

1 IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE SARS-CoV-2 MEDIANTE SECUENCIACIÓN
2 PLATAFORMA ILLUMINA.
3
4

5 **Autores:**
6

7 Paulo Covarrubias Pizarro
8 Jefe Laboratorio NGS
9 Sección Genética de Agentes infecciosos
10 Subdepto. Genómica y Genética Molecular
11 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
12

13 Andrés Castillo Ramírez
14 Jefe Sección Genética de Agentes infecciosos
15 Subdepto. Genómica y Genética Molecular
16 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
17

18 Bárbara Parra
19 Jefa Sección Genética Humana
20 Subdepto. Genómica y Genética Molecular
21 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
22

23 Jorge Fernández Ordenes
24 Jefe Subdepto. Genómica y Genética Molecular
25 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
26

27 Constanza Campano
28 Jefa Sección Bioinformática y Modelamiento Molecular
29 Subdepto. Genómica y Genética Molecular
30 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
31

32 Rodrigo Fasce Pineda
33 Jefe Subdepto Virología
34 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
35

36 Patricia Bustos
37 Jefe Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos
38 Departamento Biomédico Nacional y de Referencia
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

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

101 Regional de Vigilancia Genómica de Virus Respiratorios (RESVIGEN), que promueve
102 su implementación en diversos países. A nivel nacional, la vigilancia depende de una
103 red de detección homogénea a lo largo del territorio, que proporcione datos
104 representativos y que incluya la vigilancia en puntos críticos, como las entradas al país,
105 para monitorear la introducción de VOI y VOC. Esto exige una colaboración estrecha
106 entre diferentes instituciones para garantizar el funcionamiento óptimo de la vigilancia
107 genómica.

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

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

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

123

124

125

126

DESARROLLO

127

I. Toma de muestra

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

- 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).

- 148 • La muestra original (hisopado nasofaríngeo) debe transportarse refrigerada a
149 4°C o, si se trata de ARN, congelada en hielo seco, hasta el Laboratorio de
150 Vigilancia Genómica más cercano, idealmente en un plazo máximo de 36 horas
151 desde la toma de la muestra.

152

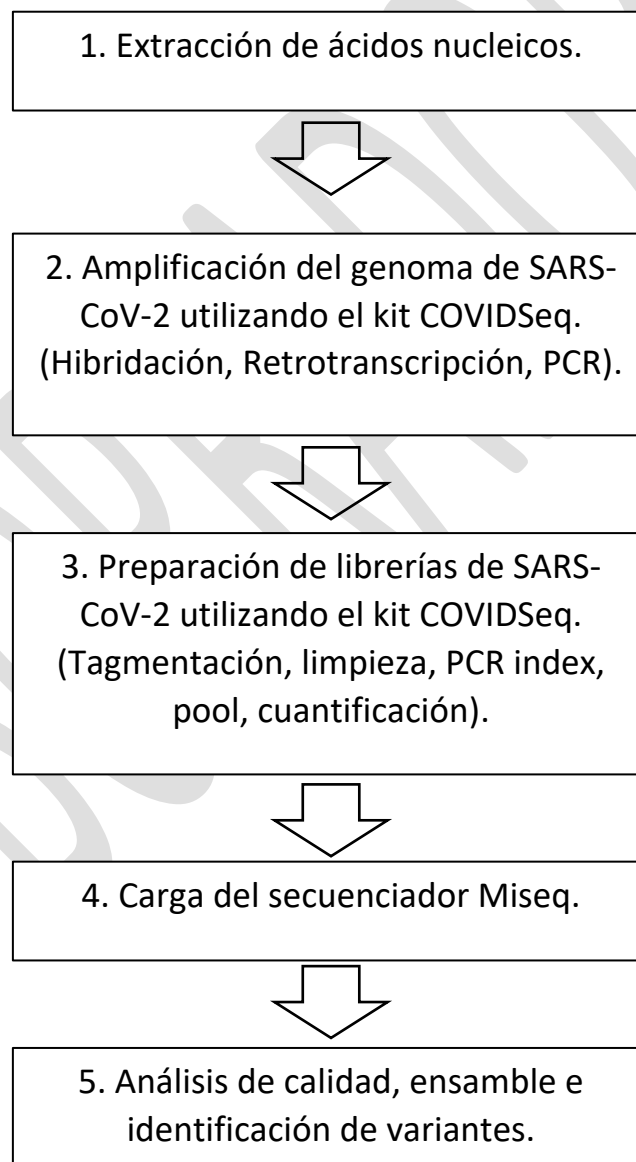
153 II. Procedimiento de secuenciación

154

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

159

160



161
162

1631. **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.**

164
165
166

167 En esta sección se describe el método de extracción automatizado por perlas magnéticas con el equipo Zybion, 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.

171

172 **Materiales, insumos y equipos**

- 173 - Kit Nucleic Acid Extraction Kit marca Zybion
- 174 - Equipo robot Zybion EXM 6000
- 175 - Tiras de 8 tubos para PCR
- 176 - Etanol al 70%
- 177 - Gasa o papel absorbente
- 178 - Mascarillas
- 179 - Pecheras desechables
- 180 - Micropipeta P200
- 181 - Micropipetas multicanal P20 y P200
- 182 - Puntas con filtro 20 y 200 μ L
- 183 - Gabinete de bioseguridad
- 184 - Placa 96 pocillos para PCR
- 185 - Tapas para placas de PCR
- 186 - Termociclador

187

188 **1.1 Preparación del área de trabajo pre-extracción**

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

194
195
196

197 **1.2 Carga de muestras (Trabajar en gabinete de bioseguridad con flujo encendido)**

- 198 - Vestir delantal celeste cirujano, pechera plástica, mascarilla N95 y doble par de guantes.
- 199 - Hacer vórtex a cada tubo con muestra clínica.
- 200 - Dispensar 180 μ L de Proteínasa K (viene en el kit) en cada pocillo de una tira de tubos de PCR.
- 201 - 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.
- 202 - Utilizando una pipeta multicanal de 20 μ L, cargar 15 μ L de Proteínasa K en cada pocillo de la placa "Extraction Reagent I".
- 203 - Humedecer una gasa con etanol y una gasa con hipoclorito de sodio al 0,5% antes de comenzar la carga de muestras.
- 204 - Agregar 190 μ L de muestra al pocillo que corresponda, sin homogeneizar para evitar la formación de aerosoles, utilizando una P200.

205
206
207
208
209
210
211

- 212 - Cuando se cargue una muestra, se limpia la micropipeta con etanol 70% (y con
213 otra gasa humedecida con solución de hipoclorito al 0,5 % si la micropipeta tome
214 contacto con una muestra).
- 215 - Una vez finalizada la carga de muestras en la placa “Extraction Reagent I”,
216 eliminar primer par de guantes en basurero dentro del gabinete y descartar
217 pechera plástica. Mantener bolsa con desechos dentro y encender la luz UV
218 durante al menos 15 minutos para inactivar virus previo a descontaminar el
219 gabinete.
- 220 - Cubrir la placa con papel aluminio y llevarla al robot.

221

222 1.3 Procesamiento de muestras en Robot

- 223 - Montar la placa con las muestras cargadas “Extraction Reagent I” en la posición
224 1 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda
225 (sticker de la placa mirando hacia afuera).
- 226 - Agitar la placa “Magnetic Beads Solution” para bajar los líquidos que pudieran
227 estar pegados en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar
228 en la posición 2 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior
229 izquierda (sticker de la placa mirando hacia afuera).
- 230 - Agitar la placa “Extraction Reagent II” para bajar los líquidos que pudieran estar
231 pegados en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar en la
232 posición 3 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior
233 izquierda (sticker de la placa mirando hacia afuera).
- 234 - Agitar la placa “Elution Buffer” para bajar los líquidos que pudieran estar pegados
235 en la tapa de aluminio. Retirar la tapa cuidadosamente y montar en la posición 5
236 del robot, cuidando que el pocillo A1 quede en la esquina inferior izquierda.
- 237 - Posicionar el capacho plástico dentro de la placa “Magnetic Beads Solution”,
238 posición 2.
- 239 - La posición 4 del robot queda desocupada.
- 240 - Revisar que todas las placas estén en la misma posición dentro del robot antes
241 de comenzar.
- 242 - Presionar el botón RUN en el menú para dar inicio al programa de extracción.

243

244 1.4 Traspaso y almacenamiento de los ácidos nucleicos

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

251

252

253

2542. Amplificación del genoma de SARS-CoV-2 utilizando el kit COVIDSeq.

255

256 Materiales, insumos y equipos

- 257 - Guantes
- 258 - Tubos para PCR 0,2 mL (DNase/RNase free) o placas de amplificación de 96
259 pocillos (DNase, RNase free)
- 260 - Tubos para PCR 1,5 mL (DNase/RNase free)
- 261 - Tubos de centrifuga 15 mL.
- 262 - Tubos para Qubit 0,6 mL

- 263 - Micropipetas P1000, P200, P100, P20, P10, P2, y Multicanal P200, P50, P10
- 264 - Puntas con filtro 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 50 μL , 20 μL , 10 μL , 2 μL (DNAse/
265 RNAse free)
- 266 - Gradilla magnética para placas o para microtubos
- 267 - Etanol grado biología molecular
- 268 - Agua grado biología molecular
- 269 - Tiras de 8 tubos de 0.2 mL o equivalente
- 270 - Equipo Qubit (Invitrogen)
- 271 - Qubit™ dsDNA HS Assay Kit para fluorímetro Qubit (Invitrogen)
- 272 - Illumina COVIDSeq Test (Illumina)
- 273 - IDT PCR Indexes for Illumina (Illumina)
- 274 - Termociclador
- 275 - Reservorios plásticos desechables
- 276 - Solución descontaminante de DNA (DNA-off® o similar)

277

278 Configurar los siguientes programas de termociclador:

279 1-Anneal:

- 280 ● Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 17 μL .
- 281 - 65°C por 3 minutos.
- 282 - 4°C por tiempo infinito

283 2-FSS:

- 284 ● Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 25 μL .
- 285 - 25°C por 5 minutos
- 286 - 50°C por 10 minutos
- 287 - 80°C por 5 minutos
- 288 - 4°C por tiempo infinito

289 3-PCR:

- 290 ● 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	∞	

291

292 4-TAG:

- 293 ● Configurar la tapa a 100°C y elegir un volumen de reacción de 50 μL .
- 294 - 55°C por 5 minutos.
- 295 - 10°C por tiempo infinito.

296

297 5-TAG PCR:

298

- 299 ● 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	∞	

300

301

302

303 **2.1 Hibridación del ARN**

304 Reactivos:

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

305

306 Procedimiento:

- 307 - En sala de preparación de mezcla de PCR, etiquetar una placa de 96 como
 308 placa de RT y añadir 8,5 µL de EPH a cada pocillo que se utilizará (usar una
 309 tira de 8 tubos y añadir 110 µL a cada pocillo para dispensar).
 310 - En sala de carga de ácidos de nucleicos, añadir 8,5 µl de muestras a cada
 311 pocillo,
 312 - Al control negativo de RT agregar 8,5 µL de agua
 313 - Tapar la placa, realizar vortex, spin por 10 segundos.
 314 - Llevar a termociclador con el programa de PCR "1-Anneal".
 315

316 **2.2 Transcripción reversa**

317

318 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.

319

320

321

322 Procedimiento:

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

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

325

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

332

333

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

336

337

338 2.3 PCR

339

340 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.

341

342 Procedimiento:

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

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
IPM	13,1 µL	1257,6 µL
CPP1 o CPP2	3,8µL	364,8 µL
H ₂ O (Refrigerador sala de preparación de mezcla de PCR)	4,1 µL	393,6 µL

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

353

354 Nota: Este es un punto seguro para detener el protocolo. Congelar la muestra y

355 conservar a -20° C y almacenar hasta por 3 días.

356

3573. Preparación de librerías de SARS-CoV-2 utilizando el kit COVIDSeq.

358 3.1 Tagmentación de los genomas amplificados de SARsS-CoV-2

359

360 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	

361

362 Procedimiento:

- 363 - Preparar la siguiente mezcla de reacción:

364

Reactivo	X1	X96 (1 placa)
TB1	12 µL	1152 µL
EBLTS	4 µL	384 µL
H ₂ O	20 µL	1920 µL

365

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

373 **3.2 Limpieza tagmentación**

374 Reactivos

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

375

376 **Procedimiento:**

377

378 - Spin por 10 segundos a la placa.

379 - Añadir 10 µl de ST2 a cada pocillo.

380 - Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundo, dejar incubar por 5 minutos a T° ambiente.

382 - Colocar en la gradilla magnética 3 minutos y luego descartar el sobrenadante.

383 - Limpieza de las perlas:

384 a- Remover placa de la gradilla magnética y añadir 100 µl de TWB a cada pocillo.

386 b- Tapar la placa, realizar vortex, spin de 10 segundos.

387 c- Colocar la placa en la gradilla magnética durante 3 minutos

388 c- Remover el sobrenadante y repetir el lavado (2 lavados total)

389 - En el segundo lavado dejar la placa en la gradilla magnética junto con el TWB y no descartar hasta más adelante.

391

392 **3.3 PCR Index**

393 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	

394

395 - Preparar la siguiente mezcla de reacción:

396

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

397

398

399 Procedimiento:

- 400 - Con la placa en la gradilla magnética descartar el TWB.
- 401 - Remover remanentes de TWB con punta de 20 o 50 µl.
- 402 - Remover la placa de la gradilla magnética y añadir 40 µl de mix a cada pocillo.
- 403 - Añadir 10 µl del index correspondiente a cada pocillo.
- 404 - Tapar la placa, realizar vortex, spin por 10 segundos.
- 405 - Llevar al termociclador con el programa de PCR "5-TAG PCR".

406

407 3.4 Limpieza librería y Pool

408

409 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

410

411

Procedimiento:

412

413

- 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:

$$\text{N}^\circ \text{muestras} \times 5 \times 0,9 = \mu\text{l de ITB}$$

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

- 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.

441 3.5 Cuantificación librería

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

445

446

447

Procedimiento:

- 448 - Preparar una solución de trabajo diluyendo 1:200 Qubit dsDNA HS Reagent en
449 Qubit dsDNA HS Buffer (1 de fluoróforo:199 Buffer), por cada muestra.
450 - Cargar 190 µL de solución de trabajo en 2 tubos para los estándares y agregar
451 10 µL de cada estándar de ADN (0, 100 ng/µL).
452 - Cargar 198 µL de la solución de trabajo a cada microtubo de acuerdo con el
453 número de muestras a analizar y añadir 2 µL de muestra.
454 - Hacer vórtex e incubar a T° ambiente, protegido de la luz, por un mínimo de 2
455 min (evitar la exposición a la luz).
456 - Medir la fluorescencia usando el Fluorímetro Qubit (Invitrogen).

457

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

459

460 4. Carga de las librerías en secuenciador Miseq

461

462 Materiales, insumos y equipos

- 463 - H2O Grado biología molecular
464 - Guantes
465 - Tubos para PCR 1,5 mL (DNase, RNase free)
466 - Micropipetas P1000, P200, P100, P20, P10, P2
467 - Puntas con filtro 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 50 µL, 20 µL, 10 µL, 2 µL (DNase,
468 RNase free)
469 - NaOH 1 N
470 - PhiX 10 nM, Illumina, catalog # FC-110-3002
471 - HT1 (Hybridation Buffer)
472 - PhiX 20 pM
473 - MiSeq
474 - Termoblock

475

476 Antes de comenzar:

- 477 - Descongelar el cartucho de Miseq Reagent Kits V2 en agua hasta donde indica
478 la línea demarcada por lo menos 90 minutos antes de usarse o dejar
479 descongelando a 4°C toda la noche.
480 - Encender el termobloque a 96°C.
481 - Chequear tener alícuotas de NaOH 1N, si no revisar preparación en **sección 5**
482 - Chequear tener alícuotas de PhiX 20 pM, si no revisar preparación en **sección**
483 **6.**
484 - Tener una gradilla refrigerada a -20°C.
485 - Chequear que el equipo tenga sobre 25% de su disco duro libre.

486

487

488 **4.1 Preparación de alícuotas de trabajo control NaOH 1N**

- 489 - Preparar NaOH 1N, luego homogeniza y spin
490

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

- 491 - Generar alícuotas de 100 μL de librería de NaOH 1N y guardar a -20°C para
492 evitar cambio de pH.
493

494 **4.2 Preparación alícuotas de trabajo control PhiX 20 pM**

495

- 496 - Preparar PhiX 4 nM, luego homogenizar, spin y dejar a T^o ambiente
497

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

498

- 499 - Preparación PhiX 20 pM, el NaOH se debe preparar antes de usar, como se
500 indica en la **sección**
501

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

502

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

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

509

510

511 **4.3 Preparación de la librería para cargar en Miseq**

512 Preparación librería 2nM

- 513 - Preparar la librería a una concentración de 2 nM, ingresando los valores de
 514 concentración obtenidos de la cuantificación con Qubit y el tamaño de la
 515 librería (310 pb) en la siguiente fórmula:
 516

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

517

518 Preparación PhiX 12,5 pM

519

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

Reactivo	Volumen μL
PhiX 20 pM (Frío)	37,5
HT1 (Frío)	22,5
Total	60 PhiX 12,5 pM)

522

523

524 **4.4 Denaturación librería MiSeq**

525

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

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

530

- 531 - Preparar librería 10 pM, luego homogenizar por vortex, spin y luego mantener
 532 en hielo.
 533

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

534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547

- 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	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL
Total (Frío)	600 μL	600 μL	600 μL	600 μL	600 μL

548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562

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 H_2O 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.

- 563
- 564
- Vaciar la botella de desechos del equipo y colocar la botella de buffer que viene junto a la flowcell en el equipo.
- 565
- 566
- Sacar el cartucho del agua y verificar que esté todo descongelado, de ser así, sacar el cartucho y secarlo.
- 567
- 568
- Con una punta de 1000 µL perforar la posición 17 destacada en naranja (Load sample).
- 569
- 570
- Cargar 600 µL de la librería preparada y colocar el cartucho en el equipo
- 571
- 572
- Esperar que el equipo pase la prueba de todos los parámetros y decirle que comience.

573

574

575 **5. Análisis de calidad, ensamble e identificación de variantes**

576

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

582 **5.1 Instalación de Nextflow y Singularity**

583 **Requerimientos Previos**

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

```
587 java -version
```

588 **5.2 Instalación de Nextflow**

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

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

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

```
593 chmod +x nextflow
```

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

595 Confirmar que Nextflow se ha instalado correctamente ejecutando:

```
596 nextflow info
```

597

598

599

600

601 **5.3 Instalación de Singularity**

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

603 `git clone https://github.com/singularityware/singularity.git`

```
604 cd singularity
605 ./autogen.sh
606 ./configure --prefix=/usr/local
607 make
608 sudo make install
```

609

610 **5.4 Preparación de lecturas**

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

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

```
616 for f in *_S*_L001_R1_001.fastq.gz; do mv $f
617 ${f%*_S*_L001_R1_001.fastq.gz}_1.fastq.gz; done
618 for f in *_S*_L001_R2_001.fastq.gz; do mv $f
619 ${f%*_S*_L001_R2_001.fastq.gz}_2.fastq.gz; done
```

620

621

622 **5.5 Uso de Cecret**

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

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

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

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

631

632 **5.6 Análisis Posterior**

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

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

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

638

639 **Herramientas Recomendadas**

640 Para revisar linajes, puedes utilizar las siguientes herramientas web:

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

643

644 **III. Generación de reportes**

645

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

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713

- 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