

# Prueba Illumina COVIDSeq

Guía de referencia



## Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000126053 v02	Julio de 2020	Se han añadido instrucciones sobre la extracción de ARN con el kit Quick-DNA/RNA Viral Magbead. Se ha añadido un punto de detención seguro después de la agrupación y la limpieza de las bibliotecas. Se han actualizado las configuraciones de los kits de índices para el IDT de los índices PCR de Illumina. Se han eliminado instrucciones de secuenciación. 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. La información acerca de los análisis de datos se ha trasladado a la guía <i>Illumina COVIDSeq Test Pipeline Software Guide</i> (n.º de documento 1000000128122) (en inglés).
N.º de documento 1000000126053 v01	Junio de 2020	No hay cambios de contenido.
N.º de documento 1000000126053 v00	Junio de 2020	Publicación inicial.

# Índice

Historial de revisiones .....	ii
Capítulo 1 Descripción general .....	1
Introducción .....	1
Recomendaciones de aporte .....	1
Capítulo 2 Preparación de bibliotecas .....	2
Introducción .....	2
Sugerencias y técnicas .....	2
Extracción del ARN .....	4
Alineación del ARN .....	5
Síntesis de ADNc de la primera cadena .....	6
Amplificación del ADNc .....	7
Tagmentación de amplicones PCR .....	9
Limpieza tras la tagmentación .....	10
Amplificación de los amplicones fragmentados por tagmentación .....	11
Agrupación y limpieza de las bibliotecas .....	12
Cuantificación y normalización de bibliotecas .....	14
Agrupación y dilución de bibliotecas .....	14
Preparación para la secuenciación .....	15
Requisitos de la hoja de muestra .....	16
Configuración de un experimento de secuenciación .....	17
Apéndice 3 Información de apoyo .....	18
Contenido de los kits .....	18
Consumibles y equipos .....	20
Asistencia técnica .....	23

# Capítulo 1 Descripción general

Introducción .....	1
Recomendaciones de aporte .....	1

## Introducción

En esta guía se explica cómo detectar el virus del SARS-CoV-2 mediante la prueba Illumina COVIDSeq.

La prueba Illumina COVIDSeq ofrece lo siguiente:

- ▶ Extracción de ARN de muestras descontaminadas de nasofaringe, orofaringe y de hisopos nasales, así como de muestras del cornete medio recogidas de personas que cumplen los criterios clínicos o epidemiológicos de la COVID-19, con los kits QIAamp Viral RNA Mini o Quick-DNA/RNA Viral Magbead.
- ▶ Preparación de hasta 3072 muestras para secuenciación de alto rendimiento con el sistema de secuenciación NovaSeq 6000 o hasta 384 muestras con los sistemas de secuenciación NextSeq 500/550 o el instrumento NextSeq 550Dx en el modo de uso exclusivo en investigación.
- ▶ Detección cualitativa del ARN del SARS-CoV-2 con el proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq de forma local o en BaseSpace Sequence Hub con la aplicación de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq.

## Recomendaciones de aporte

La prueba Illumina COVIDSeq admite muestras de pacientes obtenidas con hisopos nasofaríngeos, orofaríngeos y nasales. Transporte las muestras de acuerdo con las normas de transporte de agentes etiológicos aplicables a su región.

Almacene las muestras de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Superar los tiempos de almacenamiento podría afectar negativamente a los resultados de la prueba.

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

- ▶ Métodos de recolección de muestras, factores del paciente 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 .....	2
Sugerencias y técnicas .....	2
Extracción del ARN .....	4
Alineación del ARN .....	5
Síntesis de ADNc de la primera cadena .....	6
Amplificación del ADNc .....	7
Tagmentación de amplicones PCR .....	9
Limpieza tras la tagmentación .....	10
Amplificación de los amplicones fragmentados por tagmentación .....	11
Agrupación y limpieza de las bibliotecas .....	12
Cuantificación y normalización de bibliotecas .....	14
Agrupación y dilución de bibliotecas .....	14

## Introducción

En este capítulo se describe la preparación de bibliotecas con la prueba Illumina COVIDSeq.

- ▶ Compruebe el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los consumibles y equipos necesarios. Consulte [en la página 18](#).
- ▶ Siga los protocolos en el orden indicado, con los volúmenes y los parámetros de incubación especificados.
- ▶ Asegúrese de que los reactivos no estén caducados. El uso de reactivos caducados podría afectar negativamente al rendimiento.
- ▶ No permita varios ciclos de congelación y descongelación del reactivo CPC HT. Si realiza la preparación de bibliotecas varias veces, ponga una parte alícuota de CPC HT en tubos de baja unión y, a continuación, almacénelo a una temperatura entre -85 °C y -65 °C.
- ▶ No permita más de ocho ciclos de congelación y descongelación para todos los reactivos, excepto para CPC HT.
- ▶ Incluya un control sin cadena molde (NTC) y un control positivo por cada placa de 96 pocillos. El control del proceso interno se incluye en la prueba Illumina COVIDSeq.
- ▶ 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 use un spray de aerosol con lejía cuando prepare las bibliotecas. La contaminación por rastros de lejía puede provocar un error en el ensayo.
- ▶ Use un flujo de trabajo unidireccional cuando pase de un entorno de preamplificación a otro.

## Colocación y retirada de la junta de la placa

- ▶ 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. El ARN se puede extraer con el Quick-DNA/RNA Viral MagBead, Zymo Research, n.º de referencia R2141 o el kit QIAamp Viral RNA Mini, Qiagen, n.º de referencia 5290. Siga el procedimiento correspondiente a su método de extracción.

### Consumibles

- ▶ ELB HT (HT de tampón de elución)
- ▶ CPC HT (HT de control positivo de COVIDSeq)
- ▶ Tubos LoBind de 1,7 ml
- ▶ Tubos LoBind de 5 ml
- ▶ Tubos de 15 ml
- ▶ [Quick-DNA/RNA Viral MagBead] placa de 96 pocillos profundos, 2000 µl

### Acerca de los reactivos

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

## Preparación

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  $\mu\text{l}$ .
- c Agite en vórtice brevemente para mezclar.
- 4 Diluya el CPC HT una tercera vez de la manera siguiente.
- a Etiquete un tubo de 15 ml como Dilución 3.
  - b Añada los volúmenes siguientes al tubo *en el orden que se indica*.
    - ▶ Dilución 2 (200  $\mu\text{l}$ )
    - ▶ ELB HT (3,8 ml)
- Estos volúmenes producen 5 copias por  $\mu\text{l}$ .
- c Agite en vórtice brevemente para mezclar.

## Procedimiento de Quick-DNA/RNA Viral MagBead

- 1 Por cada muestra, añada 400  $\mu\text{l}$  de la muestra del paciente a una nueva placa de pocillos profundos. Por cada 94 muestras, incluya un tubo de dilución de 3 CPC HT (control positivo) y ELB HT (control sin cadena molde).
- 2 Para extraer el RNA, use el Quick-DNA/RNA Viral MagBead. Si desea obtener más información, consulte el manual *Quick-DNA/RNA Viral MagBead Instruction Manual* (en inglés) de Zymo Research. Use las siguientes opciones del protocolo:
  - ▶ Antes de añadir las MagBinding Beads, pipetee arriba y abajo diez veces para mezclar.
  - ▶ Después de añadir 20  $\mu\text{l}$  de MagBinding Beads, pipetee arriba y abajo diez veces para mezclar y, a continuación, agite a 1500 r/min durante 10 minutos.

## Procedimiento de kit QIAamp Viral RNA Mini

- 1 Por cada muestra, añada 140  $\mu\text{l}$  de muestra del paciente a un nuevo tubo de microcentrifugado de 1,7 ml. Por cada 94 muestras, incluya un tubo de dilución de 3 CPC HT (control positivo) y ELB HT (control sin cadena molde).
- 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) (en inglés) 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  $\mu\text{l}$  en vez de 60  $\mu\text{l}$ .

## Alineación del ARN

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

## Consumibles

- ▶ EPH3 HT (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 HT	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 HT 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 HT (HT de mezcla de la primera cadena)
- ▶ RVT HT (HT de 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 HT	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele hasta que alcance la temperatura ambiente. Invierta para mezclar el contenido y luego mantenga en hielo.
RVT HT	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 HT (9 µl)
  - ▶ RVT HT (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 HT (HT de mezcla de PCR de Illumina)
- ▶ CPP1 HT (HT del grupo del cebador 1 de COVIDSeq)
- ▶ CPP2 HT (HT del 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 (3)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

## Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
CPP1 HT	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
CPP2 HT	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Mantenga en hielo hasta que lo utilice.
IPM HT	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.
    - ▶ 65 °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 mezcla maestra PCR 1 de COVIDSeq y mezcla maestra PCR 2 de COVIDSeq. Multiplique cada volumen por el número de muestras.

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

Se incluye excedente de reactivos para tener en cuenta los pequeños errores de pipeteo.

- 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 HT para la tagmentación de amplicones PCR, que es un proceso que fragmenta y etiqueta los amplicones PCR con secuencias del adaptador.

### Consumibles

- ▶ EBLTS HT (HT de BLT de enriquecimiento)
- ▶ TB1 HT (HT del 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)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

### Acerca de los reactivos

- ▶ Almacene el EBLTS HT 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 HT	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice bien antes de su uso.
TB1 HT	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 HT (12 µl)
  - ▶ EBLTS HT (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.

## Limpeza tras la tagmentación

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

### Consumibles

- ▶ ST2 HT (HT de detención de tampón de tagmentación 2)
- ▶ TWB HT (HT de tampón de lavado de tagmentación)
- ▶ Sello adhesivo Microseal "B"

### Acerca de los reactivos

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

## Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
ST2 HT	Temperatura ambiente	Agite en vórtice antes de su uso.
TWB HT	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 HT 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 HT 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 HT (HT de mezcla de PCR mejorada)
- ▶ Adaptadores de índices (IDT para índices PCR de Illumina, juegos 1, 2, 3, 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.
  - ▶ Los pocillos de la placa de índices no se pueden reutilizar.

### Preparación

- 1 Prepare los siguientes consumibles:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
EPM HT	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 conjunto 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 HT (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 HT.
- 4 Utilice una pipeta de 20 µl para retirar cualquier TWB HT 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 HT (HT de tampón de resuspensión)
- ▶ Etanol al 80 % recién preparado (EtOH)
- ▶ Tubo de 1,7 ml (2 por cada placa de muestras de 96 pocillos)
- ▶ Gradilla de ocho 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 HT	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 EtOH al 80 % a partir de EtOH absoluto.

## Procedimiento

- 1 Centrifugue 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 las bibliotecas, siga estos pasos. Repita los pasos para cada placa de muestras adicional.
  - a Utilice una pipeta de ocho canales de 20 µl para transferir 5 µl de biblioteca de cada pocillo de la placa de PCR a una gradilla de ocho tubos de PCR. Cambie las puntas después de cada columna. Estos volúmenes dan como resultado 60 µl de biblioteca agrupada por fila.
  - b Etiquete un nuevo tubo de 1,7 ml como ITB agrupadas.
  - c Transfiera 55 µl de biblioteca agrupada de cada pocillo de la gradilla de ocho tubos de PCR en el tubo de ITB agrupadas.
 

Para cada placa de muestras, estos volúmenes dan como resultado 440 µl de grupos de bibliotecas agrupadas.

Si se procesan 3072 muestras, estos pasos dan como resultado 32 tubos de ITB 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 HT.
- 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.

$$\frac{\text{Concentración de bibliotecas ng/}\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{tamaño medio de bibliotecas (bp)}} \times 10^6 = \text{Molaridad (nM)}$$

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

## Agrupación y dilución de bibliotecas

Este paso agrupa y diluye las bibliotecas hasta la concentración inicial de su sistema de secuenciación. Después de diluirse a la concentración inicial, las bibliotecas están listas para ser desnaturalizadas y diluidas a la concentración de carga final.

- 1 Para cada juego de 384 muestras, combine 25 µl de cada grupo normalizado que contenga un adaptador de índices (juegos 1, 2, 3, 4) en un nuevo tubo de microcentrifugado. No combine grupos con el mismo juego de adaptador de índices.  
Este paso produce un grupo final de 384 muestras diluidas a una concentración inicial de 4 nM. A continuación, se indica el número de muestras que se requieren por celda de flujo para cada sistema de secuenciación.
  - ▶ NextSeq 500/550 o 550Dx: 384 muestras por celda de flujo.
  - ▶ Celda de flujo de SP del sistema NovaSeq 6000: 384 muestras por carril y 768 muestras totales por celda de flujo.
  - ▶ Celda de flujo S4 del sistema NovaSeq 6000: 384 muestras por carril y 1536 muestras totales por celda de flujo.
- 2 Siga las instrucciones de desnaturalización y dilución para que el sistema se diluya hasta la concentración de carga final.
  - ▶ En el caso de 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).
  - ▶ En el caso del sistema de secuenciación NovaSeq 6000, consulte la *guía de bibliotecas de desnaturalización y dilución del sistema NovaSeq 6000* (n.º de documento 1000000106351).
- 3 Utilice las siguientes concentraciones de carga para el sistema.

Sistema de secuenciación	Concentración de inicio (nM)	Concentración final de carga (pM)
NextSeq 500/550 o 550Dx	4	1,4
Celda de flujo SP de NovaSeq 6000	4	100
Celda de flujo S4 de NovaSeq 6000	4	100

Las concentraciones de carga final constituyen un punto de partida y una pauta general. Optimice las concentraciones para su flujo de trabajo en los subsiguientes experimentos de secuenciación.

## Preparación para la secuenciación

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

Tras finalizar la secuenciación, realice el análisis en el sistema con el proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq o en BaseSpace Sequence Hub con la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq. Si desea obtener información acerca de cómo realizar el análisis de forma local, consulte la guía *Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline Software Guide* (n.º 1000000128122) (en inglés). Si desea obtener información acerca de cómo realizar el análisis en BaseSpace Sequence Hub, consulte *Illumina DRAGEN COVIDSeq Test App Guide* (n.º de documento 1000000129548) (en inglés).

## Consumibles

- ▶ Si se utiliza la celda de flujo S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000:
  - ▶ Dos kits de reactivos S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (200 ciclos), Illumina, n.º 20027466
  - ▶ Dos kits de cuatro carriles NovaSeq Xp, Illumina, n.º 20021665
- ▶ Si se utiliza la celda de flujo SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000:
  - ▶ Cuatro kits de reactivos SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (100 ciclos), Illumina, n.º 20027464
  - ▶ Cuatro kits de dos carriles NovaSeq Xp, Illumina, n.º 20021664

- ▶ Si se utiliza el sistema NextSeq 500/550 o el instrumento NextSeq 550Dx:
  - ▶ Ocho kits de rendimiento alto de NextSeq 500/550 v2.5 (75 ciclos), Illumina, n.º 20024906

## Requisitos de la hoja de muestra

El proceso de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq requiere una hoja de muestras para cada análisis del experimento. Utilice el archivo `samplesheet.csv` para su sistema de secuenciación incluido en el paquete del instalador o disponible en el sitio de asistencia de la prueba Illumina COVIDSeq como molde para crear la hoja de muestras.

Asegúrese de que la hoja de muestra 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	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"> <li>• Únicos para el experimento.</li> <li>• ≤ 100 caracteres sin espacios.</li> <li>• Caracteres alfanuméricos, guiones bajos y guiones normales solo. Debe añadirse un carácter alfanumérico antes y después de un guion bajo o un guion normal.</li> </ul>
Index_ID	El nombre de índice del IDT para índices PCR de Illumina asociado con 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. 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 para índices PCR de Illumina.	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 para índices PCR de Illumina.	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).
Lane (Carril)	El carril de la celda de flujo para la muestra.	Si está utilizando el sistema NovaSeq 6000, introduzca uno de los siguientes valores: 1, 2, 3 o 4. En los sistemas NextSeq 500/550 o NextSeq 500Dx, no se incluye este campo.

Campo	Descripción	Requisitos
Sample_Type	El tipo de muestra de cada muestra.	<p>Introduzca uno de los siguientes valores en mayúsculas y minúsculas: PatientSample, NTC, PositiveControl.</p> <p>Si está utilizando el sistema NovaSeq 6000, debe haber una muestra NTC y una muestra PostiveControl por cada combinación de Index Set (Juego de índices)/Lane (Carril) en la hoja de muestras.</p> <p>Si está utilizando los sistemas NextSeq 500/550 o 550Dx, debe haber una muestra NTC y una muestra PostiveControl por cada combinación de Index Set (Juego de índices) en la hoja de muestras.</p>

- 4 **[Opcional]** Introduzca parámetros de datos adicionales como Sample\_Name.
- 5 Guarde la hoja de muestras.

## Configuración de un experimento de secuenciación

- 1 Si se utiliza el sistema NovaSeq 6000, consulte la *Guía del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (n.º de documento 1000000019358)* para ver las instrucciones de secuenciación.
  - ▶ Use la versión v1.6 del software de control de NovaSeq (NVCS).
  - ▶ Si se utiliza la aplicación de BaseSpace Sequence Hub de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq, seleccione Run Monitoring (Supervisión del experimento) y la opción Storage as the Configuration (Almacenar como configuración).
  - ▶ Utilice el siguiente número de ciclos y longitudes de índice:
    - ▶ **Read 1** (Lectura 1): introduzca 36 como valor.
    - ▶ **Index 1** (Índice 1) e **Index 2** (Índice 2): introduzca 10 como valor.
    - ▶ **Read 2** (Lectura 2): introduzca 0 como valor.
- 2 Si se utilizan los sistemas NextSeq 500/550 o NexSeq 550Dx, consulte los siguientes documentos: *Guía del sistema NextSeq 500 (n.º de documento 15046563)*, *Guía del sistema NextSeq 550 (n.º de documento 15069765)* o *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)*.
  - ▶ Utilice la versión v4.0 del software de control de NextSeq (NCS).
  - ▶ Si se utiliza el NextSeq 550Dx, use el modo de uso exclusivo para investigación.
  - ▶ Configure su experimento de secuenciación en el modo de uso exclusivo para investigación.
  - ▶ Si se utiliza la aplicación de BaseSpace Sequence Hub de la prueba Illumina DRAGEN COVIDSeq, seleccione Run Monitoring (Supervisión del experimento) y la opción Storage as the Configuration (Almacenar como configuración).
  - ▶ Introduzca Single-Read (Lectura única) como Read Type (Tipo de lectura).
  - ▶ Utilice el siguiente número de ciclos y longitudes de índice:
    - ▶ **Read 1** (Lectura 1): introduzca 36 como valor.
    - ▶ **Index 1** (Índice 1) e **Index 2** (Índice 2): introduzca 10 como valor.

# Información de apoyo

Contenido de los kits .....	18
Consumibles y equipos .....	20

## Contenido de los kits

La prueba Illumina COVIDSeq requiere la prueba Illumina COVIDSeq (3072 muestras) y 8 IDT para índices PCR de Illumina.

Componente	Kit	N.º de catálogo
Preparación de bibliotecas	Prueba Illumina COVIDSeq (3072 muestras)	20043675
Índices	IDT para índices PCR de Illumina, juegos 1-4 (384 índices)	20043137

## Prueba Illumina COVIDSeq

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

Tabla 1 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 1 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043645

Cantidad	Volumen de la etiqueta	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	233 ml	ITB	Bolas de calibración de Illumina	Temperatura ambiente

Tabla 2 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 2 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043434

Cantidad	Volumen de la etiqueta	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	55,6 ml	ST2 HT	HT de detención de tampón de tagmentación 2	Temperatura ambiente, entorno de posamplificación

Tabla 3 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 3 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043646

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
2	6,15	EBLTS HT	HT de BLT de enriquecimiento	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación
1	10	RSB HT	HT de tampón de resuspensión	De 2 °C a 8 °C, entorno de posamplificación

Tabla 4 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 4 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043436

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

**Tabla 5 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 5 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043648**

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	45,1	EPH3 HT	HT de mezcla 3HC de elución, cebado y fragmentación	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	100,6	IPM HT	HT de mezcla de PCR de Illumina	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	78,9	EPM HT	HT de mezcla de PCR mejorada	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación

**Tabla 6 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 6 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043647**

Cantidad	Volumen de la etiqueta (ml)	Reactivo	Descripción	Almacenamiento
1	4,6	RVT HT	HT de transcriptasa inversa	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación
1	41,1	FSM HT	HT de mezcla de la primera cadena	De -25 °C a -15 °C, entorno de preamplificación

**Tabla 7 Prueba Illumina COVIDSeq, caja 7 – 3072 muestras, n.º de referencia 20043439**

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	37,6	TB1 HT	HT del tampón de tagmentación 1	De -25 °C a -15 °C, entorno de posamplificación

**Tabla 8 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 posamplificación

## IDT para índices PCR de Illumina, almacenamiento a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C

La prueba Illumina COVIDSeq requiere 8 IDT para índices PCR de Illumina, juegos 1–4 (384 índices) para un total de 96 placas adaptadoras de índices (96 índices, 96 muestras).

Cantidad	Descripción	Número de referencia
8	IDT para índices PCR de Illumina, juego 1 (96 índices)	20043132
8	IDT para índices PCR de Illumina, juego 2 (96 índices)	20043133
8	IDT para índices PCR de Illumina, juego 3 (96 índices)	20043134
8	IDT para índices PCR de Illumina, juego 4 (96 índices)	20043135

## Consumibles y equipos

Además de la prueba Illumina COVIDSeq y el IDT para índices PCR de Illumina, asegúrese de disponer de los consumibles y el equipo 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 catálogo HSP-9601 o equivalente
Placa de 96 pocillos profundos, 2000 µl	Eppendorf, n.º de catálogo 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 catálogo 21905-026 (o equivalente)
Paño humedecido con 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
Uno de los siguientes, en función del método de extracción utilizado: <ul style="list-style-type: none"> <li>Trece kits QIAamp Viral RNA Mini</li> <li>Ocho Quick DNA/RNA Viral MagBead</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Qiagen, n.º de catálogo 52906</li> <li>Zymo Research, n.º de catálogo R2141</li> </ul>
Qubit dsDNA HS Assay Kit	En función del tamaño del kit, uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>ThermoFisher Scientific, n.º de referencia Q32851</li> <li>ThermoFisher Scientific, n.º de referencia Q32854</li> </ul>
Tubos de ensayo Qubit	ThermoFisher Scientific, n.º de catálogo Q32856
Si se utiliza la celda de flujo S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000: <ul style="list-style-type: none"> <li>Dos kits de reactivos S4 del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (200 ciclos)</li> <li>Dos kits de 4 carriles de NovaSeq Xp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina, n.º de catálogo 20027466</li> <li>Illumina, n.º de catálogo 20021665</li> </ul>
Si se utiliza la celda de flujo SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000: <ul style="list-style-type: none"> <li>Cuatro kits de reactivos SP del sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (100 ciclos)</li> <li>Cuatro kits de 2 carriles de NovaSeq Xp</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina, n.º de catálogo 20027464</li> <li>Illumina, n.º de catálogo 20021664</li> </ul>
Si se utiliza el sistema NextSeq 500/550 o el instrumento NextSeq 550Dx: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ocho kits de rendimiento alto de NextSeq 500/550 v2.5 (75 ciclos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina, n.º de catálogo 20024906</li> </ul>

## Equipo

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
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
Servidor de DRAGEN v2 o v3	Illumina
Lo siguiente, en función del método de extracción utilizado: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipo del QIAamp Viral RNA Mini Kit</li> <li>• Quick-DNA/RNA Viral Magbead</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Consulte <i>QIAamp Viral RNA Mini Handbook</i> (n.º de documento HB-0354-006) (en inglés).</li> <li>• Consulte <i>Quick-DNA/RNA Viral MagBead Instruction Manual</i> (en inglés).</li> </ul>
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"> <li>• Dynabeads MPC-S (concentrador de partículas magnéticas)</li> <li>• Gradilla de separación magnética MagnaRack</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo A13346</li> <li>• Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo CS15000</li> </ul>
Microcentrífuga	Proveedor de laboratorio general
Centrifugadora para microplacas	Proveedor de laboratorio general
Plataforma de la celda de flujo de NovaSeq Xp	Illumina, n.º 20021663
Ayuda para pipeta	Proveedor de laboratorio general
Fluorímetro Quibit 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"> <li>• Ciclador térmico C1000 Touch™ con un módulo de reacción rápida de 96 pocillos</li> <li>• Ciclador térmico C1000 Touch™ con un módulo de reacción de 96 pocillos profundos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio-Rad, n.º de referencia 1851196</li> <li>• Bio-Rad, n.º de referencia 1851197</li> </ul>
Rodillo o cuña de sellado	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general



Equipo	Proveedor
Uno de los siguientes sistemas de secuenciación: <ul style="list-style-type: none"><li>• NextSeq 500</li><li>• NextSeq 550</li><li>• NextSeq 550Dx</li><li>• NovaSeq 6000</li></ul>	Illumina

# Asistencia técnica

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

Sitio web: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
Correo electrónico: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Números del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Región	Teléfono gratuito	Regional
Alemania	+49 800 101 49 40	+49 893 803 56 77
Australia	+1 800 77 56 88	
Austria	+43 800 00 62 49	+43 19 28 65 40
Bélgica	+32 80 07 71 60	+32 34 00 29 73
China	400 066 58 35	
Corea del Sur	+82 80 234 53 00	
Dinamarca	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
España	+34 911 89 94 17	+34 800 30 01 43
Finlandia	+358 800 91 83 63	+358 974 79 01 10
Francia	+33 805 10 21 93	+33 170 77 04 46
Hong Kong (China)	800960230	
Irlanda	+353 180 093 66 08	+353 016 95 05 06
Italia	+39 800 98 55 13	+39 236 00 37 59
Japón	0 800 111 50 11	
Norteamérica	+1 800 809 4566	
Noruega	+47 800 168 36	+47 219 396 93
Nueva Zelanda	080 045 16 50	
Países Bajos	+31 800 022 24 93	+31 207 13 29 60
Reino Unido	+44 800 012 60 19	+44 207 305 71 97
Singapur	+1 800 579 2745	
Suecia	+46 850 61 96 71	+46 200 88 39 79
Suiza	+41 565 80 00 00	+41 800 20 04 42
Taiwán, China	00806651752	
Otros países	+44 179 953 40 00	

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

Documentación del producto: Disponible para su descarga de [support.illumina.com](http://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](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

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

© 2020 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

**illumina®**