

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE SARS-CoV-2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN PLATAFORMA ILUMINA.

IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE SARS-CoV-2
MEDIANTE SECUENCIACIÓN PLATAFORMA ILLUMINA.

AUTORES:

Paulo Covarrubias Pizarro

Jefe Laboratorio NGS

Sección Genética de Agentes infecciosos

Subdepto. Genómica y Genética Molecular

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Andrés Castillo Ramírez

Jefe Sección Genética de Agentes infecciosos

Subdepto. Genómica y Genética Molecular

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Bárbara Parra

Jefa Sección Genética Humana

Subdepto. Genómica y Genética Molecular

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Jorge Fernández Ordenes

Jefe Subdepto. Genómica y Genética Molecular

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Constanza Campano

Jefa Sección Bioinformática y Modelamiento Molecular

Subdepto. Genómica y Genética Molecular

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Rodrigo Fasce Pineda

Jefe Subdepto Virología

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

Patricia Bustos

Jefe Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos

Departamento Biomédico Nacional y de Referencia

IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE SARS-CoV-2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN PLATAFORMA ILLUMINA.

RESUMEN

La vigilancia genómica de patógenos monitorea los cambios genéticos en agentes infecciosos como el SARS-CoV-2, facilitando la identificación de variantes de interés (VOI) y de preocupación (VOC) que afectan la transmisibilidad, la evasión inmune y la gravedad de la enfermedad. Este proceso ha sido fundamental en el manejo de COVID-19, permitiendo mejorar la efectividad de las vacunas y de las políticas de salud mediante el rastreo de variantes y la detección de nuevas introducciones. La colaboración internacional y nacional es esencial para lograr una vigilancia efectiva, como lo demuestran la red RESVIGEN y los esfuerzos de monitoreo en Chile. La prevalencia de la variante Ómicron en Chile evidenció la importancia de este enfoque al facilitar la implementación temprana de medidas de control. Este documento presenta un protocolo para la identificación de variantes de SARS-CoV-2 mediante secuenciación masiva paralela, con el fin de evaluar su impacto en la salud pública.

ALCANCE

Este documento aplica a todos los laboratorios que realizan secuenciación masiva de SARS-CoV-2 y que utilizan la plataforma de secuenciación Illumina.

INTRODUCCIÓN

La vigilancia genómica de patógenos es el proceso mediante el cual se monitorean los cambios genéticos en un agente infeccioso. Esta herramienta ha sido fundamental en el manejo de la pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ya que permite identificar variantes de interés (VOI) o de preocupación (VOC) que están en circulación. Estas variantes pueden presentar características epidemiológicamente relevantes, como cambios en la transmisibilidad, evasión de la respuesta inmune y severidad de la enfermedad. La detección de estos cambios facilita la identificación de la prevalencia de diferentes VOI y VOC en la población infectada, el rastreo de rutas de contagio entre regiones geográficas y la detección de la introducción de nuevas variantes en áreas específicas, en comparación con la información proporcionada por organizaciones internacionales.

El virus SARS-CoV-2 tiene una alta plasticidad genómica debido a su elevada tasa de mutación, lo que hace que la identificación de variantes y sus mutaciones específicas sea crucial para el desarrollo e implementación de medidas farmacéuticas y políticas públicas de salud eficaces en el tratamiento y prevención del COVID-19. Los datos obtenidos a través de la vigilancia genómica han mejorado la efectividad

de diversas vacunas y protocolos de detección, además de permitir la implementación o el levantamiento oportuno de medidas preventivas, como restricciones de viajes, aislamiento o el uso obligatorio de elementos profilácticos en diferentes zonas.

Una vigilancia genómica efectiva requiere un esfuerzo colaborativo, ya que es necesario comparar genomas de distintas regiones y periodos para construir una filogenia precisa de las muestras analizadas. A nivel internacional, existen iniciativas como la Red Regional de Vigilancia Genómica de Virus Respiratorios (RESVIGEN), que promueve su implementación en diversos países. A nivel nacional, la vigilancia depende de una red de detección homogénea a lo largo del territorio, que proporcione datos representativos y que incluya la vigilancia en puntos críticos, como las entradas al país, para monitorear la introducción de VOI y VOC. Esto exige una colaboración estrecha entre diferentes instituciones para garantizar el funcionamiento óptimo de la vigilancia genómica.

La VOC Ómicron y sus subvariantes han sido prevalentes en Chile desde su introducción en 2021. Esta variante tiene una alta capacidad de evadir la respuesta inmune inducida por la vacuna CoronaVac, que fue administrada a la mayoría de la población durante ese periodo. Gracias al programa de vigilancia genómica, se identificó oportunamente esta VOC, lo que permitió una rápida transmisión de la información y la implementación de medidas para controlar los contagios.

Para la vigilancia genómica del SARS-CoV-2, existe una variedad de métodos y kits comerciales disponibles. Entre ellos, el kit COVIDSeq de Illumina destaca como una opción ideal debido a su cobertura uniforme del genoma, capacidad para detectar variantes, flujo de trabajo integrado, análisis de datos simplificado, flexibilidad, escalabilidad, rapidez y costo-efectividad. Estas características permiten a los laboratorios identificar y monitorear nuevas cepas del virus de manera eficiente.

El objetivo de este documento es establecer un protocolo estandarizado para identificar nuevas variantes y linajes de SARS-CoV-2, que permita evaluar el impacto en la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y la eficacia de las vacunas.

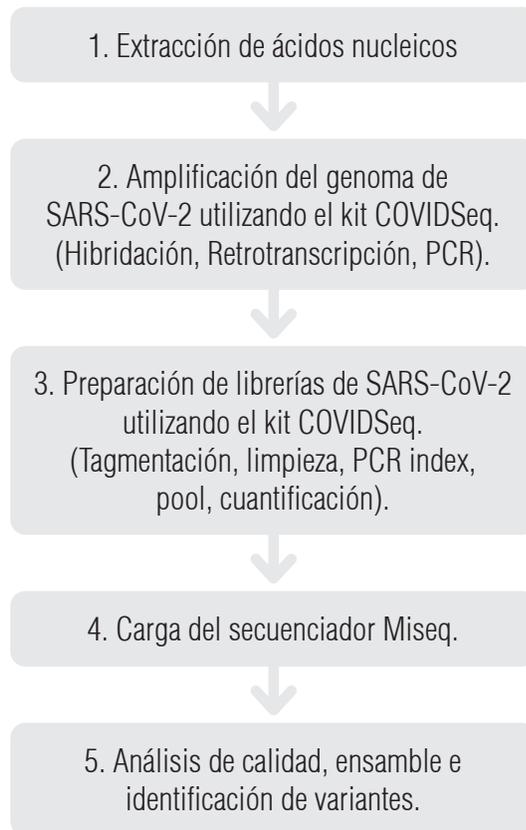
DESARROLLO

I. Toma de muestra

- Los genomas virales para secuenciación provendrán preferentemente de hisopados nasofaríngeos y serán suministrados por laboratorios de la red de diagnóstico, coordinada y aprobada por el MINSAL. Los laboratorios de vigilancia genómica recibirán ARN total o muestras originales diagnosticadas como positivas, con un Ct < 25, tomadas en un medio de transporte viral (VTM) sin sustancias inactivantes.
- Las muestras deben ser transportadas al Laboratorio de Vigilancia Genómica siguiendo el mismo protocolo de traslado utilizado para el diagnóstico de COVID-19 por PCR. Esto implica que las muestras deben contar con triple embalaje y ser enviadas en contenedores adecuados.
- Cada muestra debe estar acompañada de su formulario de ingreso en Epivigila, el cual será la única información vinculada a la muestra. Para capturar datos epidemiológicos relevantes para la salud pública, es fundamental integrar a cada genoma secuenciado un conjunto mínimo de datos. Los datos mínimos requeridos para cada muestra son: fecha de recolección, edad, sexo, comuna de origen, condición clínica de la persona (grave, asintomático, inmunosuprimido, etc.), historial de viaje, tipo de programa de vigilancia (pasiva o activa), estado de reinfección, estado de vacunación (con número de dosis y proveedor, si corresponde).
- La muestra original (hisopado nasofaríngeo) debe transportarse refrigerada a 4°C o, si se trata de ARN, congelada en hielo seco, hasta el Laboratorio de Vigilancia Genómica más cercano, idealmente en un plazo máximo de 36 horas desde la toma de la muestra.

II. Procedimiento de secuenciación

Una vez que la muestra ingresa al laboratorio, se procede con el proceso de extracción y secuenciación, siguiendo el “Flujo de Trabajo para la Identificación de Linajes de Muestras de SARS-CoV-2 mediante Secuenciación con Illumina”, descrito a continuación.



1. Extracción de ARN de Coronavirus provenientes de muestras clínicas con sospecha COVID-19 en hisopados o aspirados nasales y/o orofaríngeos para su posterior uso en secuenciación de genoma completo.

En esta sección se describe el método de extracción automatizado por perlas magnéticas con el equipo Zymio, aunque se puede utilizar cualquier otro método de extracción de ARN, como el MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, el QIAamp Viral RNA Mini Kit o similares.

Materiales, insumos y equipos

- Kit Nucleic Acid Extraction Kit marca Zymio
- Equipo robot Zymio EXM 6000
- Tiras de 8 tubos para PCR
- Etanol al 70%
- Gasa o papel absorbente
- Mascarillas
- Pecheras desechables
- Micropipeta P200
- Micropipetas multicanal P20 y P200

- Puntas con filtro 20 y 200 µL
- Gabinete de bioseguridad
- Placa 96 pocillos para PCR
- Tapas para placas de PCR
- Termociclador

1.1 Preparación del área de trabajo pre-extracción

- Encender el robot Zybio EXM6000 y activar la lámpara UV por 15 minutos previamente a la extracción.
- Limpiar la superficie de trabajo del gabinete de bioseguridad y las micropipetas utilizando hipoclorito de sodio 0,5% seguido de etanol 70%.
- Pegar sabanilla sobre la superficie de trabajo.
- Dejar gasas estériles dentro del gabinete.
- Encender luz UV durante al menos 15 minutos antes de comenzar la carga.

1.2 Carga de muestras (Trabajar en gabinete de bioseguridad con flujo encendido)

- Vestir delantal celeste cirujano, pechera plástica, mascarilla N95 y doble par de guantes.
- Hacer vórtex a cada tubo con muestra clínica.
- Dispensar 180 µL de Proteinasa K (viene en el kit) en cada pocillo de una tira de tubos de PCR.
- Cuidadosamente retirar la tapa de aluminio de la placa de lisis "Extraction Reagent I" y rotular con las coordenadas en filas y columnas y el número de protocolo.
- Utilizando una pipeta multicanal de 20 µL, cargar 15 µL de Proteinasa K en cada pocillo de la placa "Extraction Reagent I".
- Humedecer una gasa con etanol y una gasa con hipoclorito de sodio al 0,5% antes de comenzar la carga de muestras.
- Agregar 190 µL de muestra al pocillo que corresponda, sin homogeneizar para evitar la formación de aerosoles, utilizando una P200.
- Cuando se cargue una muestra, se limpia la micropipeta con etanol 70% (y con otra gasa humedecida con solución de hipoclorito al 0,5 % si la micropipeta toma contacto con una muestra).
- Una vez finalizada la carga de muestras en la placa "Extraction Reagent I", eliminar primer par de guantes en basurero dentro del gabinete y descartar pechera plástica. Mantener bolsa con desechos dentro y encender la luz UV durante al menos 15 minutos para inactivar virus previo a descontaminar el gabinete.
- Cubrir la placa con papel aluminio y llevarla al robot.

1.3 Procesamiento de muestras en Robot

- Montar la placa con las muestras cargadas "Extraction Reagent I" en la posición 1 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda (sticker de la placa mirando hacia afuera).
- Agitar la placa "Magnetic Beads Solution" para bajar los líquidos que pudieran estar pegados en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar en la posición 2 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda (sticker de la placa mirando hacia afuera).

- Agitar la placa “Extraction Reagent II” para bajar los líquidos que pudieran estar pegados en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar en la posición 3 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda (sticker de la placa mirando hacia afuera).
- Agitar la placa “Elution Buffer” para bajar los líquidos que pudieran estar pegados en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar en la posición 5 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda.
- Posicionar el capacho plástico dentro de la placa “Magnetic Beads Solution”, posición 2.
- La posición 4 del robot queda desocupada.
- Revisar que todas las placas estén en la misma posición dentro del robot antes de comenzar.
- Presionar el botón RUN en el menú para dar inicio al programa de extracción.

1.4 Traspaso y almacenamiento de los ácidos nucleicos

- Rotular una placa de PCR de 96 pocillos con las coordenadas (filas y columnas), número de protocolo y fecha.
- Utilizando una pipeta multicanal P200, traspasar los ácidos nucleicos de la placa del robot (aprox. 50 µL) a la placa de PCR ya rotulada.
- Tapar con tiras de tapas.
- Finalmente, los ácidos nucleicos purificado debe ser guardado a –70 °C.

2. Amplificación del genoma de SARS-CoV-2 utilizando el kit COVIDSeq.

Materiales, insumos y equipos

- Guantes
- Tubos para PCR 0,2 mL (DNase/RNase free) o placas de amplificación de 96 pocillos (DNase, RNase free)
- Tubos para PCR 1,5 mL (DNase/RNase free)
- Tubos de centrifuga 15 mL.
- Tubos para Qubit 0,6 mL
- Micropipetas P1000, P200, P100, P20, P10, P2, y Multicanal P200, P50, P10
- Puntas con filtro 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 50 µL, 20 µL, 10 µL, 2 µL (DNase/ RNase free)
- Gradilla magnética para placas o para microtubos
- Etanol grado biología molecular
- Agua grado biología molecular
- Tiras de 8 tubos de 0.2 mL o equivalente
- Equipo Qubit (Invitrogen)
- Qubit™ dsDNA HS Assay Kit para fluorímetro Qubit (Invitrogen)
- Illumina COVIDSeq Test (Illumina)
- IDT PCR Indexes for Illumina (Illumina)
- Termociclador
- Reservorios plásticos desechables
- Solución descontaminante de DNA (DNA-off® o similar)

Configurar los siguientes programas de termociclador:

1-Anneal:

- Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 17 µL.
 - 65°C por 3 minutos.
 - 4°C por tiempo infinito

2-FSS:

- Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 25 µL.
 - 25°C por 5 minutos
 - 50°C por 10 minutos
 - 80°C por 5 minutos
 - 4°C por tiempo infinito

3-PCR:

- Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 25 µL.

98°C	3 minutos	X 35
98°C	15 segundos	
63°C	5 minutos	
4°C	∞	

4-TAG:

- Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 50 µL.
 - 55°C por 5 minutos.
 - 10°C por tiempo infinito.

5-TAG PCR:

- Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 50 µL.

72°C	3 minutos	X 7
98°C	3 minutos	
98°C	20 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	3 minutos	
10°C	∞	

2.1 Hibridación del ARN

Reactivos:

Reactivo	Ubicación	Instrucción
EPH3	-20 °C	Dejar a T° ambiente e invertir para mezclar.

Procedimiento:

- En sala de preparación de mezcla de PCR, etiquetar una placa de 96 como placa de RT y añadir 8,5 µL de EPH a cada pocillo que se utilizará (usar una tira de 8 tubos y añadir 110 µL a cada pocillo para dispensar).
- En sala de carga de ácidos de nucleicos, añadir 8,5 µl de muestras a cada pocillo,
- Al control negativo de RT agregar 8,5 µL de agua
- Tapar la placa, realizar vortex, spin por 10 segundos.
- Llevar a termociclador con el programa de PCR "1-Anneal".

2.2 Transcripción reversa

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
FSM	-20 °C	Dejar a T° ambiente e invertir para mezclar, mantener en hielo.
RVT	-20 °C	Invertir antes de usar, mantener en hielo.

Procedimiento:

- En sala de preparación de mezcla de PCR, preparar la siguiente mezcla por muestra:

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
FSM	9 µL	864
RVT	1 µL	96

- Alicuotar en una tira de 8 tubos, colocando 100 µL en cada pocillo, tapar tubo y llevar a sala de carga de ácidos de nucleico.
- En sala de carga de ácidos de nucleico, dispensar 8 µL del mix en cada pocillo de la placa anterior (Placa RT).
- Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundos.
- Llevar a termociclador con el programa de PCR "2-FSS".

Nota: Este es un punto seguro para detener el protocolo. Congelar la muestra y conservar a -20° C y almacenar hasta por 7 días.

2.3 PCR

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
IPM	-20 °C	Dejar a T° ambiente e invertir para mezclar, mantener en hielo.
CPP1	-20 °C	Dejar a T° ambiente e invertir para mezclar, mantener en hielo.
CPP2	-20 °C	Dejar a T° ambiente e invertir para mezclar, mantener en hielo.
Agua PCR	4°C	Dejar a T° ambiente.

Se recomienda utilizar las versiones 5 o posteriores de los CPP1/ CPP2 para los linajes de SARS-CoV-2 actualmente en circulación

Procedimiento:

- En sala de preparación de mezcla de PCR, preparar la siguiente mezcla por muestra:

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
IPM	13,1 µL	1257,6 µL
CPP1 o CPP2	3,8µL	364,8 µL
H2O (Refrigerador sala de preparación de mezcla de PCR)	4,1 µL	393,6 µL

- En sala de preparación de mezcla de PCR, etiquetar 2 placas de 96 como CPP1 y CPP2, dispensar 20 µl del mix en cada pocillo según el número de muestras, alícuotar en tiras de 8.
- En sala de carga de ácidos de nucleico, añadir 5 µl de muestras desde la placa de RT a las placas CPP1 y CPP2.
- Al control negativo de RT agregar 5 µL de agua
- Tapar las placas, realizar vortex, spin de 10 segundos.
- Llevar a termociclador con el programa de PCR "3-PCR".

Nota: Este es un punto seguro para detener el protocolo. Congelar la muestra y conservar a -20° C y almacenar hasta por 3 días.

3. Preparación de librerías de SARS-CoV-2 utilizando el kit COVIDSeq.

3.1 Tagmentación de los genomas amplificados de SARsS-CoV-2

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
TB1	-20 °C	Dejar a T° ambiente. Vortex antes de usar
EBLTS	4 °C	Dejar a T° ambiente. Vortex antes de usar
Agua	T° ambiente	

Procedimiento:

- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
TB1	12 µL	1152 µL
EBLTS	4 µL	384 µL
H2O	20 µL	1920 µL

- Etiquetar una placa nueva con NGS N°, mezclar 10 µl de cada muestra de la placa CPP1 y 10 µl de la placa CPP2.
- Agregar control positivo y negativo.
- Vaciar el mix a un reservorio y dispensar 30 µl del mix a cada pocillo que contenga muestra.
- Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundos.
- Llevar a termociclador con el programa de PCR "4-TAG".

3.2 Limpieza tagmentación

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
ST2	T° ambiente	Homogeneizar por inversión suave
TWB	4 °C	Vortex antes de usar

Procedimiento:

- *Spin por 10 segundos a la placa.*
- *Añadir 10 µl de ST2 a cada pocillo.*
- *Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundo, dejar incubar por 5 minutos a T° ambiente.*
- *Colocar en la gradilla magnética 3 minutos y luego descartar el sobrenadante.*
- *Limpieza de las perlas:*
 - a- *Remover placa de la gradilla magnética y añadir 100 µl de TWB a cada pocillo.*
 - b- *Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundos.*
 - c- *Colocar la placa en la gradilla magnética durante 3 minutos*
 - d- *Remover el sobrenadante y repetir el lavado (2 lavados total)*
- En el segundo lavado dejar la placa en la gradilla magnética junto con el TWB y no descartar hasta más adelante.

3.3 PCR Index

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
EPM	-20 °C	Invertir para mezcla. Dejar en hielo
Index	-20 °C	Descongelar a 4°C. Vortex antes de usar y luego spin
Agua	T° ambiente	

- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
EPM	24 µL	2304 µL
H ₂ O	24 µL	2304 µL

Procedimiento:

- Con la placa en la gradilla magnética descartar el TWB.
- Remover remanentes de TWB con punta de 20 o 50 µl.

- Remover la placa de la gradilla magnética y añadir 40 µl de mix a cada pocillo.
- Añadir 10 µl del index correspondiente a cada pocillo.
- Tapar la placa, realizar vortex, spin por 10 segundos.
- Llevar al termociclador con el programa de PCR "5-TAG PCR".

3.4 Limpieza librería y Pool

Reactivos

Reactivo	Ubicación	Instrucción
ITB	T° ambiente	Vortex muchas veces antes de usar
RSB	4 °C	Dejar a T° ambiente por lo menos 30 minutos. Vortex antes de usar
Etanol 80%		Preparar antes de usar

Procedimiento:

- Spin por 10 segundos a la placa.
- Colocar en gradilla magnética por 3 minutos.
- Etiquetar una placa nueva con NGS N° sin perlas y traspasar a esta 45 µl de cada muestra.
- Para formar el Pool tomar 5 µl de cada muestra, se puede hacer con multicanal de 10 y mezclar todo en una tira de 8 tubos, luego juntar todo en un tubo de 1,5 mL etiquetado NGS N° y trabajar según sea una librería para MiSeq o NextSeq.
- Seguir la siguiente fórmula para saber cuánto ITB añadir:

$$N^{\circ} \text{ muestras} \times 5 \times 0,9 = \mu\text{l de ITB}$$
- Añadir el volumen de ITB al tubo de 1,5 mL
- Realizar vortex y spin de 10 segundos
- Incubar a T° ambiente por 5 minutos
- Colocar en gradilla magnética por 5 minutos
- Remover y descartar el sobrenadante
- Lavado de las perlas:
 - Con el tubo en la gradilla magnética añadir 1000 µl de Etanol 80% recién preparado
 - Dejar 30 segundos.
 - Descartar el sobrenadante y repetir el lavado.
- Remover el etanol residual con una punta de 100 µl.
- Añadir 55 µl de RSB, vortex y spin
- Incubar a T° ambiente 2 minutos
- Colocar en la gradilla magnética 2 minutos
- Transferir 50 µl del sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado NGS N°.
- Guardar la librería purificada a -20°C.

3.5 Cuantificación librería

- Equilibrar a T° ambiente los componentes del Qubit HS al menos 30 min antes de comenzar.
- Realizar la cuantificación en duplicado.

Procedimiento:

- Preparar una solución de trabajo diluyendo 1:200 Qubit dsDNA HS Reagent en Qubit dsDNA HS Buffer (1 de fluoróforo:199 Buffer), por cada muestra.
- Cargar 190 µL de solución de trabajo en 2 tubos para los estándares y agregar 10 µL de cada estándar de ADN (0, 100 ng/µL).
- Cargar 198 µL de la solución de trabajo a cada microtubo de acuerdo con el número de muestras a analizar y añadir 2 µL de muestra.
- Hacer vórtex e incubar a T° ambiente, protegido de la luz, por un mínimo de 2 min (evitar la exposición a la luz).
- Medir la fluorescencia usando el Fluorímetro Qubit (Invitrogen).

Nota: Congelar la muestra y conservar a -20° C y almacenar hasta por 30 días.

4. Carga de las librerías en secuenciador Miseq

Materiales, insumos y equipos

- H2O Grado biología molecular
- Guantes
- Tubos para PCR 1,5 mL (DNAse, RNAse free)
- Micropipetas P1000, P200, P100, P20, P10, P2
- Puntas con filtro 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 50 µL, 20 µL, 10 µL, 2 µL (DNAse, RNAse free)
- NaOH 1 N
- PhiX 10 nM, Illumina, catalog # FC-110-3002
- HT1 (Hybridation Buffer)
- PhiX 20 pM
- MiSeq
- Termoblock

Antes de comenzar:

- Descongelar el cartucho de Miseq Reagent Kits V2 en agua hasta donde indica la línea demarcada por lo menos 90 minutos antes de usarse o dejar descongelando a 4°C toda la noche.
- Encender el termobloque a 96°C.
- Chequear tener alícuotas de NaOH 1N, si no revisar preparación en sección 5
- Chequear tener alícuotas de PhiX 20 pM, si no revisar preparación en sección 6.
- Tener una gradilla refrigerada a -20°C.
- Chequear que el equipo tenga sobre 25% de su disco duro libre.

4.1 Preparación de alícuotas de trabajo control NaOH 1N

- Preparar NaOH 1N, luego homogeniza y spin

Reactivo	Volumen μL
NaOH 10 N	200
H ₂ O (T° ambiente)	1800
Total	2000 (NaOH 1N)

- Generar alícuotas de 100 μL de librería de NaOH 1N y guardar a -20°C para evitar cambio de pH.

4.2 Preparación alícuotas de trabajo control PhiX 20 pM

- Preparar PhiX 4 nM, luego homogenizar, spin y dejar a T° ambiente

Reactivo	Volumen μL
PhiX 10 nM (Stock)	4
HT1 (Frío)	6
Total	10 (PhiX 4 nM)

- Preparación PhiX 20 pM, el NaOH se debe preparar antes de usar, como se indica en la sección

Reactivo	Volumen μL
PhiX 4 nM	5
NaOH 0,2 N	5
Total	10

- Homogeneizar por vortex o por pipeteo.
- Realizar spin.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para denaturar la librería.
- Agregar 990 μL de HT1 frío

Generar alícuotas de 50 μL de librería Phix 20 pM denaturado y guardar hasta por 4 semanas a -20°C

4.3 Preparación de la librería para cargar en Miseq

Preparación librería 2nM

- Preparar la librería a una concentración de 2 nM, ingresando los valores de concentración obtenidos de la cuantificación con Qubit y el tamaño de la librería (310 pb) en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Library concentration ng}/\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{average library size (bp)}} \times 10^6 = \text{Molarity (nM)}$$

Preparación PhiX 12,5 pM

- Preparar PhiX 12,5 pM, luego homogenizar por vortex, spin y luego mantener en hielo.

Reactivo	Volumen μL
PhiX 20 pM (Frío)	37,5
HT1 (Frío)	22,5
Total	PhiX 12,5 pM)

4.4 Denaturación librería MiSeq

- Preparar NaOH 0,2 N, luego homogenizar por vortex, spin y dejar a T° ambiente.
 Siempre se debe preparar el NaOH 0,2 N fresco para una denaturación óptima de la librería.

Reactivo	Volumen μL
H ₂ O (T° ambiente)	80
NaOH 1N (T° ambiente)	20
Total	100 (NaOH 0,2 N)

- Preparar librería 10 pM, luego homogenizar por vortex, spin y luego mantener en hielo.

Reactivo	Volumen μL
Librería 2 nM (T° ambiente)	5
NaOH 0,2 N (T° ambiente)	5
Total	10

- Homogeneizar por vortex brevemente o mezclar por pipeteo.
- Realizar spin.
- Incubar por 5 min a T° ambiente, para denaturar.
- Agregar 990 μL de HT1 frío (conservado en hielo)
- Incubar durante 2 minutos en un termobloque a 96°C el microtubo que contiene los 1000 μL de librería 10 pM (5 μL NaOH 0,2 + 5 μL librería 2 nM + 990 μL HT1).
- Luego de la incubación, invertir el microtubo de 1 a 2 veces para mezclar e incubar por 5 min en hielo.
- Preparar los 600 μL de la librería según la concentración que se desee, dejar en hielo.
- **En general son 7 pM.**

Concentración Final	4 pM	5 pM	6 pM	7 pM	8 pM
Librería 10 pM (Frío)	240 μL	300 μL	360 μL	420 μL	480 μL
HT1 (Frío)	330 μL	270 μL	210 μL	150 μL	90 μL
PhiX 12,5 pM (Frío)	30 μL				
Total (Frío)	600 μL				

4.5 Carga equipo Miseq

- Antes de comenzar a revisar si los reactivos del cartucho están descongelados
- Copiar la sampleshet a la carpeta de sampleshet del equipo.
 - Ingresar al equipo al modo de secuenciación con el usuario del laboratorio
Usuario: xxxxx
Clave: xxxxxx
 - Seleccionar la opción de que se copien los resultados a la nube y se hagan los análisis.
 - Lavar la flowcell con abundante H₂O miliQ y luego secar y dejar sin pelusas con un papel para lentes.
 - Colocar la flowcell en equipo, fijarse que los inyectores queden posicionados en los 2 agujeros de la flowcell.
 - Vaciar la botella de desechos del equipo y colocar la botella de buffer que viene junto a la flowcell en el equipo.
 - Sacar el cartucho del agua y verificar que esté todo descongelado, de ser así, sacar el cartucho y secarlo.
 - Con una punta de 1000 µL perforar la posición 17 destacada en naranja (Load sample).
 - Cargar 600 µL de la librería preparada y colocar el cartucho en el equipo
 - Esperar que el equipo pase la prueba de todos los parámetros y decirle que comience.

5. Análisis de calidad, ensamble e identificación de variantes

El pipeline bioinformático utilizado es **Cecret**, ejecutado bajo **Nextflow** y desarrollado específicamente para el análisis de SARS-CoV-2. Este pipeline automatiza la ejecución de varios programas destinados a la limpieza de datos, el trimming, la generación de secuencias consenso y la determinación de linajes. En este resumen, se describen las funciones de cada programa involucrado, así como sus parámetros clave.

5.1 Instalación de Nextflow y Singularity

Requerimientos Previos

Nextflow es compatible con sistemas operativos Linux, macOS y Windows. Requiere Bash 3.2 o superior, así como Java 11 o superior. Puedes verificar tu versión de Java ejecutando el siguiente comando en la terminal:
java -version

5.2 Instalación de Nextflow

Para descargar e instalar Nextflow, ejecuta el siguiente comando en la terminal:

```
curl -s https://get.nextflow.io | bash
```

Este comando creará un ejecutable en el directorio actual. Para hacerlo ejecutable y moverlo a una ubicación en el PATH de tu sistema, ejecuta las siguientes líneas:

```
chmod +x nextflow
```

```
sudo mv nextflow /usr/local/bin
```

Confirmar que Nextflow se ha instalado correctamente ejecutando:

```
nextflow info
```

5.3 Instalación de Singularity

Para instalar la versión más reciente de Singularity, sigue estos pasos:

```
git clone https://github.com/singularityware/singularity.git
cdsingularity
./autogen.sh
./configure--prefix=/usr/local
make
sudo make install
```

5.4 Preparación de lecturas

Algunos programas del pipeline requieren que el nombre de archivos tenga cierta nomenclatura. Recomendamos el siguiente formato: nombre-muestra_1.fastq.gz; nombre-muestra_2.fastq.gz.

Para archivos fastq.gz de archivos illumina, podemos llegar a este formato ejecutando las siguientes líneas:

```
for f in *_S*_L001_R1_001.fastq.gz; do mv $f ${f%*_S*_L001_R1_001.fastq.gz}_1.fastq.gz; done
for f in *_S*_L001_R2_001.fastq.gz; do mv $f ${f%*_S*_L001_R2_001.fastq.gz}_2.fastq.gz; done
```

5.5 Uso de Cecret

Una vez instaladas todas las dependencias, puedes ejecutar el pipeline Cecret con el siguiente comando:

```
nextflow run UPHL-BioNGS/Cecret -profile singularity --reads directorio_con_lecturas
```

Al finalizar el pipeline, entre los archivos generados, destacan el archivo “cecret_results.csv” y las secuencias consenso de cada muestra, ubicadas en un directorio llamado “consensus”.

El archivo “cecret_results.csv” contiene información sobre la asignación de linaje, generada por el programa Pangolin, específicamente en la columna “pangolin_lineage”.

5.6 Análisis Posterior

Para realizar comparaciones con otras herramientas, las secuencias consenso pueden ser concatenadas en un único archivo usando el siguiente comando:

```
cat *.consensus.fa > nombre_archivo_concatenado
```

Este archivo concatenado puede utilizarse en plataformas para obtener información sobre linajes o mutaciones puntuales.

Herramientas Recomendadas

Para revisar linajes, puedes utilizar las siguientes herramientas web:

- Pangolin: <https://pangolin.cog-uk.io>
- Nextclade: <https://clades.nextstrain.org>

III. Generación de reportes

- Se generan reportes por centro médico, indicando el linaje de SARS-CoV-2 identificado.
- Se recomienda cargar las secuencias de las muestras en la base de datos GISAID, como repositorio para los datos obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Tosta S, Moreno K, Schuab G, et al. Global SARS-CoV-2 genomic surveillance: What we have learned (so far). *Infect Genet Evol.* 2023;108:105405. doi:10.1016/j.meegid.2023.105405
- Carter LL, Yu MA, Sacks JA, et al. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential 2022-2032. *Bull World Health Organ.* 2022;100(4):239-239A. doi:10.2471/BLT.22.288220
- RESVIGEN (Red Regional de Vigilancia Genómica de Virus Respiratorios) <https://www.paho.org/es/temas/influenza-sars-cov-2-vsr-otros-virus-respiratorios/resvigen-red-regional-vigilancia-genomica>
- Oróstica KY, Contreras S, Sanchez-Daza A, Fernandez J, Priesemann V, Olivera-Nappa Á. New year, new SARS-CoV-2 variant: Resolutions on genomic surveillance protocols to face Omicron. *Lancet Reg Health Am.* 2022;7:100203. doi:10.1016/j.lana.2022.100203
- Evaluación de la efectividad de la vacuna contra la COVID-19 en Chile, 2021 <https://www.paho.org/en/node/86651>
- Recomendaciones recolección y envío de muestras estudio genético SARS-CoV-2. Ordinario 2011 del 30.10.2020. Instituto de Salud Pública.
- Illumina, Inc. (2022). COVIDSeq Test.
- https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/Illumina-COVIDSeq-Test/illumina-covidseq-ruo-kits-reference-guide-1000000126053-08.pdf