

Prospecto del paquete

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SOLO PARA EXPORTACIÓN.

Catálogo n.º 20005715

Uso previsto

NextSeq 550Dx instrument está diseñado para la secuenciación de bibliotecas de ADN cuando se usa con ensayos de diagnóstico *in vitro*. NextSeq 550Dx instrument debe utilizarse con reactivos de diagnóstico *in vitro* registrados, certificados o aprobados y software analítico.

Principios del procedimiento

Illumina NextSeq 550Dx instrument está diseñado para la secuenciación de bibliotecas de ADN con ensayos de diagnóstico *in vitro* y para ser utilizado por personal de laboratorio clínico calificado y capacitado formado en el uso de procedimientos de diagnóstico *in vitro* realizados en un laboratorio clínico. Para su entrada, NextSeq 550Dx utiliza bibliotecas generadas a partir de ADN donde se agregan índices de muestra y secuencias de captura a objetivos amplificados. Las bibliotecas de muestras se capturan en una celda de flujo y se secuencian en el instrumento mediante la implementación del proceso químico de secuenciación por síntesis (SBS). El proceso químico de SBS utiliza un método basado en terminadores reversibles para detectar bases de nucleótidos individuales marcadas con fluorescencia a medida que se incorporan en cadenas de ADN en crecimiento. El software Real-Time Analysis (RTA) realiza análisis de imágenes y llamadas de base y asigna una puntuación de calidad a cada base para cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis primario, se puede ejecutar el análisis secundario en el instrumento para procesar llamadas base. NextSeq 550Dx utiliza diferentes módulos de análisis secundarios según el flujo de trabajo. Para los Módulos de variantes somáticas o de línea germinal, el procesamiento incluye demultiplexado, generación de archivos FASTQ, alineación, llamada de variantes y generación de archivos de formato de llamada de variantes (VCF y gVCF). Los archivos VCF y gVCF contienen información sobre variantes encontradas en posiciones específicas en un genoma de referencia.

Configuración de arranque doble

NextSeq 550Dx incluye una configuración de arranque doble para permitir el uso del instrumento en modo de diagnóstico (Dx) o de uso exclusivo para investigación (RUO). Los ensayos de secuenciación de diagnóstico *in vitro*, incluidos los Módulos de variantes somáticas y de línea germinal, se ejecutan en modo de diagnóstico. Solo se pueden utilizar reactivos de secuenciación IVD en el modo de diagnóstico. Las características de rendimiento y las limitaciones del procedimiento para NextSeq 550Dx instrument se establecieron a partir de los Módulos de variantes somáticas y de línea germinal en modo de diagnóstico.

Limitaciones del procedimiento

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Los módulos de variantes somáticas y de línea germinal, cuando se utilizan con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) o NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos), pueden ofrecer:
 - Salida de secuenciación ≥ 90 gigabases (Gb)
 - Longitud de lectura (en ejecución de extremo emparejado) 2 x 150 pares de bases (pb)
 - Bases iguales o mayores que Q30 ≥ 75 % a una longitud de lectura de 2 x 150 pb
El 75 % o más de las bases tienen puntuaciones de calidad de la escala de Phred ≥ 30 , lo que indica una precisión de llamadas base superior al 99,9 %.
3. Las lecturas con indels (inserciones, deleciones o combinaciones) donde la longitud del contenido es > 25 pb no están alineadas con el software del ensayo. En consecuencia, los indels de longitud > 25 pb pueden ser detectados por el software del ensayo.
4. Es posible que el software del ensayo no alinee las lecturas de amplicones con el contenido de la variante de extremos, por lo que se informará que la región está en estado natural. Dicho contenido extremo incluye:
 - Lecturas que contienen más de tres indels.
 - Lecturas de longitud de al menos 30 pb con contenido de variante de nucleótido único (SNV) > 4 % de la longitud objetivo total del amplicón (excluidas las regiones de sonda).
 - Lecturas de longitud < 30 pb con contenido de SNV > 10 % de la longitud total del amplicón (incluidas las regiones de sonda).
5. Las variantes grandes, incluidas las variantes de nucleótidos múltiples (MNV) y los indels grandes, podrían informarse como variantes más pequeñas separadas en el archivo VCF de salida.
6. Las variantes de deleción pueden filtrarse o pasarse por alto al abarcar dos amplicones en mosaico si la longitud de deleción es mayor o igual que la superposición entre los amplicones en mosaico.
7. El sistema no puede detectar indels si ocurren directamente adyacentes a un cebador y no hay amplicones superpuestos. Para las regiones con amplicones superpuestos, el ensayo no puede detectar deleciones cuando la región de superposición es menor que el tamaño de la deleción que se desea detectar. Por ejemplo, si la región de solapamiento entre dos amplicones adyacentes es dos bases, el ensayo no puede detectar ninguna deleción que incluya a dichas bases. Se puede detectar una única deleción de base en cualquiera de esas bases.
8. Al igual que con cualquier flujo de trabajo de preparación de biblioteca basado en hibridación, los polimorfismos, las mutaciones, las inserciones o las deleciones subyacentes en regiones de unión a oligonucleótidos pueden afectar los alelos que se sondan y las llamadas realizadas durante la secuenciación. Por ejemplo:
 - Una variante en fase con una variante en la región del cebador podría no amplificarse, lo que genera un falso negativo.

- Las variantes en la región del cebador podrían evitar la amplificación del alelo de referencia, lo que genera una llamada de variante homocigótica incorrecta.
 - Las variantes indel en la región del cebador pueden causar una llamada de falso positivo al final de la lectura adyacente al cebador.
9. Los indels pueden filtrarse debido al sesgo de la cadena si se producen cerca del final de una lectura y se cortan suavemente durante la alineación.
10. Las MNV pequeñas no se han validado y solo se informan en el Módulo de variantes somáticas.
11. Las deleciones se informan en el VCF en la coordenada de la base anterior según el formato del VCF. Por lo tanto, tenga en cuenta las variantes adyacentes antes de informar que una llamada base individual es una referencia homocigótica.
12. Limitaciones específicas de la línea germinal:
- NextSeq 550Dx instrument, que utiliza el Módulo de variantes de línea germinal Local Run Manager para NextSeq 550Dx, está diseñado para proporcionar resultados cualitativos para las llamadas de variantes de línea germinal (p. ej., homocigótico, heterocigótico, en estado natural).
 - Cuando se utiliza con el Módulo de variantes de línea germinal, la cobertura mínima por amplicón necesaria para una llamada de variantes precisa es de 150x. Como resultado, se requieren 150 fragmentos de ADN de respaldo, lo que equivale a 300 lecturas de extremos emparejados superpuestos. El número de muestras y el número total de bases objetivo afectan la cobertura. El contenido de GC y otro contenido genómico pueden afectar la cobertura.
 - La variación del número de copias puede determinar si una variante se identifica como homocigótica o heterocigótica.
 - Las variantes en cierto contexto repetitivo se filtran de los archivos VCF. El filtro de repetición RMxN se usa para filtrar variantes si la totalidad o una parte de la secuencia de variantes está presente repetidamente en el genoma de referencia adyacente a la posición de la variante. Para las llamadas de variantes de línea germinal, se requieren al menos nueve repeticiones en la referencia para que se filtre una variante. Solo se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 5 pb (R5x9).
 - Un indel y una SNV en un solo locus pueden dar lugar a que se informe solo una variante.
13. Limitaciones específicas de la somática.
- NextSeq 550Dx instrument, que utiliza el Módulo de variantes somáticas Local Run Manager para NextSeq 550Dx, está diseñado para proporcionar resultados cualitativos para las llamadas de variantes somáticas (p. ej., presencia de una variante somática con una frecuencia de variantes mayor o igual a 0,026 con un límite de detección de 0,05).
 - Cuando se utiliza con el Módulo de variantes somáticas, la cobertura mínima por amplicón necesaria para una llamada de variantes precisa es de 450x por grupo de oligonucleótidos. Como resultado, se requieren 450 fragmentos de ADN de respaldo por grupo de oligonucleótidos, lo que equivale a 900 lecturas de extremos emparejados superpuestos. El número de muestras y el número total de bases objetivo afectan la cobertura. El contenido de GC y otro contenido genómico pueden afectar la cobertura.

- Para las llamadas de variantes somáticas, se requieren al menos seis repeticiones en la referencia para que la variante se filtre, y solo se tienen en cuenta las repeticiones con una longitud de hasta 3 pb (R3x6).
- El Módulo de variantes somáticas no puede diferenciar entre las variantes de línea germinal y las variantes somáticas. El módulo está diseñado para detectar variantes en un rango de frecuencias de variantes, pero la frecuencia de variantes no puede usarse para diferenciar las variantes somáticas de las variantes de la línea germinal.
- El tejido normal en la muestra afecta la detección de variantes. El límite de detección informado se basa en una frecuencia de variantes en relación con el ADN total extraído, tanto del tumor como del tejido normal.

Componentes del producto

Illumina NextSeq 550Dx consta de lo siguiente:

1. NextSeq 550Dx instrument (Catálogo n.º 20005715)
2. Componentes de software para NextSeq 550Dx instrument, incluidos los siguientes:

Aplicación de software	Función	Descripción
Software operativo NextSeq 550Dx (NOS)	Controla el funcionamiento del instrumento	La aplicación de software NOS gestiona el funcionamiento del instrumento durante la secuenciación y genera imágenes para que las use el software Real-Time Analysis (RTA).
Software Real-Time Analysis (RTA)	Realiza el análisis principal	La aplicación de software RTA convierte las imágenes generadas por NOS para cada mosaico por ciclo de la ejecución de secuenciación en archivos de llamada base, que son entradas para los módulos de análisis de Local Run Manager. La aplicación de software RTA no contiene una interfaz de usuario.
Local Run Manager	Interfaz para la selección de módulos	El software Local Run Manager es una solución integrada en el instrumento para la gestión de usuarios, la selección del módulo de análisis adecuado y la supervisión del estado.

Aplicación de software	Función	Descripción
Módulo de variante somática	Realiza el análisis secundario	Este software del módulo de análisis de Local Run Manager procesa las llamadas base con análisis secundarios. El procesamiento incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, la llamada de variantes y la generación de informes. El llamador de variantes (Pisces) genera archivos VCF que contienen información sobre las variantes encontradas en posiciones específicas de un genoma de referencia e incluye la medición de la frecuencia de variantes.
Módulo de variante de línea germinal	Realiza el análisis secundario	Este software del módulo de análisis de Local Run Manager procesa las llamadas base con análisis secundarios. El procesamiento incluye el demultiplexado, la generación de archivos FASTQ, la alineación, la llamada de variantes y la generación de informes. El llamador de variantes (Pisces) genera archivos VCF que contienen información sobre las variantes encontradas en posiciones específicas de un genoma de referencia e identifica cada variante como heterocigótica u homocigótica.

3. **Opcional** Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx (Catálogo n.º 20086130), incluido el siguiente componente de software:

Aplicación de software	Función	Descripción
Illumina Run Manager	Interfaz para la selección del módulo de aplicaciones	El software Illumina Run Manager se instala en el servidor opcional DRAGEN fuera del instrumento. Illumina Run Manager permite la gestión de usuarios, la selección del módulo de análisis y el control de la ejecución de secuenciación y del estado del análisis.

Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx opcional solo está disponible en determinados países. Comuníquese con un representante de Illumina para conocer la disponibilidad en su región.

Condiciones operativas

Para obtener más información sobre las condiciones operativas, consulte la sección Consideraciones ambientales en la *Guía de preparación del sitio de NextSeq 550Dx Instrument (documento n.º 1000000009869)*.

Elemento	Especificación
Temperatura	Mantenga una temperatura de laboratorio de 19 °C a 25 °C (22 °C ± 3 °C). Esta temperatura es la temperatura operativa del instrumento. Durante la operación, no permita que la temperatura ambiente varíe más de aproximadamente 2 °C.
Humedad	Mantenga una humedad relativa sin condensación entre 20 y 80 %.

Para obtener las últimas pautas de seguridad, alertas e información para sistemas de Illumina, consulte [Seguridad y redes](#).

Equipos y materiales

Equipos y materiales requeridos, se venden por separado

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciclos), catálogo n.º 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos), catálogo n.º 20028871

Equipo y materiales requeridos, no proporcionados

Insumos suministrados por el usuario para ejecuciones de secuenciación

Insumo	Proveedor	Objetivo
Toallitas con alcohol, isopropílico al 70 % o bien Etanol al 70 %	VWR, catálogo n.º 95041-714 (o equivalente) Proveedor general de laboratorio	Limpieza de celdas de flujo y uso general
Tejido de laboratorio, baja pelusa	VWR, catálogo n.º 21905-026 (o equivalente)	Limpieza de celdas de flujo y uso general

Insumos suministrados por el usuario para el mantenimiento de instrumentos

Insumo	Proveedor	Objetivo
NaOCl, 5 % (hipoclorito de sodio)	Sigma-Aldrich, catálogo n.º 239305 (o equivalente de grado de laboratorio)	Lavado del instrumento con el lavado manual posterior a la ejecución; diluido al 0,12 %

Insumo	Proveedor	Objetivo
Tween 20	Sigma-Aldrich, catálogo n.º P7949	Lavado del instrumento con las opciones de lavado manual; diluido al 0,05 %
Agua, grado de laboratorio	Proveedor general de laboratorio	Lavado del instrumento (lavado manual)
Filtro de aire	Illumina, catálogo n.º 20063988	Limpieza del aire que el instrumento toma para enfriar

Pautas para el agua de grado de laboratorio

Utilice siempre agua de grado de laboratorio o agua desionizada para realizar los procedimientos del instrumento. Nunca use agua del grifo. Utilice solo los siguientes grados de agua o equivalentes:

- agua desionizada
- Illumina PW1
- agua con 18 megaohmios (MΩ)
- agua Milli-Q
- agua Super-Q
- agua de grado de biología molecular

Advertencias y precauciones



PRECAUCIÓN

La ley federal restringe la venta de este dispositivo por parte de un médico u otro profesional autorizado por la ley del estado en el que ejerce, o por orden de estos, para usar u ordenar el uso del dispositivo.

1. **Algunos componentes de los reactivos proporcionados por Illumina para su uso con NextSeq 550Dx instrument contienen sustancias químicas potencialmente peligrosas. Pueden producirse heridas por inhalación, ingestión y contacto con la piel y los ojos. Use equipo de protección, incluidos protección ocular, guantes y bata de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de acuerdo con las leyes y reglamentaciones regionales, nacionales y locales aplicables.** Para obtener información adicional sobre el medio ambiente, la salud y la seguridad, consulte las Hojas de datos de seguridad (SDS) en support.illumina.com/sds.html.
2. Manipule todas las muestras de sangre como si se supiera que están infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B humana (VHB) y otros agentes patógenos transmitidos por la sangre (precauciones universales).

3. No seguir los procedimientos descritos puede generar resultados erróneos o una reducción significativa de la calidad de la muestra.
4. Tome las precauciones de laboratorio de rutina. No pipetee por la boca. No coma, beba ni fume en las áreas de trabajo designadas. Use guantes y batas de laboratorio descartables cuando manipule muestras y reactivos del kit. Lávese bien las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
5. Se requieren prácticas de laboratorio adecuadas y una buena higiene del laboratorio para evitar que los productos de PCR contaminen los reactivos, la instrumentación y las muestras de ADN genómico. La contaminación de PCR puede causar resultados inexactos y poco fiables.
6. Para evitar la contaminación, asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación tengan equipos e insumos exclusivos (p. ej., pipetas, puntas de pipetas, bloques térmicos, vórtices y centrifugas).
7. El emparejamiento de índice a muestra debe coincidir exactamente con la disposición de la placa impresa. Local Run Manager completa automáticamente los cebadores de índice asociados con los nombres de la muestra cuando se la ingresa en el módulo. Se recomienda al usuario verificar que los cebadores de índice se asocien con las muestras antes de comenzar la ejecución de secuenciación. Las discrepancias entre la muestra y la disposición de la placa provocan la pérdida de la identificación positiva de la muestra y un informe incorrecto de resultados.
8. Se recomienda especialmente instalar el software antivirus suministrado por el usuario para proteger la computadora contra virus. Consulte el manual del usuario para conocer las instrucciones sobre la instalación.
9. No opere NextSeq 550Dx sin que estén todos los paneles en su lugar. Operar el instrumento sin que estén todos los paneles en su lugar crea una posible exposición al voltaje de línea y al voltaje de CC.
10. No toque la platina de la celda de flujo en el compartimento de la celda de flujo. El calentador de este compartimento funciona entre 22 °C y 95 °C y puede provocar quemaduras.
11. El instrumento pesa aproximadamente 185 libras y puede ocasionar lesiones graves si se cae o manipula de manera inapropiada.
12. Illumina reconoce la necesidad continua de gestionar las amenazas de ciberseguridad; para obtener las últimas pautas de seguridad, alertas e información para sistemas Illumina, consulte [Seguridad y redes](#).

Instrucciones de uso

Las siguientes instrucciones de uso de NextSeq 550Dx instrument requiere reactivos que se proporcionan en NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) o en NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciclos).

Crear ejecución

Cree una ejecución de secuenciación usando Local Run Manager o Illumina Run Manager. Las instrucciones de uso de Local Run Manager se incluyen a continuación y en la Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (documento n.º 100000009513). Para obtener instrucciones sobre cómo crear una ejecución con Illumina Run Manager, consulte la Guía de software Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (documento n.º 200025239).

Para obtener instrucciones sobre cómo seleccionar entre Local Run Manager o Illumina Run Manager, consulte la Guía de software Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (documento n.º 200025239). Para obtener instrucciones detalladas sobre aplicaciones específicas, consulte el módulo o la guía de aplicación del ensayo específico.

Las siguientes instrucciones corresponden al uso de los Módulos de variantes somáticas y de línea germinal de Local Run Manager.

Configuración de parámetros

1. Inicie sesión en Local Run Manager.
2. Seleccione **Create Run** (Crear ejecución) y seleccione **Somatic Variant** (Variante somática) o **Germline Variant** (Variante de línea germinal).
3. Ingrese un nombre de ejecución que identifique la ejecución, desde la secuenciación hasta el análisis. Utilice caracteres alfanuméricos, espacios, guiones bajos o guiones.
4. [Opcional] Ingrese una descripción de la ejecución para ayudar a identificarla. Utilice caracteres alfanuméricos, espacios, guiones bajos o guiones.
5. Seleccione el número de muestras y el conjunto de índices de la lista desplegable. Tenga en cuenta la siguiente información cuando haga una selección.
 - La lista desplegable contiene números de muestras con un conjunto de índices. Por ejemplo, 24-Set 1 indica 24 muestras que se analizarán con índices del conjunto de índices 1.
 - Los números de los conjuntos de índices se refieren a diferentes conjuntos de pares de índices i5 e i7. El conjunto 1 y el conjunto 2 proporcionan diversidad de índices. Se ofrecen dos conjuntos de índices para ayudar a prevenir la depleción de un solo conjunto.
 - Elija el número de muestras más cercano al número de muestras que está analizando. Si el número exacto de muestras no está en la lista, seleccione el número más cercano, pero menos que el número que está analizando. Por ejemplo, si desea analizar 18 muestras, seleccione 16 muestras.
 - Las combinaciones de pocillos de muestra e índices sugeridas que cumplen con los requisitos de diversidad de índices están resaltadas de color verde.

Importar archivos de manifiesto para la ejecución

1. Asegúrese de que los manifiestos que desee importar estén disponibles en una ubicación de red accesible o en una unidad USB.
2. Seleccione **Import Manifests** (Importar manifiestos).
3. Navegue hasta el archivo de manifiesto y seleccione los manifiestos que desea agregar.

NOTA Para que los archivos de manifiesto estén disponibles para todas las ejecuciones utilizando el Módulo de análisis de variante de la línea germinal o variante somática, agregue manifiestos utilizando la función Module Settings (Configuración del módulo). Esta función requiere permisos de nivel de usuario administrador. Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (documento n.º 1000000009513)*.

Especificar muestras para la ejecución

Especifique muestras para la ejecución utilizando una de las opciones y las instrucciones siguientes.

Ingresar muestras manualmente: utilice la tabla en blanco en la pantalla Create Run (Crear ejecución).

Importar muestras: navegue a un archivo externo con un formato de valores separados por comas (*.csv). Hay una plantilla disponible que puede descargar desde la pantalla Create Run (Crear ejecución).

Ingresar muestras manualmente

1. Ingrese un nombre de muestra (*módulo de análisis de variante somática*) o una identificación de muestra (*módulo de análisis de variante de línea germinal*) únicos.
Utilice caracteres alfanuméricos, guiones o guiones bajos.
2. [Opcional] Para muestras de control positivo o negativo, haga clic con el botón derecho y seleccione el tipo de control.
El control en un pocillo de muestra completa automáticamente el pocillo correspondiente en el otro grupo con el mismo control.
3. [Opcional] Ingrese una descripción de la muestra en el campo Descripción de la muestra.
Utilice caracteres alfanuméricos, guiones o guiones bajos.
4. Seleccione un adaptador del Índice 1 de la lista desplegable del Index 1 (i7) [Índice 1 (i7)].
Cuando utiliza pocillos de muestra sugeridos, el software completa automáticamente los adaptadores de índice i7 e i5 que cumplen con los requisitos del índice de diversidad. Si el número exacto de muestras que está analizando no está en la lista, asegúrese de seleccionar adaptadores de índice para los pocillos adicionales.
5. Seleccione un adaptador del Índice 2 de la lista desplegable del Index 2 (i5) [Índice 2 (i5)].
6. Seleccione un archivo de manifiesto de la lista desplegable Manifiesto.
Las muestras en el Grupo A requieren un manifiesto diferente al de las muestras en el Grupo B.
7. Elija una opción para ver, imprimir o guardar la disposición de la placa como referencia para preparar bibliotecas:
 - Seleccione el ícono  **Print** (Imprimir) para mostrar la disposición de la placa. Seleccione **Print** (Imprimir) para imprimir la disposición de la placa.
 - Seleccione **Export** (Exportar) para exportar información de la muestra a un archivo externo.
8. Seleccione **Save Run** (Guardar ejecución).

Importar muestras

1. Seleccione **Import Samples** (Importar muestras) y busque la ubicación del archivo de información de la muestra. Hay dos tipos de archivos que puede importar.
 - Seleccione **Template** (Plantilla) en la pantalla Create Run (Crear ejecución) para crear una nueva disposición de placa. El archivo de plantilla contiene los encabezados de columna correctos para importar. Ingrese la información de la muestra en cada columna para las muestras en la ejecución. Elimine la información de ejemplo en las celdas no utilizadas y luego guarde el archivo.
 - Utilice un archivo de información de la muestra que se exportó desde el Módulo de variantes de línea germinal o variantes somáticas utilizando la función Export (Exportar).
2. Seleccione el ícono  **Print** (Imprimir) para mostrar la disposición de la placa.
3. Seleccione **Print** (Imprimir) para imprimir la disposición de la placa como referencia para preparar bibliotecas.
4. Seleccione **Save Run** (Guardar ejecución).

Preparación del cartucho de reactivos

Asegúrese de seguir cuidadosamente las instrucciones del cartucho de reactivos para lograr una secuenciación exitosa.

1. Retire el cartucho de reactivos del almacenamiento de -25 °C a -15 °C.
2. Elija uno de los siguientes métodos para descongelar los reactivos. No sumerja el cartucho. Después de descongelar el cartucho, séquelo antes de continuar con el siguiente paso.

Temperatura	Tiempo hasta la descongelación	Límite de estabilidad
Baño de agua de 15 °C a 30 °C	60 minutos	No debe exceder las 6 horas
2 °C a 8 °C*	7 horas	No debe exceder los 5 días

NOTA Si va a descongelar más de un cartucho en el mismo baño de agua, espere más tiempo para la descongelación.

3. Invierta el cartucho cinco veces para mezclar los reactivos.
4. Inspeccione la parte inferior del cartucho para asegurarse de que los reactivos estén descongelados y libres de precipitados. Confirme que las posiciones 29, 30, 31 y 32 estén descongeladas, ya que son las más grandes y tardan más en descongelarse.
5. Golpee suavemente la mesa para reducir las burbujas de aire.
Para obtener mejores resultados, proceda directamente a cargar la muestra y configurar la ejecución.

Preparación de la celda de flujo

1. Retire una nueva caja celda de flujo del almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

2. Retire el embalaje metálico de la caja y déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.

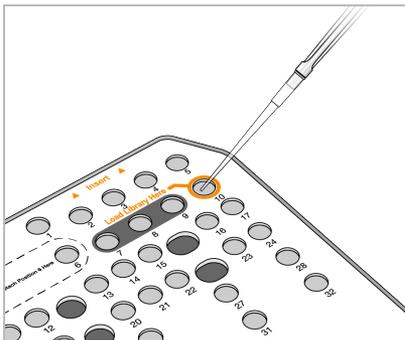
Preparación de bibliotecas para la secuenciación

Desnaturalice y diluya sus bibliotecas hasta un volumen de carga de 1,3 ml. En la práctica, la concentración de carga puede variar según los métodos de preparación y cuantificación de la biblioteca. La dilución de las bibliotecas de muestras depende de la complejidad de los grupos de oligonucleótidos. Para obtener instrucciones sobre cómo preparar bibliotecas de muestras para la secuenciación, incluida la dilución y agrupación de bibliotecas, consulte la sección Instrucciones de uso para el kit de preparación de bibliotecas correspondiente. Se requiere la optimización de la densidad de clúster en NextSeq 550Dx.

Cargar bibliotecas en el cartucho de reactivos

1. Limpie el sello de aluminio que cubre el depósito n.º 10 etiquetado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí) con un paño de papel que desprenda poca pelusa.
2. Perfore el sello con una punta de pipeta limpia de 1 ml.
3. Cargue 1,3 ml de bibliotecas preparadas en el depósito n.º 10 etiquetado **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí). Evite tocar el sello de aluminio mientras dispensa las bibliotecas.

Figura 1 Cargar bibliotecas



Configuración de una ejecución de secuenciación

Consulte el Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (documento n.º 1000000009513) para conocer las instrucciones completas de configuración de la ejecución.

1. Inicie sesión en NextSeq 550Dx con su contraseña del software Local Run Manager o Illumina Run Manager.
2. En la pantalla Home (Inicio) del software NOS, seleccione **Sequence** (Secuencia).
3. Seleccione una ejecución de la lista y luego seleccione **Next** (Siguiendo).
Aparecerá una serie de pantallas de configuración de la ejecución en el siguiente orden: Celda de flujo de carga, cartucho de solución amortiguadora de carga, cartucho de reactivo de carga y verificación previa a la ejecución.

NOTA Solo se puede acceder a las ejecuciones utilizando el mismo Run Manager utilizado al planificar la ejecución. Para obtener instrucciones sobre cómo configurar el software Run Manager, consulte Guía de software Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (documento n.º 200025239).

4. Cuando aparezca la pantalla Load Flow Cell (Cargar la celda de flujo), limpie y luego cargue la celda de flujo.
 - Retire la celda de flujo del envase de aluminio.
 - Abra el paquete de plástico transparente doble y retire la celda de flujo.
 - Limpie la superficie de vidrio de la celda de flujo con una toallita con alcohol sin pelusa. Seque el vidrio con un tejido de laboratorio de baja pelusa.
 - Asegúrese de que la superficie de vidrio de la celda de flujo esté limpia. Si es necesario, repita el paso de limpieza.
 - Retire la celda de flujo utilizada en una ejecución anterior.
 - Alinee la celda de flujo sobre los pasadores de alineación y coloque la celda de flujo en la platina.
5. Seleccione **Load** (Cargar).

La puerta se cierra automáticamente, la ID de la celda de flujo aparece en la pantalla y los sensores se verifican.
6. Siga las instrucciones del software para vaciar el contenedor de reactivos gastados, cargar el cartucho de la solución amortiguadora de NextSeq 550Dx y cargar el cartucho de reactivos de NextSeq 550Dx.

Cuando se cargan los cartuchos de solución amortiguadora y reactivos en NextSeq 550Dx, el software lee y registra la RFID. Los ID de los cartuchos de reactivos y solución amortiguadora aparecen en la pantalla y se verifican los sensores.
7. Cuando se complete la verificación automática previa a la ejecución, seleccione **Start** (Iniciar). (No se requiere si está configurado para iniciarse automáticamente).
8. Cuando comienza la ejecución, se abre la pantalla Sequencing (Secuenciación). Esta pantalla proporciona una representación visual de la ejecución en curso, incluidas las intensidades y las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q).

Resultados

El Real-Time Analysis (RTA) es un software integrado que realiza análisis de imágenes y llamadas base y asigna una puntuación de calidad a cada base para cada ciclo de secuenciación. Cuando finaliza el análisis primario, el módulo de aplicación seleccionado comienza el análisis secundario automáticamente. Los procesos de análisis secundarios descritos aquí son para los módulos de variante somática y de línea germinal de Local Run Manager en NextSeq 550Dx instrument.

Demultiplexado

El demultiplexado compara cada secuencia de Lectura de índice con las secuencias de índice especificadas para la ejecución. En este paso, no se tienen en cuenta los valores de calidad.

Las lecturas de índice se identifican utilizando los siguientes pasos:

- Las muestras se numeran a partir del 1 en función del orden en que se preparan para la ejecución.
- El número de muestra 0 se reserva para los clústeres que no fueron asignados a una muestra.
- Los clústeres se asignan a una muestra cuando la secuencia del índice coincide exactamente o cuando hay hasta una única discrepancia por Lectura de índice.

Generación de archivo FASTQ

Después del demultiplexado, el software genera archivos de análisis intermedios en el formato FASTQ, que es un formato de texto utilizado para representar secuencias. Los archivos FASTQ contienen lecturas para cada muestra y las puntuaciones de calidad asociadas. Se excluyen los clústeres que no pasaron el filtro.

Cada archivo FASTQ contiene lecturas para solo una sola muestra, y el nombre de esa muestra se incluye en el nombre del archivo FASTQ. En los Módulos de variantes somáticas y de línea germinal, se generan ocho archivos FASTQ por muestra por grupo de oligonucleótidos, cuatro de la Lectura 1 y cuatro de la Lectura 2. Esta salida da como resultado un total de 8 y 16 archivos FASTQ por muestra para línea germinal y somáticas, respectivamente. Los archivos FASTQ son la entrada principal para la alineación.

Alineación

Durante el paso de alineación, el algoritmo Smith-Waterman con bandas alinea los grupos de cada muestra con las secuencias de amplicones especificadas en el archivo manifiesto.

El algoritmo Smith-Waterman con bandas realiza alineaciones de secuencias semiglobales para determinar regiones similares entre dos secuencias. En lugar de comparar la secuencia total, el algoritmo de Smith-Waterman compara segmentos de todas las longitudes posibles.

Cada lectura de extremo emparejado se evalúa en términos de su alineación con las secuencias de sonda relevantes para esa lectura.

- La lectura 1 se evalúa teniendo en cuenta el complemento inverso de los oligonucleótidos descendentes de locus específico (DLSO).
- La lectura 2 se evalúa teniendo en cuenta los oligonucleótidos ascendentes de locus específico (ULSO).
- Si el comienzo de una lectura coincide con una secuencia de sonda con solo una discrepancia, la longitud completa de la lectura se alinearán con el objetivo de amplicones de dicha secuencia.
- Si el comienzo de una lectura observa una coincidencia con la secuencia de sonda con menos de tres diferencias (discrepancias o cambios producidos por las indels principales), la longitud completa de la lectura se alinearán con el amplicón objetivo de esa secuencia.

- Las indels dentro de los DLSO y de los ULSO no se observan debido a los procesos químicos del ensayo.

Las alineaciones se filtran teniendo en cuenta los resultados de alineación, que se basan en los índices de discrepancia que se encuentran en la región de interés o en el amplicón completo, según la longitud de este último. Las alineaciones filtradas se escriben en los archivos de alineación como no alineadas y no se utilizan para la llamada de variantes.

Nombre de la variante

El llamador de la variante Pisces está diseñado para realizar llamadas de variantes de SNV e indel desde bibliotecas preparadas para el instrumento.

Informes y archivos de salida adicionales

Los módulos de análisis de variantes producen informes en formato PDF y delimitados por tabulaciones (*.txt) que muestran métricas como la profundidad de secuenciación y los recuentos de variantes. Los módulos también producen archivos de salida como archivos de formato de llamada de variante de genoma (gVCF) y VCF para aplicaciones de llamada de variante.

Procedimientos de control de calidad

El software de NextSeq 550Dx evalúa cada ejecución, muestra y llamada base en comparación con las métricas de control de calidad. También se recomienda hacer y evaluar controles positivos y negativos en la preparación de la biblioteca. Evalúe los controles de la siguiente manera:

- Control negativo (sin control de plantilla) u otro control negativo:** debe generar el resultado esperado. Si el control negativo genera un resultado diferente a lo esperado, entonces se es posible que se haya producido un error en el seguimiento de la muestra, se haya registrado incorrectamente a los cebadores de indexación o se haya producido una contaminación.
- Muestra de control positivo:** debe generar el resultado esperado. Si el control negativo genera un resultado diferente a lo esperado, entonces se es posible que se haya producido un error en el seguimiento de la muestra o se haya registrado incorrectamente a los cebadores de indexación.

Características de rendimiento

Las características de rendimiento para NextSeq 550Dx instrument se establecieron utilizando los Módulos de variante somática y de línea germinal con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y se confirmaron utilizando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Los estudios incluyeron indexación de muestras, arrastre de muestras, entrada de ADN, sensibilidad analítica (límite de blanco/límite de detección), exactitud, precisión, comparación de métodos y reproducibilidad.

Los estudios analíticos que utilizan NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) se diseñaron para evaluar las afirmaciones de rendimiento previamente establecidas con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). Los resultados demuestran que los kits de reactivos (v2 y v2.5) tienen un rendimiento comparable utilizando el TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Consulte el *prospecto del TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* para conocer las características de rendimiento relacionadas con factores preanalíticos, como métodos de extracción o sustancias que interfieren.

Definiciones de cálculos utilizados en las características de rendimiento

1. La Concordancia de porcentaje positivo (PPA) se calcula como la proporción de loci clasificados como variantes por un método de referencia que el ensayo informa correctamente.
 - $(\text{N.º de loci de variantes informados correctamente por el ensayo}) / (\text{N.º total de loci de variantes})$
Los loci de variantes informados por el ensayo que concuerdan con el método de referencia son positivos verdaderos (TP). Los loci de variantes informados como llamadas de referencia o como llamadas de variantes diferentes por el ensayo son falsos negativos (FN).
2. La Concordancia de porcentaje negativo (NPA) se calcula como la proporción de loci clasificados como en estado natural por un método de referencia que el ensayo informa correctamente.
 - $(\text{N.º de loci en estado natural informados correctamente por el ensayo}) / (\text{N.º total de loci en estado natural})$
Los loci en estado natural informados por el ensayo que concuerdan con el método de referencia son verdaderos negativos (TN). Los loci en estado natural informados como variantes por el ensayo son falsos positivos (FP).
3. La Concordancia porcentual general (OPA) se calcula como la proporción de loci informados correctamente por el ensayo en relación con un método de referencia.
 - $([\text{N.º de loci de variante informados correctamente por el ensayo}] + [\text{N.º de loci en estado natural informados correctamente por el ensayo}]) / ([\text{N.º total de loci de variantes}] + [\text{N.º total de loci en estado natural}])$
4. Los cálculos de PPA, NPA y OPA no incluyen ninguna llamada (loci de variantes o de referencia que no cumplen con uno o más filtros de calidad).
5. El índice de llamada de autosoma se calcula como el número total de loci que pasan los filtros dividido por el número total de posiciones secuenciadas para los cromosomas 1–22; se excluyen los cromosomas X e Y. Esta métrica no considera la concordancia de las llamadas con el método de referencia.

Rendimiento de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos)

Indexación de muestras

Los cebadores de índice de muestra, agregados durante la preparación de la biblioteca, asignan una secuencia única a cada ADN de muestra. Estas secuencias únicas permiten agrupar varias muestras en una sola ejecución de secuenciación. La indexación de muestras se utiliza para flujos de trabajo de variantes somáticas y de línea germinal. El propósito de este estudio era establecer el número mínimo (8) y máximo (96) de muestras que pueden procesarse en una sola secuenciación ejecutada por NextSeq 550Dx instrument. Se analizaron ocho muestras únicas de Platinum Genomes con 12 combinaciones diferentes de cebadores de indexación por muestra. Los resultados de las muestras de cuatro ejecuciones de secuenciación utilizando el Módulo de variantes de línea germinal se compararon con Platinum Genomes, versión 2016-1.0.

Para el primer conjunto de ejecuciones, se analizaron 96 bibliotecas de muestras indexadas de manera única con un ensayo representativo diseñado para consultar una variedad de genes que cubren 12 588 bases por cadena en los 23 cromosomas humanos para verificar la capacidad del ensayo para hacer una llamada de genotipificación de manera consistente para una muestra dada en diferentes combinaciones de cebadores de indexación. Para el segundo conjunto de ejecuciones, se secuenciaron ocho bibliotecas de muestras indexadas de manera única en dos ejecuciones de secuenciación para verificar el número mínimo de índices admitidos.

Para las ejecuciones de 96 índices, la PPA para las SNV osciló entre el 98,7 % y el 100 %, la PPA para las inserciones y deleciones fue del 100 % y la NPA fue del 100 % para cada una de las 96 combinaciones de índices. Las ejecuciones de 8 índices tuvieron valores de PPA del 100 % (SNV, inserciones y deleciones) y NPA del 100 % para cada una de las ocho combinaciones de índices.

Arrastre de muestras

NextSeq 550Dx instrument permite hacer la secuenciación de múltiples muestras y controles en una sola ejecución de secuenciación. Se realizó un estudio para evaluar el alcance del arrastre de muestras dentro de una ejecución de secuenciación (dentro de la ejecución) y entre las ejecuciones de secuenciación (de ejecución a ejecución). Se analizaron dos muestras de Platinum Genomes, un macho y una hembra, con un ensayo representativo diseñado para consultar varios genes que cubren 12 588 bases (150 amplicones) en 23 cromosomas diferentes, incluidos ambos cromosomas sexuales. Las bibliotecas se secuenciaron en NextSeq 550Dx instrument utilizando el Módulo de variantes de línea germinal. El arrastre de muestras de machos a muestras de hembras se observó mediante la presencia de lecturas de amplicones del cromosoma Y en las muestras de hembras.

El arrastre dentro de la ejecución se puede hacer durante la generación del clúster, la llamada base del ciclo de índice y el demultiplexado de muestras. Para la prueba del arrastre de muestras dentro de una ejecución de secuenciación, se secuenció una vez un grupo de bibliotecas que consistió en 46 réplicas de cada una de las muestras macho y hembra más cuatro controles sin plantilla en NextSeq 550Dx instrument. El arrastre de

muestras dentro de la ejecución se evaluó mediante la comparación de la cobertura de amplicones del cromosoma Y de cada réplica hembra con la cobertura promedio de amplicones del cromosoma Y de todas las réplicas masculinas en el grupo. La mediana de arrastre dentro de la ejecución observada fue del 0,084 %.

Para las pruebas de arrastre de muestras de ejecución a ejecución, se prepararon dos grupos de bibliotecas y se secuenciaron consecutivamente en NextSeq 550Dx instrument. El primer grupo contenía 46 réplicas de muestras hembra más dos controles sin plantilla. El segundo grupo contenía 46 réplicas de muestras macho más dos controles sin plantilla. Ambos grupos utilizaron el mismo conjunto de adaptadores de índice. Primero se secuenció el grupo de hembras, seguido de una ejecución de secuenciación posterior con el grupo de machos, seguida de otra ejecución de secuenciación repetida del grupo de hembras. El arrastre de la muestra de ejecución a ejecución se evaluó comparando la cobertura del amplicón del cromosoma Y entre las réplicas correspondientes de la ejecución repetida del grupo de hembras y la ejecución del grupo de machos. La mediana de arrastre de ejecución a ejecución observada fue del 0,0076 %.

Entrada de ADN

Sangre (línea germinal)

Se estableció el rango de entrada de ADN en sangre para la preparación de la biblioteca TruSeq Custom Amplicon Kit Dx utilizando el flujo de trabajo del Módulo de variante de línea germinal para NextSeq 550Dx instrument. Este rango se evaluó mediante la realización de un estudio de dilución en serie utilizando 13 muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para consultar varios genes que cubren 12 588 bases en 23 cromosomas diferentes. La biblioteca se secuenció en dos NextSeq 550Dx instruments utilizando un lote de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Se analizaron cinco muestras por duplicado en cinco niveles de entrada de ADN que oscilaron entre 250 ng y 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng y 12 ng). Se analizaron ocho muestras como una sola réplica en cada uno de los cinco niveles de entrada de ADN. Para determinar la exactitud, se compararon los genotipos de las muestras con Platinum Genomes versión 2016-1.0. Se determinaron los resultados para cada nivel de entrada. La PPA para cada tipo de variante (SNV, inserciones y deleciones) se presenta en la [Tabla 1](#); la NPA se presenta en la [Tabla 2](#). Todos los niveles de entrada tuvieron una exactitud similar. La entrada de ADN recomendada para TruSeq Custom Amplicon Kit Dx es de 50 ng con 25 ng y 100 ng, lo que proporciona un límite inferior y superior para cumplir con las características de rendimiento.

Tabla 1 Resultados de PPA para cada entrada de ADN por tipo de variante

Entrada de ADN (ng)	Tipo de variante	Variantes esperadas	TP	FN	Variante de ausencia de llamadas	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100

12	Inserción	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Delección	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabla 2 NPA para cada entrada de ADN

Entrada de ADN (ng)	TN	FP	Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (somáticas)

Se estableció el rango de entrada de ADN fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE) para la preparación de la biblioteca TruSeq Custom Amplicon Kit Dx utilizando el flujo de trabajo del Módulo de variantes somáticas para NextSeq 550Dx instrument. El rango de entrada de ADN se evaluó mediante la realización de un estudio de dilución en serie utilizando tres muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para consultar varios genes que cubren 12 588 bases en 23 cromosomas diferentes. Las líneas celulares de Platinum Genomes GM12878 y GM12877 se fijaron con formalina y embebieron en parafina, y luego se les extrajo ADN. GM12878 se diluyó con GM12877 de manera que las frecuencias alélicas de variantes (VAF) de 79 variantes (55 SNV, 9 inserciones y 15 delecciones) fueron cercanas a 0,025, 0,05 o 0,10. Además, cada muestra tenía 91 variantes con frecuencias de variantes más altas de hasta VAF de 1,0. Las muestras se procesaron por duplicado en cinco niveles de entrada de ADN con un ciclo cuantitativo medio delta (dCq) de 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 y 7,8 según lo medido por el Kit de control de calidad TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE. Cada biblioteca se secuenció en dos NextSeq 550Dx instruments utilizando dos lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). Para determinar la exactitud, se compararon las llamadas de variantes de las muestras con Platinum Genomes versión 2016-1.0. La PPA para cada tipo de variante (SNV, inserciones y

deleciones) se presenta en la [Tabla 3](#); la NPA se presenta en la [Tabla 4](#). La entrada de ADN recomendada para variantes a una VAF de 0,05 o más es $dCq \leq 4$, y 4,6 es el límite inferior para cumplir con las características de rendimiento.

Tabla 3 Resultados de PPA para cada entrada de ADN por tipo de variante

Media de dCq	Tipo de variante	Variantes esperadas	Ausencia de llamadas esperada	VAF de dilución objetiva					
				0,025		0,05		0,10	
				Variante de ausencia de llamadas	PPA (%)	Variante de ausencia de llamadas	PPA (%)	Variante de ausencia de llamadas	PPA (%)
2,1	SNV	808	No corresponde.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Inserción	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Delección	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabla 4 NPA para cada entrada de ADN

Media de dCq	Tipo de comodín esperado	VAF de dilución objetiva					
		0,025		0,05		0,10	
		Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)	Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)	Ausencia de llamadas de referencia	NPA (%)

2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

Sensibilidad analítica (límite de blanco [LoB] y límite de detección [LoD])

Este estudio se llevó a cabo para evaluar el Límite de blanco (LoB) y el Límite de detección (LoD) para el Módulo de variantes somáticas en NextSeq 550Dx instrument. Esto se realizó mediante el uso de un ensayo representativo diseñado para consultar varios genes que cubren 12 588 bases en 23 cromosomas diferentes. Las líneas celulares de Platinum Genomes GM12878 y GM12877 estaban fijadas con formalina y embebidas en parafina, seguidas de extracción de ADN. GM12878 se diluyó con GM12877 de manera que las frecuencias de variantes de 74 variantes (53 SNV, 7 inserciones y 14 deleciones) fueron $0,05 \pm 0,02$. GM12877 y GM12878 diluida (GM12878-D) se evaluaron durante seis días de inicio consecutivos con un solo instrumento, alternando entre dos lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos), para un total de seis ejecuciones de secuenciación. Esta prueba dio como resultado 60 réplicas para cada variante en GM12878-D y 72 réplicas para cada coordenada en estado natural correspondiente en GM12877 para cada lote de reactivo. El LoB y el LoD se calcularon utilizando el enfoque clásico establecido en CLSI EP17-A2 utilizando la opción no paramétrica. El LoB y el LoD se calcularon para SNV, inserciones y deleciones por separado al agrupar las frecuencias de variantes para un tipo de variante dado. El error de Tipo I se definió como 0,01 y el error de Tipo II se definió como 0,05. Para el LoB, las frecuencias de variantes agrupadas se clasificaron de menor a mayor, y se calculó la posición del rango 99 para cada lote de reactivo para cada tipo de variante (Tabla 5). El Módulo de variantes somáticas utiliza un corte (el LoB efectivo) de una VAF de 0,026 para determinar la detección cualitativa de variantes. El LoB calculado verificó que este corte da como resultado un error de Tipo I de no más de 0,01.

Tabla 5 Límite de blanco

Tipo de variante	Observaciones totales	Lote 1 de reactivo de LoB (%)	Lote 2 de reactivo de LoB (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Inserción	504	0,56	0,56
Delección	1008	1,20	1,20

Para el LoD, se calculó el porcentaje de frecuencia de mutación individual para cada lote de reactivos para cada tipo de variante que se encuentra por debajo del corte de 0,026 en la Tabla 6. Debido a que los porcentajes fueron menores que el error de Tipo II del 5 % (0,05), la mediana de las frecuencias de variantes combinadas se calculó como el LoD (Tabla 6). El LoD para cada tipo de variante se tomó como el mayor de los dos valores calculados para los dos lotes de reactivos: 4,97 % para SNV, 5,12 % para inserciones y 5,26 % para deleciones.

Tabla 6 Límite de detección

Lote de	Tipo de	Observaciones	Número de mediciones	Número de mediciones	Límite de
---------	---------	---------------	----------------------	----------------------	-----------

reactivos	variante	totales	de VAF <2,6 %	de VAF <2,6 %	detección (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Inserción	420	6	1,4	5,08
	Delección	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Inserción	420	5	1,2	5,12
	Delección	840	7	0,80	5,26

Exactitud

Línea germinal

El siguiente estudio se llevó a cabo para evaluar la exactitud de la llamada de variantes del Módulo de variantes de línea germinal en NextSeq 550Dx instrument utilizando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). Se analizaron 13 muestras únicas de Platinum Genomes utilizando un ensayo representativo diseñado para consultar una variedad de genes que cubren 12 588 bases (150 amplicones) en 23 cromosomas diferentes. Se realizó un total de nueve ejecuciones utilizando tres instrumentos de secuenciación, tres lotes de reactivos y tres operadores durante cinco días de inicio. Se determinó la exactitud para SNV, inserciones y deleciones comparando los resultados con un método de referencia compuesto bien caracterizado, Platinum Genomes versión 2016-1.0. Las regiones genómicas de confianza se definieron en función de este método de referencia, a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 7 Resumen de la concordancia de línea germinal

Criterios	Total de observaciones ¹	Resultado por observación ²	Resultado por ejecución ³
PPA para SNV	819	98,7	>99,9
PPA para inserciones	819	95,0	98,9
PPA para deleciones	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Calculado como el número de muestras por ejecución (91) x el número de ejecuciones (9) = 819.

²Valor más bajo observado por réplica de muestra en las 9 ejecuciones.

³Valor más bajo cuando los datos de cada ejecución se analizan en conjunto.

La [Tabla 8](#) contiene los datos del estudio presentados con concordancia porcentual positiva y negativa por muestra, donde los resultados de las variantes se comparan con Platinum Genomes, versión 2016-1.0, para los cálculos de la PPA. Se combinan los tres tipos de variantes (SNV, inserciones y deleciones). Debido a que el

método de referencia solo proporciona resultados para las variantes de nucleótido único y las inserciones/deleciones, los resultados de la base no variante se comparan con la construcción hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano para los cálculos de la NPA.

Tabla 8 Concordancia de línea germinal por muestra

Muestra	Tasa media de llamadas	Variantes esperadas ¹	TP	FN	Variante de ausencia de llamadas	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Número total de variantes en todas las réplicas de muestras en 9 ejecuciones.

La [Tabla 9](#) contiene los datos del estudio presentados por muestra, donde los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto bien caracterizado. La detección se evalúa para cada tipo de variante, SNV, inserciones y deleciones, por separado. Se excluyen las posiciones de referencia.

Tabla 9 Concordancia de línea germinal por muestra por tipo de variante

Muestra	SNV			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0

Muestra	SNV			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Las muestras se analizaron, además, para llamar pequeñas inserciones y deleciones (indels). En la [Tabla 10](#) se presenta un resumen general. Hubo un total de 71 indels que variaron en tamaño de 1 a 24 pb para las inserciones y de 1 a 25 pb para las deleciones.

Tabla 10 Resumen de la detección de indels de la línea germinal

Variante Tipo	Variantes previstas	TP	FN	Variante de ausencia de llamadas	PPA
Inserción	18522	18018	27	477	99,9
Delección	17388	17073	0	315	100

El ensayo representativo consistió en 150 amplicones diseñados para cubrir diversos contenidos genómicos. El contenido de GC de los amplicones osciló entre 0,19 y 0,87. Los amplicones también tuvieron un intervalo de repeticiones de nucleótido único (p. ej., PoliA, PoliT), dinucleótidos y trinucleótidos. Los datos se compilaron por amplicón (Tabla 11) para determinar el efecto del contenido genómico en el porcentaje de llamadas correctas. El porcentaje de llamadas correctas consiste en llamadas de variante y de referencia, y es inferior al 100 % si hay llamadas incorrectas o hay ausencia de llamadas.

Tabla 11 Precisión a nivel de amplicón de la línea germinal

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli A (5), Poli C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/C	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli T (5), Poli A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/C	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli A (5), Poli T (5), Poli A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli G (6), Poli T (5), Poli A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/C	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N/C	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/C	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N/C	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli G (6), Poli C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/C	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/C	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N/C	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poli T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli A (5), Poli T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N/C	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/C	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/C	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/C	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N/C	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli A (5)	0,4	59787	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
73	11	101347052	101347136	85	85	N/C	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poli C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/C	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N/C	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli A (5), Poli T (7), Poli A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/C	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/C	0,36	74529	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/C	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/C	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N/C	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/C	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N/C	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N/C	0,64	57330	0	0	100

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Extremo del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
127	20	746056	746149	94	94	N/C	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli T (5), Poli A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N/C	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/C	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/C	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/C	0,55	0	0	0	N/C
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/C	0,48	0	0	0	N/C
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli A (5)	0,37	0	0	0	N/C

Los resultados de secuenciación de la muestra NA12878 se compararon con un genotipo de alta confianza para NA12878, establecido por los Institutos Nacionales de Normas y Tecnología (NIST) (v.2.19). De los 150 amplicones, 92 amplicones estaban completamente contenidos dentro de las regiones genómicas de alta confianza, 41 amplicones tenían superposición parcial y 17 amplicones no tenían superposición en la secuencia de los NIST. Este resultado dio como resultado 10 000 coordenadas por réplica para la comparación. Las llamadas base de no variantes se compararon con la construcción hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Los resultados de exactitud se muestran en la [Tabla 12](#).

Tabla 12 Concordancia de línea germinal de la muestra NA12878 con la base de datos de los NIST

Muestra	N.º de amplicones	Tasa media de llamadas	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

En función de los datos proporcionados por este estudio de línea germinal de nueve ejecuciones, NextSeq 550Dx instrument puede secuenciar sistemáticamente:

- Contenido de GC $\geq 19\%$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados con el 19 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,6 %).
- Contenido de GC $\leq 87\%$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados con el 87 % de contenido de GC y no hubo ninguna ausencia de llamadas).
- Longitudes de poli-A ≤ 9 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poli-A de nueve nucleótidos y no hubo ninguna ausencia de llamadas).
- Longitudes de poli-T ≤ 10 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poli-T de diez nucleótidos y no hubo ninguna ausencia de llamadas).
- Longitudes de poli-G ≤ 7 (todas llamadas bases en amplicones secuenciados 819 que contenían una repetición de poli-G de siete nucleótidos llamados correctamente y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,0 %).
- Longitudes de poli-C ≤ 6 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 2457 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poli-C de seis nucleótidos y no hubo ninguna ausencia de llamadas).
- Longitudes de repetición de dinucleótidos $\leq 11x$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados que contenían una repetición de dinucleótidos de 11x y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,5 %).
- Longitudes de repetición de trinucleótidos $\leq 5x$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 819 amplicones secuenciados que contenían una repetición de trinucleótidos de 5x y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,5 %).

- Longitudes de inserción ≤ 24 (se llamaron correctamente 66 343 de 66 370 bases llamadas de 819 amplicones secuenciados que contenían una inserción de 24 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1.2 %; no se produjeron llamadas incorrectas en la región que contenía la inserción de 24 nucleótidos).
- Longitudes de delección ≤ 25 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 2457 amplicones secuenciados que contenían una delección de 25 nucleótidos y no hubo ninguna ausencia de llamadas).

Somática

El estudio descrito se utilizó para evaluar la exactitud de las llamadas de variantes del Módulo de variantes somáticas en NextSeq 550Dx instrument utilizando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Este estudio utilizó un ensayo representativo diseñado para consultar una variedad de genes que cubren 12 588 bases (150 amplicones) en 23 cromosomas diferentes. El ADN de Platinum Genomes se extrajo de bloques tratados con FFPE para generar seis muestras únicas para su evaluación en el estudio.

El ADN de la muestra GM12877 se diluyó con el ADN de la muestra GM12878 para crear GM12877-D5 y GM12877-D7 como un conjunto de variantes heterocigóticas únicas con frecuencias de variantes cercanas al 5 % y al 7 %. El ADN de la muestra GM12878 se diluyó de manera similar con el ADN de la muestra GM12877 para crear GM12878-D5 y GM12878-D7. Cada una de las muestras se analizó por triplicado, excepto las muestras diluidas, que se analizaron en réplicas de seis. Se realizó un total de nueve ejecuciones utilizando tres instrumentos de secuenciación, tres lotes de reactivos y tres operadores durante cinco días de inicio. Se determinó la exactitud de las SNV, inserciones y delecciones mediante la comparación de los resultados con el método de referencia compuesto bien caracterizado, Platinum Genomes, versión 2016- 1.0. Se definieron regiones genómicas de confianza en función de este método de referencia, a menos que se especifique lo contrario.

Tabla 13 Resumen de la coincidencia somática

Crterios	Total de observaciones ¹	Resultado por observación ²	Resultado por ejecución ³
PPA para SNV	378	98,9	99,9
PPA para inserciones	378	96,9	99,9
PPA para delecciones	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Calculado como el número de muestras por ejecución (42) x el número de ejecuciones (9) = 378.

²Valor más bajo observado por réplica de muestra en las 9 ejecuciones.

³Valor más bajo cuando los datos de cada ejecución se analizan en conjunto.

Tabla 14 contiene los datos del estudio presentados con concordancia porcentual positiva y negativa por muestra, donde los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto bien caracterizado para los cálculos de la PPA. Se combinan los tres tipos de variantes (SNV, inserciones y

deleciones). Debido a que el método de referencia solo proporciona resultados para las variantes de nucleótido único y las inserciones/deleciones, los resultados de la base no variante se comparan con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano para los cálculos de la NPA.

Tabla 14 Coincidencia somática por muestra

Muestra	Tasa media de llamadas	Previsto	TP	FN	Variante de ausencia de llamadas	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

La [Tabla 15](#) contiene los datos del estudio presentados por muestra, donde los resultados de las variantes se comparan con el método de referencia compuesto bien caracterizado. La detección se evalúa para cada tipo de variante, SNV, inserciones y deleciones, por separado. Se excluyen las posiciones de referencia.

Tabla 15 Concordancia somática por muestra por tipo de variante

Muestra	SNV			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0

Muestra	SNV			Inserciones			Deleciones		
	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN	Previsto	TP	FN
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Las diez muestras se analizaron con una mayor profundidad para llamar pequeñas inserciones y deleciones (indels) (Tabla 16). Hubo un total de 71 indels que variaron en tamaño de 1 a 24 pb para las inserciones y de 1 a 25 pb para las deleciones.

Tabla 16 Resumen de detección de indel somática

Tipo de variante	Variantes previstas	TP	FN	Variante de ausencia de llamadas	PPA
Inserción	10773	10282	9	482	99,2
Delección	11502	10667	5	830	>99,9

Los 150 amplicones se diseñaron para cubrir diversas clases de contenido genómico. El contenido de GC de los amplicones oscilaba entre el 0,19 % y el 0,87 %. Los amplicones también contenían un intervalo de repeticiones de nucleótido único (por ejemplo, PoliA, PoliT), de dinucleótidos y de trinucleótidos. Los datos se compilaron por amplicón (Tabla 17) para determinar el efecto del contenido genómico en el porcentaje de llamadas correctas. El porcentaje de llamadas correctas consiste en llamadas de variante y de referencia y es inferior al 100 % si hay llamadas incorrectas o no hay llamadas.

Tabla 17 Precisión somática a nivel de amplicón

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli A (5), Poli C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	N/C	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli T (5), Poli A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	N/C	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/C	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli A (5), Poli T (5), Poli A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli G (6), Poli T (5), Poli A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	N/C	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	N/C	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	N/C	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	N/C	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli G (6), Poli C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	N/C	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	N/C	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	N/C	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli G (5), indel	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poli T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli A (5), Poli T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	N/C	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	N/C	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	N/C	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	N/C	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	N/C	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli A (5)	0,4	27516	0	78	99,7

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
73	11	101347052	101347136	85	85	N/C	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poli C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	N/C	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	N/C	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli A (5), Poli T (7), Poli A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	N/C	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	N/C	0,36	34286	0	112	99,7

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	N/C	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	N/C	0,37	34386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	N/C	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	N/C	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	N/C	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	N/C	0,64	26442	0	26	99,9

Amplicón	Cromosoma	Inicio del amplicón	Final del amplicón	Tamaño del fragmento analizado	Bases en regiones de confianza	Contenido genómico del amplicón	Contenido de GC	Llamadas correctas	Llamadas incorrectas	Ausencia de llamadas	% de llamadas correctas
127	20	746056	746149	94	94	N/C	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli T (5), Poli A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	N/C	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	N/C	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	N/C	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/C	0,55	0	0	0	N/C
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/C	0,48	0	0	0	N/C
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli A (5)	0,37	0	0	0	N/C

Los resultados de secuenciación de la muestra GM12878 se compararon con un genotipo altamente seguro para NA12878, establecido por los Institutos Nacionales de Normas y Tecnología (NIST) (v.2.19). De los 150 amplicones, 92 amplicones estaban completamente contenidos dentro de las regiones genómicas de alta confianza, 41 amplicones tenían superposición parcial y 17 amplicones no tenían superposición en la secuencia de los NIST. Este resultado dio como resultado 10 000 coordenadas por réplica para la comparación. Las llamadas base sin variantes se compararon con el conjunto hg19 de la secuencia de referencia del genoma humano. Los resultados de exactitud se muestran en la [Tabla 18](#).

Tabla 18 Coincidencia somática de la muestra GM12878 con la base de datos del NIST

Muestra	N.º de amplicones	Tasa media de llamadas	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

En función de los datos proporcionados por este estudio somático de nueve ejecuciones, NextSeq 550Dx instrument puede secuenciar de manera consistente:

- Contenido de GC ≥ 19 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados con el 19 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 2,6 %)
- Contenido de GC ≤ 87 % (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados con el 87 % de contenido de GC y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,6 %)
- Longitudes de poliA ≤ 9 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poliA de nueve nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 2,5 %)
- Longitudes de poliT ≤ 10 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poliT de diez nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas inferior al 0,1 %)
- Longitudes de poliG ≤ 6 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 2268 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poliG de seis nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,5 %)
- Longitudes de poliC ≤ 6 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 756 amplicones secuenciados que contenían una repetición de poliC de seis nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,4 %)
- Longitudes de repetición de dinucleótidos $\leq 4x$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1890 amplicones secuenciados que contenían una repetición de dinucleótidos de 4x y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,9 %)
- Longitudes de repetición de trinucleótidos $\leq 5x$ (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados que contenían una repetición de trinucleótidos de 5x y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 1,4 %)

- Longitudes de inserción ≤ 23 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 378 amplicones secuenciados que contenían una inserción de 23 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,8 %)
- Longitudes de deleción ≤ 25 (se llamaron correctamente todas las bases llamadas de 1134 amplicones secuenciados que contenían una deleción de 25 nucleótidos y se obtuvo un índice de ausencia de llamadas del 0,7 %)

Precisión

La precisión de NextSeq 550Dx instrument se determinó analizando 13 muestras únicas de Platinum Genomes utilizando tres instrumentos, tres lotes de reactivos y tres operadores para generar nueve ejecuciones de secuenciación durante cinco días de inicio. El ensayo representativo, las muestras y el método de referencia son los mismos que los descritos para el estudio de exactitud de la línea germinal. Las contribuciones de precisión se determinaron mediante análisis de componentes de varianza utilizando la VAF como variable de respuesta y calculando las desviaciones estándar a nivel de componente para el instrumento, el lote de reactivos, el operador y el día de inicio (Tabla 19). El número total de observaciones utilizadas en el análisis para cada componente de la variabilidad del instrumento, del operador o del lote de reactivos fue de 699, 176 y 235 para SNV, inserciones y deleciones, respectivamente.

Tabla 19 Resultados de precisión para NextSeq 550Dx Instrument (desviación estándar)

Componente	Tipo de variante	SD del componente		SD total	
		Máx.	Mediana	Máx.	Mediana
Lote	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inserción	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deleción	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrumento	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inserción	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deleción	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operador	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inserción	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deleción	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Día	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inserción	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deleción	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Comparación de métodos (plataforma de secuenciación)

Las muestras de sangre entera y FFPE se evaluaron en NextSeq 550Dx instrument y MiSeqDx instrument utilizando la línea germinal y los flujos de trabajo somáticos de TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Se evaluó la concordancia de la frecuencia de las variantes para las muestras de sangre y FFPE utilizando múltiples ensayos representativos. La [Figura 2](#) representa la correlación de VAF entre los dos instrumentos para un ensayo representativo y la [Tabla 20](#) resume esta correlación por panel de ensayo. En función de la fuerte correlación entre MiSeqDx instrument y NextSeq 550Dx instrument, se determina que las características de rendimiento relacionadas con factores preanalíticos (p. ej., métodos de extracción o sustancias que interfieren) son aplicables a ambos instrumentos. Consulte el prospecto de TruSeq Custom Amplicon Kit Dx para obtener más información.

Figura 2 Correlación de VAF de MiSeqDx con NextSeq 550Dx Instruments para muestras de FFPE (izquierda) y sangre (derecha) usando el ensayo 1

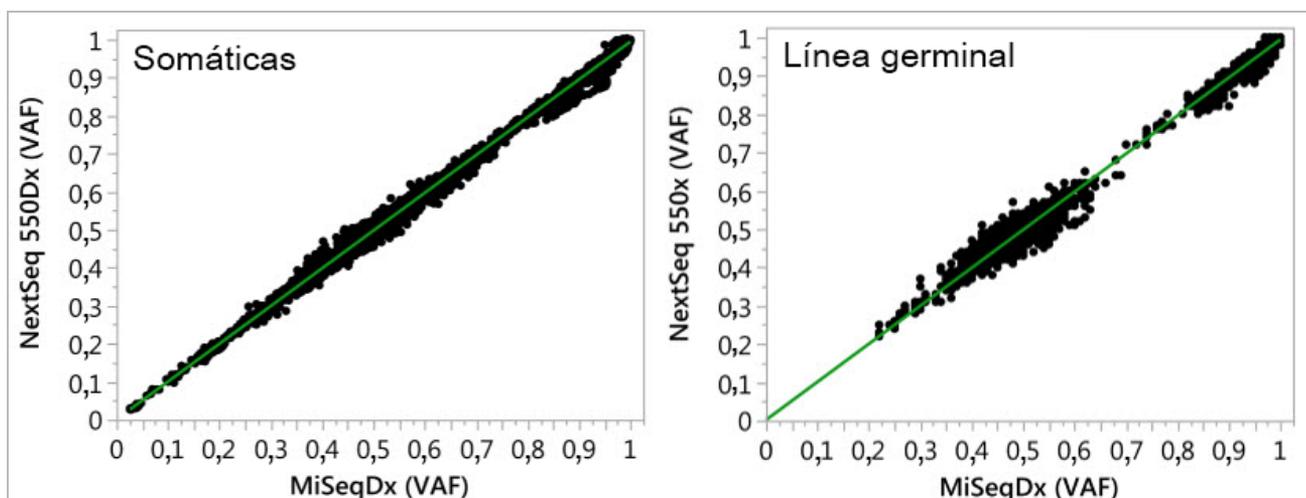


Tabla 20 Resultados de la comparación de métodos utilizando muestras únicas de sangre y FFPE

Fuente de ADNg	Ensayo (panel oligo)	Replicados biológicos (muestras)	Replicaciones técnicas (por muestra)	Observaciones (número de variantes)	Pendiente	Intersección	Correlación (R ²)
Sangre	Ensayo 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Sangre	Ensayo 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Ensayo 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Ensayo 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Se eliminaron dos puntos de datos en función de la limitación establecida para el Módulo de la variante de línea germinal.

²Coefficiente de determinación para los gráficos de VAF como se ilustra en la Figura 2.

Reproducibilidad

La reproducibilidad de NextSeq 550Dx instrument se evaluó mediante el uso de muestras de Platinum Genomes con un ensayo representativo diseñado para consultar una variedad de genes que cubren 12 588 bases en 23 cromosomas diferentes mediante el uso de 150 amplicones. Las pruebas de línea germinal consistieron en siete replicados de 13 muestras; las pruebas somáticas consistieron en seis replicados de siete muestras en diferentes niveles de la VAF. Las muestras se prepararon con TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Las pruebas se realizaron en tres centros externos utilizando un lote de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). Se utilizó un único NextSeq 550Dx instrument en cada centro. Dos operadores realizaron las pruebas en cada centro. Cada operador realizó pruebas en tres días de inicio no consecutivos para cada tipo de muestra para un total de 36 ejecuciones en los tres centros. Esta prueba dio como resultado 18 ejecuciones para cada línea germinal y flujos de trabajo somáticos.

Línea germinal

Las variantes de la línea germinal con un nivel de VAF $\geq 0,2$ se informan como (variante) positiva. Para las variantes de la línea germinal positivas esperadas, los datos se evaluaron para determinar la tasa de ausencia de llamadas y corregir la tasa de llamadas positivas dentro de cada tipo de variante (SNV, inserción, delección). La [Tabla 21](#) resume las tasas observadas, junto con los niveles de confianza inferior y superior (LCL/UCL) al 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabla 21 Observaciones de llamadas de línea germinal para resultados positivos esperados por tipo de variante

Tipo de variante	Ausencia de llamadas			Corregir llamada positiva				
	Observada	Total	Porcentaje	Observada	Total	Porcentaje	LCL del 95 %	UCL del 95 %
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Inserciones	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delecciones	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Las variantes de la línea germinal con un nivel de VAF $< 0,2$ se informan como negativas (en estado natural). Para las ubicaciones de línea germinal negativas esperadas, los datos se evaluaron para detectar ausencia de llamadas y corregir las tasas de llamadas en estado natural. La [Tabla 22](#) resume las tasas observadas, junto con los niveles de confianza inferior y superior (LCL/UCL) al 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Tabla 22 Observaciones de llamadas de línea germinal para resultados negativos esperados

Tipo de variante	Ausencia de llamadas			Corregir llamada negativa				
	Observada	Total	Porcentaje	Observada	Total	Porcentaje	LCL del 95 %	UCL del 95 %
En estado natural	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Las variantes de la línea germinal con un nivel de VAF $\geq 0,2$ y $< 0,7$ se denominan heterocigóticas positivas para la variante, y las variantes con un nivel de VAF $\geq 0,7$ se denominan homocigóticas positivas para la variante. Se utilizaron muestras de línea germinal con variantes heterocigóticas para determinar si la variabilidad inherente del ensayo afectaría la llamada de genotipo. Se determinó el valor Cx para ambos cortes (0,2 para genotipos heterocigóticos y 0,7 para genotipos homocigóticos), donde x es la proporción de pruebas repetidas que exceden el corte. Para el corte inferior de una VAF de 0,2, el valor de Cx fue $\geq 99,999$ %, lo que indica que $\geq 99,999$ % de las variantes heterocigóticas se denominarían heterocigóticas. Con respecto al corte superior de una VAF de 0,7, el valor de Cx fue $\leq 0,001$ %, lo que indica que $\leq 0,001$ % de las variantes heterocigóticas se denominarían homocigóticas. La [Tabla 23](#) resume los resultados por tipo de variante.

Las variantes de la línea germinal con un nivel de VAF $\geq 0,2$ y $< 0,7$ se denominan heterocigóticas positivas para la variante, y las variantes con un nivel de VAF $\geq 0,7$ se denominan homocigóticas positivas para la variante. Se utilizaron muestras de línea germinal con variantes heterocigóticas para determinar si la variabilidad inherente del ensayo afectaría la llamada de genotipo. Se determinó el valor Cx para ambos cortes (0,2 para genotipos heterocigóticos y 0,7 para genotipos homocigóticos), donde x es la proporción de pruebas repetidas que exceden el corte. Con respecto al corte inferior de una VAF de 0,2, el valor de Cx fue $\geq 99,999$ %, lo que indica que $\geq 99,999$ % de las variantes heterocigóticas se denominarían heterocigóticas. Para el corte superior de una VAF de 0,7, el valor de Cx fue $\leq 0,001$ %, lo que indica que $\leq 0,001$ % de las variantes heterocigóticas se denominarían homocigóticas. La [Tabla 23](#) resume los resultados por tipo de variante.

Tabla 23 Valores de Cx de la línea germinal para variantes heterocigóticas

Tipo de variante	Corte a VAF de 0,2	Corte a VAF de 0,7
	$\geq C99,999$ %	$\leq C0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Inserciones	24/24	24/24
Deleciones	35/35	35/35
Total	153	153

Somáticas

Las variantes somáticas con un nivel de VAF $\geq 0,026$ se informan como (variante) positiva. Las observaciones con niveles de VAF $\geq 0,01$ y $< 0,026$ se consideraron equívocas para los fines de este análisis (ni positivas ni negativas, marcadas como de baja frecuencia de variantes). Para evaluar el rendimiento, se calcularon los resultados de tres maneras:

- Caso más favorable: Los resultados equívocos se consideraron llamadas positivas correctas (coincidencia con los resultados esperados)
- Caso menos favorable: Los resultados equívocos se consideraron llamadas incorrectas (discrepancia con los resultados esperados)
- Caso de exclusión: Los resultados equívocos fueron excluidos del análisis

Tres tablas, [Tabla 24](#), [Tabla 25](#) y [Tabla 26](#), resumen los resultados de la llamada para caso más favorable, el caso menos favorable y el caso de exclusión, respectivamente, junto con los niveles de confianza inferior y superior (LCL/UCL) al 95 % calculados utilizando el método de puntuación de Wilson.

Tabla 24 Observaciones de llamadas somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante (caso más favorable)

Tipo de variante	Corregir llamada positiva				
	Observada	Total	Porcentaje	LCL del 95 %	UCL del 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inserciones	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Deleciones	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabla 25 Observaciones de llamadas somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante (caso menos favorable)

Tipo de variante	Corregir llamada positiva				
	Observada	Total	Porcentaje	LCL del 95 %	UCL del 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inserciones	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Deleciones	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabla 26 Observaciones de llamadas somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante (se eliminaron las llamadas equívocas)

Tipo de variante	Corregir llamada positiva				
	Observada	Total	Porcentaje	LCL del 95 %	UCL del 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inserciones	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Deleciones	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Las variantes somáticas con un nivel de VAF <0,01 se informan como negativas (en estado natural). Para las ubicaciones somáticas negativas esperadas, los datos se evaluaron para detectar la tasa de ausencia de llamadas y corregir la tasa de llamadas en estado natural. Las llamadas en estado natural correctas se determinaron excluyendo la ausencia de llamadas y restando las llamadas observadas que pertenecían a la zona equívoca (niveles de VAF $\geq 0,01$ y $< 0,026$), así como las llamadas incorrectas que estuvieron por encima del corte (niveles de VAF $\geq 0,026$) del total. La [Tabla 27](#) resume los resultados observados, totales y

porcentuales para las ubicaciones somáticas negativas para la tasa de ausencia de llamadas y la tasa de llamadas en estado natural correctas junto con los niveles de confianza inferior y superior (LCL/UCL) del 95 % calculados usando el método de puntuación de Wilson.

Tabla 27 Observaciones de llamadas somáticas para resultados negativos esperados

Variante Tipo	Ausencia de llamadas			Llamada correcta			LCL del 95 %	UCL del 95 %	
	Observada	Total	Porcentaje	Equívoca	Incorrecta	Correcta			Total
En estado natural	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972 99,974

Se evaluaron muestras somáticas a diferentes niveles de VAF para la misma variante para determinar el C95 del ensayo (dentro de cada tipo de variante). Para evaluar la variabilidad cerca del corte del ensayo, se utilizaron muestras que tenían niveles esperados de VAF de entre 0,02 y 0,07. Se determinó el valor de C95 para cada variante, y el valor de C95 más alto para cada tipo de variante se informa en la [Tabla 28](#).

Tabla 28 Resumen del valor de C95 somático

Tipo de variante	N	C95
SNV	74	0,0613
Inserción	24	0,0573
Delección	33	0,0575

Rendimiento de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos)

Descripción general

NextSeq 550Dx es compatible con dos kits de reactivos: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Para demostrar que NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) puede cumplir con los requisitos de rendimiento analítico verificados y validados con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos), se realizaron estudios con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Se realizaron dos preparaciones de biblioteca con el TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, una con el flujo de trabajo de línea germinal y la otra con el flujo de trabajo de variantes somáticas. Las bibliotecas de cada flujo de trabajo se probaron con tres lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) utilizando tres NextSeq 550Dx instruments. Además, las pruebas para cada flujo de trabajo incluyeron una sola ejecución con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Sensibilidad analítica (límite de blanco [LoB] y límite de detección [LoD])

La verificación con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) demostró que NextSeq 550Dx instrument podría detectar variantes a la VAF de 0,05 con un error de Tipo II $\leq 0,05$ y que el corte de la VAF de 0,026 utilizado por el Módulo de variantes somáticas (LoB efectivo) admite un error de Tipo I $\leq 0,01$. En función de estas afirmaciones, se espera que una variante a VAF de 0,05 sea mayor o igual a una VAF de 0,026 el 95 % del tiempo y que una posición en estado natural sea menor que una VAF de 0,026 el 99 % del tiempo. Para asegurarse de que estas afirmaciones se cumplieran con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos), se realizaron mediciones repetidas en NextSeq 550Dx instrument con muestras en estado natural (muestras LoB) y con muestras que contenían variantes a una VAF de 0,05 (muestras LoD) usando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). La proporción de llamadas por encima y por debajo del corte de 0,026 se comparó luego con las afirmaciones establecidas con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Las pruebas incluyeron dos muestras de LoD, cada una con un conjunto único de variantes dirigidas a una VAF de 0,05 y muestras de LoB correspondientes que estaban en estado natural para variantes dirigidas. Para la preparación de la biblioteca, las muestras de LoD y LoB se procesaron en réplicas de ocho y siete, respectivamente, mediante el uso del TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Las bibliotecas inicialmente se secuenciaron con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) para identificar variantes/coordenadas genómicas para la evaluación de LoB/LoD con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Todas las variantes con una VAF promedio de entre 0,045 y 0,055 (variantes del LoD) en función de los resultados de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) se utilizaron para el análisis del LoD (N = 51 variantes). Para el análisis de LoB, se evaluaron las 51 coordenadas genómicas correspondientes.

Para la evaluación de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos), las bibliotecas se secuenciaron en tres ejecuciones durante tres días consecutivos utilizando el mismo instrumento y lote de kit de reactivos. Esta prueba ascendió a 24 réplicas para cada una de las 51 variantes de LoD y 21 réplicas para cada una de las posiciones en estado natural correspondientes. La proporción de llamadas en estado natural con una VAF $< 0,026$ se indica en la [Tabla 29](#). La proporción de llamadas de variantes de LoD con una VAF mayor o igual a 0,026 se indica en la [Tabla 30](#).

Tabla 29 Proporción de llamadas $< 0,026$ para posiciones en estado natural (evaluación de afirmación de LoB)

Variante Tipo	Posiciones evaluadas	Observaciones totales	Número de mediciones de VAF $\geq 2,6$ %	Proporción $< 2,6$ %	Proporción 95 % Intervalo de confianza
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Inserción	11	231	0	1	0,984 – 1
Delección	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabla 30 Proporción de llamadas \geq VAF de 0,026 para variantes de LoD (evaluación de afirmación de LoD)

Variante Tipo	Posiciones evaluadas	Observaciones totales	Número de mediciones de VAF <2,6 %	Número de mediciones de VAF \geq 2,6 %	Proporción \geq 2,6 %	Proporción 95 % Intervalo de confianza
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Inserción	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delección	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Exactitud

Línea germinal

El siguiente estudio se llevó a cabo para evaluar la exactitud de las llamadas de variantes del Módulo de variantes de línea germinal utilizando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Se analizaron doce muestras únicas de Platinum Genomes utilizando un ensayo representativo. Se realizó un total de 11 ejecuciones utilizando tres NextSeq 550Dx instruments y tres NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).

Se determinó la exactitud para SNV, inserciones y deleciones comparando los resultados con un método de referencia compuesto bien caracterizado, Platinum Genomes versión 2016-1.0. Se brindan como referencia los resultados de exactitud de una única ejecución de secuenciación con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). En la [Tabla 31](#) se brinda un resumen de los resultados.

Tabla 31 Resumen de la concordancia de línea germinal

Criterios	Observaciones totales (v2.5) ¹	Resultado por observación (v2.5) ²	Resultado por observación (v2) ³	Resultado por ejecución (v2.5) ⁴	Resultado por ejecución (v2) ⁴
PPA para SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA para inserciones	1056	100	100	100	100
PPA para deleciones	1056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Calculado como el número de muestras por ejecución x el número de ejecuciones (96 muestras por ejecución x 11 ejecuciones = 1056 observaciones).

²Valor más bajo observado por réplica de muestra en todas las ejecuciones (basado en 11 ejecuciones para NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Valor más bajo observado por réplica de muestra en 1 ejecución (96 observaciones en total).

⁴ Valor más bajo cuando los datos de cada ejecución se analizan en conjunto.

Somáticas

El siguiente estudio se llevó a cabo para evaluar la exactitud de las llamadas de variantes del Módulo de variantes somáticas en NextSeq 550Dx instrument utilizando NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos). Se analizaron diez muestras de FFPE de Platinum Genomes (dos con variantes diluidas hasta una VAF de 0,05) utilizando un ensayo representativo. Se realizó un total de 11 ejecuciones utilizando tres NextSeq 550Dx instruments y tres lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).

Se determinó la exactitud para SNV, inserciones y deleciones comparando los resultados con un método de referencia compuesto bien caracterizado, Platinum Genomes versión 2016-1.0. Se brindan como referencia los resultados de exactitud de una única ejecución de secuenciación con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). En la [Tabla 32](#) se brinda un resumen de los resultados.

Tabla 32 Resumen de la concordancia somática

Crterios	Observaciones totales (v2.5) ¹	Resultado por observación (v2.5) ²	Resultado por observación (v2) ³	Resultado por ejecución (v2.5) ⁴	Resultado por ejecución (v2) ⁴
PPA para SNV	528	100	100	100	100
PPA para inserciones	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9
PPA para deleciones	528	100	100	100	100
NPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
OPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Calculado como el número de muestras por ejecución x el número de ejecuciones (48 muestras por ejecución x 11 ejecuciones = 528 observaciones).

²Valor más bajo observado por réplica de muestra en todas las ejecuciones (basado en 11 ejecuciones para NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Valor más bajo observado por réplica de muestra en 1 ejecución (96 observaciones en total).

⁴Valor más bajo cuando los datos de cada ejecución se analizan en conjunto.

Precisión

Línea germinal

La precisión de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) con el Módulo de variantes de línea germinal se evaluó utilizando muestras de Platinum Genomes y un ensayo representativo. Las pruebas consistieron en la preparación de una única biblioteca utilizando el TruSeq Custom Amplicon Kit Dx e incluyeron

12 muestras procesadas con ocho réplicas cada una. Las bibliotecas se secuenciaron con tres lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) y tres NextSeq 550Dx instruments para un total de nueve ejecuciones de secuenciación.

Se utilizaron muestras con variantes heterocigóticas para determinar si la variabilidad inherente del ensayo afectaría la llamada de genotipo (N = 153 variantes heterocigóticas únicas). Se determinó el valor Cx para ambos cortes del Módulo de variantes de línea germinal (0,2 para genotipos heterocigóticos y 0,7 para genotipos homocigóticos), donde x es la proporción de pruebas repetidas que exceden el corte. Para el corte inferior de la VAF de 0,2, la variante con el valor de Cx mínimo para NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) fue >99,9 %, lo que indica que >99,9 % de las variantes heterocigóticas se denominaría heterocigóticas. Para el corte superior de la VAF de 0,7, la variante con el valor de Cx máximo para NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) fue <1,5 %, lo que indica que ≤1,5 % de las variantes heterocigóticas se denominaría homocigóticas. La [Tabla 33](#) resume los resultados por tipo de variante. Se brindan como referencia los valores de Cx de una única ejecución de secuenciación con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Tabla 33 Valores de Cx de la línea germinal para variantes heterocigóticas

Tipo de variante	N	Corte a VAF de 0,2		Corte a VAF de 0,7	
		Cx mín. (v2.5) ¹	Cx mín. (v2) ²	Cx máx. (v2.5) ¹	Cx máx. (v2) ²
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Inserciones	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Deleciones	35	100 %	>99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

¹Valores de Cx basados en las estimaciones de Desviación estándar total del análisis de componentes de varianza.

²Valores de Cx basados en Desviaciones estándar de muestra.

Somáticas

La precisión de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) con el Módulo de variantes somáticas se evaluó utilizando muestras FFPE de Platinum Genomes y un ensayo representativo. Las pruebas consistieron en la preparación de una única biblioteca utilizando el TruSeq Custom Amplicon Kit Dx e incluyeron dos muestras con ocho réplicas cada una. Las bibliotecas se secuenciaron con tres lotes de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) y tres NextSeq 550Dx instruments para un total de nueve ejecuciones de secuenciación.

Se utilizaron variantes somáticas con niveles esperados de VAF ≤ VAF de 0,10 (N = 131 variantes únicas) para evaluar la variabilidad del instrumento cerca del corte de la VAF del Módulo de variantes somáticas (las variantes somáticas con nivel de VAF ≥0,026 se denominan positivas para la variante). Se determinaron los valores de C95 para cada una de las variantes somáticas. Los valores de C95 representan la VAF en la que la probabilidad de ser mayor que el corte de la VAF del Módulo de variantes somáticas es del 95 %. Los valores más altos de C95 por tipo de variante se informan en la [Tabla 34](#). Se brindan como referencia los resultados de C95 de una única ejecución de secuenciación con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos).

Tabla 34 Resumen de C95 en somáticas

Tipo de variante	N.º de variantes evaluadas	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Inserciones	24	0,062	0,061
Deleciones	33	0,060	0,060

¹Valores de C95 basados en las estimaciones de Desviación estándar total del análisis de componentes de varianza.

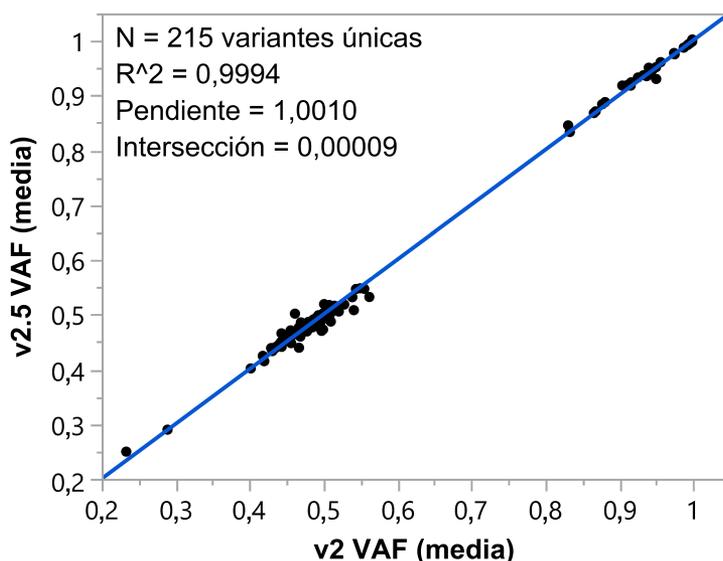
²Valores de C95 basados en Desviaciones estándar de muestra.

Comparación de métodos (kit de reactivos)

Línea germinal

Las VAF promedio para 215 variantes únicas se evaluaron en NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) utilizando los resultados generados a partir del Módulo de variantes de línea germinal. Las VAF promedio se calcularon a partir de 11 ejecuciones de secuenciación (v2.5) y una ejecución de secuenciación (v2). Se utilizaron al menos ocho réplicas para calcular el promedio para cada variante. La [Figura 3](#) representa la correlación de la VAF entre los dos kits de reactivos. En función de la fuerte correlación lineal de la VAF y la similitud en los resultados entre los kits de reactivos, se determina que las características de rendimiento inicialmente verificadas y validadas con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) con el Módulo de variantes de línea germinal son aplicables a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).

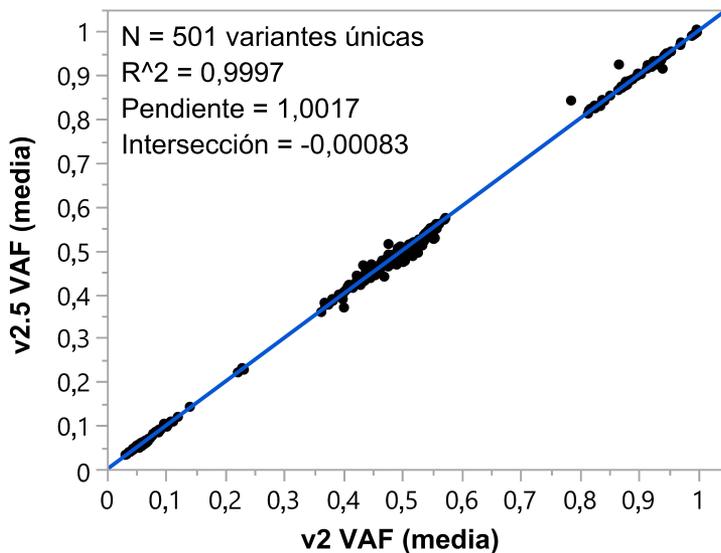
Figura 3 Correlación de la frecuencia alélica de variantes (VAF) del Módulo de variantes de línea germinal entre NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).



Somáticas

Las VAF promedio para 501 variantes únicas se evaluaron en NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos) utilizando los resultados generados a partir del Módulo de variantes somáticas. Las VAF promedio se calcularon a partir de 11 ejecuciones de secuenciación (v2.5) y una ejecución de secuenciación (v2). Se utilizaron al menos tres réplicas para calcular el promedio para cada variante única. La [Figura 4](#) representa la correlación de la VAF entre los dos kits de reactivos. En función de la correlación de la VAF y la similitud en los resultados entre los kits de reactivos, se determina que las características de rendimiento verificadas y validadas con NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) con el Módulo de variantes somáticas son aplicables a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).

Figura 4 Correlación de la frecuencia alélica de variantes (VAF) del Módulo de variantes somáticas entre NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos) y NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciclos).



Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
Documento n.º 1000000030326 v07	Agosto de 2023	Se agregó contenido para admitir Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx opcional. Se actualizó el número de pieza del filtro de aire. Se actualizó el número de variantes FFPE (somáticas) utilizado para determinar las frecuencias de alelos variantes. Se actualizó la tabla Resumen de la concordancia de línea germinal. Se agregó una advertencia de amenazas a la ciberseguridad.
Documento n.º 1000000030326 v06	Mayo de 2022	Actualizaciones realizadas para rectificar contenido agregado inadvertidamente desde el software fuente.
Documento n.º 1000000030326 v05	Noviembre de 2021	Se agregó una declaración de Advertencias y precauciones sobre el informe de incidentes graves. Se agregó una declaración a los Principios de procedimiento que especifica el usuario previsto. Se eliminó la referencia al High Output Reagent Kit v2 (300 ciclos). Se agregó la referencia al High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciclos).
Documento n.º 1000000030326 v04	Agosto de 2021	Se agregó la tabla Historial de revisiones. Se actualizó la dirección del representante autorizado en la UE.

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina"), y tienen como objetivo únicamente el uso contractual de su cliente en relación con el uso del o los producto(s) descrito(s) en el presente y no se le podrá dar ningún otro uso. Ni este documento ni su contenido podrán ser usados ni distribuidos para otro propósito que no sea el indicado en el presente, y de ningún modo podrán ser publicados, divulgados ni reproducidos sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Con este documento Illumina no otorga ninguna licencia bajo su patente, marca comercial, derecho de autor o derecho a emprender acciones conforme al derecho civil o penal ni derechos similares a terceros.

Las instrucciones de este documento deben ser seguidas de manera explícita y estricta por personal calificado y correctamente capacitado, a fin de garantizar el uso adecuado y seguro de los productos descritos en el presente. Se debe comprender y leer en su totalidad el contenido de este documento antes de usar dicho(s) producto(s).

NO LEER TODO EL DOCUMENTO O NO CUMPLIR EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES INCLUIDAS EN EL PRESENTE PUEDE DAÑAR EL O LOS PRODUCTO(S), CAUSAR LESIONES A USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑAR OTRAS PROPIEDADES, Y DEJARÁ SIN EFECTO TODAS LAS GARANTÍAS APLICABLES AL O A LOS PRODUCTO(S).

ILLUMINA NO ASUME NINGUNA RESPONSABILIDAD QUE SURJA DEL USO INDEBIDO DEL O DE LOS PRODUCTO(S) DESCRITO(S) EN EL PRESENTE DOCUMENTO (INCLUIDOS SUS PARTES O EL SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales son propiedad de Illumina, Inc. o sus respectivos dueños. Para obtener información específica sobre marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Información de contacto



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 EE. UU.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Estados Unidos)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
The Netherlands

Patrocinador australiano
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia

Etiquetado del producto

Para obtener una referencia completa de los símbolos que aparecen en el embalaje y etiquetado del producto, consulte la clave de símbolos en support.illumina.com en la pestaña *Documentation* (Documentación) para su kit.