



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Carta científica

Doble mutación en N501Y que impide su identificación mediante un kit de RT-PCR de uso habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica

Double N501Y mutation hindering its detection by RT-PCR kit widely used at Clinical Microbiology laboratories

Las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) se han convertido en una herramienta indispensable para el estudio y control de la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2¹. La secuenciación del genoma completo viral ha sido vital no solo para el desarrollo de vacunas y fármacos específicos, sino también para el descubrimiento y la monitorización de las variantes de interés que, desde la aparición de la ahora conocida como variante alpha², han ido sucediéndose y relacionándose con los recrudescimientos puntuales de la pandemia. No obstante, y pese a los esfuerzos realizados por los laboratorios de Microbiología en todo el mundo, no se dispone de la capacidad de secuenciación suficiente para caracterizar todas las muestras positivas a SARS-CoV-2 con esta tecnología. Por ello se han desarrollado diferentes estrategias para la caracterización del virus mediante RT-PCR de combinaciones conocidas de mutaciones³⁻⁵; sin embargo, no debemos olvidar las limitaciones que este tipo de estudios presentan y que pueden llevar a una asignación de variante errónea^{6,7}.

En la actualidad, en nuestro servicio se caracterizan todas las primeras muestras de un episodio con Cts por debajo de 32 mediante los paneles Allplex™ Variants I&II (Seegene, Corea) que estudian las mutaciones de la espícula más relevantes en las últimas variantes de interés (H69/V70-, W152C, K417N, K417T, L452R, E484K y N501Y). A partir de febrero de 2022, en un escenario totalmente dominado por la variante ómicron, aquellas muestras que presentaron las mutaciones H69/V70-, K417N y N501Y fueron clasificadas como variante ómicron mediante RT-PCR. En caso de no presentar la delección se consideró que pertenecían a la subvariante BA.2 mediante RT-PCR.

Ante la aparición de una muestra con H69/V70- y K417N, pero sin N501Y, se optó por secuenciar esta muestra ya que estos resultados no permitían asignarla a ninguna variante mediante RT-PCR. Para ello se utilizó una adaptación del protocolo ARTIC para Oxford Nanopore mediante la ampliación del genoma completo con el esquema VarSkip⁸. La librería resultante se procesó en un secuenciador MinION mk1c (Oxford Nanopore). Las lecturas obtenidas fueron posteriormente ensambladas mediante el pipeline de ARTIC para datos obtenidos de secuenciadores con tecnología de Oxford Nanopore y se analizaron mediante la webApp de Nextstrain⁹ comprobando su consistencia mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV)¹⁰.

La secuencia obtenida (depositada en GISAID como EPI_ISL_10968563) pertenece al clado 21K (ómicron) y al linaje

BA.1.17 y presentaba entre otras mutaciones características en la espícula las tres mutaciones empleadas por el esquema de Allplex Variants I&II: H69/V70-, K417N y N501Y; si bien, la mutación N501Y, además del cambio habitual A23063T, presentaba también T23065C. Todas las mutaciones se encontraron con suficiente cobertura. En este caso T23065C acompañando a A23063T produce una mutación silente ya que el codón que conforman sigue codificando una tirosina y mantiene la mutación N501Y.

Por lo tanto, es de esperar que esta mutación no suponga una ventaja evolutiva para el virus ni un cambio fundamental para su comportamiento. No obstante, sí que puede suponer un problema para los esquemas de caracterización que se basen en el estudio de mutaciones concretas, como el que empleamos en nuestro laboratorio en la actualidad; ya que, si este cambio se hubiese dado, por ejemplo, en una variante del linaje BA.2 en los paneles Allplex Variants I&II solo sería positiva la mutación K417N.

En resumen, creemos que este caso se trata de un ejemplo más de la enorme utilidad que presentan las NGS en los laboratorios de Microbiología Clínica en la actualidad, ya que nos permiten no solo la correcta asignación de las variantes circulantes, sino también la monitorización de la evolución de esas mismas variantes.

Bibliografía

1. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O'Toole Á, Haverkate M, Mollers M, et al. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med.* 2020;26:1405-10.
2. Rambaut A, Loman N, Pybus OG, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations - SARS-CoV-2 coronavirus /nCoV-2019. *Genomic Epidemiology* [Internet]. *Virological.* 2020 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
3. Ong DSY, Koeleman JGM, Vaessen N, Breijer S, Paltansing S, de Man P. Rapid screening method for the detection of SARS-CoV-2 variants of concern. *J Clin Virol.* 2021;141:104903.
4. Nörz D, Grunwald M, Olearo F, Fischer N, Aepfelbacher M, Pfefferle S, et al. Evaluation of a fully automated high-throughput SARS-CoV-2 multiplex qPCR assay with built-in screening functionality for del-HV69/70- and N501Y variants such as B.1.1.7. *J Clin Virol.* 2021;141:104894.
5. Kami W, Kinjo T, Arakaki W, Oki H, Motooka D, Nakamura S, et al. Rapid and simultaneous identification of three mutations by the Novaplex™ SARS-CoV-2 variants I assay kit. *J Clin Virol.* 2021;141:104877.
6. Alejo-Cancho I, Gual-de-Torrella A, Gallego M, Urrutikoetxea-Gutierrez M, Lejarraga C, López de Goikoetxea MJ. Misidentification of the SARS-CoV-2 Mu variant using commercial mutation screening assays. *Arch Virol* [Internet]. 2022 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-022-05395-w>
7. Camp JV, Buchta C, Jovanovic J, Puchhammer-Stöckl E, Benka B, Griesmacher A, et al. RT-PCR based SARS-CoV-2 variant screening assays require careful quality control. *J Clin Virol.* 2021;141:104905.
8. VarSkip multiplex PCR designs for SARS-CoV-2 sequencing [Internet]. New England Biolabs Inc. 2021 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <https://github.com/nebiolabs/VarSkip>
9. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics.* 2018;34:4121-3.

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.04.004>

0213-005X/© 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: M. Urrutikoetxea-Gutierrez, D. Fernández Vecilla, M.C. Nieto Toboso et al., Doble mutación en N501Y que impide su identificación mediante un kit de RT-PCR de uso habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica, *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.04.004>

M. Urrutikoetxea-Gutierrez, D. Fernández Vecilla, M.C. Nieto Toboso et al.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica xxx (xxxx) xxx–xxx

10. Integrative genomics viewer | Nature Biotechnology [Internet]. [consultado 6 Jun 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.1754>

Mikel Urrutikoetxea-Gutierrez^{a,b,*},
Domingo Fernández Vecilla^{a,b}, María Carmen Nieto Toboso^{a,b}
y José Luis Díaz de Tuesta Del Arco^{a,b}

^a Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Basurto,
Bilbao, España

^b Grupo de Microbiología y Control Infección. IIS Biocruces Bizkaia,
Barakaldo, España

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: mikel.j.urruti@gmail.com
(M. Urrutikoetxea-Gutierrez).