4	449237	1245	649	0	5	0	0	1
	58	308	84	449089	3	1244	658	9	0	10	0	0

ES 2 970 603 T3

nCoV_IP4-14084Sonda													
	sitio	C	T	G	A	-	N	K	Y	R	S	W	M
	0	449486	19	2	0	1244	649	0	3	0	0	0	2
	1	1	449506	1	0	1244	652	0	1	0	0	0	0
	2	1	0	449501	0	1246	652	3	0	0	2	0	0
	3	0	0	449512	2	1244	644	2	0	0	1	0	0
	4	0	449510	0	0	1244	649	0	2	0	0	0	0
	5	0	0	1	449510	1244	650	0	0	0	0	0	0
	6	13	449496	0	0	1244	649	1	1	0	0	1	0
	7	0	1	449507	1	1244	650	1	0	0	1	0	0
	8	2	1	0	449508	1244	645	0	0	2	0	3	0
	9	11	449497	0	0	1244	649	1	3	0	0	0	0
	10	1	449512	0	1	1244	646	0	1	0	0	0	0
	11	0	449507	1	1	1244	652	0	0	0	0	0	0
	12	449398	99	0	1	1244	648	0	12	0	0	0	3
	13	1	3	449501	0	1245	649	4	0	0	2	0	0
	14	1	0	449502	1	1244	646	6	1	0	4	0	0
	15	227	449281	0	2	1244	648	0	3	0	0	0	0
	16	1	1	449511	0	1244	644	3	0	0	1	0	0
	17	0	1	0	449523	1244	636	0	0	0	0	1	0
	18	45	449468	0	1	1244	642	0	5	0	0	0	0
	19	22	449486	0	1	1244	647	0	3	0	0	2	0
T	20	2	449507	1	0	1244	648	0	2	0	0	1	0
C	21	449486	20	0	4	1244	646	0	2	0	1	0	2
A	22	1	25	85	449406	1244	640	0	0	1	0	1	2
T	23	0	449511	1	1	1243	647	0	1	0	0	1	0
A	24	1	1	27	449483	1244	648	0	0	1	0	0	0
C	25	449491	0	3	5	1244	655	0	3	0	1	0	3
A	26	0	2	23	449469	1246	662	0	0	2	0	1	0
A	27	0	1	4	449501	1244	654	0	0	1	0	0	0
A	28	2	0	13	449478	1244	661	0	0	5	0	1	1
C	29	449484	20	0	2	1244	650	0	5	0	0	0	0
C	30	449479	24	0	3	1244	649	0	3	0	0	0	3
A	31	0	2	40	449466	1247	649	0	0	1	0	0	0
C	32	449237	261	4	3	1245	649	0	5	0	0	0	1
G	33	3	308	449089	84	1244	658	9	0	10	0	0	0
C	34	449348	133	6	1	1244	662	0	10	0	1	0	0
C	35	447482	1963	0	9	1244	664	0	42	0	0	0	1
A	36	2	1	13	449487	1244	656	0	0	1	0	0	1
G	37	2	114	449373	7	1248	650	7	0	4	0	0	0
G	38	1	1	449495	8	1245	643	9	0	3	0	0	0
	39	1	449513	0	0	1244	644	1	2	0	0	0	0
	40	0	5	116	449388	1244	649	0	0	3	0	0	0
	41	1	3	449473	33	1244	639	7	0	4	1	0	0
	42	9	449521	0	0	1244	631	0	0	0	0	0	0
	43	1	1	449525	1	1246	628	2	0	1	0	0	0
	44	0	2	449520	1	1245	622	11	0	1	3	0	0
	45	7	64	12	449459	1245	615	0	0	1	0	1	1
	46	0	12	449451	62	1245	617	1	0	17	0	0	0
	47	0	449522	0	0	1245	637	0	1	0	0	0	0
	48	57	449460	0	0	1245	638	1	4	0	0	0	0
	49	449496	21	0	1	1244	638	0	1	0	0	0	4
	50	449524	1	0	1	1244	632	0	1	0	0	0	2
	51	9	449517	0	1	1244	634	0	0	0	0	0	0
	52	1	2	449501	25	1244	629	2	0	1	0	0	0
	53	2	449519	3	0	1244	636	0	1	0	0	0	0
	54	3	449523	0	2	1244	630	0	2	0	0	1	0
	55	10	12	449499	1	1244	637	2	0	0	0	0	0
	56	3	449518	0	1	1244	637	0	2	0	0	0	0
	57	2	3	12	449501	1245	639	0	0	2	0	0	1
	58	0	4	449510	2	1245	638	6	0	0	0	0	0

Contexto de nCoV_IP4-14146Rv													
stio	C	T	A	G	-	N	Y	M	W	S	R	K	
0	449507	1	0	0	1244	648	2	3	0	0	0	0	
1	5	449498	0	0	1244	657	1	0	0	0	0	0	
2	1	449506	0	0	1244	654	0	0	0	0	0	0	
3	0	3	449500	0	1245	654	0	3	0	0	0	0	
4	6	449495	2	0	1244	655	2	0	0	0	0	1	
5	4	449490	0	1	1244	663	3	0	0	0	0	0	
6	0	1	449497	1	1245	658	0	0	2	0	1	0	
7	14	449487	0	0	1245	656	2	0	0	0	0	1	
8	0	449500	1	4	1245	655	0	0	0	0	0	0	
9	449489	0	0	1	1245	661	6	3	0	0	0	0	
10	1	1	449482	6	1245	667	0	0	1	0	2	0	
11	1	449485	1	4	1245	668	1	0	0	0	0	0	
12	1	449486	0	0	1245	671	1	0	0	0	0	1	
13	0	5	5	449487	1245	657	0	0	0	1	1	4	
14	13	449477	0	0	1245	664	5	0	0	0	0	1	
15	0	449491	1	0	1245	666	0	0	2	0	0	0	
16	0	0	449483	5	1245	669	0	1	0	0	2	0	
17	3	1	449486	1	1245	669	0	0	0	0	0	0	
18	0	449483	2	0	1245	675	0	0	0	0	0	0	
19	3	1	0	449466	1245	686	0	0	0	1	1	2	
C	20	449460	5	1	0	1245	685	7	2	0	0	0	
C	21	449466	2	2	0	1245	685	3	2	0	0	0	
T	22	2	449452	5	1	1245	695	1	0	3	0	0	
A	23	1	2	449465	24	1245	667	0	0	0	1	0	
T	24	119	449370	2	0	1245	667	2	0	0	0	0	
A	25	1	2	449488	3	1245	665	0	0	0	1	0	
T	26	13	449477	1	2	1245	667	0	0	0	0	0	
T	27	1	449481	0	1	1245	675	2	0	0	0	0	
A	28	1	0	449481	2	1245	675	0	0	0	1	0	
A	29	2	1	449476	5	1245	673	0	0	2	0	1	
C	30	449366	101	4	0	1245	679	10	0	0	0	0	
C	31	448861	458	107	1	1245	692	27	14	0	0	0	
T	32	5	449447	3	2	1244	702	2	0	0	0	0	
T	33	4	449459	0	0	1245	693	2	0	1	0	1	
G	34	39	14	152	449256	1246	691	0	0	0	2	1	
A	35	0	2	449466	3	1245	687	0	0	1	0	1	
C	36	449247	183	1	0	1245	695	33	1	0	0	0	
C	37	448887	514	15	1	1245	694	45	4	0	0	0	
A	38	2	20	449420	17	1245	696	0	0	1	0	4	
G	39	1	17	28	449412	1245	694	0	0	0	1	1	
	40	2	29	371	448990	1245	696	0	0	0	0	67	
	41	1	1	8	449443	1245	691	0	0	0	6	2	
	42	449378	67	1	0	1245	698	13	3	0	0	0	
	43	25	449421	0	2	1245	707	3	0	1	0	0	
	44	532	448907	1	1	1244	718	2	0	0	0	0	
	45	1	449454	0	0	1244	705	1	0	0	0	0	
	46	0	2	449451	7	1245	696	0	0	2	0	2	
	47	1	1	449449	2	1245	702	0	2	0	0	3	
	48	449360	22	45	1	1245	717	13	2	0	0	0	
	49	22	449398	5	1	1245	730	3	0	1	0	0	
	50	1	5	5	449321	1245	740	0	0	0	2	2	
	51	449402	12	0	2	1245	742	1	1	0	0	0	
	52	0	11	449348	49	1246	732	0	1	1	0	17	
	53	1	2	0	449417	1245	733	0	0	0	2	1	
	54	0	3	449403	0	1245	753	0	0	1	0	0	
	55	1	4412	11	444956	1245	742	0	0	0	2	0	
	56	1	449416	2	0	1245	738	3	0	0	0	0	
	57	449412	3	2	1	1245	737	1	4	0	0	0	
	58	1	2	449408	8	1245	741	0	0	0	0	0	
	59	449344	63	0	1	1245	740	10	2	0	0	0	

REIVINDICACIONES

1. Un método multiplex para la detección específica de la presencia o ausencia de un ARN del SARS-CoV-2 en una muestra, que comprende:

someter una muestra a dos reacciones de amplificación simultáneas:

(A) una primera reacción de transcripción inversa con un primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una primera copia de ADNc del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra; amplificar cualquier primer ADNc resultante con el primer cebador inverso y un primer cebador directo específico del SARS-CoV-2; y detectar cualquier primer producto amplificado con una primera sonda específica del SARS-CoV-2; en donde el primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-ACAACACAACAAAGGGAG-3' (SEQ ID NO: 11) y su equivalente de ARN; el primer cebador directo específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CAACAGGACTAAGCTCAT-3' (SEQ ID NO: 10) y la primera sonda específica del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-TACCGGCAGCCACAAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 12) o su complemento; y

(B) una segunda reacción de transcripción inversa con un segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 para generar una segunda copia de ADNc del ARN del SARS-CoV-2 en la muestra; amplificar cualquier segundo ADNc resultante con el segundo cebador inverso y un segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2; y detectar cualquier segundo producto amplificado con una segunda sonda específica del SARS-CoV-2; en donde el segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CCTATATTAACCTTGACCAG-3' (SEQ ID NO: 14) y su equivalente de ARN, el segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CGAAATCATACCAGTTACC-3' (SEQ ID NO: 13), y la segunda sonda específica del SARS-CoV-2 se hibrida con la secuencia: 5'-CCTGGCGTGGTTTGTATGA-3' (SEQ ID NO: 15) o su complemento; y

en donde dicho SARS-CoV-2 se elige entre variantes del aislado del SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 que portan mutaciones en la proteína Espícula que se prevé que aumentan la afinidad de unión de las partículas víricas hacia el receptor ACE2 humano y/o reducen la sensibilidad de las partículas víricas a los anticuerpos neutralizantes.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas variantes portan una o más mutaciones predichas en la proteína Espícula seleccionada del grupo que consiste en: E484K, K417N, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H, del69/70 y del144/145.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,

en donde el primer cebador inverso específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-CTCCCTTTGTTGTGTTGT-3' (SEQ ID NO: 2), y no tiene más de 21 bases de longitud; y en donde el primer cebador directo específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-ATGAGCTTAGTCCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 1), y no tiene más de 21 bases de longitud; y en donde la primera sonda específica del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-AGATGTCTTGCTGCTGCCGTA-3' (SEQ ID NO: 3), o su complemento, y no tiene más de 24 bases de longitud.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

en donde el segundo cebador inverso específico del SARS-CoV-2 comprende la secuencia 5'-CTGGTCAAGGTTAATATAGG-3' (SEQ ID NO: 5), y no tiene más de 23 bases de longitud; y en donde el segundo cebador directo específico del SARS-CoV-2 consiste en o comprende la secuencia 5'-GGTAACTGGTATGATTTTCG-3' (SEQ ID NO: 4), y no tiene más de 22 bases de longitud; y en donde la segunda sonda específica de SARS-CoV-2 consiste en o comprende la secuencia 5'-TCATACAAACCACGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 6), o su complemento, y no tiene más de 22 bases de longitud.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método es un método de RT-PCR, preferentemente una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (QRT-PCR).

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sonda está marcada con 6-carboxi-fluoresceína (6FAM) o hexacloro-6-carboxi-fluoresceína (HEX) en el extremo 5'; y/o black hole quencher 1 (BHQ1) en el extremo 3'.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra es una muestra ambiental o una muestra biológica, preferentemente una muestra de fluido corporal, más preferentemente secreciones bucales o del tracto respiratorio.

A

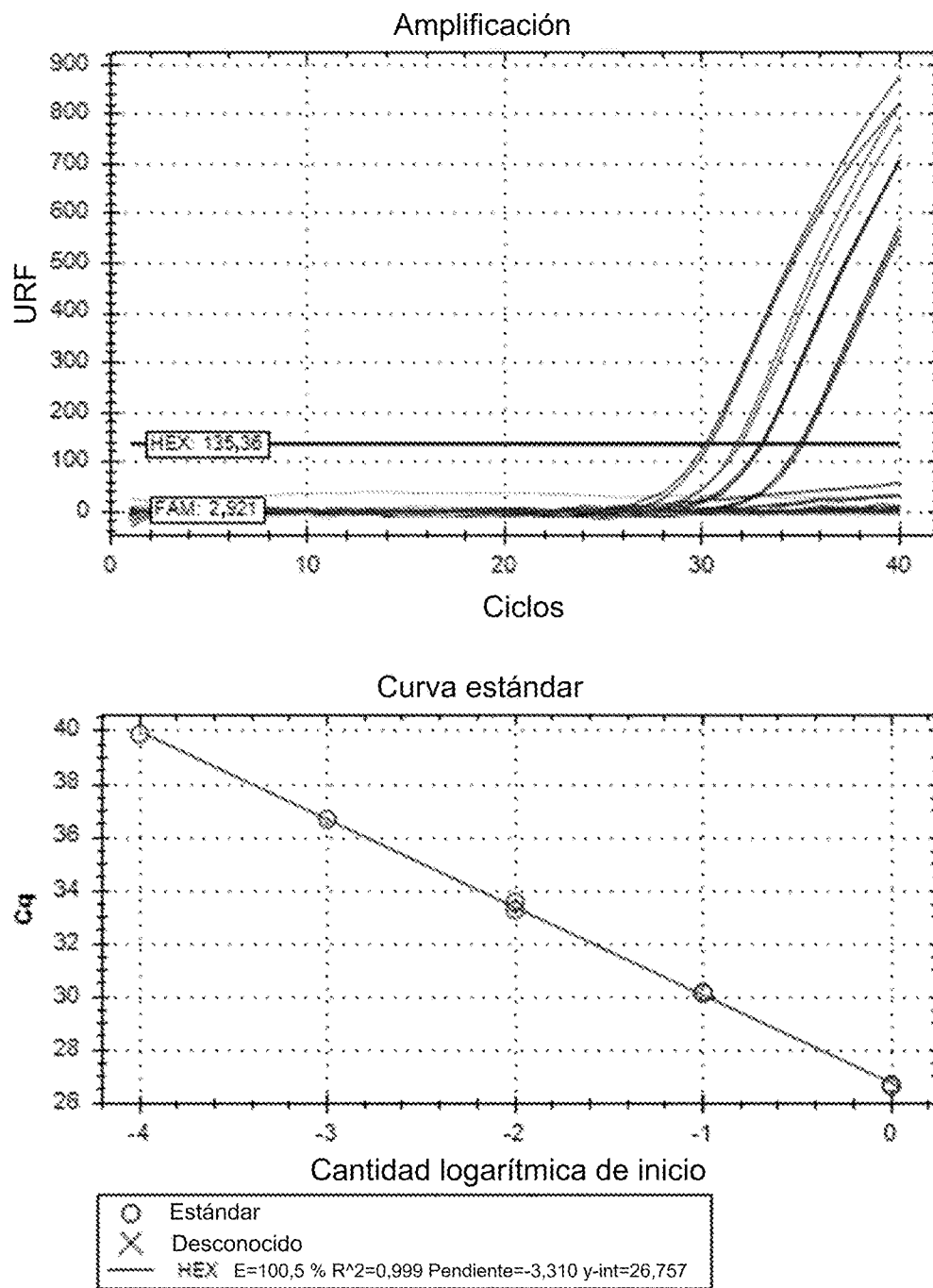


Figura 1

B

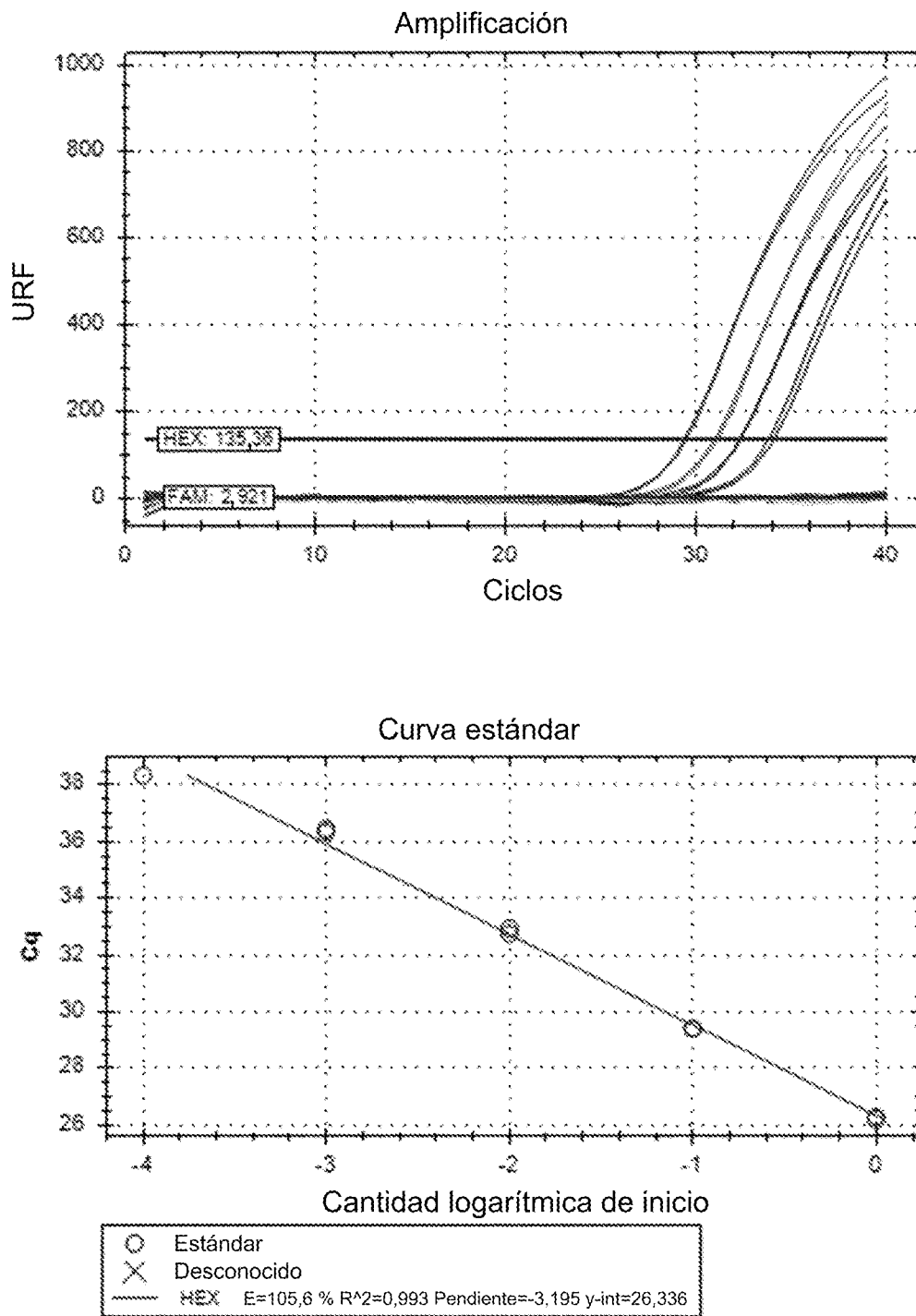


Figura 1 (continuación)

C

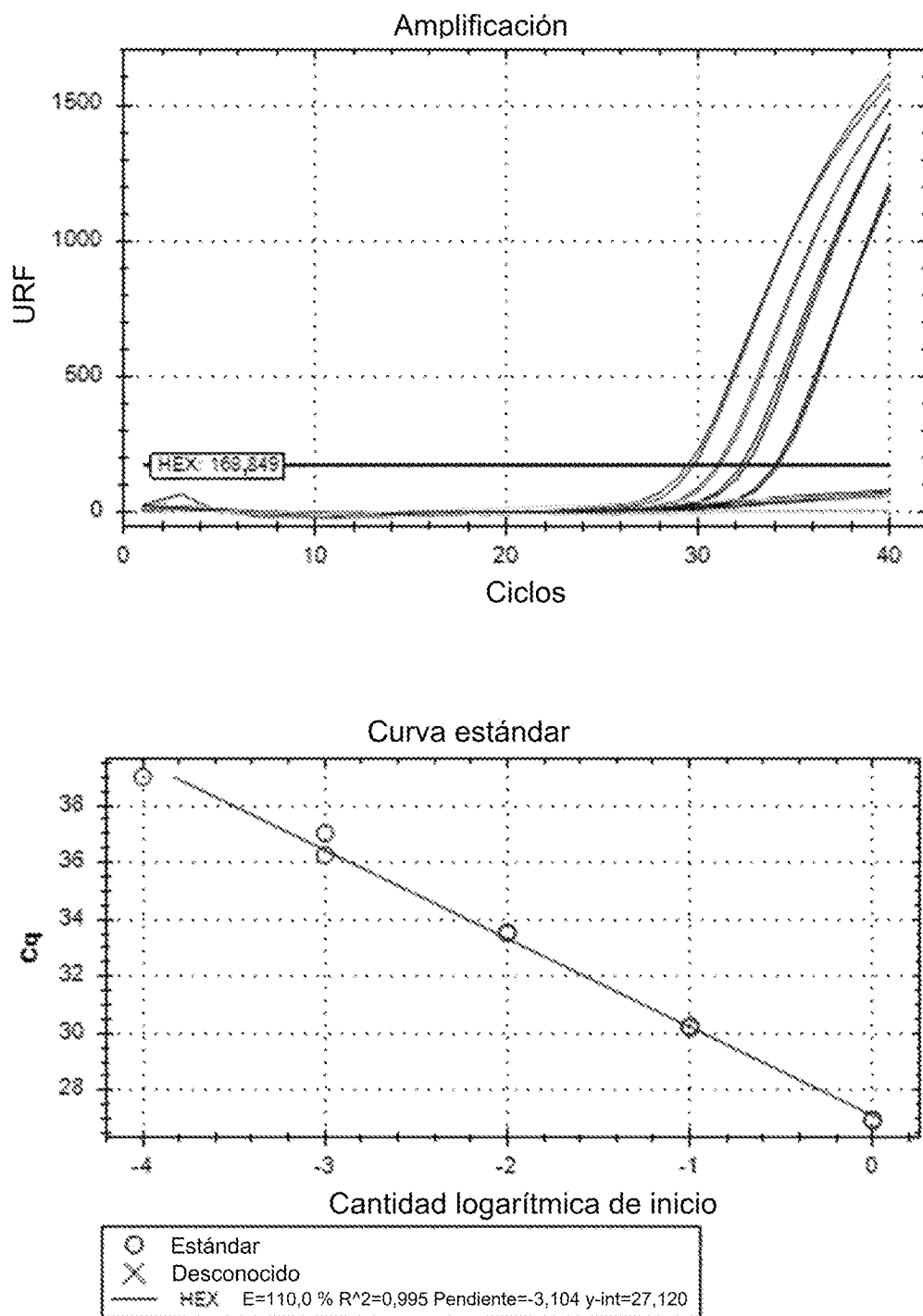


Figura 1 (continuación)

D

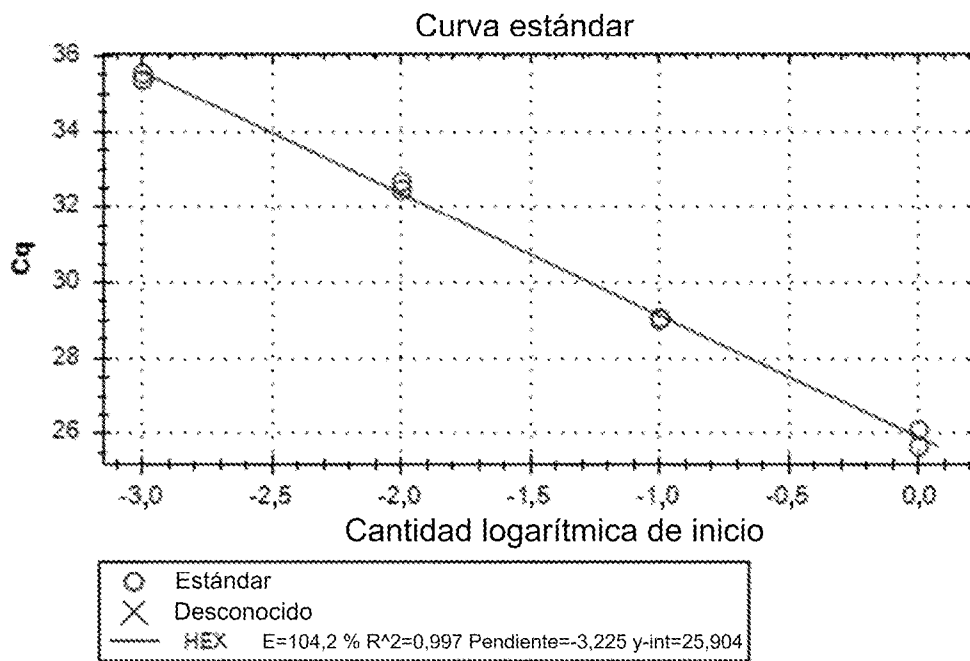
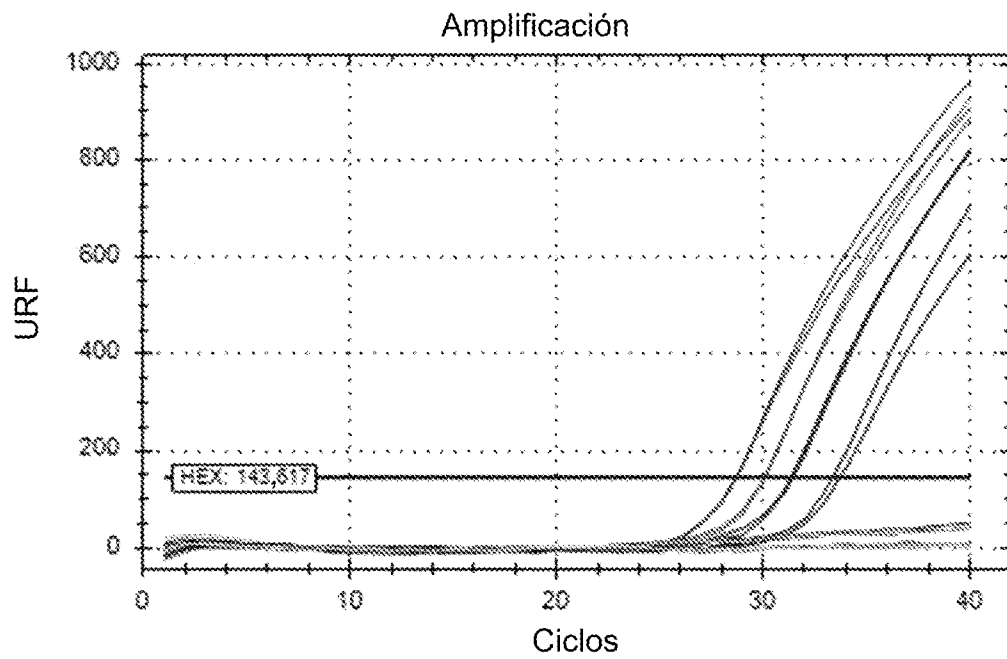


Figura 1 (continuación)

A

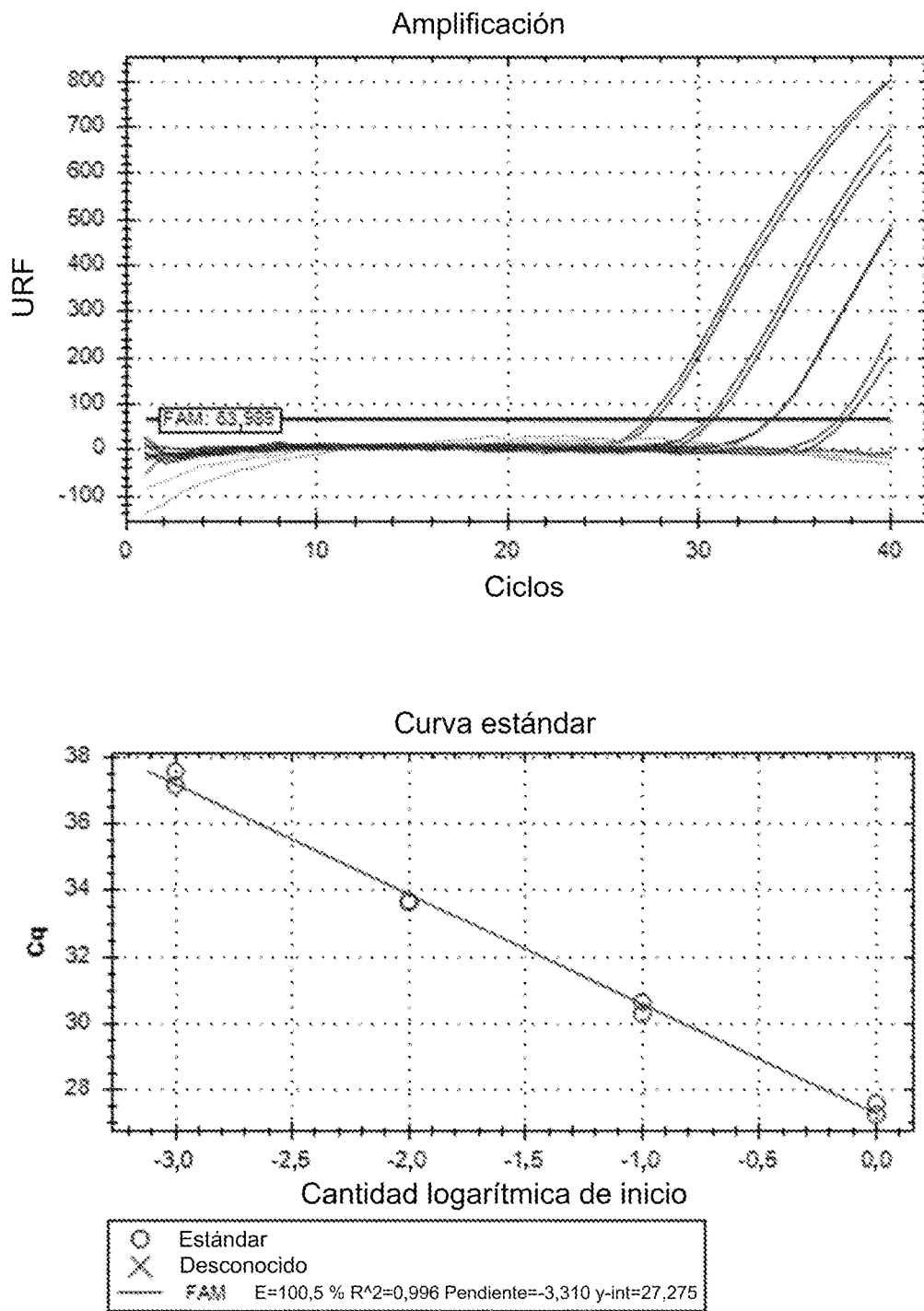


Figura 2

B

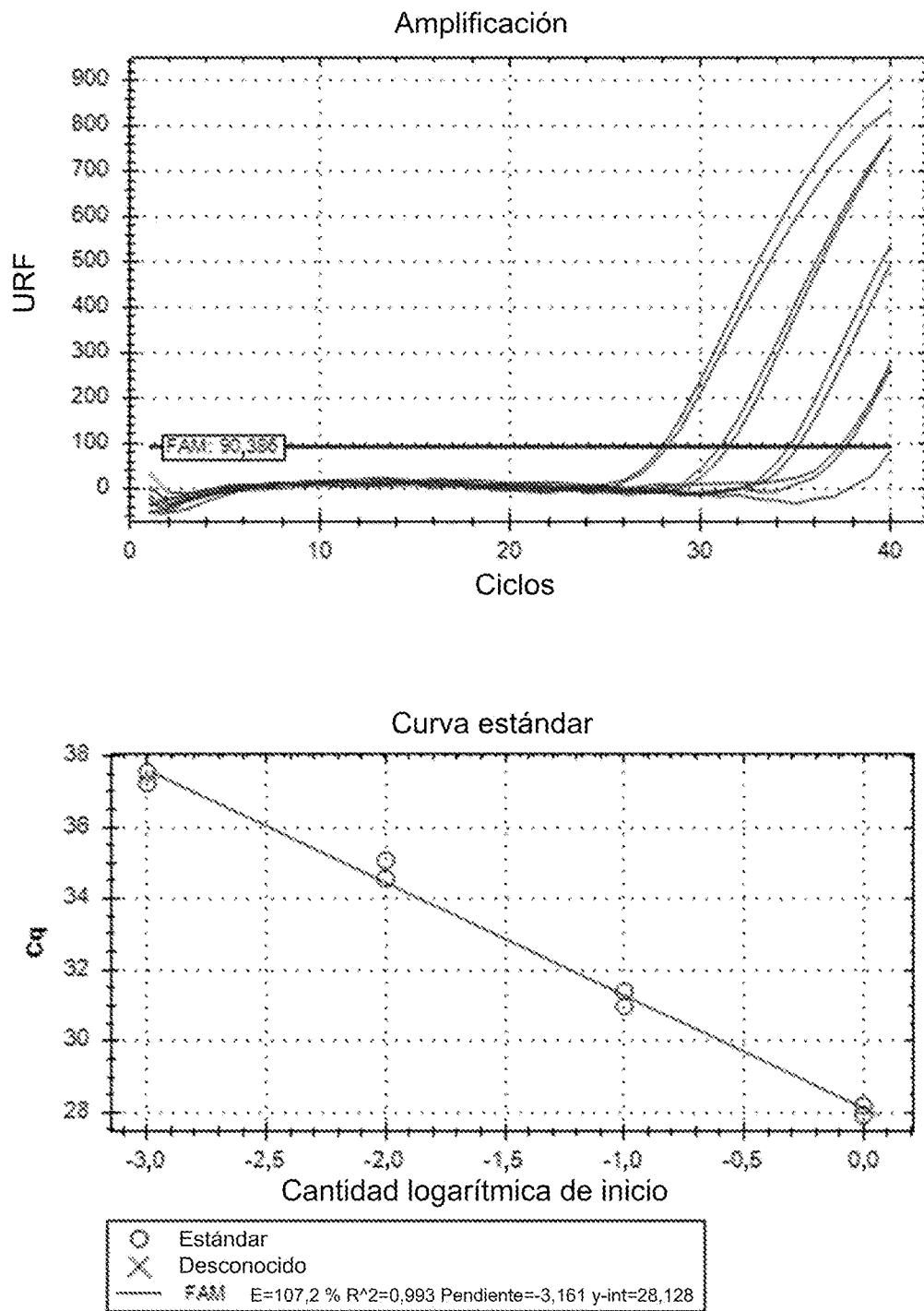


Figura 2 (continuación)

C

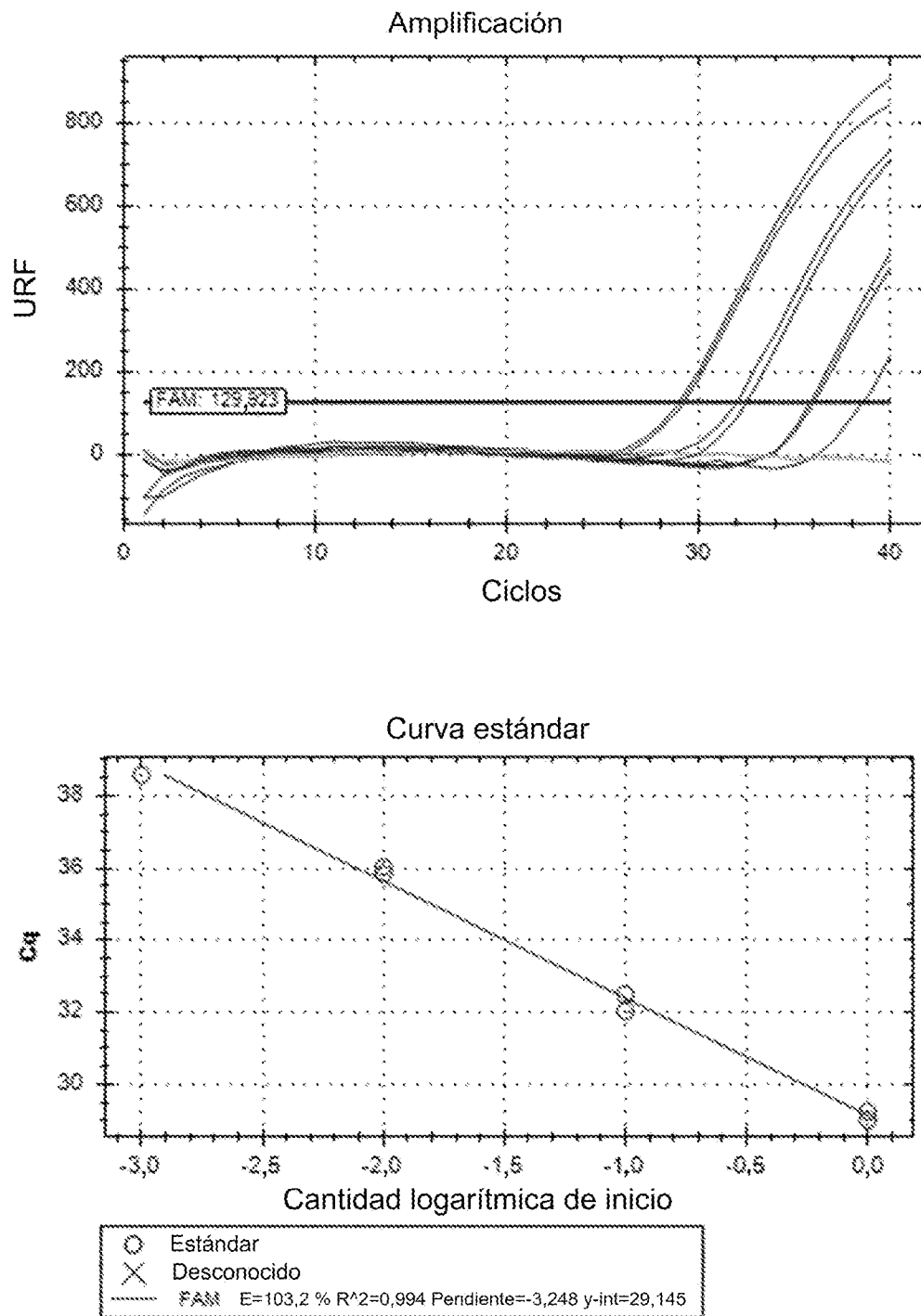


Figura 2 (continuación)

D

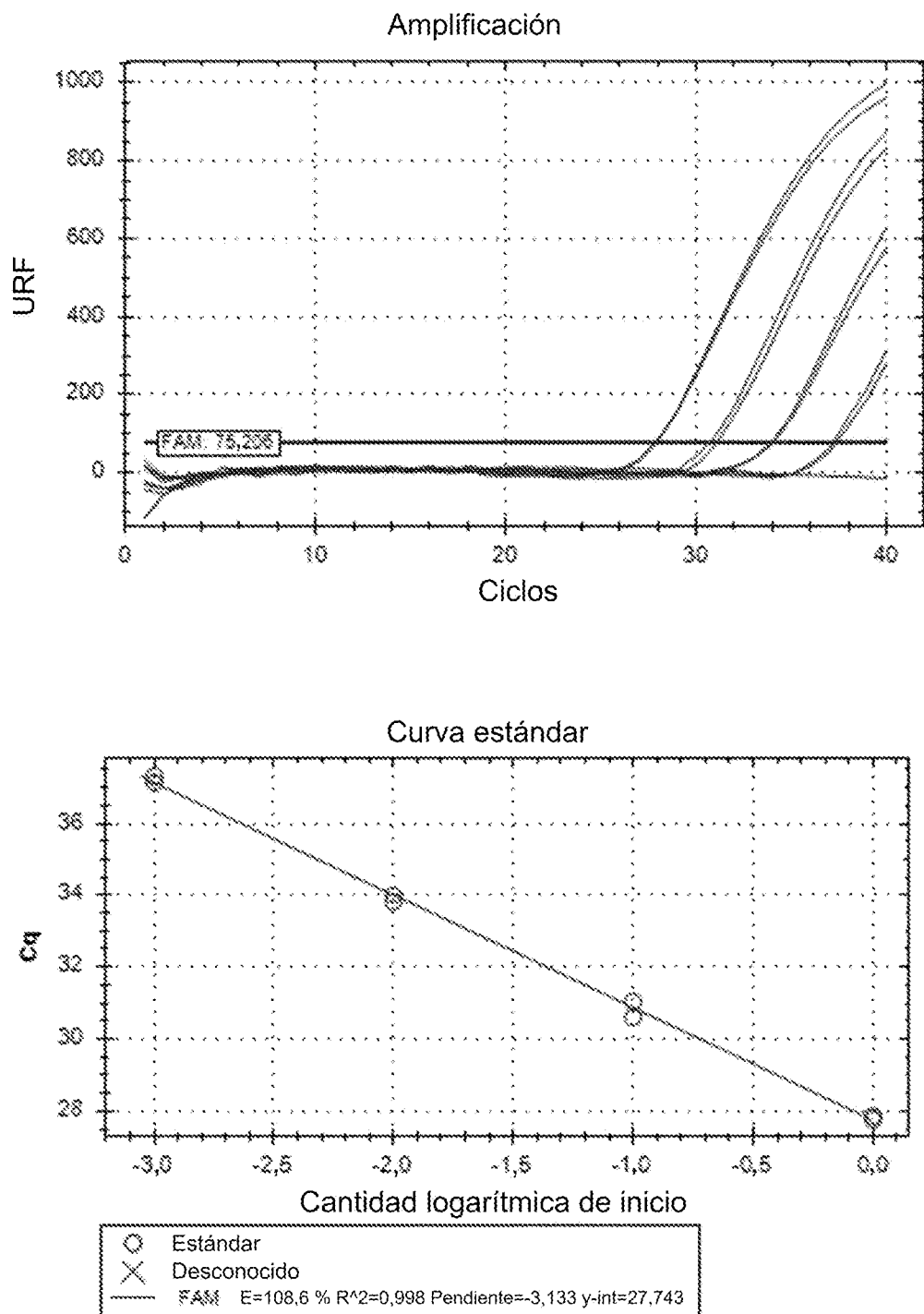


Figura 2 (continuación)

E

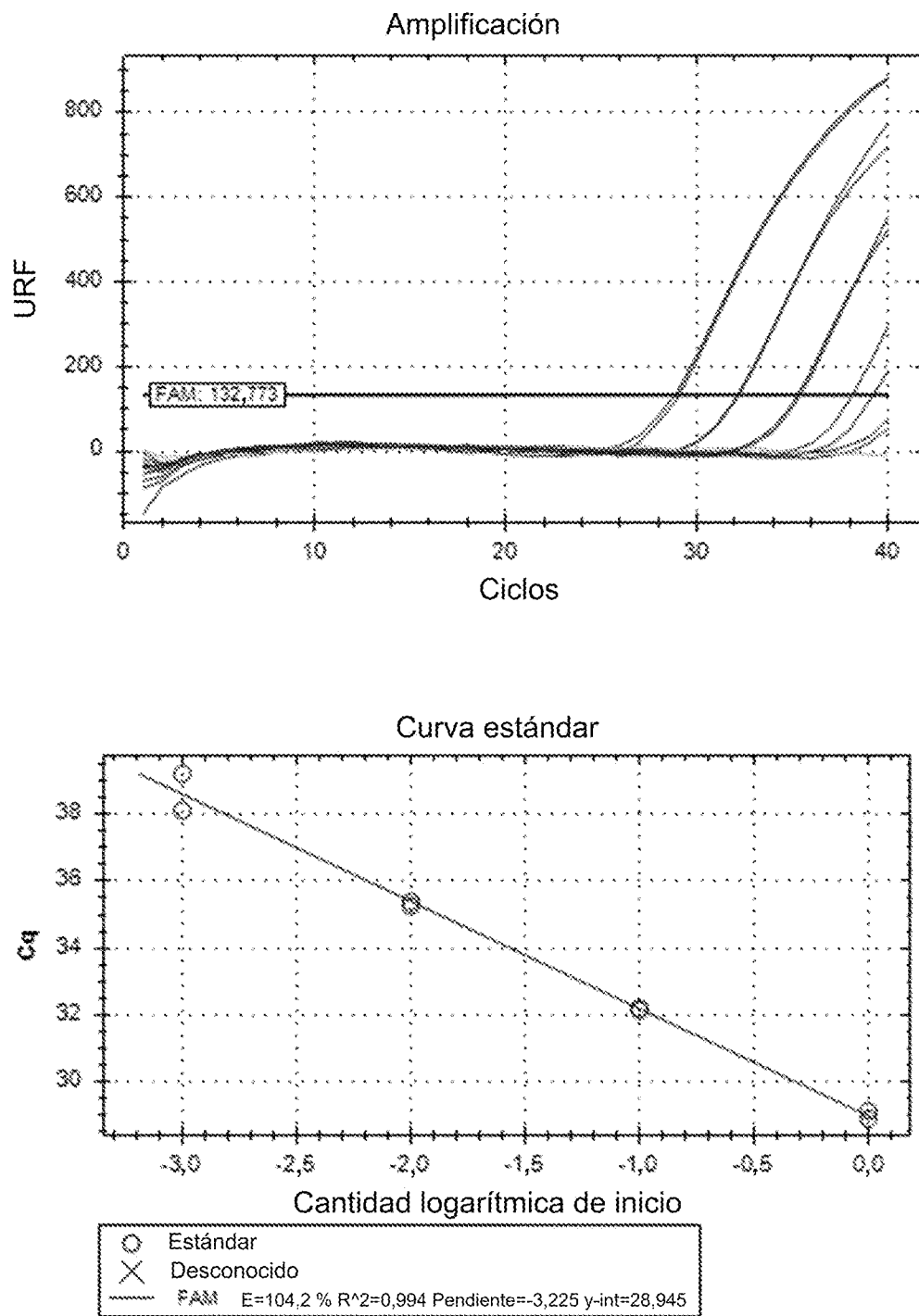


Figura 2 (continuación)

A

GRÁFICO DE AMPLIFICACIÓN

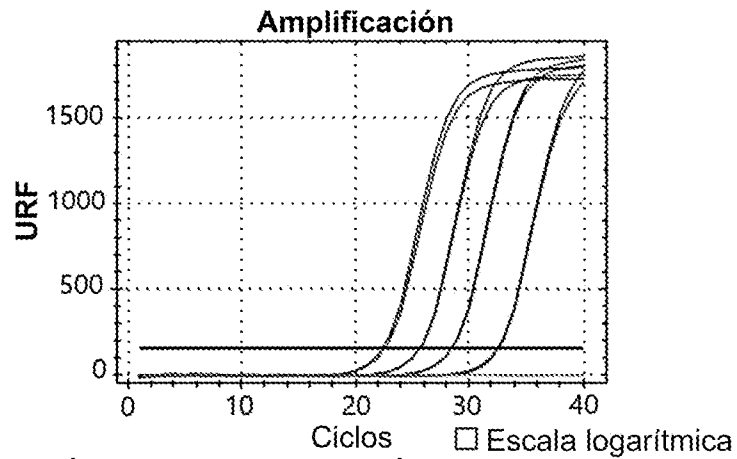


GRÁFICO DE CURVA ESTÁNDAR

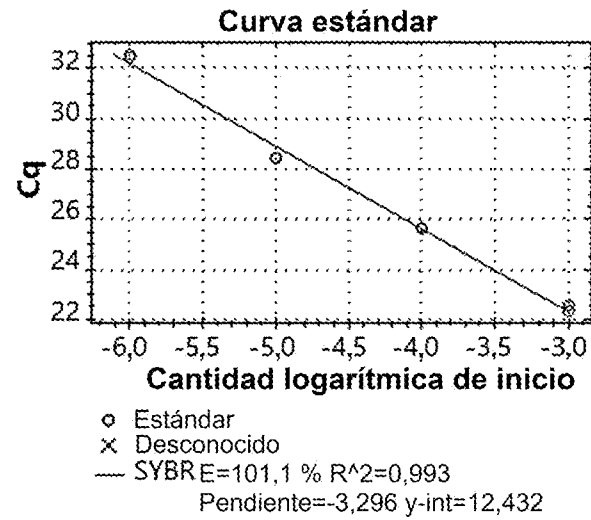


GRÁFICO DE PICOS DE FUSIÓN

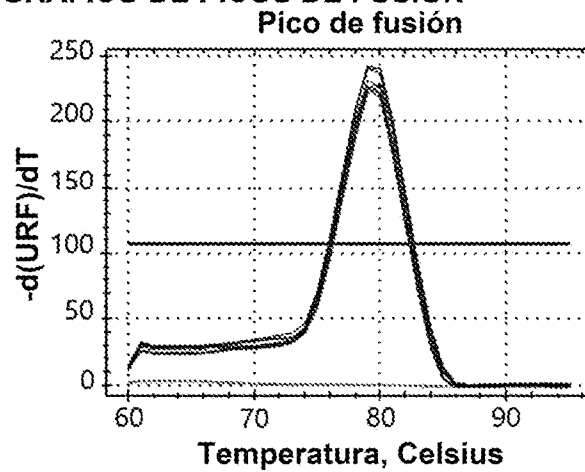


Figura 3

B

GRÁFICO DE AMPLIFICACIÓN

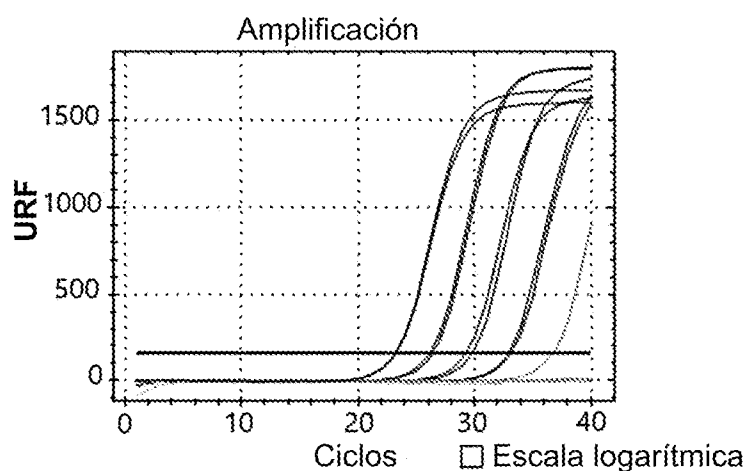


GRÁFICO DE CURVA ESTÁNDAR

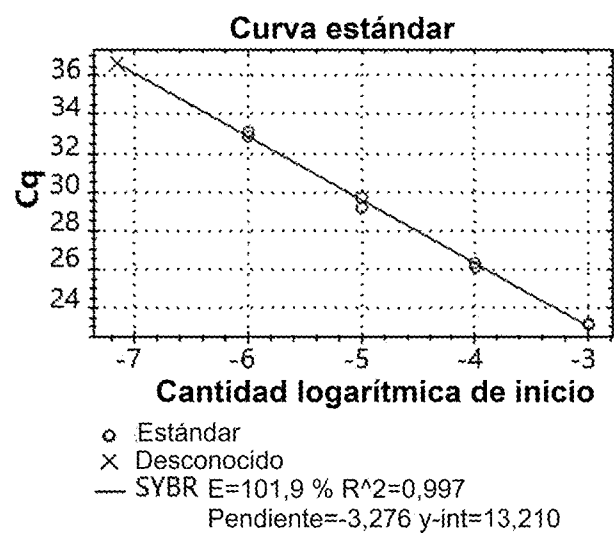


GRÁFICO DE PICOS DE FUSIÓN

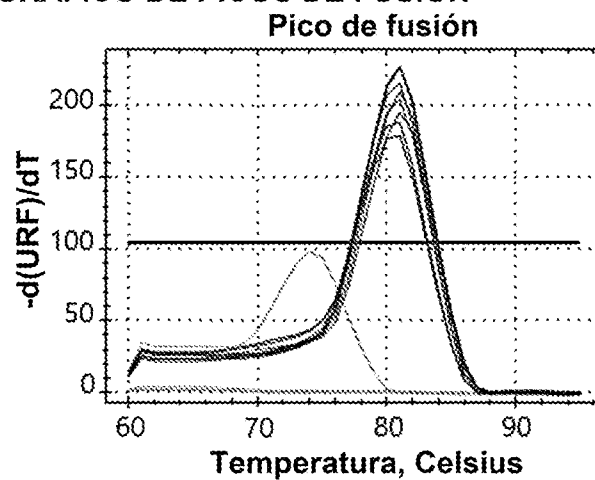


Figura 3 (continuación)

C

GRÁFICO DE AMPLIFICACIÓN

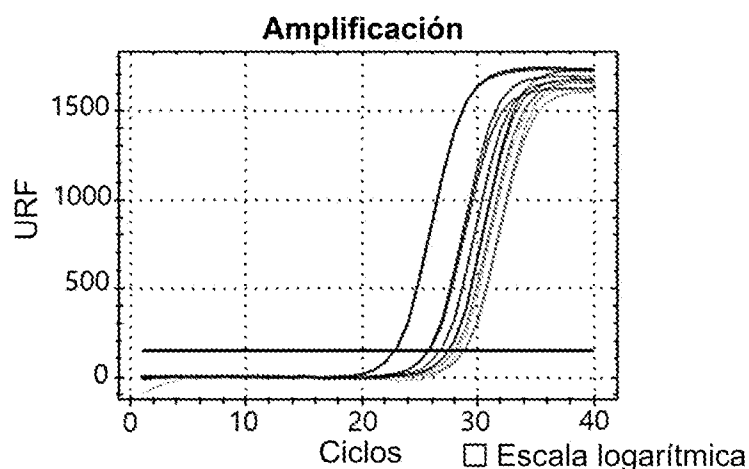


GRÁFICO DE CURVA ESTÁNDAR

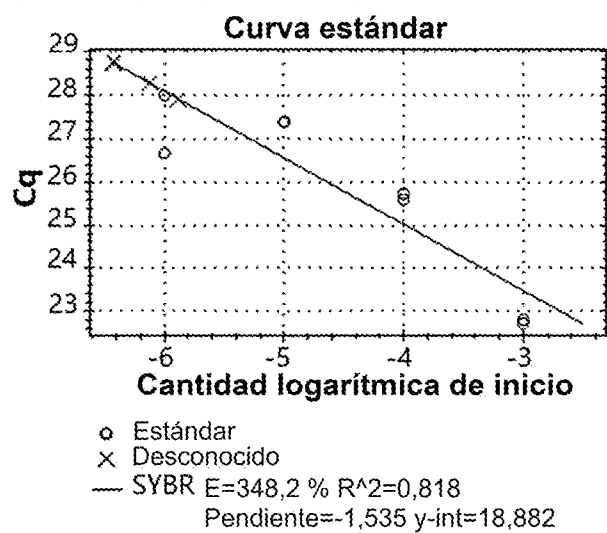


GRÁFICO DE PICOS DE FUSIÓN

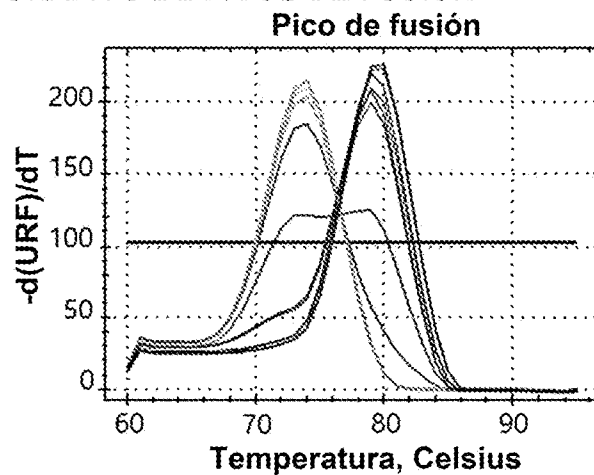
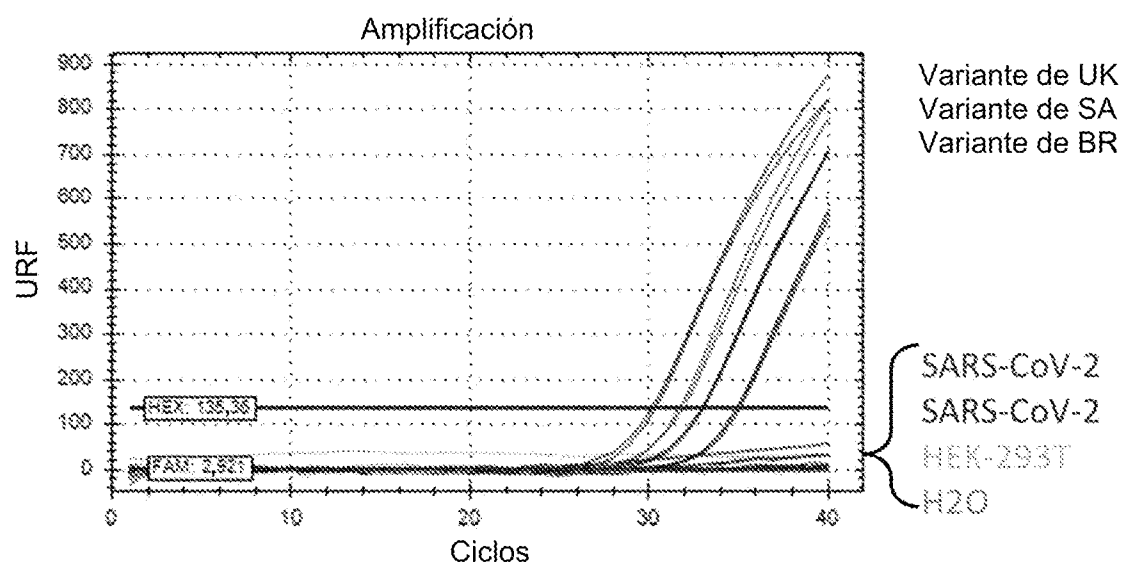


Figura 3 (continuación)

Cebadores MUT-As y MUT-Ar, MUT-sonda A



Cebadores UK-As y UK-Cr, UK-sonda B

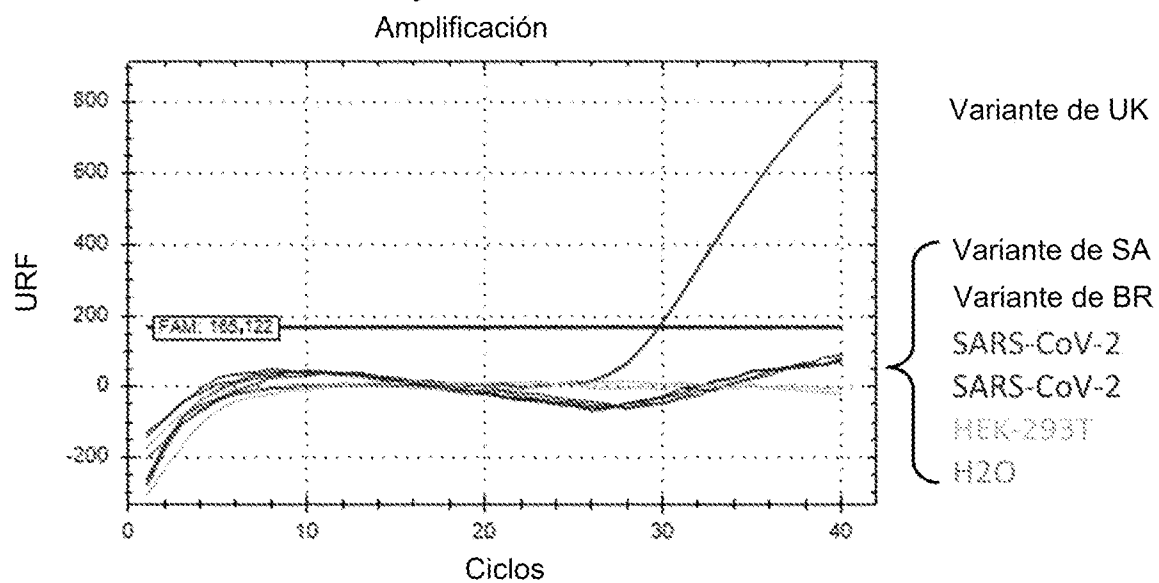


Figura 4