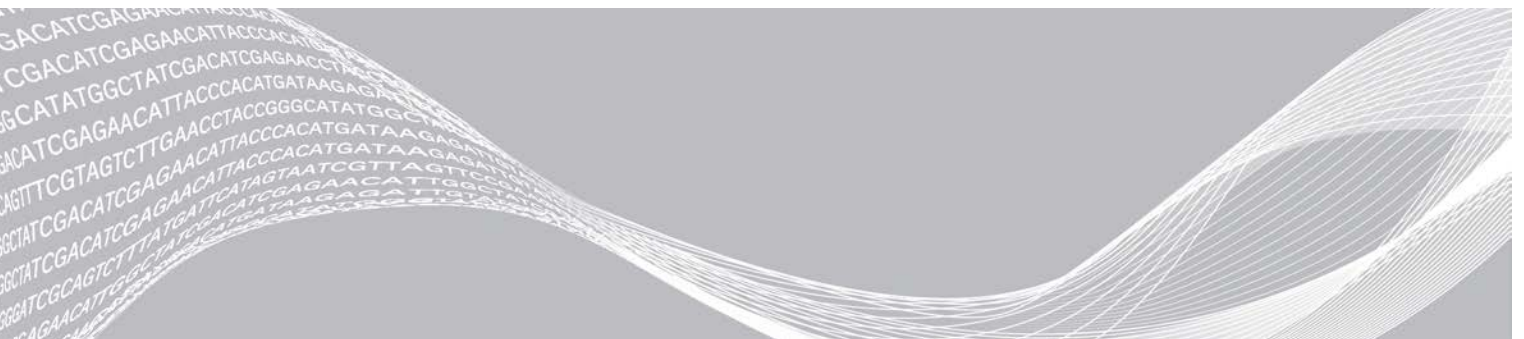


Kits de Illumina COVIDSeq RUO

Guía de referencia



Este documento y su contenido son propiedad exclusiva de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000126053 v06	Julio de 2021	<p>Información añadida para la compatibilidad con el sistema iSeq 100 sobre temas relevantes, incluidas las secciones Presentación, Agrupación y dilución de bibliotecas y Preparación para la secuenciación.</p> <p>Información sobre la hoja de muestras de Illumina COVIDSeq Test (RUO) pasada al apéndice.</p> <p>Convenciones actualizadas en materia de nomenclatura para Illumina COVIDSeq Assay y configuraciones del kit para reflejar el uso actual en el mercado.</p> <p>Reorganización de la sección Preparación para la secuenciación, para una mejor facilidad de uso.</p> <p>Eliminación de la información repetitiva sobre consumibles de secuenciación de la sección Preparación para la secuenciación.</p> <p>La información permanece en la lista Consumibles y Equipo en un apéndice.</p>
N.º de documento 1000000126053 v05	Junio de 2021	<p>Se ha renombrado el documento Guía de referencia de los kits Illumina COVIDSeq RUO para explicar el uso con 96-sample Illumina COVIDSeq Assay.</p> <p>Información añadida para 96-sample Illumina COVIDSeq Assay en las secciones Presentación, Extracción de ADN, Agrupación y limpieza de bibliotecas, Agrupación y dilución de bibliotecas y Preparación para la secuenciación.</p> <p>Información añadida para la compatibilidad con los sistemas de secuenciación MiSeq y MiniSeq en las secciones Presentación, Agrupación y dilución de bibliotecas y Preparación para la secuenciación.</p> <p>Adición de una nueva sección llamada Contenido del kit en el Apéndice A para 96-sample Illumina COVIDSeq Assay.</p> <p>Instrucciones de preparación de COVIDSeq Positive Control (CPC) pasadas a un nuevo Apéndice B y actualizadas para Illumina COVIDSeq Assay.</p>
N.º de documento 1000000126053 v04	Abril de 2021	<p>Se ha añadido información sobre opciones de software de análisis de variantes en las secciones Introducción y Preparación para la secuenciación.</p> <p>Se ha añadido la referencia a la nota técnica para la preparación de bibliotecas varias veces para un tamaño de lote de baja productividad.</p> <p>Se ha actualizado el Illumina COVIDSeq Test (3072 samples) de una configuración de ocho cajas a una configuración de cuatro cajas en la sección Contenido del kit.</p> <p>Se han actualizado las recomendaciones de longitud de lectura en la sección Preparación para la secuenciación.</p> <p>Se han actualizado las recomendaciones de ciclador térmico para la confirmación de la compatibilidad de placa de microtitulación.</p>

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000126053 v03	Febrero de 2021	<p>Se han añadido instrucciones para la configuración del análisis en BaseSpace Sequence Hub para NextSeq 2000 y otra información específica de NextSeq 2000 en el protocolo.</p> <p>Se han añadido recomendaciones del ciclador térmico.</p> <p>Se han actualizado los números de referencia de materiales, consumibles y equipos en las secciones Preparación para la secuenciación, Componentes del producto y Consumibles y equipos, y se han añadido nuevos consumibles para NextSeq 2000.</p> <p>Se han actualizado los números de versión de las celdas de flujo y el software de control del sistema NovaSeq 6000.</p> <p>Se ha actualizado el tubo para Dilución 3 en Extracción del ARN a tubo LoBind de 5 ml.</p> <p>Se han actualizado las opciones del protocolo para el procedimiento de Quick-DNA/RNA Viral MagBead para mayor precisión y claridad.</p> <p>Se ha actualizado la temperatura en el programa de PCR en el ciclador térmico del apartado Preparación de Amplificación del ADNc para pasar de 65 °C a 63 °C.</p>
N.º de documento 1000000126053 v02	Julio de 2020	<p>Se han añadido instrucciones sobre la extracción de ARN con el Quick-DNA/RNA Viral Magbead kit.</p> <p>Se ha añadido un punto de detención seguro después de la agrupación y la limpieza de las bibliotecas.</p> <p>Se han actualizado las configuraciones de los kits de índices para el IDT for Illumina-PCR Indexes.</p> <p>Se han eliminado las instrucciones de secuenciación.</p> <p>Se han añadido instrucciones para la preparación de la dilución y la secuenciación en la celda de flujo SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000, el sistema de secuenciación NextSeq 500, el sistema de secuenciación NextSeq 550 y el instrumento NextSeq 550Dx.</p> <p>La información acerca de los análisis de datos se ha trasladado a la <i>Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline Software Guide</i>, n.º de documento 1000000128122.</p>
N.º de documento 1000000126053 v01	Junio de 2020	Ningún cambio en el contenido.
N.º de documento 1000000126053 v00	Junio de 2020	Publicación inicial.

Índice

Historial de revisiones	iii
Capítulo 1 Descripción general	1
Introducción	1
Recomendaciones de entrada	2
Capítulo 2 Preparación de bibliotecas	3
Introducción	3
Sugerencias y técnicas	4
Extracción del ARN	5
Alineación del ARN	6
Síntesis de ADNc de la primera cadena	7
Amplificación del ADNc	8
Tagmentación de amplicones PCR	9
Limpieza tras la tagmentación	10
Amplificación de los amplicones fragmentados por tagmentación	11
Agrupación y limpieza de las bibliotecas	13
Cuantificación y normalización de bibliotecas	15
Agrupación y dilución de bibliotecas	15
Preparación para la secuenciación	16
Apéndice A Información de apoyo	20
Contenido del kit Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)	20
Contenido del kit Illumina COVIDSeq Test (RUO) (3072 Samples)	21
Consumibles y equipos	23
Apéndice B Preparación de COVIDSeq Positive Control	27
Preparación de COVIDSeq Positive Control	27
Apéndice C Hoja de muestras de Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline	30
Requisitos de la hoja de muestras	30
Asistencia técnica	32

Capítulo 1 Descripción general

Introducción	1
Recomendaciones de entrada	2

Introducción

En esta guía, se explica cómo detectar el virus SARS-CoV-2 usando uno de los dos kits para uso exclusivo en investigación: Illumina COVIDSeq Test (RUO) o Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples). Illumina COVIDSeq Test permite procesar muestras para una secuenciación de alto rendimiento (HT), mientras que Illumina COVIDSeq Assay está orientado a poder procesar muestras para una secuenciación de bajo rendimiento (LT).

Illumina COVIDSeq Test ofrece la preparación de hasta 3072 muestras con el sistema de secuenciación NovaSeq 6000 o hasta 384 muestras con los sistemas de secuenciación NextSeq 500/550, el instrumento NextSeq 550Dx en modo de investigación o el sistema de secuenciación NextSeq 2000. Illumina COVIDSeq Assay ofrece la preparación de hasta 96 muestras con el sistema de secuenciación iSeq 100, el sistema de secuenciación MiSeq o el sistema de secuenciación MiniSeq. En la [Tabla 1](#) se muestran algunas de las diferencias entre estas dos opciones de kit.

Tabla 1 Comparación de las opciones del kit Illumina COVIDSeq (RUO)

Nombre del kit	Samples (Muestras)	Sistemas recomendados	Índices	Control positivo
Illumina COVIDSeq Test (RUO)	Hasta 3072	NovaSeq 6000, NextSeq 500/550, Next Seq 550Dx en modo RUO, o NextSeq 2000	No incluidos	Incluidos
Illumina COVIDSeq Assay	Hasta 96	iSeq 100, MiSeq, o MiniSeq	Incluido	No incluido

Tanto Illumina COVIDSeq Test (RUO) como Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) permiten:

- ▶ Extracción de ARN de muestras descontaminadas obtenidas mediante hisopado nasofaríngeo (NP, nasopharyngeal), orofaríngeo (OP, oropharyngeal) y nasal, así como de muestras del cornete nasal medio obtenidas de personas que cumplen los criterios clínicos o epidemiológicos de la COVID-19, con un kit de extracción de ARN. Los kits recomendados incluyen el minikit QIAamp Viral RNA y el kit Quick-DNA/RNA Viral Magbead.
- ▶ Detección cualitativa del ARN del SARS-CoV-2 con el uso del proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test localmente o con la aplicación Illumina DRAGEN COVIDSeq Test en BaseSpace Sequence Hub.

Ambos kits permiten la vigilancia de características del genoma del virus SARS-CoV-2 mediante el proceso DRAGEN COVID con las herramientas COVID Lineage Tools localmente o con la aplicación DRAGEN COVID Lineage en BaseSpace Sequence Hub.

Recomendaciones de entrada

La prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO) e Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) permiten analizar muestras de pacientes obtenidas mediante hisopado nasofaríngeo (NP, nasopharyngeal), orofaríngeo (OP, oropharyngeal) y nasal. El transporte de las muestras debe efectuarse conforme a la normativa aplicable al transporte de agentes etiológicos en su región.

Conserve las muestras de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los tubos para el transporte de muestras. Superar los tiempos de almacenamiento podría afectar negativamente a los resultados de la prueba.

Los siguientes factores de la muestra podrían afectar a la detección del SARS-CoV-2:

- ▶ Métodos de recogida de muestras, factores del paciente y/o la etapa de la infección.
- ▶ Degradación del ARN viral durante el transporte y el almacenamiento. La degradación del ARN puede producir resultados falsos negativos.



PRECAUCIÓN

Manipule todas las muestras como reactivos infecciosos.

Capítulo 2 Preparación de bibliotecas

Introducción	3
Sugerencias y técnicas	4
Extracción del ARN	5
Alineación del ARN	6
Síntesis de ADNc de la primera cadena	7
Amplificación del ADNc	8
Tagmentación de amplicones PCR	9
Limpieza tras la tagmentación	10
Amplificación de los amplicones fragmentados por tagmentación	11
Agrupación y limpieza de las bibliotecas	13
Cuantificación y normalización de bibliotecas	15
Agrupación y dilución de bibliotecas	15
Preparación para la secuenciación	16

Introducción

En este capítulo se describe la preparación de bibliotecas con el uso o bien de la prueba Illumina COVIDSeq Test o bien de Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples).

- ▶ Compruebe el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los consumibles y equipos necesarios. Consulte *Información de apoyo* en la página 20.



NOTA

Los reactivos en el kit Illumina COVIDSeq Test (RUO) incluyen HT en la etiqueta para indicar su uso para una secuenciación de alto rendimiento. Los reactivos de Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) no lo incluyen.

- ▶ Siga los protocolos en el orden mostrado, con los volúmenes y los parámetros de incubación que se especifiquen.
- ▶ Asegúrese de que los reactivos no estén caducados. El uso de reactivos caducados podría afectar negativamente al rendimiento.
- ▶ Cuando use Illumina COVIDSeq Test (RUO) con fines de detección, incluya un control sin cadena molde (NTC, no template control) y un control positivo por cada placa de 96 pocillos. COVIDSeq Positive Control (CPC) viene incluido en Illumina COVIDSeq Test (RUO). Consulte *Preparación de COVIDSeq Positive Control* en la página 27 para ver las instrucciones sobre preparación.
- ▶ Para Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples), o cuando use Illumina COVIDSeq Test (RUO) con fines de seguimiento, se recomiendan un NTC y un control positivo para el control de calidad, pero no son obligatorios. Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) no incluye un control positivo; si lo necesita, puede adquirirlo por separado.
- ▶ Si realiza la preparación de bibliotecas varias veces con la prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO), consulte la Nota técnica de Illumina *Procedimiento de preparación de alícuotas para los reactivos del Illumina COVIDSeq Test Kit (versión RUO)*.
- ▶ No permita varios ciclos de congelación y descongelación del reactivo CPC. Si realiza la preparación de bibliotecas varias veces, ponga una parte alícuota de CPC en tubos de baja unión y, a continuación, almacénelo a una temperatura entre -85 °C y -65 °C.
- ▶ Para el resto de reactivos aparte del CPC, no permita más de ocho ciclos de congelación y descongelación.

- ▶ Secuencie las bibliotecas lo antes posible tras la agrupación. Las bibliotecas agrupadas son estables durante un periodo máximo de 30 días a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C.

Sugerencias y técnicas

A menos que se haya especificado un punto de detención seguro en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

Evitar la contaminación

- ▶ Siga prácticas de laboratorio adecuadas para evitar la contaminación de nucleasas y productos de PCR. La contaminación de nucleasas y productos del PCR puede causar resultados poco precisos y fiables.
- ▶ Realice la preparación de bibliotecas en un entorno sin ARNasa/ADNasa. Descontamine a fondo las áreas de trabajo con una solución que inhiba la ARNasa/ADNasa, como RNaseZap y DNAZap.
- ▶ Use puntas y materiales de laboratorio consumibles nuevos entre las dispensaciones de reactivos y muestras.
- ▶ Use puntas resistentes a los aerosoles para reducir el riesgo de contaminación cruzada residual y entre muestras.
- ▶ Dado que existe posibilidad de contaminación, extreme las precauciones para asegurarse de que el contenido permanece íntegramente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido.
- ▶ No rocíe con aerosol de lejía cuando lleve a cabo la preparación de bibliotecas. La contaminación por rastros de lejía puede provocar un error en el ensayo.
- ▶ Use un flujo de trabajo unidireccional cuando pase de entornos de preamplificación a otros de posamplificación.
- ▶ Se recomienda utilizar uno o más controles sin cadena (NTC) por placa para supervisar la contaminación.

Colocación y retirada de la junta en el plato

- ▶ Selle siempre la placa de 96 pocillos antes de llevar a cabo los siguientes pasos del protocolo:
 - ▶ Agitación
 - ▶ Agitación vorticial
 - ▶ Centrifugado
 - ▶ Termociclado
- ▶ Para sellar la placa, aplíquela la cubierta adhesiva y después la junta con un rodillo de goma o una cuña.
- ▶ Asegúrese de que los bordes y los pocillos estén completamente sellados para reducir el riesgo de contaminación cruzada y evaporación.
- ▶ Los sellos adhesivos Microseal "B" son eficaces con un rango de temperatura entre -40 °C y 110 °C, además de ser aptos para placas de PCR con bordes o semibordes. Utilice los sellos Microseal "B" para la agitación, el centrifugado y el almacenamiento a largo plazo.
- ▶ Antes de retirar la junta:
 - ▶ Centrifugue brevemente la placa de 96 pocillos a 1000 × g durante 1 minuto. Para los pasos con bolas, centrifugue a 500 × g durante 1 minuto.
 - ▶ Coloque la placa en una superficie plana antes de quitar lentamente la junta.

Transferencias de placa

- ▶ Cuando transfiera volúmenes entre placas, transfiera el volumen especificado desde cada pocillo de una placa al pocillo correspondiente de la otra placa.
- ▶ Si se aspiran las bolas con las puntas de las pipetas, dispénelas en la placa con el soporte magnético y espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos).

Centrifugado

- ▶ Centrifugue lo que sea necesario en cada paso del procedimiento para consolidar el líquido o las bolas en el fondo del pocillo, además de para evitar pérdidas de la muestra.

Manipulación de las bolas

- ▶ Pipetee la suspensión de bolas poco a poco para evitar las salpicaduras y las burbujas.
- ▶ Cuando mezcle, hágalo bien.
- ▶ Para evitar la pérdida de muestras, confirme que ninguna bola permanece en las puntas de las pipetas tras los pasos de resuspensión y mezcla.
- ▶ Cuando lave las bolas:
 - ▶ Use el imán adecuado para la placa.
 - ▶ Dispense el líquido de manera que se humedezcan las bolas del lateral de los pocillos.
 - ▶ Mantenga la placa en el imán hasta que las instrucciones especifiquen que la retire.
 - ▶ No agite la placa mientras esté en el soporte magnético. No altere el pellet de bolas.

Extracción del ARN

Este paso extrae ARN de tubos de medio de transporte viral descontaminados. Puede extraer ARN utilizando Quick-DNA/RNA Viral MagBead, Zymo Research, n.º de referencia R2141 o QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, n.º de referencia 52906. Siga el procedimiento correspondiente a su método de extracción.

Si tiene pensado utilizar COVIDSeq Positive Control, siga el procedimiento de preparación necesario que se muestra en *Preparación de COVIDSeq Positive Control en la página 27*.

Consumibles

- ▶ [QIAamp Viral RNA Mini Kit] 1.7 ml LoBind tubes
- ▶ [Quick-DNA/RNA Viral MagBead] 2000 µl 96 deep well plate

Procedimiento de Quick-DNA/RNA Viral MagBead

- 1 Para cada muestra, añada 400 µl de muestra del paciente en una nueva placa de pocillos profundos. Si planea utilizar controles, incluya un tubo de dilución de 3 CPC (control positivo) y ELB (control sin cadena molde) por lote de muestras.
- 2 Para extraer ARN, utilice Quick-DNA/RNA Viral MagBead. Para obtener información, consulte el *Manual de instrucciones de Quick-DNA/RNA Viral MagBead* de Zymo Research. Use las siguientes opciones del protocolo:
 - ▶ Antes de añadir MagBinding Beads, pipetee arriba y abajo diez veces para mezclar.
 - ▶ Después de añadir 20 µl de MagBinding Beads, pipetee arriba y abajo diez veces para mezclar y luego agite a 1500 rpm durante 10 minutos.

Procedimiento del QIAamp Viral RNA Mini Kit

- 1 Por cada muestra, añada 140 µl de muestra del paciente a un nuevo tubo de microcentrifugado de 1,7 ml.
Si planea utilizar controles, incluya un tubo de dilución de 3 CPC (control positivo) y ELB (control sin cadena molde) por lote de muestras.
- 2 Para extraer ARN, utilice QIAamp Viral RNA Mini Kit. Para obtener información, consulte *QIAamp Viral RNA Mini Handbook* (n.º de documento HB-0354-006) disponible en la página web de QIAGEN.
Use las siguientes opciones del protocolo:
 - ▶ Purifique el ARN viral usando el protocolo de centrifugado.
 - ▶ Incube la elución durante al menos 1 minuto.
 - ▶ Eluya en un tampón AVE de 30 µl en vez de 60 µl.

Alineación del ARN

Durante este proceso, el ARN extraído se alinea mediante hexámeros aleatorios para preparar la síntesis de ADNc.

Si tiene pensado utilizar COVIDSeq Positive Control, pero todavía no ha preparado el control, siga el procedimiento necesario que se muestra en *Preparación de COVIDSeq Positive Control* en la página 27.

Consumibles

- ▶ EPH3 (mezcla 3HC de elución, cebado y fragmentación)
- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos
- ▶ Sellos adhesivos Microseal "B"

Acerca de los reactivos

- ▶ Agite en vórtice antes de cada uso

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
EPH3	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente y después invierta para mezclar.

- 2 Guarde el siguiente programa de alineación de COVIDSeq en el ciclador térmico:
 - ▶ Seleccione la opción de tapa precalentada.
 - ▶ Defina el volumen de la reacción en 17 µl.
 - ▶ 65 °C durante 3 minutos.
 - ▶ Mantenga la temperatura a 4 °C.

Procedimiento

- 1 Etiquete la nueva placa de PCR como CDNA1.
- 2 Añada 8,5 µl de EPH3 en cada pocillo.
- 3 Añada 8,5 µl de muestra eluida en cada pocillo.
- 4 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.

- 5 Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
- 6 Coloque en el ciclador térmico preprogramado y lleve a cabo el programa de alineación de COVIDSeq.

Síntesis de ADNc de la primera cadena

En este paso, se realiza una transcripción inversa de los fragmentos de ARN cebados con hexámeros aleatorios en el ADNc de la primera cadena mediante la transcriptasa inversa.

Consumibles

- ▶ FSM (Mezcla de la primera cadena)
- ▶ RTV (Transcriptasa inversa)
- ▶ Tubos de 1,7 ml (1 por cada placa de muestras de 96 pocillos)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
FSM	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele hasta que alcance la temperatura ambiente. Invierta para mezclar el contenido y luego mantenga en hielo.
RVT	Entre -25 °C y -15 °C	Invierta para mezclar antes de su uso. Mantenga en hielo.

- 2 Guarde el siguiente programa FSS de COVIDSeq en el ciclador térmico:
 - ▶ Seleccione la opción de tapa precalentada.
 - ▶ Defina el volumen de la reacción en 25 µl.
 - ▶ 25 °C durante 5 minutos.
 - ▶ 50 °C durante 10 minutos.
 - ▶ 80 °C durante 5 minutos.
 - ▶ Mantenga la temperatura a 4 °C.

Procedimiento

- 1 En un tubo de 1,7 ml, combine los siguientes volúmenes para preparar mezcla maestra de ADNc de la primera cadena. Multiplique cada volumen por el número de muestras.
 - ▶ FSM (9 µl)
 - ▶ RVT (1 µl)

Se incluye excedente de reactivos para tener en cuenta los pequeños errores de pipeteo.
- 2 Añada 8 µl de mezcla maestra en cada pocillo de la placa CDNA1.
- 3 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- 4 Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
- 5 Coloque en el ciclador térmico preprogramado y lleve a cabo el programa FSS de COVIDSeq.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de siete días como máximo.

Amplificación del ADNc

Este paso utiliza dos reacciones de PCR independientes para amplificar el ADNc.

Consumibles

- ▶ IPM (Mezcla de PCR de Illumina)
- ▶ CPP1 (Grupo del cebador 1 de COVIDSeq)
- ▶ CPP2 (Grupo del cebador 2 de COVIDSeq)
- ▶ Agua sin nucleasas
- ▶ Tubo de 15 ml (2 por cada cuatro placas de muestras de 96 pocillos)
- ▶ Placas de PCR de 96 pocillos (2)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
CPP1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
CPP2	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
IPM	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente y después invierta para mezclar. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.

- 2 Guarde el siguiente programa PCR de COVIDSeq en el ciclador térmico:

- ▶ Seleccione la opción de tapa precalentada.
- ▶ Defina el volumen de la reacción en 25 µl.
- ▶ 98 °C durante 3 minutos
- ▶ 35 ciclos de:
 - ▶ 98 °C durante 15 segundos
 - ▶ 63 °C durante 5 minutos
- ▶ Mantenga la temperatura a 4 °C.

Procedimiento

- 1 Etiquete dos nuevas placas de PCR como COV1 y COV2.
Las placas representan dos reacciones PCR independientes en cada muestra y un control en la placa CDNA1.
- 2 En un tubo de 15 ml, combine los siguientes volúmenes para preparar la mezcla maestra PCR 1 de COVIDSeq y la mezcla maestra PCR 2 de COVIDSeq. Multiplique cada volumen por el número de muestras.
Se incluye excedente de reactivos para tener en cuenta los pequeños errores de pipeteo.

Reactivo	Mezcla maestra PCR 1 de COVIDSeq (µl)	Mezcla maestra PCR 2 de COVIDSeq (µl)
IPM	15	15
CPP1	4,3	N/D
CPP2	N/D	4,3
Agua sin nucleasas	4,7	4,7

- 3 Añada 20 µl de mezcla maestra PCR 1 de COVIDSeq a cada pocillo de la placa COV1 correspondiente a cada pocillo de la placa CDNA1.
- 4 Añada 5 µl de Síntesis de ADNc de la primera cadena de cada pocillo de la placa CDNA1 al pocillo correspondiente de la placa COV1.
- 5 Añada 20 µl de mezcla maestra PCR 2 de COVIDSeq a cada pocillo de la placa COV2 correspondiente a cada pocillo de la placa CDNA1.
- 6 Añada 5 µl de Síntesis de ADNc de la primera cadena de cada pocillo de la placa CDNA1 al pocillo correspondiente de la placa COV2.
- 7 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- 8 Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
- 9 Coloque en el ciclador térmico preprogramado y lleve a cabo el programa PCR de COVIDSeq.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, selle la placa y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de tres días como máximo.

Tagmentación de amplicones PCR

En este paso, se usa EBLTS para la tagmentación de amplicones PCR, que es un proceso que fragmenta y etiqueta los amplicones PCR con secuencias del adaptador.

Consumibles

- ▶ EBLTS (BLT de enriquecimiento)
- ▶ TB1 (Tampón de tagmentación 1)
- ▶ Agua sin nucleasas
- ▶ Tubo de 1,7 ml
- ▶ Tubo de 15 ml (1 por cada cuatro placas de muestras de 96 pocillos)
- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

Acerca de los reactivos

- ▶ Almacene el EBLTS en posición vertical a temperaturas por encima de los 2 °C. Asegúrese de que las bolas estén siempre sumergidas en el tampón.
- ▶ Si las bolas están adheridas al lateral o a la parte superior de la placa de 96 pocillos, centrifugue a 500 × g durante 1 minuto y después pipetee para resuspender.

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
EBLTS	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice bien antes de su uso.
TB1	Entre -25 °C y -15 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice bien antes de su uso.

- 2 Si las placas COV1 y COV2 se almacenaron congeladas, prepare de la siguiente manera.

- a Descongele a temperatura ambiente.
- b Compruebe el sello y después agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- c Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.

- 3 Guarde el siguiente programa TAG de COVIDSeq en el ciclador térmico:

- ▶ Seleccione la opción de tapa precalentada.
- ▶ Defina el volumen de la reacción en 50 µl.
- ▶ 55 °C durante 5 minutos.
- ▶ Mantenga la temperatura a 10 °C.

Procedimiento

- 1 Etiquete una nueva placa de PCR como TAG1.
- 2 Combine COV1 y COV2 de la siguiente manera.
 - a Transfiera 10 µl de cada pocillo de la placa COV1 al pocillo correspondiente de la placa TAG1.
 - b Transfiera 10 µl de cada pocillo de la placa COV2 a cada pocillo de la placa TAG1 que contenga COV1.
- 3 En un tubo de 15 ml, combine los siguientes volúmenes para preparar mezcla maestra de tagmentación. Multiplique cada volumen por el número de muestras.
 - ▶ TB1 (12 µl)
 - ▶ EBLTS (4 µl)
 - ▶ Agua sin nucleasas (20 µl)
- 4 Añada 30 µl de mezcla maestra en cada pocillo de la placa TAG1.
- 5 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- 6 Coloque en el ciclador térmico preprogramado y lleve a cabo el programa TAG de COVIDSeq.

Limpieza tras la tagmentación

En este paso, se lavan los amplicones etiquetados con adaptadores antes de la amplificación PCR.

Consumibles

- ▶ ST2 (Tampón de tagmentación de parada 2)
- ▶ TWB (Tampón de lavado de tagmentación)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

Acerca de los reactivos

- ▶ Dispense el ST2 y el TWB poco a poco para minimizar la formación de espuma.
- ▶ Dispense el TWB directamente sobre las bolas.

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
ST2	Temperatura ambiente	Agite en vórtice antes de su uso.
TWB	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice antes de su uso.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa TAG1 a 500 × g durante 1 minuto.
- 2 Añada 10 µl de ST2 en cada pocillo de la placa TAG1.
- 3 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- 4 Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Centrifugue a 500 × g durante 1 minuto.
- 6 Coloque en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (aproximadamente 3 minutos).
- 7 Compruebe que no haya burbujas en el sello. Si las hay, centrifugue a 500 × g durante 1 minuto y después coloque en el soporte magnético (aproximadamente 3 minutos).
- 8 Retire y deseche todo el sobrenadante.
- 9 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Retire de la placa magnética.
 - b Añada 100 µl de TWB en cada pocillo.
 - c Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
 - d Centrifugue a 500 × g durante 1 minuto.
 - e Coloque en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (aproximadamente 3 minutos).
 - f Para el primer lavado solo, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
- 10 Lave las bolas por **segunda** vez.
Deje el sobrenadante en la placa para el segundo lavado para evitar que se sequen demasiado las bolas.

Amplificación de los amplicones fragmentados por tagmentación

En este paso, se amplifican los amplicones fragmentados por tagmentación mediante un programa de PCR. El paso de PCR añade un par de bases 10 preemparejado, adaptadores de índices 1 (i7), adaptadores de índices 2 (i5) y las secuencias necesarias para la generación de grupos de secuenciación.

Consumibles

- ▶ EPM (Mezcla de PCR mejorada)
- ▶ Adaptadores indexados (IDT for Illumina-PCR Indexes, conjuntos 1, 2, 3 y 4)
- ▶ Agua sin nucleasas
- ▶ Tubos de 15 ml (1 por cada dos placas de muestras de 96 pocillos)
- ▶ Placa de PCR de 96 pocillos

Acerca de los reactivos

- ▶ Placas adaptadoras de índices
 - ▶ No añada muestras a los pocillos de la placa de índices.
 - ▶ Se considera que los pocillos de la placa de índices son de un solo uso, por lo que no deben reutilizarse.

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
EPM	Entre -25 °C y -15 °C	Invierta para mezclar. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
Adaptadores de índices	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.

- 2 Abra cada sello preparado de la placa adaptadora de índices de la siguiente manera. Utilice una nueva placa de PCR para cada juego diferente de índices.
 - a Alinee una nueva placa de PCR de 96 pocillos por encima de la placa adaptadora de índices y, a continuación, presione hacia abajo para perforar el sello metálico.
 - b Deseche la placa de PCR.
- 3 Guarde el siguiente programa TAG PCR de COVIDSeq en el ciclador térmico:
 - ▶ Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 100 °C.
 - ▶ Defina el volumen de la reacción en 50 µl.
 - ▶ 72 °C durante 3 minutos.
 - ▶ 98 °C durante 3 minutos
 - ▶ 7 ciclos de:
 - ▶ 98 °C durante 20 segundos.
 - ▶ 60 °C durante 30 segundos.
 - ▶ 72 °C durante 1 minuto.
 - ▶ 72 °C durante 3 minutos.
 - ▶ Mantenga la temperatura a 10 °C.

Procedimiento

- 1 En un tubo de 15 ml, combine los siguientes volúmenes para preparar mezcla maestra de PCR. Multiplique cada volumen por el número de muestras.
 - ▶ EPM (24 µl)
 - ▶ Agua sin nucleasas (24 µl)

- 2 Agite en vórtice la mezcla maestra de PCR para mezclar.
- 3 Mantenga la placa TAG1 en el soporte magnético y retire el TWB.
- 4 Utilice una pipeta de 20 µl para retirar cualquier TWB restante.
- 5 Retire la placa TAG1 del soporte magnético.
- 6 Añada 40 µl de mezcla maestra de PCR a cada pocillo.
- 7 Añada 10 µl de adaptadores de índices en cada pocillo de la placa de PCR.
- 8 Selle y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
- 9 Si hay líquido visible en el sello, centrifugue a 500 x g durante 1 minuto.
- 10 Inspeccione para garantizar que las bolas están resuspendidas. Para resuspender, cargue su pipeta con 35 µl con el émbolo hacia abajo y, a continuación, pipetee poco a poco para mezclar.
- 11 Coloque en el ciclador térmico preprogramado y lleve a cabo el programa TAG PCR de COVIDSeq.

Agrupación y limpieza de las bibliotecas

En este paso, se combinan las bibliotecas de cada placa de muestras de 96 pocillos en un tubo de 1,7 ml. Las bibliotecas de tamaño óptimo se unen a las bolas magnéticas y los fragmentos que son demasiado pequeños o grandes se eliminan.

Consumibles

- ▶ ITB (Bolas de calibración de Illumina)
- ▶ RSB (Tampón de resuspensión)
- ▶ Etanol al 80 % recién preparado (EtOH)
- ▶ Tubo de 1,7 ml (2 por cada placa de muestras de 96 pocillos)
- ▶ [Illumina COVIDSeq Test (RUO)] gradilla de 8 tubos de PCR

Acerca de los reactivos

- ▶ ITB
 - ▶ Agite en vórtice antes de cada uso.
 - ▶ Agite en vórtice frecuentemente para asegurarse de que las bolas están distribuidas de manera uniforme.
 - ▶ aspire y dispense lentamente debido a la viscosidad de la solución.

Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
ITB	Temperatura ambiente	Agite en vórtice bien para mezclar.
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice e invierta para mezclar.

- 2 Prepare 2,5 ml de EtOH al 80 % a partir de EtOH puro para cada tubo de bibliotecas agrupadas.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa TAG1 a 500 × g durante 1 minuto.
- 2 Coloque en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (aproximadamente 3 minutos).
- 3 Para agrupar bibliotecas, siga los siguientes pasos necesarios para su kit. Repita los pasos para cada placa de muestras adicional.
 - a Etiquete un nuevo tubo de 1,7 ml como ITB agrupadas.
 - b [Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)] Transfiera 5 µl de biblioteca de cada pocillo de la placa TAG1 al tubo de ITB agrupadas.
 - c [Illumina COVIDSeq Test (RUO)] Utilice una pipeta de ocho canales de 20 µl para transferir 5 µl de biblioteca desde cada pocillo de la placa TAG1 a una gradilla de 8 tubos de PCR, lo que dará como resultado una biblioteca agrupada de 60 µl por fila. Cambie las puntas después de cada columna.
 - d [Illumina COVIDSeq Test (RUO)] Transfiera 55 µl de biblioteca agrupada desde cada pocillo de la gradilla de 8 tubos de PCR al tubo de ITB agrupadas. Para cada placa de muestras, estos volúmenes dan como resultado 440 µl de grupos de bibliotecas agrupadas.
- 4 Agite en vórtice los tubos de ITB agrupadas para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 5 Agite en vórtice las ITB para resuspender.
- 6 Añada ITB usando el volumen resultante del volumen del tubo de ITB agrupadas multiplicado por 0,9. Por ejemplo, para 96 muestras, añada 396 µl de ITB a cada tubo.
- 7 Agite en vórtice para mezclar.
- 8 Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 9 Centrifugue brevemente.
- 10 Coloque en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (aproximadamente 5 minutos).
- 11 Retire y deseche todo el sobrenadante.
- 12 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Mantenga en el soporte magnético y añada 1000 µl de EtOH al 80 % recién preparado a cada tubo.
 - b Espere 30 segundos.
 - c Retire y deseche todo el sobrenadante.
- 13 Lave las bolas por **segunda** vez.
- 14 Utilice una pipeta de 20 µl para retirar todo el EtOH restante.
- 15 Añada 55 µl de RSB.



NOTA

Debido al exceso de rendimiento en las bibliotecas, el volumen de RSB no afecta a los lotes con un número pequeño de muestras.

- 16 Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 17 Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.

- 18 Coloque en el soporte magnético y espere hasta que el líquido esté transparente (aproximadamente 2 minutos).
- 19 Transfiera 50 µl de sobrenadante de cada tubo de ITB agrupadas a un nuevo tubo de microcentrifugado.

PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si va a detener el proceso, tape el tubo y almacénelo a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 30 días como máximo.

Quantificación y normalización de bibliotecas

- 1 Analice 2 µl de grupos de bibliotecas utilizando Qubit dsDNA HS Assay kit.
Si las bibliotecas están fuera del rango estándar, diluya a una concentración de 1:10 y vuelva a analizar.
- 2 Calcule el valor de molaridad usando la siguiente fórmula.
 - ▶ Utilice 400 pb como tamaño medio de la biblioteca.

$$\frac{\text{Concentración de la biblioteca ng/}\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{tamaño promedio de la biblioteca (pb)}} \times 10^6 = \text{Molaridad (nM)}$$

- 3 Diluya cada grupo de bibliotecas a un mínimo de 30 µl a una concentración normalizada de 4 nM usando RSB.

Agrupación y dilución de bibliotecas

Después de diluir hasta la concentración de inicio de 4 nM, las bibliotecas están listas para ser desnaturalizadas y diluidas a la concentración de carga final.

- 1 Transfiera el volumen designado de bibliotecas normalizadas que contienen los juegos de adaptadores indexados necesarios a un nuevo tubo de microcentrifuga para cada número de muestras especificadas en la [Tabla 2](#).
Si tiene varias agrupaciones normalizadas, combine el volumen designado para cada agrupación normalizada en el tubo. Al hacerlo, se produce una agrupación final de muestras diluidas a una concentración de inicio de 4 nM. No combine agrupaciones con el mismo juego de adaptadores indexados.

Tabla 2 Volúmenes de agrupaciones normalizadas y números de muestras para desnaturalización y dilución por instrumento

Sistema de secuenciación	Volumen de bibliotecas normalizadas utilizadas por experimento (µl)	Muestras por agrupación final de bibliotecas normalizadas	Muestras por celda de flujo
Celda de flujo de iSeq 100 v1 o v2	2	4	4
Celda de flujo de MiSeq v2	5	15	15
Celda de flujo de MiSeq v3	5	24	24
Celda de flujo de MiniSeq HO	25	24	24
Celda de flujo NextSeq 500/550 o 550Dx HO	25	384	384
Celda de flujo NovaSeq 6000 SP	25	384	384 por carril, 768 por celda de flujo

Sistema de secuenciación	Volumen de bibliotecas normalizadas utilizadas por experimento (µl)	Muestras por agrupación final de bibliotecas normalizadas	Muestras por celda de flujo
Celda de flujo NovaSeq 6000 S4	25	384	384 por carril, 1536 por celda de flujo
Celda de flujo NextSeq 1000/2000 P2	25	384	384

2. Siga las instrucciones de desnaturalización y dilución para que el sistema diluya hasta la concentración de carga final.
 - ▶ Para obtener información sobre el sistema de secuenciación iSeq, consulte la *Guía del sistema de secuenciación iSeq 100* (n.º de documento 1000000036024).
 - ▶ Para obtener información sobre el sistema de secuenciación MiSeq, consulte la *Guía de bibliotecas de desnaturalización y dilución para el sistema MiSeq* (n.º de documento 15039740).
 - ▶ Para obtener información sobre el sistema de secuenciación MiniSeq, consulte la *Guía de bibliotecas de desnaturalización y dilución para el sistema MiniSeq* (n.º de documento 1000000002697).
 - ▶ Para los sistemas de secuenciación NextSeq 500/550 y NextSeq 550Dx, consulte la *Guía de bibliotecas de desnaturalización y dilución para el sistema NextSeq* (n.º de documento 15048776).
 - ▶ Para el sistema de secuenciación NovaSeq 6000, consulte la *Guía de desnaturalización y dilución de bibliotecas con NovaSeq 6000* (n.º de documento 1000000106351).
 - ▶ Para el sistema de secuenciación NextSeq 2000, consulte la *Guía del sistema de secuenciación NextSeq 1000/2000* (n.º de documento 1000000109376).
3. Utilice las siguientes concentraciones de carga para el sistema.

Tabla 3 Concentraciones de carga por instrumento

Sistema de secuenciación	Concentración de inicio (nM)	Concentración final de carga (pM)
Celda de flujo de iSeq 100 v1 o v2	4	75
Celda de flujo de MiSeq v2	4	10
Celda de flujo de MiSeq v3	4	12
Celda de flujo de MiniSeq HO	4	1,2
Celda de flujo NextSeq 500/550 o 550Dx HO	4	1,4
Celda de flujo NovaSeq 6000 SP	4	100
Celda de flujo NovaSeq 6000 S4	4	100
Celda de flujo NextSeq 1000/2000 P2	4	1000

Siga las instrucciones de desnaturalización y dilución de su sistema de secuenciación para hacer los ajustes de la concentración final de carga.

Preparación para la secuenciación

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) es compatible con iSeq 100 i1 reagents v2, MiSeq reagent kits v2 y v3, y MiniSeq High Output (HO) reagent kit.

La prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO) es compatible con las celdas de flujo SP y S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000, con los sistemas de secuenciación NextSeq 2000 y NextSeq 500/550 y con el instrumento NextSeq 550DX.

Utilice el archivo `samplesheet.csv` para su sistema de secuenciación disponible en el sitio de asistencia de los kits Illumina COVIDSeq Test Research Use Only (RUO) como molde para crear la hoja de muestras.

Para conocer los requisitos de la hoja de muestras de Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline, consulte [Hoja de muestras de Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline en la página 30](#).

Configuración del experimento de secuenciación para Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)

Consulte los documentos de su sistema de secuenciación y la siguiente información para configurar su experimento.

- ▶ Para conocer las recomendaciones sobre longitud de lectura, consulte la nota técnica de Illumina *Guía de secuenciación para vigilancia de COVID-19 con el uso de la prueba Illumina COVIDSeq Test (versión RUO)* para más información.
- ▶ Si utiliza el sistema iSeq, consulte la *Guía del sistema iSeq (n.º de documento 1000000036024)*.
- ▶ Si utiliza MiSeq, consulte la *Guía del sistema MiSeq (n.º de documento 15046563)*.
- ▶ Si utiliza el sistema MiniSeq, consulte la *Guía del sistema MiniSeq (n.º de documento 1000000002695)*.
- ▶ Configure su experimento de secuenciación en modo manual, a no ser que esté llevando a cabo una vigilancia y utilice Local Run Manager.
 - ▶ Si está utilizando Local Run Manager, consulte la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 1000000111492)*.
- ▶ Si está utilizando una aplicación de BaseSpace Sequence Hub, asegúrese de habilitar la supervisión y el almacenamiento según las necesidades de su instrumento.
 - ▶ Para el sistema iSeq, seleccione o habilite **Run Analysis** (Análisis del experimento), **Collaboration** (Colaboración) y **Storage** (Almacenamiento) en los ajustes del sistema.
 - ▶ Para el sistema MiniSeq, seleccione **Run Monitoring and Storage** (Supervisión del experimento y almacenamiento) como la opción de Configuración.
- ▶ Introduzca **Paired End** (Ambos extremos) como Read Type (Tipo de lectura).
- ▶ Introduzca **10** como valor para Index 1 (índice 1) e Index 2 (índice 2).

Configuración del experimento de secuenciación para Illumina COVIDSeq Test (RUO)

Consulte los documentos de su sistema de secuenciación y la siguiente información para configurar su experimento.

Para conocer las recomendaciones sobre longitud de lectura, consulte la nota técnica de Illumina *Guía de secuenciación para vigilancia de COVID-19 con el uso de la prueba Illumina COVIDSeq Test (versión RUO)* para más información.

- 1 Si se utiliza NextSeq 500/550 o NexSeq 550Dx, consulte la *Guía del sistema NextSeq 500 (n.º de documento 15046563)*, la *Guía del sistema NextSeq 550 (n.º de documento 15069765)* o la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.
 - ▶ Utilice la v4.0 del software de control de NextSeq (NCS, NextSeq Control Software).
 - ▶ Si se utiliza el instrumento NextSeq 550Dx, utilice el modo de investigación.
 - ▶ Configure su experimento de secuenciación en modo manual, a no ser que esté llevando a cabo una vigilancia y utilice Local Run Manager.
 - ▶ Si está utilizando Local Run Manager, consulte la *Guía del software Local Run Manager (n.º de documento 1000000111492)*.
 - ▶ Si utiliza la aplicación BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Run Monitoring and Storage** (Almacenamiento y supervisión del experimento) como opción de configuración.

- ▶ Introduzca **Single-Read** (Lectura única) como tipo de lectura. Para la vigilancia, introduzca **Paired End** (Ambos extremos) como Read Type (Tipo de lectura).
 - ▶ Introduzca **10** como valor para Index 1 (índice 1) e Index 2 (índice 2).
- 2 Si se utiliza el sistema NovaSeq 6000, consulte la *Guía del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (n.º de documento 1000000019358)* para obtener instrucciones de secuenciación.
- ▶ Utilice la v1.7 del software de control de NovaSeq (NVCS, NovaSeq Control Software).
 - ▶ Si utiliza la aplicación BaseSpace Sequence Hub, seleccione **Run Monitoring and Storage** (Almacenamiento y supervisión del experimento) como opción de configuración.
 - ▶ Introduzca **10** como valor para Index 1 (índice 1) e Index 2 (índice 2).
- 3 Si se utiliza NextSeq 2000, consulte la *Guía del sistema de secuenciación NextSeq 1000/2000 (n.º de documento 1000000109376)*.
- ▶ Al crear un experimento en BaseSpace Sequence Hub, asegúrese de hacer lo siguiente:
 - ▶ Seleccione **BaseSpace** para la ubicación del análisis.
 - ▶ Seleccione la prueba **Illumina DRAGEN COVIDSeq Test** en Analysis Type (Tipo de análisis).
 - ▶ Si la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test no aparece como tipo de análisis, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
 - ▶ Configure el análisis como se describe en la siguiente sección *Configuración de un análisis en BaseSpace Sequence Hub para NextSeq 2000*.
 - ▶ Utilice la v1.2 del software de control de NextSeq 1000/2000.
 - ▶ Asegúrese de que las opciones **Online Run Setup** (Configuración del experimento en línea) y **Proactive, Run Monitoring, and Storage** (Proactivo, Supervisión del experimento y Almacenamiento) están seleccionadas en la pantalla Settings (Ajustes) para permitir el modo Cloud (Nube).

Configuración de un análisis en BaseSpace Sequence Hub para NextSeq 2000

Utilice los siguientes pasos para configurar el análisis de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test en BaseSpace Sequence Hub cuando se utiliza un instrumento NextSeq 2000.

- 1 Para activar el modo rápido, configure la opción Fast Mode (modo rápido) en **True** (Verdadero). El modo rápido desactiva la alineación, la llamada de variantes y la generación FASTA de secuencias de consenso para analizar resultados.
- 2 Para excluir los registros de experimentos, los archivos de criterios de medición de CC y otro tipo de archivos, configure la opción Metrics and Logs Datasets (Conjuntos de datos de criterios de medición y registros) en **False** (Falso). Al configurar esta opción como falsa mejora la velocidad de análisis, aunque no se genera la carpeta Logs_Intermediates_Lane_* (Registros_intermedios_carril).
- 3 Identifique la ubicación de sus controles positivo y sin cadena molde utilizando el ID de la muestra o la posición del pocillo.
- 4 Introduzca el control positivo y el control sin cadena molde para cada juego de índices.
 - ▶ Si ha utilizado el juego de índices durante la preparación de la biblioteca, introduzca el mismo ID de muestra o la misma posición del pocillo para los controles positivo y sin cadena molde.
 - ▶ Si no ha utilizado el juego de índices, introduzca NA (No procede).
- 5 Seleccione **Submit Run** (Enviar experimento).

Software de análisis

Una vez completada la secuenciación, el análisis se lleva a cabo o bien de forma local utilizando el software del proceso instalado o bien en BaseSpace Sequence Hub.

- ▶ El análisis local para la detección cualitativa del ARN del SARS-CoV-2 utiliza el proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test.
- ▶ El análisis local para la vigilancia utiliza el proceso Illumina DRAGEN COVID con las herramientas COVID Lineage Tools.
- ▶ El análisis en la nube en BaseSpace Sequence Hub puede utilizar la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test para la detección cualitativa del SARS-CoV-2 o bien la aplicación DRAGEN COVID Lineage para vigilancia.

Para obtener información adicional, consulte uno de los recursos siguientes.

- ▶ *Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline Software Guide (Guía del proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test) (n.º de documento 1000000128122)*
- ▶ *Illumina DRAGEN COVIDSeq Test App Guide (Guía de aplicación Illumina DRAGEN COVIDSeq Test) (n.º de documento 1000000129548)*
- ▶ *Illumina DRAGEN COVID Pipeline Software Guide (Guía del software del proceso de Illumina DRAGEN COVID) (n.º de documento 1000000158680)*

Apéndice A Información de apoyo

Contenido del kit Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)	20
Contenido del kit Illumina COVIDSeq Test (RUO) (3072 Samples)	21
Consumibles y equipos	23

Contenido del kit Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) para secuenciación de bajo rendimiento tiene cuatro opciones de kit diferentes. Cada opción de kit contiene un conjunto diferente de IDT for Illumina-PCR Indexes.

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) no contiene el COVIDSeq Positive Control, pero puede adquirirlo por separado. Consulte [COVIDSeq Positive Control for 96 Samples \(Opcional\)](#) en la página 21

Kit	N.º de catálogo
Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) que incluye Index Set 1	20049393
Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) que incluye Index Set 2	20051772

Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)

Almacene rápidamente los reactivos a la temperatura indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

Tabla 4 Illumina COVIDSeq Assay Box 1 – 96 Samples, n.º de referencia 20051272

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	15	ITB	Bolas de calibración de Illumina	Temperatura ambiente, entorno de posamplificación
1	2	ST2	Tampón de tagmentación de parada 2	Temperatura ambiente, entorno de posamplificación

Tabla 5 Illumina COVIDSeq Assay Box 2 – 96 Samples, n.º de referencia 20051273

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
2	2	EBLTS	BLT de enriquecimiento	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación
3	2	ELB	Tampón de elución	De 2 °C a 8 °C, entorno de preamplificación
2	2	RSB	Tampón de resuspensión	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación
1	50	TWB	Tampón de lavado de tagmentación	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación

Tabla 6 Illumina COVIDSeq Assay Box 3 – 96 Samples, n.º de referencia 20051274

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	2	CPP1	Grupo del cebador 1 de COVIDSeq	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	2	CPP2	Grupo del cebador 2 de COVIDSeq	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
4	0,5	EPH3	Mezcla 3HC de elución, cebado y fragmentación	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
3	2	EPM	Mezcla de PCR mejorada	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
3	0,5	FSM	Mezcla de la primera cadena	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
4	2	IPM	Mezcla de PCR de Illumina	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
2	0,5	RVT	Transcriptasa inversa	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
6	0,5	TB1	Tampón de tagmentación 1	De -25 °C a -15 °C, entorno de posamplificación

Tabla 7 Illumina COVIDSeq Assay Box 4 – 96 Samples, Indexes

Cantidad	Descripción	Almacenamiento
8	Uno de los siguientes conjuntos: <ul style="list-style-type: none"> • IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 1 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 2 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 3 (96 Indexes) • IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 4 (96 Indexes) 	Entre -25 °C y -15 °C

COVIDSeq Positive Control for 96 Samples (Opcional)

COVIDSeq Positive Control (CPC) es opcional para Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples). Se vende por separado de Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples). Almacene el CPC entre -85 °C y -65 °C en el entorno de preamplificación.

Cantidad	Volumen de la etiqueta	Reactivo	Número de referencia
1	100 µl	COVIDSeq Positive Control	20051775

Contenido del kit Illumina COVIDSeq Test (RUO) (3072 Samples)

La prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO) para secuenciación de alto rendimiento requiere la prueba Illumina COVIDSeq Test (3072 Samples) y 8 IDT for Illumina-PCR Indexes.

Componente	Kit	N.º de catálogo
Preparación de bibliotecas	Illumina COVIDSeq Test (3072 Samples)	20043675
Índices	IDT for Illumina-PCR Indexes Sets 1–4 (384 Indexes)	20043137

Illumina COVIDSeq Test (RUO)

Almacene rápidamente los reactivos a la temperatura indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

Tabla 8 Illumina COVIDSeq Test Box 1: 3072 muestras, n.º de referencia 20044405

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	233	ITB	Bolas de calibración de Illumina	Temperatura ambiente
1	56	ST2 HT	HT de detención de tampón de tagmentación 2	Temperatura ambiente, entorno de posamplificación

Tabla 9 Illumina COVIDSeqTest Box 2: 3072 muestras, n.º de referencia 20044406

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
2	6,1	EBLTS HT	HT de BLT de enriquecimiento	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación
1	114	ELB HT	HT de tampón de elución	De 2 °C a 8 °C, entorno de preamplificación
1	10	RSB HT	HT de tampón de resuspensión	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación
1	845	TWB HT	HT de tampón de lavado de tagmentación	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación

Tabla 10 Illumina COVIDSeq Test Box 3: 3072 muestras, n.º de referencia 20044407

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	14,4	CPP1 HT	HT del grupo del cebador 1 de COVIDSeq	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	14,4	CPP2 HT	HT del grupo del cebador 2 de COVIDSeq	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	45	EPH3 HT	HT de mezcla 3HC de elución, cebado y fragmentación	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	79	EPM HT	HT de mezcla de PCR mejorada	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	41	FSM HT	HT de mezcla de la primera cadena	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	100	IPM HT	HT de mezcla de PCR de Illumina	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	4,6	RVT HT	HT de transcriptasa inversa	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	38	TB1 HT	HT del tampón de tagmentación 1	De -25 °C a -15 °C, entorno de posamplificación

Tabla 11 HT de control positivo de Illumina COVIDSeq, n.º de referencia 20043401

Cantidad	Volumen de la etiqueta	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	100 µl	HT de control positivo de COVIDSeq	HT de control positivo de COVIDSeq	De -85 °C a -65 °C, entorno de preamplificación

IDT for Illumina- PCR Indexes, almacenar entre -25 °C y -15 °C

Para la prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO) se necesitan 8 IDT for Illumina PCR Indexes Sets 1–4 (384 Indexes).

Cantidad	Descripción	Número de referencia
8	IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 1 (96 Indexes)	20043132
8	IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 2 (96 Indexes)	20043133
8	IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 3 (96 Indexes)	20043134
8	IDT for Illumina- PCR Indexes, Set 4 (96 Indexes)	20043135

Consumibles y equipos

Además de su kit (Illumina COVIDSeq Test (RUO) o Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)) y el IDT for Illumina-PCR Indexes, asegúrese de que dispone de los consumibles y equipos necesarios antes de iniciar el protocolo.

Consumibles

Consumible	Proveedor
Puntas de pipeta de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Placas de PCR de 96 pocillos con carcasa dura	Bio-Rad, n.º de referencia HSP-9601 o equivalente
Placa de 96 pocillos profundos, 2000 µl	Eppendorf, n.º de referencia 951033707
Tubos de microcentrifugado LoBind de 1,7 ml	Eppendorf, n.º de catálogo 022431021
Tubo de microcentrifugado LoBind de 5 ml	Eppendorf, n.º de catálogo 0030122348
Tubos de 15 ml	Proveedor de laboratorio general
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de referencia 21905-026, o equivalente
Paño humedecido en alcohol sin pelusa	Proveedor de laboratorio general
Sellos adhesivos Microseal "B"	Bio-Rad, n.º de referencia MSB-1001
Depósitos para pipetas desechables sin ARNasa/ADNasa	VWR, n.º de referencia 89094-658

Consumible	Proveedor
<p>Uno de los siguientes, en función del método de extracción utilizado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 13 QIAamp Viral RNA Mini Kit • 8 Quick DNA/RNA Viral MagBead 	<ul style="list-style-type: none"> • Qiagen, n.º de referencia 52906 • Zymo Research, n.º de referencia R2141
Qubit dsDNA HS Assay Kit	<p>En función del tamaño del kit, uno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ThermoFisher Scientific, n.º de referencia Q32851 • ThermoFisher Scientific, n.º de referencia Q32854
Tubos de ensayo Qubit	ThermoFisher Scientific, n.º de catálogo Q32856
<p>Si utiliza el sistema iSeq 100:</p> <ul style="list-style-type: none"> • iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 Cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo 20031371
<p>Si utiliza MiSeq System v2 reagent kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo MS-102-2002
<p>Si utiliza MiSeq System v3 reagent kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo MS-102-3003
<p>Si utiliza el sistema MiniSeq:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MiniSeq High Output Reagent Kit (300 Cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo FC-420-1003
<p>Si se utiliza la celda de flujo S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 NovaSeq 6000 Sequencing System S4 Reagent Kit v1.5 (35 cycles) • 2 NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina, n.º de catálogo 20044417 • Illumina, n.º de catálogo 20043131
<p>Si se utiliza la celda de flujo SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 NovaSeq 6000 Sequencing System SP Reagent Kit v1.5 (100 cycles) • 4 NovaSeq Xp 2-Lane Kit v1.5 	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina, n.º de catálogo 20028401 • Illumina, n.º de catálogo 20043130
<p>Si se utilizan el sistema NextSeq 500/550 o el instrumento NextSeq 550Dx:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8 NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo 20024906
<p>Si se utiliza el sistema NextSeq 2000</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8 NextSeq 1000/2000 P2 Reagents (100 cycles) 	• Illumina, n.º de catálogo 20046811

Equipo necesario, no suministrado

Equipo	Proveedor
Pipetas de canal único de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 8 canales de 10 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 8 canales de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 8 canales de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 8 canales de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 12 canales de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de 12 canales de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Pipetas serológicas de 25 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 50 ml	Proveedor de laboratorio general
BioShake iQ	QInstruments, n.º de referencia 1808-0506
Plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN Bio-IT o BaseSpace Sequence Hub	Illumina
Equipo para uno de los métodos de extracción siguientes (según sea necesario):	
<ul style="list-style-type: none"> Equipo Quick-DNA/RNA Viral MagBead 	<ul style="list-style-type: none"> Consulte el <i>Manual de instrucciones de Quick-DNA/RNA Viral MagBead</i>, Zymo Research
<ul style="list-style-type: none"> Equipo QIAamp Viral RNA Mini Kit 	<ul style="list-style-type: none"> Consulte <i>QIAamp Viral RNA Mini Handbook (n.º de documento HB-0354-006)</i>, Qiagen
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general
Congelador, entre -85 °C y -65 °C	Proveedor de laboratorio general
Soporte magnético para 96 pocillos	Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AM10027
Uno de los siguientes soportes magnéticos:	
<ul style="list-style-type: none"> Dynabeads MPC-S (concentrador de partículas magnéticas) Gradilla de separación magnética MagnaRack 	<ul style="list-style-type: none"> Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo A13346 Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo CS15000
Microcentrífuga	Proveedor de laboratorio general
Centrifugadora para microplacas	Proveedor de laboratorio general
Uno de los siguientes sistemas de secuenciación:	Illumina
<ul style="list-style-type: none"> iSeq 100 MiSeq MiniSeq NextSeq 500 NextSeq 550 NextSeq 550Dx NextSeq 2000 NovaSeq 6000 	
Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp	Illumina, n.º 20021663
Ayuda para pipeta	Proveedor de laboratorio general
Fluorímetro Qubit 3.0	Thermo Fisher, n.º de catálogo Q33216, Q33217 o Q33218
Refrigerador, entre 2 °C y 8 °C	Proveedor de laboratorio general
Uno de los siguientes cicladores térmicos:	
<ul style="list-style-type: none"> Ciclador térmico C1000 Touch™ con un módulo de reacción rápida de 96 pocillos Ciclador térmico C1000 Touch™ con un módulo de reacción de 96 pocillos profundos Ciclador térmico Veriti de 96 pocillos Ciclador térmico rápido GeneAmp PCR System 9700 Ciclador térmico con los requisitos mínimos especificados. Consulte <i>Especificaciones recomendadas del ciclador térmico en la página 26</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Bio-Rad, n.º de referencia 1851196 Bio-Rad, n.º de referencia 1851197 Thermo Fisher, n.º de catálogo 4375786 Thermo Fisher, n.º de catálogo 4339386
Rodillo o cuña de sellado	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general

Especificaciones recomendadas del ciclador térmico

Estos son los requisitos mínimos recomendados para un ciclador térmico utilizado con la prueba Illumina COVIDSeq Test (RUO) o Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples). Compruebe también la compatibilidad de su placa de PCR con el ciclador térmico específico que utiliza.

Especificación	Requisitos mínimos
Tipo de tapa	Calefactada
Intervalo de temperatura	De 4 °C a 99 °C
Formato	Tubos de 0,2 ml, placa de 96 pocillos
Precisión de temperatura	±0,25 °C (de 35 °C a 99,9 °C)
Uniformidad de temperatura	±0,5 °C entre pocillos en un plazo de 30 segundos de llegada a la temperatura objetivo
Tasa de incremento máxima	Al menos 1,5 °C
Tasa de incremento de la muestra	±1,25 °C

Apéndice B Preparación de COVIDSeq Positive Control

Preparación de COVIDSeq Positive Control27

Preparación de COVIDSeq Positive Control

Este procedimiento diluye el COVIDSeq Positive Control (CPC) y lo prepara para su uso con los kits Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples) e Illumina COVIDSeq Test (RUO).

Consumibles

- ▶ Tubos LoBind de 1,7 ml
- ▶ Tubos LoBind de 5 ml
- ▶ COVIDSeq Positive Control

Acerca de los reactivos

- ▶ Ponga una parte alícuota de CPC en tubos de baja unión. Almacénelo a una temperatura entre -85 °C y -65 °C.
- ▶ Agite en vórtice antes de cada uso.

Preparación para Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples)

Los siguientes pasos describen el procedimiento para el kit Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples). Para el kit Illumina COVIDSeq Test (RUO), consulte [Preparación para Illumina COVIDSeq Test \(RUO\)](#) en la página 28.

Se recomienda usar COVIDSeq Positive Control (CPC) con Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples), pero no es obligatorio.

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
ELB	Entre 2 °C y 8 °C	Descongele a temperatura ambiente y después invierta para mezclar. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
CPC	Entre -85 °C y -65 °C	Diluya a 5 copias por μl siguiendo las instrucciones que se indican a continuación. Mantenga el control positivo diluido en hielo.

- 2 Diluya el CPC de la manera siguiente.
 - a Etiquete un tubo de 1,7 ml como Dilución 1.
 - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
 - ▶ CPC (1 μl)
 - ▶ ELB (99 μl)Estos volúmenes producen 10 000 copias por μl .
 - c Agite en vórtice brevemente para mezclar.

- 3 Diluya el CPC una segunda vez de la manera siguiente.
 - a Etiquete un tubo de 1,7 ml como Dilución 2.
 - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
 - ▶ Dilución 1 (1 µl)
 - ▶ ELB (99 µl)
 Estos volúmenes producen 100 copias por µl.
 - c Agite en vórtice brevemente para mezclar.

Preparación para Illumina COVIDSeq Test (RUO)

Los siguientes pasos describen el procedimiento de preparación para el kit Illumina COVIDSeq Test (RUO). Para el kit Illumina COVIDSeq Assay (96 Samples), consulte [Preparación para Illumina COVIDSeq Assay \(96 Samples\)](#) en la página 27.

Usar COVIDSeq Positive Control (CPC) HT con Illumina COVIDSeq Test (RUO) es necesario para llevar a cabo tareas de detección; asimismo, también se recomienda para fines de seguimiento.

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
ELB HT	Entre 2 °C y 8 °C	Descongele a temperatura ambiente y después invierta para mezclar. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
CPC HT	Entre -85 °C y -65 °C	Diluya a 5 copias por µl siguiendo las instrucciones que se indican a continuación. Mantenga el control positivo diluido en hielo.

- 2 Diluya el CPC HT de la manera siguiente.
 - a Etiquete un tubo de 1,7 ml como Dilución 1.
 - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
 - ▶ CPC HT (5 µl)
 - ▶ ELB HT (495 µl)
 Estos volúmenes producen 10 000 copias por µl.
 - c Agite en vórtice brevemente para mezclar.
- 3 Diluya el CPC HT una segunda vez de la manera siguiente.
 - a Etiquete un tubo de 1,7 ml como Dilución 2.
 - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
 - ▶ Dilución 1 (5 µl)
 - ▶ ELB HT (495 µl)
 Estos volúmenes producen 100 copias por µl.
 - c Agite en vórtice brevemente para mezclar.

- 4 Diluya el CPC HT una tercera vez de la manera siguiente.
 - a Etiquete un tubo de 5 ml como Dilución 3.
 - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
 - ▶ Dilución 2 (200 µl)
 - ▶ ELB HT (3,8 ml)Estos volúmenes producen 5 copias por µl.
 - c Agite en vórtice brevemente para mezclar.

Apéndice C Hoja de muestras de Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline

Requisitos de la hoja de muestras30

Requisitos de la hoja de muestras

El proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test requiere una hoja de muestras para cada análisis del experimento. Este requisito no se aplica a NextSeq 2000, que utiliza la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq Test en BaseSpace Sequence Hub.

Utilice el archivo `samplesheet.csv` para su sistema de secuenciación incluido en el paquete del instalador o disponible en el sitio de asistencia de los kits Illumina COVIDSeq Test Research Use Only (RUO) como molde para crear la hoja de muestras.

Asegúrese de que la hoja de muestras cumple con los siguientes requisitos.

- 1 Guarde la hoja de muestras con el nombre `SampleSheet.csv` en la carpeta del experimento de secuenciación.
- 2 En Settings (Configuración), introduzca el siguiente valor para el parámetro `AdapterRead1`.
CTGTCTCTTATACACATCT
- 3 En la sección Data (Datos), introduzca los siguientes parámetros necesarios. Asegúrese de que no haya filas vacías entre las muestras.

Campo	Descripción	Requisitos
Sample_ID (ID de muestra)	El ID usado para identificar las muestras en los informes de la prueba y que se incluye en los nombres de los archivos de resultados.	Los ID de las muestras no distinguen entre mayúsculas y minúsculas. Asegúrese de que los ID de las muestras contengan lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> • Únicos para el experimento. • ≤ 100 caracteres sin espacios. • Caracteres alfanuméricos, guiones bajos y guiones normales solo. Debe añadirse un carácter alfanumérico antes y después de un guion bajo o un guion normal.
Index_ID (ID de índice)	El nombre de índice del IDT for Illumina-PCR Indexes asociado a la muestra.	Consulte en <i>Secuencias de adaptadores de Illumina (n.º de documento 100000002694)</i> los nombres de índices e información adicional. El nombre debe ser único para cada carril de la celda de flujo. Si no se especifica el Index_ID, el campo Index Set (Juego de índices) se toma de Index (Índice) e Index2 (Índice 2). Si se especifican los tres, los nombres de índices y las secuencias asociadas deben coincidir.
Index (Índice)	Bases de la hoja de muestras del índice i7 del IDT for Illumina-PCR Indexes	Consulte en <i>Secuencias de adaptadores de Illumina (n.º de documento 100000002694)</i> las bases de las hojas de muestras para su sistema de secuenciación y la información adicional. Si se especifica Index_ID (ID de índice), no se requiere Index (Índice).
Index2 (Índice 2)	Bases de la hoja de muestras del índice i5 del IDT for Illumina-PCR Indexes.	Consulte en <i>Secuencias de adaptadores de Illumina (n.º de documento 100000002694)</i> las bases de las hojas de muestras para su sistema de secuenciación y la información adicional. Si se especifica Index_ID (ID de índice), no se requiere Index2 (Índice 2).

Campo	Descripción	Requisitos
Lane (Carril)	El carril de la celda de flujo para la muestra.	Si se utiliza el sistema NovaSeq 6000, introduzca uno de los siguientes valores: 1, 2, 3 o 4. Si se utiliza NextSeq 500/550, NextSeq 500Dx o NextSeq 2000, no se incluye este campo.
Sample_Type (Tipo de muestra)	El tipo de muestra de cada muestra.	Introduzca uno de los siguientes valores utilizando las mayúsculas y minúsculas correspondientes: PatientSample (MuestraPaciente), NTC, PositiveControl (ControlPositivo). Si se utiliza el sistema NovaSeq 6000, debe haber una muestra NTC y una muestra PositiveControl (Control positivo) para cada combinación de juego de índices/carril en la hoja de muestras. Si se utiliza NextSeq 500/550, NextSeq 500Dx o NextSeq 2000, debe haber una muestra NTC y una muestra PositiveControl (Control positivo) para cada combinación de juego de índices en la hoja de muestras

- 4 **[Opcional]** Introduzca parámetros de datos adicionales como `Sample_Name` (Nombre_de_muestra).
- 5 Guarde la hoja de muestras.

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sitio web: www.illumina.com
Correo electrónico: techsupport@illumina.com

Números del servicio de asistencia técnica de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Internacional
Alemania	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Australia	+61 1800 775 688	
Austria	+43 800 006249	+43 1 9286540
Bélgica	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Canadá	+1 800 809 4566	
China		+86 400 066 5835
Corea del Sur	+82 80 234 5300	
Dinamarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
España	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Estados Unidos	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Filipinas	+63 180016510798	
Finlandia	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Francia	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hong Kong (China)	+852 800 960 230	
India	+91 8006500375	
Indonesia		0078036510048
Irlanda	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italia	+39 800 985513	+39 236003759
Japón	+81 0800 111 5011	
Malasia	+60 1800 80 6789	
Noruega	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nueva Zelanda	+64 800 451 650	
Países Bajos	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Reino Unido	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Singapur	1 800 5792 745	
Suecia	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Suiza	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Tailandia	+66 1800 011 304	
Taiwán (China)	+886 8 06651752	
Vietnam	+84 1206 5263	

Hojas de datos de seguridad (SDS): disponibles en el sitio web de Illumina, support.illumina.com/sds.html.

Documentación del producto: disponible para su descarga de support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

**Para uso exclusivo en investigación.
Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.**

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

illumina®